



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

**“CONTRIBUCIÓN DE LA GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS DE PARED CELULAR EN
EL RECONOCIMIENTO INMUNE INNATO DE CANDIDA TROPICALIS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

MARCO JOSUÉ HERNÁNDEZ CHÁVEZ

ASESOR:

DR. HÉCTOR MANUEL MORA MONTES

Guanajuato, Gto., Julio de 2018

Indice	
Indice	1
Resumen	6
Introducción	8
Importancia de la <i>N</i> - y <i>O</i> -glicosilación.....	11
Rutas de la <i>N</i> - y <i>O</i> -glicosilación.....	13
Función del gen <i>OCH1</i>	17
Fosfomananas.....	18
Fosfomanosilación en <i>C.albicans</i>	20
Función del gen <i>OCH1</i> de <i>C. tropicalis</i>	22
Función del gen <i>MNN4</i> de <i>C. tropicalis</i>	22
Función del gen <i>PMR1</i>	23
Función del gen <i>PMR1</i> de <i>C.tropicalis</i>	24
Justificación y objetivos	25
Materiales y Métodos	27
Organismos y Condiciones de Cultivo.....	27
Extracción de ADN genómico.....	32
Extracción de ADN plasmídico.....	33
Reacciones de ligación.....	34
Tinción celular con el colorante azul alciano.....	34
Generación de pACT CtMNN4.....	35
Mutagénesis sitio dirigida de ORF. Ct. <i>OCH1</i>	36
Transformación de <i>C.albicans</i> mediante acetato de litio.....	37
Transformación de <i>C. tropicalis</i> mediante electroporación.....	38
Determinación de glicosilación de la proteína Hex1.....	39
Extracción de paredes celulares de <i>Candida</i>	39
Hidrólisis ácida.....	41
Hidrólisis alcalina.....	41
Determinación de azúcares mediante HPACD.....	41
Efecto de diferentes perturbadores de pared celular.....	42
Determinación de azúcares reductores mediante fenol y ácido sulfúrico.....	43
Obtención de células mono nucleares humanas.....	43
Diferenciación de macrófagos primarios.....	44
Ensayos de fagocitosis y tinción con naranja de acridina.....	44
Cultivo de línea celular Raw 264.7®.....	45
Cuantificación de citocinas.....	45
Ensayos de Virulencia en <i>Galleria Mellonella</i>	46
Obtención de oligomanosas derivados de fosfomananas.....	46
Derivatización de fosfomananas.....	46

Ensayo de FACE	47
Determinación de la porosidad de la pared celular	47
Resultados	48
Complementación de <i>Camnn4Δ</i> con <i>CtMNN4</i> bajo el promotor fuerte <i>CaACT1</i>	48
Complementación de <i>Caoch1Δ</i> con el marco de lectura abierto <i>CtOCH1</i>	50
Estrategia de interrupción de los genes <i>CtMNN4</i> , <i>CtOCH1</i> y <i>CtPMR1</i>	55
Generación de una mutante <i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ</i>	58
Generación de una mutante <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	63
Generación de una mutante <i>Ctpmr1Δ/pmr1Δ</i>	69
Generación de cepas control reintegrantes.....	74
Análisis fenotípico de <i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ</i>	77
Análisis fenotípico de <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	81
Análisis fenotípico de <i>Ctpmr1Δ/pmr1Δ</i>	86
Sensibilidad a agentes perturbadores de pared por parte de las mutantes.....	90
Interacción de <i>Ct</i> silvestre y <i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ</i> con una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 ATCC ® y macrófagos diferenciados humanos.....	94
Las fosfomananas y las β-glucanas son reconocidas por el macrófago pero su exposición es diferente entre <i>C. albicans</i> y <i>C.tropicalis</i>	98
Las mutantes de pared tienen una virulencia atenuada en un modelo de <i>G.mellonella</i>	101
La pérdida de N-mananas y O-mananas de proteínas de pared, pero no así de fosfomananas, afectan la producción de citocinas de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMNC's).....	103
Discusión	108
Conclusiones	115
Perspectivas	117
Bibliografía	118

Indice de Figuras

Figura 1. Pared celular de <i>C. albicans</i>	10
Fig. 2 .Estructura de las <i>N</i> -mananas y <i>O</i> -mananas en <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura.3. PCR de amplificación del marco de lectura abierto de <i>Ct.MNN4</i> de la complementante <i>Camnn4Δ+pACT1-ORF.CtMNN4</i>	48
Figura 4. Niveles de retención del colorante azul alciano por parte de la complementante <i>Camnn4Δ+pACT1-ORF.CtMNN4</i>	49
Figura.5 Amplificación del marco de lectura abierto de <i>Ct.OCH1</i> mediante PCR de una cepa <i>CaOCH1+pACT1-ORF.CtOCH1</i>	51
Figura 6. Niveles de retención del colorante azul alciano por parte de la complementante <i>Caoch1Δ+pACT1-ORF.CtOCH1</i>	53
Figura 7. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de la proteína HexNAcasa.	54
Figura 8. Interacción de <i>Ca silvestre</i> , <i>Caoch1Δ+CaOCH1</i> , <i>Caoch1Δ</i> y <i>Caoch1Δ+CtOCH</i> con diversos agentes perturbadores de pared	55
Figura 9. Diagrama del vector pSFS2, utilizado para la construcción de los casetes de interrupción.....	56
Figura 10. Escrutinio de la correcta integración del casete de interrupción en el <i>locus</i> deseado.....	58
Fig 11. Escrutinio de clonas heterocigotas <i>Ct.MNN4/mnn4Δ</i>	60
Figura 12. Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota <i>Ct.MNN4/mnn4Δ</i> después de la expulsión del marcador de selección	61
Figura 13. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de mutantes homocigotas <i>Ct.mnn4Δ/mnn4Δ</i>	61
Figura 14. Amplificación de la cicatriz de dos clonas homocigotas <i>Ct.mnn4Δ/mnn4Δ</i> después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina.....	62
Figura 15. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de mutantes heterocigotas <i>Ct.OCH1/och1Δ</i>	64
Figura 16 .Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota <i>Ct.OCH1/och1Δ</i> después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina.....	65
Figura 17. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigotas <i>Ct.OCH1/och1Δ</i>	66
Figura 18. Amplificación de la cicatriz de una clona homocigota <i>Ct.och1Δ/och1Δ</i> después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina.....	67

Figura 19. Confirmación de ausencia del marco de lectura abierto <i>Ct. OCH1</i> en la clona homocigota <i>Ct.och1Δ/och1Δ</i>	68
Figura 20. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigotas <i>Ct.PMR1/pmr1Δ</i>	70
Figura 21 .Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota <i>Ct.PMR1/pmr1Δ</i> después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina.....	71
Figura 22. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigota <i>Ct.pmr1Δ/pmr1Δ</i>	72
Figura 23. Confirmación mediante PCR de la homocigocidad de la clona <i>Ct.pmr1Δ/pmr1Δ</i>	73
Figura 24. Escrutinio mediante PCR de una reintegrante <i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ+CtMNN4</i>	76
Figura 25. Análisis fenotípico de la cepa <i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ</i>	78
Figura 26. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul alciano en las cuatro cepas analizadas para estudiar el gen <i>CtMNN4</i>	79
Figura 27. Análisis por FACE de oligosacáridos obtenidos a partir de fosfomananas de <i>C.tropicalis</i>	80
Figura 28. Análisis fenotípico de <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	82
Figura 29. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul alciano por parte de la cepa <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	83
Figura 30. Abundancia relativa de componentes de pared celular en la cepa <i>C.tropicalis</i> silvestre y <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	84
Figura 31. Ensayo de termosensibilidad de <i>C. t</i> silvestre y <i>Ctoch1Δ/och1Δ</i>	85
Fig. 32. Análisis fenotípico de <i>C. tropicalis</i> silvestre y <i>Ctpmr1Δ/pmr1</i>	87
Figura 33. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul Alciano por parte de la cepa <i>Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ</i>	88
Fig. 34. Abundancia relativa de componentes de pared celular en la cepa <i>C.tropicalis</i> silvestre y <i>Ctpmr1Δ/pmr1Δ</i>	89
Figura 35. Las mutantes de pared presentan diferentes grados de sensibilidad a tres agentes perturbadores de pared.....	91
Figura 36. Células de <i>C.tropicalis</i> fagocitadas por macrófagos RAW 264.7 ®... 96	
Figura 37. Células de <i>C. tropicalis</i> y <i>C albicans</i> fagocitadas por macrófagos Humanos.....	97
Figura 38. β-glucanas y fosfomananas están involucradas en el apropiado reconocimiento y fagocitosis por parte del macrófago.....	100
Figura 39. Las mutantes <i>C.tmn4Δ/Ctmnn4Δ</i> , <i>Ctoch1Δ/Ctoch1Δ</i> y <i>Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ</i> presentan virulencia atenuada.....	102

Figura 40. La pérdida de mananas afecta la capacidad de *C. tropicalis* para estimular los PBMCs..... 105

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de cepas utilizadas 28
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados 30
Tabla 3. Composición de pared de *Ct Wt*, *Ctmnn4Δ* y reintegrante..... 80
Tabla 4. Porosidad relativa de la mutante *Ctoch1Δ/och1Δ*..... 85
Tabla 5. Porosidad relativa de la mutante *Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ*..... 90
Tabla 6. Contenido de fosfomananas de *C.albicans* y *C. tropicalis*..... 97

Resumen

Candida albicans y *Candida tropicalis* son organismos levaduriformes que pueden llegar a causar severas infecciones en pacientes inmunocomprometidos.

En *C. albicans*, se sabe que la pared celular se compone de una capa interna de quitina, una capa de β -glucanas y una capa externa de manoproteínas que son manosiladas mediante varias rutas de glicosilación.

En *C. albicans*, el gen *OCH1* está involucrado en la síntesis de la cadena externa de *N*-mananas y es requerido para la integridad celular y virulencia. Por otro lado, *MNN4* está involucrado en la ruta de fosfomanosilación, en la cual son agregados residuos de fosfomananas tanto a *N*- como a *O*-mananas. Estos residuos son esenciales para el reconocimiento del hongo por células fagocíticas.

Por otra parte, se sabe que el producto del gen *PMR1* de *C. albicans* es una bomba de iones $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ubicada en el aparato de Golgi y es la encargada de aportar estos iones a las manosiltransferasas, necesarios para la realización del proceso de glicosilación.

Se ha reportado que en *C. albicans* la interrupción del gen *PMR1* presenta una gama de fenotipos que incluye un defecto global en la glicosilación de la pared celular, atenuación en la virulencia, defectos en el reconocimiento por el sistema inmune y en la síntesis de la pared celular.

En *C. tropicalis* existen tres genes con una identidad y similitud muy significativa a los genes *MNN4*, *OCH1* y *PMR1* de *C. albicans*. Debido a que no existía información sobre las rutas de ensamble de la pared celular, ni de las rutas de glicosilación en *C. tropicalis*, se estudió estos tres genes y se demostró que son ortólogos funcionales de los genes de *C. albicans*.

Los fenotipos de las mutantes generadas nos indican que los tres genes están involucrados en las rutas de fosfomanosilación y *N*-glicosilación, mientras que *PMR1* funciona como una bomba de iones catiónicos que suple de su cofactor a las manosiltransferasas del aparato de Golgi.

Las mutantes sufrieron un re arreglo en el contenido de azúcares de su pared celular, y debido a que también presentaron defectos en su crecimiento y termo sensibilidad, nuestros datos indican que la integridad de la pared celular, aunque es importante para tener una estabilidad celular óptima en *C. tropicalis*, no afectan drásticamente la viabilidad celular. Finalmente, se encontró que las fosfomananas de *C. tropicalis* son críticas para el reconocimiento de este organismo por parte de los macrófagos humanos.

Introducción:

Las infecciones fúngicas invasivas son causas importantes de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados. (Herrera *et al*; 2005). Los miembros del género *Candida* suelen ser los comensales fúngicos más comunes en individuos inmunocompetentes, siendo *Candida albicans* la especie más común, y el principal patógeno oportunista fúngico que ocasiona candidiasis (infección a nivel mucosa y epitelio) y candidemias (infección sistémica) en pacientes inmunocomprometidos, poniendo en riesgo la vida del paciente y llegando a índices de mortalidad que llegan a ser de hasta 71% (Calderon *et al.*, 2003 , Morán *et al*; 2009, Kabir y Hussain; 2009). Se sabe que *C. albicans* es un residente normal del tracto gastrointestinal y es dimórfico, ya que presenta dos estadios, el de levadura e hifa, pero puede también, bajo ciertas condiciones formar pseudohifas y clamidoconidias (Noble y col., 2007). Dentro del género, existen otras especies no *albicans* (ENA), como lo es *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* que de igual forma pueden llegar a tener una virulencia importante en pacientes inmunocomprometidos, ocasionando un aumento en las complicaciones intrahospitalarias causadas por las especies del género *Candida*, siendo la candidemia la cuarta causa de infecciones sistémica nosocomiales

(Pappas *et al*; 2004). El alto uso de antifúngicos para profilaxis ha ocasionado en los últimos años una mayor colonización por parte de las ENA (Moralez *et al.*, 2014). *C. tropicalis* es la ENA más comúnmente aislada en países tropicales. En Brasil, *C. tropicalis* es aislado en un 33%-48% en las infecciones sistémicas ocasionadas por el género *Candida* (Moralez *et al.*, 2014). En la India, las ENA son la causa principal de candidemias nosocomiales, siendo *C. tropicalis* la más común. (Kothavade *et al*; 2010). Por otro lado, en estudios de autopsias de pacientes con candidemias se han observado bandas necróticas de tejido en capas subcutáneas en candidemias ocasionadas por *C. tropicalis*, pero no así en aquellas causadas por *C. albicans* (Kothavade *et al*; 2010). *C. tropicalis* ha sido reportado como el principal causante de candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos, con leucemia aguda, o que han recibido trasplante de médula ósea; sin embargo, los factores involucrados para generar las condiciones oportunistas causantes de la colonización gastrointestinal o diseminación son poco conocidos. (Kothavade *et al*; 2010). Existen diversos factores que contribuyen a la virulencia de *C. tropicalis*, tales como la adherencia a las superficies del hospedero, la capacidad para formar biopelículas sobre dispositivos médicos, morfogénesis de levadura a formas filamentosas, invasión de tejidos, formación de biopelículas y producción de enzimas extracelulares (Negri *et al*; 2011, Kothavade *et al*; 2010).

Se sabe que en *C. albicans* la pared celular posee proteínas responsables de la adhesión a tejidos, tales como las proteínas *Als*, entre otras (Gow *et al*; 2012). Por otro lado, esta estructura interacciona con el sistema inmune innato del huésped,

debido a que diversos receptores de las células de la inmunidad innata reconocen los componentes de ésta (Netea *et al*; 2008). La pared celular de este organismo se compone de una capa interna de quitina, β -1,3 y β -1,6-glucanas y una capa externa de glicoproteínas covalentemente unidas a las glucanas mediante anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cuales están modificadas con oligosacáridos que pueden ser de dos tipos: *N*-mananas u *O*-mananas (Klis *et al*; 2001) (Fig.1).

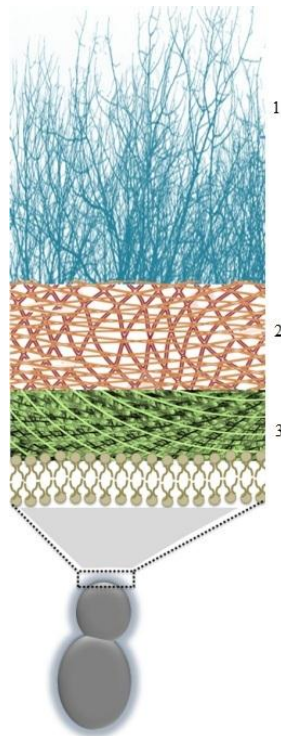


Figura 1. Pared celular de *C. albicans*. 1) capa externa de glicoproteínas; 2) estructura media de β 1,3- y β 1,6-glucanas y 3) capa interna de quitina. (Tomado de Pérez-García y col., 2011).

Importancia del estudio de la ruta de glicosilación de proteínas en *C. tropicalis*

En *C. albicans*, se sabe que las proteínas de pared celular son glicosiladas y estas son importantes para darle forma y rigidez a la célula, además de que muchas proteínas de pared están involucradas en la adhesión al tejido del huésped para comenzar su colonización (Chaffin *et al* ; 1998). Se sabe que las células epiteliales de las superficies mucosas son las primeras en reconocer a *C. albicans*, mientras que, en células epiteliales orales, *Candida* es reconocida mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), tales como son los componentes de la pared celular de *Candida* (Naglik *et al*; 2014). Son justamente estos componentes de la pared celular los que son reconocidos por el sistema inmune de mamíferos mediante diversos receptores presentes en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células CD4⁺ y monocitos (Netea *et al.*, 2008). Se sabe que el receptor dectina 1 puede reconocer a las β 1,3-glucanas, las cuales, aunque están en la parte interna de la célula, pueden estar presentes de forma mínima en las cicatrices de gemación; por otro lado, la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos es mediada por el reconocimiento de las β 1,3-glucanas. (Netea *et al.*, 2008). Por su parte, las células dendríticas son presentadoras de antígenos a los linfocitos CD4⁺ para la estimulación de linfocitos B, por lo que en pacientes inmunocomprometidos por el virus del VIH, esta ruta se ve altamente afectada ocasionando una vía de escape por parte del patógeno y convertirse en oportunista (Netea *et al.*, 2008). Con lo que respecta a *C. tropicalis*, se sabe que la

conformación de la pared es similar en cuanto a la composición de azúcares, pero diferente en el arreglo de la pared con respecto a *C. albicans* (Kobayashi *et al*; 1994), por lo que la estimulación de las células de la inmunidad innata podría ser diferente a la de *C. albicans* y cambiar el perfil de interleucinas secretadas por las células del sistema inmune innato, tal es el caso de las células mononucleares de sangre periférica. Se sabe que cadenas largas de α 1,3–manosas y β 1,2-oligomanosas anclados a los grupos fosfato son los componentes comunes en *C. albicans* y *Candida stellatoidea*, sin embargo, en al menos dos cepas de *C. tropicalis* previamente estudiadas, no hay α 1,3–oligomanosidos (Kobayashi *et al* , 1994) lo que podría contribuir al cambio de patrones de reconocimiento por parte del sistema inmune innato.

También se conoce que el receptor TLR4 puede reconocer a las O-mananas y el receptor MR reconoce a las N-mananas de *C. albicans*, mientras que la galectina 3 reconoce a sus fosfomananas. (Netea *et al.*; 2008). Se sabe que mutantes de *C. albicans* con N-mananas truncas tienen virulencia atenuada, hay cambios en su morfología colonial y celular, así como afectación en su crecimiento (Bates *et al.*, 2006). Por todo esto, es importante estudiar la glicosilación de proteínas en *C. tropicalis* con el fin de entender mejor cómo interaccionan estas macromoléculas con el sistema inmune del huésped y poder establecer cómo influyen en su patogenicidad.

Las rutas de N- y O-glicosilación

La N-manosilación de proteínas ha sido caracterizada en *Saccharomyces cerevisiae*; y se ha demostrado que las rutas involucradas en su biogénesis están conservadas en *C. albicans* (Mora-Montes *et al*; 2010). Con lo que respecta a *C. tropicalis*, las cepas IFO 0199 e IFO 1647, parecen tener manosilación similar a *C. albicans* serotipo A y *C. stellatoidea* tipo II, con la diferencia de que *C. tropicalis* carece de cadenas laterales tipo oligomanosil α 1,3- .(Kobayashi ., 1994). (Fig.2).

La ruta comienza en el retículo endoplásmico (RE), donde un precursor $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3M9) se transfiere de un donador dolicol-pirofosfato (Dol-PP) a un residuo de asparagina situada dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína a ser manosilada mediante un enlace amido, donde interviene el complejo enzimático oligosacaril transferasa (Herscovics *et al.*, 1993). Este precursor está presente en levaduras, hongos, invertebrados y vertebrados, lo que remarca la importancia de la ruta de glicosilación en los eucariotes (Kelleher *et al*; 2007, Schwarz *et al*; 2011). Una vez que se ha formado dicho precursor, cada especie sigue rutas de modificación con diversos azúcares que pueden variar de una especie a otra. En humanos, por ejemplo, se sabe que este precursor sufre de diversas modificaciones por glicosilhidrolasas y transferasas que adicionan diversos azúcares como fucosas, galactosas u otros residuos como ácido siálico y SO_3^- . (Wang *et al*; 2005). En *C. albicans* se conoce que el precursor G3M9 es modificado por glicosilhidrolasas: en primer lugar, el residuo externo de

glucosa es removido por la acción de la α -glucosidasa I, mientras que la α -glucosidasa II elimina los dos residuos restantes de glucosa, y finalmente se procesa un residuo de manosa por la acción de una α 1,2-manosidasa para generar un oligosacárido $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, al cual se le conoce como núcleo (Jigami y Odani.,1999). Posteriormente, las glicoproteínas son transportadas al aparato de Golgi donde el proceso de glicosilación continúa adicionando más residuos de manosa al núcleo conformando *N*-glicanas ricas en manosa. (Jigami y Odani., 1999).

Existen diferencias importantes en la estructura de las glicanas entre *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Por ejemplo, se sabe que en ésta última las *N*-mananas son de mayor peso molecular, tiene un contenido mayor de manosa y contienen residuos de β 1,2- manosa tanto en la fracción ácido lábil (fosfomananas) y ácido estable (Cambi *et al*; 2008, Mora-Montes *et al.*, 2010 Shibata *et al*; 1992).

Por otro lado, la *O*-manosilación es llevada de manera similar, pero las proteínas que sufren esta modificación tienen como secuencia consenso Ser/Thr, donde se incorpora una α -manosa mediante un enlace éter gracias a la acción de las enzimas manosiltransferasas del RE. Posteriormente, la cadena es extendida hasta un máximo de 5 residuos de α 1,2-manosas por dos miembros de la familia *KRE2/MNT1* de manosiltransferasas del aparato de Golgi: Mnt1 y Mnt2.(Munro *et al.*, 2005, Díaz-Jiménez *et al.*, 2012). Existe una diferencia entre las *O*-mananas de *S. cerevisiae* y las de *C. albicans*, ya que en éstas últimas no hay residuos de

α 1,3-manosa y su cadena es corta, alcanzando un máximo de 5 residuos (Herscovics *et al.*, 1993).

El alargamiento de las glicanas en el aparato de Golgi es llevado a cabo por glicosil transferasas codificadas por familias de genes que pueden tener un número variable de miembros entre las especies de hongos analizadas. (Butler *et al.*, 2009).

En los genomas de especies no *albicans* del género *Candida*, genes homólogos a las manosiltransferasas previamente estudiadas en *S. cerevisiae* y *C. albicans* han sido identificados mediante análisis *in silico* tipo BLAST, por ejemplo el gen ortólogo de *OCH1* de *C. parapsilosis*, previamente descrito en *C. albicans* (Bates *et al.*, 2006), el cual se caracterizó y demostró su papel en el reconocimiento del hongo por parte del sistema inmune innato (Pérez García, 2016). El estudio y caracterización de genes involucrados en las rutas de glicosilación de *C. tropicalis* aportaría información importante al conocimiento sobre la forma en que las ENA interactúan con el hospedero.

Función del gen *OCH1*

En levaduras, la cadena externa de *N*-manosas comienza por la acción de una α 1,6-manosiltransferasa Och1, la cual ha sido caracterizada en *S. cerevisiae*, donde se sabe que comienza la extensión del núcleo preformado en el RE, agregando un residuo de α 1,6-manosa (**Fig 2**). En *C. albicans*, la pérdida de *CaOCH1* resultó en termosensibilidad a 42°C y agregación celular (Bates *et al.*, 2006). La síntesis de la cadena externa de las *N*-mananas resultó estar ausente, lo cual se demostró por la ausencia del esqueleto de *N*-polimanasas (Bates *et al.*, 2006). Esta mutante resultó ser sensible a diferentes agentes que afectan la pared celular y presentó virulencia atenuada en un modelo murino de infección sistémica. (Bates *et al.*, 2006). Sin embargo, un dato interesante es que en un ensayo de virulencia en un modelo murino, la carga de patógeno tisular es similar a los de la cepa silvestre, lo que sugiere que la interacción hospedero-patógeno fue alterada de tal forma que altos niveles de la mutante *Caoch1* Δ eran tolerados. (Bates *et al.*, 2006). Existe un probable gen homólogo en el genoma de *C. tropicalis* que podría dar información sobre su contribución en la interacción con el sistema inmune del hospedero, y cómo afecta la ausencia de la cadena externa de las *N*-glicanas en el patrón de reconocimiento hospedero-*C. tropicalis*.

Fosfomananas

Las fosfomananas son residuos de manosa unidos a mananas mediante un enlace fosfodiéster y se encuentran en un número muy limitado de especies fúngicas, incluyendo *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* (Jeong *et al.*, 2011) y algunas especies de *Candida* como *C. albicans* y *C. tropicalis* (Hidemitsu *et al.*, 1993). La presencia de fosfomananas le confiere una carga negativa a la pared celular, lo que podría influir en sus propiedades de adhesión al tejido del hospedero. Además, se demostró que las fosfomananas sirven para una adecuada fagocitosis por parte de los macrófagos (McKenzie *et al.*, 2010). La fosfomanosilación parece ser exclusiva de hongos, pero también hay fosfatos en oligosacáridos de mamíferos, aunque se limita a enzimas dirigidas a los lisosomas (Odani *et al.*, 1999).

La función de las fosfomananas no es clara hasta el momento; sin embargo, podrían funcionar como respuesta al estrés celular ya que la fosfomanosilación es inducida bajo ciertas circunstancias de estrés; además, los grupos fosfato confieren a la pared celular una carga negativa, haciéndola más hidrofílica y formando una concha de hidratación que protegería a las células de deshidratación o bien de estrés por exceso de sales (Odani *et al.*, 1999).

En *S. cerevisiae* se han descrito dos genes cuyos productos génicos están involucrados en la ruta biosintética de fosfomananas. El producto génico de *MNN6/KTR6* tiene una gran similitud con *Kre2/Mnt1*, la cual es una α 1,2-manosiltransferasa involucrada en la O-manosilación, localizada en aparato de

Golgi (Odani *et al.*; 1996, Odani *et al.*, 1999). La mutante *mnn6Δ* de *S. cerevisiae* exhibió un crecimiento normal, pero presentó una disminución en la retención del colorante catiónico azul alciano, hipersensibilidad al blanco de calcoflúor y a higromicina B, así como una disminuida actividad de fosfomanosiltransferasa hacia los aceptores $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ y $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ *in vitro* (Odani *et al.*, 1999). La sobreexpresión de *MNN6* en *S. cerevisiae* no aumentó los niveles de fosfomanosilación más allá de los niveles presentes en cepas silvestres, indicando que esta enzima no es el factor limitante de la ruta (Odani *et al.*, 1999).

El otro componente de esta ruta biosintética es el gen *MNN4*, el cual codifica para una proteína homóloga a la proteína Yjr061 de *S. cerevisiae* que es a su vez se predice que sea una serina/treonina cinasa y por lo tanto Mnn4 podría regular la transferencia de manosil-fosfato mediante fosforilación o desfosforilación de las fosfomanosiltransferasas (Odani *et al.*, 1999). La mutante *mnn4Δ-mnn6Δ* que fue transformada con un plásmido que contiene varias copias del gen *MNN4* y solamente una copia de *MNN6* presentó un aumento en la retención del colorante azul alciano, pero no hubo aumento en una cepa transformada con un plásmido con múltiples copias de *MNN6* y solo una copia de *MNN4*, lo que indica que Mnn4p es el factor limitante de la fosfomanosilación y cuya función es activar a la fosfomanosiltransferasa Mnn6 (Odani *et al.*, 1997). Debido a que *MNN4* es indispensable para que haya fosfomanosilación de la pared celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans* (Jigami *et al.*; 1997), se ha sugerido que podría tratarse de un factor de transcripción. Sin embargo, en *S. cerevisiae* no se encontró localizado

en núcleo, más bien dentro del aparato de Golgi (Jigami *et al*; 1997). Además, no se encontró mediante análisis bioinformático ninguna secuencia consenso de localización nuclear. Su topología predicha es de una proteína de membrana tipo II con una región transmembranal cerca del extremo amino terminal (Odani *et al.*, 1999). Tiene un dominio muy conservado de la superfamilia *LicD* del cual no se conoce mucho en hongos, pero se sabe que está involucrado en el metabolismo de fosforil colina. En procariones, mutantes en *LicD2* tienen una capacidad reducida para recapturar colina, menos adherencia al tejido del huésped y menos virulencia (Zhang *et al.*, 1999) (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/LicD>). Por otro lado, se conoce que *MNN4* es un gen de estrés ya que tiene un elemento tipo STRE río arriba de su codón de inicio y la transcripción es similar a los genes de estrés, esto es, baja transcripción al inicio de la fase logarítmica y aumento al final de la misma y durante la fase estacionaria; sin embargo, en alta osmolaridad que es una condición de estrés, la transcripción es alta desde el inicio de la fase logarítmica, lo que corrobora que podría ser un gen de respuesta a estrés (Odani *et al.*, 1999).

Fosfomanosilación en *C. albicans*

La pared de *C. albicans*, al igual que la de *S. cerevisiae*, tiene fosfomananas que se unen a la ramificación lateral de α 1,2-manosas (**Fig. 4**). Existen diferencias estructurales de las fosfomananas entre ambos organismos ya que en *C. albicans*, la α -fosfato-manosa se encuentra modificada mediante adición de β 1,2-manosas, los cuales están ausentes en *S. cerevisiae* (Jouault *et al*, 2006) (**Fig.4**). Como ya

se describió anteriormente, en *S. cerevisiae* hay dos genes involucrados en la ruta biosintética: *MNN4* y *MNN6*, cuyos productos génicos, Mnn4p y Mnn6p actúan como regulador positivo y fosfomanosiltransferasa, respectivamente. En *C. albicans* se sabe que existe el mismo regulador positivo *MNN4*, ya que al obtener la mutante nula *mnn4Δ* se abatió por completo la síntesis de fosfomananas y con ello los residuos de β 1,2-manosas de la fracción ácido lábil. La mutante nula *mnn4Δ* no mostró virulencia atenuada, pero si una fagocitosis menor por parte de los macrófagos de ratón, lo que sugiere que el sistema inmune puede reconocer a las fosfomananas (McKenzie *et al.*, 2010). A diferencia de *S. cerevisiae*, en *C. albicans* hay más de una fosfomanosiltransferasa y hasta el momento se han encontrado dos de ellas: *MNT3* y *MNT5*, las cuales son responsables del 50% de la fosfomanosilación (Mora Montes *et al.*, 2010). La mutante nula a estas dos fosfomanosiltransferasas, *mnt3Δ-mnt5Δ*, presentó un mayor contenido de quitina e indujo una producción menor de citocinas por parte de los monocitos humanos periféricos; sin embargo, este efecto se debió al aumento de quitina en la pared de dicha mutante, lo que probablemente llevó al enmascaramiento de otros componentes de la pared. En esta mutante también se observó una mayor producción de citocinas dependiente de dectina-1 por parte del hospedero, ya que debido al rearrreglo de la pared celular debida a la ausencia de las fosfomananas, las β -glucanas quedaron más expuestas a la superficie siendo más fácilmente reconocidas por células el sistema inmune innato del hospedero (Mora-Montes *et al.*, 2010).

Gen *OCH1* de *C. tropicalis*

Dentro del genoma de *C. tropicalis* secuenciado por el Broad Institute, se encontró mediante un BLAST, un gen probable que codifica para una proteína hipotética con similitud a Och1. El marco de lectura abierto consta de 1131 nucleótidos, no tiene intrones y codifica para una proteína de 376 aminoácidos, un tamaño muy similar a la proteína Och1 de *C. albicans* de 385 aminoácidos. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/13675>).

En un análisis tipo BLAST se encontró un dominio DXD característico de las familias de glicosil transferasas encargadas de adicionar azúcares a otros azúcares, fosfatos y proteínas. Las glicosil transferasas con secuencias DXD utilizan cationes divalentes como Mn^{2+} como cofactores y utilizan azúcares-nucleótido difosfato como donadores. Mediante un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Och1 de *C. albicans* y *C. tropicalis*, se encontró una identidad y similitud de 72 % y 84 %, respectivamente, por lo que muy probablemente este gen sea el responsable del comienzo del esqueleto de alfa-1,6-polimánosa observado en *C. albicans* y, que se sabe mediante análisis de la pared, que está presente también en *C. tropicalis* (Hidemitsu, 1993).

Gen *MNN4* de *C.tropicalis*

En *C. tropicalis* se encontró mediante un análisis bioinformático, un gen que contiene 2841 nucleótidos, 40 nucleótidos menos que Mnn4 de *C. albicans*, y

tampoco tiene intrones, Dicho gen codifica para una proteína hipotética de 947 aminoácidos y no hay dominios conocidos, salvo un dominio LicD también presente en *CaMNN4*, el cual hasta la fecha permanece desconocida su función. Mediante un análisis de alineamiento tipo BLAST entre las secuencias aminoacídicas de Mnn4 de *C. albicans* y *C. tropicalis* se observó una identidad y similitud del 64 y 81 %, respectivamente, por lo que es muy probable que este gen de *C. tropicalis* tenga la misma función que su ortólogo en *C. albicans*. El estudio de su función por lo tanto puede arrojar información valiosa sobre su función implicada en la ruta de fosfomanosilación en *C. tropicalis*.

Gen PMR1

En *S. cerevisiae* el gen *PMR1* codifica para una bomba de iones $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ubicada en el aparato de Golgi y su función principal es proporcionar a este organelo los iones calcio y manganeso necesarios para llevar a cabo el proceso de glicosilación de proteínas (Bates et al., 2005). Por lo tanto, el producto del gen *PMR1* es un transportador de cationes divalentes, los cuales funcionan como cofactores esenciales para las manosiltransferasas necesarias para llevar a cabo la síntesis de *N*- y *O*-glicanas en el aparato de Golgi (Bates et al., 2005).

Secuencias con alta similitud a la de *Pmr1* han sido clasificados como Ca^{2+} -ATPasas de la ruta secretora, y son distintas de las Ca^{2+} -ATPasas del RE y las Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (Bates et al., 2005). Las Ca^{2+} -ATPasas

de la ruta secretora están identificadas en una amplia gama de hongos y células animales (Bates et al., 2005).

Se ha reportado que en *C. albicans* la interrupción del gen *PMR1* resulta en una gama de fenotipos que incluye un defecto global en la glicosilación de la pared celular, atenuación en la virulencia, defectos en el reconocimiento por parte del sistema inmune y en la elaboración de la pared celular (Bates et al., 2005).

Gen *PMR1* en *C. tropicalis*

Dentro del grupo de trabajo se realizó un análisis *in silico* de un posible ortólogo *PMR1* en *C. tropicalis*, al compararlo con la secuencia de *PMR1* de *C. albicans*. Dicho análisis arrojó una similitud del 81% entre los dos marcos de lectura abiertos, lo que permitió predecir una posible ortología entre los dos genes. El marco de lectura abierto *PMR1* de *C. tropicalis* fue subclonado en el vector *pACT 1* (Barelle et al; 2004) y se generó una complementante *Capmr1Δ + CtPMR1*, en la cual se suprimieron los defectos asociados a la mutante, como agregados celulares, sensibilidad a perturbadores de pared y los niveles de retención del colorante azul alciano fueron restaurados. Esto demostró que *CtPMR1* es el ortólogo de *CaPMR1* (Tesis de Licenciatura de Elizabeth Tovar Zárte ; 2015)

Justificación

Las infecciones causadas por hongos del género *Candida* representan una de las principales causas de micosis sistémica en el mundo. Las rutas de glicosilación de proteínas han sido ampliamente estudiadas en *C. albicans*; sin embargo, existen otras especies del género *Candida* que parecen tener patrones diferentes de virulencia y diferencias estructurales en su pared celular, por lo que entender las diferencias estructurales y patrones en el reconocimiento por el sistema inmune innato nos dará información muy valiosa sobre su patogenicidad y virulencia.

Es por esto que la caracterización funcional de los genes *OCH1*, *MNN4* y *PMR1*, involucrados en la ruta biosintética de glicanas, nos dará información importante sobre la interacción del hospedero con *C. tropicalis*.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la contribución de la glicosilación de proteínas en el reconocimiento inmune innato de *C. tropicalis*.

Objetivos específicos

- Caracterizar funcionalmente los genes *OCH1*, *MNN4* y *PMR1* de *C. tropicalis*.
- Interrumpir los genes *OCH1*, *MNN4* y *PMR1* de *C. tropicalis* y analizar el fenotipo de las mutantes.
- Interaccionar las mutantes nulas con células mononucleares de sangre periférica humana.

Materiales y métodos

Organismos y condiciones de cultivo

La cepa de *C. tropicalis* y *C. albicans* utilizadas y generadas en este trabajo se encuentran en la **tabla 1**. Los organismos levaduriformes se crecieron a 30°C en medio YPD [1% (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de peptona bacteriológica, 2% (p/v) de glucosa], medio SC [0.67% (p/v) de bases nitrogenada para levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos, 2% (p/v) de glucosa, 0.077% (p/v) de mezcla de suplemento total sin uracilo, MP Biomedicals®], suplementado con 50 µg/mL de uridina cuando se requirió o bien medio Sabouraud [1%(w/v) peptona micológica ,4%(w/v) glucosa]. Para preparar medio sólido se incluyó 2%(w/v) de agar. *Escherichia coli*, usada para mantenimiento de los vectores, se creció en medio LB [peptona (1%), extracto de levadura (0.5%), cloruro de sodio (1%), pH 7] a 37°C.

Tabla 1. Tabla de cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Organismo	Fuente
CAI-4	Como SC5314, pero <i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	<i>C. albicans</i>	Fonzi, W. A., and Irwin, 1993
CDH7	Como CAI4 pero <i>mnn4 Δ ::hisG/mnn4 Δ ::hisG</i>	<i>C. albicans</i>	Hobson <i>et al.</i> , 2004
NGY152	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434, RPS1/rps1Δ::Cip10</i>	<i>C. albicans</i>	Brand <i>et al.</i> , 2004
CDH15	Como CDH7 pero <i>RPS1/rps1::Clp10</i>	<i>C. albicans</i>	Hobson <i>et al.</i> , 2004
CDH7 -pACT1- CtMNN4	Como CDH7 pero <i>RPS1::pACT1-CtMNN4</i>	<i>C. albicans</i>	Este estudio
CDH7 -pACT1- CtOCH1	Como CDH7 pero <i>RPS10::pACT1-CtOCH1</i>	<i>C. albicans</i>	Este estudio
CDH7 -pACT1- CtPMR1	Como CDH7 pero <i>RPS10::pACT1-CtPMr1</i>	<i>C. albicans</i>	Teisis de Licenciatura de Elizabeth Tovar Zárate
MYA-3404™	Aislado clínico, cepa tipo	<i>C. tropicalis</i>	Joly S <i>et al.</i> ; 1996

Ct mnn4Δ/MNN4Δ	Como MYA-3404™ pero MNN4/mnn4Δ ::Sat1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct mnn4Δ/mnn4Δ	Como MYA-3404™ pero mnn4Δ /mnn4Δ ::Sat1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct mnn4Δ/mnn4Δ	Como MYA-3404™ pero, mnn4Δ/mnn4Δ	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct mnn4Δ/mnn4Δ – CtMNN4	Como MYA-3404™ pero , mnn4Δ/mnn4Δ::CtMNN4::SA T1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct och1Δ/OCH1Δ	Como MYA-3404™ pero, och1Δ::SAT1 /OCH1Δ	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct och1Δ/och1Δ	Como MYA-3404™ pero, och1Δ/och1Δ::SAT1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct och1Δ/och1Δ	Como MYA-3404™ pero , och1Δ/och1Δ::sat1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ctoch1Δ/och1Δ – CtOCH1	Como MYA-3404™ pero , och1Δ/och1Δ::CtOCH1::SAT 1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct pmr1Δ/PMR1Δ	Como MYA-3404™ pero, PMR1/pmr1Δ::SAT1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct pmr1Δ/pmr1Δ	Como MYA-3404™ pero pmr1Δ/pmr1Δ::SAT1	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio

Ct pmr1Δ/pmr1Δ	Como MYA-3404™ pero <i>pmr1Δ/pmr1Δ::sat1</i>	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
Ct pmr1Δ/pmr1Δ – CtPMR1	Como MYA-3404™ pero , <i>pmr1Δ/pmr1Δ::CtPMR1::SAT1</i>	<i>C. tropicalis</i>	Este estudio
DH5α	F–Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–,mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>	<i>E. coli</i>	Invitrogen
RAW 264.7 (ATCC® TIB71™)	Linea celular de monocitos/macrófagos	<i>Mus musculus</i>	Raschke, W. C <i>et al</i> ; 1978.

Tabla 2. Lista de oligonucleótido iniciadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (sentido 5' a 3')
orfMNN4tR-F	ATGGCTTCGATAATACAAGTA
orfMNN4tR-R	CTATTCTATATGCAAACGGTAAA
orfOCH1R-F	ATGCGTCTGAAGGATATCA
orfOCH1tR-F	TTAATCTTCCATTCTGGCAT
orfPMR1R-F	AAGCTTATGAGTGATAACCCTTATGAACTA
orfPMR1R-R	GCTAGCTTATACTCCATATGTATAATTATTAGTATAAATAGT
OCH1R-F mutagénesis sitio diriga	CCTGATGTTTCAAGGCTTATAAAATTATGCCAAAATC
OCH1tR-R mutagénesis sitio diriga	GGCATAATTTTATAAGCTTTGAAACATCAGGAATTTT
5'IntUpstreamMNN4	GGGCCCTGCTCTTCCTCATTATCACCA
3'IntUpstreamMNN4	CTCGAGATTCTGGTTGGGTAATGGGT
5'IntUpstreamOCH1	GGGCCACACAACCGTCTCTATCAGG
3'ntUpstreamOCH1	CTCGAGTGTTAACTTCTGAATTGGTCTATGA
5'IntUpstreamPMR1	GGGCCAGTTGATTGAAAAATTTTGGCCAGG

3'IntUpstreamPMR1	CTCGAG AGGGAGTCTGTTGAAGGAGTG
5'IntDntreamMNN4	GCGGCCGCCATGGTTCGTTGTTATCTTGG
3'IntDntreamMNN4	GAGCTCGGGCACTAAATCTTGATGGA
5'IntDntreamOCH1	GCGGCCGCTCTAATGTTCAATAAAAACCTTGATT
3'ntDntreamOCH1	GAGCTCGATTGTTAATTAAGAAGATGGTGT
5'IntDntreamPMR1	GCGGCCGCACTCCAGAAGTGTGGTATGTGT
3'IntDntreamPMR1	GAGCTCACTACGCATACCTTCCAACCA
5'ScreenUpstMNN4	ATGCAACCTGCATTCGGTAT
3'ScreenUpstMNN4	AACCAGATTTCCAGATTTCCAGA
5'ScreeDownsMNN4	GGCTATACAGATTTCCCGGCTC
3'ScreenDownsMNN4	GCTGTAGCAGTTAAACCATCACG
5'ScreenUpssOCH1	ACAAACCCAGAATGTCTGAAGC
3'ScreenUpstOCH1	TTGCTTGAAGAATTGCCGGTC
5'ScreeDownsOCH1	AGCCACCCAAGGCATTTCTA
3'ScreenDownsOCH1	AGTCTCCATTGGTGGTGTGG
5'ScreenUpstPMR1	TTGAGCGCGACTGACAGAAT
3'ScreenUpstPMr1	CCCCCACTCCCCAATCTTTG
5'ScreenDownsPMR1	ATTGATCTGTCCGGCAGTGTT
3'ScreenDownsPMr1	AGAGGGTTAAGATTTGGTGTGGT
5'ReintMNN4Upst	GGGCCCAAGGTGTGAGTGAGTGAGTGT
3'ReintMNN4Upst	CTCGAGCAGAACAAGAACTAGTCGGTGC
5'ReintMNN4Downst	GCGGCCGCCCTTGGTGGCATTGTTGTTGA
3'ReintMNN4Downt	GAGCTCTGGATCCGGTAAAGTTTCTGAATTT
5'ReintOCH1Upst	GGGCCCGGTAATGCTTCACCATCATCAACT
3'ReintOCH1Upst	CTCGAGATCCACGGAAAGAACCGCAA
5'ReintOCH1Downst	GCGGCCGCCCTGGAGGCAAGTGTCTTTCA
3'ReintOCH1Downts	GAGCTCACGGATTTGTATTTGTCAAGAGCCA
5'ReintPMR1Upst	GGGCCCCCAATGTTATTACGTCCTGGTGG
3'ReintPMR11Upst	CTCGAGGAGGGAGAAAAGGGGAGGATAC
5'ReintPMR1Downst	GCGGCCGCATTGCTTCATTTGGAGGTGTTG
3'ReintPMR1Downts	GAGCTCCTACGCATACCTTCCAACCA
5'ScreenReintMNN4Up	TTACCACCAGCAGTGACCAA
3'ScreenReintMNN4Up	ATGGGGTACCAATCATCAACTTACA

5'ScreenReintMNN4Downst	GCTCTATGAACACAATCACGACA
3'ScreenReintMNN4Downt	TCTCCAAACGGATTTGTATTTGTCA

Extracción de ADN genómico

Células levaduriformes crecidas por toda la noche en medio YPD se centrifugaron a 1700 x g durante 5 min, se decantó el sobrenadante, se agregaron 400 µL de agua estéril, un volumen similar de perlas de vidrio de 0.45-0.6 mm (Sigma-Aldrich®) y se agitaron en vórtex por periodos interrumpidos de 30s seguidos de 30s de reposo en hielo para evitar sobrecalentamiento de la mezcla, hasta completar un total de 10 min de ruptura. Posteriormente se agregaron 200 µL de TENS (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NaOH 0.1 N, SDS 0.5%) y se repitió la operación anterior por 2 min. Enseguida se centrifugaron los tubos por 2 min, recuperando el sobrenadante al cual se agregó un volumen de una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo y se agitó en vórtex por 1 min. Enseguida se centrifugó la mezcla por 15 min a 12 000 x g, se tomó la fase superior, se agregaron 900 µL de etanol absoluto para precipitar el ADN y se dejó reposar 2 h a una temperatura de -20 °C. Enseguida se centrifugó el ADN por 15 min y se lavó la pastilla dos veces con 500 µL de etanol al 70% (v/v) frío, centrifugando por 2 min a 12 000 x g. Posteriormente se dejó secar la pastilla y se resuspendió el ADN en 40 µL de regulador TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).(Blin y Stafford, 1976) o bien agua estéril.

Extracción de ADN plasmídico

Para obtener ADN plasmídico de las transformantes con la construcciones realizadas en el vector de clonación pCR™2.1-TOPO®, el vector integrativo pACT y del vector pSFS2 para generar las mutantes, las clonas positivas se crecieron en medio LB con ampicilina en tubos cónicos toda la noche, al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 1700 x g por 10 min, se decantó el sobrenadante y se suspendió la pastilla en el sobrenadante restante, enseguida se pasó a un tubo de 1 mL y se agregaron 350 µL de regulador TENS (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NaOH 0.1 N, SDS 0.5%), agitando por inversión de 4-6 veces y con una ligera agitación de vórtice. Enseguida se agregaron 150 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y se mezcló por inversión. Se centrifugó la mezcla a 12 000 x g por 10 min a 4 °C. Enseguida se pasó el sobrenadante a otro tubo de 1 mL y se agregó un volumen de una solución 1:1 (v/v) de fenol-cloroformo, agitando con vórtex constantemente por 1 min, para posteriormente centrifugar por 15 min a 12 000 x g. Después de este proceso, se formaron 3 fases de las cuales se tomó la superior, correspondiente a la fase acuosa donde está el ADN y se cambió a un tubo de 1 mL. Se agregaron 900 µL de etanol absoluto para precipitar al ADN y se dejó reposar de 30 min a 2 h a una temperatura de -20 °C. Enseguida se centrifugó el ADN por 15 min y se lavó la pastilla dos veces con 500 µL de etanol al 70% (v/v) frío, centrifugando por 2 min a 12 000 x g. Posteriormente se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 40 µL de regulador TE o agua estéril.

Reacciones de ligación

Se preparó una mezcla de reacción que contenía 500 ng del vector pACT1 (Barelle *et al*; 2014) purificado y linearizado con *Hind III* y *Nhe I*, 4.5 µg del fragmento *orf.CtOCH1* o bien *orf.CtMNN4*. Para las subclonaciones en pSFS2 (Reuss *et al*; 2004), este plásmido se cortó con las enzimas correspondientes y se utilizó 500 ng de fragmento y 4.5 µg de los fragmentos *upMNN4* o *upOCH1*., regulador de reacción [50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM de MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 5% (v/v) polietilenglicol -8000], 2 (U) de T4 ligasa y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua desionizada. Se incubó a 16 °C por 15 horas.

Tinción celular con el colorante azul Alciano

Una suspensión celular de 1.4×10^7 cel/mL en fase de crecimiento exponencial se resuspendió en 1 mL de colorante azul Alciano (30 µg/mL en HCl 0.02 N, pH 3.0), se incubó a temperatura ambiente por 10 min para después centrifugar a 12 000 x g; de esta mezcla se recuperó el sobrenadante al cual se determinó la absorbencia a una longitud de onda de 620 nm. La concentración del colorante unido se determinó a partir de una curva de calibración, cuantificando la cantidad de azul alciano no unido (sobrenadante). Debido a que la solución tiene una concentración de 30 µg/ml, a partir de los datos obtenidos se determinó la cantidad de colorante unido a las células.

Generación de la construcción pACT-CtMNN4

El marco de lectura abierto de *MNN4* de *C. tropicalis* fue obtenido del Broad Institute a partir de la cepa secuenciada MYA-3404 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/255729199?report=genbank&log\\$=nuclalig&blast_rank=1&RID=THTW4ERX015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/255729199?report=genbank&log$=nuclalig&blast_rank=1&RID=THTW4ERX015)) mediante PCR utilizando los iniciadores orfMNN4tR-F y orfMNN4t-R (**ver Tabla 2**) y ADN genómico de la cepa de *C. tropicalis*. La mezcla de amplificación contenía: 1x del regulador *px* (invitrogen®), 1 mM de MgSO₄, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 (U) de polimerasa Pfx (invitrogen®), 0.5 µg de ADN genómico de *C. tropicalis*, 0.15 nmoles de orfMNN4tR-F y 0.12 nmoles de orfMNN4t-R. El amplicón se clonó en el vector pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen) y para ello, primero se adenilaron los extremos 3' del fragmento amplificado utilizando las condiciones siguientes: regulador de reacción (20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl), 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2 U de Taq Polimerasa (invitrogen®), 21 µg de orfMNN4 y se llevó a un final de 25 µL. La mezcla se incubó por 20 min a 72 °C. Posteriormente, se ligó al vector siguiendo las instrucciones del proveedor, la mezcla se agregó a un vial de células químicamente competentes de *E. coli* DH5α, se mezcló suavemente con la punta de una pipeta, se incubó 30 min en hielo, luego las células se pasaron a 42 °C por 30 seg sin agitación, se colocó en hielo y se añadieron 250 µL de medio LB sin antibiótico. Se incubó a 37°C y 140 rpm por 1 h, sembrando alícuotas de esta mezcla sobre placas con medio LB conteniendo 50 µg/mL de ampicilina y 40 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal). Las cajas se

incubaron a 37°C por 24 h y las colonias blancas presuntamente positivas se sometieron a escrutinio para confirmar que tenían la construcción pCR™2.1-TOPO®-MNN4t, amplificando el fragmento orf.MNN4. Finalmente, el gen MNN4 de la construcción pCR™2.1 TOPO®-MNN4 se subclonó en los sitios *Hind III* y *Nhe I* del vector pACT1 (Berelle *et al*; 2004), generándose la construcción pACT1-orfMNN4t.

Mutagénesis sitio dirigida para la generación del orf. CtOCH1

Para llevar a cabo esta estrategia, se clonó el orf. *Och1t* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/255726061?report=genbank&log\\$=nuclalig_n&blast_rank=1&RID=THTRC9E1014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/255726061?report=genbank&log$=nuclalig_n&blast_rank=1&RID=THTRC9E1014)) en pCR™2.1-TOPO® de manera habitual, utilizando los iniciadores orfOCH1R-F y orfOCH1R-F. El codón AAA localizado en la posición 450-453 del marco de lectura abierto que contiene la secuencia reconocida por *Hind III* fue cambiado por el codón AAG que es traducido a una LYS al igual que el codón AAA. Esto se logró utilizando dos iniciadores OCH1R-F mutagénesis sitio dirigida y OCH1R-R mutagénesis sitio dirigida, de 36 y 37 pb respectivamente, uno directo y otro reverso, con la mutación puntual correspondiente que alinean en el codón AAA nativo. De esta forma, cada iniciador amplificó la construcción completa en una dirección y el reverso en la dirección contraria, generando una construcción con la mutación puntual deseada. Este ADN de doble cadena abierto, posteriormente se utilizó para transformar

células de *E. coli* químico competentes preparadas con cloruro de rubidio, capaces de ligar la construcción. Las clonas fueron seleccionadas en medio con ampicilina de manera habitual (Ver arriba).

Transformación de *C. albicans* por técnica del acetato de litio

Se preparó un preinóculo del organismo, creciéndolo en 25 mL de YPD con uridina en un matraz Erlenmeyer de 125 mL durante toda una noche a 28°C y 200 rpm. A la mañana siguiente se tomaron 1600 µL del preinóculo y se inocularon en 100 mL en un matraz de 250 mL de medio YPD. Este último matraz se dejó por 5 h a 28°C y 200 rpm. Posteriormente, las células del cultivo se recuperaron en tubos cónicos estériles por centrifugación por 5 minutos a 1700 x g. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 20 mL de agua destilada estéril. Enseguida se centrifugó por 5 min a 1700 x g y desechó el sobrenadante; se agregó 1 mL de acetato de litio (100 mM) y se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorff. Se centrifugó a 16 000 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 600 µL de acetato de litio 100 mM. De esta mezcla se tomaron 100 µL y se transfirieron a un tubo Eppendorff, centrifugando a 16 000 x g por 2 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 240 µL de polietilenglicol 4000 (50% en acetato de sodio 100 mM), 36 µL de acetato de litio 1 M, 10 µL de ADN acarreador desnaturalizado de esperma de salmón (Promega®), 75 µL de la construcción pACT1-*MNN4t*. Se incubó por 40 min a 30°C y posteriormente 20 min a 42°C. La mezcla se centrifugó a 12 000 x g por 2 min, se decantó el

sobrenadante y se agregaron 600 μL de agua estéril. Las células transformadas se resuspendieron, se tomaron alícuotas de 200 μL para esparcirlas sobre una placa de medio SC sin uridina. Las placas se incubaron a 28°C apareciendo colonias a los 3-5 días.

Transformación de *C. tropicalis* por electroporación:

Se preparó un preinóculo de la cepa de *C. tropicalis*, creciéndola en 25 mL de YPD en un matraz Erlenmeyer de 125 mL durante toda una noche a 28°C y 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 2×10^7 cel/mL. Se centrifugó el cultivo a 1700 x g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 10 mL de buffer TE adicionado con DTT 10 mM. Se incubó la solución 1 hora a 28°C agitando ocasionalmente. Enseguida se resuspendió la pastilla en sorbitol 1 M a una concentración final de 8×10^9 cel/mL. A 50 μL de la suspensión anterior se le agregó 1 μg de plásmido PYM 70 y se incubó en hielo por 5 minutos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm y se realizó la electroporación a 1.5 kV, 2 ohms y 25 μF . Inmediatamente después se agregó 950 μL de medio YPS, enfriado previamente en baño de hielo y se mezcló por inversión. La suspensión celular se incubó por 2 horas a 28°C con agitación ocasional. Transcurido este tiempo, la suspensión celular se centrifugó a 12 000 x g por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. La

pastilla se resuspendió en 1 μ L de agua estéril y se plaquearon 4×10^6 células en YPD adicionada con Higromicina B (50 μ g/mL).

Determinación de glicosilación de la proteína Hex1

Las células a utilizar se crecieron en matraz de 250mL con 50 mL de medio YBN 0.7% y 25mM de GlcNAc adicionado con uridina durante 16 horas a 28°C y 1700 g, las células se cosecharon y lavaron como se describe en secciones anteriores, se resuspendieron en 0.5mL de Tris-HCl 10mM, pH 7 y se pasaron a un tubo de 1.5 mL que contenía perlas de vidrio. Se agitaron en ciclos de 30 segundos como se describe en secciones anteriores durante 7 minutos y se rescató el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL.

Enseguida, se corrió una muestra de este sobrenadante (homogenado total) en un gel nativo de poliacrilamida al 6% en condiciones de 60 V durante 5 horas, al término se lavó el gel con el amortiguador de citratos 0.1M, pH 4.5 y se reveló con 9 mL de 4-metil-umbeliferil N-acetil β -D-glucosamínido (Sigma) y luz UV.

Extracción de paredes celulares de *Candida*

Se prepararon preinóculos de *C. tropicalis* y *C. albicans*, creciendo las células en 10 mL de caldo dextrosa Sabouraud en un tubo Falcon de 50 mL durante toda la noche a 28°C . A la mañana siguiente, se tomaron 8 mL del preinóculo y se inocularon en 300 mL de caldo dextrosa-Sabouraud en un matraz de 1000 mL.

Este último inóculo se dejó crecer por 6 h a 28°C y agitación constante. Se cosecharon las células por centrifugación a 1700 x g por 5 min y se lavó la pastilla dos veces con 20 mL de agua desionizada estéril. Enseguida, se llevó a cabo un rompimiento de la pastilla celular con la ayuda de un homogenizador marca Braun®. Se llenó la botella con un 1/3 de perlas de vidrio (0.45-0.55 mm de diámetro), luego se colocó la pastilla obtenida anteriormente y se agregaron 2/3 (v/v) de agua desionizada a la botella. Se llevaron a cabo 6 ciclos de ruptura de un minuto cada uno, aplicando ciclos de enfriamiento de 15 seg con una corriente de CO₂ líquido. Al término de los 6 ciclos se tomó una alícuota para evaluar el rompimiento bajo el microscopio. En seguida se recolectaron los restos celulares en un tubo Falcon, se centrifugó a 1700 x g por 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla 5 veces con 10 mL de NaCl 1M estéril a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL de 2% SDS/ β-mercaptoetanol 0.3 M/ EDTA 1mM, pH7.5/ Tris 50 mM, y se calentó a baño María a 100°C por 10 min, después se centrifugó a 1700 x g por 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con 10 mL de agua desionizada. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 2 mL de agua desionizada, se alícuotó en tubos de Eppendorf, tapados con Parafilm, se le hicieron pequeños orificios y se congelaron a -20°C. Una vez congeladas las muestras se liofilizaron por 12 h.

Hidrólisis ácida

Se pesaron 5 mg de pared celular y se colocaron en una ampolleta de vidrio, se agregaron 3 mL de ácido trifluoroacético 2 M, se selló la ampolleta por calor y se dejó incubar por 18 h a 100°C con calor seco. Al término de la incubación, el contenido de la ampolleta se colocó en un vaso de precipitado de 10 mL, se dejó evaporar el ácido trifluoroacético por calentamiento y los restos de azúcares se lavaron 3 veces con 1 mL de agua desionizada estéril. Finalmente, se resuspendieron los azúcares con 1 mL de agua desionizada y se distribuyeron en tubos de Eppendorf tapados con parafilm, se le hicieron pequeños orificios y se congelaron a -20°C. Una vez congeladas las muestras se liofilizaron por 12 h.

Hidrólisis alcalina

Se pesaron 10 mg de pared celular de *C. albicans* y *C. tropicalis*, se colocaron en tubos Falcon de 15 mL, se resuspendieron en 3 mL de NaOH 1M y se calentaron a baño maría a 100°C por 30 min. Después se dejó enfriar y se neutralizó con HCl 1N.

Determinación de azúcares por cromatografía de intercambio aniónico de alta afinidad con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

Se utilizaron las muestras liofilizadas tratadas por hidrólisis ácida. Se pesó 1 mg de la pastilla y se agregó 1 mL de agua desionizada, posteriormente se ajustaron las muestras a una concentración final de 25 µg/mL. Las muestras fueron

analizadas y cuantificadas por HPAEC-PAD, en el equipo automatizado Dionex ICS-3000® (USA) con la columna CarboPac PA-100 (4 mm x 50 mm) y por la columna CarboPac-PA-100 (4 mm – 250 mm). La separación de los carbohidratos se hizo con un gradiente de acetato de sodio en 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5mL/min, como a continuación se presenta: 0-5min= 45-75 mM NaOH, 5-15 min= 90mM NaOH, 15-17min= 105 mM NaOH + 75 mM de acetato de sodio, 17-20 min= 75 mM NaOH + 150 mM de acetato de sodio, y 20-25 min= 45 mM NaOH en una columna a 25°C. El potencial aplicado para la detección fue de E1 (400 ms), E2 (20 ms), E3 (20 ms) y E4 (60 ms) de + 0.1, - 2.0, + 0.6, and - 0.1 V, respectivamente.

Ensayos de perturbadores de pared celular:

Los ensayos de sensibilidad a agentes perturbadores fueron adaptados de Bates *et al.*, 2005. Las células utilizadas se crecieron, cosecharon, lavaron y se ajustaron a 6 concentraciones que fueron de 1×10^3 a 1×10^8 cel/mL., para cada una de las muestras. Cada dilución se sembró mediante gota, utilizando 10 μ L de cada muestra en placas de YPD conteniendo un agente perturbador (Rojo Congo, Higromicina B y Blanco de Calcoflúor) con 4 diferentes concentraciones (ver resultados). Las placas se prepararon por duplicado y se incubaron a 28°C durante 36 horas. Pasado este tiempo, se fotografiaron y analizaron los niveles de crecimiento de cada dilución.

Determinación de azúcares mediante el método del fenol y ácido sulfúrico

Esta técnica fue adaptada de Dubois *et al*; 1956. Se tomaron 10 μ L de la muestra y fue llevada a un volumen final de 100 μ L con agua desionizada, enseguida se agregaron 300 μ L de fenol al 80% (v / v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras fueron agitadas e incubadas en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurridos 15 minutos, se leyó la absorbencia a 490 nm. Para la curva de calibración, se utilizaron diluciones dobles seriadas de un estándar de manosa (1 mg/mL).

Obtención de células mononucleares humanas

Se obtuvo sangre periférica de pacientes sanos, previo consentimiento, por punción de la vena mediana cubital, empleando un sistema BD Vacutanier® en tubos con K₂EDTA y se separaron las células mononucleares por centrifugación sin freno, a 1800 x g en un gradiente de Histopaque® - 1077 (Sigma) durante 20 min a temperatura ambiente. Se recuperaron las células mononucleares de la interfase y fueron lavadas dos veces con PBS frío. Las células se resuspendieron en 5 mL de medio RPMI 1640 (Modificado de Dutch) adicionado con glutamina 2 mM, piruvato 0.1 M y gentamicina 0.05 mg/mL. Se realizó el conteo celular en

cámara de Neubauer usando una tinción vital de azul de metileno 0.01% en PBS y se ajustó la densidad celular a 5×10^6 cel/mL con RPMI 1640 modificado de Dutch.

Diferenciación de macrófagos primarios

Después del aislamiento de células mononucleares humanas, se hicieron alícuotas de 1 mL conteniendo 5×10^6 cel. en medio RPMI 1640 (Modificado de Dutch). Se repartieron en placas de 24 pozos de fondo plano para ser incubadas durante 1.5 h a 37°C y una atmósfera de 5 % de CO₂. Enseguida se removieron las células no adherentes junto con el medio y las células adheridas se lavaron 2 veces con PBS a 37°C. Enseguida se adicionó a cada pozo 1 mL de medio X – VIVO 15 sin suero (Lonza) suplementado con solución penicilina–estreptomicina (PS, Sigma) 1% y factor estimulador de colonias granulocíticas y de macrófagos (GM– CSF, Sigma), 10 ng / mL. Las placas se incubaron durante 8 días a 37°C y una atmósfera de 5 % de CO₂ y el medio fue reemplazado cada tercer día. Después se eliminó el medio de diferenciación y se resuspendieron los macrófagos por pipeteo suave en medio RPMI 1640 modificado de Dutch.

Ensayo de fagocitosis y tinción con naranja de acridina

Una suspensión de 1×10^7 levaduras se tiñeron con 500 µL de naranja de acridina y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron en 30 µL de PBS 2 veces y se hicieron interaccionar con una solución de macrófagos

diferenciados o bien, pertenecientes a la línea celular Raw 264.7 ® contenidos en 2 µL de RPMI.

Las células interaccionaron por 3 h a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Enseguida los macrófagos se lavaron con PBS a temperatura ambiente y se resuspendieron en PBS frío + 1% de azul de tripano. Las células se analizaron en citómetro de flujo MoFlo XDP high speed cell sorter de la marca Beckman Coulter, haciendo la detección en los canales FL1 y FL3, utilizando un láser de 488nm.

Cultivo de macrófagos Raw 264.7 ®

Se descongeló un vial de macrófagos en baño maría a 37°C por 2 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 125 x g. Se descartó el sobrenadante en esterilidad y se transfirieron las células de la pastilla a una botella de cultivo celular Corning® conteniendo medio fresco (DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS / FCS (FBS) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂. Se monitoreó la formación de colonias adheridas a la botella.

Cuantificación de citocinas

Para medir las concentraciones de TNFα, IL-6 y de IL-10; se utilizó un kit de ELISA (Prepotech), mientras que para la determinación de los niveles de IL-1β se utilizó un kit de ELISA de R&D systems. La cuantificación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Ensayos de virulencia en *Galleria mellonella*

Los ensayos de infección en larvas de *G. mellonella*, fueron adaptados de (Pérez-García et al. 2016). Alícuotas conteniendo 4×10^6 células en 10 μ L de PBS fueron inyectadas en la hemolinfa del último pro pie izquierdo, previamente sanitizado con etanol al 70%, utilizando una jeringa Hamilton y aguja calibre 26. El ensayo se hizo 3 veces por separado con grupos de 10 larvas para cada cepa a probar. Se incluyó un control negativo donde solamente se inyectó PBS.

Obtención de oligomanosas derivadas de las fosfomananas

La obtención de los oligosacáridos de fosfomananas se adaptó de (Kobayashi et al. 1990). 2 g de pared celular previamente purificada se hirvió en 5 mL de HCl 10 mM por 1 h para liberar la fracción de mananas ácido lábiles. Se recuperó el sobrenadante y se clarificó dos veces, posteriormente se neutralizó con NaOH 10 mM y se guardó para su posterior derivatización.

Derivatización de fosfomananas

Alícuotas conteniendo 20 miligramos de fosfomananas se derivatizaron utilizando 20 μ L de ANTS ($C_{10}H_7NNa_2O_9S_3$) 0.2 M resuspendido en ácido acético y agua 1:17 (v/v) y 20 μ L de Cianoborohidruro de sodio 1.0 M resuspendido en DMSO. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 16 horas y posteriormente se liofilizó. Los oligomanósidos derivatizados se resuspendieron en 20 μ L de regulador de carga (62.5 mM Tris-HCl /Glicerol 20%). (Hernández et al. 2017, Navarro-Arias et al. 2016)

Ensayo de FACE

Muestras de 10 μL de oligosacáridos de fosfomananas derivatizados previamente, se cargaron en un gel de poliacrilamida formado por dos geles continuos, un gel revelador inferior al 20% de poliacrilamida y un gel superior concentrador de poliacrilamida al 5%. El gel se corrió en una cámara de electroforesis a 100 V por 4 horas en buffer nativo y posteriormente se lavó con agua destilada por 1 minuto. Posteriormente, el gel se observó en un fotodocumentador bajo exposición con luz UV. (Hernández et al. 2017, Navarro-Arias et al. 2016)

Determinación de la porosidad de pared

Células crecidas toda la noche en medio Sabouraud se cosecharon por centrifugación y se inocularon en medio fresco por 6 horas a 28°C y 200 rpm. Las células se lavaron dos veces con PBS y 1×10^8 células de cada cepa fueron distribuidos en 3 diferentes tubos de 1.5 mL que contenían regulador A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4), regulador A más 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of poli-L-Lisina (MW30-70 kDa, Sigma Cat. No. P-2636) ó regulador A más 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DEAE-dextrano (MW 500 kDa, Sigma Cat.No. D-9885) y se incubaron por 30 minutos a 30°C con agitación constante de 200 rpm. Al finalizar este tiempo, los tubos se centrifugaron y se recolectaron los sobrenadantes y se midió absorbancia a 260 nm. Se calculó así la porosidad relativa de la Poli L-Lisina con respecto al DEAE-Dextrano (Cheng et al. 2011, De Nobel et al. 1990).

Resultados:

Complementación de *Camnn4*Δ con el marco de lectura abierto *CtMNN4* bajo el promotor fuerte *CaACT1*, y su análisis fenotípico.

Para demostrar que el marco de lectura abierto hipotético de *CtMNN4* es el ortólogo funcional de *CaMNN4*, la mutante nula *Camnn4*Δ fue complementada con la construcción *pACT1-ORF.CtMNN4* mediante transformación química (**Ver Materiales y Métodos**). Una cepa generada, *CaMNN4+pACT1-ORF.CtMNN4* fue confirmada mediante PCR, amplificando el marco de lectura abierto de *CtMNN4* con un tamaño esperado de 2800 pb utilizando como control negativo ADN genómico de *Camnn4*Δ y como control positivo ADN genómico de *C. tropicalis*.

(Fig 3)

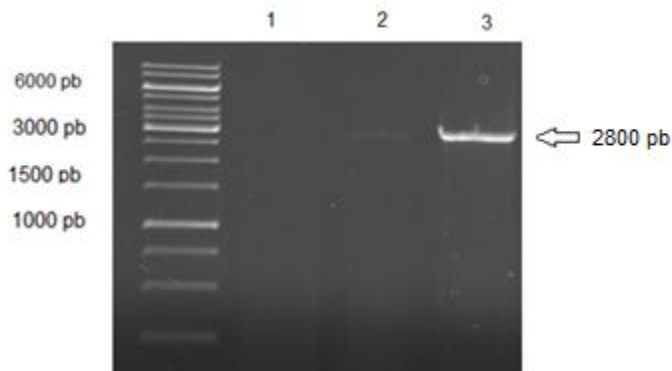


Figura.3. Electroforesis del resultado de la amplificación del marco de lectura abierto de *Ct.MNN4* a partir de ADN genómico de la cepa *Camnn4*Δ+*pACT1-ORF.CtMNN4*, obtenido mediante PCR utilizando los iniciadores *orfMNN4tR-F* y *orfMNN4t-R*. Carril.1. Control negativo *Camnn4*Δ

Ura- (CDH7). Carril. 2. Control positivo de *C. tropicalis* silvestre. Carril
3. *Camnn4Δ*+pACT1-ORF.*CtMNN4*

Para conocer si *CtMNN4* restauraría la función perdida en la cepa mutante carente de *CaMNN4*, se midieron los niveles de retención del colorante catiónico azul alciano por parte de las levaduras, el cual es capaz de unirse a las cargas negativas conferidas por las fosfomananas en la cepa silvestre de *C. albicans* NGY152 (Odani *et al*; 1999) (Ver materiales y métodos). Los datos sugirieron que 2 cepas complementantes *Camnn4Δ*+pACT1-ORF.*CtMNN4* (C1, C2) tienen niveles de retención del colorante azul alciano muy similares a la cepa silvestre NGY152, restaurándose así los niveles de retención del colorante en la cepa mutante *Camnn4Δ* (Fig 4), (Tabla3).

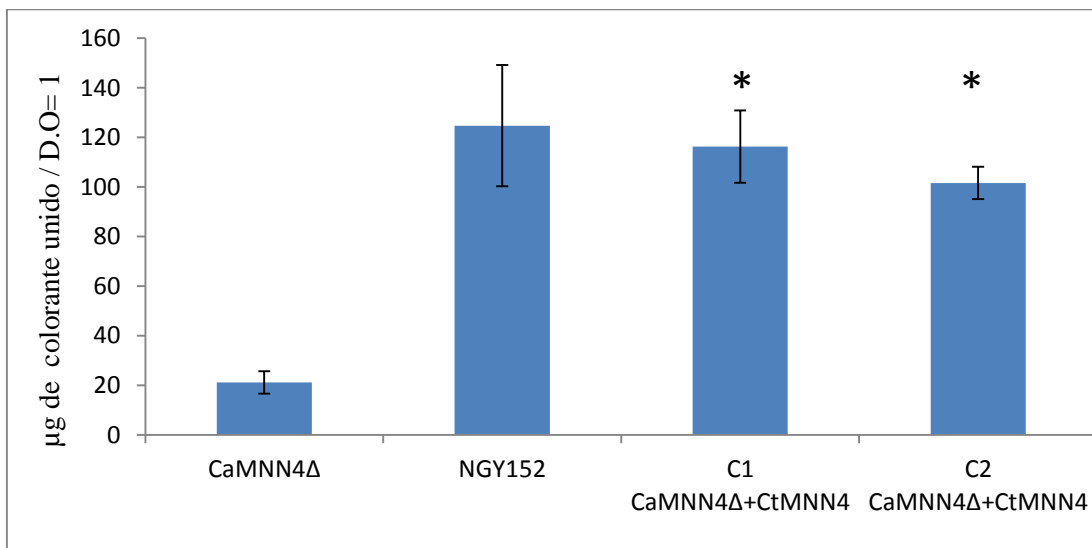


Figura 4. Niveles de retención del colorante azul Alciano por parte de la

complementante *Camnn4* Δ +pACT1-ORF.CtMNN4. Niveles de colorante azul alciano unido por parte la cepa control *Camnn4* Δ , *C. albicans* silvestre NGY152 (B, Clona 1 de *Camnn4* Δ +pACT1-ORF.CtMNN4, Clona 2 de *Camnn4* Δ +pACT1-ORF.CtMNN. * $p < 0.05$ al comparar niveles de retención de colorante de cepas reintegrantes con la mutante nula utilizando una Prueba T de Student .

Complementación de *Caoch1* Δ con el marco de lectura abierto *CtOCH1* bajo el promotor fuerte *CaACT1* y su análisis fenotípico.

De igual manera, para demostrar que el probable marco de lectura abierto de *CtOCH1* es el ortólogo funcional de *CaOCH1*, la mutante *Caoch1* Δ fue complementada con la construcción pACT1-ORF.CtOCH1, previamente optimizado mediante mutagénesis sitio dirigida en el *locus* neutro *CaRPS1* mediante transformación química (Ver Materiales y Métodos).

Una cepa generada *Caoch1* Δ +pACT1-ORF.CtOCH1 fue confirmada mediante PCR, amplificando el marco de lectura abierto de *CtOCH1* con un tamaño esperado de 1131 pb (**Fig 5**), utilizando como control negativo ADN genómico de *Caoch1* Δ .

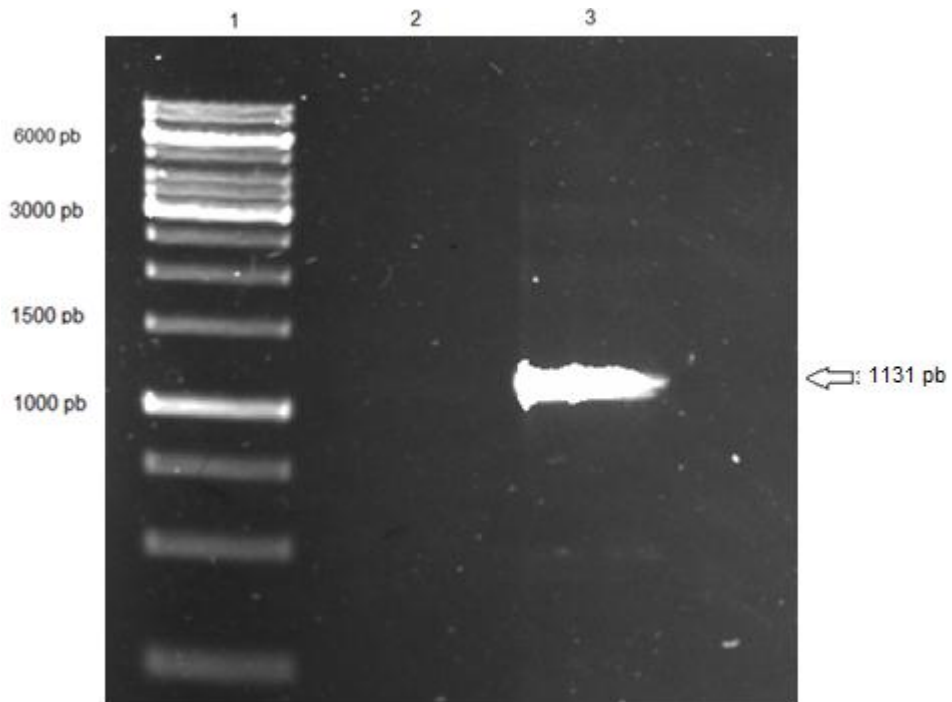


Figura.5 Electroforesis de la amplificación del marco de lectura abierto de *Ct.OCH1* mediante PCR a partir de ADN genómico de la cepa *CaOCH1+pACT1-ORF.CtOCH1*. Carril.1. Marcadores de tamaño de ADN. Carril 2. Control negativo *Caoch1Δ Ura-*. Carril. 3. *Caoch1Δ+pACT1-ORF.CtOCH1*.

Una vez comprobada la construcción de la cepa *Caoch1Δ+pACT1-ORF.CtOCH1*, esta complementante se analizó fenotípicamente, midiendo los niveles de retención del colorante azul alciano, donde los datos sugieren que hay una restauración significativa en los niveles de retención del colorante azul alciano por parte de la complementante.(Fig.6).Para tener evidencia de la restauración en la

N-glicosilación, se realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética de la proteína HexNAcase, la cual es una proteína que tiene siete sitios ocupados por *N*-glicanas, por lo que una mayor movilidad indica una *N*-desglicosilación, mientras que un retardo indica que la proteína está *N*-glicosilada (Mora-Montes *et al*; 2010) . El zimograma obtenido sugiere que los niveles de *N*-glicosilación fueron restaurados en la proteína HexNAcase de la complementante *Caoch1Δ*+pACT1-ORF.*CtOCH1* (**Fig.7**), lo que demuestra directamente que *CtOCH1* es el ortólogo funcional de *CaOCH1*.

Finalmente, se realizaron ensayos de crecimiento en presencia de perturbadores de pared celular, para conocer el nivel de restauración del daño en esta complementante. Se realizaron ensayos de gota enfrentando a las cepas en diluciones que fueron desde 1×10^3 hasta 1×10^8 en medio YPD, o bien YPD adicionado con Blanco de Calcoflúor (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Higromicina B (65 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ó Rojo Congo (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La viabilidad de la cepa complementante *Caoch1Δ*+pACT1-ORF.*CtOCH1* se comportó similar a la de la cepa silvestre y a la complementante *Caoch1Δ*+*caOCH1*, mientras que la cepa *Caoch1Δ* mostró un claro decremento en la viabilidad, confirmando nuevamente que los niveles de glicosilación fueron restaurados por *CtOCH1* (**Fig.8**).

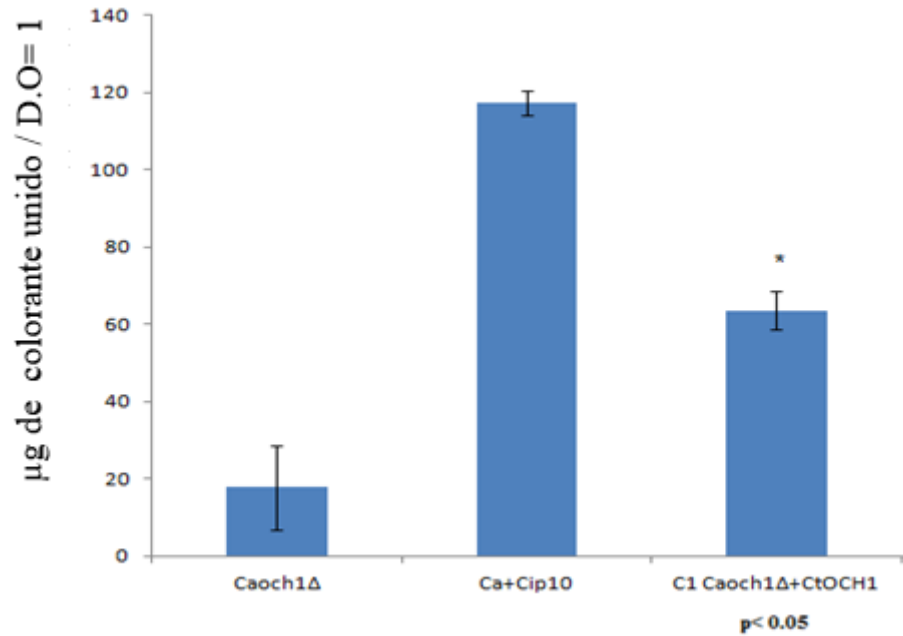


Figura 6. Niveles de retención del colorante azul Alciano por parte de la complementante *Caoch1Δ+pACT1-ORF.CtOCH1*. Niveles de colorante azul alciano unido por las cepas *Caoch1Δ*, *C. albicans* silvestre NGY152, y *Caoch1Δ+pACT1-ORF.CtOCH1*. * $p < 0.05$ al comparar cepa complementante con mutante nula utilizando una prueba T de Student.

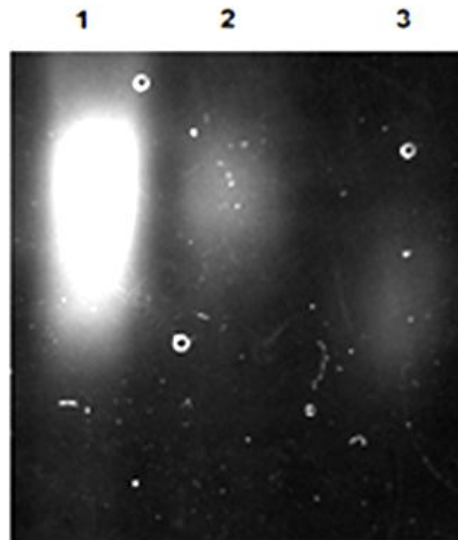


Figura 7. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética de la proteína HexNAcasa. Carril 1. NGY152 (*C. albicans* silvestre). Carril 2. *Caoch1Δ*+ORF.*CtOCH1*. Carril 3. *Caoch1Δ*.

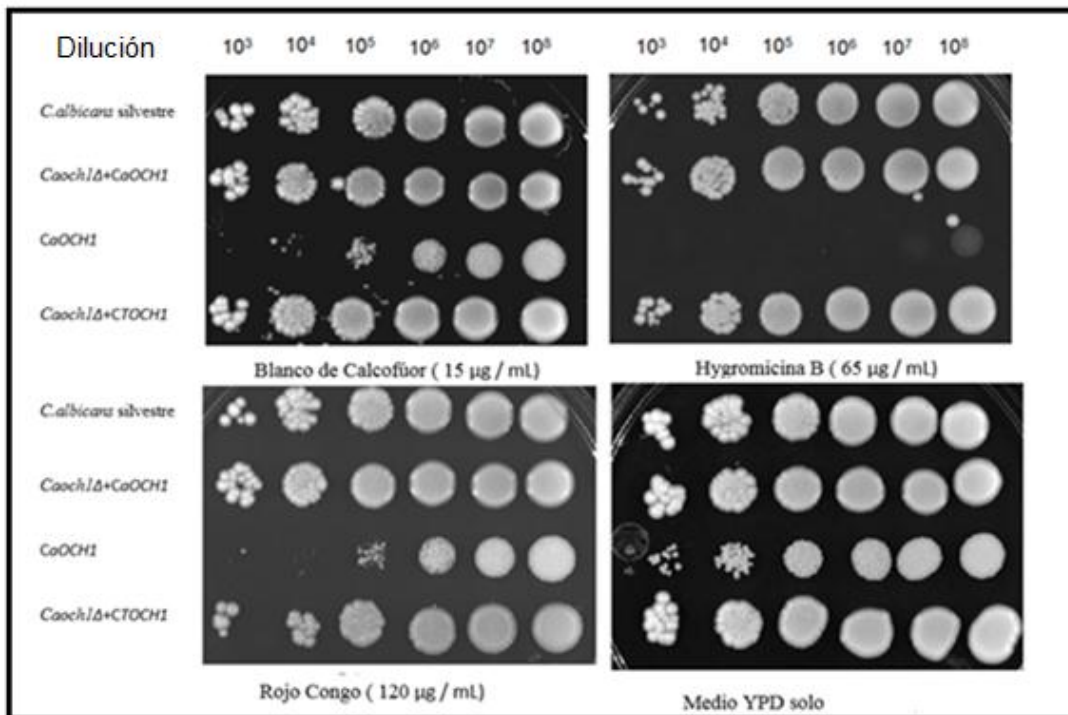


Figura 8. Interacción de *C. albicans* silvestre (NGY152), *Caoch1*Δ+*CaOCH1*, *Caoch1*Δ y *Caoch1*Δ+*CtOCH* sobre placas con diversos agentes perturbadores de pared celular. Cada ensayo (gota) consistió en 10 microlitros de la dilución indicada.

Interrupción de *CtMNN4*, *CtOCH1* y *CtPMR1*

Teniendo suficiente evidencia de que *CtMNN4* y *CtOCH1* eran los ortólogos de los genes respectivos de *C. tropicalis* se continuó con la interrupción de ambos genes y se decidió interrumpir *CtPMR1* debido a que previamente dentro del grupo de

trabajo se había demostrado que *CtPMR1* es el ortólogo funcional de *CaPMR1* (Tesis de licenciatura de Elizabeth Tovar Zárate, datos no publicados).

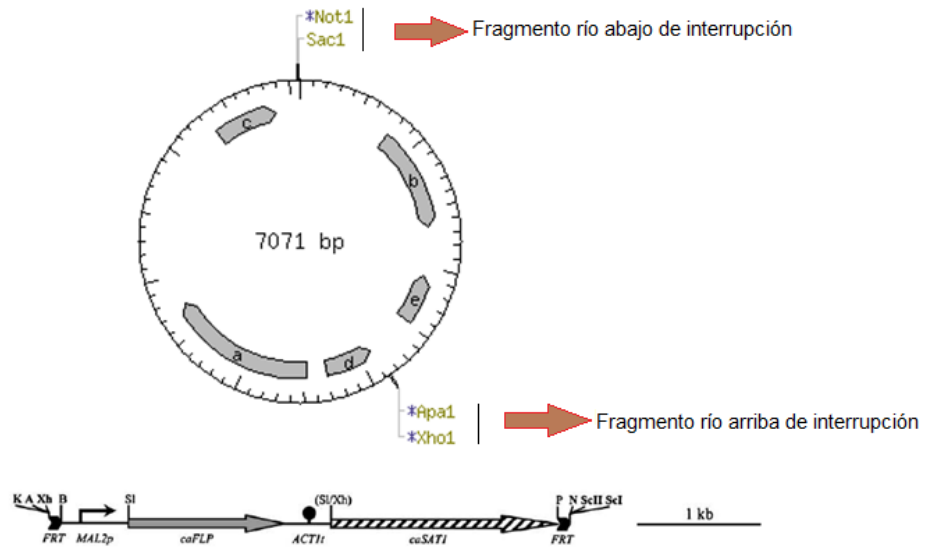


Figura 9. Diagrama del vector pSFS2, utilizado para la construcción de los casetes de interrupción. Se muestra con flechas anaranjadas el sitio de clonación *Apal-XhoI* utilizado para clonar el fragmento de interrupción río arriba y el sitio *Not I-Sac I* utilizado para clonar el fragmento de interrupción río abajo. (Reuss *et al.*, 2004).

La estrategia utilizada fue “Sat-1 flipper” (Reuss *et al.*; 2004) la cual consistió en la generación de un casete de interrupción para cada gen mediante doble

recombinación homóloga, clonando 1 fragmento de 1500 pb río arriba para el caso de *OCH1* y *PMR1* y de un tamaño de 497 pb para *MNN4*, utilizando los iniciadores IntMNN4upstream, IntOCH1upstream o bien IntPMR1upstream (Ver tabla 2), que amplifican un fragmento río arriba y fuera del marco de lectura que se deseaba interrumpir. Estos fragmentos se clonaron en el sitio 5' *ApaI-XhoI* del vector pSFS2 (**Fig 9**). Posteriormente se amplificó un fragmento de 1500 pb río abajo, fuera del marco de lectura a interrumpir utilizando los iniciadores IntMNN4downstream, IntOCH1downstream o bien IntPMR1downstream y fueron clonados en el sitio *NotI-SacI* del mismo vector (**Fig 9**). La correcta integración de los fragmentos se corroboró mediante PCR y análisis por restricción. Una vez clonados ambos fragmentos, se liberó el casete digiriendo el DNA con las enzimas *Apa I* y *Sac I* obteniendo el casete linearizado listo para utilizarse; el resto del plásmido se eliminó utilizando una columna de gel de sílice y recuperando con agua destilada tibia mediante centrifugación.

Los casetes purificados y cuantificados fueron utilizados para llevar a cabo una primera ronda de transformación mediante electroporación e interrumpir el primer alelo. La correcta inserción del casete en el *locus* deseado fue corroborada mediante PCR, utilizando un par de oligonucleótidos para cada mutante en cuestión (5'Screen-Upst y 3'Screen-Upst) que amplifican un fragmento río arriba que comprende de una región fuera del casete de interrupción y otra dentro del casete. Por otro lado, se amplificó un segundo fragmento río abajo con un oligonucleótido iniciador directo 5'Screen-Downst dentro del casete de interrupción

y un oligonucleótido iniciador reverso, 3'Screen-Downst, fuera del casete de interrupción (**Fig. 10**).

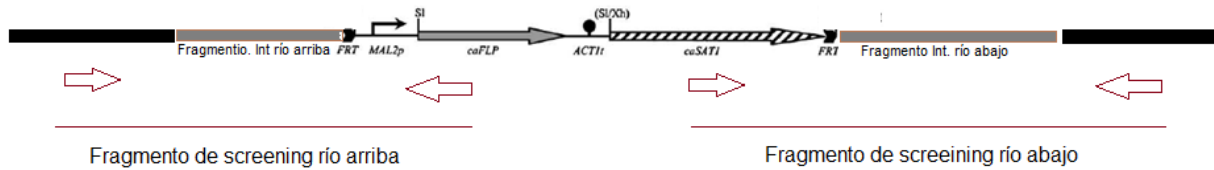


Figura 10. Escrutinio de la correcta integración del casete de interrupción en el locus deseado. Se muestra en gris el casete de interrupción y en negro el resto de locus. Se muestra con flechas rojas los iniciadores utilizados para amplificar a ambos fragmentos de escrutinio (Iniciadores ScreenUpst y ScreenDownst, Ver tabla 2)

Generación de una mutante homocigota *Ctmnn4*Δ/*mnn4*Δ

Se llevó a cabo una primera ronda de transformación mediante electroporación con un casete para interrumpir *CtMNN4* utilizando como medio de selección YPD sólido + Nourseotricina (100µg/mL). Transformantes resistentes a nourseotricina fueron obtenidas después de 3-6 días y posteriormente se les extrajo ADN genómico, el cual fue utilizado para llevar a cabo una PCR para amplificar ambos fragmentos de escrutinio, previamente descritos en la sección anterior, utilizando los iniciadores 5'Screen-Upst.MNN4, 3'Screen-Upst.MNN4 y 5'Screen-Downt.MNN4 3'Screen-Downt.MNN4, respectivamente, donde las clonas 2 y 3

resultaron positivas. **(Fig.11)**. El fragmento de escrutinio río arriba fue sometido a un doble patrón de digestión donde se corroboró su identidad, obteniendo los fragmentos esperados **(Anexo. Fig.1)**. Se escogió una de estas clonas y se indujo la activación de la flipasa contenida en el vector de pSFS2 para expulsar el marcador de selección de resistencia a nourseotricina, esto se hizo creciendo las células en medio líquido YNB-Maltosa (2%) durante dos días. Enseguida, las clonas fueron cultivadas en medio sólido YNB-Maltosa (2%) suplementado con una dosis subletal de nourseotricina (10 µg/mL) y a los 5 días se seleccionaron las colonias más pequeñas, correspondientes a aquellas que habían perdido el casete de resistencia. Una clona sensible a nourseotricina fue caracterizada para corroborar la correcta expulsión del marcador de selección mediante amplificación por PCR de la cicatriz génica, utilizando los oligonucleótidos 5'Screen-Upst.MNN4 y 3'Screen-Downstr.MNN4, obteniendo un fragmento de 1650 pb, perteneciente a la cicatriz y el amplicón silvestre, con un tamaño de 3486 pb del aleo intacto, la identidad de dicha cicatriz fue corroborada mediante un patrón de digestión **(Ver Figura 2, Anexo)**. **(Fig.12)**.

Esta clona sensible a nourseotricina se sometió a una segunda ronda de transformación, utilizando el mismo casete de interrupción generado para CtMNN4. Se seleccionaron varias transformantes para amplificar los dos amplicones de escrutinio río arriba y río abajo mediante PCR a partir de ADN genómico. Dos clonas resultaron positivas **(Fig.13)** al amplificar ambos fragmentos simultáneamente. La clona 1 se utilizó para expulsar el marcador de resistencia a

nourseotricina inducida por maltosa, y fue elegida una clona para ser sometida a un escrutinio por PCR, en donde a partir de ADN genómico se amplificó la cicatriz correspondiente a los dos alelos interrumpidos, como se puede apreciar en la **figura 14**. Se pudo corroborar que dicha clona homocigota no contiene ya el amplicón silvestre que se observa en la cepa heterocigota, lo que confirma que el gen fue interrumpido (**Fig.14**)

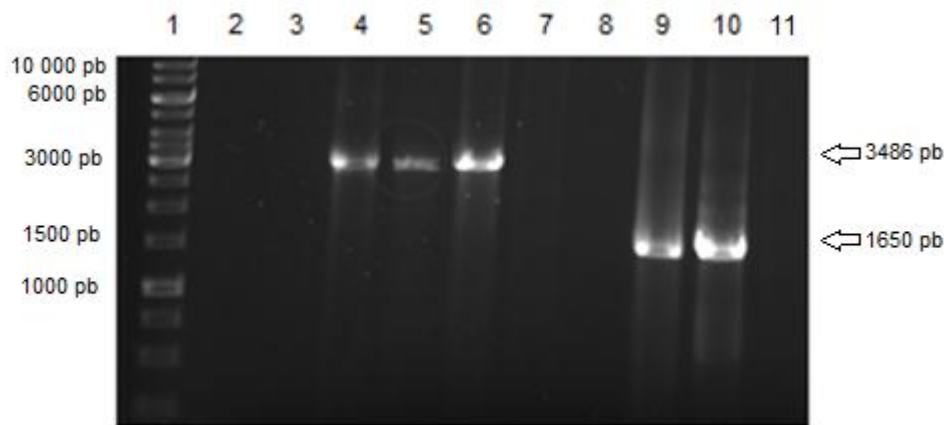


Fig 11. Escrutinio de clonas heterocigotas Ct.MNN4/mnn4 Δ . Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.MNN4 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3 a 7. Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.MNN4 de 4 transformantes. Carril 7. Control negativo de amplificación de fragmento 3'Screen-Downstr.MNN4 a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre. Carril 8 a 11. Amplificación de fragmento 3'Screen-Downstr.MNN4 a partir de ADN genómico de 4 transformantes.

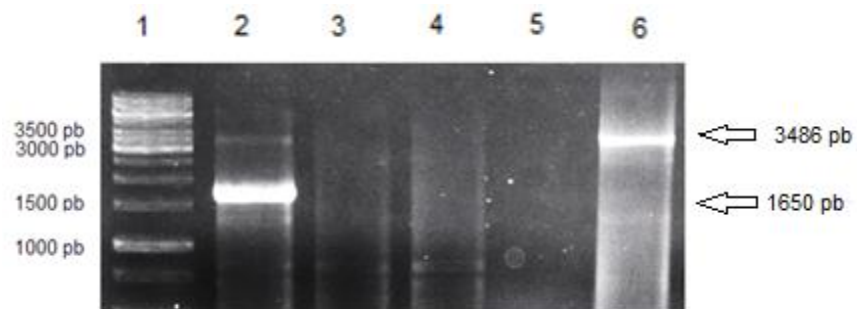


Figura 12. Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota *Ct.MNN4/mnn4* Δ después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2 a 5. Amplificación simultánea de amplicón silvestre y cicatriz de clonas 1, 2,3 y 4, respectivamente. Carril 6. Control positivo de amplificación de amplicón silvestre a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre.

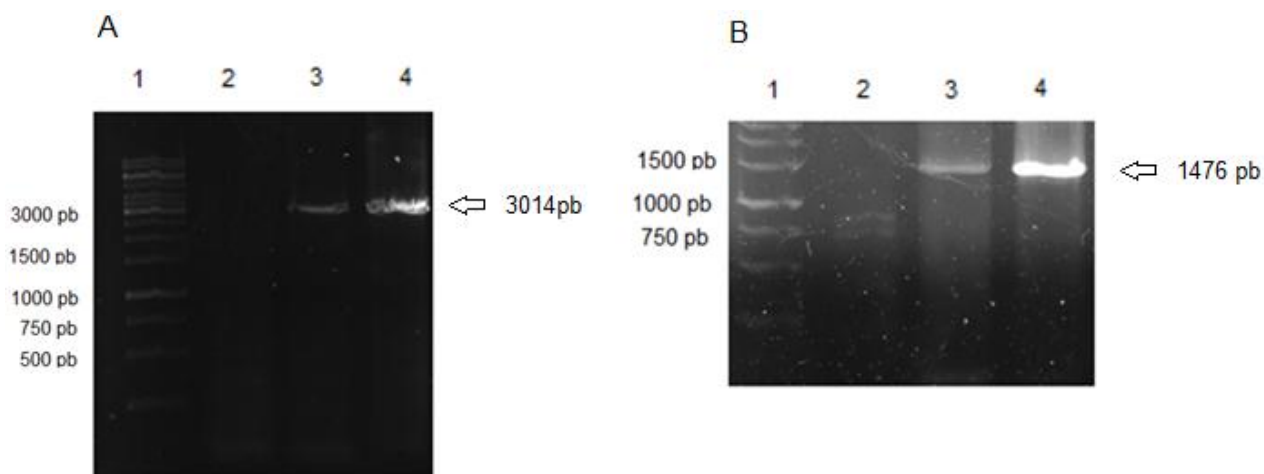


Figura 13. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de mutantes homocigotas *Ct.mnn4* Δ /*mnn4* Δ . Figura A. Carril 1. Marcadores de peso

molecular. Carril 2. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.MNN4 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3 y 4. Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.MNN4 de transformantes 1 y 2. **Figura B.** Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control negativo de amplificación de fragmento 3'Screen-Downst.MNN4 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3 y 4. Amplificación de fragmento 5'Screen-Downs.MNN4 de transformantes 1 y 2, respectivamente.

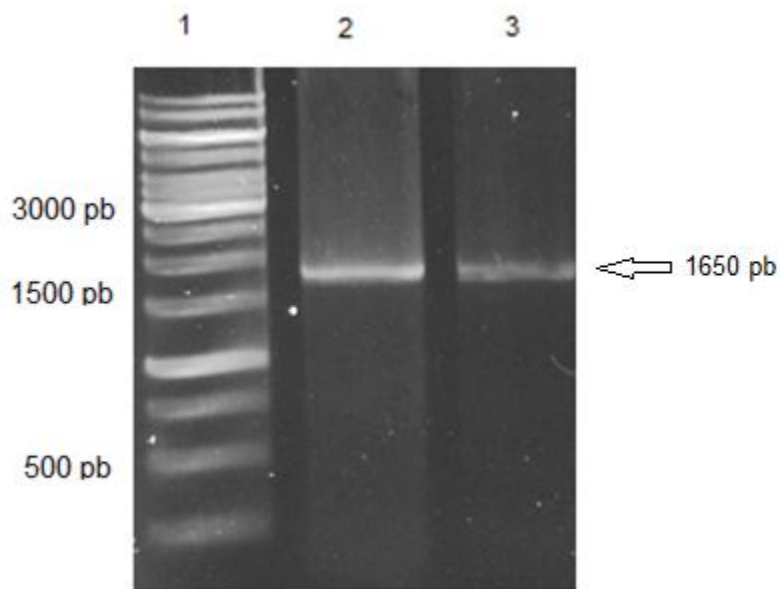


Figura 14. Amplificación de la cicatriz de dos clonas homocigotas *Ct.mnn4*Δ/*mnn4*Δ después de la expulsión del casete de resistencia a

nourseotricina. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2 y 3. Amplificación simultánea de amplicón silvestre y cicatriz de clonas 1, 2. Se aprecia que las clonas homocigotas solamente amplifican la cicatriz, lo que confirma que son homocigotas.

Generación de una mutante homocigota *Ctoch1*Δ/*och1*Δ

Al igual que para el caso de *CtMNN4*, se llevó a cabo una primera ronda de transformación de la cepa silvestre de *C. tropicalis* MYA-3404 con un casete de interrupción para *CtOCH1*. De esta primera ronda de transformación, se obtuvieron 4 clonas positivas que amplificaron ambos fragmentos de escrutinio río arriba y río abajo con los tamaños esperados, 3302 pb y 3721 pb, respectivamente, utilizando los iniciadores 5'Screen-Upst.OCH1, 3'Screen-Upst.OCH1 y 5'Screen-Downt.OCH1, 3'Screen-Downt.OCH1, respectivamente **(Fig. 15)**.

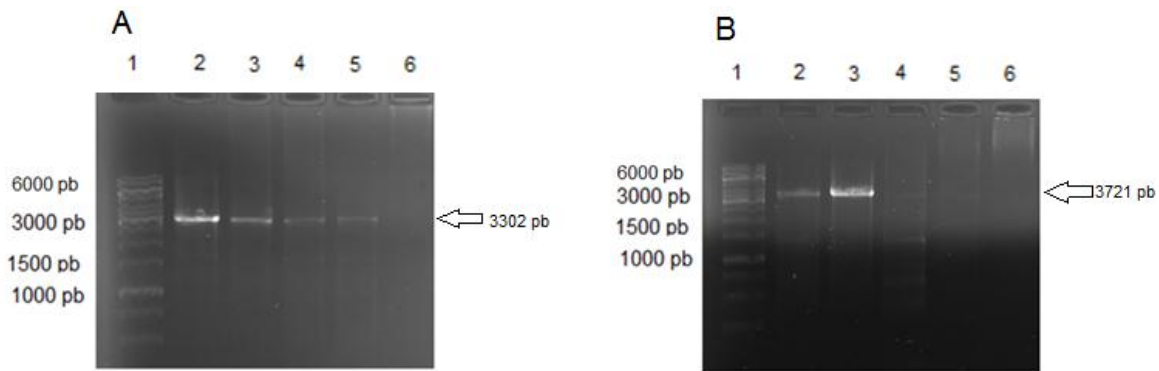


Figura 15. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de mutantes heterocigotas Ct.OCH1/och1 Δ . **Panel A.** Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2 a 5. Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.OCH1 de transformantes 1, 2, 3 y 4. Carril 6. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.OCH1 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. **Panel B.** Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2 a 5. Amplificación de fragmento 3'Screen-Downst.OCH1 de transformantes 1,2, 3 y 4. Carril 6. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Downst.OCH1 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre.

Para corroborar la identidad de los amplicones, se llevó a cabo una digestión de ambos fragmentos, resultando el patrón de bandas esperado (**Figura 3. Anexo**). La clona 2 fue elegida para ser sometida a la expulsión del marcador de selección mediante inducción por maltosa, de este proceso fueron obtenidas abundantes clonas heterocigotas sensibles a nourseotricina, de las cuales se eligió una para ser sometida a escrutinio amplificando la cicatriz esperada de un tamaño de 3596

pb y un amplicón silvestre de 4727 pb, utilizando los oligonucleótido iniciadores 5'Screen-Upst.OCH1 y 3'Screen-Downt.OCH1 (**Fig.16**).

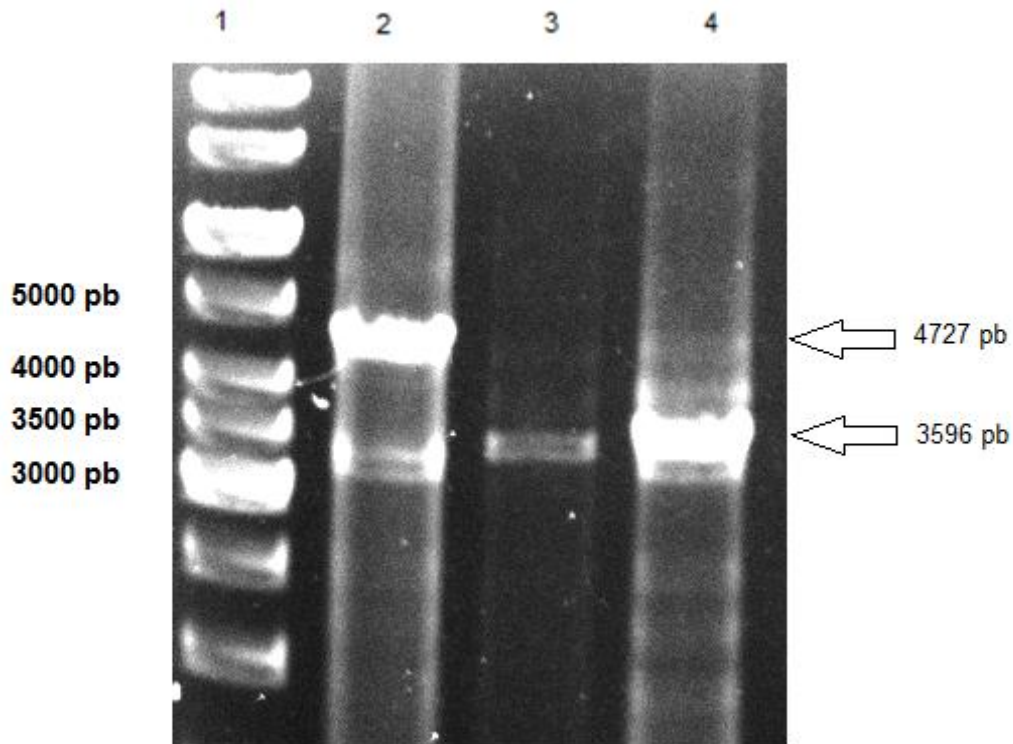


Figura 16 .Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota *Ct.OCH1/och1* Δ después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control positivo de amplificación de amplicón silvestre de 4727 pb a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3. Clona 1 negativa. Carril 4. Clona 2 positiva que amplifica el amplicón silvestre de 4727 pb y la cicatriz de 3596 pb.

Esta clona fue sometida a una segunda ronda de transformación, amplificando nuevamente los dos fragmentos de escrutinio río arriba y río abajo (**Fig.17**). Esta clona homocigota resistente a nourseotricina, se sometió a una segunda ronda de expulsión del marcador de selección inducida por maltosa, obteniendo una clona homocigota que, como ya se esperaba, solo contenía la cicatriz de tamaño esperado de 3596 pb (**Fig.18**). Para corroborar que el marco de lectura abierto del gen *CtOCH1* ya no estaba presente, se hizo una amplificación utilizando ADN genómico de esta clona y se intentó amplificar el marco de lectura *CtOCH1* con un tamaño esperado de 1131 pb; sin embargo, no hubo amplificación (**Fig.19**). Como control de integridad del ADN se amplificó a partir de este último el gen *CtPMR1* con un tamaño esperado de 2760 pb, y como control de integridad de los oligonucleótido iniciadores se amplificó el marco de *CtOCH1* de 1131 pb a partir de DNA genómico de la cepa silvestre de *C. tropicalis*. Al no obtener amplificación en el caso de la transformante homocigota, se demostró la delección del gen. (**Fig.19**).

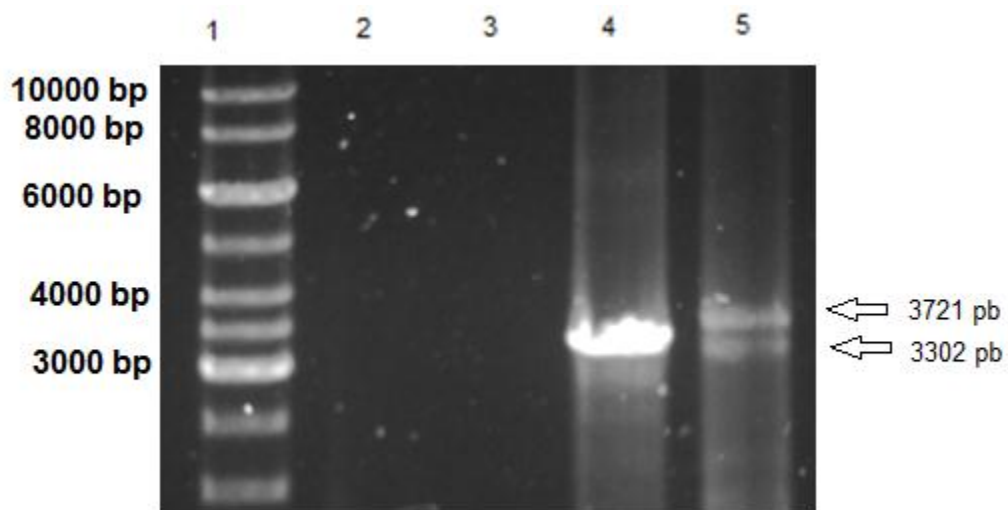


Figura 17. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigotas *Ct.OCH1/och1*Δ. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.OCH1 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3. Control negativo de amplificación de fragmento 5'Screen-Downst.OCH1 a partir de ADN de *C. tropicalis* silvestre. Carril 4. Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.OCH1 a partir de ADN genómico de clona 1. Carril 5. Amplificación de fragmento 5'Screen-Downst.OCH1 a partir de ADN genómico de clona 1.

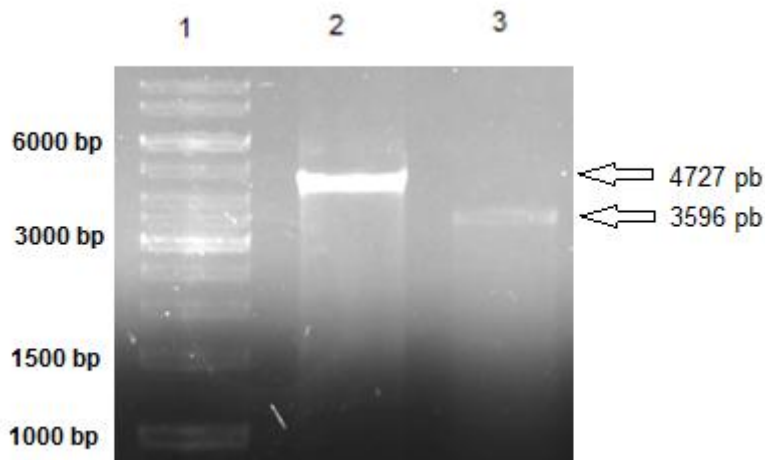


Figura 18. Amplificación de la cicatriz de una clona homocigota *Ct.och1*Δ/*och1*Δ después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control positivo de amplificación del amplicón silvestre de 4727 pb a partir de ADN genómico de *C. tropicalis*. Carril 3. Amplificación simultánea del amplicón silvestre y de la cicatriz

con un tamaño esperado de 3596 pb. Como se aprecia en el último carril, esta clona no amplifica el amplicón silvestre, solamente la cicatriz, lo que confirma que es una clona homocigota.

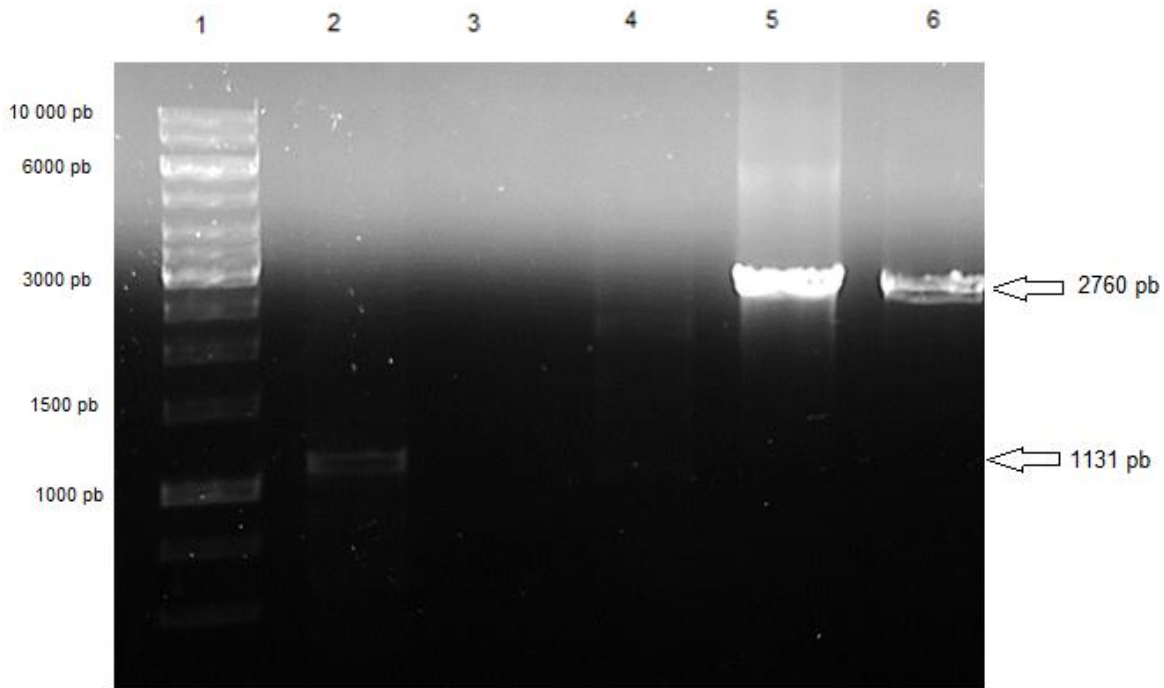


Figura 19. Confirmación de ausencia del marco de lectura abierto *Ct. OCH1* en la clona homocigota *Ct.och1Δ/och1Δ*. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control positivo de amplificación del marco de lectura abierto *Ct.OCH1* a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre. Carril 3. Amplificación del marco de lectura abierto *Ct.OCH1* a partir de ADN genómico de homocigota *Ct.och1Δ/och1Δ*, el cual está ausente. Carril 4. Control de homocigota *Ct.och1Δ/och1Δ*, el cual está ausente. Carril 5. Amplificación del marco de lectura abierto *Ct.OCH1* a partir de ADN genómico de heterocigota *Ct.OCH1/och1Δ* (se aprecia banda tenue a los 1131 pb) . Carril 6. Control de silvestre.

amplificación del marco de lectura abierto *Ct. PMR1* a partir de *C. tropicalis* silvestre con un tamaño esperado de 2760 pb. Carril 6. Control de amplificación del marco de lectura abierto *Ct. PMR1* a partir de ADN genómico de clona *Ct.och1Δ/och1Δ* con un tamaño esperado de 2760 pb.

Generación de una mutante homocigota *Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ*

Utilizando un casete de interrupción para *CtPMR1*, se interrumpió *CtPMR1* de la misma manera como se describió en las dos secciones anteriores. Para analizar la clona heterocigota resistente a nourseotricina, se utilizaron los oligonucleótido iniciadores 5'Screen-Upst.PMR1, 3'Screen-Upst.PMR1 y 5'Screen-Downt.PMR1, 3'Screen-Downt.PMR1 que amplifican dos amplicones río arriba y río abajo, de 2410 pb y 2788 pb, respectivamente, corroborando la correcta integración del casete de interrupción. En la **Figura 20** se muestra una clona positiva a partir de la cual se amplificó el fragmento río arriba con un tamaño esperado de 2410 pb y un fragmento río abajo de 2788 pb. Esta clona se sometió a la expulsión del marcador de resistencia a la nourseotricina y una clona resultante, se sometió a escrutinio mediante PCR, amplificando la cicatriz esperada de 3510 pb. (**Fig.21**). Esta clona se sometió a una segunda ronda de transformación obteniendo una clona positiva que amplificó los dos fragmentos de escrutinio (**Fig 22**). Esta clona se sometió a la segunda ronda de expulsión del marcador de selección obteniendo una

homocigota sensible a nourseotricina cuyo ADN_g amplifica la cicatriz esperada de 3510 pb y es incapaz de amplificar el marco de lectura abierto de *PMR1*, lo que confirma su homociguidad. (Fig.23).

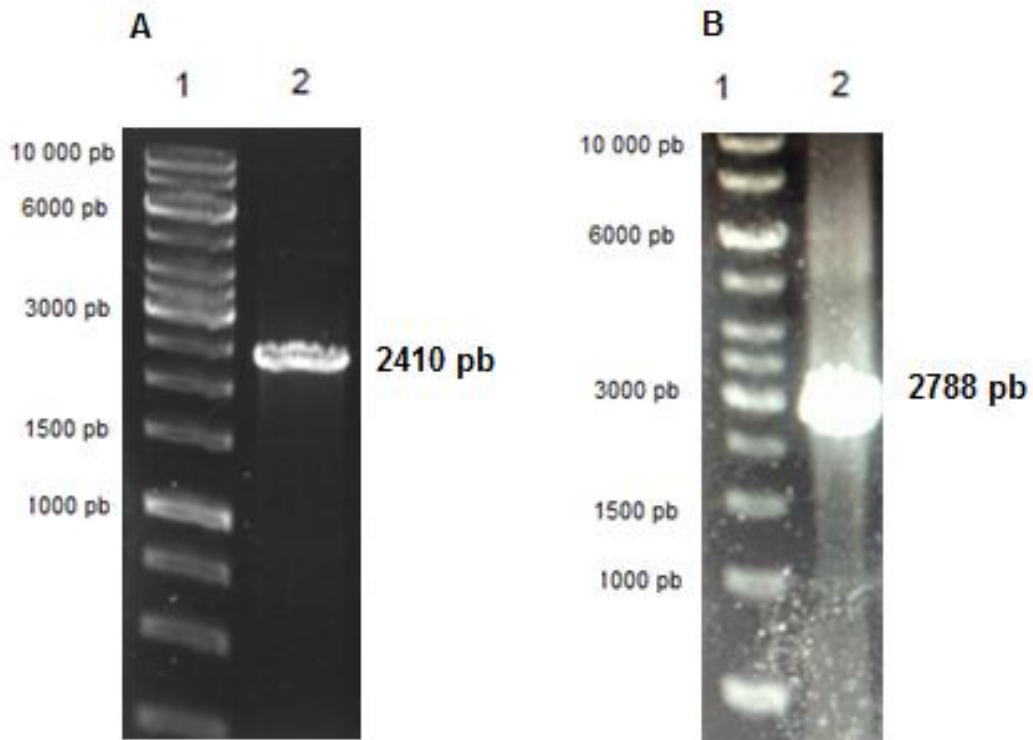


Figura 20. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigotas *Ct.PMR1/pmr1*Δ. **Figura A.** Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.PMR1 a partir de ADN genómico de clona 1. **Figura B.** Carril 1. Marcadores de peso molecular.

Carril 2. Amplificación de fragmento 3'Screen-Downst.PMR1 a partir de ADN genómico de clona 1.

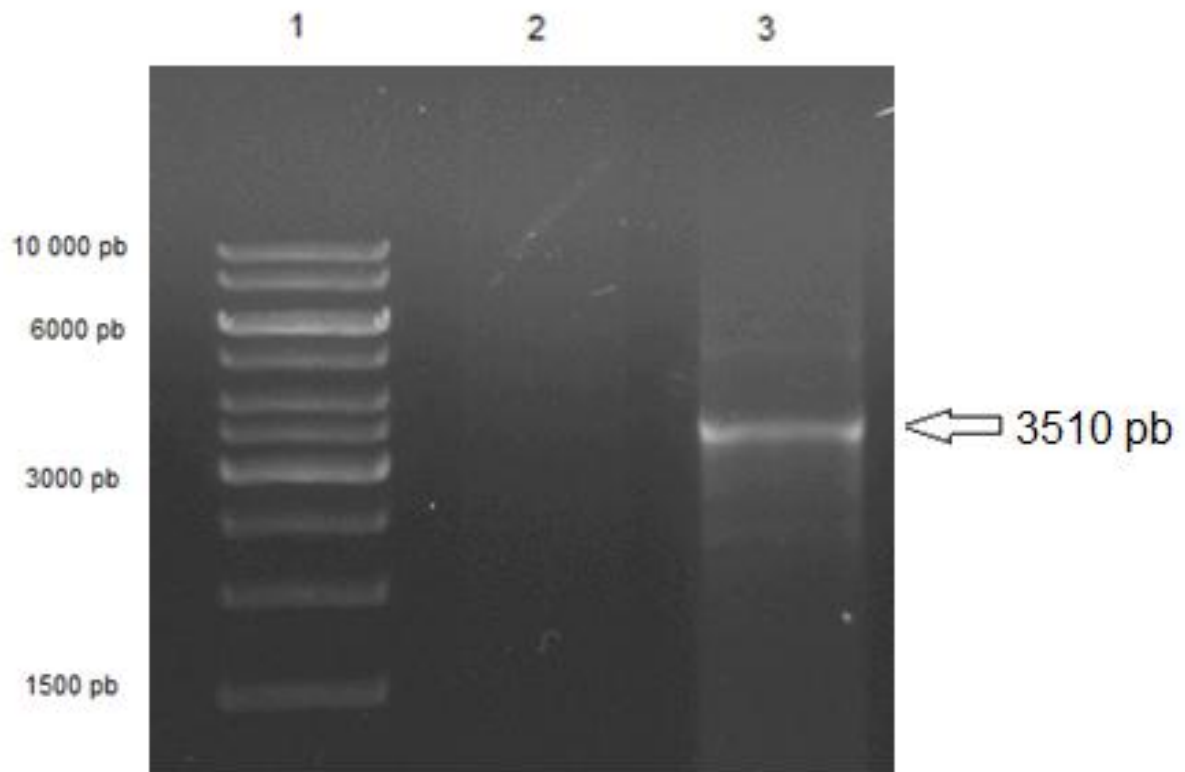


Figura 21 .Amplificación de la cicatriz de una clona heterocigota *Ct.PMR1/pmr1* Δ después de la expulsión del casete de resistencia a nourseotricina. Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Control negativo de amplificación de la cicatriz de 3510 pb a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre usando 3:30 minutos de extensión. Carril 3. Clona 1 positiva que amplifica la cicatriz esperada de 3510 pb.

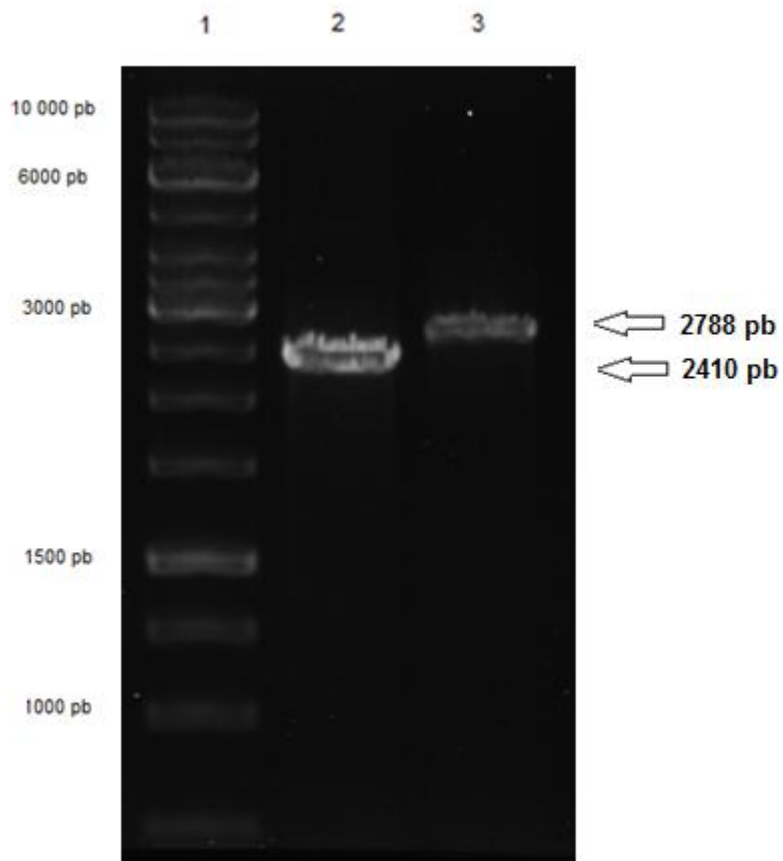


Figura 22. Amplificación de los fragmentos de escrutinio de una mutante homocigota *Ct.pmr1* Δ /*pmr1* Δ . Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2.

Amplificación de fragmento 5'Screen-Upst.PMR1 de clona 1. Carril 3. Amplificación de fragmento 3'Screen-Downst.PMR1 a partir de ADN genómico de clona 1.

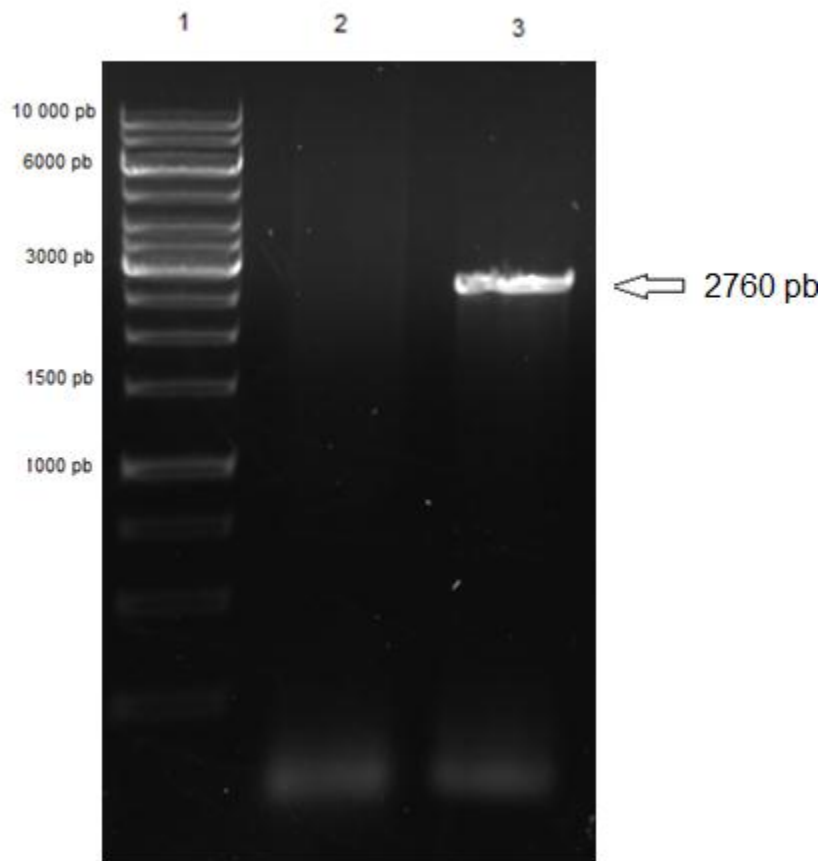


Figura 23. Confirmación mediante PCR de la homocigocidad de la clona *Ct.pmr1* Δ /*pmr1* Δ . Carril 1. Marcadores de peso molecular. Carril 2. Amplificación del marco de lectura abierto *CtPMR1* a partir de la clona homocigota

Ct.pmr1Δ/pmr1Δ. Carril 3. Amplificación de *Ct.PMR1* a partir de ADN genómico de *C. tropicalis* silvestre.

**Generación de cepas control reintegrantes para *Ctmnn4Δ/mnn4Δ*,
Ctoch1Δ/och1Δ y *Cpmr1Δ/pmr1Δ***

Una vez que se obtuvo la mutante *Ctmnn4Δ*, se reintegró el gen de *CtMNN4* con promotores y terminadores, para lo cual se diseñó un par de oligonucleótido iniciadores que amplifican desde – 1000 pb río arriba del marco de lectura abierto hasta + 500 pb después del marco de lectura abierto. Estos iniciadores denominados 5'ReintUpst y 3'ReintUpst amplificaron el gen completo de 4643 pb para el caso de *CtMNN4*, 2789 pb para *CtOCH1* o bien 4517 pb para el caso de *CtPMR1*. Estos fragmentos se ligaron al sitio de clonación *ApaI*– *XhoI* del vector pSFS2 de la misma forma que se subclonaron los fragmentos de interrupción. Posteriormente, se amplificó un fragmento de 700 pb que comienza 20 pb aproximadamente río debajo de la secuencia del fragmento de reintegración elegido. Este fragmento se amplificó con los oligonucleótido iniciadores 5'ReintDownst y 3'ReintDownst y se subclonaron en el sitio *NotI*– *SacI* del vector pSFS2. De esta forma, al linearizar el vector pSFS2 mediante *ApaI*–*SacI* se pudo llevar a cabo una doble recombinación homóloga con ambos brazos en los *loci*

que flanquea a la cicatriz que quedó después de la interrupción de cada ORF en cuestión. Para buscar una cepa que hubiese integrado una copia en el locus deseado de la mutante nula de *Ctmnn4Δ*, se hizo un escrutinio mediante PCR y un par de oligonucleótido iniciadores (5'ScreenReintMNN4Up y 3'ScreenReintMNN4Up) que amplifican un fragmento río arriba que comprende una región fuera del casete de interrupción y otra dentro del casete de reintegración, con un tamaño esperado de 1009 pb. Por otro lado, se amplificó un segundo fragmento río abajo con un oligonucleótido iniciador directo 5'ScreenReintMNN4Downst dentro del casete de reintegración y un oligonucleótido iniciador reverso, 3'ScreenReintMNN4Downst, fuera del casete de reintegración, amplificando un fragmento de 1253 pb , de la misma forma que se plantea en la **Fig. 10**.

Una clona reintegrante resultó positiva (**Figura 24.A**), amplificando los dos fragmentos de reintegración y el marco de lectura abierto *Ct. MNN4*. (**Fig.24.B**). Para el caso de las reintegrantes de *Ctoch1Δ+CtOCH1* y *Ctpmr1Δ+CtPMR1*, se amplificó el ORF correspondiente, indicando la reintegración del gen (**Anexo, Figura 4**).

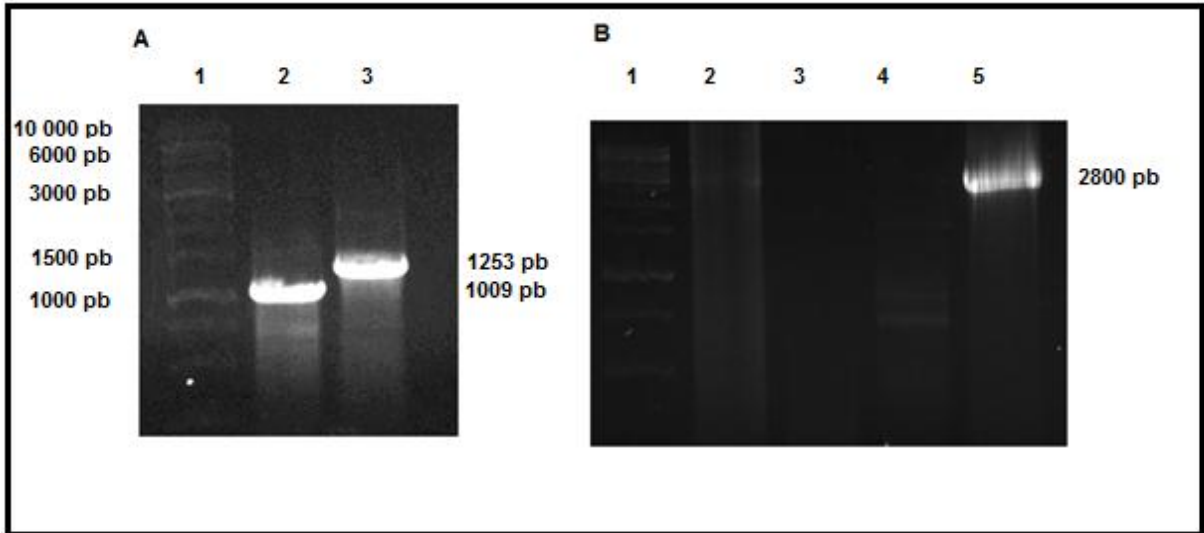


Figura 24. Escrutinio mediante PCR de una reintegrante *Ctmnn4Δ/mnn4Δ+CtMNN4*. A; Carril 1, Marcadores de peso molecular, Carril 2, fragmento de escrutinio de reintegración río arriba con un tamaño esperado de 1253 pb, de la clona 1. Carril 3. Fragmento de escrutinio de reintegración río debajo de clona 1, con un tamaño esperado de 1253 pb. **B;** Carril 1, Marcadores de peso molecular, carril 2, control negativo de amplificación del marco de lectura abierto de *CtMNN4* a partir de genómico de NGY152, carril 3 y 4, control negativo de amplificación el marco de lectura abierto de *CtMNN4* a partir de *Ctmnn4Δ/mnn4Δ*, Carril 5, amplificación del marco de lectura abierto *Ct.MNN4* de clona 1 (Reintegrante *Ctmnn4Δ/Ctmnn4Δ+CtMNN4*).

Análisis fenotípico de *Ctmnn4*Δ/*Ctmnn4*Δ

La mutante *Ctmnn4*Δ/*Ctmnn4*Δ no tuvo cambios en cuanto a morfología, ya que la forma de la levadura es idéntica a la cepa silvestre (**Fig.25.A y Fig 25. B**), tampoco presentó termo sensibilidad, pero sí tuvo un decremento muy drástico en los niveles de retención del colorante catiónico azul alciano, a niveles muy cercanos a cero, los cuales son parcialmente restaurados en la reintegrante *Ctmnn4*Δ/*mnn4*Δ + *CtMNN4* (**Fig. 26**). En un ensayo macroscópico se puede apreciar claramente la nula retención del colorante por parte del paquete celular de *Ctmnn4*Δ (**Fig.25 C**), lo que confirma que *CtMNN4* codifica para el regulador maestro de la fosfomanosilación de proteínas en este microorganismo. Para corroborar la ausencia de fosfomananas, se realizó un FACE (**Figura 27**), donde se puede apreciar que las fosfomananas *C. tropicalis* silvestre y reintegrante se componen de monosacárido y oligosacáridos que van de 2 a 5 residuos de manosa. La mutante mostró un perfil con acumulación de monosacárido (1 residuo) y una banda tenue a la altura del marcador de maltobiosa pero están ausentes el resto de bandas de mayor tamaño indicando pérdida de fosfomanosilación. Para corroborar que nuestro método, montamos un FACE con la mutante de *Camnn4*Δ ausente de fosfomananas, observando un patrón electroforético similar en esta mutante con acumulación de monosacárido (**Figura 5, Anexo**), lo que indica que muy probablemente existe fosfomanosilación residual del núcleo en ambas especies.

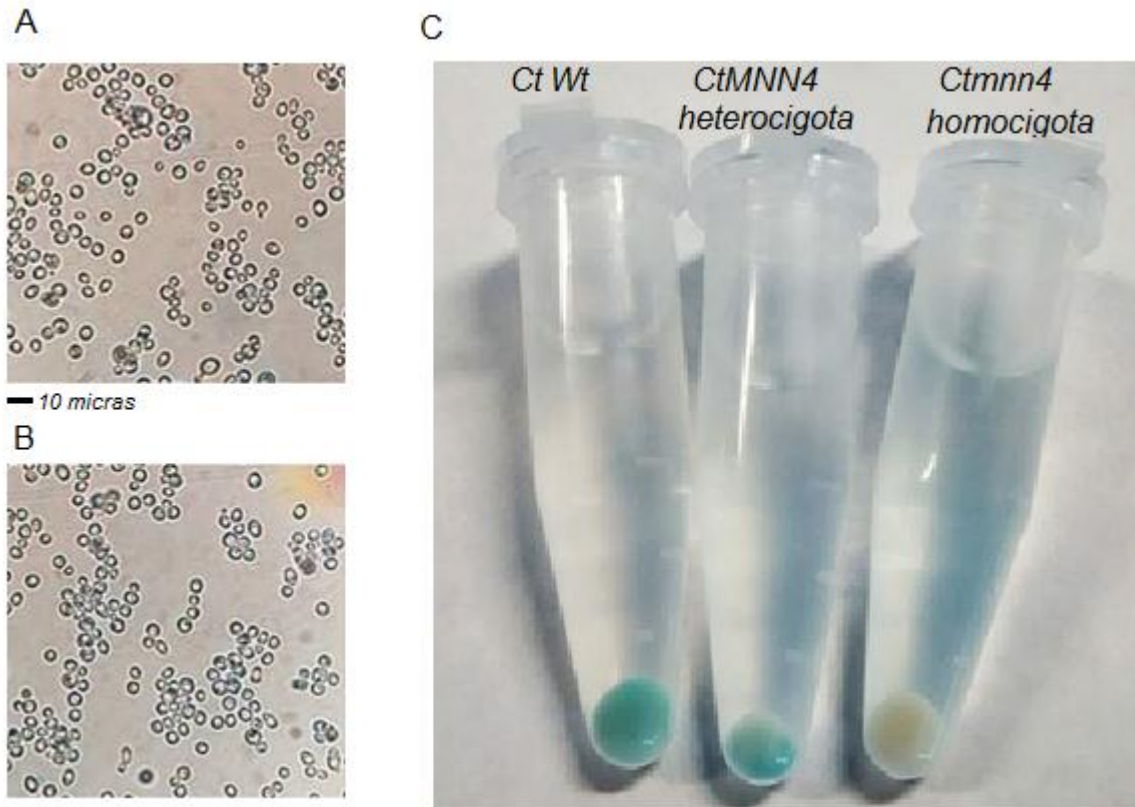


Figura 25. Análisis fenotípico de la cepa *Ctmnn4Δ/mnn4Δ* **A.** Morfología en campo claro de *C. tropicalis* silvestre. **B.** Morfología en campo claro de *Ctmnn4Δ/mnn4Δ*. **C.** Ensayo macroscópico de retención del colorante azul alciano por parte del paquete celular por parte de *C. tropicalis* silvestre, la cepa heterocigota *CtMNN4Δ/mnn4Δ* y la homocigota *Ctmnn4Δ/mnn4Δ*.

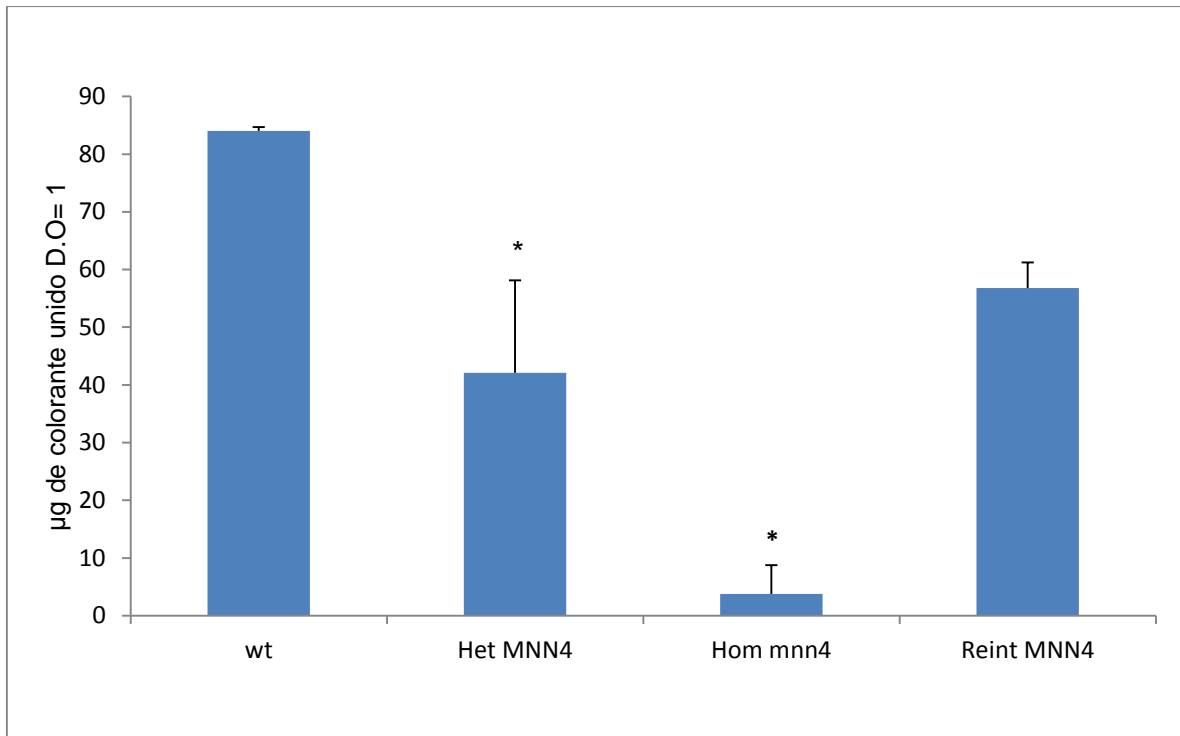


Figura 26. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul alciano en las 4 cepas analizadas para estudiar el gen *CtMNN4*. Microgramos totales de colorante unidos por cepa ajustada a una D.O de 0.2 contenida en 1 mL de azul alciano. * $p < 0.05$ para la cepa heterocigota *CtMNN4/Ctmnn4Δ* y homocigota *mnn4Δ* con respecto a la cepa *C. tropicalis* silvestre (Wt).

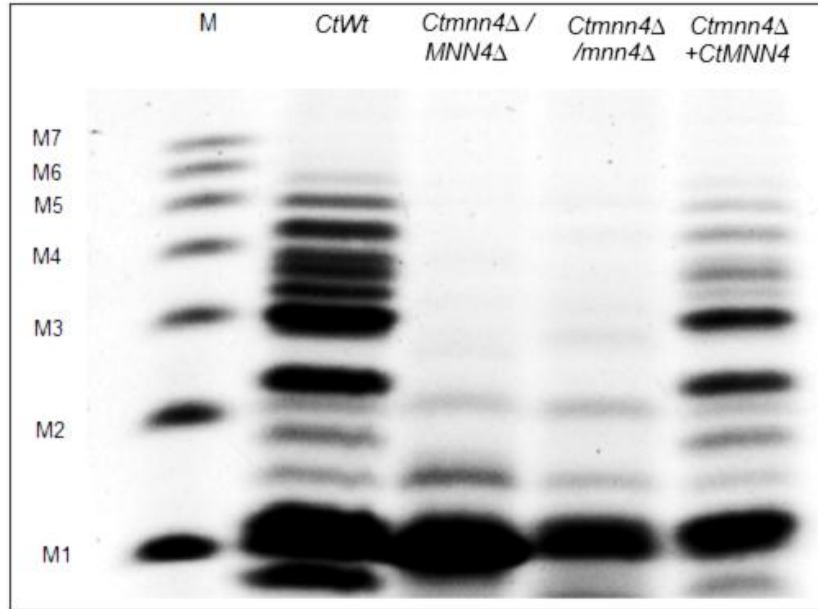


Figura.27. Análisis por FACE de oligosacáridos obtenidos a partir de fosfomananas de *C. tropicalis*. En el carril 1, se muestran marcadores de malto oligosacáridos desde 1 unidad (M1) hasta 7 unidades de glucosa (M7). Carril 2 a 4, corresponde a las cepa silvestre, heterocigota, mutante nula y reintegrante respectivamente.

Tabla 3. Composición de pared de cepa silvestre, *Ctmnn4Δ* y reintegrante.

Cepa	Abundancia de carbohidratos de pared			Porosidad
	Quitina (%)	Glucosa (%)	Manosa (%)	
<i>CtWt</i>	2.08±0.43	59.42±5.54	38.49±5.08	55.15 ± 5.88
<i>Ctmnn4Δ/mnn4Δ</i>	2.92±0.47	54.3±3.29	42.7±2.77	67.72 ± 5.58*
<i>Ctmnn4Δ+CtMNN4</i>	2.26±0.0351	58.5±3.25	39.2±3.20	56.61 ± 7.59

* $p < 0.05$, valor p al comparar la porosidad de la cepa *Ctmnn4Δ/mnn4Δ* con la cepa silvestre y su reintegrante utilizando una prueba T de Student.

Análisis fenotípico de *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ*

La cepa *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ* mostró una clara diferencia en la morfología colonial al presentar bordes irregulares y pliegues que le dan una forma semejante a una pelota de golf. Por su parte, las levaduras presentaron aglomerados celulares que no se observan en la cepa silvestre, lo que sugiere que esta cepa tiene un defecto acentuado en la glicosilación, como ya se ha visto en mutantes de *OCH1* de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. (Bates *et al*; 2006). También se puede observar un defecto en los niveles de retención del colorante azul alciano (**Figura 28, 29**).

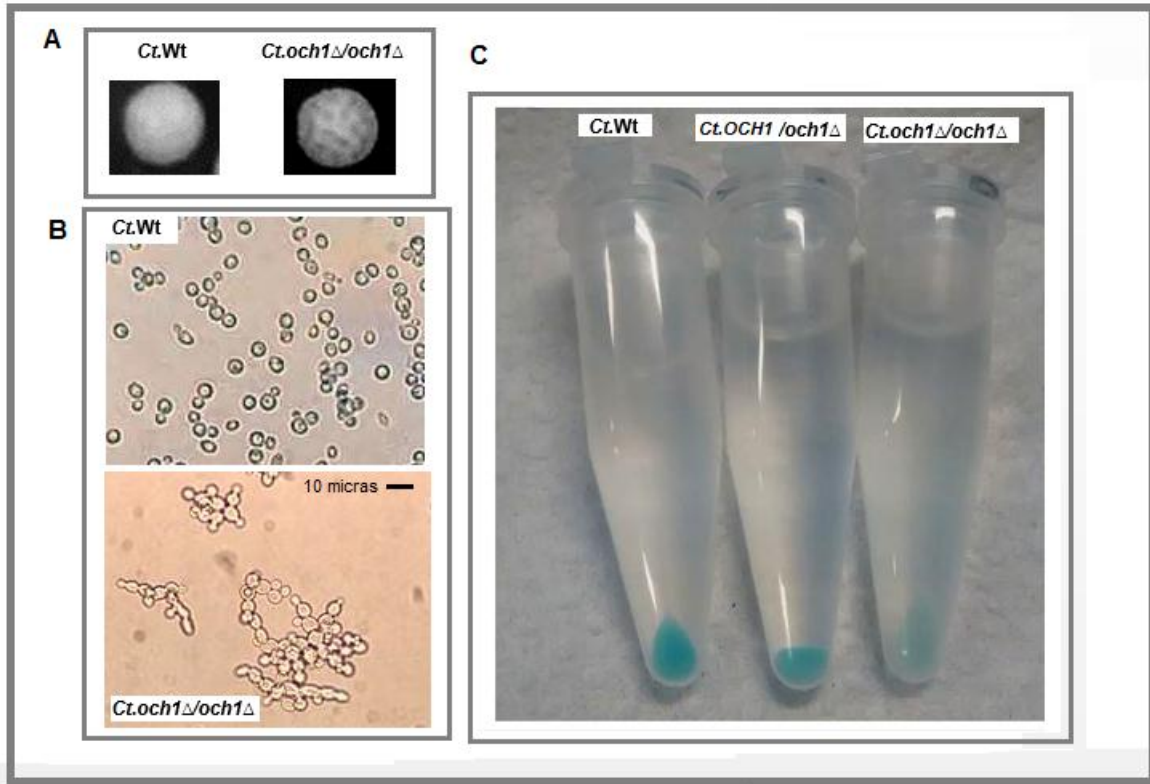


Figura 28. Análisis fenotípico de *Ctoch1Δ/och1Δ*. **A.** Morfología colonial de *C. tropicalis* y mutante *Ctoch1Δ/och1Δ*. **B.** Microscopía de campo claro de levaduras silvestres (arriba) y la mutante (abajo). **C.** Análisis fenotípico de retención del colorante azul Alciano de las tres cepas evaluadas.

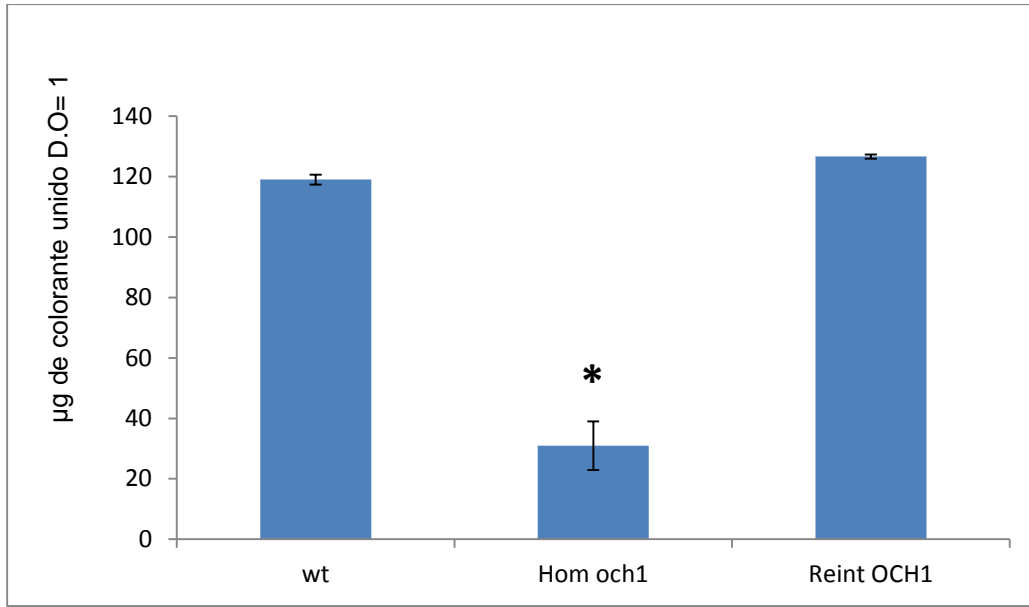


Figura 29. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul Alciano por parte de la cepa *Ctoch1Δloch1Δ*. Microgramos totales de colorante unidos por cepa ajustada a una D.O de 0.2 contenida en 1 mL de azul alciano. * $p < 0.05$ al comparar los niveles de retención del colorante de la mutante nula con *C. tropicalis* silvestre y reintegrante utilizando una prueba T de Student.

Para conocer si hubo un re-arreglo en los componentes de la pared celular de esta cepa, se determinó la abundancia relativa de carbohidratos, mediante HPAEC (Cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico). Los resultados sugieren que en la mutante hubo un aumento significativo de glucosa (de 65.85% a 87.11 %) y una disminución de manosa (de 29.48 % a 6.85 %), mientras que la abundancia de quitina no cambió. **(Figura 30).**

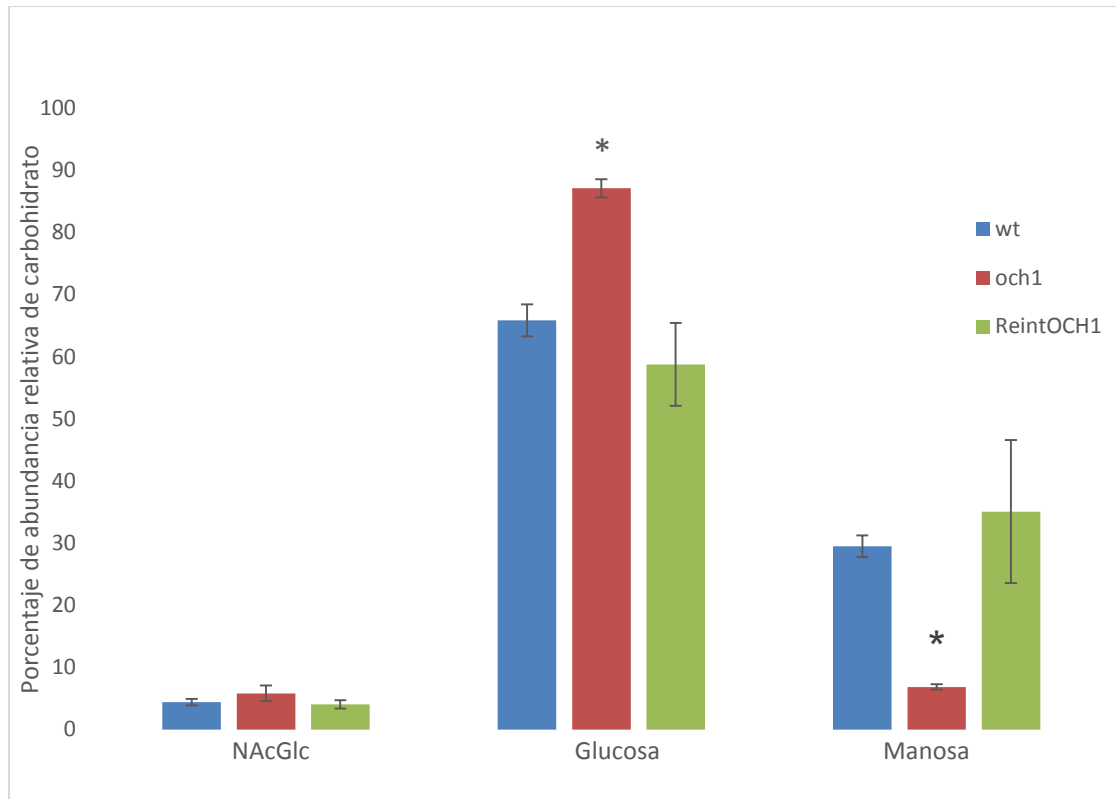


Figura 30. Abundancia relativa de componentes de pared celular en la cepa *C.tropicalis* silvestre , *Ctoch1Δ/och1Δ* y reintegrante . Se muestra en azul, los datos correspondientes a *C. tropicalis* silvestre, en rojo a la cepa *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ* y en verde a la reintegrante .GlcNAc= N-Acetil glucosamina, Glc=Glucosa, Man=Manosa.* $p < 0.05$ al comparar el contenido de la glucosa y manosa de la cepa *Ctoch1Δ/och1Δ* con respecto a la cepa silvestre utilizando una prueba T de Student.

Debido al re-arreglo de componentes de pared celular de esta cepa, se realizó un ensayo de termosensibilidad probando tres temperaturas diferentes, 28 °C, 37 °C

y 42 °C. Como se aprecia en la **figura 31**, la cepa mutante muestra un crecimiento similar a la silvestre, pero tiene un defecto en el crecimiento a los 37°C y es incapaz de crecer a los 42 °C.

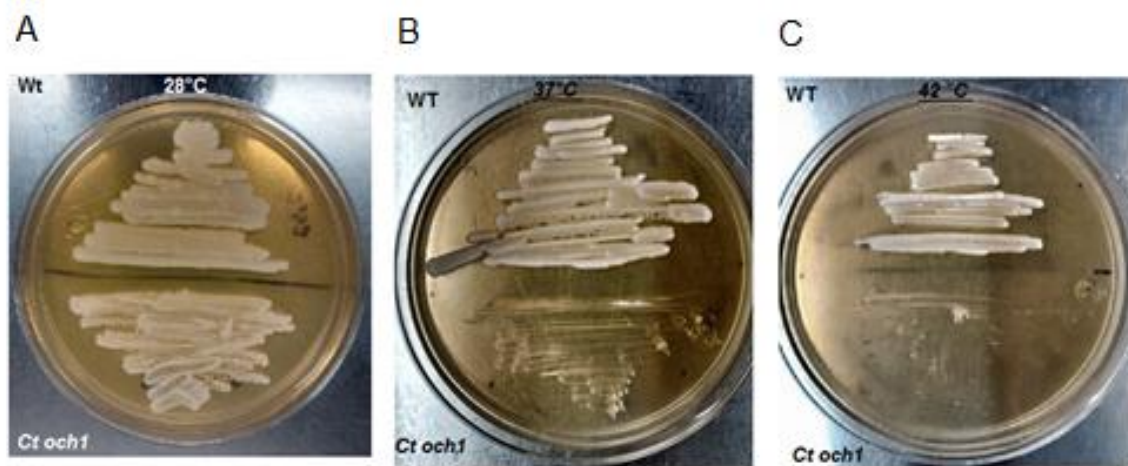


Figura 31. Ensayo de termosensibilidad de *C. tropicalis* silvestre y *Ctoch1*Δ/*och1*Δ. Cepa silvestre (arriba) y mutante (abajo) crecidas por 2 días en medio YPD sólido a 28°C (Panel A), 37 °C (Panel B) y 42 °C (Panel C).

Tabla 4. Porosidad relativa de la mutante *Ctoch1*Δ/*och1*Δ al DEAE-Dextrano.

Cepa	Porosidad
<i>CtWt</i>	55.15 ± 5.88
<i>Ctoch1</i> Δ/ <i>Ctoch1</i> Δ*	88.81 ± 2.64*
<i>Ctoch1</i> Δ+ <i>CtOCH1</i>	56.90 ± 10.49

* $p < 0.05$ al comparar la porosidad relativa de *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ* con la cepa silvestre y la reintegrante utilizando una prueba T de student.

Análisis fenotípico de *Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ*

Esta mutante presenta termosensibilidad a 37°C, es incapaz de crecer a 42 °C y la dosis subletal de nourseotricina (10 µg/mL) para *C. tropicalis* silvestre resultó letal para esta mutante. Por lo tanto, para poder seleccionar una homocigota sensible a nourseotricina, después de la expulsión del segundo casete de interrupción, se utilizó una dosis de 2.5 µg/mL, 3 veces más baja, ya que a dosis mayores fue imposible tener clonas viables. En cuanto a la morfología colonial, esta resulta amorfa, con pliegues irregulares y un tono opaco. Por otro lado, la morfología de las levaduras en medio YPD líquido son muy similares a la silvestre, pero estas forman grandes aglomerados que llegan a superar las 100 células (**Fig. 32. A**). En cuanto a la retención del colorante azul alciano, el paquete celular es incapaz de retenerlo (**Fig.32 C, Fig 33**), lo que sugiere que no hay fosfomananas en esta mutante, esto debido a la ausencia de *N*- y *O*-manosilación por parte de las células, que sirven como pilares para el anclaje de las fosfomananas.

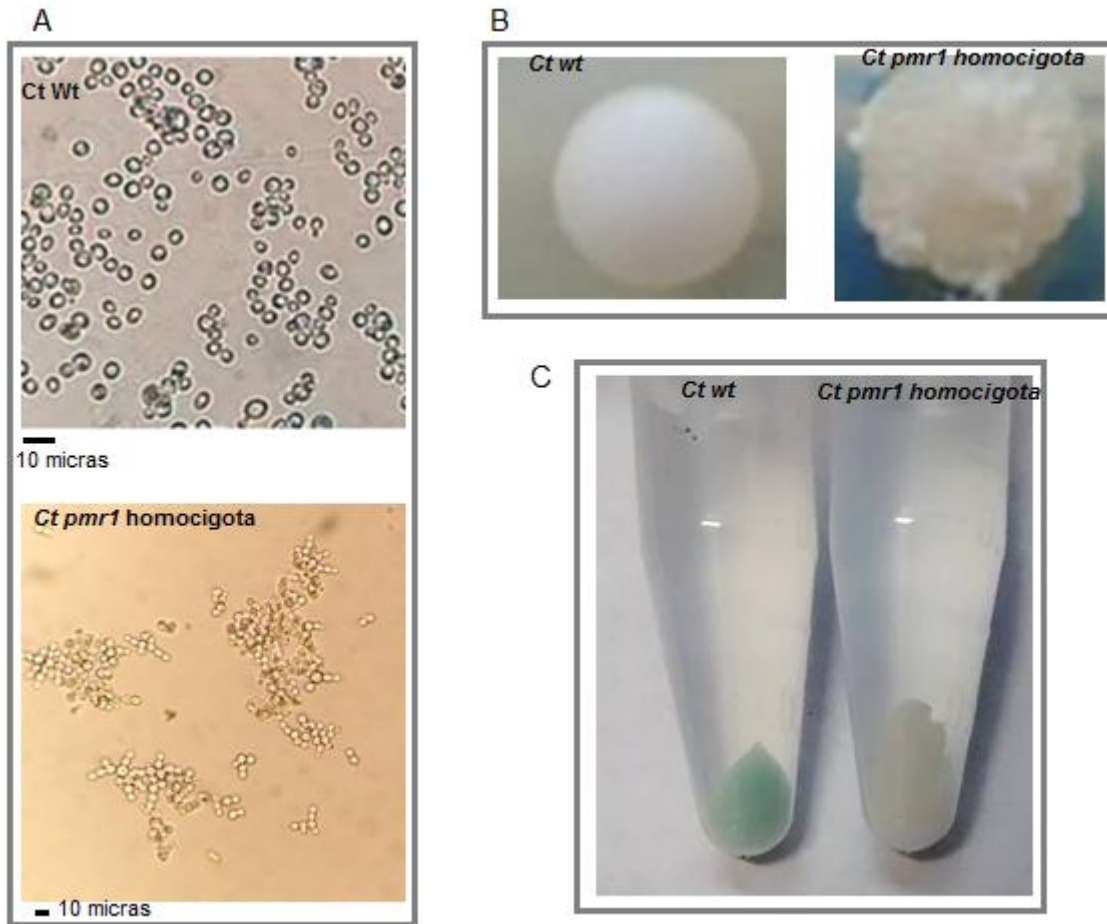


Fig. 32. Análisis fenotípico de *C. tropicalis* silvestre y *Ctpmr1Δ/pmr1Δ*. Panel A, Microscopía de campo claro de levaduras de *C. tropicalis* silvestre (arriba) y *Ct pmr1Δ/pmr1Δ* (abajo). Panel B, Morfología colonial de cepa silvestre (izquierda) y mutante (derecha). Panel C, Ensayo macroscópico de retención del colorante azul alciano.

Una vez que se observó la ausencia de retención del colorante azul Alciano, se analizó mediante HPAEC el contenido de carbohidratos de la pared celular

(Fig.34). Los resultados sugieren que la pared celular de *Ctpmr1* Δ /*Ctpmr1* Δ tiene niveles de GlcNAc casi 9 veces mayor que la cepa silvestre, en cuanto a los niveles de Glucosa, estos se mantienen casi igual, mientras que los niveles de manosa disminuyeron drásticamente de un 28% hasta un 8.93%.

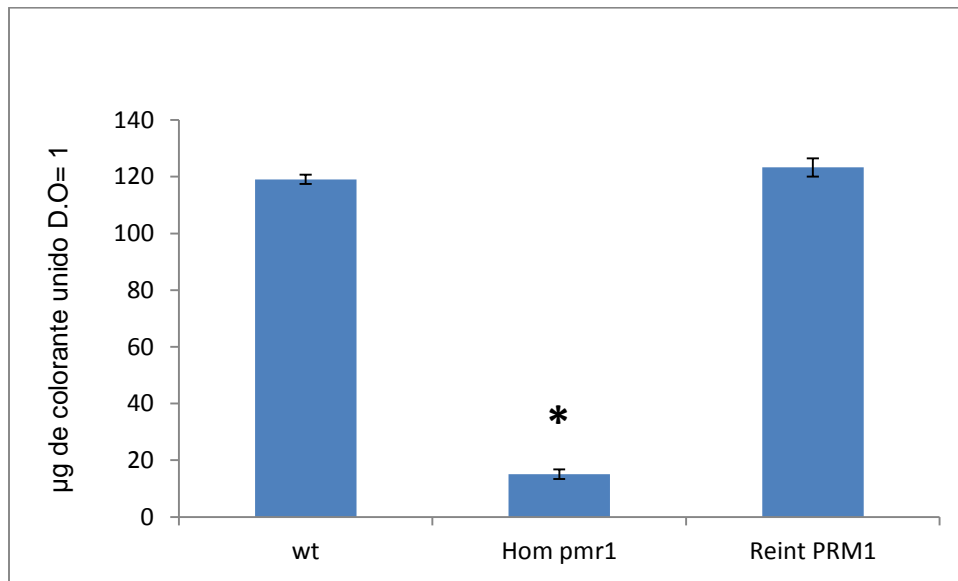


Figura 33. Niveles cuantitativos de retención del colorante azul Alciano por parte de la cepa *Ctpmr1* Δ /*Ctpmr1* Δ . Microgramos totales de colorante unidos por cepa ajustada a una D.O de 0.2 contenida en 1 mL de azul alciano. * $p < 0.05$ al comparar niveles de retención de colorante de mutante con respecto a *C. tropicalis* silvestre y su reintegrante usando una prueba T de Student.

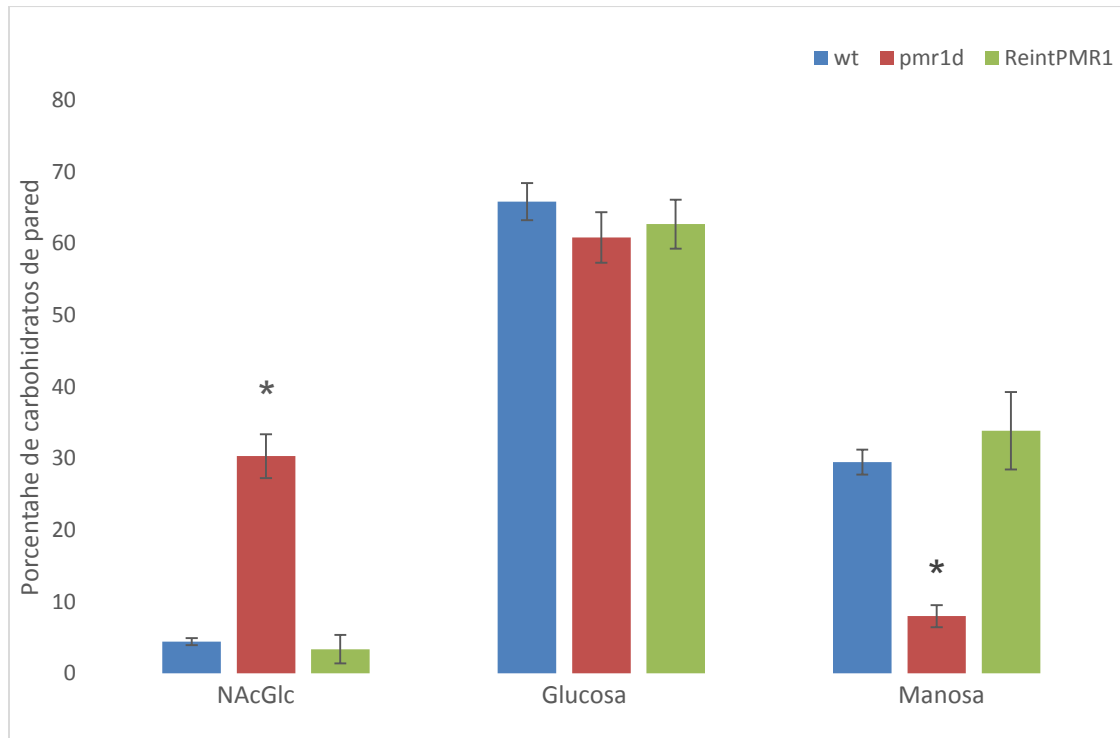


Fig. 34. Abundancia relativa de componentes de pared celular en la cepa *C. tropicalis* silvestre, *Ctpmr1*Δ/*Ctpmr1*Δ y la reintegrante. Se muestra en azul, los datos correspondientes a *C. tropicalis* silvestre, en rojo a la cepa *Ctpmr1*Δ/*Ctpmr1*Δ y en verde la reintegrante. GlcNAc= N-Acetil glucosamina, Glc=Glucosa, Man=Manosa.* $p < 0.05$ al comparar niveles de NAcGlc y Manosa de *Ctpmr1*Δ/*Ctpmr1*Δ con la cepa silvestre y la reintegrante utilizando una prueba T de Student.

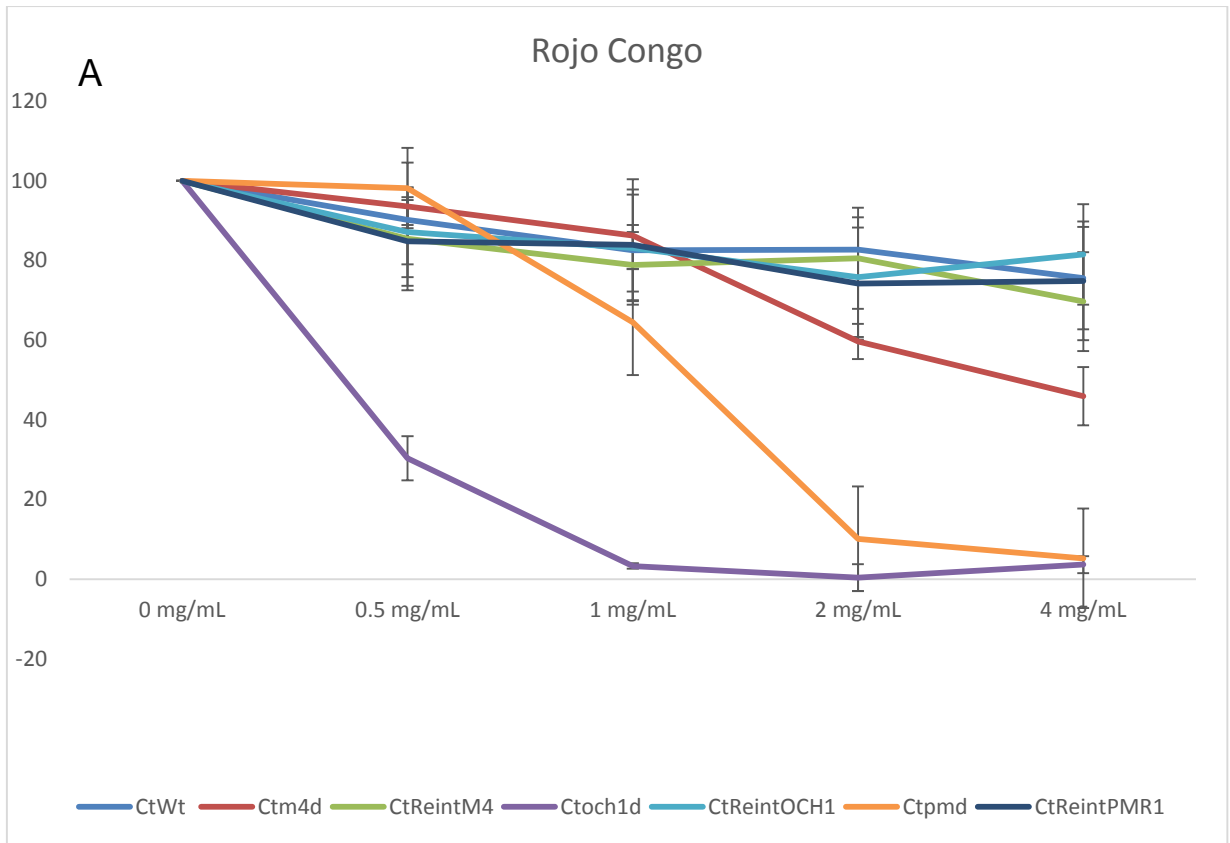
Tabla 5. Porosidad relativa de la mutante *Ctpmr1* Δ /*Ctpmr1* Δ al DEAE-Dextrano.

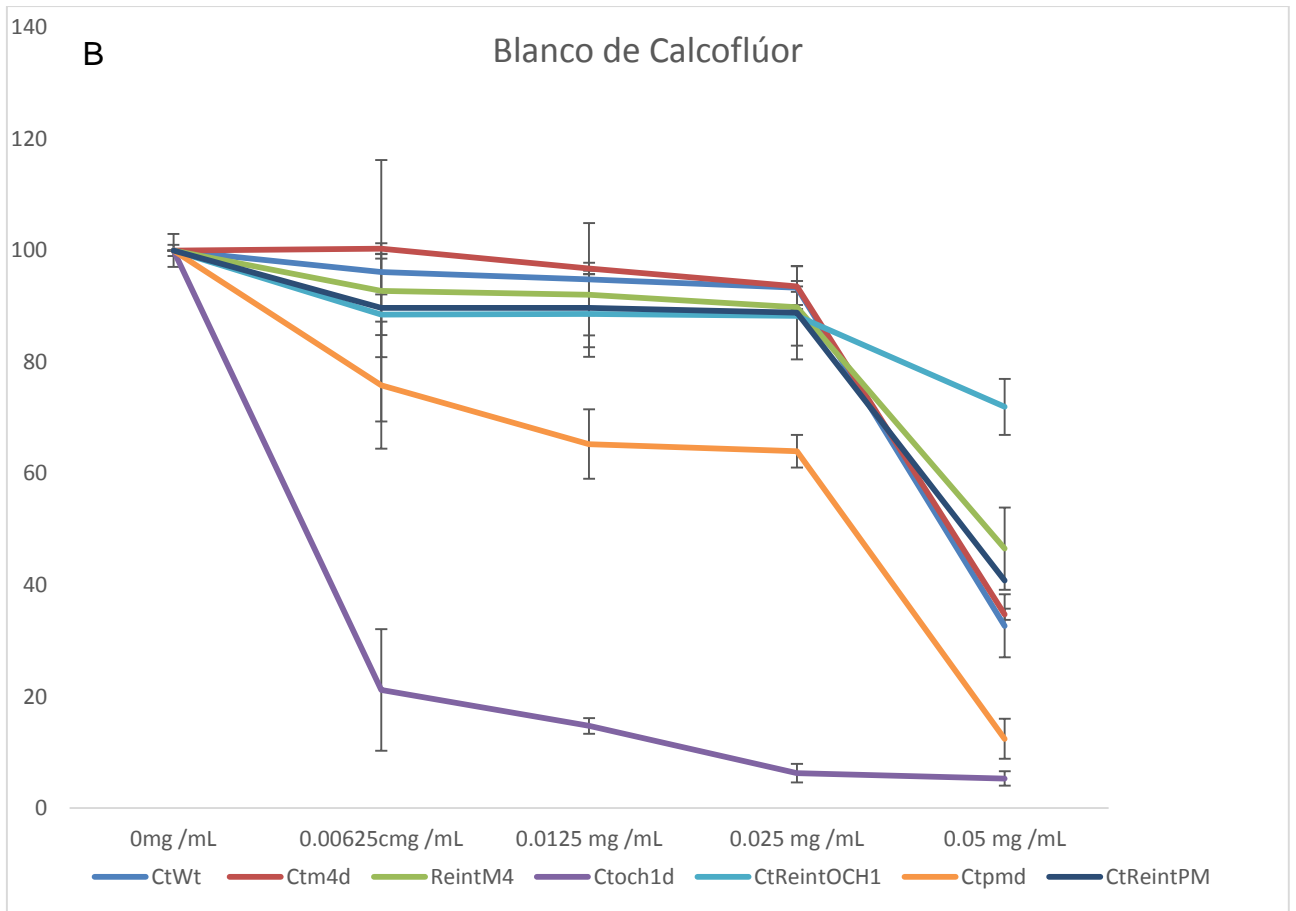
Cepa	Porosidad
<i>CtWt</i>	55.15 \pm 5.88
<i>Ctpmr11</i> Δ / <i>Ctpmr1</i> Δ *	92.92 \pm 5.75*
<i>Ctpmr11</i> Δ + <i>CtPMR1</i>	51.90 \pm 9.73

*p < 0.05, valor p de la porosidad de la cepa *Ctpmr1* Δ /*Ctpmr1* Δ con respecto a la cepa silvestre y la reintegrante utilizando una prueba T de Student .

Sensibilidad a agentes perturbadores de pared por parte de las mutantes

Para entender mejor el defecto de las paredes celulares de las mutantes generadas, se realizaron ensayos de susceptibilidad a 3 perturbadores de pared: Rojo Congo (0 a 4 mg/mL), Blanco de calcoflúor (0 a 0.05 mg/mL) e Higromicina B (0 a 0.66 mg/mL). La mutante *Ctoch1* Δ , la mutante *Ctpmr1* Δ , y en mucho menor grado la mutante *Ctmnn4* Δ , resultaron ser sensibles al Rojo Congo, mientras que para el caso del Blanco de calcoflúor y la Higromicina B, solamente las mutantes *Ctoch1* Δ y *Ctpmr1* Δ presentaron una sensibilidad importante, indicando un fuerte defecto en la organización de la pared. (Figura 36).





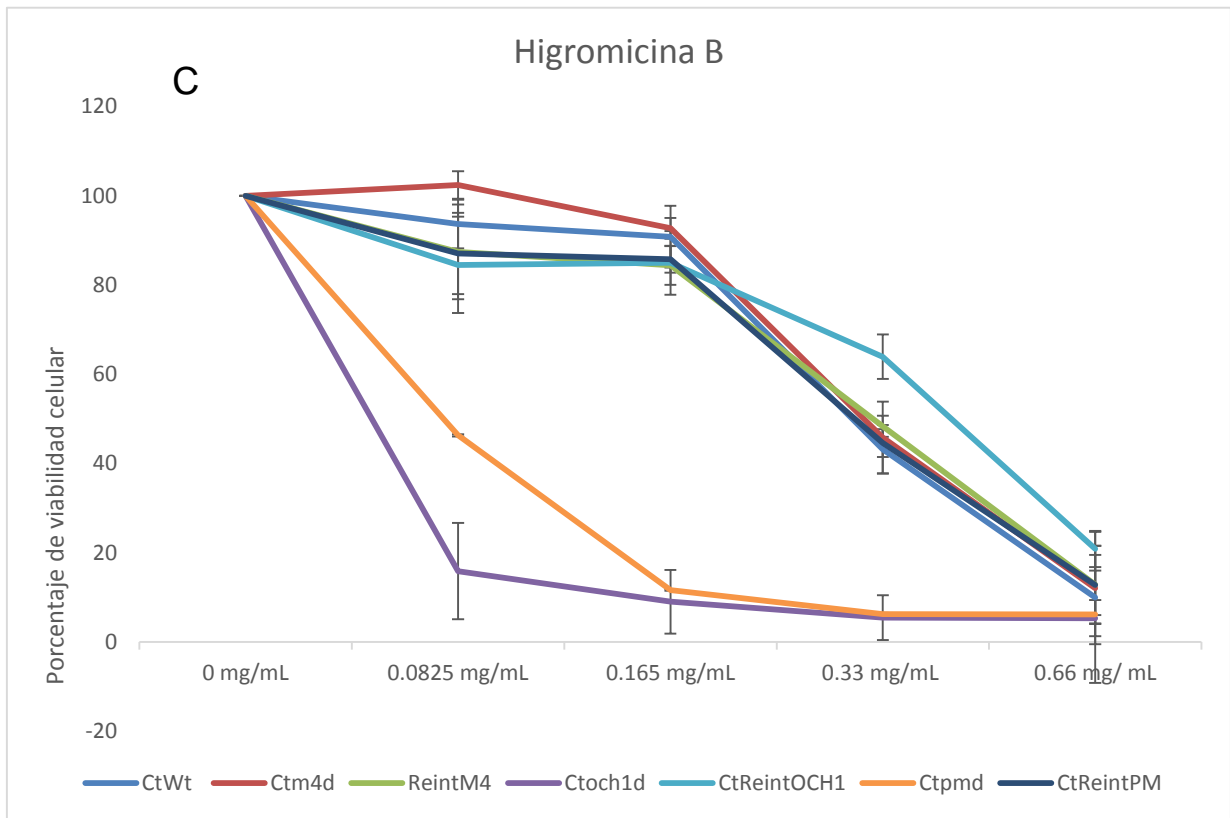


Figura 35. Las mutantes de pared presentan diferentes grados de sensibilidad a 3 agentes perturbadores de pared. Levaduras de cada mutante y sus respectivos controles (Cepa silvestre y reintegrante) fueron incubados en medio YPD con diferentes concentraciones de 3 diferentes perturbadores (A, Rojo Congo, B, Blanco de calcoflúor y C, Hygromicina B) durante 36 horas, agitación de 100 rpm y 30°C. Después de este tiempo, se midió su crecimiento en lector de placas de ELISA a 600 nm. Los datos fueron normalizados utilizando los

porcentajes de las cepas crecidas en medio YPD sin agente perturbador, el cual se consideró como 100% de crecimiento. Los datos obtenidos fueron resultado de 3 experimentos independientes por duplicado. Para todas las mutantes se presentó cierto grado de sensibilidad, excepto la mutante *Ctpmnn4Δ/mnn4Δ* quien solo presentó una ligera sensibilidad a dosis altas de Rojo Congo.

Interacción de *C. tropicalis* silvestre y *Ct.mnn4Δ/mnn4Δ* con línea celular de macrófagos RAW 264.7 ATCC® y macrófagos diferenciados humanos.

Debido a que anteriormente se había reportado la importancia de la fosfomanosilación en el reconocimiento de *C. albicans* por parte de macrófagos murinos (McKenzie *et al.*, 2010) nos preguntamos si existirían diferencias en el patrón de reconocimiento por parte de estos hacia la cepa deficiente en fosfomanosilación, *Ctmnn4Δ*. Para cumplir este objetivo, se hicieron interaccionar macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 ATCC® con células de *C. tropicalis* teñidas previamente con naranja de acridina con la finalidad de poder medir su fluorescencia emitida en caso de ser fagocitadas. La fluorescencia de las levaduras que quedaron ancladas a la superficie de los macrófagos al no ser fagocitadas por completo fue eliminada utilizando azul de tripano (Santos *et al.*, 2014). Las levaduras fagocitadas fueron cuantificadas mediante citometría de flujo.

Como se muestra en la figura 33, los niveles de células fagocitadas de la cepa heterocigota de *CtMNN4/mnn4Δ*, disminuyeron considerablemente, mientras que la fagocitosis de la cepa homocigota *Ctmnn4Δ/Ctmnn4Δ* fue prácticamente nula. Por otro lado, la reintegrante restauró su capacidad de ser fagocitada parcialmente. Para validar estos resultados, decidimos repetir el ensayo con macrófagos humanos diferenciados a partir de PBMCs y para dar un mayor soporte a nuestros resultados, analizamos los niveles de fagocitosis de *C. albicans* silvestre y *Camnn4Δ*, la cual es carente de fosfomananas. Estas cepas ya habían sido estudiadas por McKenzie y colaboradores y nosotros encontramos resultados muy similares, ya que en la cepa de *C. albicans* carente de fosfomananas, los niveles de fagocitosis se redujeron a la mitad aproximadamente, con respecto a la cepa silvestre. En cuanto a *C. tropicalis*, la cepa carente de fosfomananas *Ctmnn4Δ* no sufrió fagocitosis significativa, de igual forma que con macrófagos murinos (**Fig.36 y Fig.37**).

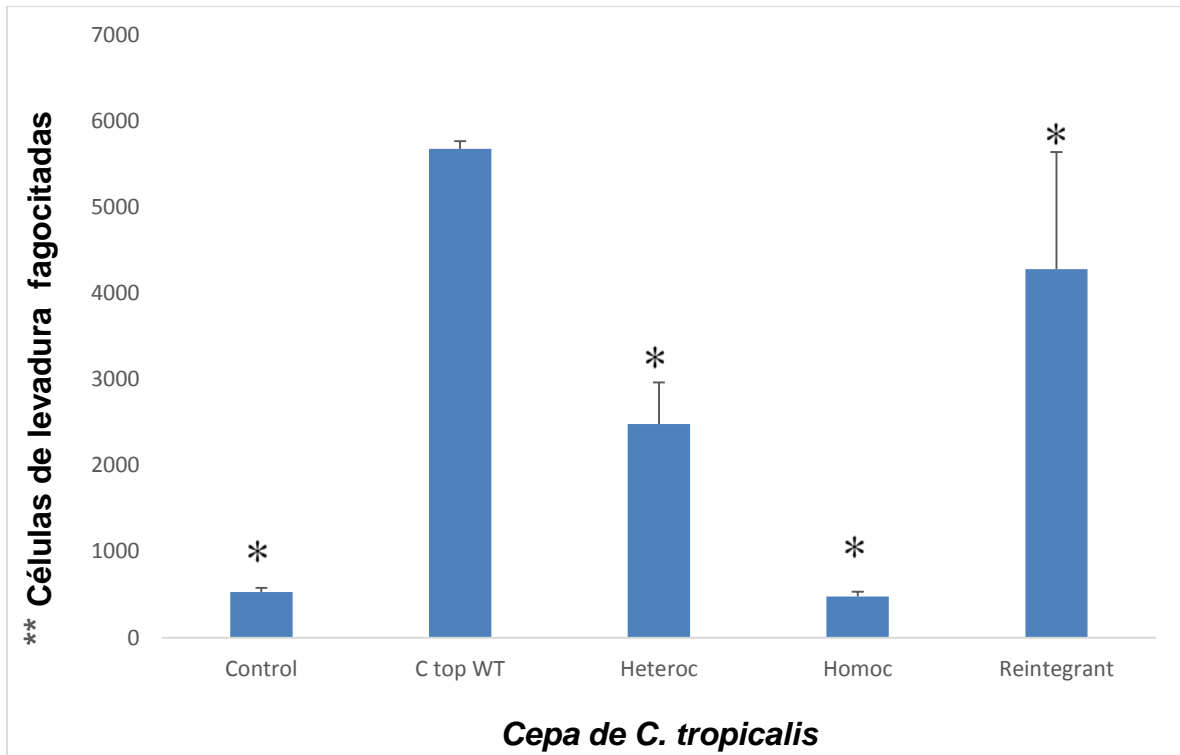


Figura 36. Células de *C. tropicalis* fagocitadas por macrófagos RAW 264.7

ATCC®. * $p < 0.05$ con respecto a *C. tropicalis* silvestre utilizando una prueba T de Student. Control, fluorescencia basal de macrófagos sin interacción con levaduras. **Resultados normalizados a 9 000 células.

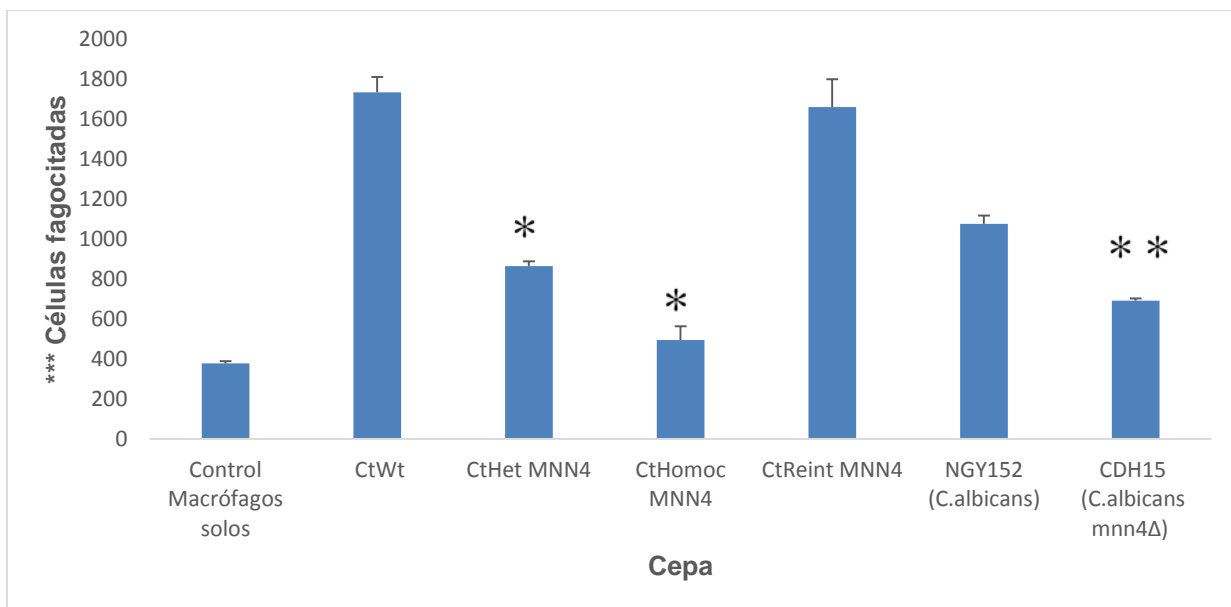


Figura 37. Células de *C. tropicalis* y *C. albicans* fagocitadas por macrófagos Humanos. * $p < 0.05$ con respecto a *C. tropicalis* silvestre. ** Valor $p < 0.05$ de *C. albicans mnn4Δ/mnn4Δ* respecto a *C. albicans* silvestre NGY152. ***Resultados normalizados a 2000 células.

Tabla 6. Contenido de fosfomananas de *C. albicans* y *C. tropicalis*

Contenido de Fosfomananas *	
<i>C. albicans</i>	2.75 ± 0.06 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	3.39 ± 0.032 mg/mL

* Contenido neto de fosfomananas de 300 millones de levaduras

Las fosfomananas y las β -glucanas son reconocidas por el macrófago pero su exposición es diferente entre *C. albicans* y *C.tropicalis*.

Nuestro siguiente objetivo fue identificar los componentes involucrados en el reconocimiento y posterior fagocitosis de *C. tropicalis*. Como se puede observar en la figura 38. *C. albicans* es fagocitada más eficientemente que *C. tropicalis*, esto podría deberse a la organización de la pared ya que está reportado que la pared celular de *C. albicans* es mucho menos porosa que la de *C. tropicalis* (28.2% Vs 55.15 %) (Estrada-Mata *et al.*, 2015) pero también debido a que *C. tropicalis* tiene mayor abundancia de fosfomananas en su superficie con respecto a *C.albicans* (Ver tabla 6), por lo que los macrófagos podrían tener acceso a componentes internos de la pared más eficientemente en *C. tropicalis*, tal es el caso de las β 1,3-glucanas, reconocidas por el receptor dectina 1, presente en los macrófagos. (Netea *et al.* 2008). Para comprobar esta hipótesis, bloqueamos el receptor dectina-1 con diferentes concentraciones de laminarina y los enfrentamos a *C. albicans* y *C. tropicalis* bajo las mismas condiciones. Tal y como lo indican nuestros resultados (Fig.38) , la concentración necesaria de laminarina para bloquear el reconocimiento de *C.albicans* por parte de los macrófagos, fue insuficiente para tener el mismo efecto sobre *C. tropicalis* esto muy probablemente al mayor contenido de fosfomananas de *C. tropicalis* (Ver tabla 6) y por lo tanto, mayor probabilidad de interacción entre la fosfomanana y otros receptores como el receptor galectina 3, el cual reconoce a las fosfomananas en el caso de *C.albicans* (Netea *et al.*, 2008) . Debido a que el receptor MR reconoce las N-mananas

(Netea *et al.* 2008), nos preguntamos si los oligosacáridos provenientes de las fosfomananas, podrían bloquear a los macrófagos. Como se parecía en la figura 38, nuevamente las concentraciones de oligosacáridos suficientes de bloquear el reconocimiento de *C. albicans*, fueron insuficientes para bloquear el reconocimiento de *C. tropicalis*, lo que sugiere fuertemente que a pesar de que las fosfomananas están involucradas en el reconocimiento de *C. tropicalis*, también las *N*-Mananas son importantes y muy probablemente debido a la mayor porosidad de *C. tropicalis*, el receptor MR del macrófago tenga un mejor acceso a las *N*-mananas de *C. tropicalis* que para el caso de *C. albicans*. Esto confirma por un lado que las fosfomananas son reconocidas por los macrófagos, pero son más abundantes y probablemente están más expuestas en *C. tropicalis* debido a su mayor porosidad. Finalmente, para conocer si los receptores de dectina-1 y MR llevan a cabo un reconocimiento sinérgico, bloqueamos a los macrófagos con las concentraciones más bajas de oligosacáridos de fosfomananas y de laminarina (10 μ g/mL+500 μ g/mL), resultando en un bloqueo total del reconocimiento del macrófago hacia ambas especies, indicando que tanto las β -1,3-glucanas como las fosfomananas están involucradas en el reconocimiento por parte del macrófago en ambas especies.

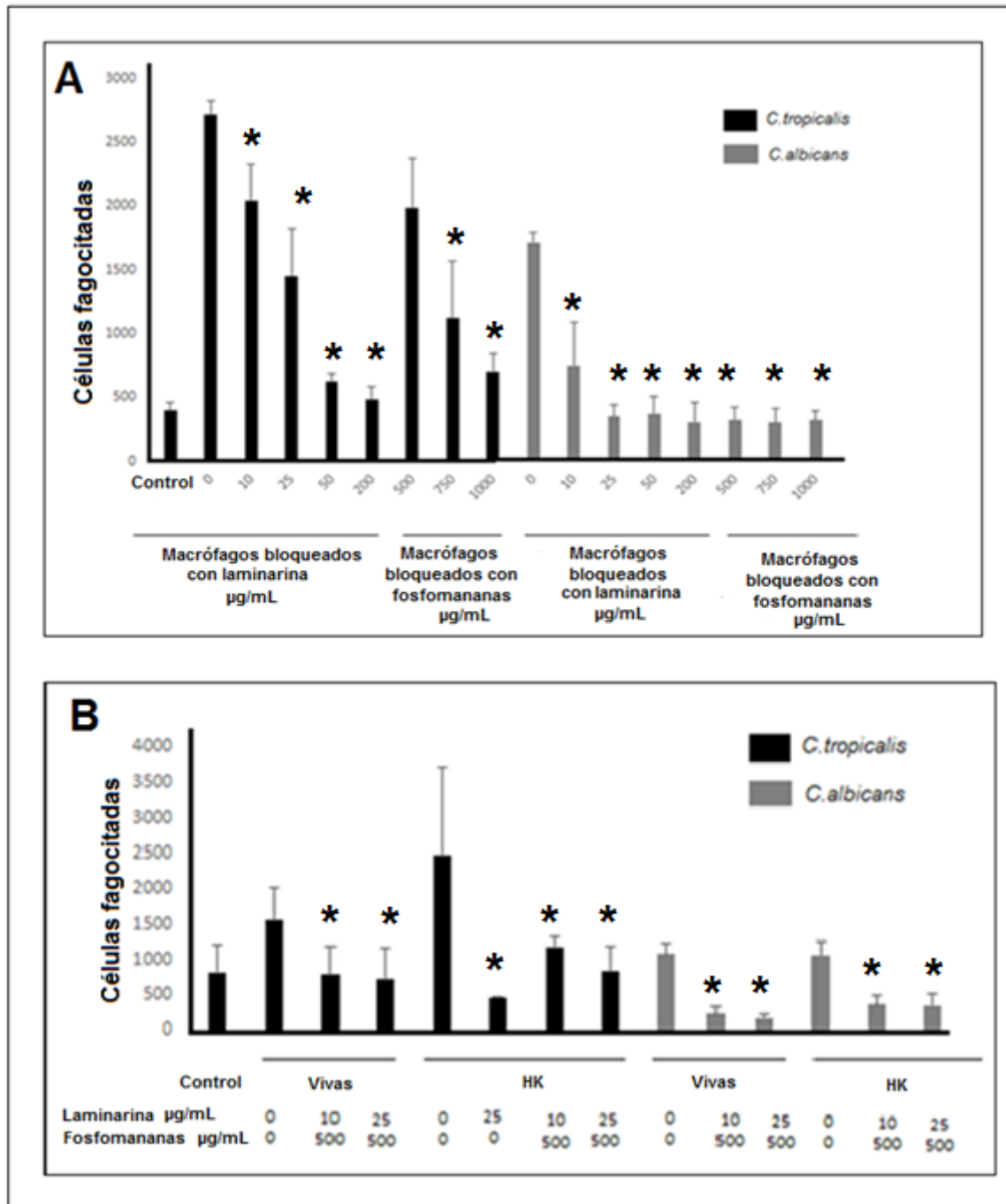


Figura 38. β -glucanas y fosphomananas están involucradas en el apropiado reconocimiento y fagocitosis por parte del macrófago. A. Levaduras de *C. albicans* NGY152 y *Ct.Wt* (MYA-3404), fueron enfrentados con macrófagos

previamente bloqueados con diferentes concentraciones de laminarina y su habilidad para fagocitar ambas cepas fue medida por citometría de flujo. **B.** Combinaciones de diferentes concentraciones de laminarina y fosfomananas fueron utilizadas para bloquear los macrófagos y llevar a cabo una posterior interacción con ambas especies de *Candida*. Se aprecia que existe un efecto sinérgico, ya que a dosis mínimas de laminarina + fosfomananas, ocurre un bloqueo total del macrófago, dejándolo incapaz de fagocitar a ambas cepas de *Candida*. * $p < 0.05$ al comparar niveles de fagocitosis de levaduras con previa incubación de los macrófagos con agente bloqueante con respecto a interacciones efectuadas sin agente bloqueante.

Las mutantes de pared tienen una virulencia atenuada en un modelo de *Galleria mellonella*

Para entender si los defectos de la pared celular en las tres diferentes mutantes contribuyen a cambios en la virulencia de *C. tropicalis*, se enfrentaron las mutantes con larvas de *G. mellonella*. Tanto la mutante *Ctoch1Δ* como *Ctpmr1Δ* poseen una virulencia atenuada importante, mientras que la mutante carente de fosfomananas, *Ctmnn4Δ*, resultó tener una virulencia atenuada de manera moderada (**Fig. 39**). Estos datos sugieren fuertemente que la organización correcta de la pared celular contribuye a la virulencia de *C. tropicalis*.

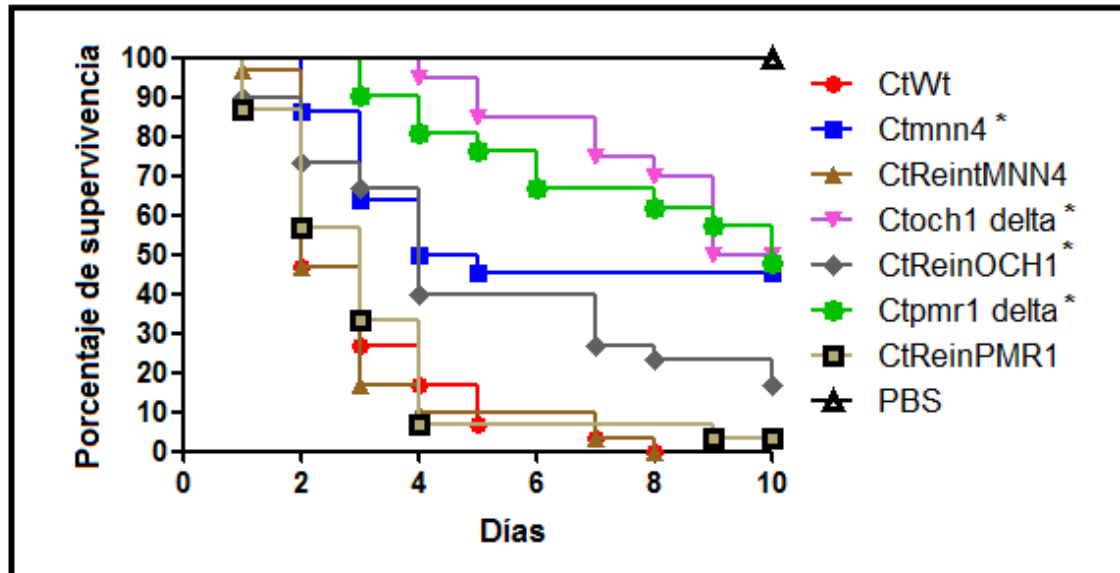
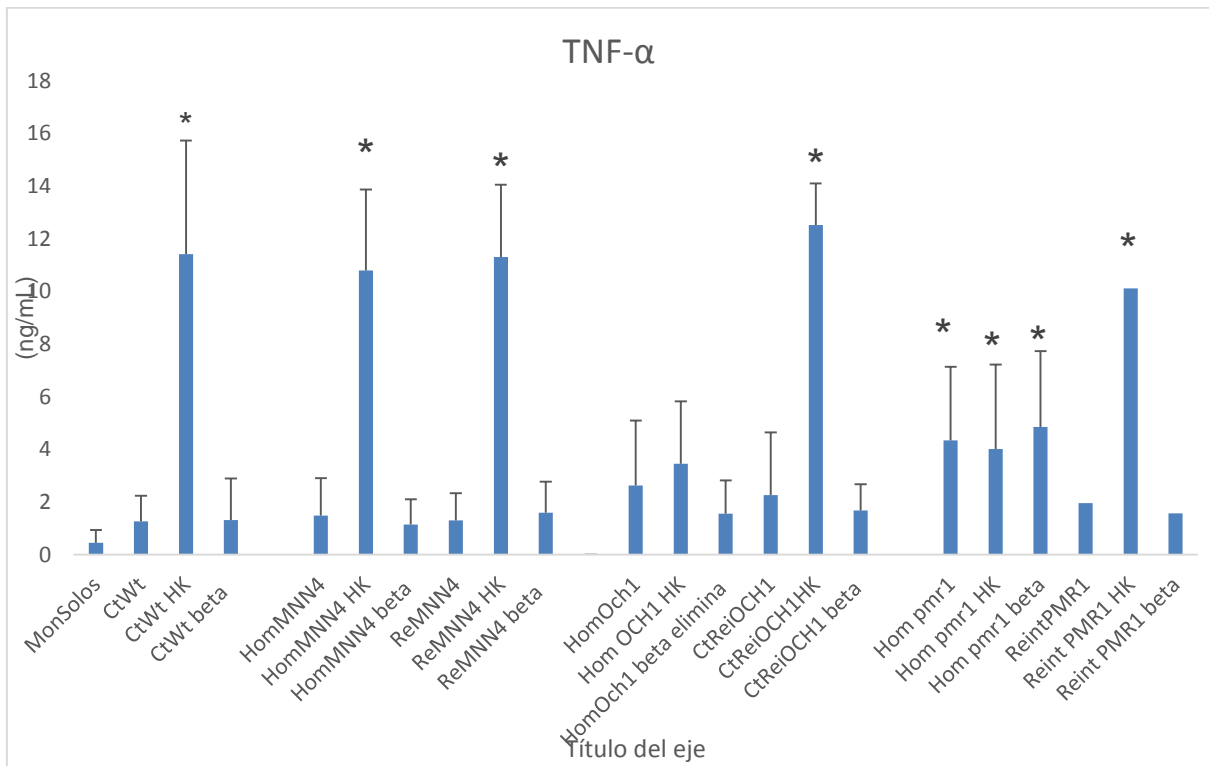
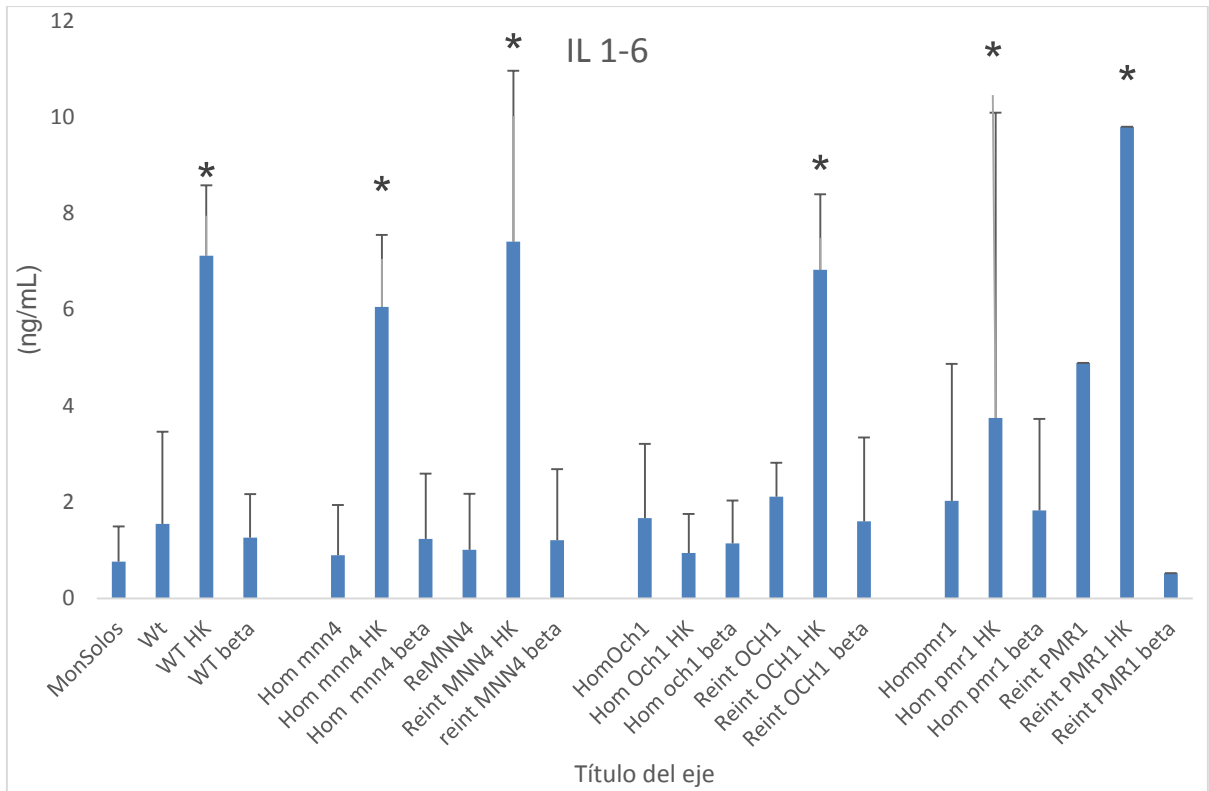


Figura 39. Las mutantes *C.tmn4Δ/Ctmnn4Δ*, *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ* y *Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ* presentan virulencia atenuada. Alícuotas conteniendo 4×10^6 células fueron inyectadas en la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* y su supervivencia fue monitoreada a diario durante 10 días; lapso que duró el experimento. Se montaron 3 experimentos independientes en grupos de 10 larvas cada uno. Se usó un grupo control donde se inyectó el mismo volumen de PBS estéril y los controles correspondientes, *CtWt* (MYA-3404) y las respectivas reintegrantes (en el gráfico se muestran como Reint). La mutante *C.tmn4Δ/Ctmnn4Δ* y en mucho mayor grado *Ctoch1Δ/Ctoch1Δ* y *Ctpmr1Δ/Ctpmr1Δ* presentan una atenuación en la virulencia. $*P < 0.05$, al comparar viabilidad de cada una de las cepas respecto a la cepa silvestre y su reintegrante utilizando una prueba T de Student .

La pérdida de *N*-mananas y *O*-mananas de proteínas de pared, pero no así de fosfomananas, afectan la producción de citocinas de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMNC's).

Nuestro siguiente objetivo fue determinar la relevancia de cada uno de los 3 componentes de pared celular estudiados durante la interacción de *C. tropicalis* con PBMC's. Las células vivas de *C. tropicalis* silvestre estimularon una producción baja de las 4 citocinas medidas (IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-1 β) y en mucha mayor cantidad cuando estas se inactivaron por calor (HK), debido a que exponen sus componentes internos (β 1,3-glucanas y quitina). (Perez-García *et al*; 2016).**(Figura 40)**. Cuando las células fueron beta-eliminadas (rasurado de *O*-mananas), se observó un aumento en la estimulación de IL 1- β , y en menor medida para IL 1-10, indicando que las *O*-mananas juegan un papel de enmascaramiento de los componentes internos de pared. Con respecto a la mutante carente de fosfomananas *Ctmnn4* Δ , no se observó un cambio significativo en la producción de las 4 citocinas probadas, con respecto a la cepa silvestre y el control de reintegración; tanto las células vivas, beta eliminadas e inactivadas por calor estimularon a los PBMC's de manera similar que la cepa silvestre, sugiriendo que las fosfomananas no juegan un papel mayor de enmascaramiento de los componentes internos de pared hacia los PBMC's. Para el caso de la mutante carente de *N*-mananas, *Ctoch1* Δ , la células vivas estimularon a los PBMNC's a producir una mayor cantidad de IL-6, TNF- α e IL-1 β , pero interesantemente, las células inactivadas por calor y beta eliminadas estimularon la producción de

citocinas de manera similar a la cepa viva para las cuatro citocinas probadas, mientras que el control de reintegración estimuló nuevamente una sobreproducción de las cuatro citocinas cuando se inactivó por calor. La mutante nula viva *Ctpmr1Δ*, carente de *N*-mananas y *O*-mananas, estimuló de manera importante una sobreproducción de las cuatro citocinas probadas y, nuevamente, dicha mutante beta- eliminada e inactivada por calor no generó un aumento importante en la producción de citocinas como lo hace la cepa silvestre y el control de reintegración; sin embargo, la mutante viva por sí sola fue capaz de estimular la producción de niveles de IL-10 y de IL 1-β similares a las inactivadas por calor. Los aumentos medianamente importantes de citocinas que produce la mutante carente de *N*-mananas indican que estas ejercen un enmascaramiento de los componentes de pared; sin embargo, la ausencia de ambas estructuras, tanto *N*- como *O*-mananas, conllevaron a una sobre estimulación similar a la cepa inactivada por calor, lo que indica que las *O*-mananas juegan un papel muy importante en el enmascaramiento de los componentes internos de la pared celular.



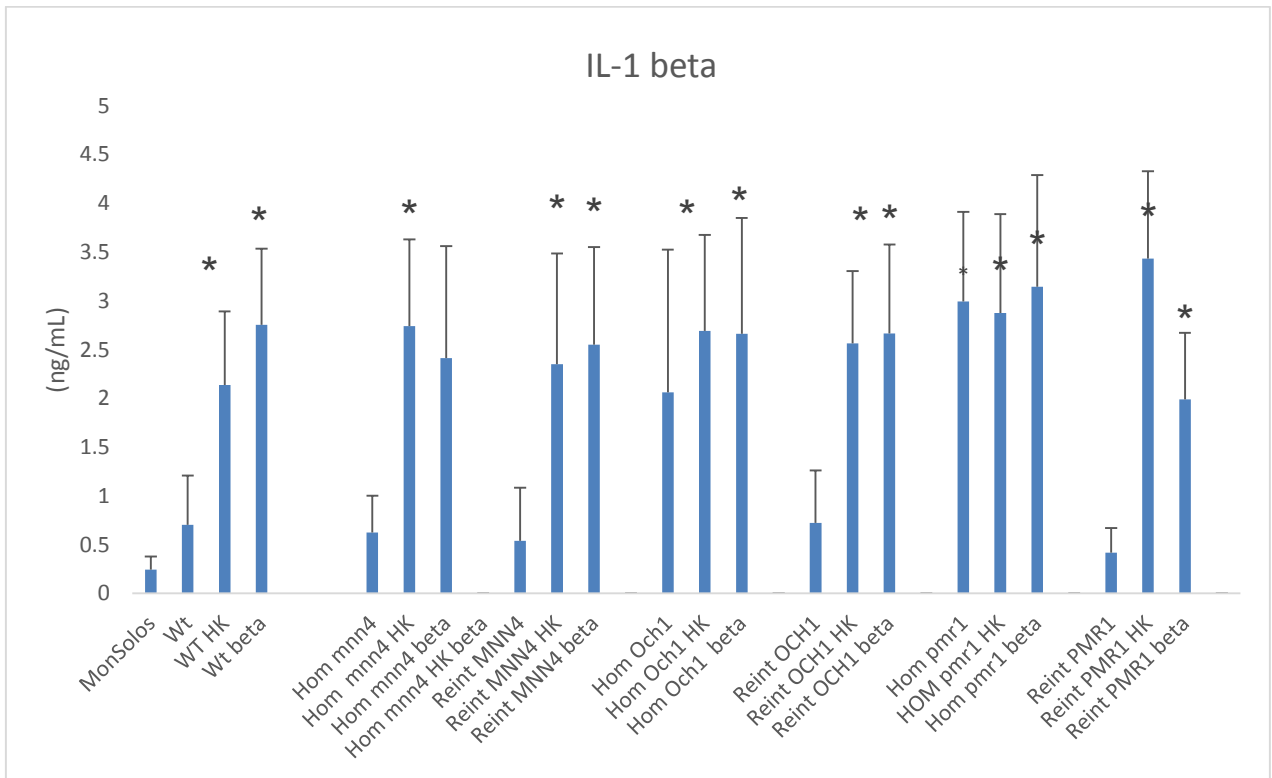
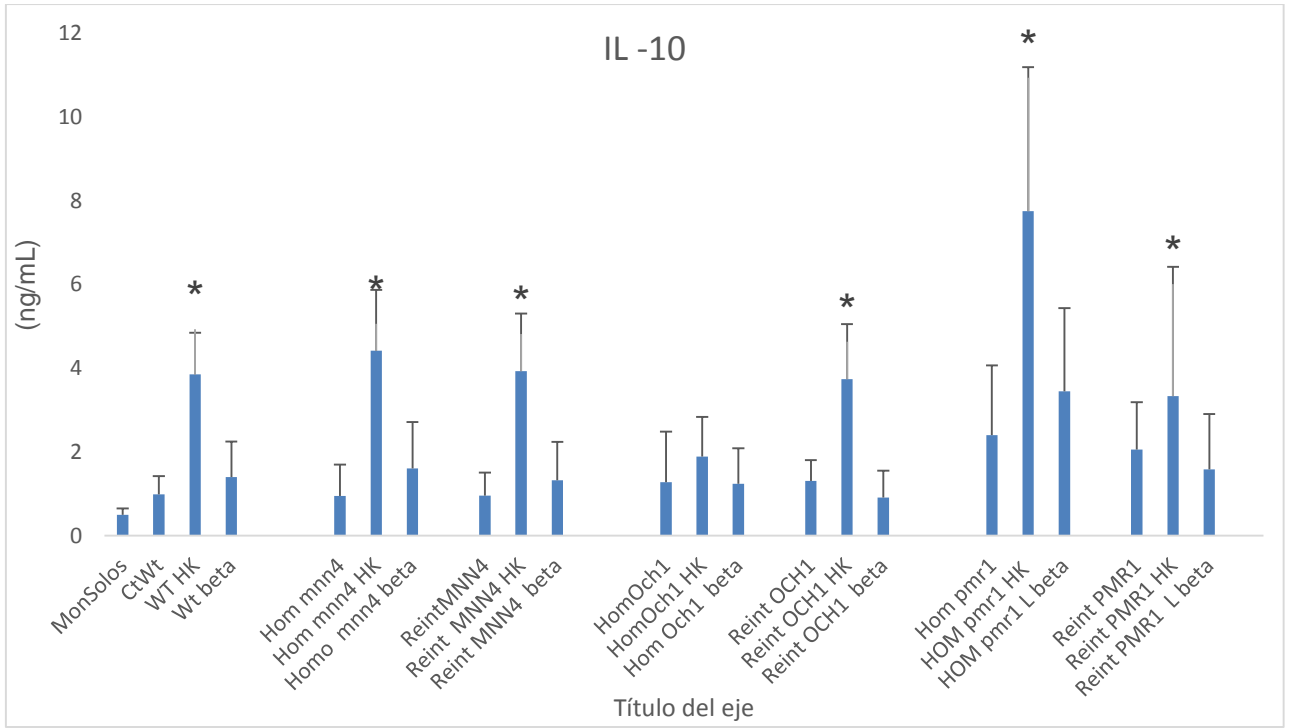


Figura 40. La pérdida de mananas afecta la capacidad de *C. tropicalis* para estimular los PBMCs. Las levaduras se co-incubaron con PBMCs durante 24 horas y los sobrenadantes fueron rescatados para cuantificar los niveles de 4 citocinas, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. Los resultados mostrados corresponden a las interacciones de cada cepa con 6 donadores sanos diferentes. Cada ensayo fue hecho por duplicado. Los resultados se muestran como (media \pm SD). Para todos los casos la producción de citosinas fue estadísticamente significativa con respecto al control de monocitos solos. Para el resto de las interacciones, * $p < 0.05$, al comparar la producción de citosinas de la interacción en cuestión con la producción de citosinas de la interacción PBMNC y cepa silvestre *CtWt* utilizando una prueba Wilcoxon-Mann-Whitney.

Discusión

En este estudio se dilucidó la contribución en el reconocimiento por parte del sistema inmune innato de la *N* y *O* glicosilación de proteínas de pared celular de *C. tropicalis*. Se identificaron 3 ortólogos de *C. albicans* involucrados en 3 rutas biosintéticas muy importantes de la pared celular; la fosfomanosilación, la *N*-glicosilación y la glicosilación global de la pared, que abarca la *N* y *O* glicosilación. Esto se logró mediante análisis tipo BLAST que arrojaron grandes similitudes e identidades entre tres posibles ortólogos con genes previamente estudiados de *C. albicans*. Por un lado, estudiamos el gen *Ct.MNN4* que resultó estar involucrado en la ruta biosintética de fosfomanosilación, al llevar a cabo la complementación de la función de *CaMNN4* en una mutante nula de *C. albicans*, *Camnn4Δ*, logrando restaurar la síntesis de fosfomananas; esto fue corroborado mediante la restauración en la retención del colorante azul alciano. Por otro lado, nos interesaba conocer cuál sería el aporte de la *N*-glicosilación en la pared celular de *C. tropicalis* en el reconocimiento inmune innato, por lo que decidimos buscar un ortólogo de *CaOCH1*, cuyo producto génico se sabe que es una α 1,6-manosiltransferasa que inicia el alargamiento del núcleo de azúcares anclado a la secuencia consenso de *N*-glicosilación. Encontramos que *OCH1* es el gen ortólogo en *C. tropicalis*, ya que logró restaurar la morfología colonial y de levadura típica en una mutante de *C. albicans* carente de *OCH1*, también se restauró la sensibilidad a tres perturbadores de pared celular y los niveles de *N*-glicosilación de la proteína reportera Hex1 fueron restaurados a niveles silvestres.

Estos datos sugieren que a pesar de que los productos génicos de *MNN4* y *OCH1* de *C. albicans* tienen diferencias en cuanto a tamaño y secuencia con respecto a los de *C. tropicalis*, son los dominios conservados presentes en los genes de ambas especies lo que es crucial para que lleven a cabo su función, ya que los niveles de restauración fueron muy cercanos a los silvestres.

Por otro lado, dentro del grupo de trabajo, se había encontrado un ortólogo del gen *CaPMR1*, cuyo producto es una ATPasa tipo P que dota a las manosiltransferasas de aparato de Golgi de cationes $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, restaurando en *Capmr1* Δ el fenotipo silvestre. Una vez que se encontraron los correspondientes ortólogos, se interrumpieron los tres genes en la cepa de *C. tropicalis* ATCC ® MYA-3404™ mediante la metodología “*Sat 1 flipper*” (Reuss *et al*; 2004). La mutante *Ctmnn4* Δ presentó una morfología igual a la silvestre, pero tuvo una nula retención por parte del colorante azul alciano. Esto confirmó que *CtMNN4* está involucrado en la ruta de fosfomanosilación en *C. tropicalis* y tiene como función codificar para el regulador de fosfomanosilación que hasta la fecha se desconoce su función, esto se supo por la complementación del gen en *C. albicans mnn4* Δ /*mnn4* Δ y porque de acuerdo a un análisis *in silico* de la proteína codificada por este marco de lectura abierto, presenta un dominio LicD, también presente en *CaMNN4*, y al igual que el ortólogo en *C. albicans*, hay ausencia de un dominio de glicosiltransferasa para dar pauta a que se trataría de una fosfomanosiltransferasa. Por otro lado, su homología con fosfomanosiltransferasas reportadas en *C. albicans* es mucho menor. Anteriormente ya se había descrito que la fagocitosis de una mutante carente de fosfomananas de *C. albicans* por parte de macrófagos murinos se

decrementaba a la mitad (McKenzie et al., 2010), por lo que nos preguntamos cual sería el efecto de esta interacción en la mutante carente de fosfomananas de *C. tropicalis*. Nuestros datos sugieren que la fagocitosis de *C. tropicalis* es mayor que la de *C. albicans*, pero hay ausencia de fagocitosis de la cepa *Ctmnn4Δ/mnn4* por parte de los dos tipos de macrófagos empleados, lo que indica que las fosfomananas en *C. tropicalis* son aún más críticas para el reconocimiento por parte de los macrófagos que las fosfomananas de *C. albicans*, por un lado esto podría ser debido a su mayor abundancia y probablemente a una mayor exposición debido a la mayor porosidad de la pared de *C. tropicalis* con respecto a la de *C. albicans* (Eine -Estrada et al., 2015). El patrón diferencial en el reconocimiento por parte de los macrófagos podría deberse a que el tamaño de las fosfomananas es diferente entre ambas especies. Para el caso de *C. tropicalis* los residuos son más cortos (M1 a M5) con respecto a los de *C. albicans* (M1 a M8) y muy probablemente a que estén expuestas de manera diferente entre *C. tropicalis* y *C. albicans* debido a su porosidad la cual también es diferente (Eine -Estrada et al., 2015). Tanto la laminarina como los oligosacáridos de las fosfomananas fueron suficientes para bloquear el reconocimiento de los macrófagos hacia *C. tropicalis* pero en concentraciones mayores a aquellas que fueron necesarias para que el macrófago deje de reconocer a *C. albicans*, esto sugiere fuertemente que las fosfomananas aparte de ser más abundantes en *C. tropicalis*, podrían estar más expuestas en *C. tropicalis*.

Para conocer la contribución de la *N*-glicosilación de proteínas de pared de *C. tropicalis*, se generó una mutante con defecto en esta ruta, esta cepa carece de la elongación del núcleo preformado en el retículo endoplásmico, *Ctoch1Δ*.

El análisis fenotípico de esta mutante reveló un defecto en el crecimiento a los 37 °C y nulo crecimiento a los 42°C, mientras que la cepa silvestre crece sin problema alguno; esto nos habla que muchas proteínas vitales de pared celular al tener un defecto en la *N*-glicosilación, podrían tener una pérdida de funcionalidad a temperaturas mayores a la óptima, ocasionando una desestabilización de la pared celular. Esta cepa también presenta una serie de agregados celulares, este fenómeno previamente ya se había descrito en *Caoch1Δ* (Bates *et al*; 2006) y se observó que las células se despegaban después de un tratamiento con quitinasa o bien mediante rompimiento mecánico fuerte (Bates *et al*; 2006), lo que sugiere que las células hijas no se logran separar por completo durante la gemación. Esto podría deberse a que cambios en el arreglo de los azúcares de pared o bien la pérdida de *N*-glicosilación de las propias quitinasas de pared celular, ocasiona cierto grado de pérdida de función. Para conocer la organización de la pared celular de esta mutante, se hizo la determinación de abundancia relativa de azúcares, donde se determinó que había una importante disminución de manosa, pasando de 29.48 % a 6.85 %. Esta manosa residual muy probablemente corresponde al núcleo de la *N*-glicosilación y las *O*-mananas aún presentes en las proteínas de pared; esto concuerda con la fosfomanosilación residual observada en los ensayos del colorante azul alciano ya que al no abatirse por completo, sugiere que hay fosfomanosilación en las *O*-mananas y en mucha menor

proporción al núcleo de *N*-glicosilación. Por otro lado, también ocurrió un ligero aumento en la quitina, pero los niveles de glucosa aumentaron en un 25%, lo que sugiere fuertemente que hubo una compensación por parte de las glucanas para compensar la ausencia de las *N*-mananas. Este resultado es diferente a lo que ocurrió en la mutante nula de *C. albicans och1Δ*, donde si bien se observó también un aumento en los niveles de glucosa, esta mutante también tuvo un aumento en los niveles de quitina de manera significativa, lo que nos habla que *C. tropicalis* y *C. albicans* tienen efectos diferentes al activar la ruta de integridad de pared celular.

Finalmente se generó una mutante *Ctprm1Δ/ pmr1Δ*, la cual tiene un defecto en una ATPasa tipo P que supe a las manosil transferasas de Golgi de los cationes que funcionan como cofactores de estas, como consecuencia tuvimos una cepa carente de *N* y *O*-manans y cuya morfología es similar a la cepa silvestre pero ésta forma agregados celulares en medio líquido, presentó un defecto en el crecimiento a los 37° C y pérdida de viabilidad a los 42°C. Para conocer cuál era su arreglo de la pared celular, se determinó la abundancia relativa de azúcares de la pared celular, donde se encontró que los niveles de quitina habían aumentado nueve veces más, pasando de un 3.92% hasta un 35.95%, mientras que la glucosa había disminuido ligeramente y la manosilación había disminuído de un 28% hasta un 8.93 %. Este re arreglo en el contenido de azúcares es muy diferente al de la mutante nula de *Capmr1Δ* (Bates et al; 2005), ya que en esta mutante, los niveles de quitina no cambiaron, los niveles de manosa pasaron de 39% a un 8%, pero los niveles de glucosa pasaron de un 60% en la silvestre a un

90% en la mutante (Bates *et al*, 2005), lo que nos habla que mientras que en *C. albicans* la levadura compensó la falta de mananas con glucana, en *C. tropicalis* se compensaron con quitina, enfatizando nuevamente que la ruta de integridad de la pared celular tiene efectos diferentes entre ambas especies. Finalmente, se aprecia que los niveles de manosa no se decrementan por completo en *Ctprm1Δ* como ya se esperaba, tampoco sucedió en la mutante nula de *C. albicans pmr1Δ* (Bates *et al*; 2005) , esto es debido a que existe O-manosilación residual llevada a cabo en el retículo endoplásmico, así como sigue presente el núcleo de la N-glicosilación preformado también en retículo endoplásmico; sin embargo la mutante *Ctprm1Δ* tiene una nula capacidad de unión al colorante Azul alciano, lo que sugiere que carece de fosfomananas y por lo tanto las N y O-glicanas están truncas en esta mutante . Debido a que la fosfomanosilación se abatió por completo en *Ctprm1Δ*, a diferencia de la mutante carente de N-glicanas, que presenta cierto grado de fosfomanosilación, nos indica que *C. tropicalis* tiene fosfomanosilación tanto en N-mananas como O-mananas. Para determinar la contribución de la manosilación de proteínas de pared de *C.tropicalis* en el reconocimiento por parte del sistema inmune, las tres mutantes se enfrentaron con PBMNC's. La mutante carente de fosfomananas estimuló de manera similar a la cepa silvestre, también lo hizo el control de reintegración, lo que sugiere que las fosfomananas no juegan un papel mayor en la estimulación de los PMBNC's a pesar de su mayor porosidad, sin embargo también cabe la posibilidad que la ligera porosidad observada se deba a que al no haber fosfomananas, los policationes usados en la técnica puedan entrar más libremente al no haber

cargas negativas de las fosfomananas como en el caso de la cepa silvestre. Por otro lado, la mutante carente de *N*-glicosilación sobre estimuló de manera discreta la secreción TNF- α y en mayor grado IL-1 β , lo que sugiere una contribución de las *N*-mananas al enmascaramiento de los componentes internos de pared, sin embargo también se debe considerar que esta mutante tiene niveles mayores de β -glucanas, por lo que esta mayor producción de citocinas se debe probablemente a la ausencia de *N*-mananas que no están para enmascarar a las β -glucanas. La mutante *Ctpmr1* Δ *viva*, por su parte, estimuló de manera bastante importante a la producción de niveles mayores de citocinas a excepción de la IL-6, indicando que tanto las *N* como las *O*-mananas enmascaran a los componentes internos de la pared de *C. tropicalis*, a diferencia de CtWt, la mutante nula *Ctpmr1* Δ HK sobre estimuló de manera importante la secreción de IL-10, lo que sugiere que el contenido mayor de β -glucanas de esta mutante interacciona con su ligando, la Dectina-1, debido a que se sabe que la secreción de IL-10 se activa al interaccionar las β -glucanas con Dectina-1 y co estimular la producción de IL-10 junto con con TLR2. (Reid *et al*; 2009). Finalmente, se determinó el grado de sensibilidad de las mutantes generadas a diferentes perturbadores de pared, resultando *Ctoch1* Δ y *Ctpmr1* Δ severamente sensibles indicando una severa desorganización de la pared lo cual se corroboró con un aumento bastante importante de la porosidad, lo que explica la sensibilidad y el mayor reconocimiento de estas mutantes por parte de los PBMNC's. Sorprendentemente, la mutante nula *Ctmnn4* Δ presentó una ligera sensibilidad al rojo congo y una porosidad ligeramente mayor a la silvestre, aunque como ya se

discutió antes, podría ser un efecto ocasionado por la pérdida de las cargas negativas, pero también es posible que su ausencia en efecto contribuya a una discreta desorganización de la pared celular. La sensibilidad al rojo congo en esta mutante no queda clara pero podría deberse a que al tener afinidad por las β glucanas y en menor grado por la quitina, la ausencia de fosfomananas haga que el perturbador tenga más fácil acceso al interior de la célula. Finalmente, se determinó la virulencia de las tres mutantes. Como se esperaba, la virulencia de *Ctoch1 Δ* y *Ctpmr1 Δ* se vio severamente atenuada y en mucho menor grado *Ctmnn4 Δ* , lo que sugiere que la organización adecuada de la pared celular de *C. tropicalis* es necesaria para llevar a cabo una infección en *Galleria mellonella*.

Conclusiones

El gen *CtMNN4* codifica para el regulador de la ruta de fosfomanosilación en *C. tropicalis*.

Las fosfomananas presentes en la pared de *C. tropicalis* son de gran importancia en el proceso del reconocimiento de *C. tropicalis* por parte de los macrófagos y son cruciales para que pueda ser fagocitada el estadio de levadura.

El gen *CtOCH1*, está involucrado en la ruta biosintética de la *N* glicosilación y las *N* glicanas son capaces de sufrir fosfomanosilación en el estadio de levadura de *C. tropicalis*.

El gen *CtPMR1* funciona en *C. tropicalis* como una ATPasa que supe a las manosil transferasas del aparato de Golgi con los iones Mn^{2+} y Ca^{2+} .

La fosfomanosilación de proteínas de pared celular de *C. tropicalis* está presente tanto en *N*-glicanas como en *O*-glicanas y esta es más abundante en *C. tropicalis* que en *C. albicans*.

La ruta de integridad de la pared celular llevada a cabo por *C. tropicalis* tiene efectos diferentes a los observados en *C. albicans*.

Las *N* y *O*-mananas enmascaran los componentes internos de la pared celular, por lo que al no estar presentes, ocasionan cambios en la estimulación de producción de citocinas pro y anti-inflamatorias por parte de las células mono nucleares de sangre periférica Humana.

Perspectivas:

- 1.- Análisis del tipo de fosfomananas presentes en *C. tropicalis*, así como su localización en la pared celular del patógeno.
- 2.- Determinar el papel de la carga de las fosfomananas en el reconocimiento del patógeno por parte del macrófago.

Bibliografía:

Bates , S; MacCallum, D.M; Bertram, G; Munro , C.A; Hughes, H.B; Buurman E.T; Brown, A.J; Odds, F.C; Gow. N.A. (2005). *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem.* **280(24)**, 23408-230815

Bates S, Hughes HB, Munro C.A, Thomas W.P, MacCallum D.M, Bertram G, Atrih A, Ferguson M,A, Brown A.J, Odds F.C, Gow N.A.(2006) Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **281(1)**, 90-98.

Barelle, C.J, Manson, C.L; MacCallum, D.M; Odds , F.C; Gow ,N.A; Brown, A.J. (2004). GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast.* **4**, 333-40.

Butler G; Rasmussen M.D; Lin MF; Santos M.A; Sakthikumar S; Munro C.A; Rheinbay E; Grabherr M; Forche A; Reedy JL; Agrafioti I; Arnaud M.B; Bates S; Brown AJ; Brunke S; Costanzo MC; Fitzpatrick D.A; de Groot PW; Harris D; Hoyer L.L; Hube B; Klis FM; Kodira C; Lennard N; Logue ME; Martin R; Neiman A.M; Nikolaou E; Quail MA; Quinn J; Santos MC; Schmitzberger FF; Sherlock G; Shah P; Silverstein KA; Skrzypek MS; Soll D; Staggs R; Stansfield I; Stumpf M.P; Sudbery P.E; Srikantha T; Zeng Q; Berman J; Berriman M; Heitman J; Gow N.A; Lorenz MC; Birren B.W; Kellis M; Cuomo C.A. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* **459(7247)**, 657-62.

Cambi A; Netea M.G; Mora-Montes H.M; Gow N.A; Hato S.V; Lowman D.W; Kullberg B.J; Torensma R; Williams D.L; Figdor C.G.(2008) .Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem* **283(29)**, 20590-20599.

Calderon, L., Williams, R., Martinez, M., Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2003) . Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. *Med. Mycol.* **41**, 143–147.

Chaffin W. L; López-Ribot J. L; Casanova M; Gozalbo D; Martínez J. P (1998) Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression . *Microbiol Mol Biol Rev* **62(1)**, 130–180

Díaz-Jiménez D.F , Mora-Montes H.M , Hernández-Cervantes A , Luna-Arias J; Gow N.A.R ,Flores-Carreón A. Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis . *Biochem Biophys Res Commun* **419**, 77–82

Estrada-Mata E, Navarro-Arias M, Pérez –García L.A, Mellado-Mojica E, G-Lopez M, Csonka K, Gacser A, Mora-Monter H.M. Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Microbiol* **6**, 1527.

Gow N. A y Bernhard H.(2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012, **15**, 1–7

Herscovics A., Orlean P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **7**, 540–550.

Jigami Y; Wang X.H; Nakayama K; Shimma Y; Tanaka A.(1997). MNN6; a member of the KRE2/MNT1 family; is the gene for mannosylphosphate transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272(29)**, 18117-18124.

Joly, S et al. (1996) Development of two species-specific fingerprinting probes for broad computer-assisted epidemiological studies of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3063-3071

Jouault T, El Abed-El Behi, M; Martínez-Esparza, M; Breuilh, L, Trinel , P.A; Chamaillard, M, Trottein ,F; Poulain, D. (2006). Specific recognition of

Candida albicans by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J. Immunol.* **177**, 4679–4687

Kabir, M.A., Hussain, M.A. (2009). Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **7**, 121–134

Kelleher D.J Banerjee S, Cura A. J , Samuelson J y Gilmore R (2007) Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. *J Cell Biol* **177(1)** 29-37

KLIS F. M., DE GROOT P. y HELLINGWERF K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**, Suplemento 1, 1–8

Kobayashi H; Matsuda K, Ikeda T; Suzuki M; Takahashi S; Suzuki A; Shibata N y Suzuki S. (1994). Structures of cell wall mannans of pathogenic *Candida tropicalis* IFO 0199 and IFO 1647. *Yeast strains Infect Immun* **62(2)**, 615–622

Kothavade R.J; Kura M. M; Valand A. G y Panthaki M. H. (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *JMM* **59**, 873–880

McKenzie C.G., Koser U., Lewis L.E., Bain J.M., Mora-Montes H.M., Barker R.N., Gow N.A.R., Erwig L.P.(2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun.* **78**, 1650–1658

Moran C ; Grussemeyer C; Spalding R.J; Daniel K. Benjamin Jr, Spalding J.R; Benjamin D.K y Reed S.D. (2009). *Candida albicans* and Non-*albicans*

Bloodstream Infections in Adult and Pediatric Patients: Comparison of Mortality and Costs. *Pediatr Infect Dis J* .**28(5)**, 433–435.

Mora-Montes H.M., Bates S., Netea M.G., Castillo L., Brand A., Buurman E.T., Diaz-Jimenez D.F., Jan Kullberg B., Brown A.J.P., Odds F.C., Gow N.A.R.(2010) A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J. Biol. Chem* **285**, 12087–12095

Morales A. T. P; Franca E. J. G.; Furlaneto M. L, Quesada M. B. R y Furlaneto M. C. (2014). Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. *Med Mycol* **52**, 106–114.

Munro C.A; Bates S; Buurman E.T (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J. Biol. Chem.* **280**, 1051–1060

Navarro A.M.J, Tatiana A. D; Karine D; Katalin C; Erika M.J; Aline D.V; Roberto J.G.H; Vincent C; Marc C; N. V. H; Luis A. P.G , Dhirendra K.S; Csaba V; Attila G; Ricardo S. A; Thierry N ; Mercedes G. L; Nicolas P y Héctor M. M-M 1 (2016). Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host interaction. *Front. Microbiol.* **7**:306.

Naglik J.R; Richardson J.P y Moyes D.L (2014) *Candida albicans* Pathogenicity and Epithelial Immunity. *PLoS Pathog* **10(8)**, 1004257

Negri M; Silva S; Henriques M; Azeredo J; Svidzinski T; Oliveira R.(2011). Candida tropicalis biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. *Med Mycol.* **49(7)**, 739-47.

Netea M.G; Brown G.D. Kullberg B.J y Gow N.A (2008) . An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews, Micro* **6**, 67 –78

Noble, S.M; Jojnson A.D.(2007). Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* **41**, 193-211.

Odani T y Jigami Y.(1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan *Biochim Biophys Acta.* **1426(2)**, 335-45

Odani T, Shimma Y, Tanaka A a Jigami Y. (1996) Cloning and analysis of the *MNN4* gene required for phosphorylation of N-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gycobiology* **6 (8)**, 805-810.

Pappas P.G; Rex J.H; Lee J, Hamill R.J; Larsen R.A; Powderly W; Kauffman C.A; Hyslop N; Mangino J.E; Chapman S; Horowitz H.W; Edwards J.E; Dismukes W.E y NIAID Mycoses Study Group. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* **37(5)**, 634-43.

Raschke, W. C., Baird , S., Ralph, P y Nakoinz, I. (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, **15**, 261–267.

Reid,D.M.,Gow,N.A.R. y Brown,G.D.(2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr.Opin.Immunol.* **21**,30–37.

Reuss, O; Vik, A; Kolter , R; Morschhäuser, J.(2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* **341**, 119-27.

Ruíz-Herrera, J; Elorza M.V; Valentín, E; Sentandreu, R. (2005). Molecular organization of the cellwall of *Candida albicans* and its relationto pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**, 14–29.

Schwarz Flavio y Aebi Markus (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 576–582

Shibata N; Arai M; Haga E; Kikuchi T; Najima M; Satoh T; Kobayashi H; Suzuki S. (1992). Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect Immun.* **60(10)**, 4100-10.

Zhang. J.R; Idanpaan-Heikkila I, Fischer, W,; Tuomanen, E.I.(1999) Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol* **31(5)**, 1477-88.

Wang P.H. (2005) Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. *J. cancer mol* **1(2)**, 73-81