



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

“Relevancia de la *N*-glicosilación en la virulencia y reconocimiento inmune de *Sporothrix schenckii*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

NANCY EDITH LOZOYA PÉREZ

ASESOR:

Dr. HÉCTOR MANUEL MORA MONTES

GUANAJUATO, GTO.

MAYO 2018

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	1
Complejo de <i>Sporothrix schenckii</i> y esporotricosis	2
Pared celular de <i>Sporothrix schenckii</i>	4
Glicosilación de proteínas	5
Síntesis de <i>N</i> -glicanos	6
Manosiltransferasas	7
Respuesta inmune	8
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material Biológico	13
Medios de cultivo	14
Soluciones	15
<u>Métodos</u>	17
Crecimiento y mantenimiento de organismos	17
Aislamiento de ácidos nucleicos	18
Extracción de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Extracción de DNA plasmídico	18
Extracción de DNA genómico de <i>S. schenckii</i>	19
Extracción de RNA de <i>S. schenckii</i>	19
Síntesis de cDNA	20
Purificación de cDNA en columna	20

Cuantificación de Ácidos Nucleicos	20
PCR en tiempo real	21
Electroforesis de Ácidos Nucleicos	21
Purificación de fragmentos obtenidos mediante PCR y restricción	22
Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	22
Ensayo de unión al colorante azul Alciano	23
Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared	23
Transformación <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
Transformación fúngica mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
Tratamiento de los transformantes	25
Determinación de composición de pared	25
Cuantificación de azúcares	26
β -Eliminación de células	26
Tratamiento con endoH	26
Ensayo de tinción con Fluorocromos	26
Cuantificación de la fluorescencia de células de <i>Sporothrix</i>	27
Inactivación de células por calor	27
Aislamiento y purificación de monocitos a partir de sangre periférica humana (hPBMCs)	27
Diferenciación de macrófagos a partir de hPBMC	28
Interacción de hPBMCs con células de <i>S. schenckii</i>	28
Interacción de macrófagos diferenciados a partir de hPBMCs con células de <i>S. schenckii</i>	28
Ensayos de ELISA	29
Ensayos de virulencia en <i>Galleria mellonella</i>	29
Determinación de unidades formadoras de colonia	29

RESULTADOS	31
<u>Aislamiento y caracterización funcional del gen <i>OCH1</i></u>	31
Aislamiento del marco de lectura abierto ORF del gen <i>OCH1</i> de <i>S. schenckii</i>	
Complementación de la mutante nula <i>OCH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> con el gen <i>SsOCH1</i>	35
Efecto de la expresión del gen <i>SsOCH1</i> sobre la fosfomanosilación de la cepa <i>Scoch1Δ</i>	36
Efecto de la expresión del gen <i>SsOCH1</i> sobre la estructura de la pared de la cepa <i>Scoch1Δ</i>	37
<u>El silenciamiento del gen <i>OCH1</i> en <i>S. schenckii</i></u>	40
Construcción del plásmido 2N-pC para el silenciamiento del gen <i>SsOCH1</i>	41
Transformación de la cepa <i>AGL1</i>	43
<u>Transformación de <i>S. schenckii</i></u>	44
Análisis por PCR en tiempo real de la expresión de <i>SsOCH1</i>	48
Determinación de número de copias	50
Análisis de expresión de los genes de la familia <i>OCH</i>	52
<u>Caracterización de las cepas silenciadas en el gen <i>SsOCH1</i></u>	54
Crecimiento y morfología de las cepas silenciadas	54
Efecto de agentes perturbadores de pared en las cepas silenciadas	56
Análisis de carbohidratos de pared	57
<i>N</i> - y <i>O</i> - glicosilación de las cepas silenciadas	59
Exposición de quitina	60
<u>Interacción de cepas silenciadas con células del sistema inmune</u>	61
Estimulación de interleucinas por la interacción de las mutantes silenciadas con hPBMC	
Estimulación de interleucinas por la interacción de las mutantes silenciadas con macrófagos derivados de hPBMC	65
Fagocitosis de mutantes silenciadas de <i>S. schenckii</i> por macrófagos derivados de hPBMC	66

Ensayos de virulencia en el modelo <i>G. mellonella</i>	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	78
BIBLIOGRAFÍA	79

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Morfología de <i>Sporothrix schenckii</i>	2
Figura 2. Complejo <i>Sporothrix</i>	3
Figura 3. Distribución de los dominios estructurales predichos para la posible α 1-6, manosiltransferasa de <i>S. schenckii</i>	32
Figura 4. Electroforesis de RNA total obtenido a partir de micelio de <i>S. schenckii</i>	33
Figura 5. Productos de amplificación del ORF del gen OCH1 de <i>S. schenckii</i>	34
Figura 6. Producto de amplificación del ORF de OCH1 de <i>S. schenckii</i> a partir de cDNA	34
Figura 7. Comprobación de la construcción pYES2-SsOCH1	35
Figura 8. Productos de amplificación del ORF SsOCH1 con DNA genómico de las transformantes <i>Scoch1</i> Δ + SsOCH1	36
Figura 9. Fosfomanosilación de la pared celular en cepas de <i>S. cerevisiae</i> .	37
Figura 10. Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared	38
Figura 11. Morfología de la complementante <i>Scoch1</i> Δ + SsOCH1	39
Figura 12. Transformación de <i>S. schenckii</i>	41
Figura 13. Construcción del plásmido 2N-pC	42
Figura 14. Patrón electroforético de la amplificación para comprobar construcción 2N-pC	43
Figura 15. Patrón electroforético de los productos de amplificación de la cepa 2NpCAgl	44
Figura 16. Colonias obtenidas en medio YPD + 400 μ g mL ⁻¹ de <i>Hyg</i> + 200 μ M de cefotaxima	45
Figura 17. Colonias de <i>S. schenckii</i> seleccionadas del medio de co-cultivo.	45

Figura 18. Patrón electroforético de productos de amplificación para un fragmento del gen <i>SsCOCH1</i>	46
Figura 19. Patrón electroforético de RNA total extraído de <i>S. schenckii</i>	47
Figura 20. Electroforesis de los productos de amplificación FE-1A	48
Figura 21. Curva estándar para <i>SsOCH1</i>	49
Figura 22. Niveles de expresión de las cepas <i>Ssoch1-10</i> y <i>Ssoch1-2.2</i>	50
Figura 23. Patrón electroforético del análisis por PCR del número de copias del fragmento sentido transformantes de <i>S. schenckii</i> por PCR semicuantitativo	51
Figura 24. Número de copias en las cepas <i>Ssoch1-10</i> y <i>Ssoch1-2.2</i>	52
Figura 25. Niveles de expresión de los genes OCH2, OCH3 y OCH4 de las cepas <i>Ssoch1-10</i> y <i>Ssoch1-2.2</i>	53
Figura 26. Morfología celular y colonial de mutantes silenciadas en el gen OCH1 de <i>S. schenckii</i>	55
Figura 27. Unión del colorante azul Alciano a las cepas silenciadas en el gen <i>SsOCH1</i>	55
Figura 28. Porcentaje de germinación en presencia de agentes perturbadores de Pared	57
Figura 29. Porcentaje relativo de carbohidratos de pared celular	58
Figura 30. Cuantificación de N- y O- mananas	59
Figura 31. Tinción con WGA-FITC para evaluar exposición de Quitina.	60
Figura 32. Estimulación de interleucinas IL-10, IL-6 y TNF α por mutantes de <i>Sporothrix schenckii</i> silenciadas en el gen OCH1	61
Figura 33. Estimulación de interleucina IL-10 por mutantes de <i>Sporothrix schenckii</i> silenciadas en el gen OCH1	62
Figura 34. Estimulación de interleucina IL-6 por mutantes de <i>Sporothrix schenckii</i> silenciadas en el gen OCH1	63
Figura 35. Estimulación de interleucina TNF- α por mutantes de <i>Sporothrix schenckii</i> silenciadas en el gen OCH1	64
Figura 36. Estimulación de interleucina 1 β por mutantes de <i>Sporothrix schenckii</i> silenciadas en el gen OCH1	65

Figura 37. Estimulación de interleucinas por macrófagos derivados de hPBMC interaccionados con <i>S. schenckii</i>	66
Figura 38. Fagocitosis de levaduras de <i>S. schenckii</i> por macrófagos diferenciados a partir de hPBMCs	66
Figura 39. Ensayo de virulencia en <i>Galleria mellonella</i>	67
Figura 40. Unidades formadoras de colonia en <i>Galleria mellonella</i>	68

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Microorganismos utilizados y generados en este estudio	13
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados	16
Tabla 3. Comparación de la secuencia nucleotídica de la α 1,6-manosiltransferasa (<i>och1</i>) de <i>S. schenckii</i> con los demás miembros de la familia <i>OCH</i>	31
Tabla 4. Comparación de la secuencia aminoacídica de la α 1,6-manosiltransferasa (<i>och1</i>) de <i>S. schenckii</i> con α 1,6-manosiltransferasa (<i>och1</i>) de otros hongos.	32

RESUMEN

S. schenckii es un hongo patógeno, dimórfico, y el agente etiológico de la infección llamada esporotricosis, la cual afecta a animales y humanos. Dicha enfermedad es una infección granulomatosa de la piel y del tejido subcutáneo, aunque puede diseminarse afectando cualquier órgano del cuerpo humano. En las células fúngicas, la pared celular juega un papel muy importante durante la interacción patógeno-hospedero.

Las glicoproteínas de pared son necesarias para llevar a cabo funciones como soporte estructural, transducción de señales, y biosíntesis de la pared celular. La glicosilación de proteínas es una modificación postraducciona covalente, que modula la estructura y la función de proteínas en las células eucariotas. Durante el proceso de la *N*-glicosilación participan las manosiltransferasas que son capaces de transferir residuos de manosa a partir de GDP-manosa al grupo hidroxilo de un azúcar u oligosacárido aceptor generando enlaces glicosídicos α 1,2-, α 1,3-, α 1,4- y α 1,6-.

El producto del gen *och1* es el responsable de adicionar el primer residuo de α 1,6-manosa, el cual inicia la elaboración de la cadena exterior en el Aparato de Golgi. En *S. schenckii* han sido poco estudiadas las enzimas que participan en las vías biosintéticas de glicosilación de proteínas. En hongos patógenos este proceso juega un papel fundamental para la integridad de pared celular, virulencia y reconocimiento inmune.

Para este proyecto es de importancia el estudio de la ruta de *N*-glicosilación, mediante el conocimiento de la actividad de la α 1,6-manosiltransferasa y cómo esta enzima participa en la virulencia y respuesta inmune durante la interacción de *S. schenckii* con el hospedero. Mediante ensayos de complementación de la cepa mutante nula *Scoch1* Δ se observó que el gen *OCH1* aislado de *S. schenckii* es capaz de restaurar el fenotipo de la cepa mutante *Scoch1* Δ de *S. cerevisiae*, sugiriendo fuertemente que este podría ser el ortólogo funcional del gen *OCH1* en *S. schenckii*.

Para determinar la participación del producto del gen *SsOCH1* en la virulencia y reconocimiento inmune del hongo se optimizó un protocolo de transformación para *S. schenckii* y se logró el silenciamiento del gen *SsOCH1*. Se cuenta con un grupo de mutantes silenciadas que cuentan con 100%, 98%, 96% , 86% y 43% de silenciamiento del gen *SsOCH1*, de las cuales en este trabajo se muestra la caracterización de las cepas *Ssoch1-10* (86%) y *Ssoch1-2.2* (43%).

Dichas cepas presentan una sola inserción de la construcción en el genoma, cambios en composición de pared y diferencias en la estimulación de interleucinas, indicando que el defecto en la *N*-glicosilación de proteínas causa modificación de β 1,3-glucanos y el reconocimiento es diferente en células del sistema inmune como hPBMC y macrófagos. Presentan un menor porcentaje de fagocitosis, en comparación con la cepa silvestre, y se observa una atenuación en ensayos de virulencia con *G. mellonella*.

INTRODUCCIÓN

S. schenckii es un hongo patógeno y dimórfico. Fue descrito por primera vez por Benjamin Schenk en 1898 y clasificado en 1900 como *S. schenckii* (Lopes-Bezerra et al., 2006). Es el agente etiológico de la infección llamada esporotricosis, la cual afecta a animales y humanos (Travassos et al., 1980). La infección en el humano se produce a través de inoculación en heridas de la piel por plantas o animales contaminados.

El estado saprobio, que es el estado infeccioso, presenta la forma filamentosa, compuesta por hifas hialinas y septadas, hifas no diferenciadas con células conidiógenas y conidios que emergen en grupo desde el conidióforo, o individualmente directamente de las hifas.

El morfotipo micelial se obtiene creciéndolo de 25–28°C, y pH de 3.0 a 12.5 (Ghosh et al., 2002), presenta septos de 1-2 µm de ancho, con conidióforos perpendiculares cuyo extremo distal se dilata formando una vesícula denticulada, de la que nacerán conidios hialinos de 2-3 a 3-6 µm que se agrupan en forma de ramillete o margarita (fig. 1). A medida que el cultivo envejece, la conidiación aumenta y aparecen conidios sésiles a lo largo de los conidióforos e incluso hifas no diferenciadas.

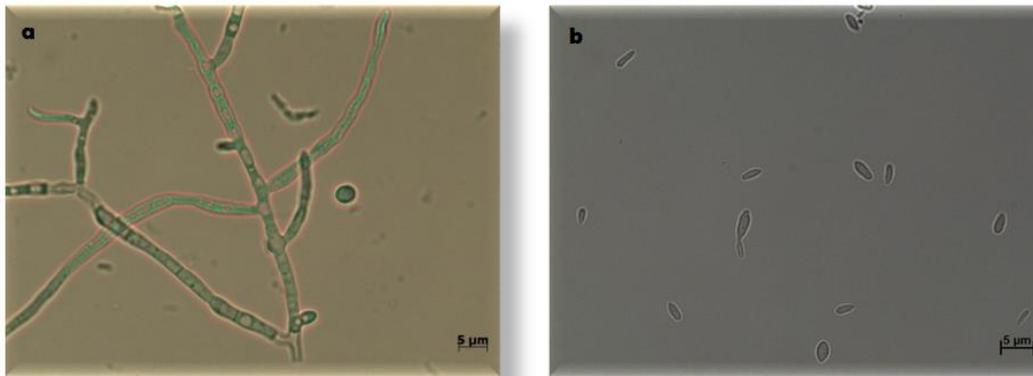


Figura 1. Morfología de *Sporothrix schenckii*. **a.** Forma filamentosa, compuesta por hifas hialinas y septadas, también se pueden observar conidios. **b.** Forma levaduriforme, se observan células ovoides.

En su fase parasita desarrolla la forma levaduriforme, en esta morfología se observan células fusiformes y ovoides que van de 2.5–5 a 3.5–6.5 µm. Se obtienen en diferentes medios de cultivo suplementados con glucosa y crecidos de 37 a 25°C, con pH neutro (7.2) y aereación (Resto et al., 1988).

Complejo de *Sporothrix Schenckii* y esporotricosis

Recientemente se han descrito varios genotipos de *S. schenckii*, lo que ha llevado a formar un complejo denominado complejo de *S. schenckii* (fig. 2). En este grupo podemos encontrar *S. brasiliensis*, *S. globosa* y *S. lurie* (de Beer ZW et al., 2016). Las especies que se encuentran dentro de este complejo son consideradas de interés debido a su potencial patogénico (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009).

Las principales herramientas moleculares que se emplearon para describir a este complejo se han basado principalmente en el análisis de las secuencias que codifican para los genes de la quitina sintasa, calmodulina y β-tubulina, y también se han descrito otros complejos de especies ambientales (Marimon et al., 2006.; Lopes-Bezerra et al., 2006.; Lopes-Bezerra et al., 2018).

También se pueden diferenciar basándose en sus características macroscópicas, asimilación de sacarosa y rafinosa, así como su crecimiento a 37°C (Marimon et al., 2007).

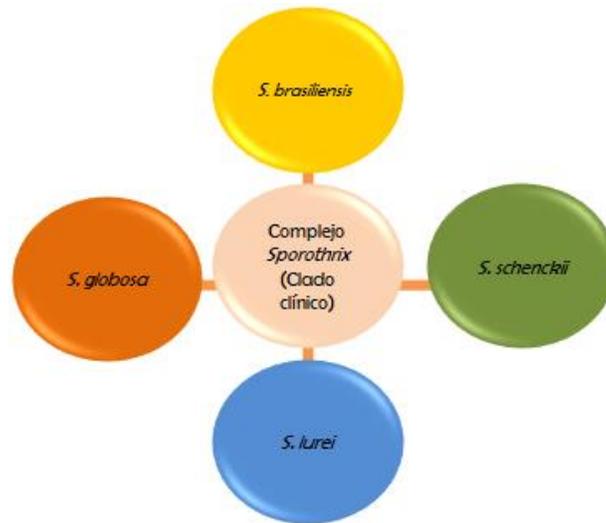


Figura 2. Complejo *Sporothrix*. Miembros del clado clínico de *Sporothrix*, basado en análisis de secuencia del gen que codifica para calmodulina.

La esporotricosis es causada por la inoculación traumática del hongo existente en materia orgánica y los suelos, por astillas de madera de algunos árboles (Marimon et al., 2008), y recientemente se ha descrito por contacto o rasguños por gatos y ocasionalmente puede ser inhalado o llegar a la conjuntiva. Las personas inmunodeprimidas suelen sufrir lesiones extensas y múltiples (Durdin et al., 1997). Las poblaciones más vulnerables son campesinos, amas de casa y menores de 15 años.

La esporotricosis se encuentra distribuida en diferentes partes del mundo. En el continente americano tiene mayor prevalencia en Brasil, México, Colombia, Perú, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Guatemala y los Estados Unidos de Norteamérica.

En México, ocupa el segundo lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma, siendo las entidades con más casos confirmados la Ciudad de México y Jalisco, seguido por Guanajuato (con una mayor incidencia en Acámbaro y Dolores Hidalgo), Puebla, Nayarit y San Luis Potosí (Macotella-Ruiz E, Nochebuena-Ramos E, 2006; Carrada-Bravo, 2012).

Para el tratamiento de esta enfermedad se han empleado diferentes drogas, incluyendo yoduro de potasio, itraconazol, terbinafina, fluconazol y anfotericina B (Song et al., 2011). El tratamiento utilizado dependerá de la condición clínica de la persona, la extensión de las lesiones cutáneas, la evaluación de las interacciones entre medicamentos, y los eventos adversos y afectación sistémica. Algunas contraindicaciones que se han observado son: náuseas, vómitos y diarrea, dolor de cabeza, dolor abdominal, reacciones de hipersensibilidad y disfunción hepática, (López-Romero et al., 2011).

Pared celular de *Sporothrix schenckii*

Los hongos poseen una pared celular, esencial para la integridad y forma de las células (Klis, 1994). La rigidez de la pared no solo protege a la célula de agresiones físicas externas, sino que también resiste la presión y evita la lisis de la célula cuando ocurren descensos en la osmolaridad del medio. Actúa como barrera frente a sustancias potencialmente dañinas del medio ambiente, proporciona una estructura donde las proteínas integrales de pared pueden ser ancladas sirviendo para la exposición de proteínas que juegan un papel importante en interacciones célula-célula, mediando de esta manera varios procesos asociados con la patogénesis de estos microorganismos.

La pared celular, que constituye aproximadamente un 30% del peso seco de la célula (Valentín et al., 1987), está compuesta principalmente por tres clases de polisacáridos: manosa unida covalentemente a péptidos (manoproteínas), glucosa, y N-acetil-glucosamina (quitina), formando una estructura con dos capas, donde las proteínas están mayoritariamente en la superficie externa y el glucano en la

parte interna (Fleet,1991; Klis, 1994). Los distintos componentes de la pared son sintetizados tanto en la membrana plasmática, como a través de pasos sucesivos durante la ruta de secreción, en el caso de proteínas de la pared celular.

La pared de *S. schenckii* está formada por glucanas solubles e insolubles en álcali, y se presentan en las dos morfologías del microorganismo. Se han identificado glucanas solubles en álcali con enlaces β 1,3- (44%), β 1,6- (28%) y β 1,4- (28%), y glucanas insolubles en álcali con enlaces β 1,3- (66%), β 1,6- (29%) y β 1,4- (5%) (Previato et al., 1979).

De la pared celular de la fase levaduriforme de *S. schenckii* se aisló una glicoproteína denominada peptidoramnomana, conteniendo ramnosa 33.5%, manosa 57% y proteínas 14.2% (Lloyd y Bitoon, 1971), es de interés encontrar ramnosa ya que este azúcar es muy raro en otros patógenos de humano (Barros et al., 2011). En la superficie del hongo se han detectado residuos de galactosa (Previato et al., 1979). También se encontró presencia de residuos de ácido glucurónico en una fracción ácida de ramnomananas (Gorin et al., 1977).

Otro componente que se ha descrito en la pared celular de levaduras de *S. schenckii* es una glicoproteína de 70 kDa, conocida como Gp70, la cual se encuentra distribuida a lo largo de la pared celular y se le atribuye una regulación en la adhesión a células del hospedero (López-Romero et al., 2011).

Glicosilación de proteínas

Las glicoproteínas de la pared celular son necesarias para las funciones vitales, como soporte estructural, transducción de señales, y biosíntesis de la pared celular.

La glicosilación de proteínas es el proceso donde de manera seriada se adicionan carbohidratos a una proteína. Existen varios tipos de glicoproteínas, de las cuales dos son las más abundantes: las *N*-glicoproteínas y las *O*-glicoproteínas. En las *N*-glicoproteínas, los oligosacáridos se unen al grupo amino de la cadena lateral de

residuos de asparagina de la proteína naciente. En las O-glicoproteínas, las glicanas se unen al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los a residuos de Ser y/o Thr de la proteína naciente (Gentzsch, M. y Tanner, W. 1997).

Las N-glicoproteínas constituyen la clase principal de glicoproteínas, tanto circulantes como unidas a membranas. La diferencia entre ellas está dada fundamentalmente por dos elementos: su biosíntesis y la naturaleza de los aminoácidos unidos a la cadena de oligosacáridos (Murray et al., 2001).

Todos los N-glicanos comparten un pentasacárido nuclear común, el $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, sin embargo, difieren en sus ramas externas, las cuales pueden ser muy variadas y complejas.

Síntesis de N-glicanos

La biosíntesis de los N-glicanos inicia de modo co-traduccional, es decir que los carbohidratos se adicionan al mismo tiempo que el péptido se sintetiza en los ribosomas, en un proceso muy conservado en todos los eucariotes. El primer paso tiene lugar en la cara citosólica del retículo endoplásmico, donde se sintetiza el glicolípido Dol-P- $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, seguido de una etapa en la cara luminal donde el glicolípido que se genera es Dol-P-Glc $_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, conocido como el precursor de N-glicanas (Herscovics y Orlean, 1993;. Lehle et al, 2006). Este precursor se transfiere al residuo de Asn de la secuencia Asn-X-Ser/Thr del polipéptido que se está sintetizando, donde el aminoácido X puede ser cualquiera excepto prolina (Kornfeld y Kornfeld, 1985; De Praeter et al., 2000).

Una vez que el N-glicano se encuentra en la proteína es procesado por α -glucosidasas I y II del retículo endoplásmico, que remueven una α 1,2-glucosa externa y los dos residuos de glucosa restantes, respectivamente (Frade-Pérez et al., 2010; Robledo-Ortiz et al., 2012), y por una α 1,2-manosidasa que elimina un residuo de α 1,2-manosa, generando el $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Mora-Montes et al., 2010b). Posteriormente las glicoproteínas son transportadas al aparato de Golgi, donde serán modificadas por una serie de glicosiltransferasas.

Manosiltransferasas

En *S. cerevisiae* se ha estudiado detalladamente el proceso de la *N*-glicosilación, y se ha visto que las manosiltransferasas del aparato de Golgi son las responsables de la elaboración de los *N*-glicanos. La primera reacción es catalizada por una α 1,6-manosiltransferasa Och1, seguida por la acción de los complejos de α 1,6-manosiltransferasas MolP-I y MolP-II (Sean, 2001). El producto del gen *OCH1* es responsable de adicionar el primer residuo de α 1,6-manosa, el cual inicia la elaboración de la cadena exterior en el aparato de Golgi (Ballou, 1990; Nakayama et al., 1992; Gaynor et al., 1994; Nakayama et al., 1997).

El genoma de *S. schenckii* muestra ortólogos de los genes que codifican para enzimas de la familia OCH1, incluyendo *OCH2*, *OCH3* y *OCH4*.

En diferentes organismos se han realizado estudios para observar la participación de los ortólogos de estas manosiltransferasas en el procesamiento de glicoproteínas *N*-glicosiladas. En *S. cerevisiae*, la ausencia del gen *OCH1* generó cepas con termosensibilidad, sensibilidad a agentes que dañan pared y ausencia de residuos de α 1,6-manosa en las *N*-glicanas (Nakayama et al., 1992; Nakanishi-Shindo et al., 1993).

Posteriormente se han hecho estudios de *OCH1* en *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Candida albicans*, *Ogataea minuta*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, entre otros (Barnay-Verdier et al., 2004; Bates et al., 2006; Kim et al., 2006; Kuroda et al., 2006; Lambou et al., 2010; Maddy and Free, 2010; Zanni et al., 2009).

Lo que se ha observado es que el producto del gen *OCH1* está involucrado en morfogénesis, biosíntesis de pared celular, y en algunos organismos afecta la virulencia.

Respuesta inmune

En las células fúngicas la pared celular juega un papel muy importante durante la interacción patógeno-hospedero, ya que es el primer punto de contacto con el hospedero, modulando en gran manera la respuesta inmunitaria.

Esta modulación de la respuesta inmunitaria se debe principalmente a que algunos componentes de la pared del patógeno (PAMP's) son reconocidos como extraños para las células del sistema inmune, desencadenando una señalización y secreción de citocinas pro y anti-inflamatorias. Los mecanismos inmunológicos implicados en la prevención y control de las infecciones de *S. schenckii* no se conocen a detalle hasta la fecha.

Estudios recientes han demostrado que los extractos de lípidos de la forma de levadura de *S. schenckii* se unen a TLR4, y esta interacción conduce a la inducción de una explosión oxidativa contra el hongo (Sassa et al., 2012). Algunos autores especulan sobre el hecho de que TLR4 podría ser el receptor principal para el reconocimiento de *S. schenckii* de origen cutáneo e inducir una fuerte respuesta inmune (Uenotsuchi et al., 2006).

La inmunidad mediada por células T se ha descrito como la principal defensa contra *S. schenckii*. En infecciones experimentales con ratones se ha visto una mayor susceptibilidad a la esporotricosis, y la inmunidad adquirida contra *S. schenckii* está mediada principalmente por los macrófagos que han sido activados por las células T (Hachisuka y Sasai, 1981).

ANTECEDENTES

La pared celular de *S. schenckii* está compuesta de polímeros de azúcar y glicoproteínas, los cuales representan aproximadamente el 80 y 20% del peso seco, respectivamente (Previato et al., 1979).

En cuanto a la estructura de las glicoproteínas, se ha descrito que están compuestas principalmente de manosa, ramnosa y galactosa las cuales forman, entre otros oligosacáridos, la péptidoramnomanana, la galactomanana y la peptidoramnogalactana (Lloyd y Bitoon, 1971; Mendonca et al., 1976; Mendonca y Previato, 1980; Nakamura, 1976).

En el grupo de trabajo se han reportado nuevos datos de la composición de la pared de *S. schenckii*, por ejemplo: un 18.5 % de proteína en pared, una mayor porosidad de pared de los conidios, seguido de levaduras e hifas. (Martínez-Álvarez, et al., 2017).

En cuanto a las enzimas que se encuentran dentro de las rutas de glicosilación, han sido poco estudiadas en *S. schenckii*. Sin embargo debido a que se han encontrado las secuencias de los ortólogos de algunos genes, se puede suponer que estas rutas existen en el hongo. Se tienen evidencias en la ruta de *N*-glicosilación de α -glucosidasas, α 1,2-manosidasas, *ROT2* y α 1,2-manosiltransferasas del RE, α 1,2-manosidasas IA, IB, e IC del aparato de Golgi, y glicoproteínas que participan en el control de calidad de glicoproteínas del retículo endoplásmico, EDEMs, (Mora Montes et al., 2010b; Torres Rodríguez et al., 2012; Robledo-Ortiz et al., 2012; Hernández-Cervantes et al., 2012; Lopes-Bezerra et al., 2015).

En lo que respecta a la interacción con componentes del sistema inmune, se ha observado que el reconocimiento de *S. schenckii* es dependiente de la morfología celular. También se ha demostrado que Dectina-1 y el receptor de manosa MR están parcialmente involucrados en el reconocimiento del hongo. En cuanto al

receptor TLR2, éste está parcialmente involucrado en el reconocimiento de las células fúngicas, detectando β -glucanas, mientras que TLR4 sensa glicanos O-ligados. Estos experimentos se realizaron con células mononucleadas de sangre periférica humana (hPMBC's; Martínez-Álvarez, et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN

En *Sporothrix schenckii* han sido poco estudiadas las enzimas que participan en las vías biosintéticas de glicosilación de proteínas. En hongos patógenos este proceso juega un papel fundamental para la integridad de pared celular, virulencia y reconocimiento inmune.

Durante la *N*-glicosilación, la α 1,6-manosiltransferasa codificada por el gen *OCH1* es la encargada de iniciar la adición de residuos de manosa. Es de interés el conocer la importancia de la actividad de esta enzima, y cómo participa en la virulencia y respuesta inmune durante la interacción de *Sporothrix schenckii* con el hospedero.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relevancia de la *N*-glicosilación en la virulencia y el reconocimiento inmune de *Sporothrix schenckii*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar funcionalmente el gen *OCH1* de *S. schenckii*.
- Silenciar el gen *OCH1* en *S. schenckii* .
- Caracterizar las transformantes obtenidas, así como determinar la interacción entre células silenciadas y PBMCs humanos, para establecer la importancia del gen en la interacción *S. schenckii*-células del sistema inmune innato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. Los microorganismos utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos utilizados y generados en este estudio

Cepa	Organismo	Genotipo
1099-18 ATCC MYA 4821	<i>S. schenckii</i>	Silvestre
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0
Scoch1Δ ura ⁻	<i>S. cerevisiae</i>	BY4741; MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0; YGL038c::kanMX4
Scoch1Δ ura ⁺	<i>S. cerevisiae</i>	Como Scoch1Δ ura ⁻ pero transformada con pYES2
Scoch1Δ +OCH1	<i>S. cerevisiae</i>	Como Scoch1Δ ura ⁻ pero transformada con pYES-OCH1
Scoch1Δ + Ssoch1	<i>S. cerevisiae</i>	Como Scoch1Δ ura ⁻ pero transformada con pYES-SsOCH1
AGL1	<i>A. tumefaciens</i>	AGL0 (C58 pTiBo542) recA::bla, T-region deleted Mop(+) Cb(R)
AGL1-2N	<i>A. tumefaciens</i>	Como Agl1 pero transformada con 2NpC
Ssoch1-10	<i>S. schenckii</i>	Cepa silenciada en el gen OCH1
Ssoch1-2.2	<i>S. schenckii</i>	Cepa silenciada en el gen OCH1

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados se describen a continuación:

Medio YPD. Este medio fue utilizado para crecer a *S. schenckii* y se preparó con: 0.3 % extracto de levadura, 1% peptona de gelatina, 3% glucosa. Ajustando pH a 7.8 con hidróxido de sodio 5N para diferenciación a levadura y pH a 4.5 con ácido sulfúrico para diferenciación a micelio.

Medio SC. Base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos 0.67% p/v, dextrosa 2% p/v y mezcla de suplemento completo sin uracilo 0.077% p/v. Para crecimiento de cepas con auxotrofia a uridina (ura^-) se suplementó con uridina 100mg/mL. Cuando se requirió se le adicionó agarosa al 2%.

Para los ensayos de azul Alciano se utilizó el medio suplementado con 2% galactosa y 3% rafinosa.

Medio LB. Se utilizó para la propagación de *E. coli* DH5 α y AGL1, se preparó con peptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%, suplementado con ampicilina y/o kanamicina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante a 200 rpm durante 24 h para *E. coli* y 28°C con agitación constante a 200 rpm durante 24 h para AGL1. Cuando se requirió se adicionó 2% de agar.

Medio mínimo para *Agrobacterium tumefaciens*

Este medio de cultivo se empleó para la inducción y co-cultivo de *A. tumefaciens* durante la transformación de *S. schenckii*. Se preparó con amortiguador de fosfatos 20X (100mL); 6 g K_2HPO_4 y 2 g NaH_2PO_4 , solución salina 20X (100mL); 2 g NH_4Cl , 6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g KCl , 0.02 g CaCl_2 y 0.005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se ajustó el pH a 7.0 con HCl. **Medio de inducción;** suplementado con 200 μM de acetosiringona. **Medio de co-cultivo;** Se preparó medio de inducción con agar bacteriológico al 2%. **Medio de selección;** Medio solido YPD pH 4.5 suplementado con higromicina 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y cefotaxima 200 μM

Soluciones

Polietilenglicol/Cloruro de Magnesio (PEG 8000 30%/MgCl₂ 30mM). Esta solución se utilizó para limpiar los productos de PCR y restricciones enzimáticas. Para prepararla se disolvieron 30 g de PEG 8000 en aproximadamente 70mL de agua destilada, posteriormente se llevó a un volumen final de 90mL, se esterilizó y se le adicionaron 10mL de cloruro de magnesio 0.3 M. Esta solución se mantuvo a 4°C, o se guardó en alícuotas a -20°C (García M., et al., 2008).

Tris-EDTA-NaOH- SDS (TENS). Esta solución se empleó para la obtención del ADN plasmídico. La composición de esta solución es la siguiente: amortiguador TE 1X; conteniendo 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH) y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.5%.

Tris-base-acetato-EDTA (TAE). El TAE se utilizó como amortiguador de corrida para la electroforesis de DNA y para la preparación de la agarosa. Se preparó 1L de solución concentrada de 50X, cuya composición es la siguiente: Tris base 2M, 57.1mL de ácido acético glacial y 100mL de EDTA 0.5M.

Amortiguador de Fosfatos (PBS). Se preparó 1L de solución 10X, cuya composición es la siguiente: 80.1 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na₂HPO₄ y 2.7 g de KH₂PO₄, disolver en 800 mL de agua mQ y ajustar pH a 7.4 con HCl. Llevar a un volumen final de 1L y autoclavar. La solución que se emplea es 1X.

Amortiguador TE. Se empleó para precipitar fragmentos de PCR y restricciones enzimáticas, se preparó una solución 10X que contiene 100 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA (pH 8.0). Se esterilizó por autoclave. La solución que se empleó es 1X.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se utilizaron para los experimentos de biología molecular se describen a continuación:

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados durante este estudio, se presentan en sentido 5'-3'.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Características
Och1 D	<u>aagctt</u> atgctcacctcaagcgg	Gen <i>OCH1</i> SS09317
Och1 R	gctagcttactcctgctgctgcc	
gdp D	ggcgacctcgattggaatc	Promotor <i>Ppdg</i> y secuencia interna del marcador <i>Hyg</i> 970 pb
Hph-R	ctattccttggcctcggacgag	
Sentido och1D	<u>ctcgagt</u> tacatcaccaccgctcacata	SS09317 444pb
Sentido och1R	<u>aagctt</u> tcgtaatgacctcgtggatga	
Antisentido och1D	<u>agatct</u> tcgtaatgacctcgtggatga	
Antisentido och1R	<u>aggcct</u> tacatcaccaccgctcacata	
PtpC D-PstI	<u>ctgcag</u> atgccagttgtcccagtgatc	Promotor <i>PtpC</i> y Terminador <i>TrpC</i> del vector pSilent1
TtpC R-SacI	<u>gagctc</u> ctctaaacaagtgtacctgtgcatt	
OCH1qD	cagattgtcacgcacatcac	SS09317 139pb expresión <i>SsOCH1</i>
OCH1qR	cgtcgttgaagtagccaag	
OCH1sentqRT D	ccgtcaatagcatcacaagg	SS09317 171 pb número de copias <i>SsOCH1</i>
OCH1sentqRT R	cagcttgcgtagagggtca	
L6 D	attgcgacatcagagaagg	Proteína ribosomal L6e (SS09488)
L6 R	tcgaccttctgatgttg	
OCH2sentqRT D	tcgacttctaccgcaatgtg	SS03245 188 pb expresión <i>SsOCH2</i>
OCH2sentqRT R	ctcgtgatctcaacaccaa	
OCH3sentqRT D	cctttacgccttctctcg	SS02495 241 pb expresión <i>SsOCH3</i>
OCH3sentqRT R	gcattgtcacggtcacttc	

OCH4sentqRT D	tgcacctcaatgagcaagac	SS09242 179 pb expresión SsOCH4
OCH4sentqRT R	cgttgtcgtcgtgtcaaact	

Métodos

Crecimiento y mantenimiento de organismos. Los cultivos de *S. schenckii* se incubaron a 28°C, en medio líquido YPD pH 4.5 con agitación rotatoria 200 rpm para la obtención de micelio. Para la morfología de levadura se incubaron en medio YPD pH 7.8 con agitación rotatoria a una temperatura de 37°C. Para la conservación de la cepa, de un cultivo de conidios de 5-7 días en medio YPD agar pH 4.5, la suspensión se centrifuga a 1370 x g durante 10 min. Los conidios se lavaron con agua destilada estéril o PBS, se resuspendieron en glicerol al 30 % (v/v) y se mantuvieron a -70°C. Estos conidios se emplearon como inóculo para los cultivos.

Los cultivos de *S. cerevisiae* fueron crecidos a 28°C en medio YPD, las cepas *Ura^r* fueron crecidas en medio suplementado con uridina. Para crecimiento de las cepas en los ensayos de unión de azul Alciano se utilizó medio SC suplementado con 2% de glucosa y YNB suplementado con 2% de galactosa y 3% rafinosa

A. tumefaciens la cepa AGL-1, fue crecida a 28°C durante 2 días en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹). Para las cepas transformadas con el vector binario apropiado, fueron crecidas a 28°C durante 2 días en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg mL⁻¹) y kanamicina (100 µg mL⁻¹).

Aislamiento de ácidos nucleicos

Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*. Se Obtuvieron las células de *S. cerevisiae* de un cultivo de toda la noche (YPD, 28°C y 200 rpm). Se centrifugaron y la pastilla se resuspendió en 500 µL del regulador de lisis (SDS, 1%; EDTA, 50 mM, Tris pH 8.0, 100 mM). Posteriormente se rompieron las células mecánicamente usando perlas de vidrio y agitando las muestras en vórtex durante 3 min. Se añadieron 275 µL de acetato de amonio 7 M y se incubaron las muestras a 65°C por 5 min y en baño de hielo por otros 5 min. Se adicionaron 500 µL de mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se realizó la extracción agitando por inversión y centrifugando durante 10 min a 9485 x g. Se recuperó la fase acuosa, se adicionó un volumen de isopropanol y se incubó a -20°C durante 10 min. El DNA se recuperó por centrifugación a 9485 x g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%. Una vez se hubo secado, el DNA se resuspendió en 100 µL de agua con RNAsa (10 µg mL⁻¹).

Extracción de DNA plasmídico. Modificación del protocolo de Chen Zhou, et al., 1990. El medio de cultivo donde se creció la bacteria se centrifugó hasta formar una pastilla, posteriormente se resuspendió en 50µL del propio sobrenadante. Se Añadiieron 5µL de RNAasa (10 µg mL⁻¹) a cada muestra (previamente hervir la RNAasa diez minutos). Se agregaron 300µL de la solución TENS y se mezcló por inversion. En este paso se rompen las células. Se incubó cinco minutos a temperatura ambiente, para dar tiempo a que se rompan todas las bacterias y la RNAasa trabaje. Se agregaron 150µL de acetato de sodio 3M pH 5.2, y se mezcló por inversión. En este punto se precipitará el DNA genómico, las proteínas y los lípidos. Se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima de la microcentrífuga. Se transfirió el sobrenadante, que contiene el DNA plasmídico de nuestro interés, a un tubo nuevo, se agregaron 900µL de etanol al 100% (-20°C), y se mezcló por inversión suavemente. En este paso se precipita el DNA plasmídico. Se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad en la microcentrífuga. Se eliminó el sobrenadante con mucho cuidado con una punta de 1mL. Se lavó el precipitado con 400µL de etanol al 70% (-20°C), para eliminar el exceso de sales, se centrifugó para formar

una pastilla (un pulso solamente). La pastilla se lavó por segunda vez con etanol al 70% y se secó al aire durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 35µL de agua desionizada estéril.

Extracción de DNA genómico de *S. schenckii*. El micelio se trituró en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero. Aproximadamente 0.5 mL (polvo). Se añadieron 400 µL de amortiguador de extracción (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, pH 8). Se le agregaron 80 µL SDS al 10% + 8 µL proteinasa K y se incubó por 1 h a 60°C, posteriormente se le agregó 320 µL de NaCl 5M y se centrifugó por 30 min a 9485 x g. El sobrenadante se vertió en un tubo nuevo. Se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 20 min a 9485 x g, se lavó 2 veces con etanol al 70%, se centrifugó por 5 min y se dejó secar. El DNA se resuspendió en 35 µL de agua desionizada + RNAasa (1-2 µL) y se dejó incubar por 10 min a 37°C.

Extracción de RNA de *S. schenckii*. Una vez obtenido el micelio, éste se trituró con nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero. El polvo obtenido se pasó a tubos eppendorf. Posteriormente se adicionó 1mL de TRIZOL y la mezcla se homogenizó por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 200µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se Incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 9485 x g durante 15 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µL de isopropanol, posteriormente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 9485 x g durante 10 minutos. La pastilla obtenida se lavó con 1mL de etanol al 70%, se centrifugó por 3 min y se dejó secar. El RNA se resuspendió en un volumen mínimo de agua DEPC.

Síntesis de cDNA. Se tomó una alícuota de RNA total aislado y se le adicionaron: 1µL de Oligo dT₂₀ + 1µL de dNTPs mix 10mM y se llevó a un volumen final de 10 µL con agua DEPC. Se incubó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se colocó en hielo durante 1 minuto. La mezcla para la síntesis de cDNA se preparó en el orden indicado: 2µL de buffer RT 10x, 4µL de MgCl₂ 25mM, 2µL de DTT 0.1 M, 1µL de RNAasa OUT, 1µL SuperScript III RT. Se adicionan 10µL de la Mezcla a cada tubo y se incubaron (en el caso de Oligo dT₂₀ 50 minutos a 50°C). Terminando la reacción de 85°C durante 5 minutos, se colocó en hielo. Se adicionó 1µL de RNasa H a cada tubo y se incubó durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente 1µL de RNAasa A durante 30 minutos. El cDNA obtenido se sometió a limpieza por columna (Trujillo, E. et al., 2016).

Purificación de cDNA en columna. (Trujillo, E., et al., 2016) Se tomaron 20 µL de cDNA y se mezclaron con 20 µL de solución de isotiocianato de guanidina (isotiocianato de guanidina 3M y acetato de sodio 30 mM, ajustado a pH 5 con ácido acético glacial) y 20 µL de solución de acetato de potasio (acetato de potasio 1.5 M, ajustado a pH 5 con ácido acético glacial) (Xu *et al.*, 2011). Esta mezcla se colocó en columnas de sílice para purificación de DNA plasmídico (Quiagen), y se centrifugó a 9485 x *g* durante 2 min. El eluido se precipitó con etanol absoluto dejando reposar durante 40 min a -20°C, posteriormente se centrifugó la muestra a 10000 x *g* durante 10 min, se realizaron dos lavados de la pastilla con etanol al 70%, centrifugando a 9485 x *g* durante 1 min, entre lavados. Finalmente, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC calentada a 60 °C.

Cuantificación de Ácidos Nucléicos. El DNA genómico, RNA total y cDNA obtenidos fueron cuantificados por espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). Se utilizaron 2 µL de muestra para realizar la medición utilizando agua-DEPC como blanco.

PCR

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se requirió de : 100 ng μL^{-1} a 200 ng μL^{-1} del DNA o cDNA aislado, 15 pg μL^{-1} de los oligonucleótidos específicos (reverso y directo), 2.5 μL de amortiguador 10X DreamTaq (MgCl_2 20mM), 0.5 μL de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) 2.5 mM, y 0.2 μL de la enzima (DreamTaq 5U μL^{-1}), la reacción se llevó a un volumen final de 25 μL con agua libre de DNasa y RNasa.

PCR en tiempo real. Para esta reacción se utilizó cDNA purificado por columna a una concentración de 200 ng μL^{-1} . Para la mezcla control (20 μL por reacción) se utilizó: 10 μL de Fast SYBR Green Master Mix (Colorante SYBR® Green I, DNA polimerasa AmpliTaq® Fast, uracil-DNA glicosilasa, ROX, dNTPs y regulador de componentes optimizado) (Applied Biosystems), 0.4 μL de cada oligonucleótido (10 μM) y 9.2 μL de agua DEPC. Para la mezcla problema se utilizó: 10 μL de Fast SYBR Green Master Mix, 0.4 μL de cada oligonucleótido y 4.2 μL de agua DEPC. A cada pozo problema se adicionaron 15 μL de la mezcla y posteriormente 5 μL de cDNA según la muestra a analizar, finalmente se cubrió la placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL; Life technologies) con el film (MicroAmp® Optical Adhesive Film; Life Technologies). La placa se analizó en un equipo de PCR en Tiempo real (StepOne plus, Life Technologies), en un programa de cT comparativo.

Electroforesis de Ácidos Nucleicos. La separación de los ácidos nucleicos se realizó mediante electroforesis horizontal, cargando una alícuota en un gel de agarosa. Cada muestra contenía el ácido nucleico y amortiguador de carga 6X (ésta se preparó con 0.25% p/v de orange G y 30% de glicerol estéril en agua desionizada estéril) en proporción (3:1) v/v. La concentración de agarosa del gel varió (0.8% a 1%) en función del tamaño del ácido nucleico. Para la detección de éste se empleó bromuro de etidio a una concentración de 20 ng μL^{-1} , el cual se polimerizó junto con la agarosa. Como amortiguador de la disolución de la agarosa y de corrida de la electroforesis se empleó TAE 1X y como marcadores de peso

molecular se emplearon marcadores lineales de 1Kb (Fermentas). Los geles fueron analizados en un foto-documentador ChemiDoc XRS+System (BIO-RAD)

Purificación de fragmentos obtenidos mediante PCR y restricción. Los fragmentos obtenidos de las diferentes amplificaciones por PCR y productos de digestión enzimática fueron purificados mediante amortiguador TE y solución PEG al 30%, MgCl₂ 30mM. Al material genético de interés se le adicionaron tres volúmenes de PEG al 30% conteniendo MgCl₂ 30mM y dos volúmenes de TE. Posteriormente se centrifugó a una velocidad de 9485 x g durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en el volumen necesario de amortiguador TE o agua estéril. La calidad del material genético se observó en gel de agarosa al 0.8%.

Transformación de *S. cerevisiae*. Las cepas de *S. cerevisiae* se transformaron por el método del acetato de litio. Se creció un preinóculo de las cepas a transformar en 10 mL de medio YPD-uridina en un tubo Falcon de 50 mL a 28°C durante toda la noche con agitación constante de 200 rpm. Se inocularon 50 mL de medio YPD-uridina con 1 mL del preinóculo y se creció por 4 a 5 h con agitación constante de 200 rpm y a 28°C, hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.8. Las células se cosecharon por centrifugación y se realizaron dos lavados con 25 mL de agua desionizada estéril y uno más con 1 mL de acetato de litio 0.1 M y el paquete celular se resuspendió en 600 µL de acetato de litio 0.1 M, de los cuales se tomaron 200 µL y se centrifugaron a 1200 rpm en una microcentrífuga durante 1 min. El paquete celular se resuspendió en 240 µL de polietilenglicol 4000 al 50% p/v y se adicionaron 36 µL de acetato de litio 1 M y 10 µL de DNA de esperma de arenque (10 mg mL⁻¹), previamente desnaturalizado a 94°C por 10 min. La mezcla de transformación se colocó en hielo y se adicionaron 50-75 µL de la construcción apropiada. Posteriormente se incubó en baño de agua a 30°C durante 40 min e inmediatamente se transfirió a un baño de agua a 42°C durante 20 min. Las células se cosecharon por centrifugación a 9485 x g durante 1 min y se resuspendieron en 600 µL de agua desionizada estéril. Finalmente se sembraron

200 μL de la mezcla de transformación en cajas de Petri con medio mínimo SC sólido. Las cajas de incubaron de 3 a 5 días a 28°C.

Ensayo de unión al colorante azul Alciano. Se preparó un preinóculo para cada una de las cepas de *S. cerevisiae*, creciéndolas en 50 mL de medio SC suplementado con rafinosa y galactosa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL durante 16 horas a 28°C y 200 rpm. Posteriormente, se cosecharon las células por centrifugación a 9485 x *g* durante 5 min y se lavó la pastilla dos veces con 20 mL de agua desionizada. La pastilla se resuspendió finalmente en 1mL de agua desionizada. Se ajustaron las células a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.18 - 0.22$ en el tubo Falcon, se tomó 1mL de la suspensión celular y se centrifugó a 9485 x *g* durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de la solución de azul Alciano (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en HCl 0.02N). Se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 9485 x *g* durante 2 min y se leyó el sobrenadante a DO_{620} . Se realizó una curva de calibración del colorante azul Alciano utilizando concentraciones de entre 0 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared. Se estudió el efecto de sustancias que afectan específicamente el ensamblaje de la pared celular o la síntesis de sus componentes, las distintas cepas a estudiar se crecieron bajo las mismas condiciones utilizadas para el ensayo de unión al colorante azul Alciano, una vez obtenido el cultivo se colectó mediante centrifugación y las células se ajustaron a concentraciones de 1×10^2 a 1×10^7 células/mL, se colocó una gota de 5 μL de dichas suspensiones en placas que contenían 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rojo Congo; 26.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de blanco de calcoflúor y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B.

Transformación de *A. tumefaciens*. Células competentes. Se inocularon 5mL de LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con 40 μL de la cepa en stock con glicerol AGL-1 de *A. tumefaciens*. Se incubó toda la noche a 28°C con agitación (250 rpm). Posteriormente se inocularon 2mL de este cultivo a 50mL de medio LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se incubó a 28°C con agitación durante

aproximadamente 8 h hasta una DO_{600nm} de 0.6, y después se colocó el matraz en hielo durante 5 minutos. Se obtuvo la pastilla celular centrifugando a $1370 \times g$ a $4^{\circ}C$ durante 5 minutos y se resuspendió en 1 mL de $CaCl_2$ 20mM. Se hicieron alícuotas de 50 μ L y se guardaron a $-70^{\circ}C$. A una alícuota de células competentes se le adicionaron 10 μ L de ADN plasmídico, se mezcló y se congelaron los tubos en nitrógeno líquido, posteriormente se incubaron los tubos a $37^{\circ}C$ durante 5 minutos y se adicionaron 500 μ L de LB sin antibiótico. Se incubaron las células 3 h a $28^{\circ}C$ con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se sembraron en placas de LB suplementadas con ampicilina y el antibiótico de selección del plásmido, en este caso kanamicina. Las placas se incubaron 3 días para poder observar transformantes.

Transformación fúngica mediada por *A. tumefaciens*. Se inoculó la cepa 1099-18 ATCC MYA 4821 de *S. schenckii* en medio de cultivo YPD pH 4.5 para la obtención de conidios. Dos días antes de que las esporas estén listas se inocularon las cepas de *Agrobacterium* conteniendo el vector binario apropiado en medio LB con los antibióticos correspondientes, se incubaron a $28^{\circ}C$ y 200 rpm. Posteriormente se ajustó la DO a 0.2 (midiendo a 600nm) en medio de inducción líquido, las células se crecieron durante 4.5 h a $28^{\circ}C$ con agitación y los antibióticos apropiados. Se incluyeron los controles sin inducción (sin acetosiringona). Durante la inducción de las bacterias se colectaron las esporas de *S. schenckii* y se resuspendieron en medio de inducción, se realizó el conteo celular y se ajustó a una concentración de 1×10^6 células /mL.

Los discos de celofán se colocaron sobre las cajas de co-cultivo de tal forma que no se formaran burbujas, posteriormente se mezclaron 100 μ L de cultivo de *Agrobacterium* y 100 μ L de la suspensión de esporas sobre las membranas de celofán y se sembraron. Los co-cultivos experimentales contenían 200 μ M de acetosiringona, y se incubaron a $28^{\circ}C$ durante 3-4 días.

Posteriormente, las membranas de celofán se transfirieron a cajas de medio de cultivo de YPD pH 4.5 para el crecimiento de *S. schenckii*, conteniendo

higromicina B ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) como marcador de selección y $200 \mu\text{M}$ de cefotaxima para matar *Agrobacterium*. Los cultivos se inocularon de 3-5 días a 28°C .

Tratamiento de las transformantes. Las colonias se cortaron con un bisturí estéril y se colocaron en placas de YPD pH 4.5 adicionadas de higromicina B $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para después incubar éstas durante 3-4 días a una temperatura de 28°C .

Pases monoconidiales:

Una vez crecida la colonia se cosecharon conidios y se transfirieron a una placa fresca de YPD con higromicina B $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, se esparcieron con la ayuda de una varilla de vidrio. Las colonias aisladas se incubaron durante 4 días a una temperatura de 28°C y una vez crecidas se inocularon en matraces conteniendo 25 mL de medio YPD pH 7.8 ó pH 4.5 más higromicina B para la obtención de levaduras y micelio, respectivamente. Se incubaron durante 4-5 días a una temperatura de 37°C ó 28°C , el cultivo se centrifugó a $1370 \times g$ durante 5 min y se congeló a -80°C para extracción de DNA genómico o RNA.

Determinación de la composición de la pared. Las células fueron lavadas dos veces con agua desionizada y se realizó ruptura mecánica con la ayuda de un homogenizador celular (precelllys® 24) utilizando el programa 4 (con ciclos de 6500rpm y rompimiento de 30 seg). El homogenado se centrifugó, y posteriormente se llevó a cabo una hidrolisis ácida (Mora-Montes et al., 2007). Las paredes hidrolizadas fueron analizadas por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada a detección por amperometría de pulso HPAEC-PAD (columna PA 100), en un equipo Dionex DX-600.

Cuantificación de azúcares de pared de *S. schenckii*

Se preparó un cultivo de 25 mL de YPD pH 7.8 y se dejó en crecimiento con las condiciones óptimas para la obtención de levaduras durante 4 días. Se ajustó la concentración de células a 1×10^9 células/mL y fueron tratadas para:

β -eliminación de células. Para obtención de O-mananas, las células fueron resuspendidas en 20mL de 0.1 M NaOH e incubadas toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave, se centrifugaron a 3500 x g durante 5 min, y se lavaron dos veces con PBS, pH 7.4. El sobrenadante se ajustó a pH 7 con HCl 100 mM.

Tratamiento con endo H. Para la obtención N-mananas las células fueron resuspendidas en 24mL de agua desionizada estéril, 1mL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 25U de endoglicosidasa H (endoH, New England BioLabs®), la muestra se incubó toda la noche a 37° C con agitación suave, se centrifugó a 1370 x g durante 5 min, y se lavó dos veces con PBS 1X pH 7.4, el sobrenadante se ajustó a pH 7 con NaOH 100mM.

Las muestras β eliminadas y tratadas con EndoH se liofilizaron y resuspendieron en 1mL de agua mQ estéril. Se determinó la cantidad de azúcares con el método de Dubois: para el ensayo se tomaron 100 μ L de la muestra tratada a la cual se le adicionaron 300 μ L de fenol al 80% y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se agitaron e incubaron durante 10 min a temperatura ambiente protegidas de la luz, se leyó a 490 nm. Se realizó una curva de calibración donde se utilizaron diluciones dobles seriadas de un estándar de manosa (1 mg mL^{-1}). (Dubois *et al.*, 1956).

Ensayo de tinción con Fluorocromos. Las células fueron teñidas con isotiocianato de fluoresceína acoplada a aglutinina germen de trigo (WGA-FITC). Se obtuvo un cultivo de levaduras de 4 días de crecimiento. Una vez obtenido el cultivo las células se cosecharon por centrifugación a 1700 x g por 5 min y se lavó la pastilla dos veces con PBS. Posteriormente se ajustó una suspensión celular a

1×10^8 cel/mL en PBS. Esto se realizó por duplicado, ya que un tubo fue inactivado por calor. De igual manera a los tubos tratados por calor y sin tratamiento se les agregaron 100 μ L de WGA-FITC SIGMA® (1 mg mL⁻¹ en PBS) y se incubaron protegidos de la luz por 30 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Se centrifugaron a 9485 x g por 2 min, se retiraron los sobrenadantes y se lavaron las pastillas dos veces con PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 500 μ L de PBS (Mora-Montes et al., 2011). Las muestras se observaron con una preparación de 7 μ L de la suspensión en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscope-40 con el programa AxioVs 40 V 4.6.1.0 con una cámara AxioCam MRc. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 63x.

Cuantificación de la fluorescencia de células de *Sporothrix*. Las imágenes obtenidas después de la tinción con WGA-FITC fueron analizadas para conteo de pixeles verdes con la ayuda del programa Adobe Photoshop® CS6, se realizó el conteo de 100 células en cada condición (vivas e inactivadas por calor) por cepa. El porcentaje de fluorescencia se determinó con la siguiente formula: [(pixeles verdes totales – pixeles verdes de fondo) x 100]/pixeles totales.

Inactivación de células por calor.

Las células una vez ajustadas a la concentración requerida fueron inactivadas a 60°C durante 2 horas.

Aislamiento y purificación de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMCs). Se tomó una muestra de 40 mL de sangre de 6 donadores voluntarios, la cual se obtuvo por punción venosa en tubos que contenían EDTA. La sangre contenida en los tubos fue vertida en tubos Falcon (50 mL) estériles y libres de pirógenos hasta llegar a la marca de 20 mL. Los tubos con EDTA se lavaron con PBS estéril a temperatura ambiente para rescatar las células adheridas al tubo y se ajustó el volumen a 35 mL con PBS, posteriormente se le agregó 15 mL de HISTOPAQUE®-1077 SIGMA (ficoll) a temperatura ambiente de tal manera que el ficoll quedara en la parte inferior del tubo, enseguida se centrifugó a temperatura ambiente a 874 x g por 20 min sin freno. Se recuperaron

las células mononucleares con pipetas estériles y nuevas y se colocaron en tubos Falcon de 50 mL, se agregó PBS estéril frío hasta un volumen de 50 mL y se centrifugó a 4°C a 874 x g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante, se agitó suavemente, se agregó PBS estéril frío hasta un volumen de 30 mL y se centrifugó a 4°C a 874 x g por 10 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla con 5 mL de RPMI DM. Se tomaron 20 µL de la suspensión y de ésta última se tomaron 5 µL y se tiñó con 95 µL del colorante azul de metileno al 0.1%, se tomaron 10 µL de muestra y se cuantificó con el hematocitómetro.

Diferenciación de macrófagos a partir de PBMC. Una vez que se realizó el aislamiento de las células mononucleadas, se ajustaron a una concentración de 5×10^6 cel/mL en RPMI DM y se colocaron en una placa de 24 pozos de fondo plano en incubación durante 2 horas a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS (estos lavados se realizaron con PBS a 37°C para evitar despegar las células de la placa) y se adicionó 1 mL de medio X-VIVO suplementado con 10 ng mL⁻¹ del factor de diferenciación de colonias granulocíticas-macrófagos (GM-CSF, Sigma®) por pozo, las placas fueron incubadas durante 8 días a 37°C, con 5% CO₂, haciendo un recambio de medio cada 3 días (Netea et al., 2009).

Interacción de PBMCs con células de *S. schenckii*. La concentración de las células fue ajustada a 5×10^6 cel/mL. Los PBMCs fueron preincubados con conidios, levaduras y germínulas de *Sporothrix* a 2×10^6 cel/mL o con RPMI DM (como control). Después de 24 horas de incubación a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad, los sobrenadantes fueron recuperados y guardados a -20°C para posteriormente ser analizados en ensayos de ELISA.

Interacción de macrófagos con células de *S. schenckii*. Una vez obtenidos los macrófagos derivados de PBMCs, estos fueron preincubados con levaduras de *S. schenckii* a una concentración de 1×10^7 cel/mL, las condiciones de incubación fueron dos horas a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los sobrenadantes

fueron recuperados y guardados a -20°C para posteriormente ser analizados en ensayos de ELISA.

Ensayos de ELISA. Los ensayos de ELISA se realizaron con los sobrenadantes obtenidos de la interacción de monocitos con células de *S. schenckii* para la cuantificación de las citocinas IL-10, IL-6 y TNF- α , se realizó con el Kit PEPROTECH. Para IL-1 β se realizaron con el Kit R&D. Para los ensayos con los sobrenadantes obtenidos de la interacción de macrófagos con células de *S. schenckii* se cuantificaron las citocinas IL-10, IL-6 y TNF α con el Kit PEPROTECH.

Ensayos de virulencia. Los ensayos de virulencia en larvas del gusano de cera se realizaron como se describió en Mylonakis et al., 2005. Brevemente, se inyectaron directamente en el hemocele de la larva 10 μL de PBS conteniendo 1×10^5 levaduras con ayuda de una jeringa Hamilton con aguja de 26 gauges. La inyección se realizó en el propodio posterior izquierdo de las larvas. El tratamiento fue igual para cada grupo de 10 larvas, mismas que se incubaron a 37°C después de la infección. La sobrevivencia de las mismas fue monitoreada cada día durante 15 días. Como control se incluyó un grupo que sólo fue inyectado con PBS. Los datos de sobrevivencia fueron graficados y analizados con el programa GraphPad Prism6.

Determinación de las unidades formadoras de colonia (UFCs). Para evaluar que el efecto observado en los ensayos de virulencia corresponde a la dosis del patógeno fueron determinadas las UFCs. Las larvas muertas y vivas (en el caso de las cepas que mostraron baja virulencia) fueron disgregadas en PBS estéril, y una dilución 1:100 del sobrenadante obtenido se sembró en placas de YPD pH 4.5 con ampicilina. Las placas fueron incubadas a 28°C y 3 días después se realizó el conteo de colonias.

Análisis estadísticos

Los análisis de niveles de expresión y número de copias fueron obtenidos utilizando el paquete informático StepOne software v 2.3. Para análisis comparativos, también se analizaron en Excel para obtener la variación estándar y *t* de student. Para el análisis de estimulación de citocinas por células mononucleares y macrófagos se realizó por duplicado con seis donadores sanos, se realizó la prueba de Mann-Whitney *U* para establecer la significancia de los datos, $p < 0.05$. Los ensayos de virulencia fueron analizados con el paquete informático del software GraphPad Prism6. Los ensayos de azul Alciano, cuantificación de azúcares de pared y unidades formadoras de colonia se analizaron para obtener la *t* de student para establecer la significancia de los datos, $p < 0.05$.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización funcional del gen *OCH1*

Aislamiento del marco de lectura abierto (ORF) del gen *OCH1* de *S. schenckii*.

Como ya se mencionó anteriormente en el genoma de *S. schenckii* se encontró la secuencia del gen que codifica para la enzima α 1,6-manosiltransferasa (*OCH1*) SS09317, incluyendo también las secuencias de otros miembros de la familia *OCH*: *OCH2*, *OCH3* y *OCH4* (ver tabla 3).

Tabla 3. Comparación de la secuencia nucleotídica de la α 1,6-manosiltransferasa (*Och1*) de *S. schenckii* con los demás miembros de la familia *OCH*.

Función de la proteína	<i>S. schenckii</i>	% identidad
α 1,6- manosiltransferasa	<i>OCH1</i>	100%
α 1,6- manosiltransferasa	<i>OCH2</i>	50.2 %
α 1,6- manosiltransferasa	<i>OCH3</i>	44.1 %
α 1,6- manosiltransferasa	<i>OCH4</i>	51.6 %

Cuando se realizó el análisis aminoacídico de las secuencias de la familia *OCH* de *S. schenckii*, se observó que muestran un dominio catalítico conservado para glicosiltransferasas, conteniendo un motivo DXD. Este motivo ha sido descrito de gran importancia para la adición de carbohidratos en las glicosiltransferasas.

Además, se realizó un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica que codifica para el gen *OCH1* (SS09317), que se muestra en la figura 3, y al igual que otras glicosiltransferasas presenta un único paso transmembranal del tipo II en el extremo amino terminal y un dominio citoplasmático, muestra un tamaño de 398 aa y un peso estimado de 44kDa.

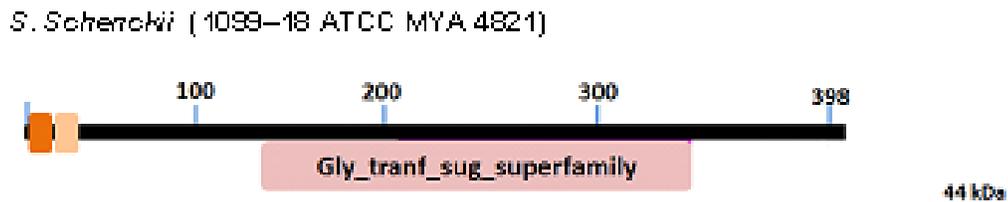


Figura 3. Distribución de los dominios estructurales predichos para la posible α 1,6-manosiltransferasa de *S. schenckii*. La secuencia aminoacídica del gen que codifica para *OCH1* muestra un dominio catalítico conservado para glicosiltransferasas, conteniendo un motivo DXD , un dominio citoplásmico y un único paso transmembranal del tipo II en el extremo amino terminal .

También se llevó a cabo un análisis BLAST con secuencias de otros hongos donde se han descrito con mayor detalle la α 1,6-manosiltransferasa (*Och1*), mostrando que tienen un alto porcentaje de identidad con estas secuencias. Siendo las de *N. crassa* y *A. nidulans* (tabla 4) las que muestran un mayor porcentaje de similitud, con el 70% y 55%, respectivamente.

Tabla 4. Comparación de la secuencia aminoacídica de la α 1,6-manosiltransferasa (*Och1*) de *S. schenckii* con α 1,6-manosiltransferasa (*Och1*) de otros hongos.

Organismo	Identidad
<i>Neurospora Crassa</i>	70%
<i>Aspergillus nidulans</i>	55%
<i>Candida albicans</i>	42%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37%

Se observó que la secuencia reportada en la base de datos del genoma de *S. schenckii* del DNA genómico predice un tamaño para el gen *OCH1* de 1278 pb, mientras que la secuencia proveniente de cDNA predice un tamaño de 1192 pb,

sugiriendo que el gen contiene un intrón, por lo que el aislamiento del ORF se realizó a partir de cDNA.

Para esto se llevó a cabo la extracción de RNA total a partir de micelio *S. schenckii* (Fig. 4).

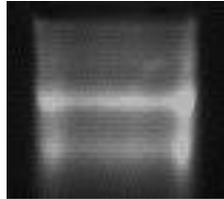


Figura 4. Electroforesis de RNA total obtenido a partir de micelio de *S. schenckii*

Este RNA se utilizó para la síntesis de cDNA con oligonucleótido reverso específico (GCTAGCTTACTCCTGCTGCTCGCC) para lograr la amplificación del gen *OCH1*. Como control positivo de amplificación se utilizó DNA genómico de *S. schenckii* y para comprobar que los oligonucleótidos no estuvieran generando dímeros se utilizaron por separado en la reacción de amplificación (controles d y r). En la figura 5 podemos observar la diferencia en las amplificaciones para el gen *OCH1* con cDNA y DNA genómico, con lo que se comprueba que efectivamente la secuencia posee un intrón de 87 pb.

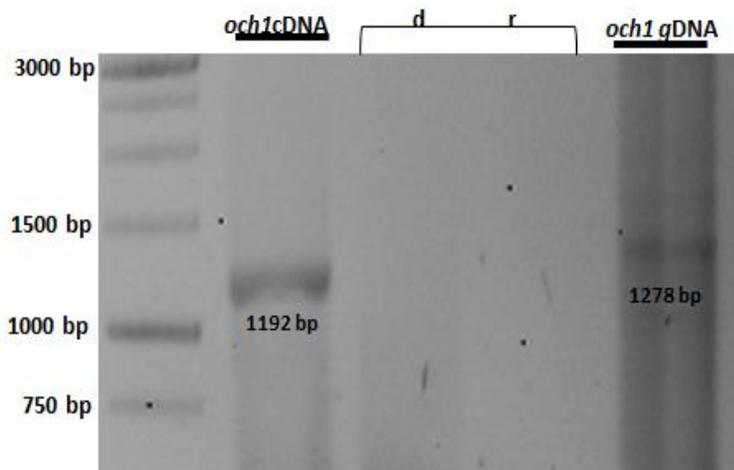


Figura 5. Productos de amplificación del ORF del gen *OCH1* de *S. schenckii*. Se puede observar un producto de amplificación de 1192 pb a partir de cDNA y 1278 pb a partir de DNAg.

Una vez que se demostró la amplificación del ORF de *OCH1*, este fragmento se aisló a partir de cDNA, y se purificó (figura 6). El fragmento fue clonado en el vector de mantenimiento TOPO 2.1 para su posterior secuenciación.

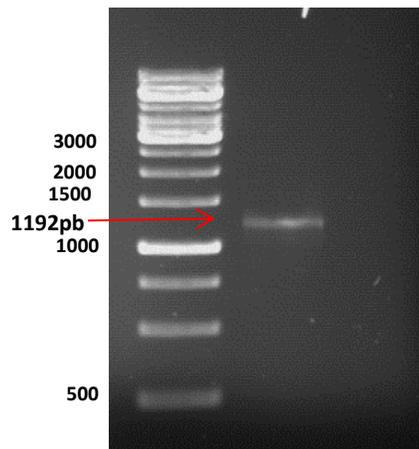


Figura 6. Producto de amplificación del ORF de *OCH1* de *S. schenckii* a partir de cDNA. Se puede observar un fragmento de 1192 pb, el cual fue utilizado posteriormente para la complementación funcional de la cepa *Scoch1Δ*.

La secuencia obtenida se alineó con la secuencia reportada en el genoma de *S. schenckii*, resultando con un 100% de identidad.

Complementación de la mutante nula *OCH1* de *S. cerevisiae* con el gen *SsOCH1*. El siguiente paso, una vez que se obtuvo el ORF del gen *SsOCH1*, fue la expresión de éste para demostrar su funcionalidad. Para lograr este propósito se expresó el producto del gen *SsOCH1* en una mutante de *S. cerevisiae* (*Scoch1Δ*). El gen *SsOCH1* fue clonado en el vector de expresión para *S. cerevisiae* pYES2 (fig. 7).

Con esta construcción se transformaron células de la cepa mutante *Scoch1Δ*, por el método de acetato de litio como se describió en materiales y métodos. Una vez que se obtuvieron células transformantes, se les extrajo DNA genómico y se comprobó la presencia del gen *SsOCH1* mediante PCR.

Como controles se utilizaron DNA genómico de *S. schenckii* (control positivo) y DNA genómico de la cepa *Scoch1Δ* (control negativo, figura 8)

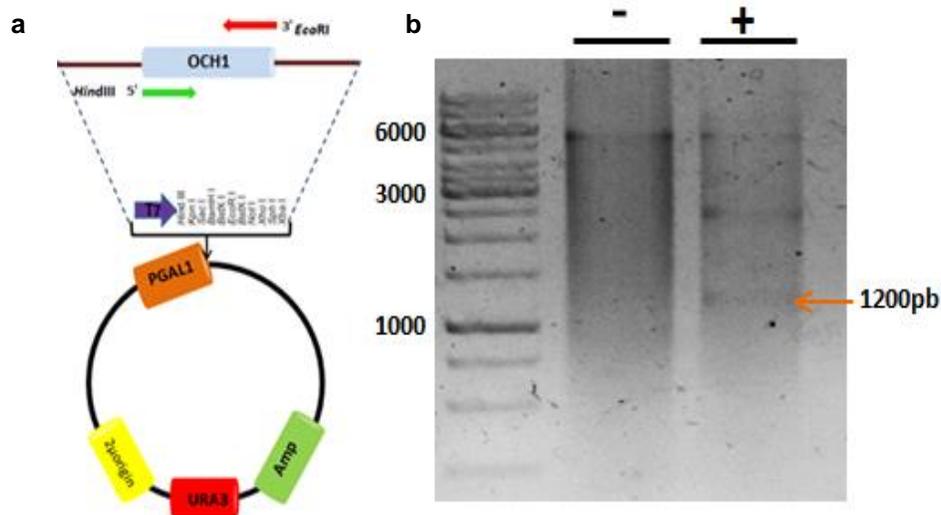


Figura 7. Comprobación de la construcción pYES2-SsOCH1. **a** Construcción para la expresión del gen *SsOCH1* en *S. cerevisiae*. **b** Comprobación de la construcción pYES2-SsOCH1 por restricción enzimática con *EcoRI* y *HindIII*, se observa un fragmento de 1200 pb aprox.

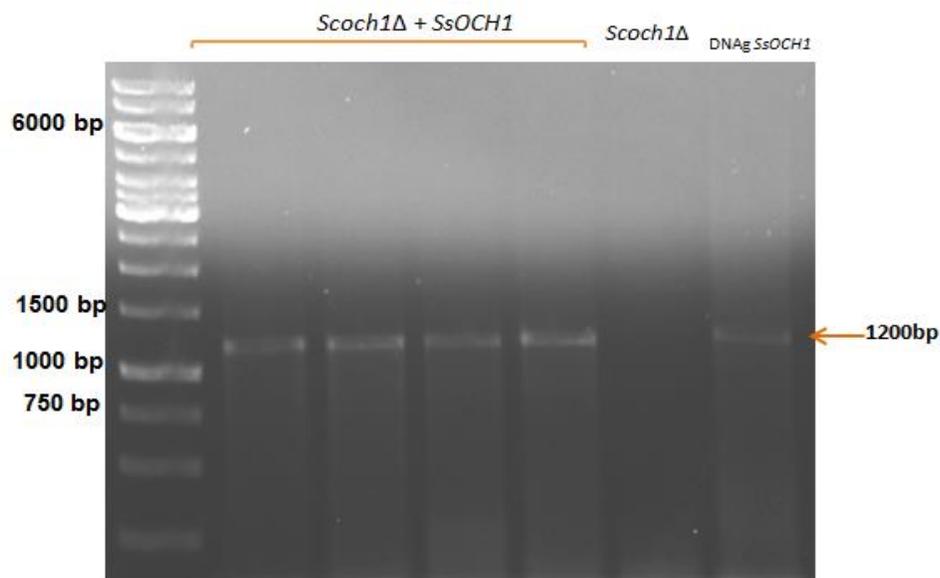


Figura 8. Productos de amplificación del ORF *SsOCH1* con DNA genómico de las transformantes *Scoch1Δ*+ *SsOCH1*.

Efecto de la expresión del gen *SsOCH1* sobre la fosfomanosilación de la cepa *Scoch1Δ*. Como una manera de determinar si *SsOCH1* participa en la ruta de *N*-glicosilación y fosfomanosilación de proteínas, se decidió analizar el nivel de fosfomananas en la pared celular como un parámetro indirecto de estas rutas de glicosilación. Para cumplir este propósito se probó la capacidad de las células de unir el colorante azul Alciano, el cual se une al grupo fosfato de las fosfomananas (Hobson *et al.*, 2004).

La cepa silvestre BY4741 unió 129.87 ± 2.87 unidades (μg de colorante unido por las células a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$), la cepa *Scoch1Δ* mostró una unión al colorante del 72.14 ± 8.36 , la cepa que tiene reintegrado el gen nativo *OCH1* de *S. cerevisiae* mostró 120.11 ± 7.27 , y la cepa mutante nula a la que se le reintegró el gen *SsOCH1* muestra 128.94 ± 5.64 unidades de colorante, reestableciendo completamente la habilidad de unir el colorante al nivel de la cepa silvestre (fig. 9).

Estos resultados indicaron que *SsOCH1* reestablece el fenotipo de esta mutante nula a los niveles del tipo silvestre en cuanto a niveles de fosfomanosilación se refiere.

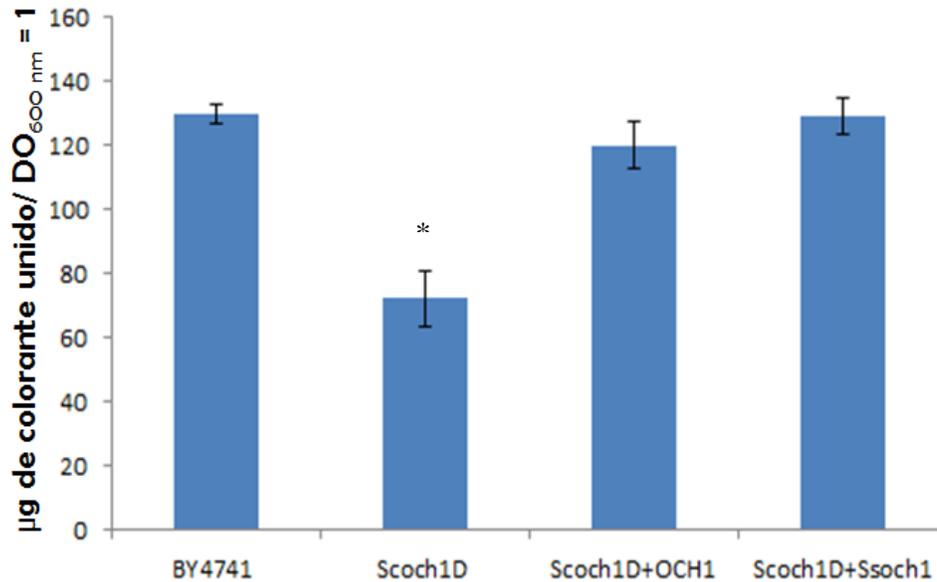


Figura 9. Fosfomanosilación de la pared celular en cepas de *S. cerevisiae*. BY4741 cepa silvestre; *Scoch1D*, cepa mutante nula *och1Δ*; *Scoch1D+OCH1*, cepa reintegrante con el gen nativo; *Scoch1D+SsOCH1* cepa complementante con el gen *SsOCH1*. Cepas crecidas en SC suplementado con rafinosa y galactosa. Los datos representan los promedios ± D.S. de tres experimentos independientes realizados triplicado. * $p < 0.05$.

Efecto de la expresión del gen *SsOCH1* sobre la estructura de la pared de la cepa *Scoch1Δ*. Como se mencionó anteriormente, la pérdida del gen *OCH1* afecta la sensibilidad a agentes perturbadores de la pared celular, como es el caso de la cepa deficiente en *N*-manosilación de *C. albicans* (Bates et al., 2006).

Para determinar el efecto de la expresión del gen *SsOCH1*, se probaron diferentes agentes estresantes de la pared celular, como el Blanco de Calcoflúor, que afecta el ensamblaje de la quitina (Murgui *et al.*, 1985); el rojo Congo que interfiere con la correcta estructuración de las glucanas (Kopecka y Gabriel, 1992); e higromicina B, un inhibidor de la síntesis de proteínas que ha mostrado un efecto negativo en otras mutantes deficientes en *N*-glicosilación (Bates et al., 2006).

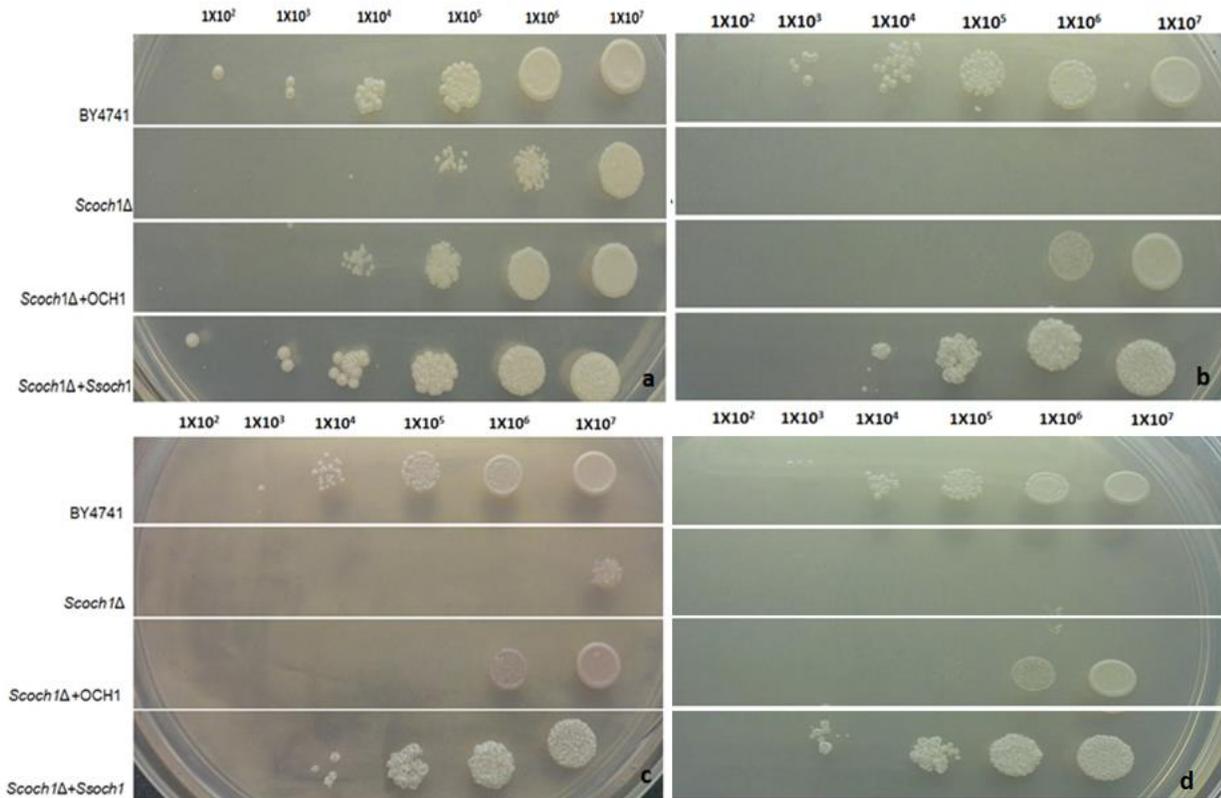


Figura 10. Ensayos de sensibilidad a perturbadores de pared. BY4741, cepa silvestre de *S. cerevisiae*, *Scoch1Δ* mutante en *OCH1* de *S. cerevisiae*, *Scoch1Δ* +*OCH1* reintegrante de *S. cerevisiae* y *Scoch1Δ* +*Ssoch1* complementante de *S. cerevisiae* con el gen *OCH1* de *S. schenckii*. Las cepas fueron crecidas en medio SC suplementado con 3% de rafinosa y 2% de galactosa **a**. SC suplementado con 3% de rafinosa y 2% de galactosa + 26.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de blanco de clacoflúor **b**. SC suplementado con 3% de rafinosa y 2% de galactosa + 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rojo Congo **c**. SC suplementado con 3% de rafinosa y 2% de galactosa + 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B **d**.

Los resultados obtenidos muestran que la ausencia del gen *OCH1* hace más susceptible a la célula al efecto del blanco de Calcoflúor (Fig. 10 b), rojo Congo (Fig. 10 c), e higromicina B (Fig. 10 d), esto se puede observar en la cepa mutante nula *Scoch1Δ*. La resistencia a estos perturbadores de pared se puede observar cuando el gen *OCH1* es reintegrado (en el caso de la cepa *Scoch1Δ* + *OCH1*), incluso cuando la cepa se complementa con el gen *SsOCH1* se observa que se restaura por completo el fenotipo a los niveles de la cepa parental BY4741 (fig. 11).

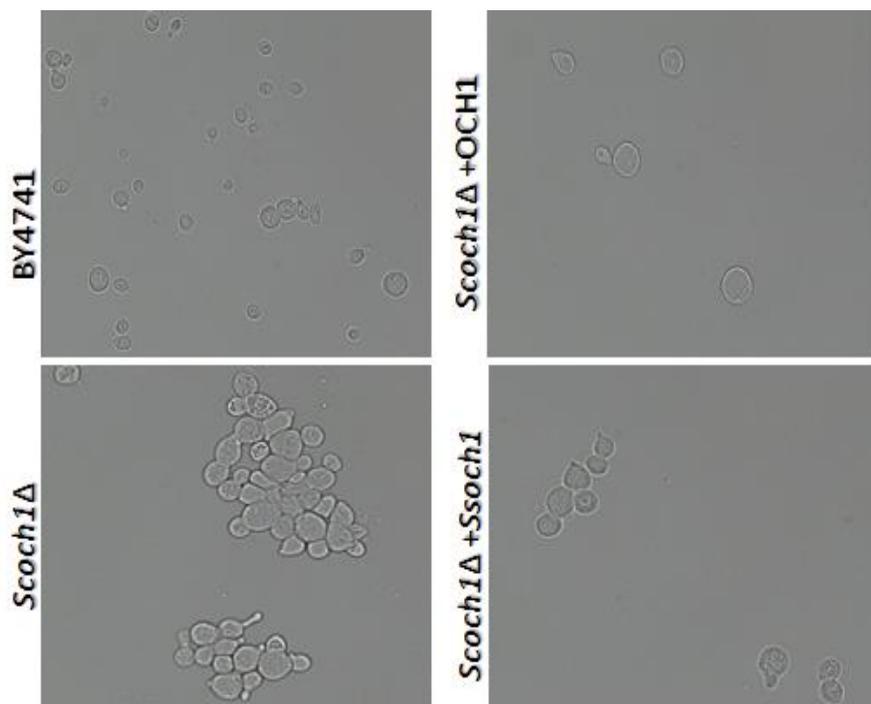


Figura 11. Morfología de la complementante *Scoch1Δ* +*SsOCH1*. BY4741 cepa silvestre de *S. cerevisiae*, *Scoch1Δ* mutante en *OCH1* de *S. cerevisiae*, *Scoch1Δ* +*OCH1* reintegrante de *S. cerevisiae* y *Scoch1Δ* +*Sscoch1* complementante de *S. cerevisiae* con el gen *OCH1* de *S. schenckii*. Microscopía campo claro 63X.

Los resultados obtenidos de los ensayos para la determinación de niveles de fosfomanosilación, y sensibilidad a perturbadores de pared celular indican que el gen *OCH1* aislado de *S. schenckii* es capaz de restaurar el fenotipo de la cepa mutante *Scoch1Δ* de *S. cerevisiae*, sugiriendo fuertemente que este podría ser el ortólogo funcional del gen *OCH1* en *S. schenckii*.

Silenciamiento del gen *OCH1* de *S. schenckii*

Una vez que se observó que el gen *SsOCH1* es capaz de complementar la función del gen *ScOCH1* en una cepa de *S. cerevisiae*, se planteó silenciar el gen en *S. schenckii*, esto con la finalidad de observar la participación de este gen en aspectos tan importantes del hongo, como lo son la biosíntesis de la pared y la virulencia.

A pesar de que se han reportado algunos métodos de transformación, como la mutagénesis insercional (*Zhang et al., 2011,*) y silenciamiento del gen que codifica para la cinasa 1 dependiente de calcio/calmodulina mediante RNAi (*Rodríguez-Caban et al., 2011*), estos métodos no fueron reproducibles para nuestro proyecto. Para cumplir con este objetivo lo primero que se realizó fue la estandarización de un protocolo de transformación para el hongo.

El método que se logró estandarizar fue la transformación mediada por *A. tumefaciens* (materiales y métodos). Para esto se utilizó un vector modificado de pCAMBIA (*pBGgHg*), el cual contiene un marcador de selección para higromicina B y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP*).

Las cepas que se obtuvieron se analizaron por PCR y se comprobó la integración del marcador de selección, y por microscopía de fluorescencia se pudo observar la expresión de la proteína eGFP (fig.12).

Se observó que las transformantes son estables después de varias rondas de crecimiento en medio de cultivo sin el marcador de selección. Y mediante qRT-PCR se demostró que puede haber más de un evento de inserción en el genoma.

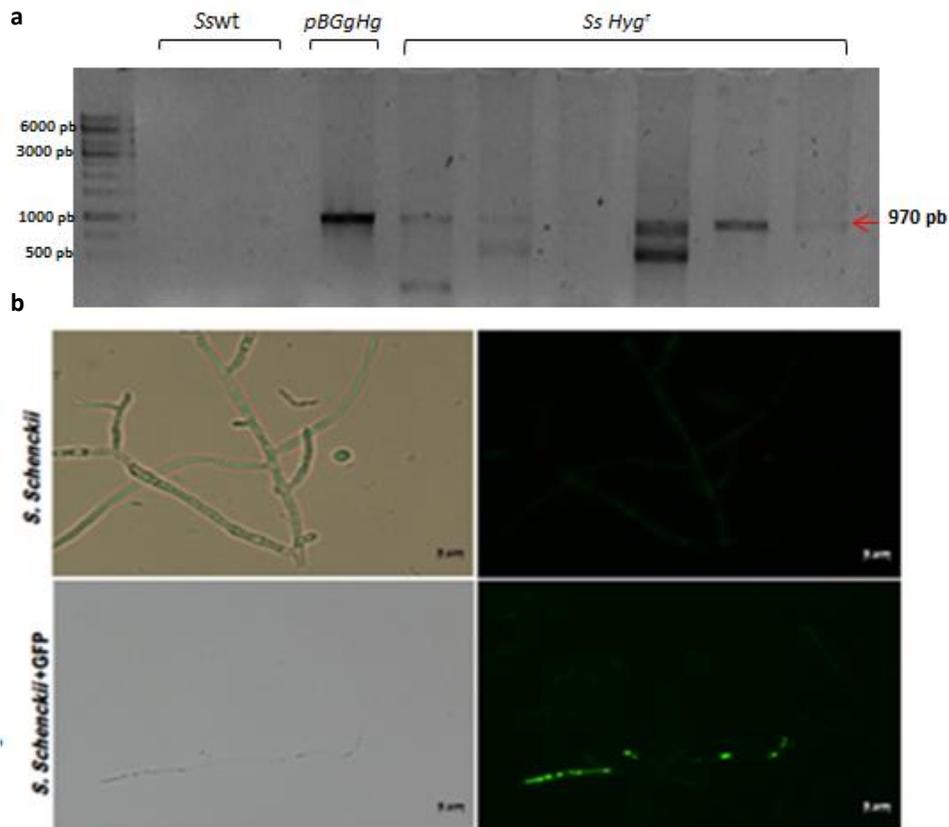


Figura 12. Transformación de *S. schenckii*. a. Amplificación de un fragmento del casete de resistencia a higromicina *Hyg^r* de las transformantes de *S. schenckii*, se espera un tamaño de amplificación de 970 pb aprox. *Sswt*; *S. schenckii* sin transformar, *pBGgHg*; control positivo, *Ss Hyg^r*; transformante resistentes a higromicina. b. Microscopía de fluorescencia de *S. schenckii* sin transformar y de una transformante *Hyg^r* que expresa la *GFP*.

Construcción del plásmido 2N-pC para el silenciamiento de gen *SsOCH1*.

Una vez que se probó que el protocolo de transformación funcionaba, se realizó la construcción de un vector modificado de pCAMBIA, con el fin de lograr el silenciamiento del gen *OCH1*. Como primer paso se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos de 425 pb correspondientes al gen *SsOCH1*, los cuales se insertaran en el sitio múltiple de clonación del plásmido pSilent1 en sentido con las enzimas de restricción *XhoI*/*HindIII* (sentD CTCGAGTTACATCACCACCCG CTCACATA; sentR CTCGAGTTACATCACCACCCGCTCACATA) y en antisentido

con las enzimas BglIII/StuI (antiD AGATCTTCGGTAATGACCTCGTGGATGA ; antiR AGGCCTTTACATCACACCCGCTCACATA). Dichos fragmentos quedaron flanqueando la secuencia intrónica del vector de silenciamiento. Posteriormente, mediante amplificación por PCR se obtuvo un fragmento de 3084 pb (2N) el cual contempla la secuencia en pSilent1 que está conformada por el promotor de triptófano de *A. nidulans* PC, seguido de una secuencia en sentido correspondiente al gen *OCH1* de *S. schenckii*, una secuencia intrónica, una secuencia en antisentido correspondiente al gen *OCH1* de *S. schenckii* y por último el terminador de triptófano de *A. nidulans* TC (Fig. 13).

Una vez que se obtuvo el fragmento 2N, se purificó y clonó en el vector de mantenimiento TOPO 2.1® para su posterior secuenciación. Esta secuencia posteriormente fue subclonada en el vector pBGgHg previamente linealizado con las enzimas SacI/PstI, la construcción que se obtuvo se denominó como 2N-pC (fig.13 b).

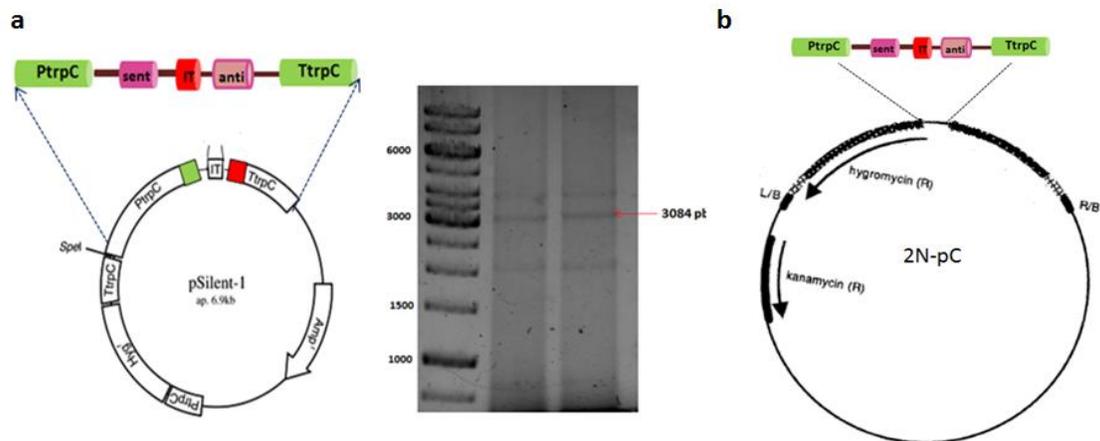


Figura 13. Construcción del plásmido 2N-pC. a. construcción del vector pSilent1 con la construcción sentido-antisentido. Se muestra el producto de amplificación del fragmento 2N (PC-TC). b. Organización del vector binario 2N-pC. Tiene un tamaño de 9866 pb y consiste en un esqueleto de pBGgHg y un casete de resistencia a higromicina B.

El vector binario que se construyó está conformado por un esqueleto del vector pCAMBIA0380, la secuencia que se localiza en el MCS entre el sitio de corte para PstI y SacI fue removida y se insertó en este lugar una secuencia previa obtenida

del vector pSilent1. La construcción para el silenciamiento fue comprobada por PCR y digestión enzimática (fig. 14).

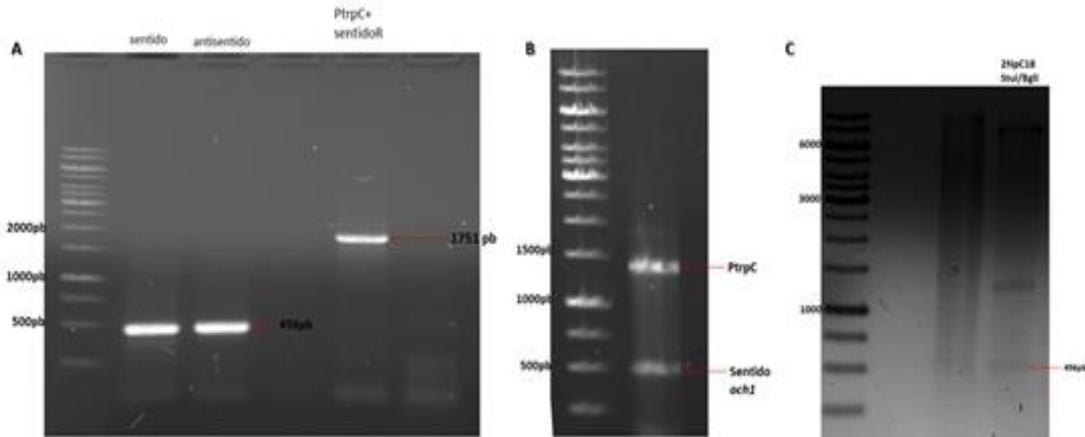


Figura 14. Patrón electroforético de la amplificación para comprobar la construcción 2NpC. Productos de amplificación mediante PCR de los fragmentos sentido, antisentido y PtrpC+ sentido (A). Electroforesis de restricción enzimática del fragmento PtrpC+ sentido con *XhoI*. Electroforesis de restricción enzimática del fragmento antisentido con las enzimas *BglIII/StuI* (C).

Transformación de la cepa *AGL1*

El fondo genético de las cepas de *A. tumefaciens* utilizadas para transformar juega un papel importante en la eficiencia del sistema de transformación. Esto se debe principalmente a la variación que presentan las cepas en cuanto a la función de los genes *vir*, el reconocimiento y unión de la cepa *A. tumefaciens* a la superficie de la cepa a transformar (Koukolikova, Z., et al., 1993). La cepa para este método de transformación que se eligió fue *AGL1*, ya que su fondo genético (C58) le confiere un rápido crecimiento y es altamente infecciosa, además que se ha demostrado la obtención de un mayor número de transformantes (Wirawan, I., et al., 1993; Lazo, G. et al., 1991; Zhang, Y., et al., 2011)

Se realizó la transformación de *A. tumefaciens* (materiales y métodos) para formar la cepa *Agl2NpC*, la cual se utilizó para transformar *S. schenckii*. En la figura 15 se pueden observar los productos de amplificación mediante PCR de la construcción 2NpC en la cepa *AGL1*. Se realizó la amplificación del fragmento correspondiente

a la construcción 2N, que va del promotor *P_{trpC}* al fragmento en sentido de *OCH1* y se espera un producto de amplificación de 1750 pb (figura 15 a). Se realizó una restricción enzimática de dicho fragmento con *XhoI* y se observan los dos fragmentos esperados que corresponden al promotor *P_{trpC}* y al fragmento en sentido de *OCH1* (figura 15b).

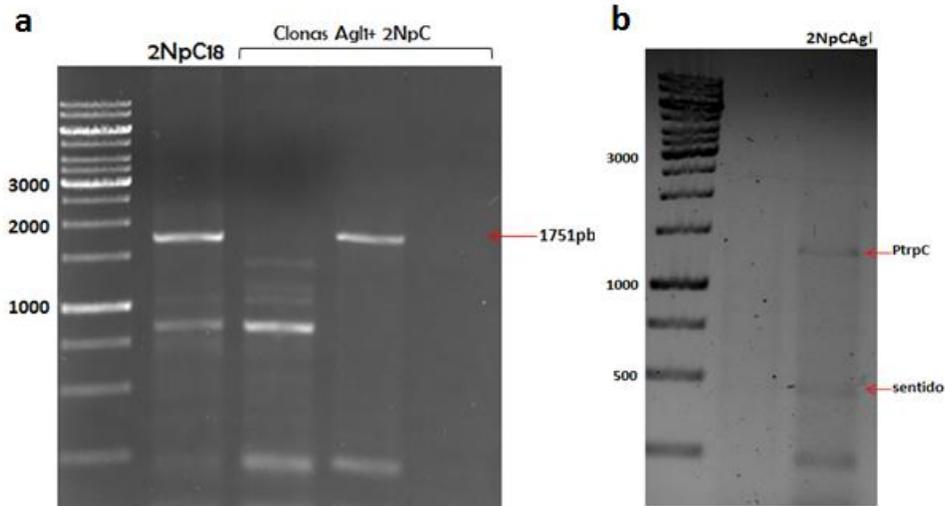


Figura 15. Patrón electroforético de los productos de amplificación de la cepa 2NpCAgl. a. Productos de amplificación para el fragmento *P_{trpC}*+sentido de las transformantes en *Agl1*. b. Productos de la restricción enzimática del fragmento *P_{trpC}*+sentido con *XhoI* de cepa 2NpCAgl.

Transformación de *S. schenckii*

En diferentes reportes se ha descrito que se puede insertar el T-DNA en protoplastos, pero también en células intactas. Al mismo tiempo se han ensayado diferentes temperaturas, cepas de *Agrobacterium* y tiempos de inducción.

En este protocolo para *S. schenckii* se probaron con diferentes concentraciones de los conidios (desde 1×10^4 hasta 1×10^8), resultando 1×10^6 cel/mL la concentración de células ideal para llevar a cabo la transformación. Ya que a esta concentración se puede llevar a cabo una selección de las colonias que van creciendo en el medio de co-cultivo (fig. 16).

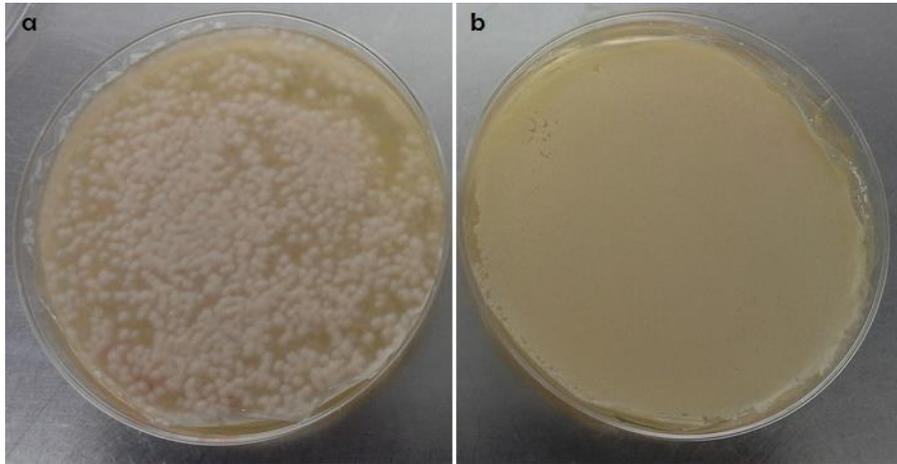


Figura 16. Colonias obtenidas en medio YPD + 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *Hyg* + 200 μM de cefotaxima. a. Cocultivo *2NpCAGI* +Ss conidias con acetosiringona (AS); b. Control negativo (*Ag+* Ss conidias)

Se probaron diferentes tiempos de inducción para la cepa de *Agrobacterium*: 4.5 y 8 horas (datos no mostrados), pero se observó que este factor no afectaba en la obtención de transformantes, el tiempo de inducción establecido fue de 4.5 horas. Una vez que se transformó el hongo, se obtuvieron varias transformantes de las cuales se comenzaron a seleccionar las que presentaron un mejor crecimiento en medio de selección suplementado con higromicina B (fig.17), primero en medio sólido y posteriormente en medio líquido.

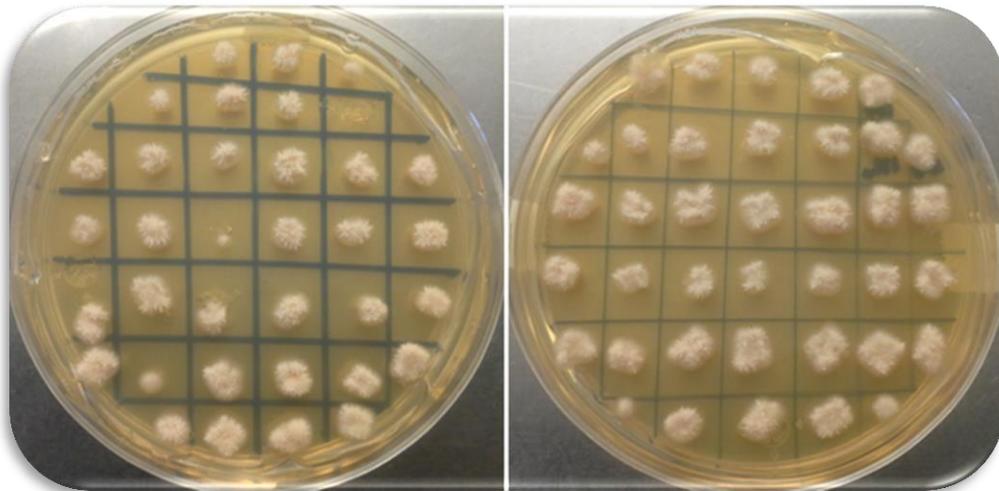


Figura 17. Colonias de *S. schenckii* seleccionadas del medio de co-cultivo. Medio de selección YPD pH 4.5, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de higromicina B.

Se realizaron de 2 a 3 pases monoconidiales y posteriormente se extrajo DNA genómico de tres cepas que fueron seleccionadas, se realizó PCR para amplificar el gen *OCH1* y L6 para comprobar que las colonias obtenidas eran efectivamente *S. schenckii* (fig.18). Los oligonucleótidos utilizados fueron OCH1Dq (CAGATTGTCACGCACATCAC) y OCH1Rq (CGTCGTTGAAGTAGCCAAAG), y se esperaba un tamaño de amplicón de 139pb.

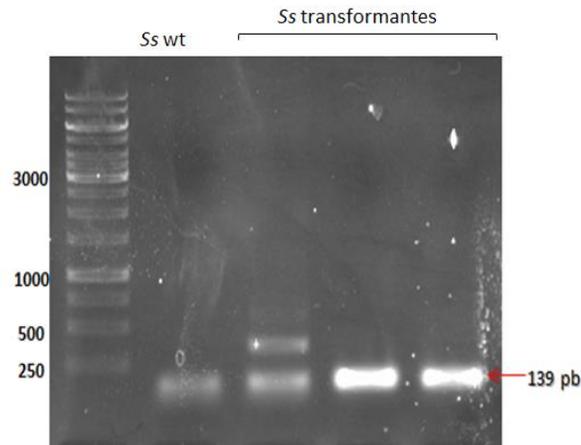


Figura 18. Patrón electroforético de productos de amplificación para un fragmento del gen *SsCOCH1*. *Ss wt*, cepa sin transformar y *Ss transformantes*; cepas de *S. schenckii* transformadas con la cepa *2NpCAgl*. Se puede observar un fragmento de 139 pb correspondiente al fragmento del cual se realizará el análisis de expresión del gen *SsOCH1*.

Tres cepas fueron seleccionadas, *Ssoch1-1*, *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* para posteriores análisis. De ellas, dos cepas mostraron una banda única de amplificación para un fragmento del gen *SsOCH1* (*Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*), mientras que *Ssoch1-1* muestra al menos tres bandas de amplificación para *SsOCH1*, sin embargo, muestra la banda del tamaño correspondiente al fragmento del gen *SsOCH1* por lo cual se siguieron analizando (fig. 18).

Con la finalidad de sintetizar cDNA para los experimentos de análisis de expresión se extrajo RNA de las cepas seleccionadas, en la figura 19 se puede observar que el RNA se encuentra íntegro.

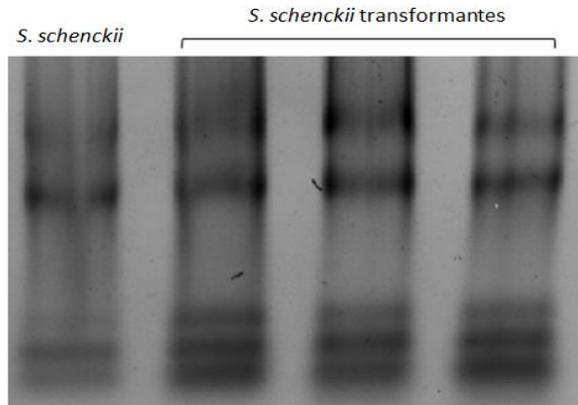


Figura 19. Patrón electroforético del RNA total extraído de *S. schenckii*. *S. schenckii*; *S. schenckii* sin transformar y *S. schenckii* + 2N-pC; cepas transformadas. Cultivos de 4 días de crecimiento en medio líquido YPD pH 4.5, 28°C.

Síntesis y purificación de cDNA

Se decidió realizar la síntesis de cDNA con el oligonucleótido dT₂₀ (materiales y métodos), ya que para los ensayos de expresión nos permitirá utilizar el mismo cDNA para el gen de interés (SsOCH1) y para el gen de control endógeno (L6). Una vez sintetizado el cDNA se purificó por columna (Trujillo, E., et al., 2016) con el fin de eliminar DNA genómico que se haya extraído durante la extracción de RNA, contaminantes como dNTP's residuales y RNA después de la retrotranscripción, ya que estos componentes pueden alterar la cuantificación final del cDNA.

Para comprobar la limpieza del cDNA sintetizado se realizó una amplificación utilizando los oligonucleótidos para el gen FEA1 (factor de elongación α), estos oligonucleótidos fueron diseñados con la finalidad de discernir entre amplificación con DNA genómico y cDNA (Trujillo, E., et al., 2016), ya que contiene un intrón de 588 pb y obtendremos amplificaciones de 824 pb y 226 pb para DNA genómico y cDNA, respectivamente.

En la figura 20 se muestra la amplificación con los cDNA purificados de las muestras Sswt, Ssoch1-1, Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2, obteniéndose una sola banda

de amplificación de 226 pb en todas las muestras, lo que nos indica que el cDNA no está contaminado con DNA genómico. Posteriormente se cuantificó y se obtuvo una buena concentración, de $700 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ a $1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$, y coeficientes 260/280; 260/230 cercanos a 2, indicando que el cDNA es de buena calidad para realizar qRT-PCR.

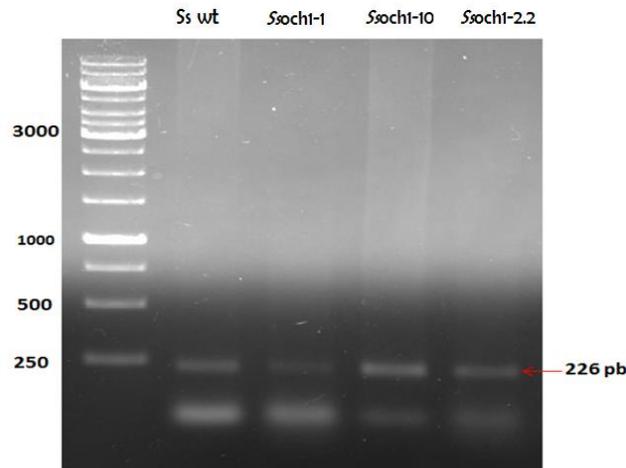


Figura 20. Electroforesis de los productos de amplificación FEA-1. Se pueden observar fragmentos de amplificación por PCR de 226 pb, obtenidos con los oligonucleótidos para amplificar FEA-1 a partir del cDNA purificado por columna.

Análisis por PCR en tiempo real de la expresión de *SsOCH1*

Para el análisis de la expresión del gen *SsOCH1*, lo primero fue realizar la curva estándar para determinar la eficiencia de los iniciadores (fig.21). La amplificación de los iniciadores es de 114% y la cantidad de cDNA que se utilizó en los ensayos posteriores fue de 1000 ng, ya que esta concentración fue óptima para la amplificación del gen L6 que se utilizó como control endógeno (Trujillo, E., et al., 2017).

También se obtuvo la curva de disociación para el gen *SsCOH1*, para determinar que los iniciadores tienen un solo producto de amplificación en PCR en tiempo real.

Usando el gen *L6* como control de expresión endógeno en la PCR en tiempo real, y como calibrador la expresión del gen *SsOCH1* de la cepa silvestre, se determinaron los patrones de expresión de las muestras a analizar, se graficó el nivel de expresión del gen *SsOCH1*, que es la variación del gen de interés en la muestra problema con respecto a una muestra de referencia. La cepa *Ssoch1-1* fue descartada ya que mostraba inespecificidades, más de un pico en las curvas de disociación, lo cual podría deberse a una contaminación de la cepa.

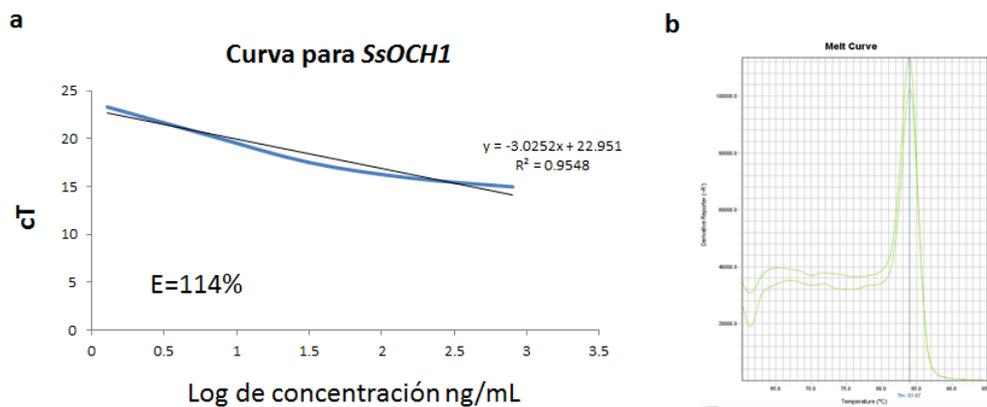


Figura 21. Curva estándar para *SsOCH1*. **a.** Se muestran los valores de E como el porcentaje de eficiencia de amplificación y la ecuación de ajuste lineal de las curvas obtenidas con su coeficiente de correlación lineal R^2 . **b.** Se muestra la curva de disociación.

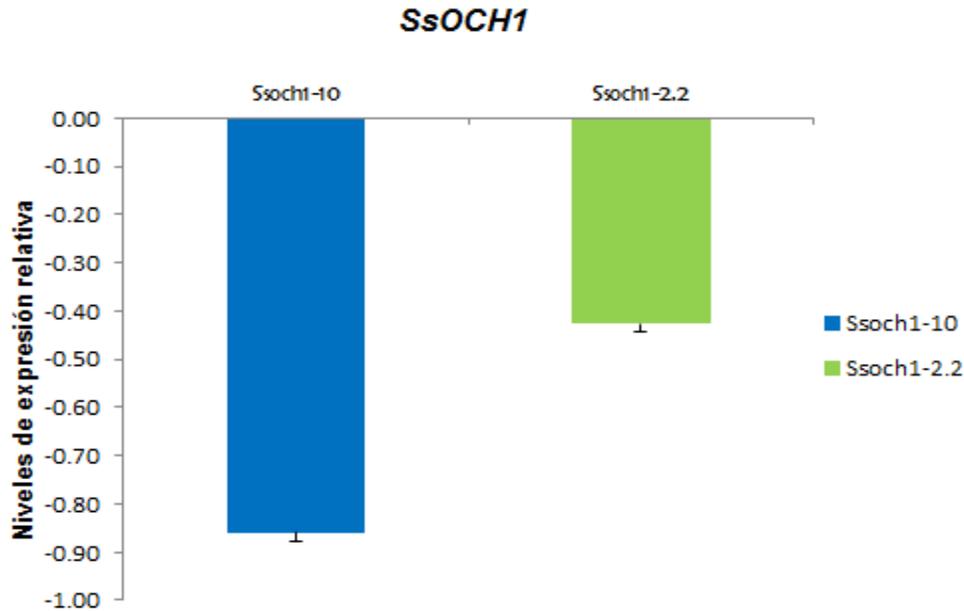


Figura 22. Niveles de expresión de las cepas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*. Control endógeno L6, usando como calibrador la cepa *S. schenckii* silvestre. Los datos representan los promedios \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados triplicado.

En la figura 22 se observa una disminución en la expresión del gen *SsOCH1* en las muestras *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2-2*, que muestran 86% y 43%, respectivamente, menos expresión del gen *SsOCH1*, comparados con la expresión del gen *SsOCH1* de la cepa silvestre.

Determinación del número de copias insertadas en el genoma de *S. schenckii*

Para determinar el número de copias del fragmento de la construcción para silenciamiento que se integraron en el ADN de las cepas transformantes *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*, se realizó primeramente un PCR semicuantitativo con el ADN genómico, utilizando como referencia un gen de copia única en el genoma de *S. schenckii*. Para esto se empleó el gen L6, el cual se sabe que es de copia única (Trujillo, E., 2017). Se realizó la amplificación simultánea con oligonucleótidos que amplifican un fragmento de la secuencia en sentido del gen *SsOCH1*: OCH1sentqRTD (CCGTCAATAGCATCACAAGG) y OCH1sentqRTR (CAGCTTGTCGTA

GAGGGTCA) y con oligonucleótidos que amplifican L6. En la figura 23, se puede observar el producto de amplificación del PCR semicuantitativo para estos genes, con tamaños de 303 pb para el gen L6 y de 171 pb para el gen *SsOCH1*, respectivamente. Además, se puede observar una intensidad mayor en las bandas de amplificación para el gen *OCH1* de las cepas silenciadas, indicando que se integró más de una copia del fragmento del gen *SsOCH1*. Para verificar el número de copias se realizó por triplicado, de forma independiente, el PCR semicuantitativo con ADN genómico de las cepas, y se hizo un análisis densitométrico. Para esto se midieron las intensidades de las bandas de amplificación para el gen L6 y sent, tomándose la relación de L6/sent y como un valor arbitrario de 1 en la cepa silvestre. Obteniendo que el número de copias es 1.72 copias para *Ssoch1-10* y 1.93 para *Ssoch1-2.2*.

Posteriormente se realizó la determinación del número de copias mediante tiempo real, utilizando los mismos genes de referencia L6/sent en la cepa silvestre como amplificación de gen de copia única.

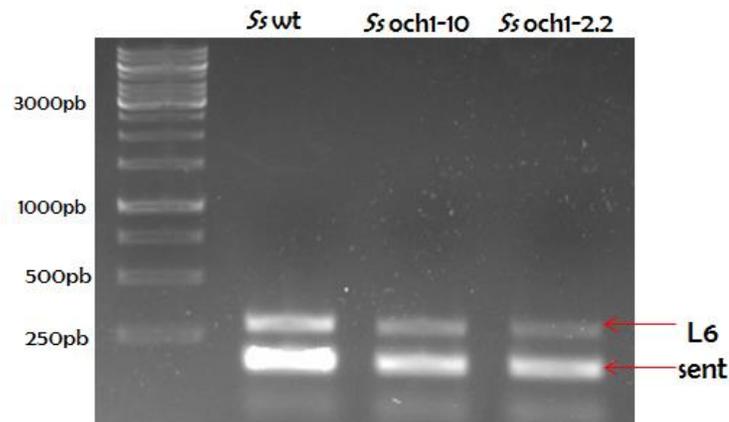


Figura 23. Patrón electroforético del análisis por PCR del número de copias del fragmento sentido de transformantes de *S. schenckii* por PCR semicuantitativo. *Ss wt*: cepa silvestre, *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* transformantes de *S. schenckii*; se observa el producto de amplificación de un fragmento de 303 pb / 171pb correspondientes a un fragmento del gen que codifica para L6/ y sent.

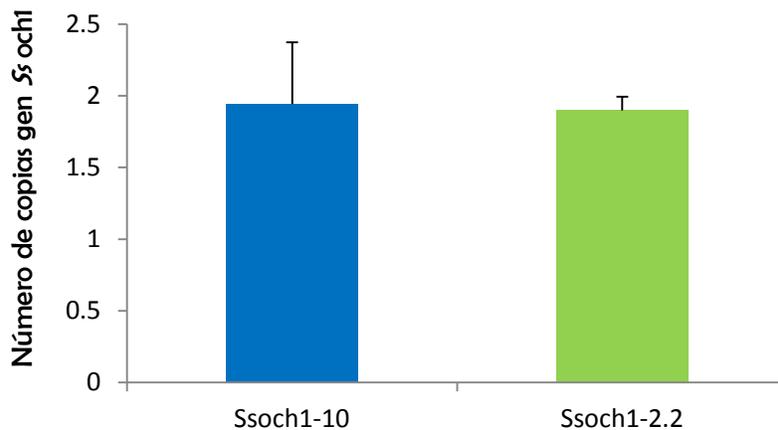


Figura 24. Número de copias en las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2. Control endógeno L6, usando como calibrador la cepa *S. schenckii* silvestre. Los datos representan los promedios \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados triplicado.

El número de copias que se determinó mediante PCR en tiempo real fue de 1.94 ± 0.42 para Ssoch1-10 y 1.89 ± 0.094 para Ssoch1-2.2 (fig.24). El fragmento que se está analizando está en sentido y en antisentido en la construcción, por lo que se espera un número de copias de 2. Estos resultados nos indican que efectivamente la construcción para silenciamiento se insertó una sola vez en el genoma de *S. schenckii*.

Análisis de la expresión de los genes de la familia *OCH*

En organismos como *A. fumigatus* se han descrito ortólogos de la familia *OCH1* (*AfOCH1*, *AfOCH2*, *AfOCH3* y *AfOCH4*) y se ha visto que en la morfología de micelio los cuatro genes son expresados (Lambou et al., 2010). Como una estrategia para confirmar que el efecto que se observa en las cepas silenciadas está relacionado a la disminución en la expresión del gen *OCH1*, y que no estuvieran involucrados los demás miembros de la familia, se decidió analizar por qRT-PCR la expresión de los genes *OCH2*, *OCH3*, y *OCH4* en las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2.

Se diseñaron oligonucleótidos para los genes *OCH2*, *OCH3* y *OCH4* (ver tabla 2), y se obtuvo una curva de calibración para determinar su eficiencia (datos no mostrados).

Con el gen L6 como control de expresión endógeno, y como calibrador la expresión del gen *SsOCH2*, *SsOCH3* y *SsOCH4* de la cepa silvestre, se determinaron los patrones de expresión de cada una de las muestra. Se graficó la variación de cada gen en una muestra, con respecto al gen de la muestra de referencia (fig. 25).

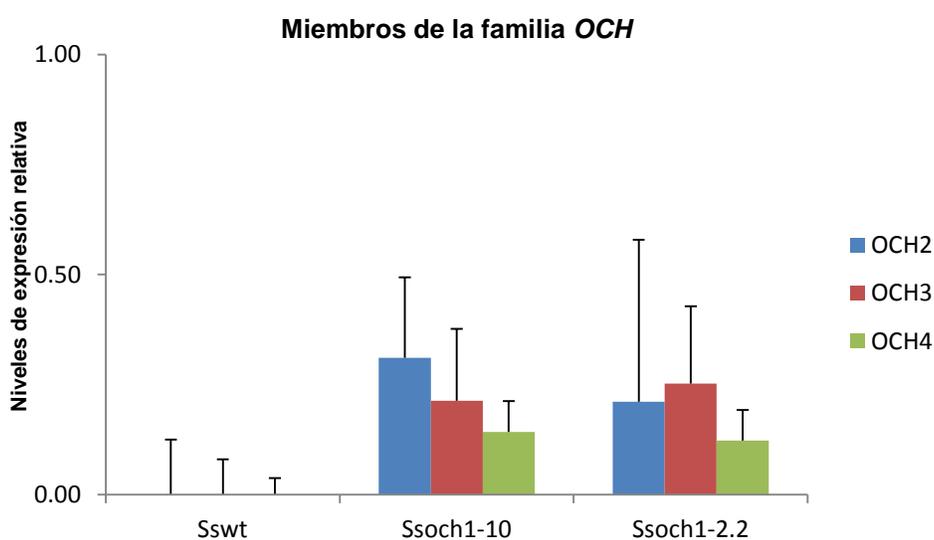


Figura 25. Niveles de expresión de los genes *OCH2*, *OCH3* y *OCH4* de las cepas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*. Control endógeno L6, usando como calibrador la cepa *S. schenckii* silvestre. Los datos representan los promedios \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se encontró que no hay diferencias significativas entre la expresión de los genes de la familia OCH de las cepas silenciadas con respecto a la expresión de la cepa silvestre, lo que nos habla de que el silenciamiento del gen *SsOCH1* no afecta la expresión de los demás genes y que los efectos que se observen en estas cepas silenciadas podrían ser atribuidos al gen *SsOCH1*.

Caracterización de las cepas silenciadas en el gen *SsOCH1*

Crecimiento y morfología de las cepas silenciadas. Las mutantes nulas como *Caoch1*Δ, *Scoch1*Δ, *Fooch1*Δ y *Ncoch1*Δ han mostrado alteraciones en la morfología celular, como agregación, disminución en crecimiento (hasta un 75%), cambios en morfología colonial y crecimiento micelial, lo que conlleva a una pérdida de capacidad de colonización y disminución de virulencia.

Por todo esto se evaluó el crecimiento de las mutantes obtenidas en colonia y capacidad de transición del dimorfismo. Podemos observar que las cepas mutantes no presentan alteración en la apariencia de las colonias en medio YPD pH 4.5, al tiempo de crecimiento (fig. 26).

Las cepas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* fueron capaces de crecer en micelio y de realizar la transición sin ningún problema, además que no se observa el fenómeno de agregación celular descrito otras mutantes para el gen *OCH1*.

En los diferentes modelos donde se ha estudiado el efecto de la disrupción del gen *OCH1* se ha analizado el defecto que causa en pared celular, tanto su organización como en su composición. Una estrategia muy utilizada es analizar indirectamente el cambio de fosfomanosilación de pared mediante la unión del colorante azul Alciano. Para *S. schenckii* podemos usar ese ensayo como un acercamiento para saber si existen diferencias entre las cepas de interés, ya que en este hongo no sólo contamos con fosfomananas sino también con el ácido glucorónico, ramnosa y residuos de galactosa, los cuales también pueden unir el colorante.

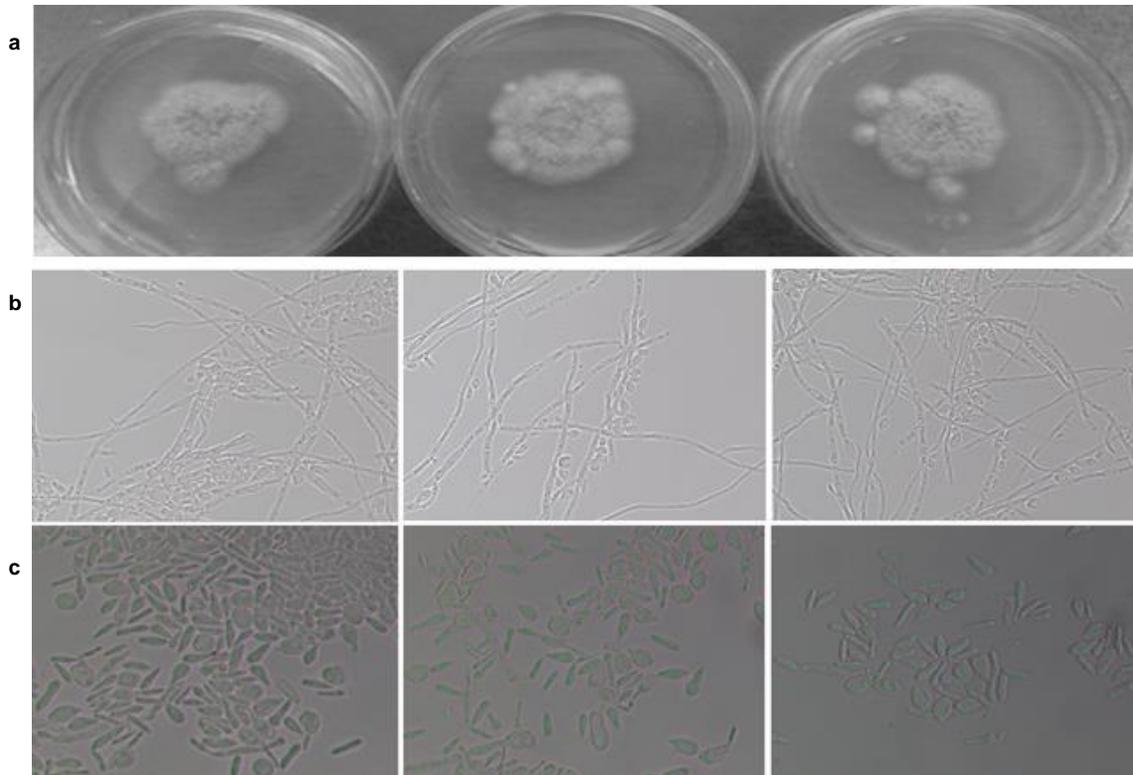


Figura 26. Morfología celular y colonial de mutantes silenciadas en el gen *OCH1* de *S. schenckii*. **a.** Morfología colonial, medio sólido YPD pH 4.5 5 días de crecimiento. **b.** Morfología celular micelio 4 días de crecimiento en YPD pH4.5 y **c.** levaduras de 4 días de crecimiento en YPD pH7.8. No se observan diferencias con respecto a la cepa silvestre.

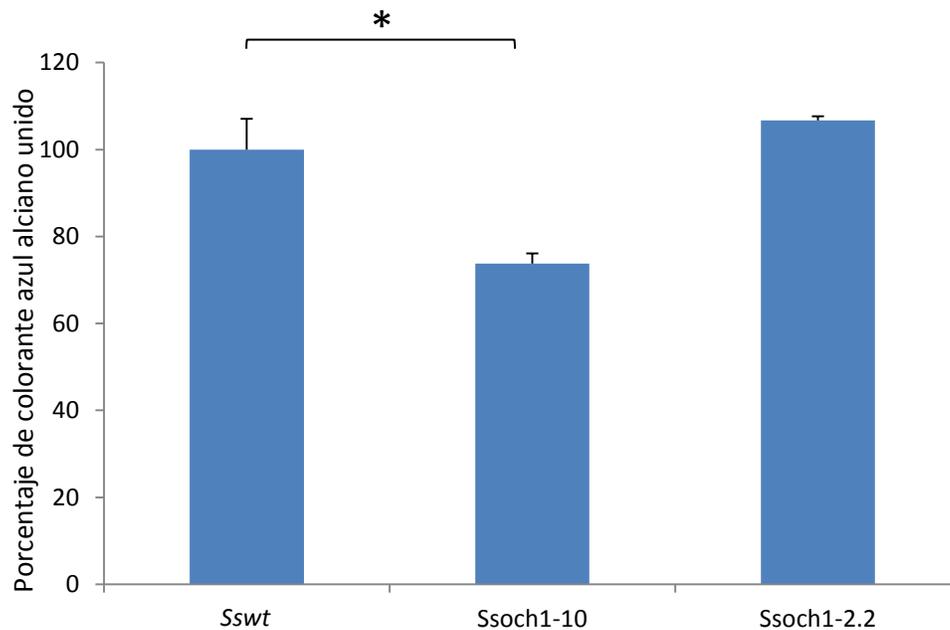


Figura 27. Unión del colorante azul Alciano a las cepas silenciadas en el gen *SsOCH1*. Las cepas analizadas fueron: *Sswt* (*S. schenckii* silvestre), *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* Células crecidas en YPD pH 7.8. * $p < 0.05$

Se obtuvo que la cepa silvestre une $100 \pm 7.04\%$, *Ssoch1-10* $73.73 \pm 2.37\%$ y *Ssoch1-2.2* $106.71 \pm 0.95 \%$ (fig. 27). El ensayo está expresado en porcentaje de azul Alciano unido con respecto a la cepa parental WT por células correspondientes a una $DO_{600nm} = 1$. Se obtuvo que la cepa *Ssoch1-10* muestra una disminución del 30% en la unión al colorante con respecto a la cepa silvestre, y a la cepa *Ssoch1-2.2*. Estos datos correlacionan con la expresión del gen *SsOCH1* en las cepas y se puede sugerir un rearrreglo diferente en la pared de la cepa *Ssoch1-10* que presenta un 86% de silenciamiento. Los datos representan los promedios \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado ($p < 0.05$).

Efecto de agentes perturbadores de pared en las cepas silenciadas

En cepas con defectos en las rutas de síntesis de pared se ha visto que pueden presentar defectos graves en crecimiento y morfología, en el caso de las cepas silenciadas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* no se observa un defecto drástico. Se han estudiado diferentes agentes perturbadores como lo son rojo Congo, blanco de calcofluor, SDS, higromicina B, compuestos de estrés osmóticos, entre otros, para observar estos defectos en la síntesis u organización de la pared celular (Bates, S., et al., 2006; Pérez, L., et al., 2016). Para saber si las cepas silenciadas presentan un retardo en el crecimiento se decidió realizar ensayos en la etapa de la germinación. Las células se ajustaron a 1×10^7 conidias/mL, se incubaron en medio YPD pH 4.5 a 37°C durante 11 horas con agitación, posteriormente se realizó conteo de las germínulas presentes en cada cepa y no se observó diferencia en el porcentaje de germinación.

Tanto la cepa silvestre como las cepas silenciadas mostraron un porcentaje de germinación del 30%, lo que nos indica que, de haber alguna diferencia en composición u organización de la pared en las cepas silenciadas, no se ve afectado el crecimiento. Posteriormente se realizó el mismo ensayo, pero ahora en presencia de rojo Congo y blanco de Calcofluor.

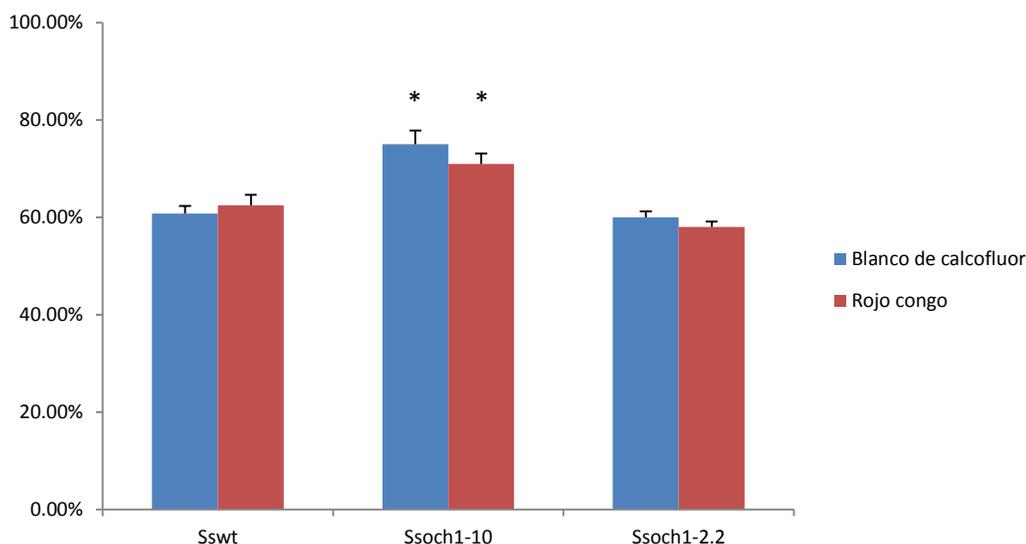


Figura 28. Porcentaje de germinación en presencia de agentes perturbadores de la pared celular. Las cepas de *S. schenckii* analizadas en presencia de blanco de calcofluor y rojo congo fueron: Ssoch1-10, Ssoch1-2.2 y Sswt. El ensayo está expresado en porcentaje de germinación, tomando como un 100% de germinación el conteo de germínulas totales de cada cepa crecida en medio YPD pH 4.5 sin perturbador. Los datos representan los promedios \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$.

Se puede observar un mayor porcentaje de germinación en la cepa *Ssoch1-10* en presencia tanto de blanco de calcofluor como en rojo congo (fig. 28), lo que sugiere que puede haber un aumento en la cantidad de quitina y/o glucosa en la estructura de pared de esta cepa.

Análisis de carbohidratos de pared

Para comprobar si hay un cambio en la composición de pared de las cepas silenciadas se analizó el porcentaje de carbohidratos de pared celular. Los carbohidratos analizados fueron ramnosa (rha), glucosamina (glcN), glucosa (glc) y manosa (man). Las cepas silenciadas fueron crecidas en medio YPD pH 7.8 y se realizó una hidrólisis de pared (ver materiales y métodos), estas muestras fueron analizadas por HPAEC-PAD en un equipo Dionex, usando la columna CarboPac PA10.

En la figura 29 se observa una diferencia en la cantidad de ramnosa, glucosamiana y glucosa presente en la cepa Ssoch1-10, con respecto a la cepa silvestre.

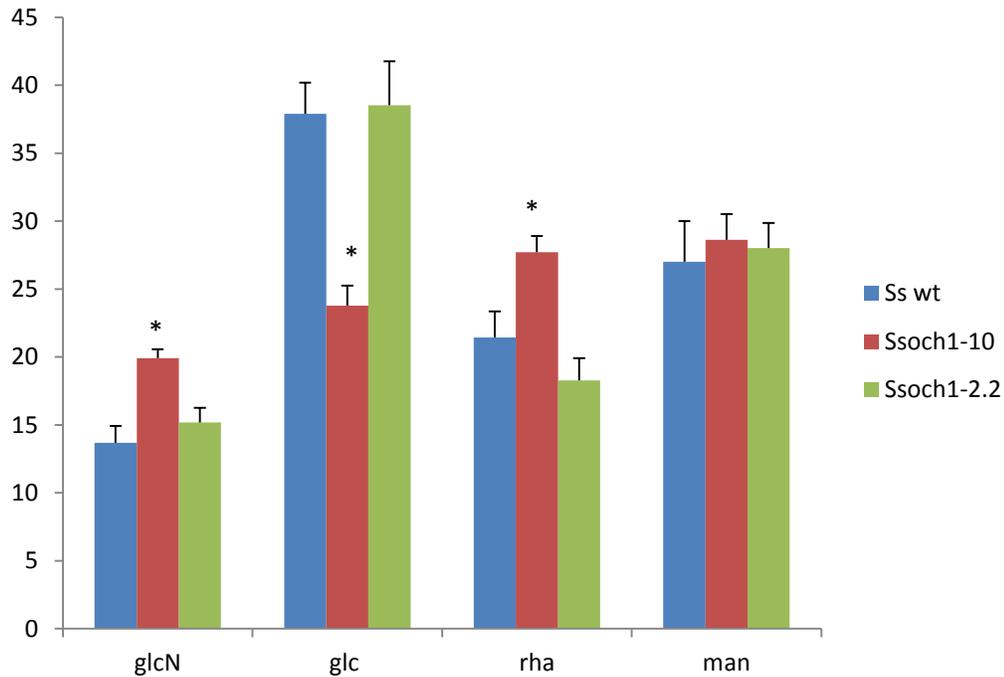


Figura 29. Porcentaje relativo de carbohidratos de pared celular. Las cepas de *S. schenckii* analizadas fueron: *Ssoch1-10*, *Ssoch1-2.2* y *Sswt*. El ensayo está expresado en porcentaje relativo de carbohidratos tomando como un 100% la suma de los porcentajes de ramnosa (*rha*), glucosamina (*glcN*), glucosa (*glc*) y manosa (*man*) de cada cepa. Los datos representan los promedios \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados triplicado. * $p < 0.05$.

En organismos donde se ha deletado el gen *OCH1*, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, entre otros, el fenotipo que han observado en cuanto a carbohidratos presentes en pared es una disminución considerable de manosa (Bates, S., et al., 2006; Pérez, L., et al., 2016; Nakayama et al., 1992; Maddi, a., et al., 2010). En este caso no se observa ningún cambio en las cepas silenciadas. Esto podría deberse a que no hay una delección completa del gen o que otras enzimas están compensando de alguna manera la falta de *N*-glicanas en *S. schenckii*.

N- y O- glicosilación de las cepas silenciadas

Para confirmar si el silenciamiento del gen *OCH1* efectivamente estaba causando un daño en la ruta de la N-glicosilación de proteínas, se evaluó el contenido de N- y O-mananas en las cepas de interés. Para esto se removieron las mananas de pared celular con la ayuda de Endo H y β -eliminación (materiales y métodos), y fueron cuantificadas (fig. 30).

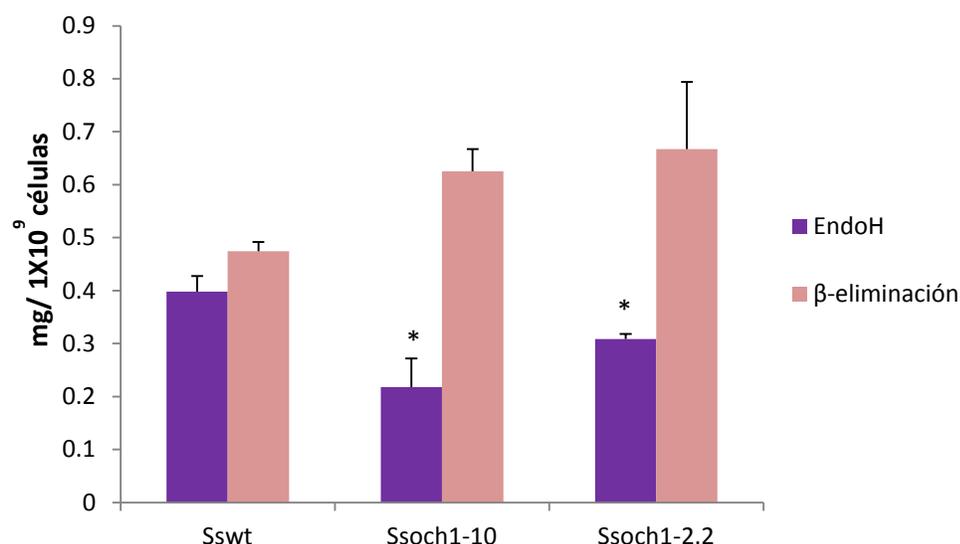


Figura 30. Cuantificación de N- y O- mananas. Las cepas de *S. schenckii* analizadas para cuantificación de azúcares fueron: Ssoch1-10, Ssoch1-2.2 y Ss wt. El ensayo está expresado en la cantidad de azúcares eliminados utilizando β -eliminación y EndoH. Tomando como referencia una curva estándar de manosa ($1\text{mg mL}^{-1} - 0.0625\text{ mg mL}^{-1}$). Levaduras de 4 días de crecimiento en medio YPD pH 4.5. * $p < 0.05$

En la cepa silvestre no se muestra una diferencia en la cantidad de azúcares liberados. En las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 se muestra una disminución de 46% y 23% de las N-mananas, y un aumento del 30% y 40% de O-mananas respectivamente, lo que nos puede sugerir que las N-mananas sí están en menor cantidad en las cepas silenciadas, pero que son compensadas por la ruta de la O-glicosilación.

Exposición de quitina

Como se ha observado, en la cepa *Ssoch1-10* existe un aumento en la cantidad de quitina, y esta característica se ha visto en mutantes $\Delta OCH1$, y también se ha observado que en estas cepas afectadas existe un rearrreglo de los componentes de pared y a un cambio en la accesibilidad de la célula (Pérez, L., et al., 2016). Para evaluar esto se cuantificó la capacidad de unión de WGA-FITC (isotiocianato de fluoresceína acoplada a aglutinina germen de trigo) a la quitina.

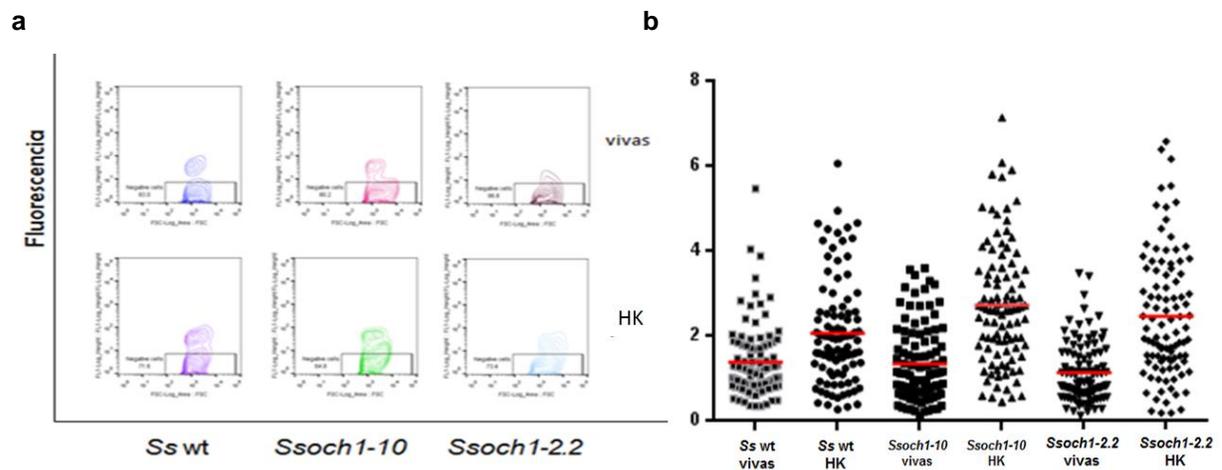


Figura 31. Tinción con WGA-FITC para evaluar la exposición de quitina. a. Análisis de fluorescencia mediante citometría de flujo. b. Cuantificación de fluorescencia mediante microscopía. Las células fueron crecidas en YPD pH7.8, células HK : inactivadas por calor.

Los resultados muestran que la lectina tiene una mayor unión en la cepa *Ssoch1-10* cuando es inactivada por calor, presentando un 30% más de fluorescencia, en comparación con la cepa silvestre, lo cual puede deberse al aumento de quitina en la superficie celular (fig. 31). Estos resultados nos indican que el defecto en el gen *OCH1* genera daños y modificaciones en la estructura y composición de pared celular del hongo.

Interacción de cepas silenciadas con células del sistema inmune

Para entender el papel que juega la ruta de la *N*-glicosilación durante la interacción *S. schenckii*-hospedero se realizaron ensayos para determinar la producción de interleucinas pro y anti inflamatorias. La producción de interleucinas por hPBMC cuando se interaccionan con células de *S. schenckii* ya ha sido estudiada en el grupo de trabajo (Martínez, J., et al., 2017). Se ha observado que la producción de interleucinas durante la interacción es dependiente de la morfología del hongo.

Por lo que de las cepas de interés se obtuvieron conidios, levaduras, y germínulas, las cuales interaccionaron con células hPBMC y a los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó la cantidad de interleucinas producidas.

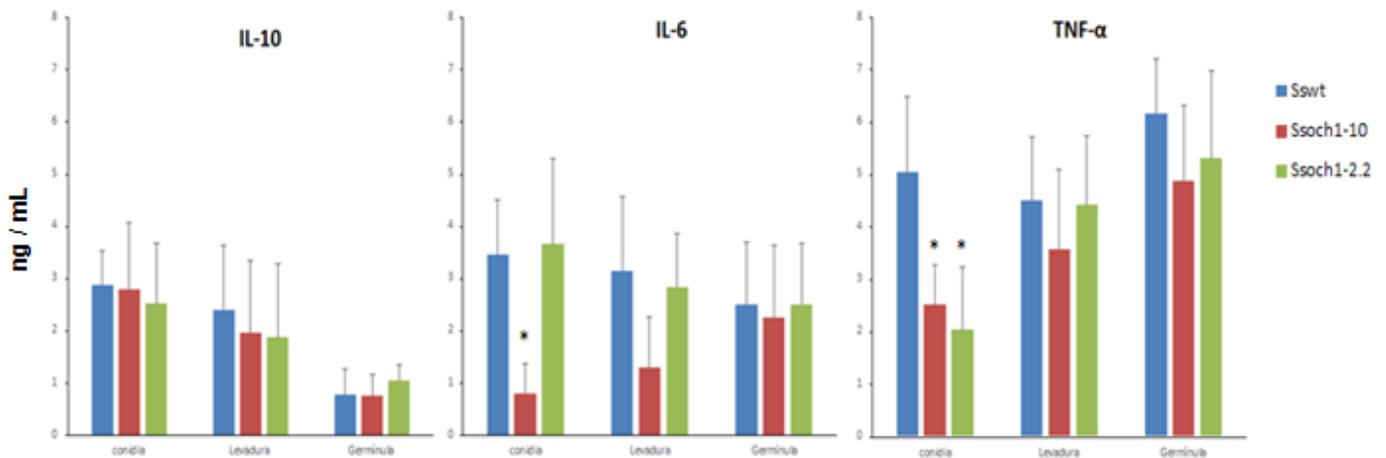


Figura 32. Estimulación de la producción de IL-10, IL-6 y TNF α por mutantes de *S. schenckii* silenciadas en el gen *OCH1*. Conidios, levaduras y germínulas fueron puestas en incubación con hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para la cuantificación de la producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos. * $p < 0.05$

Para la producción de IL-10 no se observa diferencia entre las cepas silenciadas con respecto a la cepa silvestre, y se sigue observando una disminución con germínulas. Cuando se analizó la producción de IL-6 se observó que cuando los

hPBMC interactan con conidios de la cepa Ssoch1-10 se produce una disminución de la interleucina.

Para TNF- α , se observó una disminución con la interacción de conidios de las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 (fig. 32).

Se ha descrito que el morfotipo de levadura es el que se encuentra presente cuando la infección de *S. schenckii* ya está establecida, y los componentes que presentan en pared son los encargados de activar el sistema inmune en el hospedero.

Por ello se analizó la producción de interleucinas en levaduras vivas comparadas con levaduras cuando se exponen los componentes internos de la pared (inactivadas por calor) durante la interacción con hPBMC.

Cuando se analizó la producción de IL-10 (fig. 33), no se observó diferencia entre las cepas de interés y la cepa silvestre, y tampoco cuando se expusieron los componentes internos.

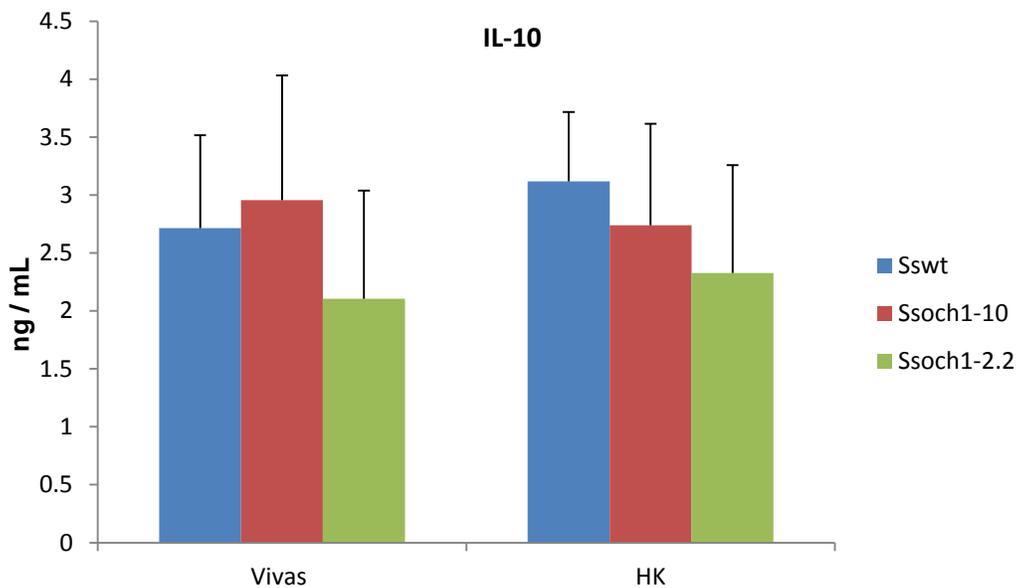


Figura 33. Estimulación de interleucina IL-10 por mutantes de *S. schenckii* silenciadas en el gen *OCH1*. Levaduras vivas e inactivadas por calor fueron puestas en incubación con hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificación de producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos.

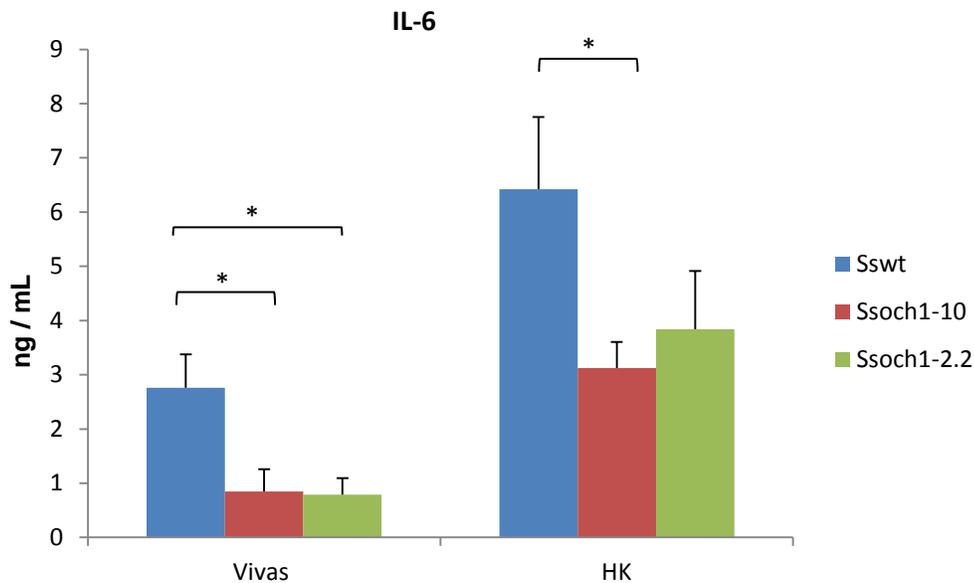


Figura 34. Estimulación de interleucina IL-6 por mutantes de *Sporothrix schenckii* silenciadas en el gen *OCH1*. Levaduras vivas e inactivadas por calor fueron puestas en incubación con hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificación de producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos. * $p < 0.05$.

Cuando se analizó la producción de IL-6 y TNF α comparando las células vivas y las células inactivadas por calor, se observó un aumento significativo en la estimulación de IL-6 de hasta 3 veces cuando las células se inactivaron por calor (fig. 34), y para TNF- α se observó un aumento de hasta 5 veces en las células inactivas con calor (fig. 35).

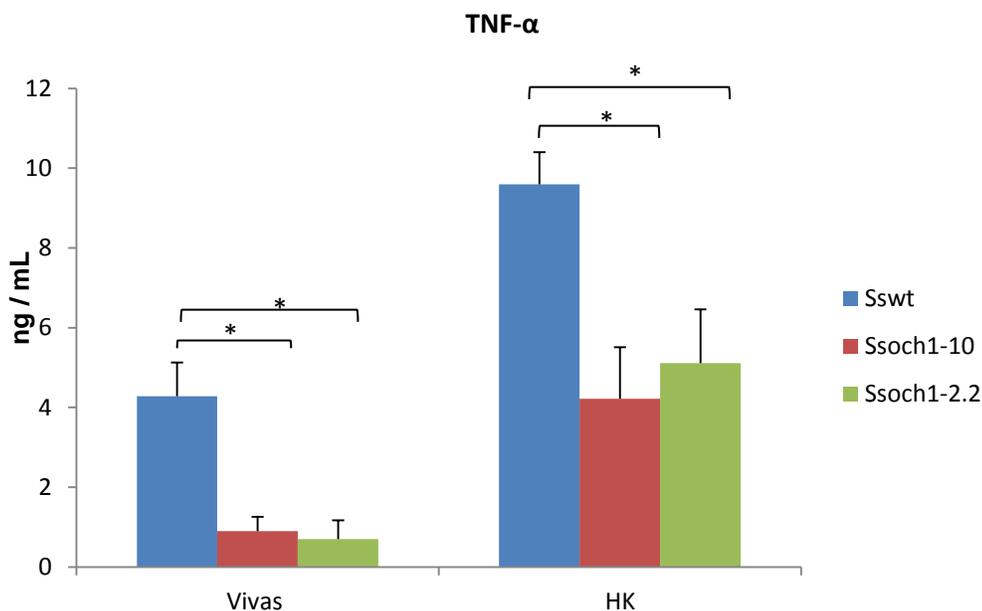


Figura 35. Estimulación de interleucina TNF- α por mutantes de *S. schenckii* silenciadas en el gen *OCH1*. Levaduras vivas e inactivadas por calor fueron puestas en incubación con hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificación de la producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos. * $p < 0.05$.

En adición, se observa una disminución de IL-6 estimulada por la cepa Ssohc1-10, comparada con la cepa silvestre, cuando las células son inactivas por calor (fig. 34). Para TNF α se observa una disminución en su estimulación por las cepas Ssohc1-10 y Ssoch1-2.2, comparadas con la cepa silvestre (fig. 35). Este efecto ya se había observado en otras cepas afectadas en el gen *OCH1* (Pérez-García L.A., et al., 2016). La producción de la interleucina antiinflamatoria IL-1 β no mostró diferencia (fig. 36).

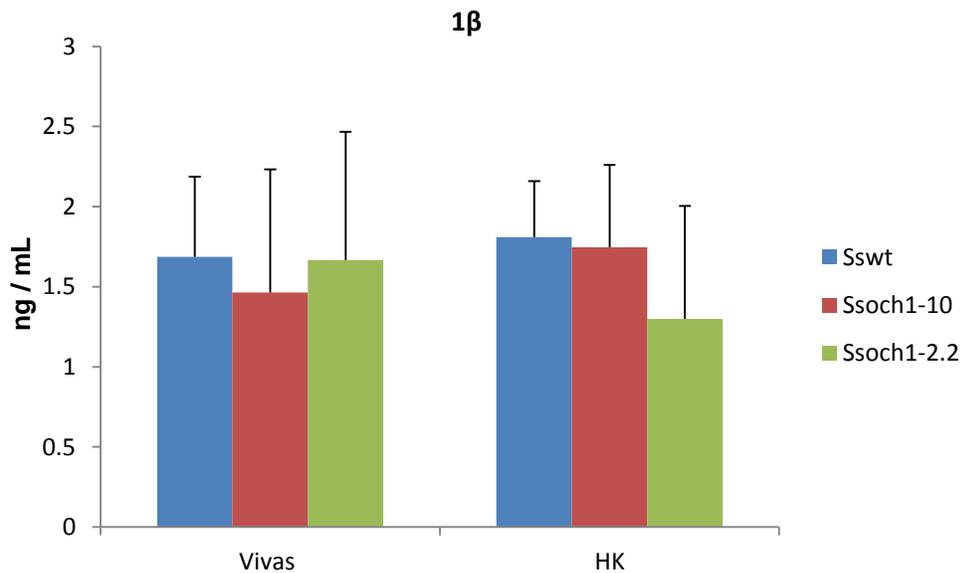


Figura 36. Estimulación de interleucina 1 β por mutantes de *S. schenckii* silenciadas en el gen *OCH1*. Levaduras vivas e inactivadas por calor fueron puestas en incubación con hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificación de producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos.

Producción de interleucinas estimulas por macrófagos derivados de hPBMC.

Se analizaron de la misma forma la producción de interleucinas producidas durante la interacción de células diferenciadas del sistema inmune y las cepas silenciadas. Para esto se usaron macrófagos diferenciados a partir de hPBMC y levaduras de la cepa silvestre, Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2, vivas e inactivadas por calor, en una relación 1:6, posterior a la interacción se recuperaron sobrenadantes y se determinaron interleucinas mediante ELISA. Para la producción de IL-6 y TNF- α no se observa una diferencia, la producción de la interleucina IL-10 es baja en comparación a las demás interleucinas, esto habla de la regulación de inhibición de producción de IL-6 y TNF- α en los macrófagos. Cuando los componentes de pared son expuestos por calor se puede observar una mayor estimulación de IL-10 en la cepa Ssoch1-10 (fig. 37).

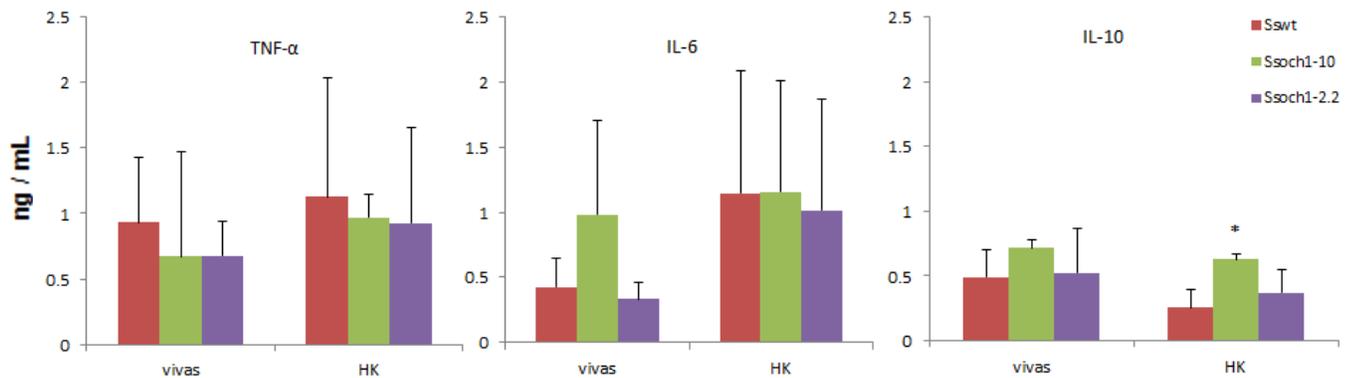


Figura 37. Estimulación de interleucinas por macrófagos derivados de hPBMC interaccionados con *S. schenckii*. Levaduras vivas e inactivadas por calor fueron puestas en incubación con macrófagos derivados de hPBMCs, los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para cuantificación de producción de interleucinas por ELISA. Sswt cepa 1099-18 ATCC MYA 4821; Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 cepas silenciadas. Los datos representan los promedios \pm SD de los datos obtenidos por duplicado de seis donadores sanos. * $p < 0.05$.

Para determinar si el defecto en pared de las cepas silenciadas tiene relevancia durante el proceso de fagocitosis se co-incubaron las cepas silenciadas con macrófagos diferenciados a partir de hPBMC y se analizó dicho proceso mediante citometría de flujo.

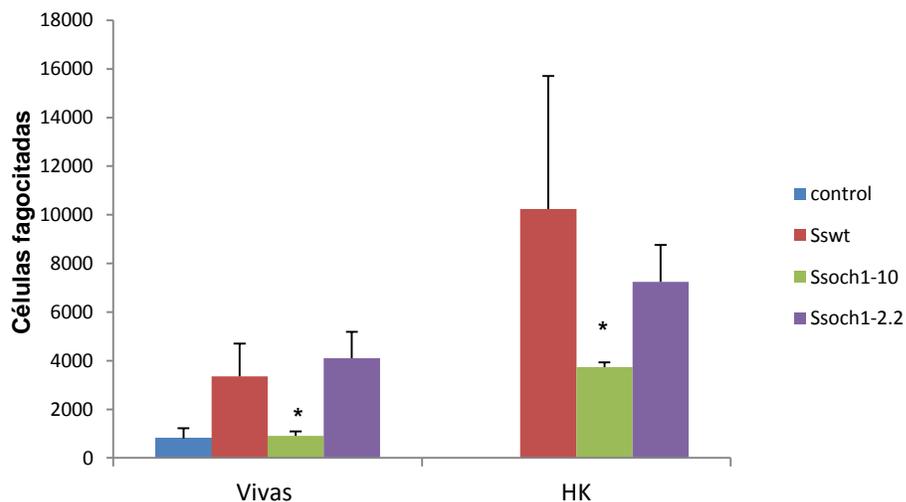


Figura 38. Fagocitosis de levaduras de *S. schenckii* por macrófagos diferenciados a partir de hPBMCs. Las levaduras fueron marcadas con naranja de acridina e incubadas con macrófagos en una relación 1:6 durante 2.5 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Sswt; cepa 1099-18 ATCC MYA 4821, Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2; mutantes silenciadas en el gen OCH1. Los datos representan los promedios \pm SD de tres replicas biológicas por duplicado. * $p < 0.05$.

De manera general se puede observar que hay un aumento de la fagocitosis cuando las células son inactivas por calor, sin embargo, la cepa Ssoch1-10 es la única que muestra una disminución evidente en la fagocitosis con células vivas e inactivadas por calor, con respecto a la cepa silvestre (fig. 38).

Estos datos nos sugieren que el silenciamiento del gen *SsOCH1* afecta la respuesta del sistema inmune durante la infección del hongo.

Virulencia

Para determinar si el silenciamiento del gen *SsOCH1*, y por consiguiente el daño en la ruta de la *N*-glicosilación de proteínas tiene algún efecto en la virulencia del hongo, se analizaron las cepas silenciadas en un modelo de esporotricosis sistémica en larvas de *G. mellonella* (Clavijo-Giraldo et al. 2016). Fueron evaluadas la cepa silvestre y las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2, se inocularon 60 individuos y el proceso de infección se monitoreo durante 15 días, y como control un grupo se inyectó con PBS estéril.

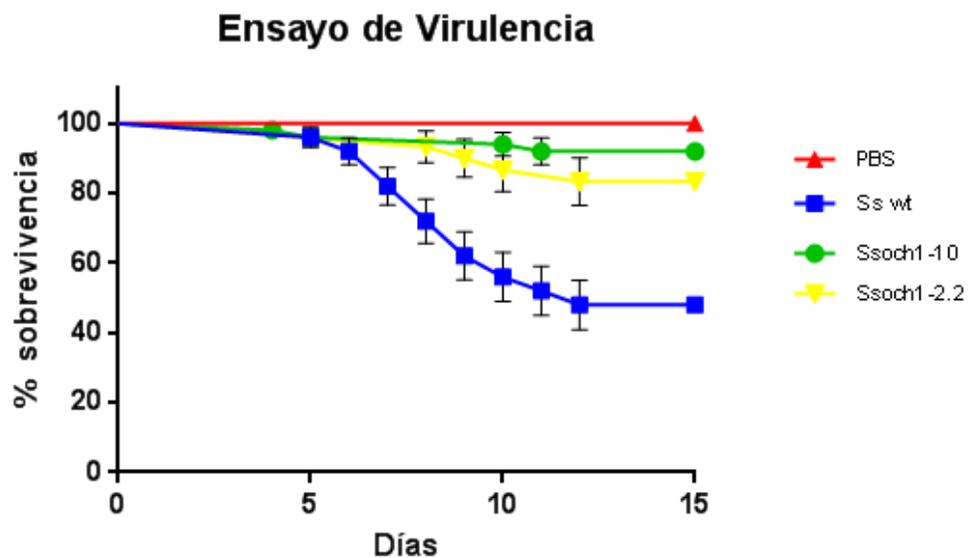


Figura 39. . Ensayo de virulencia en *Galleria mellonella*. Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Ss wt*, *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*. Las larvas fueron inoculadas con 1×10^5 de levaduras y fueron monitoreadas durante un periodo de 15 días. Como control de no infección se inyectó un grupo con PBS1X estéril. Se analizaron 60 individuos, $p < 0.0001$.

La cepa silvestre muestra un porcentaje de mortalidad de un 60%, mientras que las cepas silenciadas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 mostraron un 8% y 14% de mortalidad, lo que nos habla de una atenuación de la virulencia del hongo en cepas afectadas en el gen *SsOCH1* (fig. 39). Estos resultados demuestran que el silenciamiento del gen *SsOCH1* afecta significativamente la virulencia de *S. schenckii in vivo*.

Posteriormente, a las larvas infectadas se les extrajo la hemolinfa y se realizaron diluciones seriadas para determinar unidades formadoras de colonias de cada cepa. No se observan diferencias significativas de las colonias de las cepas silenciadas comparadas con la cepa silvestre (fig. 40). Estos resultados demuestran que las cepas Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 tienen un crecimiento igual que la cepa silvestre y que la atenuación de la virulencia que se observa tiene que ver con las modificaciones presentes en la pared celular y no por un impedimento en la colonización.

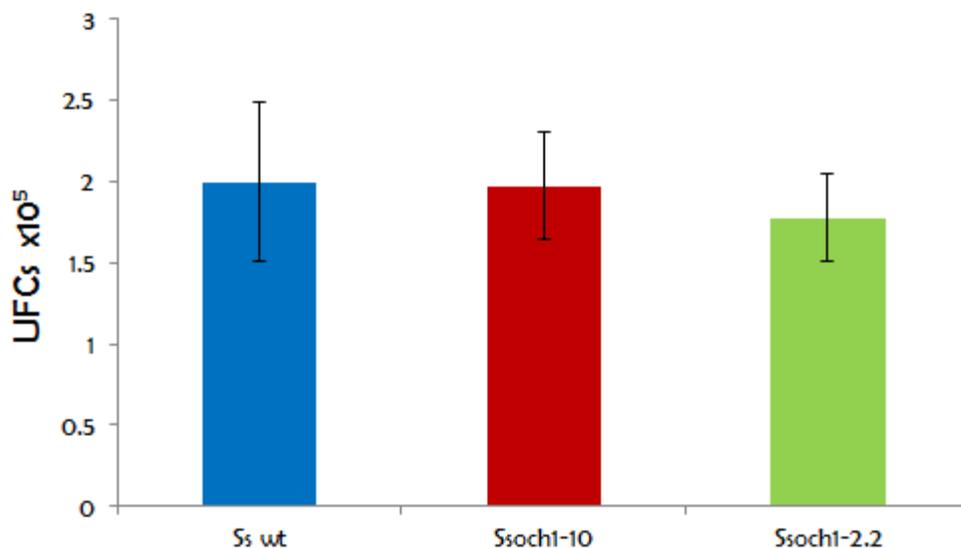


Figura 40. Unidades formadoras de colonia en *Galleria mellonella*. Después de analizar la virulencia de las cepas, se aisló la hemolinfa de las larvas y se usó para realizar el cálculo de unidades formadoras de colonias.

DISCUSIÓN

S. schenckii ha sido reportado como un importante agente etiológico de la enfermedad conocida como esporotricosis, la cual es una micosis subcutánea o crónica que afecta humanos y otros mamíferos. A últimas fechas se ha incrementado el número de reportes que ubican a este hongo patógeno como uno de los principales causantes de infecciones en sectores vulnerables.

En la interacción patógeno-hospedero, uno de los componentes más importantes es la pared celular del patógeno, ya que, al ser la estructura más externa de la célula, más allá del papel estructural, también representa el primer punto de contacto de la célula fúngica con su entorno.

Por lo tanto, la estructura y composición de la pared de *S. schenckii* determinaran en gran medida las interacciones de este patógeno con su hospedero. Se han descrito diferentes moléculas como adhesinas (gp70) que inducen reacciones inmunogénicas específicas, además de otras glicoproteínas de pared que son importantes para la respuesta inmune ante este patógeno, como lo son la peptidoramnanosa.

Mediante una búsqueda en la base de datos del genoma de *S. schenckii*, se lograron identificar secuencias pertenecientes a la familia *OCH*, la cual codifica para glicosiltransferasas del aparato de Golgi. Los genes que se encontraron son: SS09317 (*OCH1*), SS03245 (*OCH2*), SS02495 (*OCH3*) y SS09242 (*OCH4*), los cuales codifican para probables α 1,6-manosiltransferasas. Estas secuencias nucleotídicas mostraron una identidad cercana al 50% entre sí.

Filogenéticamente, *S. schenckii* está relacionado con *N. crassa* y *A. fumigatus* entre otros (Teixeira, M., et al., 2014), y las secuencias de los genes para *OCH1* que están más estudiadas son las correspondientes a *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

Por lo que se realizó un alineamiento con las secuencias aminoácidas de estos organismos. Los resultados determinaron regiones altamente conservadas, como el dominio catalítico para glicosiltransferasas, motivos DXD, dominio citoplásmico y transmembrana. Con estos datos se predice la estructura de esta posible proteína como una proteína de membrana tipo II, al igual que las α 1,6-manosiltransferasas que ya han sido caracterizadas.

Los estudios de complementación funcional fueron realizados para elucidar si el gen *SsOCH1* es capaz de revertir los efectos de la falta del gen que codifica para una α 1,6-manosiltransferasas en *S. cerevisiae*.

Las mutantes carentes del gen *OCH1* en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*, son viables pero presentan sensibilidad a la temperatura, hipersensibilidad a agentes que perturban la pared celular, sensibilidad a higromicina B, agregación celular, defectos de crecimiento, y pérdida de residuos asociado a la falta de manosa con enlace α 1,6-. Y las reintegrantes de estas mutantes son capaces de revertir los defectos observados (Dean, 1995; Nakayama *et al.*, 1997; Neiman *et al.*, 1997; Bates *et al.*, 2006). Los defectos que presenta la cepa *SsOch1* Δ son muy evidentes y anteriormente había sido utilizada para la complementación funcional con genes de *A. fumigatus* (Lambou, K., *et al.*, 2010).

La cepa complementante *Scoch1* Δ +*SsOCH1* muestra una restauración del fenotipo a niveles de la cepa silvestre en ensayos de fosfomanosilación y sensibilidad a perturbadores de pared celular. Cabe señalar que la complementación funcional de los miembros de la familia OCH (*OCH2*, *OCH3* y *OCH4*) se realizó por López-Ramírez, y dichas complementantes no mostraron una restauración del fenotipo de la cepa *ScOCH1* Δ , lo que nos sugiere que el gen *SsOCH1* es el único posible ortólogo con función de α 1,6–manosiltransferasa en *S. schenckii* (datos no publicados).

Una de las estrategias utilizadas para el conocimiento genético y molecular de algunos modelos de estudio es la implementación de sistemas de transformación genética. Mediante estas herramientas es posible la manipulación del gen de interés, para este trabajo uno de los objetivos es el silenciamiento del gen *SsOCH1*, y para esto es necesario implementar un sistema de transformación de *S. schenckii*.

Uno de los primeros trabajos de transformación en *S. schenckii* fue el que describe la implementación de la técnica de RNA de interferencia para el estudio de la cinasa calcio/calmodulina (Rodríguez-Cabán, et. al., 2011) . También se reportó un protocolo de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang, Y., et. al., 2011).

El uso del sistema de T-DNA se trata de una integración por recombinación y se ha visto que es entre 100–1000 veces más eficiente que otros métodos de transformación, y generalmente la integración del DNA es en una sola copia (Bundock, P., et. al., 2002).

La transferencia del T-DNA es un proceso conocido y regulado, cuyo éxito depende de múltiples factores relacionados tanto con la propia bacteria como con el organismo a infectar. Se ha demostrado que la expresión de los genes *vir*, indispensables para iniciar el proceso de infección de *A. tumefaciens*, está afectada por numerosos factores como las condiciones físico-químicas del medio de cultivo, la presencia de compuestos fenólicos como AS, o el tiempo de contacto de *Agrobacterium* con el huésped.

En este trabajo se observó que estos factores no influían en gran medida a la obtención de transformantes. Se probaron diferentes tiempos de inducción con AS de la cepa AGL1 y no se tuvieron diferencias significativas en la transformación.

Sin embargo, se observó que un factor determinante para la eficiencia de la transformación fue la concentración de las células fúngicas utilizadas. Ya que es importante la competencia de las células para ser infectadas por *A. tumefaciens*.

El protocolo de transformación mostró la obtención de mutantes de *S. schenckii* con hasta tres inserciones, las cuales no modifican estructura y composición de pared celular, virulencia y capacidad de interacción con células de sistema inmune (datos no mostrados).

El silenciamiento de genes mediante RNA se reportó en *S. schenckii* (Rodriguez-Caban et al., 2011), demostrando que el hongo contiene los genes homólogos de la maquinaria de silenciamiento. Con el fin de llevar a cabo el silenciamiento del gen *SsOCH1* se diseñó la construcción de un plásmido binario que contiene una secuencia proveniente del vector de silenciamiento pSilent1. Esta secuencia tiene un fragmento de 425 pb del gen *SsOCH1* en sentido y antisentido, flanqueando a una secuencia intrónica la cual será la responsable del silenciamiento.

Durante el desarrollo de este trabajo se analizaron 5 cepas con diferente grado de silenciamiento (100%, 98%, 96% 86% y 43%), se determinó que estas cepas tienen una inserción en el genoma. El defecto que muestran las cepas es dependiente del grado de silenciamiento. Pero no se muestra un fenotipo tan drástico como en otros organismos donde se ha interrumpido el gen *OCH1*.

Como ya se había mencionado, existen otros tres genes en *S. schenckii* descritos como miembros de familia de glicosiltransferasas, y estos fueron analizados por PCR en tiempo real, con el fin de saber si el silenciamiento de *SsOCH1* había afectado su expresión. Se observó que estos genes en las mutantes silenciadas no tienen una diferencia en la expresión con respecto a la cepa silvestre, con lo que podemos concluir que el defecto que se observa en estas cepas mutantes es por silenciamiento del gen *SsOCH1* y no de los otros miembros de la familia.

En diferentes organismos se han visto defectos en cuanto a morfología y crecimiento en cepas carentes de genes que participan directa o indirectamente en rutas de glicosilación de pared, como lo son *OCH1*, *PMR1*, *MNT1*, *KTR4*, *KTR5*, entre otros (Pérez, L., et al., 2016; Navarro- Arias, M. et al., 2016; Hernández, N., et al., 2017).

Las más drásticas se han reportado para *OCH1* y *PMR1* en diferentes especies del género *Candida*, donde las mutantes exhiben crecimiento colonial aberrante y las levaduras se muestran en agregados celulares (Pérez, L., et al., 2016; Navarro- Arias, M. et al., 2016; Bates, S. et al., 2006). En las mutantes silenciadas en *S. schenckii* no se observan ese comportamiento, tienen una morfología igual a la cepa parental, sugiriendo que la participación de la *N*-glicosilación en la morfología de *S. schenckii* no es tan importante como lo es en otros organismos.

La delección del gen *OCH1* disminuye de manera significativa la unión del colorante azul Alciano (Bates., et al., 2006), ya que al no llevarse a cabo la extensión de la cadena lateral se ve afectada la fosfomanosilación. Se realizó el ensayo de unión al colorante azul Alciano y se observó una disminución de unión del 30% de la cepa con 86% de silenciamiento. Lo que sugiere que el defecto del gen *SsOCH1* está modificando la organización de la pared.

El defecto del gen *OCH1* se ha visto que afecta el crecimiento micelial, y por ende la capacidad de colonizar a su hospedero (Li et al., 2014). Las cepas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2* no muestran un defecto en el crecimiento micelial, ya que se realizó un ensayo de germinación y mostraron la misma germinación que la cepa silvestre.

Cuando se pusieron en contacto con blanco de calcofluor y rojo Congo, la cepa con mayor silenciamiento mostró un mayor porcentaje de germinación comparado con la cepa silvestre, sugiriendo un aumento en algún componente de pared como lo es glucanas y/o quitina.

Lo reportado previamente en el grupo de trabajo para carbohidratos de pared en levadura fue una proporción mayoritaria de glucosa, seguida de manosa, ramnosa y glucosamina (Martínez-Álvarez et. al., 2017). La mutante *Ssoch1-10* mostró un aumento en quitina del 45%, mientras que mutantes que tienen 100 y 98% de silenciamiento muestran un aumento similar tanto en quitina como en glucosa.

El aumento de quitina fue confirmado por la exposición de quitina y tinción con FITC, y se observa que la cepa con mayor silenciamiento muestra un aumento de quitina. Lo que nos sugiere que el silenciamiento del gen *SsOCH1* afecta la composición y estructura de la pared de *S. schenckii*

Este aumento en quitina y glucosa se ha observado en cepas con defectos en *N*-glicosilación, además de una disminución drástica de manosa. En las cepas silenciadas no se observó diferencia en manosa por lo que se analizaron *N*- y *O*-mananas y lo que se observó fue que efectivamente la *N*-manosilación está afectada en ambas cepas silenciadas pero esta deficiencia es compensada por un aumento en las *O*-mananas. Esto nos habla de que la *O*-glicosilación tiene un papel importante en la estructuración de pared de *S. schenckii*. Esta participación de la *O*-glicosilación en estructuración de pared también fue reportada en *C. parapsilosis* (Pérez- García, L., et al., 2016)

En *C. albicans*, las mananas y β 1,3- glucanas tienen un papel importante durante la interacción del patógeno con el sistema inmune innato y la interrupción de la *N*-manosilación reduce la capacidad de estimulación de citosinas (Netea., et al., 2006).

Las diferencias en pared celular que muestra *S. schenckii* pueden influir en la participación de los receptores involucrados en la estimulación de citocinas por hPBMCs (Martínez- Álvarez., et. al., 2017). Cuando el gen *SsOCH1* es silenciado se observa una diferencia en la estimulación de citocinas.

La estimulación de citosinas en interacción con hPBMCs y *S. schenckii* es dependiente de la morfología en células vivas. La producción de IL-6 y TNF α en las mutantes silenciadas se ve disminuida en conidias, indicando que los β 1,3-glucanos en esta morfología pueden estar modificados, ya que este es un ligando importante para la estimulación de estas interleucinas.

El morfotipo de levadura presentó aumento en la estimulación de IL-6 y TNF α cuando los componentes internos de pared fueron expuestos por inactivación con calor. Sin embargo, en las cepas mutantes tanto en levaduras vivas e inactivadas por calor, la estimulación de IL-6 y TNF α se ven disminuidas con respecto a la cepa silvestre. Mientras la IL-10 e IL-1 β no muestran diferencias.

En trabajos previos (Martínez –Álvarez., et al., 2017), se decidió bloquear el receptor dectina-1 en hPBMC e interaccionar con células de *S. schenckii*, se sabe que este receptor es importante en el proceso de la fagocitosis y reconoce a β 1,3-glucanos, demostrando que el receptor está involucrado en el reconocimiento de dicho patógeno y en la producción de TNF α e IL-6. La estimulación de IL-6 y TNF α cuando se interaccionan macrófagos con células vivas e inactivadas por calor de las cepas silenciadas no muestran diferencia. Para IL-10 si hay diferencia con la cepa Ssoch1-10 mostrando un aumento en las células inactivadas por calor.

La disminución y aumento de estas interleucinas en las cepas silenciadas indica que el defecto en *N*-glicosilación causa modificación de los β 1,3-glucanos y el reconocimiento es diferente en células del sistema inmune, como lo son hPBMC y macrófagos.

El análisis de interacción de macrófagos derivados de hPBMC con *S. schenckii* muestra que las mutantes silenciadas son internalizadas con menor porcentaje en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo que la *N*-glicosilación tiene un papel importante durante la fagocitosis del hongo. Es posible sugerir que el arreglo en la

pared celular de las cepas silenciadas oculte ciertos PAMPs y con esto las células del hongo pasan desapercibidas por los macrófagos y eviten ser fagocitadas.

Las mutantes Ssoch1-10 y Ssoch1-2.2 muestran una atenuación de la virulencia en el modelo de infección de *G. mellonella*, recuperándose unidades formadoras de colonia similares en las cepas analizadas. El silenciamiento del gen *SsOCH1* muestra diferencias en la inducción de interleucinas y cambios en composición de pared, lo que puede contribuir a esta disminución de virulencia.

La disminución en la expresión del gen *SsOCH1* tiene como resultado cambios en: composición y organización de pared celular del hongo, interacción con células del sistema inmune, y atenuación de la virulencia. Estos resultados sugieren una importante participación de componentes de la ruta de la *N*-glicosilación en la virulencia y reconocimiento inmune de *Sporothrix schenckii*.

CONCLUSIONES

El gen *OCH1* aislado de *S. schenckii* es capaz de restaurar el fenotipo de la cepa mutante *Soch1Δ* de *S. cerevisiae*, sugiriendo fuertemente que este podría ser el ortólogo funcional del gen *OCH1* en *S. schenckii*.

Se realizó la optimización de un protocolo de transformación mediada por *A. tumefaciens*.

Se logró el silenciamiento del gen *OCH1*, obteniendo un grupo de mutantes con diferentes grados de silenciamiento: 100%, 98%, 96% 86% y 43%, las cuales presentan una sola inserción, capacidad de dimorfismo y estabilidad mitótica.

Se analizaron las cepas *Ssoch1-10* y *Ssoch1-2.2*, con 86% y 43% de silenciamiento, las cuales mostraron aumento de quitina en la pared celular.

Los β 1,3-glucanos están involucrados con la estimulación de interleucinas en las cepas silenciadas.

La virulencia en las cepas silenciadas es atenuada, sugiriendo un papel importante de la ruta de la *N*-glicosilación de *S. schenckii* durante la interacción con el hospedero.

PERSPECTIVAS

- Desarrollo de una construcción para la deleción génica, así se tendrá una rápida confirmación de mutantes.
- Determinación de sitios de inserción de la construcción de silenciamiento.
- Análisis de los diferentes receptores involucrados en la respuesta inmune de las mutantes silenciadas.
- Análisis de virulencia de las mutantes silenciadas en modelo murino.

BIBLIOGRAFÍA

- **Arrillaga-Moncrieff, I., Cpailla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Mariné, M, Gené, J., Cano, J., Guarro, J. (2009).** Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:651–655.
- **Ballou, C.E. (1990)** Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* MNN mutants with non conditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* 185: 440-470.
- **Barnay-Verdier, S., Boisrame, A., Beckerich, J.M., (2004).** Identification and characterization of two alpha-1,6-mannosyltransferases, An1p and Och1p, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 150, 2185–2195.
- **Barros, M. B., de Almeida Paes, R. & Schubach, A. O. (2011).** *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 633-654.
- **Bates, S., Hughes, H.B., 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 Nglycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 281, 90–98.
- **Bundock, P., Van Attikum, H., Dulk-Ras, A. Den & Hooykaas, P. J. J. (2002).** Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast* 19, 529–536.
- **Carrada-Bravo, T. (2012).** Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica* 59, 25.
- **Chen Zhou, Yujun Yang and Ambrose Y. Jong (1990).** *Biotech, Benchmarks* vol. 8 No.2
- **Clavijo, D., Martínez, J., Lopes, L., Ponce, P., Franco, B., Almeida, R., et al. (2016).** Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *J Microbiol Methods*; 122:73-77.

- **de Beer ZW, Duong TA, Wingfield MJ. (2016).** The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Stud Mycol.*; 83:165–191
- **de Meyer, E. M., de Beer Z.W., Summerbell, R. C., Moharram, A. M., de Hoog, G. S., Vismer, H. F., Wingfield, M. J. (2008).** Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* 100:647–661.
- **De Praeter CM., Gerwig GJ., Bause E, Nuytinck LK., Vliegenthart JF., Breuer W., Kamerling JP., Espeel MF., Martin JJ., De Paepe AM., Chan NW., Dacremont GA., Van Coster RN. (2000).** A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *Am J Hum Genet.* 66:1744-56.
- **Díaz-Jiménez DF, Pérez-García LA, Martínez-Álvarez JA, Mora-Montes HM (2012).** Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. *Curr Fungal Infect Rep* 6: 275-282
- **Durden FM, Elewski B (1997).** Fungal infections in HIV patients. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 16, 200–207
- **DuBois, M. Gilles, K. A. Hamilto, K.J. Reber, P.A & Smith. F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 23, 350-356.
- **Fleet, G.H. 1991.** Cell walls. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. *The yeasts*, vol 4. Academic Press, Inc., London, 200- 277.
- **Frade-Pérez, M., Hernández-Cervantes, A., Flores-Carreón, A. and Mora-Montes, H. M. (2010).** Biochemical characterization of *Candida albicans* α -glucosidase I heterologously expressed in *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 291-298.
- **García, M., Nadal, M., Kapa, L., Perlin, M., Andrews, D., Gold, S. (2008).** DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Methods in Molecular Biology.* 638: 55-76.

- **Gaynor, E.C., Te Heesen, S., Graham, T.R., Aebi, M. y Emr, S.D. (1994).** Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* 127: 653-665.
- **Gentzsch, M. and Tanner, W. (1997).** Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* 7: 481-486.
- **Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, and A. Chakrabarti. (2002).** Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45:449–454.
- **Gorin, P.A.J., Haskins, R.H., Travassos, L.R. y Mendonça-Previato, L. (1977)** Further studies on the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras*. *Carbohydr. Res.* 55: 21– 33.
- **Hachisuka, H., and Sasai, Y. (1981).** Development of experimental sporotrichosis in normal and modified animals. *Mycopathologia* 76, 79–82.
- **Hernández, N., López-Ramírez, L., Díaz-Jiménez, D. , Mellado-Mojica, E. , Martínez-Duncker, I. , López, M., Mora-Montes, H., (2017).** *Saccharomyces cerevisiae* KTR4, KTR5 and KTR7 encode mannosyltransferases differentially involved in the N- and O-linked glycosylation pathways. *Research in Microbiology* .,168:740-750.
- **Hernández-Cervantes, A., Mora-Montes, H. M., Álvarez-Vargas, A., Díaz-Jiménez, D. F., Robledo-Ortiz, C. I. and Flores-Carreón, A. (2012).** Isolation of *Sporothrix schenckii* MNT1 and the biochemical and functional characterization of the encoded alpha1,2-mannosyltransferase activity. *Microbiology* 158: 2419-2427.
- **Herscovics, A., and Orlean, P. (1993).** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 7: 540-550.
- **Jin, C. (2012).** Protein Glycosylation in *Aspergillus fumigatus* Is Essential for Cell Wall Synthesis and Serves as a Promising Model of Multicellular Eukaryotic Development. *Int J Microbiol* 2012: 21.

- **Kim, M., Kim, E., Kim, J., Park, J., Oh, D., Shimma, Y., Chiba, Y., Jigami, Y., Rhee, S., Kang, H. (2006).** Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol Chem* 281:6261-72.
- **Klis, F.M. (1994).** Review: Cell Wall Assembly in Yeast. *Yeast*, 10: 851-869.
- **Kopecka, M., Gabriel, M. (1992).** The influence of congo red on the cell wall and (1,3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 158: 115- 126.
- **Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985).** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.
- **Kuroda, K., Kobayashi, K., Tsumura, H., Komeda, T., Chiba, Y., Jigami, Y., (2006).** Production of Man5GlcNAc2-type sugar chain by the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. *FEMS Yeast Res.* 6, 1052–1062.
- **Koukolikova-Nicola, Z., Hohn, B., 1993.** How does the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* find its way into the plant cell nucleus? *Biochimie* 75, 635–638.
- **Lambou, K., Perkhofer, S., Fontaine, T., Latge, J.P., (2010).** Comparative functional analysis of the OCH1 mannosyltransferase families in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 625–636.
- **Lazo, G.R., Stein, P.A., Ludwig, R.A., 1991.** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* 9, 963–967.
- **Lehle, L., Strahl, S. and Tanner, W. (2006).** Protein Glycosylation, Conserved from Yeast to Man: A Model Organism Helps Elucidate Congenital Human Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* 45: 6802-6818.

- **Lloyd, K.O. and Bitton, M.A. (1971).** Isolation and purification of a peptidorhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. *J. Immunol.* 107: 663-671.
- **Lobsanov, Y. D., Vallee, F., Imberty, A., Yoshida, T., Yip, P., Herscovics, A., et al. (2002).** Structure of Penicillium citrinum alpha 1,2-mannosidase reveals the basis for differences in specificity of the endoplasmic reticulum and Golgi class I enzymes. *J Biol Chem* 277: 5620-30.
- **Lopes-Bezerra, LM. (2011).** Sporothrix schenckii cell wall peptidorhamnomannans. *Front. Microbio.* 2: 243.
- **Lopes-Bezerra LM, Lozoya-Pérez NE, López-Ramírez LA, Martínez-Álvarez JA, Teixeira MM, Felipe MS, Flores-Carreón A, Mora-Montes HM. (2015).** Functional characterization of Sporothrix schenckii glycosidases involved in the N-linked glycosylation pathway. *Med Mycol* 53:60-8.
- **Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, de Camargo ZP, de Hoog S., (2018).** Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med Mycol.* 56:126-143.
- **Lopes-Bezerra, L.M., Schubach, A. y Costa, O. (2006).** Sporothrix and Sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78: 293-308.
- **López-Romero, E., Reyes-Montes, M. del R., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J.C., Mora-Montes, H.M., Flores-Carreón, A. y Toriello, C. (2011).** Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* 6: 85-102.
- **Macotela-Ruíz, E. & Nochebuena-Ramos, E. (2006).** [Sporotrichosis among rural communities in the Northern Sierra in Puebla. Report of 55 cases September 1995 - December 2005].
- **Maddi, A., Free, S.J., (2010).** a-1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their

incorporation into the cell wall in the filamentous fungus. *Eukaryot. Cell* 9, 1766–1775.

- **Marimon, R., C. Serena, J. Gene, J. Cano, and J. Guarro. (2008).** *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:732–734.
- **Marimon, R., Cano, J., Gene, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M. & Guarro, J. (2007).** *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 45, 3198-3206.
- **Marimon, R., Gene, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazera, M. & Guarro, J. (2006).** Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol* 44, 3251-3256.
- **Martinez-Alvarez, J.A.; Perez-Garcia, L.A.; Mellado-Mojica, E.; Lopez, M.G.; Martinez-Duncker, I.; Lopes-Bezerra, L.M., et al. (2017).** *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol* 8:843.
- **Mendonça, L., Gorin, P., Lloyd, K. and Travassos, L. (1976).** Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. *Biochemistry* 15: 2423-2431.
- **Mendonça-Previato, L., Gorin, P.A.J., and Travassos, L.R. (1980).** Galactosecontaining polysaccharides from the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 29: 934– 939.
- **Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Diaz-Jimenez DF, Lopez-Romero E, et al. (2007).** Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 6: 2184-93
- **Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, Lenardon MD, Brown GD, et al. (2011).** Recognition and Blocking of Innate Immunity Cells by *Candida albicans* Chitin. *Infect Immun* 79: 1961-1970.
- **Mora-Montes, H. M., Robledo-Ortiz, C. I., González-Sánchez, L. C., López-Esparza, A., López-Romero, E. and Flores-Carreón, A. (2010b).**

Purification and biochemical characterisation of endoplasmic reticulum α 1,2-mannosidase from *Sporothrix schenckii*. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 79-85.

- **Murgui, A., Elorza, M.V., Sentandreu, R. (1985).** Tunicamycin and papulacandin B inhibit incorporation of specific mannoproteins into the wall of *Candida albicans* regenerating protoplast. Biochem. Biophys. Acta, 884: 552-558.
- **Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J.B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S.B., et al. (2005).** *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect. Immun. 73,3842–3850.
- **Nakamura, Y. (1976).** Purification and isolation of a biologically active peptidorhamnogalactan from *Sporothrix schenckii*. J. Dermatol. 3: 25–29.
- **Nakanishi-Shindo, Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y., Jigami, Y., (1993).** Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of α -1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 268, 26338–26345.
- **Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. y Jigami, Y. (1992).** OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. EMBO J. 7: 2511-2119.
- **Nakayama, K., Nakanishi-Shindo, Y., Tanaka, A., Haga-Toda, Y. y Jigami, Y. (1997).** Substrate specificity of α -1,6-mannosyltransferase that initiates N-linked mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 412: 547-550.
- **Navarro-Arias MJ, Defosse TA, Dementhon K, Csonka K, Mellado-Mojica E, Dias Valério A, et al., (2016).** Disruption of Protein

Mannosylation Affects *Candida guilliermondii* Cell Wall, Immune Sensing, and Virulence. *Front Microbiol.* 7:1951.

- **Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., & Ferwerda, G. (2006).** Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* 116, 1642–1650.
- **Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F. (2009).** Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta. *Blood* 113, 2324-2335.
- **Pérez-García, L. A., Csonka, K., Flores-Carreón, A., Estrada-Mata, E., Mellado-Mojica, E., Nemeth, T., et al. (2016).** Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction. *Front. Microbiol.* 7:306.
- **Previato, J.O., Gorin, P.A.J., Haskins, R.H. and Travassos, L.R. (1979).** Soluble and insoluble glucans from different cell types of *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* 3: 92–105
- **Resto, S., and N. Rodriguez-del Valle. (1988).** Yeast cell cycle of *Sporothrix schenckii*. *J. Med. Vet. Mycol.* 26:13–24.
- **Rodriguez-Caban, J.; Gonzalez-Velazquez, W.; Perez-Sanchez, L.; Gonzalez-Mendez, R., and Valle, N. (2011).** Calcium/calmodulin kinase1 and its relation to thermotolerance and HSP90 in *Sporothrix schenckii*: an RNAi and yeast two-hybrid study. *BMC Microbiology*;11(1):162.
- **Sassa, M. F., Ferreira, L. S., de Abreu Ribeiro, L. C., and Carlos, I. Z. (2012).** Immune response against *Sporothrix schenckii* in TLR-4-deficient mice. *Mycopathologia* 174, 21–30.
- **Sean, M. (2001).** What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus?. *FEBS Letters* 498: 223-227.
- **Song, Y., Zhong, S. X., Yao, L., Cai, Q., Zhou, J. F., Liu, Y., Hou, S., Li, S. (2011).** Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25:302–305.

- **Teixeira, M., de Almeida, L., Kubitschek, P., Alves, F., Kioshima, E., Abadio, A., et al., (2014).** Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics* . 15:943.
- **Torres-Rodríguez, B.I., Flores-Berrout, K., Villagómez-Castro, J.C. y López-Romero, E. (2012)** Purification and partial biochemical characterization of a membrane-bound type II-like α -glucosidase from the yeast morphotype of *Sporothrix schenckii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101: 313-322.
- **Travassos, L.R. and Lloyd, K. (1980).** *Sporothrix schenckii* and related species of *Ceratocystis*. *Microbiol. Rev.* 44: 683-721.
- **Travassos, L.R., Souza, W., Mendonça-Previato, L. and Lloyd, K.O. (1977).** Location and biochemical nature of surface components reacting with concanavalin A in different cell types of *Sporothrix schenckii*. *Exp. Mycol.* 1: 293–305.
- **Trujillo-Esquivel E., Franco B., Flores-Martinez A., Ponce-Noyola P., Mora-Montes H. M. (2016).** Purification of single-stranded cDNA based on RNA degradation treatment and adsorption chromatography. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 35, 404–409.
- **Trujillo-Esquivel, E.; Martínez-Alvarez, J.A.; Clavijo-Giraldo, D.M.; Hernández, N.V.; Flores-Martinez, A.; Ponce-Noyola, P., et al. (2017).** The *Sporothrix schenckii* gene encoding for the ribosomal protein L6 has constitutive and stable expression and works as an endogenous control in gene expression analysis. *Front Microbiol*; 8:1676.
- **Uenotsuchi, T., Takeuchi, S., Matsuda, T., Urabe, K., Koga, T., Uchi, H., et al. (2006).** Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. *Int. Immunol.* 18, 1637–1646.

- **Valentín, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall., Sentandreu, R. (1987).** Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 148: 88-94.
- **Wirawan, I.G., Kang, H.W., Kojima, M., 1993.** Isolation and characterization of a new chromosomal virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 175,3208–3212.
- **Zanni, E., Farina, F., Ricci, A., Mancini, P., Frank, C., Palleschi, C., Uccelletti, D., (2009).** The Golgi alpha-1,6 mannosyltransferase KIOch1p of *Kluyveromyces lactis* is required for Ca²⁺/calmodulin-based signaling and for proper mitochondrial functionality. *BMC Cell Biol.* 10, 86.
- **Zhang, Y.; Li, G.; He, D.; Yu, B.; Yokoyama, K., and Wang, L. (2011).** Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Microbiol Methods*; 84(3):418-422.