



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



TESIS

“Clonación y subclonación en el vector de expresión PUE08 de un fragmento del gen *hsp75* de *Sporothrix schenkii*”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

PRESENTA:

I.B.Q. SILVIA SOTO IBARRA

Durango, Dgo.

Junio 2018



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Clonación y subclonación en el vector de expresión pUE08
de un fragmento del gen *hsp75* de *Sporothrix schenkii*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR**

PRESENTA

I.B.Q. SILVIA SOTO IBARRA

APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS

D.C. ESTELA RUIZ BACA

Durango, Dgo.

Junio de 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**"Clonación y subclonación en el vector de expresión PUE08 de un
fragmento del gen *Hsp 75* de *Sporothrix schenckii*"**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR**

**PRESENTA
I.B.Q. SILVIA SOTO IBARRA**

Esquivel Naranjo Edgardo U.

APROBADA POR EL CO-DIRECTOR DE TESIS

D.C. EDGARDO ULISES ESQUIVEL NARANJO

Durango, Dgo.

Junio de 2018.





UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**“Clonación y subclonación en el vector de expresión pUE08
de un fragmento del gen *hsp75* de *Sporothrix schenckii*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR

PRESENTA

I.B.Q. SILVIA SOTO IBARRA

APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL

D.C. ESTELA RUIZ BACA
PRESIDENTE

D.C. MARIBEL CERVANTES FLORES
SECRETARIO

D.C. MA. LETICIA SAUCEDO MENDIOLA
VOCAL

Durango, Dgo.

Junio de 2018

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Genoproteómica de la Facultad de Ciencias Químicas (unidad Durango) de la Universidad Juárez del Estado de Durango, bajo la dirección y supervisión de la D.C. Estela Ruiz Baca, y en el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección de él D.C. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo de beca mixta para realizar una estancia en la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la universidad Juárez del Estado de Durango por haberme brindado la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado en la Facultad de Ciencias Químicas.

Agradezco a mi comité tutorial, en especial a la D.C Estela Ruiz Baca, por su atención, dirección, amabilidad, apoyo, y asesoramiento a lo largo del proyecto.

Al equipo *Schenckii*, en especial a la M.B.M.C Bertha Cristina Calderón Barraza por su gran colaboración, apoyo, generosidad, amabilidad y por su gran amistad.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por permitirme la oportunidad de realizar varias estancias en el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos.

Al equipo LAMIMO UAQ en especial al D.C Edgardo Esquivel Naranjo por su valiosa colaboración, Co-dirección y apoyo en este proyecto.

Gracias a mis profesores de maestría por sus enseñanzas guiadas a este proyecto a la D.C Maribel Cervantes y D.C Leticia Saucedo. Agradezco su gran apoyo en uso de equipo de laboratorio, al D.C Gerardo Anguiano, D.C Eda Guadalupe Ramírez, D.C Norma Urtiz y D.C Marcelo Barraza.

Agradezco a todos mis amigos en especial a M.C Laura Anabel Páez Oliván, M.C Mireya Lozano Morales e Ing. Orton Gabriel Medel Delgado, por su apoyo incondicional, su invaluable amistad, y por creer en mí.

Un especial agradecimiento con mucho cariño al Ing. Jorge Morales Estrada por su comprensión, respeto, apoyo y confianza.

A mis compañeros de maestría: Efraín, Liz, Sharon, Fer, Linyu e Iván, por su apoyo, tiempo y enseñanzas.

Dedico el presente trabajo a mis padres, a mis hermanos y hermanas, a mis profesores a quienes reitero mi agradecimiento y a todas las personas que colaboraron directa o indirectamente con la realización de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
INDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Esporotricosis.....	1
1.2 Epidemiología.....	2
1.3 Diagnóstico y tratamiento.....	3
1.4 Mecanismo de propagación y transmisión.....	4
1.5 <i>Sporothrix schenckii</i>	5
1.5.1 Morfología.....	6
1.6 Pared Celular fúngica.....	7
1.6.1 Adhesinas.....	8
1.7 Proteínas de choque térmico.....	8
1.8 Clonación.....	9
1.8.1 Clonación bacteriana.....	9
1.8.2 Vector de clonaje.....	10
1.9 Transformación genética en hongos.....	11
1.10 Silenciamiento génico.....	12
II. ANTECEDENTES.....	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Cepas.....	19
5.2 Oligonucleótidos.....	19
5.2.1 Diseño de oligonucleótidos.....	19
5.3 Plásmidos.....	21
5.3.1 Vector de clonación pGEM-T.....	21
5.3.2 Vector de expresión pUE08.....	23
5.4 Condiciones de cultivo para extracción de ADN y ARN.....	24

5.4.1	Extracción de ADN genómico.....	24
5.5	Retrotranscripción (RT).....	25
5.5.1	Extracción de ARN.....	25
5.5.2	Conversión a ADNc.....	26
5.6	Amplificación de un fragmento del gen <i>hsp75</i>	27
5.7	Geles de agarosa.....	27
5.8	Purificación del producto de PCR.....	28
5.9	Preparación de células competentes químicas y transformación.....	28
5.10	Clonación de un fragmento de 357 pb del gen <i>hsp75</i> en el vector PGEM-T.....	29
5.11	Extracción de ADN plasmídico de <i>S. schenckii</i>	30
5.12	Restricción enzimática del fragmento de 357 pb del gen <i>hsp75</i> clonado en el vector pGEM-T.....	31
5.13	Subclonación del fragmento de 357 pb gen <i>hsp75</i> en el vector de expresión pUE08.....	31
5.13.1	Evaluación de la orientación del fragmento del gen <i>hsp75</i> en el vector pUE08.....	32
VI.	RESULTADOS.....	33
VII.	DISCUSIONES.....	48
VIII.	CONCLUSIONES.....	51
IX.	PERSPECTIVAS.....	52
X.	REFERENCIAS.....	53

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADNp	Acido desoxirribonucleico plasmídico
AMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
APE	A Plasmid Editor
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Antisentido
ATCC	American Type Culture Collection
BrEt	Bromuro de etidio
DEPC	Dietil-pirocarbonato
H	Horas
Hph	Gen de resistencia a higromicina
Hsp	Proteína de choque térmico
IK	Yoduro de potasio
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
kv	Kilovolt
L	Litros
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos

ml	Mililitros
mm	Milímetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución Buffer de fosfatos
PC	Pared celular
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
p/v	Peso sobre volumen
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
siRNA	Ácido ribonucleico de cadena simple
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
V	Voltios
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
YPG	Extracto de levadura–peptona-dextrosa
µg	Microgramos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estados de la República Mexicana que presentan esporotricosis.....	3
Figura 2	Especies pertenecientes al grupo <i>Sporothrix</i>	5
Figura 3	Morfología de <i>Sporothrix schenckii</i>	6
Figura 4	Inserción de ADN exógeno en un plásmido mediante el uso de enzimas de restricción EcoRI y BamHI.....	11
Figura 5	Secuencia codificante del gen <i>hsp75</i>	20
Figura 6	Mapa del vector pGEM-T.....	22
Figura 7	Mapa del plásmido pUE08 de expresión constitutiva.....	23
Figura 8	Mapa del plásmido pUE08 con el fragmento de 357 pb insertado en orientación antisentido, generado en el programa APE con un tamaño de 6476 pb.....	32
Figura 9	Análisis de la integridad del ADN genómico extraído de la fase micelial de <i>S. schenckii</i>	34
Figura 10	Amplificación de un fragmento de 590 pb del gen <i>hsp75</i> a partir de ADN genómico de la fase micelial de <i>S. schenckii</i>	35
Figura 11	Cultivo del morfotipo micelial de <i>S. schenckii</i>	36
Figura 12	Evaluación de integridad de ARN extraído de la fase micelial de <i>S. schenckii</i>	36
Figura 13	Amplificación de un fragmento de 357 pb del gen <i>hsp75</i> a partir de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de la fase micelial de <i>S. schenckii</i>	37
Figura 14	Cultivo de células transformantes de <i>E. coli</i> DH5α con el vector PGEM-T.....	38
Figura 15	Evaluación de ADN plasmídico extraído de 9 células blancas transformantes.....	39
Figura 16	Evaluación por duplicado de restricción enzimática con NotI y BamHI del ADN plasmídico extraído de dos cepas transformantes de <i>E.coli</i>	40
Figura 17	Linearización del vector pUE08 utilizando la enzima NotI.....	41

Figura 18	Cultivo de células transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α con el vector pUE08.....	42
Figura 19	Evaluación de ADN plasmídico extraído de las 13 células transformantes de <i>E. coli</i>	43
Figura 20	PCR para amplificación del gen Hph.....	44
Figura 21	Digestión con las enzimas de restricción <i>NotI</i> y <i>BamHI</i> a partir del ADN plasmídico de las cepas transformadas de <i>E. coli</i> DH5 α con el vector PUE08 con el fragmento de 357 pb del gen <i>hsp75</i> integrado.....	45
Figura 22	PCR a partir del ADN plasmídico de las cepas transformadas de <i>E. coli</i> DH5 α con el vector PUE08 con el fragmento de 703 pb del gen <i>hsp75</i> integrado.....	46
Figura 23	PCR a partir de ADN plasmídico de las cepas transformadas de <i>E. coli</i> DH5 α con el vector PUE08 con el fragmento de 420 pb del gen <i>hsp75</i> integrado.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Formas clínicas de esporotricosis.....	2
Tabla 2	Secuencia de oligonucleótidos generados	21
Tabla 3	Composición de buffers empleados para la extracción de ADN genómico de <i>S. schenkii</i>	25
Tabla 4	Oligonucleótidos empleados en PCR para verificar la orientación del fragmento <i>hsp75</i> en el vector pUE08.....	33

RESUMEN

La esporotricosis es una micosis subcutánea cosmopolita causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Esta enfermedad tiene varias formas clínicas dependiendo de la interacción del microorganismo con el hospedero.

La adhesión de un patógeno a los tejidos del huésped es un paso esencial en enfermedades infecciosas que conducen a la diseminación del microorganismo. En *S. schenckii* se ha descrito que esta interacción es mediada por glicoproteínas tipo adhesinas presentes en la pared celular. Estudios de nuestro grupo de trabajo identificaron una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp75) se une a proteínas de la matriz extracelular y la cual pudiera tener un papel relevante en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de este hongo.

En el presente trabajo se llevó a cabo la clonación y subclonación de un fragmento de 357 pb del gen que codifica para una proteína de choque térmico de 75k Da (Hsp75) de la fase micelial de *S. schenckii*. Primeramente se amplificó y purificó el fragmento de 357 pb a partir de ADNc. Para la clonación del fragmento de 357 pb se utilizó el vector de clonación múltiple pGEM-T y células de *E. coli* DH5α. Se obtuvieron colonias transformantes de las cuales se seleccionaron 3 colonias blancas a las cuales se les extrajo el ADNp con el cual se realizó digestión enzimática con NotI y BamHI. En el análisis de los productos de digestión se observó una banda de 3015 pb aprox. correspondiente al vector pGEM-T y una banda de 357 pb aprox. correspondiente al fragmento del gen de *hsp75*. Posteriormente el fragmento del gen *hsp75* se cortó del gel de agarosa y se purificó para subclonarlo en el vector de expresión constitutiva pUE08. El vector pUE08, contiene un cassette de resistencia a higromicina y cloranfenicol, un sitio promotor de *Trichoderma reesei* y un sitio terminador de *Aspergillus nidulans*. Se obtuvieron 13 células transformantes a las cuales se les realizó extracción de ADNp y se realizó PCR para verificar la presencia del gen *hph* de higromicina. observando que en 3 colonias se logró amplificar un fragmento de 1400 pb correspondiente al gen *hph*. Posteriormente, se llevaron a cabo digestiones enzimáticas con NotI y BamHI encontrando que dos cepas liberaron dos fragmentos, uno de 6100 pb correspondiente

al vector pUE08 y otro de 357 pb correspondiente al fragmento del gen *hsp75*. A las cepas que presentaron el fragmento de 357 pb se les analizó la orientación del fragmento subclonado mediante digestión enzimática y PCR utilizando oligos específicos. Los resultados nos indican que en las dos cepas transformantes analizadas se subclonó el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación sentido.

Palabras clave: Esporotricosis, *Sporothrix schenckii*, Adhesinas, Hsp75.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a cosmopolitan subcutaneous mycosis caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. This disease has several clinical forms depending of interaction of the microorganism with the host.

The adhesion of a pathogen to the tissues of the host is an essential step in infectious diseases that lead to the spread of the microorganism. In *S. schenckii* it has been described that this interaction is mediated by adhesin type glycoproteins present in the cell wall. Previous studies identified a heat shock protein of 75 kDa (Hsp75) binds to proteins of the extracellular matrix and which could have a relevant role in the mechanisms of pathogenicity and virulence of this fungus.

In the present work, the cloning and subcloning of a fragment of 357 bp of the gene coding for a heat shock protein of 75 kDa (Hsp75) of the mycelial phase of *S. schenckii* was carried out. First, the 357 bp fragment was amplified and purified from cDNA. For the cloning of the 357 bp fragment, the multiple cloning vector pGEM-T and *E. coli* DH5α cells were used. Transformant colonies were obtained, of those, three white colonies were selected for pDNA extraction and enzymatic digestion with NotI and BamHI. In the analysis of the digestion products, a band of 3015 bp was observed and corresponded to the vector pGEM-T and a band of 357 bp that corresponded with the fragment of the *hsp75* gene. Subsequently, the *hsp75* gene fragment was cut from the agarose gel and purified to subclone into the constitutive expression vector pUE08. The pUE08 vector contains a resistance cassette to hygromycin and chloramphenicol, a *Trichoderma reesei* promoter site and an *Aspergillus nidulans* terminator site. Thirteen transformant cells were obtained and pDNA extraction were performed. PCR was performed to verify the presence of the hygromycin *hph* gene. We observed that in 3 colonies a fragment of 1400 bp corresponding to the *hph* gene was amplified. Subsequently, enzymatic digestions with NotI and BamHI were carried out, finding that two strains released two fragments, one of 6100 bp corresponding to the pUE08 vector and another of 357 bp corresponding

to the fragment of the *hsp75* gene. Strains that presented the 357 bp fragment were analyzed for orientation of the 357 bp fragment by enzymatic digestion and PCR using specific oligos. The results indicated that in the analysis of two transformant strains, the 357 bp fragment of the *hsp75* gene was subcloned in sense orientation.

Key words: Sporotrichosis, *Sporothrix schenckii*, Adhesins, Hsp75

INTRODUCCIÓN

1.1 Esporotricosis

La esporotricosis es una micosis subcutánea causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Esta enfermedad tiene varias formas clínicas (Tabla 1), hasta ahora, no hay pruebas científicas claras que puedan explicar la aparición cutánea diseminada y/o formas extracutáneas de esporotricosis en pacientes inmunocompetentes (Lima *et al.*, 2001). Estas observaciones clínicas indican que además del historial inmunológico del huésped, otros factores asociados con el patógeno pueden deteriorar las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, tales como factores de virulencia (es decir, adhesinas) y moléculas antigénicas (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

Aunque la vía de entrada del hongo es generalmente por inoculación cutánea, en ocasiones es por vía inhalatoria causando una neumonitis granulomatosa con frecuencia cavitada. También puede haber diseminación hematógena con posterior localización osteoarticular, en el sistema nervioso central, aparato genitourinario y ojos, en el huésped inmunocompetente o enfermedad multifocal en el huésped inmunodeprimido (Barros *et al.*, 2011).

La esporotricosis se distribuye actualmente por todo el mundo, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales. La infección se produce generalmente por inoculación traumática de suelo, las plantas y la materia orgánica contaminada con el hongo. Ciertas actividades de ocio y ocupacionales, como la floricultura, la agricultura, la minería y la explotación de madera, se asocian tradicionalmente con la micosis (Barros *et al.*, 2011).

Tabla 1. Formas clínicas de esporotricosis (Carrada, 2012).

ESPOROTRICOSIS			
CUTÁNEA	MUCOSAS	EXTRACUTÁNEA	ESPOROTRICOSIS- INFECCIÓN
-Linfocutánea -Fija o localizada: • nodulopapular • ulcerosa • verrucosa • furunculoide	-Ocular - Nasal - Faríngea	-Osteoarticular y tendinosa - Pulmonar - Meníngea - Diseminada	Sin lesiones aparentes

1.2 Epidemiología

La esporotricosis presenta amplia distribución mundial; en el continente americano los países con mayor endemicidad son El Salvador, Uruguay, Colombia, Venezuela, México y Brasil (Munguía *et al.*, 2007).

En la República Mexicana ocupa el primer lugar entre las micosis subcutáneas, después del micetoma. Dos entidades federativas han registrado el mayor número de casos confirmados: la Ciudad de México y Jalisco, seguidos por Guanajuato (Acámbaro y Dolores Hidalgo). Otro foco endémico principal se encuentra en la Sierra Norte de Puebla (Huachinango, Necaxa, Xicotepec de Juárez), extendiéndose por los valles y cañadas de la Sierra Madre Oriental por Hidalgo y Veracruz (las Huastecas), además del Estado de México, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Nayarit, San Luis Potosí, Zacatecas y Querétaro (Fig. 1)(Carrada, 2012).



Figura 1. Estados de la Republica mexicana que presentan esporotricosis (Carrada, 2012).

1.3 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se confirma por cultivo e identificación del hongo. El aislamiento de *S. schenckii* se obtiene fácilmente después de la extensión de las muestras clínicas en agar Sabouraud con cloranfenicol y en medios con cicloheximida. Después de 5 a 7 días de incubación a 25 °C, comienzan a crecer colonias hialinas filamentosas, y después de algún tiempo, pueden desarrollar un color oscuro, por lo general en los centros de las colonias (Murray, 2006; Bonifaz, 2010).

Otro método específico y rápido es el de la inmunofluorescencia directa, que se aplica a impresiones de biopsias de tejidos afectados o a extensiones de esputos y lavajes bronquiales. En pacientes con esporotricosis extracutáneas son de utilidad las pruebas serológicas (aglutinación del látex, inmunodifusión, inmunofluorescencia indirecta). Las pruebas serológicas tienen el inconveniente de que los anticuerpos pueden tardar en establecerse o desaparecer después de un tiempo, a pesar de que la enfermedad persista (Pluss-Opal, 1986).

Para el tratamiento de la forma cutánea se puede usar yoduro de potasio (IK) por vía oral. El IK tiene sabor metálico y es más agradable cuando se toma con zumos, leche o bebidas carbonatadas. Los efectos indeseables incluyen náuseas, anorexia, diarrea, sialorrea, aumento de la glándula parótida o lacrimal y erupción acneiforme. Estos efectos pueden disminuir con la reducción de la dosis o con el cese temporal de la terapia.

En los casos extracutáneos se obtuvieron buenos resultados con ketoconazol e itraconazol, o con el nuevo triazol oral, el saperconazol. El tratamiento con este último antimicótico requiere una dosis de 100 a 200 mg diariamente por un plazo de 3,5 meses (Franco *et al.*, 1992).

1.4 Mecanismo de propagación y transmisión

La transmisión se produce principalmente por inoculación del hongo *S. schenckii* en la piel mediante pinchazos o arañazos con objetos contaminados como: plantas espinosas, paja, astillas, herramientas, etc. También por arañazo, picadura o mordedura de animales como los gatos, perros, loros, insectos, armadillos, espinas de pescado (zoonosis). La esporotricosis felina es notoria por su potencial de transmitir la infección al hombre. Los gatos (generalmente machos) pueden tener entre las uñas restos vegetales con el hongo y transmitir la infección a otros gatos cuando pelean. También se puede dar por contaminación de heridas con el suelo o elementos contaminados, como ropa o herramientas de trabajo (Carrada, 2012).

Otra vía de penetración del hongo es la aerógena, por inhalación del hongo, que es responsable del pequeño número de casos de esporotricosis pulmonar que se ha descrito (Acha-Boris, 2001).

En los últimos años, la incidencia de las infecciones causadas por *S. schenckii*, han tenido un significativo incremento, la esporotricosis ha sido reportada como una micosis emergente debido a la amplia prevalencia en pacientes con terapias inmunosupresivas, SIDA, cáncer y alcoholismo (Lopes- Bezerra *et al.*, 2006).

1.5 *Sporothrix schenckii*

S. schenckii es un hongo patógeno de humanos y animales, se le atribuye ser la causa de esporotricosis (Costa et al., 2008). Perteneciente al reino fungi, es un organismo eucariote heterótrofo sin movilidad que presenta quitina en su pared celular. Durante varios años, este hongo se incluyó en la división Eumycetos, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Moniliales y familia Moniliaceae. Este hongo se caracteriza en la división Ascomycota, clase Pyrenomycetes, orden Ophiostomatales, y la familia Ophiostomataceae (Barros et al., 2011).

Marimon et al. (2006) en su investigación sobre la base fenotípica y genotípica del complejo *Sporothrix*, sugieren que *S. schenckii* no debe considerarse la única especie que causa esporotricosis, ya que existen otras especies pertenecientes al complejo como (i) *S. globosa*, un hongo distribuido Mundial; (ii) *S. brasiliensis*, la especie relacionada con la epidemia zoonótica de esporotricosis en Rio de Janeiro, Brasil; (iii) *S. mexicana*, limitada a México; y (iv) *S. albicans (pallida)*. Diferenciándose de *S. schenckii* principalmente en la forma tisular por la producción de células grandes, a menudo septadas en ciernes, incapaces de asimilar creatinina o creatina, además las dos últimas especies (*S. mexicana* y *S. albicans*) se caracterizan por su incapacidad infecciosa (Fig. 2) (Marimon et al., 2006)

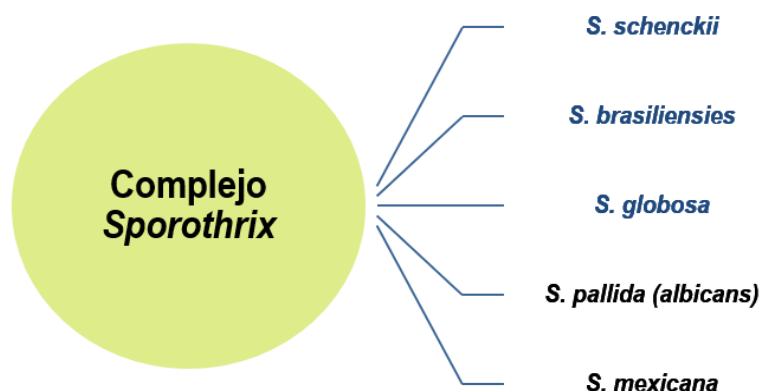


Figura 2. Especies pertenecientes al complejo *Sporothrix*; en azul se muestran las especies causan infección en humanos y animales; en negro las especies con incapacidad infecciosa. (Barros et al ., 2011).

1.5.1 Morfología

S.schenckii es un hongo dimórfico, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, en forma de levadura a 37°C en tejidos animales o humanos y como hongo filamentoso a 25°C en la naturaleza (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

En el morfotipo micelial forma colonias, inicialmente claras, húmedas o levaduriformes, que posteriormente se convierten en colonias duras y arrugadas de color marrón o negro en su totalidad o por zonas. Microscópicamente se observan hifas finas, hialinas, ramificadas, septadas con conidióforos con conidios ovoides o piriformes, que se agrupan en forma de ramillete o de pétalos de margarita (Fig. 3A).

En el morfotipo levaduriforme forma colonias cremosas, glabras, blanco amarillentas. Las células tienen diferentes formas (oval, lágrima, forma de cigarro) con varias gemaciones (Fig. 3B). En muestras procedentes de lesiones humanas es característico el fenómeno de cuerpo asteroide en el que se observa una disposición radial de las levaduras, concéntricas unas de las otras (Fig. 3C) (Lopes-Bezerra *et al.*, 2006).

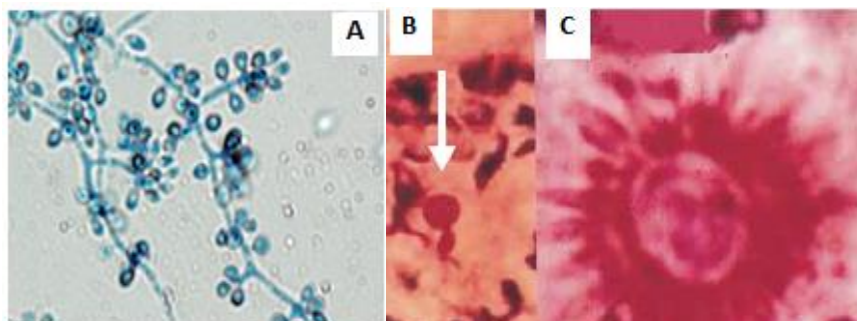


Figura 3. Morfología de *S. schenckii*. **A)** Se observan hifas ramificadas y tubulares (1-2 µm de diámetro), recargadas con microconidios en forma de un «matraz invertido y triangular» **B)** levadura redondeada de color rojo brillante, (flecha) dentro de micro área necrótica. **C)** cuerpo asteroide con micro clavatas periféricas radiales (Carrada, 2012).

La morfogénesis en hongos dimorfos ha sido investigada desde varios puntos de vista, principalmente a nivel de pared celular, con el objetivo de determinar los mecanismos de transición morfológica y la formación de células (Previato, 1979). Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica (Pontón, 2008).

1.6 Pared Celular Fúngica

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella componentes de la superficie celular y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula. La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse el talón de Aquiles de los hongos y por tanto, una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos (Pontón *et al.*, 2008).

Las interacciones físicas de los microorganismos patógenos de plantas y animales con el hospedero, se presenta a nivel de la superficie celular. En el caso de bacterias y hongos, los constituyentes protéicos de la pared celular del patógeno involucrados en dicho proceso, son denotados comúnmente como “adhesinas” (Bernal *et al.*, 2009).

1.6.1 Adhesinas

El reconocimiento de las células epiteliales se realiza a través de manoproteínas de superficie (adhesinas) que se unen a receptores que contienen carbohidratos (lectinas). No se ha estudiado la adherencia de hongos a células de mamíferos en la misma medida que la adherencia bacteriana. La mayoría de los experimentos sobre adherencia fúngica se ha hecho con *C. albicans*. La evolución de este organismo como comensal de los seres humanos probablemente resultó en su capacidad para colonizar las células epiteliales de la mucosa y seleccionar otros atributos que promuevan su invasión (Sturtevant-Calderone,1997). Las proteínas de la pared celular que median esta adhesión son consideradas un factor de virulencia. Ramírez *et al.* (2015) reportaron que proteínas multifuncionales también denominadas “moonlight” que se localizan en la pared celular en especies de *Candida* juegan un papel importante para que las especies de *Candida* se adhieran y colonicen células huésped, además de adaptarse a especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por células fagocíticas del huésped humano. Entre las 15 proteínas multifuncionales descritas por Ramírez *et al.* (2015) se identificaron dos proteínas de choque térmico Ssb1 y Ssa2 a las cuales se les atribuyó funciones como interacción con el hospedero y respuesta a estrés.

1.7 Proteínas de choque térmico

Las proteínas del choque térmico (Hsp) constituyen una familia que se encuentra en forma constitutiva en todas las células procariotas y eucariotas. Cumplen diversas funciones fisiológicas: colaboran en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas en formación, interviniendo en su ensamble, translocación y secreción así como también en la degradación o reparación de proteínas anormales, actuando como chaperonas moleculares. Cuando las células son sometidas a distintos estímulos como el estrés del choque calórico, radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, etc., las Hsp se sobreexpresan. De esta manera confieren protección a las células, volviéndolas resistentes a la apoptosis (Coronato, 1999).

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo han logrado identificar una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp75) de pared celular de *S. schenckii* con afinidad a Fibronectina, Laminina y Colágeno tipo II. Además se demostró que la Hsp75 se encuentra glicosilada al presentar afinidad a la lectina de Concanavalina A (Con-A) (Salas-Leal, 2014). Estos resultados nos sugieren que la Hsp75 pudiera tener un papel relevante en los procesos de adhesión a las células huésped del hongo. Sobre esta base, nuestra meta prioritaria en esta propuesta es clonar y subclonar en orientación antisentido un fragmento del gen *hsp75* en el vector de expresión constitutiva pUE08 el cual se utilizará para llevar a cabo el silenciamiento de este gen en el hongo *S. schenckii*. A las células transformantes que presenten el gen *hsp75* silenciado se caracterizará su fenotipo para determinar el papel que juega esta proteína en los mecanismos de adhesión de este hongo y si pudiera ser una proteína blanco para desarrollar alternativas potenciales de tratamiento contra esta micosis.

1.8 Clonación

1.8.1 Clonación bacteriana

Desde el descubrimiento de *Escherichia coli* (*E. coli*) como el hospedero más práctico para la introducción de ADN foráneo, se ha implementado como el sistema más común en el campo de la genética y de la biología molecular (Yoshida *et al.*, 2009). En algunos estudios otras especies bacterianas como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Wagoner *et al.*, 2004; Böttig *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2009), han sido consideradas blanco de uso para clonación y expresión de recombinantes, no obstante se determinó que no poseen la misma habilidad de *E. coli* para introducir y clonar ADN exógeno.

Para la clonación en una bacteria es necesario realizar el proceso de transformación, el cual puede realizarse mediante varios métodos como transformación química, térmica, electro transformación y transformación biolística (Yoshida *et al.*, 2009). Generalmente el proceso de transformación en bacteria se lleva a cabo por choque térmico y electroporación donde las células son sometidas a choques eléctricos con voltajes que

varían según el tipo celular; este método es ampliamente utilizado debido a que requiere pocos pasos y ofrece más facilidades frente a otras técnicas (Current Protocols In Molecular Biology, 2003).

Clonar implica introducir un fragmento de ADN en un vector. Los vectores de clonación, deben permitir la inserción de un fragmento de ADN extraño y ser capaces de replicarse normalmente dentro de la bacteria. Los plásmidos tienen la capacidad de autorreplicarse y son elementos génicos factibles de ser transferidos entre bacterias e introducidos en una cepa deseada, por lo tanto constituyen buenos vectores de clonación (Watson *et al.*, 1998).

1.8.2 Vector de clonaje

El principio de la clonación en biología molecular consiste en insertar un segmento de ADN extranjero en una molécula pequeña capaz de replicarse automáticamente. A ése tipo de molécula de ADN se lo denomina vector de clonaje.

Los plásmidos son excelentes vectores de clonaje. Puede ser "cortado" con una o dos enzimas de restricción o puede incorporársele un fragmento de ADN que ha sido previamente cortado usando las mismas enzimas de restricción (Fig. 4). Los plásmidos así modificados se los denomina plásmidos recombinados. En éste estado, se los introduce entonces en una bacteria donde serán replicados (Barcia-Macay, 2005)..

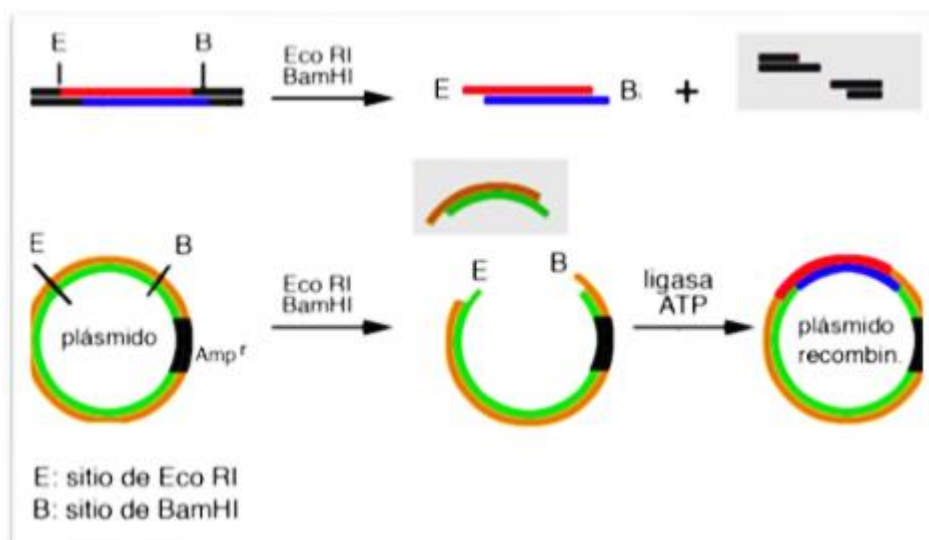


Figura 4. Inserción de ADN exógeno en un plásmido mediante el uso de enzimas de restricción Eco RI y BamHI (Barcia-Macay, 2005).

1.9 Transformación genética en hongos

Una de las estrategias más efectivas para determinar la función biológica de una proteína es examinar el fenotipo de organismos que contienen mutantes en el gen codificante de la misma. Una vía de estudio puede ser aislar mutantes nulas mediante el escrutinio de una colección previamente obtenida por mutagénesis o si es posible mediante la interrupción del locus de interés utilizando casetes apropiados (Jiang *et al.*, 2013).

La manipulación genética molecular de microorganismos requiere el desarrollo de sistemas de transformación mediados por plásmidos que incluyen: (i) la infusión de ADN exógeno en células receptoras; (ii) la expresión de los genes presentes en el ADN entrante; y (iii) el mantenimiento y la replicación del ADN insertado estable, conduce a la expresión de la característica fenotípica deseada (Ruiz-Diez *et al.*, 2002).

En particular, los hongos filamentosos resultan ser sistemas muy atractivos para aplicar metodologías de transformación. El aislamiento de marcadores genéticos para la construcción de vectores de hongos y la caracterización de la transformación genética

son requisitos indispensables para el desarrollo de sistemas de clonación en estos organismos. Los primeros reportes de transformación de hongos filamentosos surgieron en 1979 cuando se introdujo ADN dentro de protoplastos de *Neurospora crassa* (Buxton *et al.*, 1983). La transformación genética es una alternativa para el conocimiento de genes involucrados en la patogenicidad de los hongos. A la fecha se han transformado algunos hongos utilizando técnicas que incluyen tratamientos por medio de agitación con perlas de vidrio, electroporación protoplastos , biobalística, *Agrobacterium tumefaciens* (AMT) y transformación a través de ondas de choque entre otros (Acosta *et al.*, 2011),.

1.10 Silenciamiento génico

Las técnicas generales de silenciamiento génico son aquellas capaces de impedir la expresión de un gen endógeno con independencia de su secuencia constituyen procedimientos habituales de mutación inespecífica empleados convencionalmente en la obtención de mutantes afectados en diversos procesos enzimáticos (Burraco, 2005). Entre las técnicas de silenciamiento que hacen uso de la secuencia del gen que se busca inactivar pueden destacarse las siguientes:

- 1) ARN antisentido: consiste en la síntesis de un ARNm complementario al del gen cuya expresión se desea inactivar. Esto puede llevarse a cabo mediante la fusión transcripcional de un promotor constitutivo con el ADNc antisentido del gen que se busca inactivar.
- 2) Otra alternativa pasa por la secuencia de la región transcrita o por la expresión simultánea de ARNs sentido y antisentido. Esta técnica parece conllevar su integración en una ruta general de degradación de ARN bicatenario responsable de los fenómenos de silenciamiento postranscripcional (Burraco, 2005).
- 3) “RNA interferencia” que consiste en introducir en la célula pequeños fragmentos de ARN de doble cadena (siRNAs) o secuencias de ADN diseñadas para generarlos. (Vila *et al.*, 2009).

Estudios por Rodriguez *et al.*, (2011) reportaron el uso de tecnología RNAi para silenciar la expresión del gen *sscmk1* en *S. schenckii*. Los transformantes fueron incapaces de crecer como células de levadura a 35 °C mostrando disminución de la tolerancia a esta temperatura. Este estudio constituye el primer reporte de transformación y silenciamiento de genes de *S. schenckii*.

ANTECEDENTES

La adhesión de un patógeno a los tejidos del huésped es un paso esencial en enfermedades infecciosas que conducen a la diseminación del microorganismo. Estudios previos han descrito la interacción entre *S. schenckii* con proteínas de la matriz extracelular (ECM). Lima *et al.* (1999) demostraron que existen diferencias entre las fases morfológicas de conidios y levaduras en la capacidad de unión a proteínas de ECM como entactina, fibronectina (FN), laminina, colágeno tipo I y colágeno de tipo IV, las cuales están involucradas en la adhesión de algunos hongos patógenos como *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *H. capsulatum*.

Las interacciones de los microorganismos patógenos con el hospedero, se presentan a nivel de la superficie celular. En el caso de los hongos patógenos, los constituyentes proteicos de la pared celular involucrados en dicho proceso, son denotados comúnmente como “adhesinas” (Bernal *et al.*, 2009). Por ejemplo, el patógeno oportunista *C. albicans* (agente causal de la candidiasis), se le han caracterizado las siguientes adhesinas: 1) Manoproteínas de diferente peso molecular (30, 55, 58 60, 66, 70, 130 y 165 kDa) que median la unión a proteínas de la matriz extracelular ; 2) INT1p: Adhesina involucrada en la adhesión a epitelios; 3) La proteína de pared micelial Hwp1 y la proteína de adherencia extracelular Eap1. Para *H. capsulatum*, agente causal de la histoplasmosis, fue reportado una adhesina tipo lectina (50 kDa) de unión a laminina *Fonsecaea pedrosoi* (agente causal de la cromoblastomycosis) posee una adhesina tipo lectina de 50 kDa que reconoce manosa (Bernal *et al.*, 2009).

En *S. schenckii* se ha estudiado una glicoproteína de 70kDa (gp70) aislada de la pared celular de la fase de levadura. El glicopéptido purificado tiene un punto isoeléctrico (pI) de 4.1, y aproximadamente 5.7% de su masa molecular se compone de N-ligados a glicanos. Esta glicoproteína tiene una distribución uniforme en la superficie de la célula fúngica y se ha demostrado que participa en la adhesión a la matriz dérmica extracelular de cola de ratón (Ruiz-Baca *et al.*, 2009). Otros estudios han demostrado que gp70 tiene afinidad a la proteína de Fibronectina (Castro *et al.*, 2013).

En ciertos hongos, el cambio en la temperatura desde 25° a 37 °C se asocia con intensos cambios morfológicos resultantes de micelio a la transición levadura (Jefferson *et al.*, 2011). Por otra parte, este fenómeno inducido por el calor se acompaña de una respuesta de choque, que a su vez da lugar a cambios en varios procesos metabólicos, que involucra la sobreexpresión e implica la síntesis de un conjunto de proteínas, conocidas bajo el nombre de Hsp (*Heat shock proteins*) o proteínas anti-estrés. Las proteínas Hsp pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células eucariotas y procariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas y la inducción de otras, de la misma familia, que no son constitutivas. Su función es minimizar los daños producidos por el estrés. Las células en cultivo responden de manera similar a cambios en su medio ambiente habitual o situaciones de estrés, iniciándose una respuesta que implica la síntesis de Hsp o proteínas anti estrés (Coronato *et al.*, 1999).

Estudios en hongos patógenos como *Cryptococcus neoformans* han demostrado la presencia de Hsp por inmunofluorescencia en su superficie celular la cual han asociado con la interacción del hongo con las células del hospedero (Chaffin, 2008; Silveira *et al.*, 2013). En *H. capsulatum* se ha demostrado que una Hsp recombinante Hsp60 inhibe la unión de la fase levaduriforme hacia células ováricas de hámster (Long *et al.*, 2003). Estos resultados nos muestran la relación de Hsp con la adhesión a células hospederas. En el hongo *P. brasiliensis* una Hsp encargada de la regulación del cambio dimórfico que participa como chaperona presente en la mitocondria del hongo también se encuentra en la pared celular pero no se ha demostrado su participación como molécula de adhesión (Batista *et al.*, 2006).

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo han logrado identificar una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp75) de pared celular de *S. schenckii* con afinidad a Fibronectina, Laminina y Colágeno tipo II. Además se demostró que esta glicosilada al

presentar afinidad a la lectina de Concanavalina A (Con-A) (Salas-Leal, 2014). Estos resultados nos sugieren que Hsp75 pudiera tener un papel relevante en los procesos de adhesión a las células huésped del hongo. Sobre esta base, nuestra meta prioritaria en esta propuesta es clonar y subclonar en el vector de expresión pUE08 en orientación antisentido un fragmento de 357 pb del gen *hsp75*. Este vector se utilizará para llevar a cabo un silenciamiento génico y determinar de esta manera el papel que juega esta proteína en los mecanismos de patogenicidad de este hongo y si pudiera considerarse una proteína blanco para desarrollar alternativas potenciales de tratamiento contra esta micosis.

JUSTIFICACIÓN

En las ultimas décadas, las enfermedades relacionadas con *S. schenckii* han ido en aumento sobre todo en pacientes inmunocomprometidos. Las proteínas tipo adhesinas de la pared celular fúngica han sido consideradas como factores de patogenicidad y virulencia. Estudios recientes del grupo de trabajo han logrado identificar una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp75) de la PC de *S. schenckii* afín a proteínas de la matriz extracelular.

En base a estos antecedentes, en la presente propuesta se pretende clonar y subclonar en antisentido en el vector de expresión constitutiva pUE08 un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* de la fase micelial de *S. schenckii*. Con este vector posteriormente se utilizará para hacer silenciamiento génico de la Hsp75 y determinar si esta proteína juega un papel relevante en los mecanismos adhesión de *S. schenckii*.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Clonar y subclonar en el vector de expresión pUE08 un fragmento de 357 pb del gen que codifica para una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp75) de la fase micelial de *S. schenckii*.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Extraer ARN y sintetizar ADNc a partir de la fase micelial de *S. schenckii*
- 2) Amplificar un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* y clonarlo en el vector pGEM-T.
- 3) Subclonar en antisentido el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en el vector de expresión pUE08.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas

Se utilizó la cepa ATCC 58251 de *S. schenckii* y la cepa de *E. coli* DH5 α .

Para cultivar el hongo, se utilizó cajas con agar YPG, el cual contiene: extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 1%, dextrosa 2%, agar 2%, pH 4.5. Las cajas se inocularon con una suspensión de esporas y se incubaron 10 días a una temperatura de 28°C.

Para el crecimiento y la propagación de la cepa DH5 α de *E. coli*, se empleó el medio Luria-Bertani (LB) (Millar, 1972), el cual contiene (p/v): extracto de levadura 0.5%, peptona 1%, NaCl 0.5%, agar (en caso de medio solido) 2%.

5.2 Oligonucleótidos

5.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó un análisis de la secuencia codificante del gen *hsp75*, donde se reconocieron las regiones exónicas e intrónicas (Fig. 5). Se definieron las secuencias de los oligonucleótidos directo (Hsp75F) y reverso (Hsp75R) para amplificar un fragmento de 357 pb del gen *Hsp75*. Al oligonucleótido Hsp75F se le adicionó en el extremo 5' un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI. Además, se diseñó un oligonucleótido directo de la región del promotor pKi1 (*Trichoderma reesei*) y un oligonucleótido reverso diseñado en la sección del terminador Ttrpc (*Aspergillus nidulans*), ambos utilizados para poder detectar la presencia del vector en el genoma de *S. schenckii*. Además se diseñaron oligonucleótidos directo y reverso para la amplificación del cassette de resistencia a higromicina (hph) (Tabla 2).



Figura 5. Secuencia codificante del gen *hsp75* . En rojo semuestra la región exónica, en negro la región intrónica; en verde el codón de inicio; en naranja el codón de término; en amarillo se marcan los oligonucleótidos diseñados.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos generados.

Oligos	Secuencia blanco	Secuencia	Característica
Hsp75-F	<i>hsp75</i>	5' <u>ggatc</u> CAAGATGGCCGAAGAAGTCTAC3'	Directo con un sitio <i>BamHI</i>
Hsp75-R	<i>hsp75</i>	5'GAGAACGTGTGCGTGCTGC3'	Reverso
Ppk1-F	Promotor del gen <i>pk1</i>	5'AAGCTTAGCGCTCAACTCAATGCC 3'	Directo
TtrpC-R	Terminador del gen <i>trpC</i>	5'GGTACCTGTGCATTCTGG 3'	Reverso
Hym-F	<i>hph</i>	5'CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG 3'	Directo
Hym-R	<i>hph</i>	5'GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAG'3	Reverso

5.3 Plásmidos

5.3.1 Vector de clonación pGEM-T

El vector de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems promega (Fig. 6) es un sistema conveniente para clonar productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables. Estas polimerasas a menudo añaden una sola desoxiadenosina, de una manera independiente de la plantilla, a los extremos 3 'de los fragmentos amplificados.

Este plásmido cuenta con 3 características importantes:

1. T-terminales para una fácil clonación por PCR. El pGEM-T es un vector linealizado con un único timidina 3'-terminal en ambos extremos.
2. Selección de recombinantes mediante el método de identificación de color azul / blanco: el vector contiene T7 y SP6 ARN polimerasa, promotores que flanquean una región de clonación múltiple dentro de la codificación de α -péptido, región de la enzima

β -galactosidasa. La inactivación por inserción de la α -péptido permite la identificación de recombinantes por azul / blanco de cribado en placas indicadoras.

3. Elección de los sitios de restricción para la Liberación de inserción. La región de clonación múltiple pGEM-T tiene una región de fácil flanqueo por sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Eco RI, BstZI y NotI, proporcionando tres enzimas de simple digestiones para la liberación del inserto

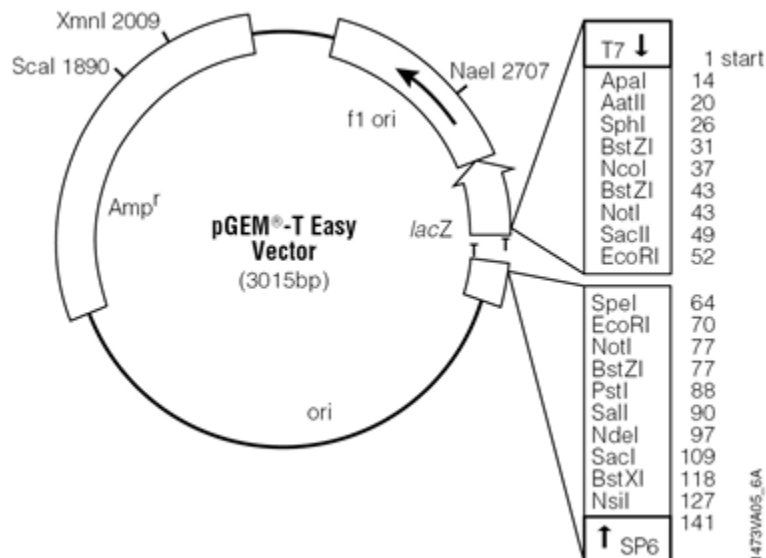


Figura 6. Mapa del Vector pGEM®-T Easy. Porta un gen de resistencia a ampicilina y un sitio de clonación múltiple en el fragmento Lac Z. El vector pre-linealizado pGEM®-T Easy contiene extremos 3'-T en el sitio de inserción para proporcionar un extremo cohesivo compatible para productos de PCR.

5.3.2 Vector de expresión pUE08

El plásmido de expresión constitutiva pUE08 (Fig. 7), porta el gen *hph* que codifica para una higromicina fosfotransferasa. Este gen confiere resistencia al antibiótico higromicina B en hongos y es utilizado para la selección de transformantes (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007). Además, tiene el promotor del gen *pki1* que codifica para la piruvato cinasa de *Trichoderma reesei* y el terminador del gen *trpC* de *Aspergillus nidulans*. Estas secuencias facilitan la expresión constitutiva de genes en hongos, ya sea en sentido (sobre-expresión) o en antisentido (silenciamiento). Entre la secuencia promotora y el terminador tiene disponible un sitio de clonación múltiple con 12 sitios de reconocimiento para diferentes endonucleasas.

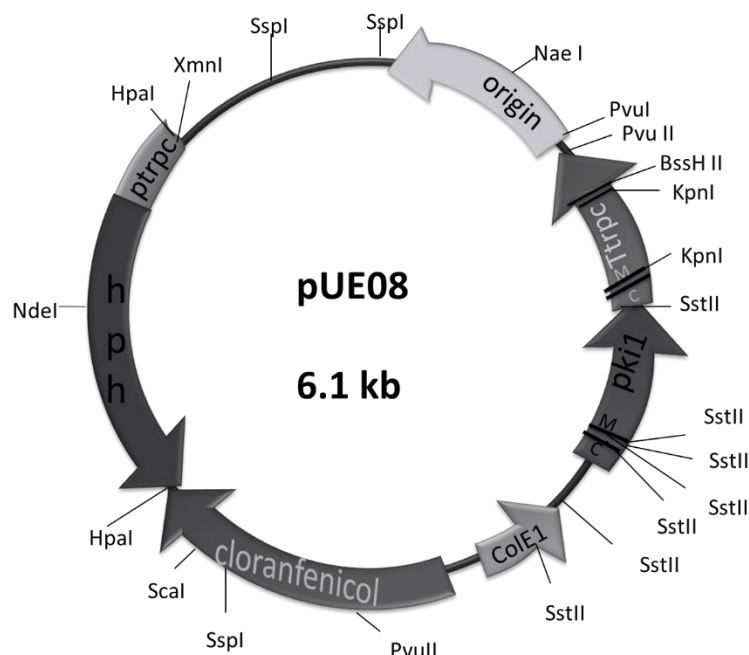


Figura 7. Mapa del plásmido pUE08 de expresión constitutiva. Este plásmido porta el gen de resistencia a higromicina-B (*hph*) para hongos y el gen de resistencia a cloranfenicol para bacterias. Los sitios de restricción disponibles para clonaciones en este vector son: Promotor *pki1*-EagI-NotI-XbaI-SpeI-BamHI-SmaI-PstI-EcoRI-EcoRV-HindIII-ClaI-SalI-Terminador *trpC* (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007).

5.4 Condiciones de cultivo para extracción de ADN y ARN de *S. schenckii*

Con la finalidad de llevar a cabo la extracción de ADN y ARN de *S. schenckii*, se realizó un cultivo para preservar la cepa ATCC 58251. Se empleó medio YPG (extracto de levadura al 3%; peptona al 1%; glucosa al 2%; agar al 2%; a un pH de 4.5) (bartnicki-García y Nickerson, 1962). Para preservar y generar conidios de *S. schenckii*. Las cajas se incubaron a 28°C durante 10 días. Para la propagación de las células y la obtención de la fase micelial de *S. schenckii*, se ajustó la concentración de conidios a 5×10^5 , en un matraz erlenmeyer de 1L, con 400 ml de medio YPG líquido a pH de 4.5, se incubó durante 24 h. Transcurrido el tiempo se tomó una muestra y se observó al microscopio, para verificar el crecimiento de micelio. Se aseguró el desarrollo de la fase micelial de *S. schenckii* y se procedió a la filtración de la muestra, para ello se instaló una bomba de vacío, conectada a un matraz kitazato y embudo buchner. La muestra sólida se recolectó en un papel aluminio estéril y se almacenó a -20°C para uso posterior.

5.4.1 Extracción de ADN genómico

En un tubo Eppendorf se colocó una cantidad pequeña del micelio, se molió con un palillo de plástico estéril y se lavó con 500 µl de agua destilada estéril. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min (se repitió el lavado las veces que fuera necesario). Se agregaron perlas de vidrio estériles en una cantidad aprox. igual a la del micelio, el tubo se agitó con el vortex durante 1 min. 5 veces. Se adicionaron 200 µl de Buffer de rompimiento, 200 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (96:100:4) y 200 µl de Buffer TE (Tabla 3), se mezcló en el vortex. Se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa (fase superior) en un tubo nuevo y se le agregó 1ml de alcohol absoluto a -20°C, se mezcló y se incubó a 30 min a -20°C. Se centrifugó el tubo durante 5 min a 15 000 rpm a 4°C. Se decantó el líquido del tubo para recuperar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 400 µl de Buffer TE y se adicionaron 3 µl de RNasa (1mg/ml), se mezcló y se dejó incubar durante 5 min a 37°C, después de este tiempo se agregaron 30 µl de NaCl 4M y 1 ml de etanol absoluto a -20°C, se mezcló y se dejó en incubación a -20°C por 30 min. Se centrifugó a 15 000 rpm durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante

y se lavó la pastilla 2 veces con 500 µl de etanol al 70% a -20°C. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 100-30 µl de Buffer TE (tabla 3).

Tabla 3. Composición de buffers empleados para la extracción de ADN genómico de *S. schenckii*.

Buffer	Composición
Buffer de rompimiento	Tris-HCl 200 mM pH8.5 NaCl 200 mM SDS 0.5% EDTA 25 mM Proteinasa K 1mg/ml
Buffer TE (100x)	EDTA 100 mM Tris-HCl 1 M pH 7.5 Se usa a 1

5.5 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

5.5.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total a partir de micelio de *S. schenckii*, se empleó la técnica manual de extracción con trizol. Brevemente; se lisaron las células en un mortero añadiendo un volumen de N₂ líquido, se agregaron de 100-200 µl de micelio recién molido a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de trizol y se mezcló 1 min en vórtex. Se incubaron los tubos 5 min a temperatura (T) ambiente y se centrifugaron 1 min a 12 000 rpm a 4°C. Se transfirió el sobrenadante (SN) a tubos eppendorf y se agregaron 200 µl de cloroformo. Se mezcló en vórtex durante 1 min y se incubó por 2 min a T ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (SN) y se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 500µl de isopropanol al 100 % a los tubos con el SN. Se incubó durante 10 min a T ambiente. Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. se desechó el isopropanol.

Se lavó el ARN del tubo agregando 1 ml de etanol al 70% diluido en agua DEPC(dietil-pirocarbonato), se mezcló en vórtex 1 min y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó etanol y se dejaron secar los tubos hacia abajo en una sanita de 5 – 10 min. Se disolvieron las pastillas de ARN en agua DEPC.

5.5.2 Conversión a ADNc

Después de hacer una cuantificación de ARN en Nanodrop 2000, se trató con DNasas para eliminar moléculas de ADN presentes, para ello se realizó un mix, añadiendo: Buffer 10x + MgCl₂, DNasa y se adicionó cierta cantidad de ARN, de acuerdo a las cantidades de los componentes del mix, se completó a 10 µl dependiendo de la concentración de ARN) adicionando H₂O libre de nucleasas. Luego se incubó 30 min a 37 °C, se adicionó 1µl de EDTA y se incubó 10 min a 65 °C. Después se cuantificó el ARN tratado con DNasa. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar integridad de ARN. Para la síntesis de ADNc se usaron 11 µl, el volumen fue ajustado con H₂O DEPC, de acuerdo a la concentración de ARN. Se usó lo siguiente: 11 µl de ARN , 1 µl de dNTP's 10mM y se usaron oligos reversos para los fragmentos esperados de 590 y 357 pb de Hsp75, además del control para tubulina. Se incubó 5 min a 65 °C, seguido de 2 min en hielo, se centrifugó un spin, luego se añadió a la mezcla de 5X Fs buffer y DTT 0.1 M. Se mezcló y centrifugó un spin, se incubó a 42 °C por 2 min. Se agregó 1 µl de Super script II reverse (transcriptasa invitrogen). Se incubó 50 min durante 42 °C seguido de 15 min a 70 °C. Finalmente se cuantificó ADNc y se almacenó a -20 ° C para su uso posterior.

5.6 Amplificación de un fragmento del gen *hsp75*

El fragmento del gen *hsp75* el cual codifica para la proteína Hsp75 (producto esperado de 590 pb) fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de ADN genómico, utilizando los oligonucleótidos, Hsp 75-F y Hsp 75-R (Tabla 2). Las condiciones de reacción para la amplificación del fragmento del gen *hsp75* a partir de ADN genómico fueron: un paso inicial de 5 min a 95°C, 34 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 58°C y 1 min a 72°C, y un paso final de 7 min a 72°C.

Para la amplificación del fragmento del gen *hsp75* a partir de ADNc (producto esperado de 357 pb) mediante PCR se utilizó un volumen de 2.5 µl de ADNc, 16.2 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de buffer 5x, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl dNTP's, 0.3 µl oligonucleótidos F y R, y 0.2 µl de taq polimerasa. Se emplearon las condiciones anteriormente estandarizadas para amplificar los fragmentos del gen *hsp75*. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se corrió durante 30 min a 100 volts, después se observó en el fotodocumentador.

5.7 Geles de agarosa

Brevemente los geles de agarosa se prepararon de la siguiente manera: se pesó la cantidad de agarosa requerida (para un gel al 1% (p/v) 0.3 g, se disolvió la agarosa en 30ml de TAE 1X, se calentó en el microondas por 1 min, posteriormente se agitó y se adicionó 1 µl de Bromuro de etidio (BrEt) para teñir el gel y se volvió a agitar para mezclar el BrEt. Se armó la caja molde para el gel de agarosa, se balanceó, se colocó el peine para los pocillos y finalmente se vertió la agarosa. Se esperó aproximadamente 20 min para que solidificara el gel. Una vez solidificado el gel, este se pasó a la cámara de electroforesis con TAE 1X, la mezcla para cargar los pocillos se realizó como se indica a continuación: 1 µl de marcador de peso molecular de 1kb plus DNA ladder de la marca Thermo Scientific + 1 µl de buffer de carga, para la muestra: 3 µl de muestra + 3 µl de Buffer de carga. Los geles se corrieron a 100 V durante 30 min.

5.8 Purificación del producto de PCR

Se realizó mediante el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente: se añadió un volumen igual de solución de unión (membrane binding solution) al producto de PCR, (la banda de interés fue previamente cortada del gel de agarosa al 1% y pesada). Se insertó la minicolumna en el tubo de recolección, y se le transfirió la mezcla preparada con el producto de PCR. Se incubó a temperatura ambiente por 1min y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector. Para el lavado se adicionaron 700µl de la solución membrane wash solution (diluida en etanol al 75%), se centrifugó a 16000g por 1min, se descartó el sobrenadante y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector. Se añadieron 500 µl de solución de lavado (membrane wash solution) y se centrifugó a 16000g por 5 min. Se vació el tubo colector y se recentrifugó la columna durante 1 min para la evaporación de los residuos de etanol. Para la elución se transfirió la minicolumna en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna. Se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000g por 1 min. Se descartó la minicolumna y se almacenó el ADN a 4°C.

5.9 Preparación de células competentes químicas y transformación

Se prepararon células competentes químicas de la siguiente manera: En un tubo de ensaye estéril se colocaron 2ml del medio LB sin antibiótico y se inoculó *E. coli* DH5α con la ayuda de una asa metálica, y se incubó a 37°C con agitación toda la noche. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se adicionó 25 ml de medio LB, inoculándolo con 300µl de cultivo de *E. coli*, que se obtuvo en el paso 1, se agitó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 0.5 a 0.6 nm, el cual se leyó cada hr usando como blanco medio LB puro. El cultivo fue transferido a hielo durante 10 min junto con la solución de CaCl₂ 50mM en Tris-HCl 10mM, pH 8.0 previamente enfriada en hielo. Se pasó el cultivo a los tubos especiales para centrifugación, y se centrifugaron por 30 minutos a 4000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue desechado, cuidando de no arrastrar la

pastilla bacteriana. Se resuspendieron las células suavemente (sin usar vortex) en la mitad de volumen original de CaCl_2 , la suspensión se incubó en hielo por 15 min, luego se centrifugó por 15 min a 4000 rpm a una temperatura de 4°C. El SN se desechó y las células se resuspendieron en 1/15 (1/22 ml) del volumen original que eran 25 ml (aproximadamente 1.4 ml) de CaCl_2 . Las células se alicuotaron en fracciones de 200 μl en tubos de vidrio para su uso posterior.

5.10 Clonación de un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en el vector PGEM-T

Para la reacción de ligación al vector PGEM-T se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente: Se mezcló 5 μl de buffer 2x rápida ligación, 1 μl de pGEM-T 50 ng, 3 μl Producto de PCR y 1 μl de T4 DNA ligasa, se incubó toda la noche a 4°C para maximizar la reacción de ligación. Por otra parte las células transformantes se alicuotaron en fracciones de 200 μl en tubos de vidrio los cuales quedaron de la siguiente manera:

Tubo 1: 200 μl de células competentes + 10 μl de la reacción de ligación.

Tubo 2: 200 μl de células competentes (control negativo)

Los tubos con la muestra problema y el control negativo, fueron incubados en hielo por 20 min. Posteriormente se sometieron a choque térmico incubando 2 min a 42°C, después fueron transferidos rápidamente a un baño con hielo por 2 min. Se adicionó a cada tubo 800 μl del medio LB estéril sin ampicilina y se incubaron a 37°C por 1 h, pasado este tiempo, la suspensión bacteriana fue cultivada en placas con agar LB con ampicilina (50mg/ml), IPTG (100mM, 9 μl) y X-Gal (40mg/ml, 30 μl) y se incubaron cubiertas en papel aluminio a 37°C durante 24 h. Se seleccionaron las colonias transformantes, mediante selección por color blanco, estas fueron utilizadas para verificar la presencia del vector con el inserto.

5.11 Extracción de ADN plasmídico de *S. schenckii*

Para realizar la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Brevemente, se tomó parte del micelio, se colocó en un tubo eppendorf y se le agregaron 100-200 µl de agua destilada estéril aprox., el micelio se molió con un tubo de plástico estéril y se centrifugó durante 5 min. a 10000g. Se descartó el sobrenadante. La centrifugación se realizó 2 veces. La pastilla se resuspendió en 250 µl de solución para resuspensión de células y se llevó al vórtex. Se dejó el tubo en incubación a temperatura ambiente hasta que la suspensión se aclaró (10 min aprox.). Se agregaron 10 µl de solución de proteasa alcalina y el tubo se mezcló por inversión 4 veces y se incubó durante 5 min. (Hasta que la solución se aclaró, procurando no dejar más tiempo). Inmediatamente se agregaron 350µl de solución de neutralización y se mezcló el tubo por inversión 4 veces (no se usó vórtex). Se centrifugó a 14000g durante 10 min a temperatura ambiente. La columna de decantación se insertó en el tubo colector y el lisado (aprox. 850 µl) se transfirió a la columna, el sobrenadante se centrifugó a máxima velocidad por 1 min a temperatura ambiente, la columna se removió del tubo y se descartó el fluido del tubo colector. La columna se reinsertó en el tubo colector y se agregaron 750 µl de la solución de lavado (previamente diluido con etanol 95%) a la columna, se centrifugó durante 1 min a temperatura ambiente, se descartó el fluido del tubo colector. Se repitió el procedimiento de lavado usando 250 µl de la solución de lavado, se centrifugó durante 2 min a temperatura ambiente. La columna se transfirió a un tubo nuevo estéril de 1.5 ml y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad, se adicionaron 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min a temperatura ambiente, se retiró la columna. La pastilla de DNA se dejó secar y se resuspendió en 30 µl aprox. de Buffer TE (Tabla 3).

5.12 Restricción enzimática del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* clonado en el vector pGEM-T

El ADN plasmídico obtenido anteriormente, se cuantificó en Nanodrop, en base a la cuantificación se realizaron los cálculos para saber la cantidad de muestra que se debía usar para la digestión enzimática (1µg/µl). La reacción para la digestión enzimática se llevó a cabo de la siguiente manera: 1 µl de Buffer H 10X, 0.1 µl de BSA, 4 µl de muestra, 4.3 µl de agua libre de nucleasas, se mezcló por pipeteo, 0.6 µl de *NotI* + 0.4 µl de *BamHI*. Se incubó a 37°C por 2 h. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt (Bromuro de etidio) como se indica en el apartado.

5.13 Subclonación del fragmento de 357 pb gen *hsp75* en el vector de expresión pUE08

El fragmento de 357 pb del gen *hsp75* se recuperó del vector pGEM-T por una doble restricción con las endonucleasas *NotI* y *BamHI*, y se purificó utilizando columnas QIAquick Spin (QIAGEN). Posteriormente, se linearizó el vector pUE08 y el gen *hsp75* se subclonó en los mismos sitios de restricción del plásmido pUE08. El uso de estas dos enzimas de restricción permitió la clonación del gen *hsp75* en cierta orientación con respecto al promotor *pki1* en el plásmido pUE08. La ligación se realizó a 16 °C usando la enzima T4 ligasa (Invitrogen). El vector de expresión constitutiva con el gen insertado se denominó pUE08-*Hsp75*. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5α competentes por choque térmico y estas células fueron sembradas en placas con medio LB adicionadas con cloranfenicol (37 µg/ml) e incubadas a 37°C por 12 h. Se seleccionaron las colonias transformantes y se realizó la búsqueda del plásmido con el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* clonado mediante restricción enzimática empleando *NotI* y *BamHI*.

5.13.1 Evaluación de la orientación del fragmento del gen *hsp75* en el vector pUE08

Para evaluar el sentido de como se inserto el fragmento de 357 pb en el vector pUE08 se generó el mapa del plásmido PUE08 con el fragmento del gen *hsp75* insertado en orientación antisentido y en sentido utilizando el programa APE (A Plasmid Editor) (Fig. 8). Con este mapa se llevó a cabo el diseño de oligos para evaluar la inserción del fragmento de 357 pb en orientación antisentido y sentido (Tabla 4).

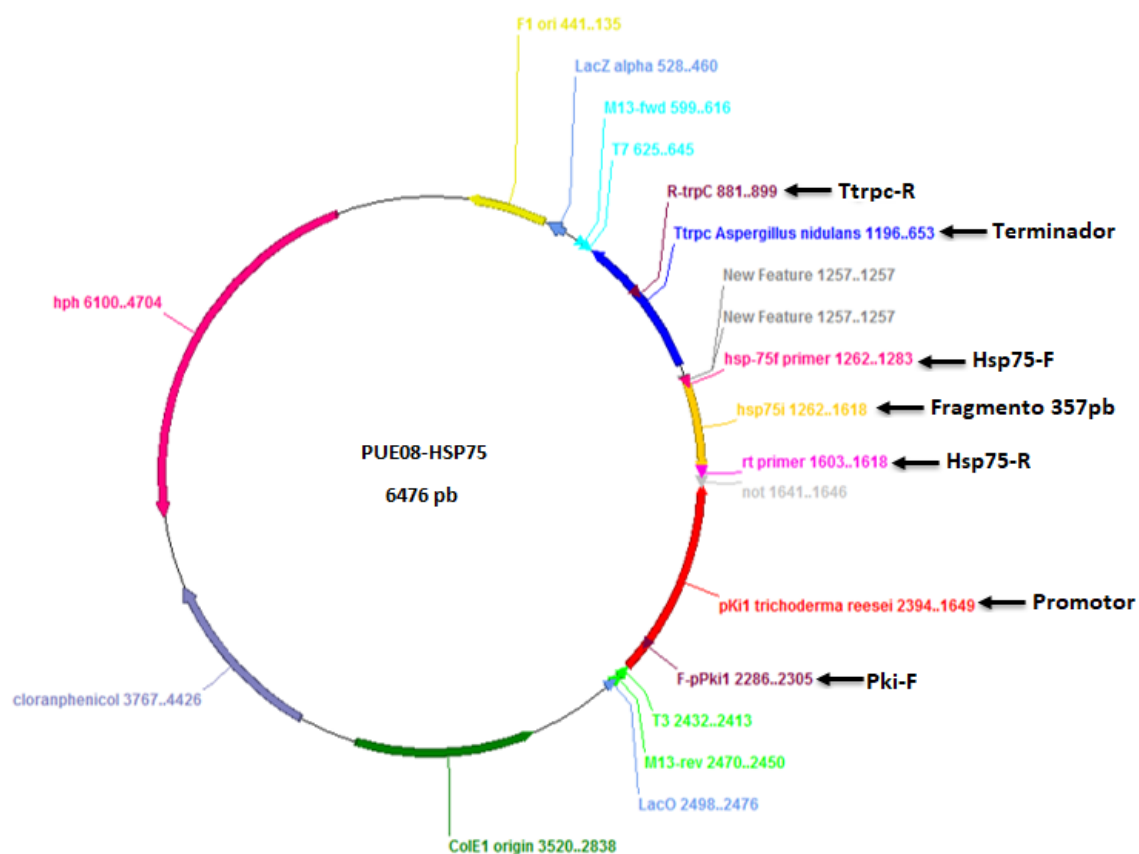


Figura 8. Mapa del plásmido pUE08 con el fragmento de 357 pb insertado en orientación antisentido, generado en el programa APE con un tamaño de 6476 pb. Se muestra el sitio de origen, los cassette de resistencia a higromicina y cloranfenicol. En flechas moradas, el primer reverso del promotor y primer directo del terminador (Pki-F y Ttrpc-R). En flechas rosas los primer directo y reverso del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* (hsp75-F y hsp75-R). Así mismo se pueden observar los genes del terminador de *A. nidulans*, el promotor de *T. reesei* y el fragmento del gen *hsp75* de 357pb.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en PCR para verificar la orientación del fragmento del gen *hsp75* en el vector pUE08

Oligos	Característica	Secuencia blanco	Tamaño del fragmento esperado Orientación sentido	Tamaño del fragmento esperado Orientación antisentido
hsp75-F	Directo con un sitio <i>Bam</i> HI	<i>hsp75</i> y promotor del gen <i>pki1</i>	No amplifica	756 pb
Ppki1-F	Directo			
hsp75-R	Reverso	Terminador del gen <i>trpC</i>	No amplifica	1026 pb
TtrpC-R	Reverso			
Ppki1-F	Directo	<i>hsp75</i> y promotor del gen <i>pki1</i>	703 pb	No amplifica
hsp75-R	Reverso			
TtrpC-R	Reverso	Terminador del gen <i>trpC</i> y <i>hsp75</i>	420 pb	No amplifica
hsp75-F	Directo			

VI. RESULTADOS

6.1 Amplificación de un fragmento del gen *hsp75* a partir de ADN genómico de *S. schenckii*

Se llevó acabo la extracción de ADN genómico a partir del morfotipo micelial de *S. schenckii*, obteniéndose un ADN genómico de calidad el cual fue evaluado en geles de agarosa al 1% (Fig. 9). Con el ADN genómico obtenido se procedió amplificar un fragmento del gen *hsp75* mediante PCR con los oligos diseñados (Tabla 2) para estandarizar las condiciones de amplificación del fragmento del gen. El producto amplificado fue analizado en geles de agarosa al 1% (Fig. 10, carril 1). En la Figura 10 se puede observar que se logró amplificar un producto de 590 pb que corresponde con la región a amplificar por los oligos diseñados y la cual abarca una parte de la región exónica e intrónica del gen *hsp75*.

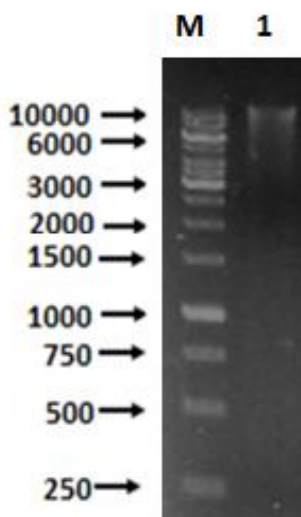


Figura 9. Análisis de la integridad del ADN genómico extraído de la fase micelial de *S. schenckii*. El ADN extraído fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt al 0.1%. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 kb (Promega); **carril 1:** ADN genómico extraído.

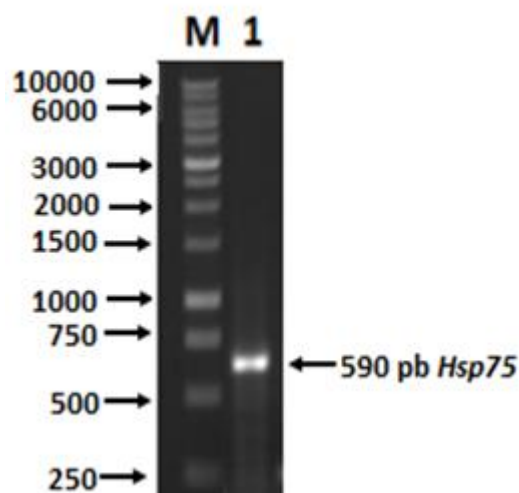


Figura 10. Amplificación de un fragmento de 590 pb del gen *hsp75* a partir de ADN genómico de la fase micelial de *S. schenckii*. El producto amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt al 0.1 %. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 kb (Promega); **carril 1:** producto amplificado de 590 pb aproximadamente del gen *hsp75*.

6.2 Amplificación de un fragmento del gen *hsp75* a partir de ADNc de la fase micelial de *S. schenckii*.

6.2.1 Extracción de ARN total a partir de micelio de *S. schenckii*

Se realizó un cultivo de la cepa de *S. schenckii* en medio YPG líquido a un pH de 4.5 por no máximo de 30 hrs a 28 °C y se evaluó la presencia de micelio al microscopio (Fig.11). Posteriormente, se procedió a la extracción de ARN como se describe en la sección de Materiales y Metodos. Al ARN extraído se le evaluó su calidad mediante cuantificación por espectrofotometría evaluando su relación de absorbancia 260/280 y mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con BrEt (Fig. 12). Los resultados obtenidos de Abs 260/280 fue de 1.8 lo cual nos indica que el ARN extraído es de buena calidad.

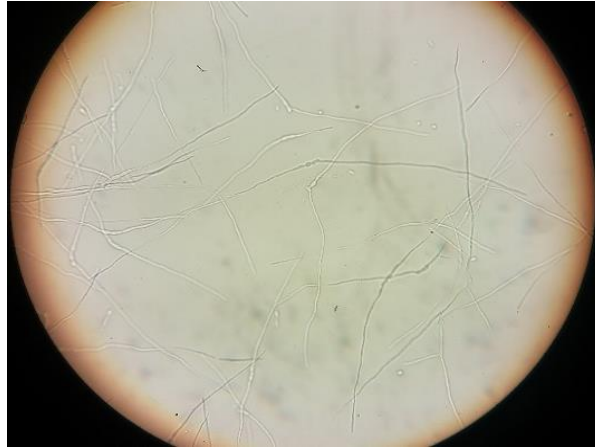


Figura 11. Cultivo del morfotipo micelial de *S. schenckii*. Evaluación del crecimiento de un cultivo en medio YPG pH 4.5 de 24 h de *S. schenckii* en fase micelial en donde se observan hifas ramificadas.

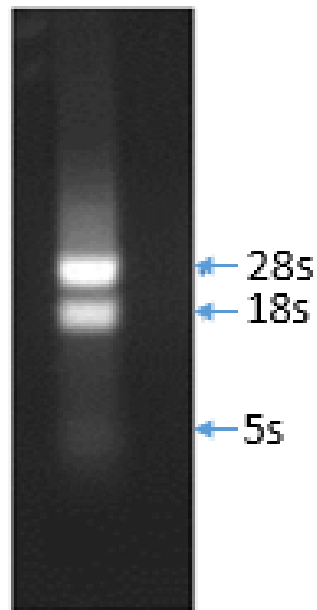


Figura 12. Evaluación del ARN extraído de la fase micelial de *S. schenckii*. El ARN extraído se evaluó en geles de agarosa al 1% con agua DEPC, en donde se verificó la integridad del ARN total, observándose la presencia de 3 bandas correspondientes a las unidades ribosomales 28s, 18s y 5s.

6.2.2 Amplificación de un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* a partir de ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de micelio de *S. schenckii*

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído de la fase micelial de *S. schenckii* y se evaluó su calidad cuantificándolo mediante espectrofotometría midiendo una Abs a 260/280 de 1.8 indicando que el ADNc obtenido es de buena calidad. Posteriormente se llevó a cabo una PCR utilizando los oligos diseñados (Tabla 2) para amplificar un fragmento del gen *hsp75* con las condiciones que se habían estandarizado previamente utilizando el ADN genómico. En la Figura 13 se puede observar la amplificación de un producto de 357 pb correspondiente al producto amplificado esperado del gen *hsp75* en donde solo se amplifica una región exónica del gen.

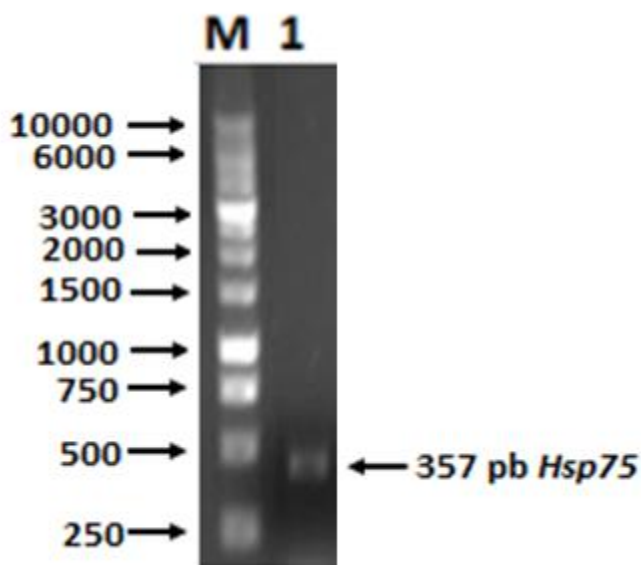


Figura 13. Amplificación de un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* a partir de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de la fase micelial de *S. schenckii*. El producto amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt al 0.1 %. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 kb (Promega); **carril 1:** producto amplificado de 357 pb aproximadamente del gen *hsp75* a partir del ADNc.

6.3 Clonación del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en el vector PGEM-T.

El producto de PCR amplificado de 357 pb del gen *hsp75* de *S. schenckii* fue cortado del gel, purificado y ligado al vector pGEM-T de acuerdo a como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La reacción de ligación (fragmento de 357 pb y vector PGEMT) se utilizó para hacer la transformación utilizando células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes. La suspensión bacteriana fue cultivada en placas con agar LB suplementadas con ampicilina (50 mg/ml), 9 μ l de IPTG (100 mM) y 30 μ l de X-Gal (40mg/ml), se incubaron en oscuridad a 37°C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación se logró observar la presencia de células transformantes de color blanco y azules (Fig. 14), de las cuales se aislaron 9 colonias blancas para llevar la extracción de ADN plasmídico y evaluar la presencia del fragmento del gen de 357 pb con enzimas de restricción.

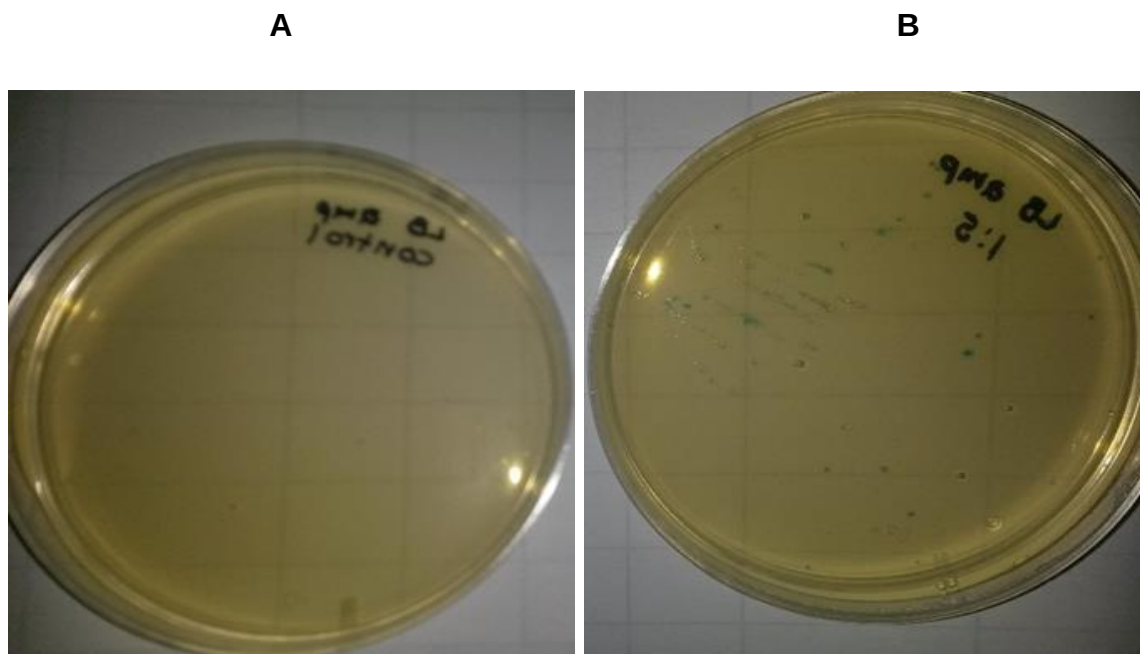


Figura 14. Cultivo de células transformantes de *E. coli* DH5 α con el vector pGEMT . Los cultivos bacterianos fueron sembrados en medio agar LB suplementado con ampicilina, IPTG y X-gal. **A)** Células de *E. coli* DH5 α sin transformar; **B)** Células de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pGEMT sembradas a una dilución 1:5 en donde se observan colonias azules y blancas.

Las 9 colonias blancas aisladas se cultivaron en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina a 37°C en agitación por 16 h. Pasado el tiempo de incubación se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico de acuerdo a como se describe en la sección de Materiales y Métodos el cual se cuantificó y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt para evaluar su calidad (Fig. 15). Posteriormente se realizó la incubación con enzimas de restricción NotI y BamHI con las 9 muestras de ADN plasmídico extraídos. De esta incubación con las enzimas de restricción en solo dos cepas se observó la presencia de dos productos, uno correspondiente al fragmento de 357 pb del gen *hsp75* y otro de 3015 pb correspondiente al vector pGEMT (Fig. 16). Este resultado nos indica que se logró clonar el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* de *S. schenckii* en dos cepas de *E. coli* DH5α.

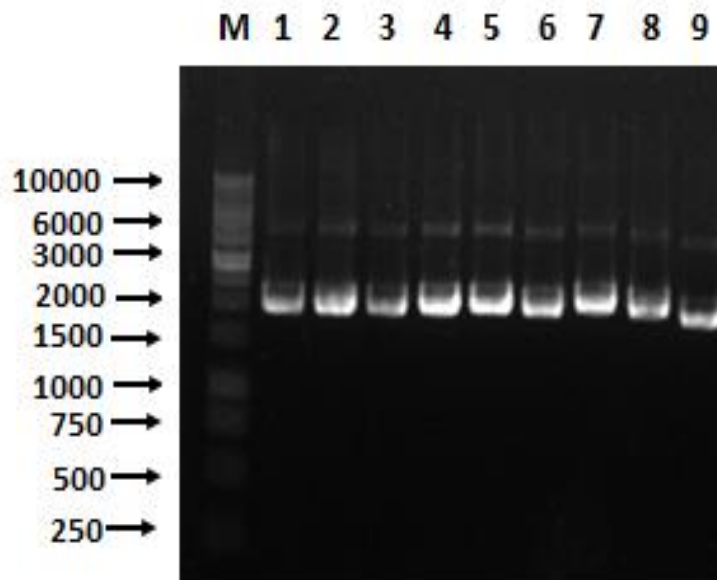


Figura 15. Evaluación del ADN plasmídico extraído de las 9 células blancas transformantes. El ADN plasmídico se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 Kb. **Carril 1-9:** ADN plasmídico extraído de las células transformantes.

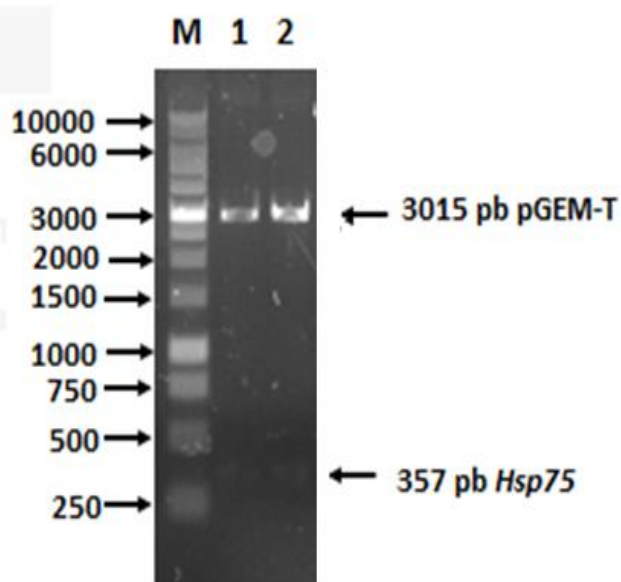


Figura 16. Evaluación por duplicado de la restricción enzimática con NotI y BamHI del ADN plasmídico extraído de dos cepas transformantes de *E. coli*. Los productos obtenidos de la restricción enzimática se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 Kb: **carril 1 y 2:** restricción del ADN plasmídico extraído de dos cepas transformante con NotI y BamHI, en donde se observa un fragmento de 3015 pb correspondiente al vector pGEM-T y una banda de 357 pb del gen *hsp75* de *S. schenckii*.

6.4 Subclonación del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en el vector de expresión pUE08

El fragmento de 357 pb del gen *hsp75* se recuperó del vector pGEM-T por una doble restricción con las endonucleasas *NotI* y *BamHI*, y se purificó utilizando columnas QIAquick Spin (QIAGEN). Posteriormente se procedió a linearizar el vector pUE08 mediante una restricción con la endonucleasa *NotI* (Fig. 17). El vector linearizado se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñido con BrEt, observando un producto de 6100 pb correspondiente al vector linearizado.

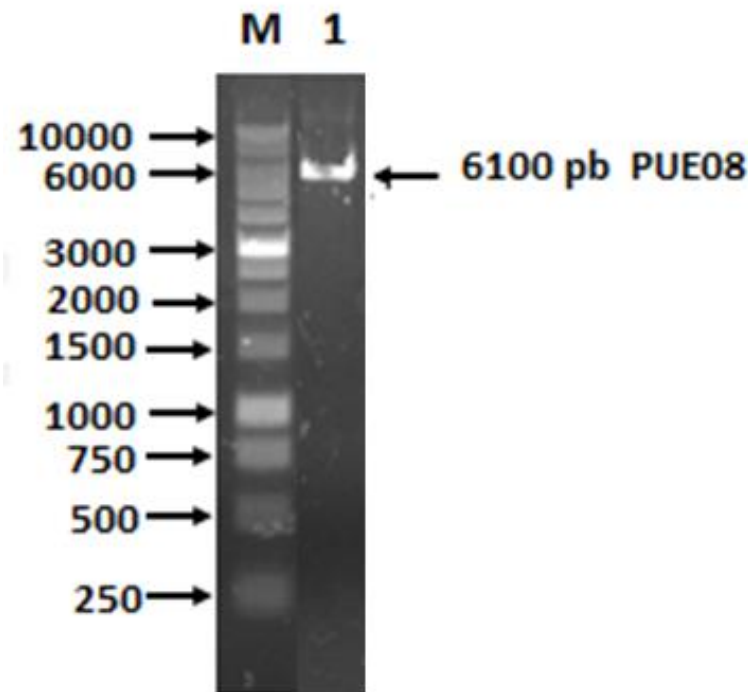


Figura 17. Linearización del vector pUE08 utilizando la enzima *NotI*. El producto de la restricción enzimática se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. **M:** Marcador de tamaño molecular de 1 Kb; **carril 1)** Evaluación del vector pUE08 linearizado con *NotI* observando una banda de 6100 pb aproximadamente.

Con el vector pUE08 linearizado se llevó a cabo una reacción de ligación con el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* con la finalidad de llevar a cabo la transformación de células de *E. coli* DH5 α como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Las células bacterianas transformadas se cultivaron en placas de medio LB suplementadas con cloranfenicol (34 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 16 h. Pasado el tiempo de cultivo, se aislaron 13 colonias blancas (Fig. 18B), las cuales se cultivaron en 3 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol a 37°C por 16h en agitación y pasado el tiempo de cultivo se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico. El ADN plasmídico extraído se evaluó su calidad por espectrofotometría teniendo una relación de Abs 260/280 de 1.8 y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con BrEt (Fig. 19).

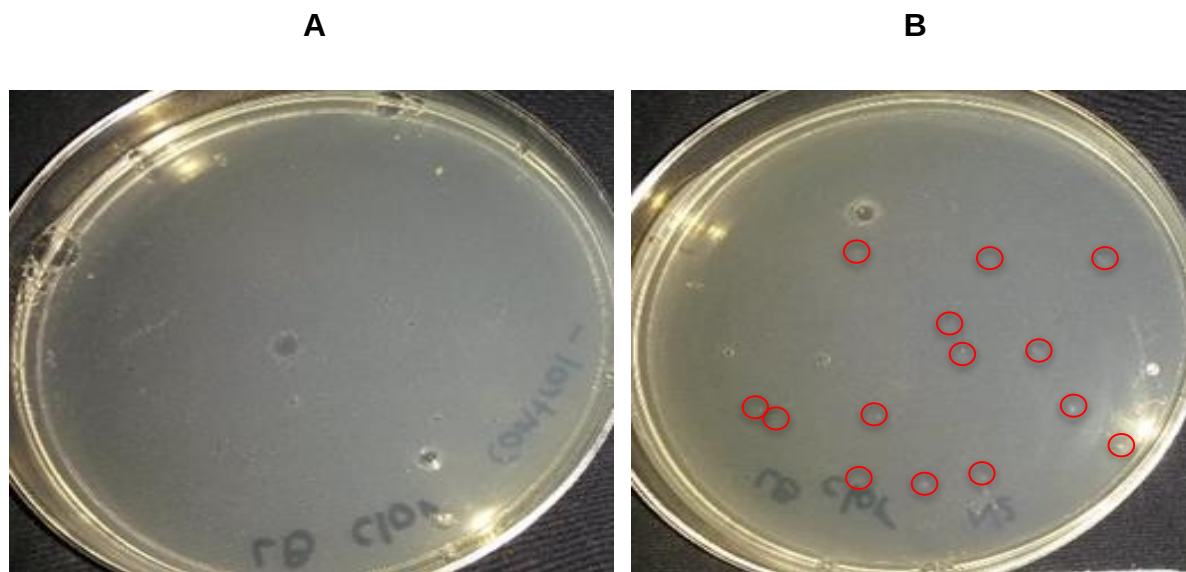


Figura 18. Cultivo de células transformantes de *E. coli* DH5 α con el vector pUE08 . Los cultivos bacterianos fueron sembrados en medio agar LB suplementado con cloranfenicol. **A)** Control negativo: células *E. coli* DH5 α sin transformar; **B)** Células de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pUE08 y sembradas a una dilución 1:5. Se marcaron con círculo rojo las 13 colonias blancas que se aislaron para llevar a cabo la extracción del ADN plasmídico.

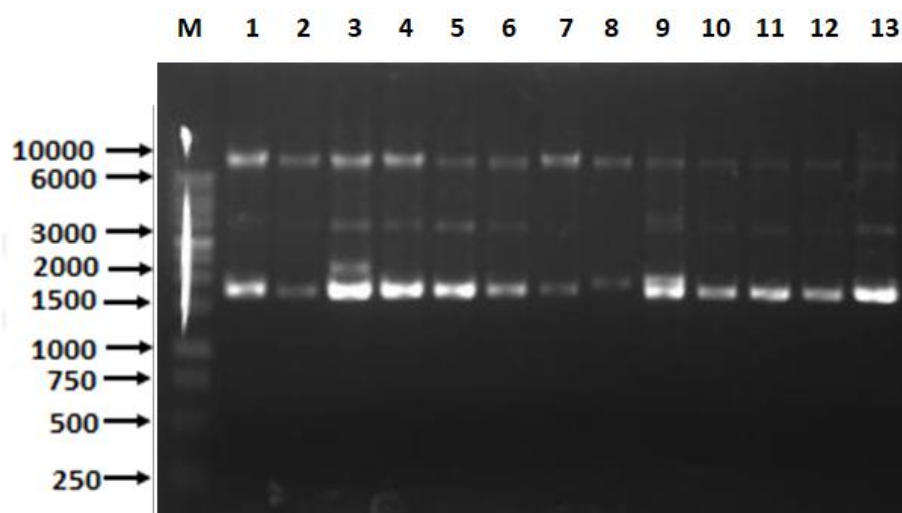


Figura 19. Evaluación del ADN plasmídico extraído de las 13 células transformantes de *E. coli*. El ADN plasmídico se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. **M:** Marcador de tamaño molecular de 1 Kb. **Carril 1-13:** ADN plasmídico extraído de las células transformantes.

De las muestras de ADN plasmídico procedente de las 13 colonias blancas se procedió a realizar PCR a 3 de ellas para verificar la presencia del cassette de resistencia a higromicina B utilizando oligos específicos para amplificar el gen *hph* (Tabla 2). En la Figura 20 se observa que en las tres muestras se logró amplificar un producto de 1400 pb correspondiente al gen *hph*. Posteriormente con el ADN plasmídico de estas tres cepas se realizó una doble digestión enzimática con las endonucleasas NotI y BamHI. En la Figura 21 se puede observar en dos de las cepas la detección de dos bandas una de 357 pb aprox. correspondiente al fragmento del gen *hsp75* y uno de 6100 pb aprox. correspondiente al vector pUE08 (Fig. 21, carriles 1 y 2) mientras que en una de las cepas solo se observó la presencia de una banda de 6100 pb aprox. (Fig. 21, carril 3). Estos resultados nos indican que se logró subclonar el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en dos de las cepas de *E. coli* transformadas.

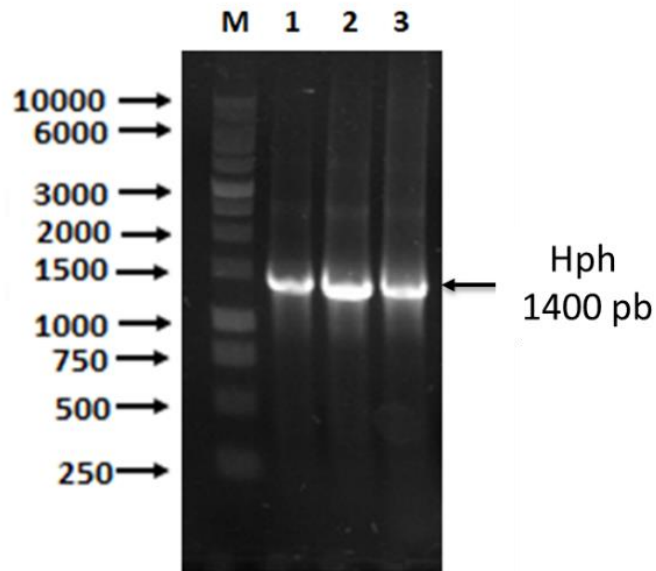


Figura 20. PCR para amplificación del gen *hph*. El ADN plasmídico extraído de tres cepas transformantes de *E. coli* se utilizó para hacer una PCR y amplificar el gen *hph*. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. **M:** marcador de tamaño molecular de 1 Kb; **Carril 1-3:** Productos de PCR a partir de ADN plasmídico de las cepas *E. coli* transformadas con el vector pUE08, observando la amplificación de una banda de 1400pb correspondientes al gen *hph*.

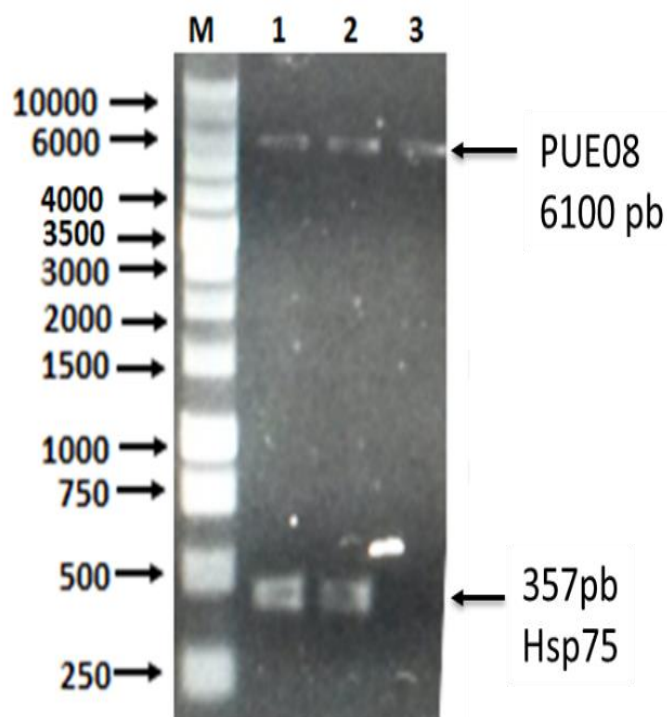


Figura 21. Digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI* a partir del ADN plasmídico de las cepas transformadas de *E. coli* DH5 α con el vector PUE08 con el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* integrado. Los productos de la digestión enzimática del ADN plasmídico fueron analizados en geles de agarosa al 1% con BrEt. M: Marcador de tamaño molecular 1kb; **carriles 1 y 2:** los productos de digestión de dos de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas, observándose la presencia de dos bandas, una de aproximadamente 6100 pb correspondiente al vector pUE08 y otra de 357 pb correspondiente al fragmento del gen *hsp75*; **carril 3:** El producto de digestión de una de las cepas de *E. coli* transformadas en donde solo se observó una sola banda de 6100 pb aprox. que corresponde al vector pUE08.

6.5 Evaluación del sentido del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* subclonado en el vector pUE08

Con los oligos diseñados para evaluar la orientación del fragmento de 357 pb (Tabla 4) se procedió a realizar PCR con ADN plasmídico extraído de las dos cepas de *E. coli* en donde se logró subclonar el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en el vector pUE08. Con el par de oligos Pki1 y *hsp75*-F no se observó la amplificación de bandas (Fig. 22A), mientras que con el par de oligos Pki1 y *hsp75*R se observó la amplificación de una banda de aprox. 703 pb correspondiente a la inserción del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación en sentido en el vector PUE08 (Fig. 22B). Por otra lado, utilizando el par de oligos Trpc- *hsp75*F se observó la amplificación de una banda de aprox. 420 pb correspondientes a la inserción del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación en sentido en el vector pUE08 (Fig. 23A), mientras que con el par de oligonucleótidos Trpc y *hsp75*R no se observó la presencia de algún producto amplificado (Fig. 23B)

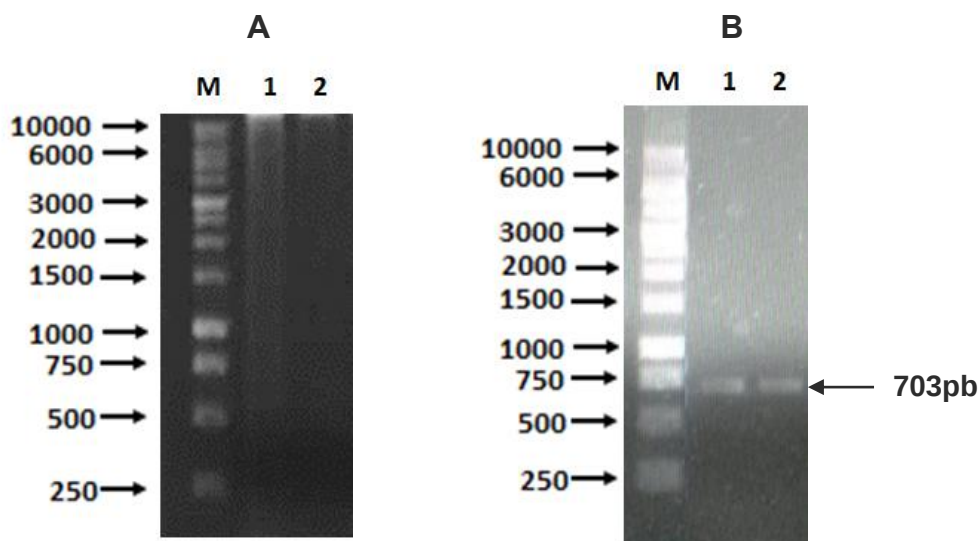


Figura 22. PCR a partir del ADN plasmídico de las cepas transformadas de *E. coli DH5 α* con el vector PUE08 con el fragmento de 703 pb del gen *hsp75* integrado. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt. **M)** Marcador de tamaño molecular 1kb; **A) carriles 1 y 2:** los productos de PCR usando el par de oligos Pki1 y *hsp75*-F no observándose la presencia bandas; **B) carriles 1 y 2:** productos de PCR usando el par de oligonucleótidos Pki y *hsp75*R donde se observó la amplificación de una banda de aprox. 703 pb correspondiente a la inserción del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación en sentido en el vector pUE08.

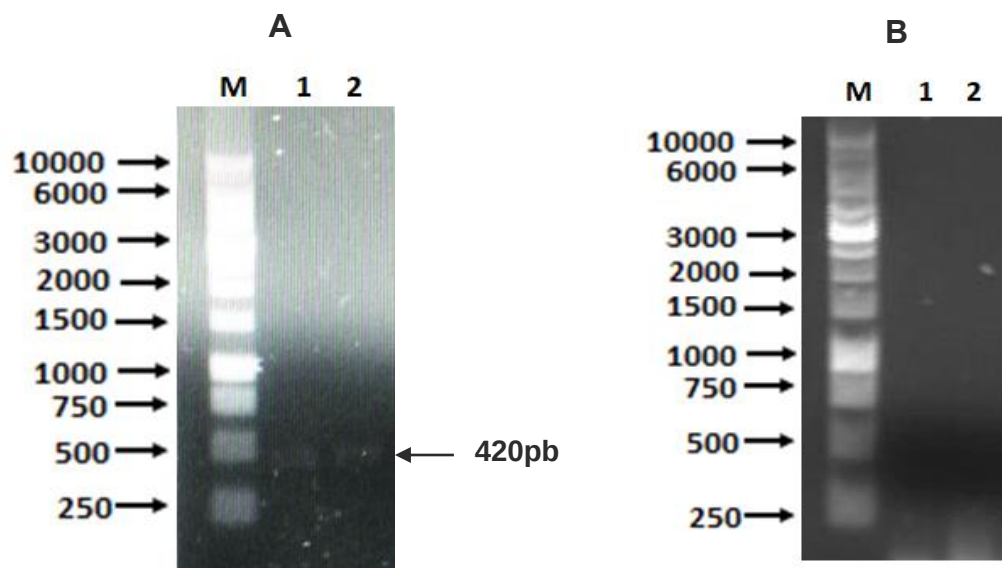


Figura 23. PCR a partir de ADN plasmídico de las cepas transformadas de *E. coli DH5α* con el vector PUE08 con el fragmento de 420 pb del gen *hsp75* integrado. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% y teñido con BrEt. **M)** Marcador de tamaño molecular 1kb; **A) carriles 1 y 2:** los productos de PCR usando el par de oligos Trpc- Hsp75F donde se observan una banda de aprox. 420 pb correspondientes a la inserción del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación en sentido en el vector PUE08, **B) carriles 1 y 2:** productos de PCR usando el par de oligonucleótidos Trpc y Hsp75R no se observó la presencia de bandas.

VII. DISCUSIONES

La esporotricosis es una enfermedad micótica causada por especies pertenecientes al complejo *Sporothrix*, particularmente *S. schenckii*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Esta micosis se ha reportado en todos los continentes y es muy frecuente en México sobre todo en el centro y el occidente, ocupando el primer lugar entre las micosis subcutáneas (Bonifaz, 2015).

La adhesión microbiana es un proceso que consiste en el reconocimiento, interacción y anclaje del patógeno hacia la célula blanco. Los patógenos son capaces de adherirse a células epiteliales, endoteliales, factores solubles del suero, componentes de la matriz extracelular y materiales inertes implantados en el cuerpo del hospedero. En los hongos patógenos las proteínas de la pared celular que median esta adhesión son consideradas un factor de virulencia.

En *S. schenckii* se ha descrito que la interacción del hongo con los tejidos del huésped es mediada por glicoproteínas tipo adhesinas presentes en la pared celular. Ruiz-Baca *et al.* (2009) logró identificar y purificar una glicoproteína de 70 kDa (gp70) con propiedades de adhesina, siendo posteriormente identificada como una carboxi-cis-muconato ciclasa (Castro *et al.*, en 2013). Ramírez *et al.* (2015) reportaron proteínas multifuncionales también denominadas “moonlight” que se localizan en la pared celular en especies de *Candida* y se les atribuyeron diversas funciones entre ellas adherirse a las células huésped. Entre las proteínas reportadas se identificaron dos proteínas de choque térmico Ssb1 y Ssa2 a las cuales se les atribuyó funciones como interacción con el hospedero y respuesta a estrés. En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo se logró identificar una proteína de choque térmico de 75 kDa (Hsp 75) de la pared celular de la fase micelial de *S. schenckii* afín a proteínas de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y colágeno tipo II de la matriz extracelular (Salas-Leal 2014).

Con la finalidad de evaluar el papel que tiene esta Hsp75 como un factor de patogenicidad y virulencia en el hongo *S. schenckii* en la presente propuesta se llevó a cabo la clonación y subclonación de un fragmento de 357 pb del gen *hsp75* y se analizó su orientación en el vector de expresión pUE08. Para lograr el objetivo, primero se llevó a cabo la amplificación del fragmento de 357 pb del gen *hsp75* a partir de ADNc (Fig. 13) sintetizado a partir de ARN extraído de la fase micelial del hongo. Posteriormente este fragmento amplificado se purificó y clonó en el vector pGEM-T usando células de *E. coli* DH5 α . Se cultivaron en medio LB suplementado con ampicilina, X-gal e IPTG. La clonación fue verificada con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*, observándose la presencia de dos bandas, una de aprox. 357 pb correspondiente al fragmento del gen *hsp75* y otra de aprox. 3015 pb correspondiente al vector pGEM-T (Fig.16). Posteriormente, se procedió a subclonar el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en cierta orientación en el vector de expresión pUE08 en células de *E. coli* DH5 α . Se cultivaron en medio LB suplementado con cloranfenicol, se seleccionaron 13 colonias blancas a las cuales se le realizó extracción de ADN plasmídico. La subclonación se verificó utilizando las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*, observando que se logró subclonar el fragmento de 357 pb en dos de tres cepas transformadas observándose la presencia de dos bandas, una de aprox. 357 pb correspondiente al fragmento del gen *hsp75* y otra de 6100 pb correspondiente al vector pUE08 (Fig. 21). Posteriormente se verificó la orientación del fragmento del gen en el vector mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada sentido del gen, además se realizó un análisis en el programa APE, donde se insertó la secuencia del plásmido, así como la del gen y los oligonucleótidos. Se observó que el fragmento de 357 pb se insertó en orientación sentido en el vector pUE08 (Fig. 22 y 23). Si el gen se hubiese insertado en antisentido se esperaban productos de amplificación de 756 y 1026 pb con los primers pki1-Hsp75F y Trpc-Hsp75R respectivamente.

Debido a que se generaron problemas para hacer la liberación de fragmento de 357 pb con la enzima de restricción *EcoRI* del vector pGEM-T, se procedió hacer la digestión con la enzima de restricción *NotI* con la cual se logró liberar el fragmento de 357 pb, éste se cortó y se purificó, en la posterior digestión con *BamHI* no hubo restricción para cortar el fragmento de 16pb de la banda, correspondientes al oligonucleótido Hsp75-F, por lo

que estas pares de bases se le adicionaron al fragmento, por ende la inserción del fragmento en el vector se tornó a un 50% de probabilidad de que fuera en orientación sentido o antisentido debido a que solo se generó un corte con NotI en el vector PUE08 .

El vector pUE08 con el fragmento del gen *hsp75* subclonado en sentido no es de utilidad para llevar a cabo experimentos de silenciamiento génico por lo que sería necesario seguir haciendo experimentos para subclonar el gen *hsp75* en el vector pUE08 hasta comprobar que alguna transformante cuente con este vector y el fragmento del gen *hsp75* subclonado en orientación antisentido.

VIII. CONCLUSIONES

- Se extrajo ARN y se sintetizó ADNc a partir de la fase micelial de *S. schenkii*.
- Se amplificó y se clonó en el vector pGEM-T un fragmento del gen de la *hsp75* de 357 pb de *S. schenkii*.
- El fragmento de 357 pb del gen *hsp75* de *S. schenckii* se subclonó en orientación sentido en el vector de expresión pUE08.

IX. PERSPECTIVAS

- Volver a llevar a cabo la subclonación en el vector puE08 para obtener transformantes con el fragmento de 357 pb del gen *hsp75* en orientación antisentido.
- Con este vector (con el fragmento de 357 pb en antisentido), hacer la transformación de *S. schenckii* mediante ondas de choque y evaluar las cepas transformantes para determinar el grado de silenciamiento.
- Otra opción para evaluar la funcionalidad del gen *hsp75* sería llevar a cabo la mutación o la sobreexpresión de este gen y evaluar los fenotipos de las cepas transformantes.

X. REFERENCIAS

Acha PN, Boris S. (2001). Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales vol. 3 (Publicación Científica y Técnica No. 580, 3.a ed. Washington, D.C.

Batista W, Matsuo A, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymüller E, Puccia R. (2006). The PbMDJ1 Gene Belongs to a Conserved MDJ1/LON Locus in Thermotolerant Pathogenic Fungi and Encodes a Heat Shock Protein That Localizes to both the Mitochondria and Cell Wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*. 5(2): 379–390.

Barros MB, Almeida Paes R, Oliveira Schubach A (2011). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 24(4). 633-650.

Bernal, G. S., Sabanero, G. B., & López, M. S. (2009). Biología del proceso de adhesión de *Sporothrix schenckii* y otros micopatógenos de humanos hacia los tejidos hospederos. Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, (43), 21-25.

Bonifaz A., (2010). Micología médica básica. 3ª ed. México. McGraw-Hill.

Buxton FP, Radford A. (1983). Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. Molecular and General Genetics.

Burraco, A. B. (2005). Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Reverté.

Calderone, R., Enache, E., Eskandri, T., Wadsworth, E., & Sturtevant, J. (1997). Adherence of *Candida albicans* to mammalian cells in vitro: nutritional influences. Fungal cells in biodefense mechanism. Saikon Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japan, 73-83.

Carrada Bravo T. (2012). Esporotricosis: Avances recientes en el diagnóstico de laboratorio, histopatología y la epidemiología en México. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 59(3):147-171.

Chaffin W. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews.* 72(3):495-544.

Castro, R. A., Kubitschek-Barreira, P. H., Teixeira, P. A., Sanches, G. F., Teixeira, M. M., Quintella, L. P., ... & de Souza, W. (2013). Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. *PLoS One*, 8(10), e75656.

Coronato S, Girolamo W, Salas M, Spinelli O, Laguens G. (1999). Biología de las proteínas del shock térmico. *Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.* 59:477-486.

Costa RO, Celso MK. Damasco PS, Bernardes EAR, Dias CMP. Silva C, Lopes-Bezerra LM. (2008). Infectious arthritis as the single manifestation of sporotrichosis. *Rev iberoam micol.* 25:54-56.

Franco LI, Gómez A, Restrepo R, (1992). Saperconazole in the treatment of systemic and subcutaneous mycoses. *Int J Dermatol.*

Gracia R. zarain P. laguna Y. (2004). Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito- hospedero. pags 138-139

Gori S, Lupetti A, Moscato G, Parenti M, Lofaro A. (1997). Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected patient. A case report. *Acta Cytologica*

Lima O.C., Figueiredo C.C., Pereira B.A.S., Coelho MGP., Morandi V., Lopes-Bezerra LM. (1999). Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to extracellular matrix proteins. *Braz J Med Biol.* 32:651-657.

Lima, O. C., Figueiredo, C. C., Previato, J. O., Mendonça-Previato, L., Morandi, V., & Bezerra, L. M. L. (2001). Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infection and immunity*, 69(11), 6874-6880.

Lima Barros, M. B., Schubach, A. O., de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, R., Martins, E. B., Teixeira, J. L., & Wanke, B. (2011). Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole—study of 645 patients. *Clinical Infectious Diseases*, 52(12), e200-e206.

Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. (2003). Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol*.170(1):487-94

Lopes LM, Mendonça-Previato L, Fournet B, Degand P, Previato JO. (1992). O-glycosidically linked oligosaccharides from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycoconjugate Journal*. 9: 75-85.

Lopez-Bezerra LM, Schubach A, Costa R. (2006). *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 78(2):293-308.

Lopes-Bezerra, L. M. (2011). *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans. *Frontiers in microbiology*, 2.

Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Lazéra, M. D. S., & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3251-3256.

Moore, D. D., & Dowhan, D. (2003). Preparation and analysis of DNA. *Current protocols* 5.

Munguia-Pérez R, Velázquez-Escobar MC, Rosas-Quijano R,Guerrero-Ontiveros L, Espinosa-Taxis P. (2007). Factores ambientales que influyen en el desarrollo de *Sporothrix schenckii* en Huachinango, Puebla, México. Puebla, pueb.

Murray Patrick R., (2006). Microbiología médica. -5a. ed. -- Madrid; Elsevier Mosby., pp 963-965.

Pluss JL, Opal SM. (1986). Pulmonary sporotrichosis: review of treatment and outcome. *Medicine* . 65:143–153.

Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78-82.

Previato J. Philip A. J. Gorin, R. Travassos. (1979). Cell Wall Composition in Different Cell Types of the Dimorphic Species *Sporothrix schenckii*. EXPERIMENTAL MYCOLOGY 3, 83—91. Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Ramírez-Quijas, M. D., López-Romero, E., & Cuéllar-Cruz, M. (2015). Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microbial pathogenesis*, 87, 1-12.

Rodriguez-Caban J, Gonzalez-Velazquez W, Perez-Sanchez L, Gonzalez-Mendez R, Rodriguez-del 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*. 11:1-16.

Ruiz-Baca E, Toriello C, Pérez-Torres A, Sabanero-Lopez M, Villagomez-Castro JC, Lopez-Romero E. (2009). Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med Mycol*. 47:185-196.

Ruiz-Diez B., (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*. 92:189-195.

Sandoval-Bernal G. Barbosa-Sabanero G. Sabanero-López M. (2009). Biología del proceso de adhesión de *Sporothrix schenckii* y otros micopatógenos de humanos hacia los tejidos hospederos. Investigación y ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Silveira CP, Piffer AC, Kmetzsch L, Fonseca FL, Soares DA, Staats CC, Rodrigues ML, Schrank A, Vainstein MH. (2013). The heat shock protein (Hsp) 70 of *Cryptococcus neoformans* is associated with the fungal cell surface and influences the interaction between yeast and host cells. *Fungal Genet Biol.* 60:53-63.

Sturtevant J. Calderone R. (1997). *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University School of Medicine, Medical Dental Building, Washington DC 20007, USA

Torres, I., Hernández, O., Tamayo, D., Muñoz, J. F., García, A. M., Gómez, B. L. & McEwen, J. G. (2014). *Paracoccidioides brasiliensis* PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. *FEMS yeast research*, 14(2), 270-280.

Vila Spínola, M. (2009). Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas: el irna como mecanismo de silenciamiento génico, 13,15-19.

Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. (1998). ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética, 50-208.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 5(3), 237-241.