

MANIPULACIÓN GENÉTICA DEL HONGO PATÓGENO *Sporothrix schenckii*

Diana Marcela Clavijo Giraldo¹ y Héctor Manuel Mora Montes².

RESUMEN

Sporothrix schenckii, es un hongo dimórfico integrante del complejo *S. schenckii*, que se desarrolla en forma micelial (forma saprófita) o levaduriforme (forma patógena) y es el agente etiológico de la esporotricosis, una micosis subcutánea de los mamíferos que se adquiere por inoculación traumática del hongo.

Este organismo, es un modelo interesante para estudiar la base bioquímica, genética, molecular y fisiológica de la diferenciación celular y morfogénesis. Sin embargo, a pesar de los significativos avances en el conocimiento de la filogenia y la virulencia de dicho organismo, existe una disponibilidad limitada de herramientas para el estudio, con enfoques genéticos y/o moleculares.

Aquí se describe la transformación de *S. schenckii* con un vector que contiene la secuencia del gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). Como era de esperar, se detectó la expresión de la proteína GFP en células de micelio cuando se analizaron con microscopía de fluorescencia.

Palabras Clave

Proteína Verde fluorescente (GFP), transformación, vector pH1, *Agrobacterium*.¹

¹ 1. Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, col. Noria Alta, C.P. 36050, Guanajuato, Gto. Tel. 4737320006. Ext. 8154.

² 2. Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Noria Alta s/n, col. Noria Alta, C.P. 36050, Guanajuato, Gto. Tel. 4737320006. Ext. 8154; e-mail: hmora@ugto.mx

INTRODUCCIÓN

Sporothrix schenckii es un hongo patógeno de distribución mundial. Es un organismo dimórfico que en estado saprófito se desarrolla en forma micelial con ramificaciones, mientras que la forma levadura es la morfología presente en lesiones, y es la que se disemina de manera sistemática en el hospedero (López-Romero E. et al., 2011). Cuando se desarrolla como saprófito es muy resistente a la desecación y puede crecer en diversos sustratos, principalmente en suelo, madera y plantas espinosas. *S. schenckii* es el agente etiológico de la esporotricosis, la cual puede afectar el tejido subcutáneo o en casos graves, órganos profundos (Lopes-Bezerra L., 2011.) Esta enfermedad tiene una distribución mundial y se adquiere usualmente por inoculación traumática del hongo en el tejido subcutáneo, aunque se han reportado casos de infecciones pulmonares causadas por inhalación de material fúngico y a través de mordeduras de animales infectados, principalmente por gatos domésticos (Lopes-Bezerra L., 2006.). Es una infección cutánea primaria y se manifiesta en diferentes formas clínicas: se difunde por los vasos linfáticos (75%), la forma cutánea localizada (20%), cutánea diseminada y raramente extracutánea. La esporotricosis diseminada sistémica se considera una infección oportunista severa (Romero-Cabello R. et al., 2011:39), aunque se presenta en todas las edades, es muy frecuente en niños y adultos jóvenes atacando ambos sexos por igual (Lopes-Bezerra L., 2011.). Mediante análisis moleculares de secuenciación de fragmentos del genoma de este organismo y diversas pruebas fisiológicas, se ha demostrado que *S. schenckii* no es el único agente de la esporotricosis humana y animal, sino más bien, se trata de un complejo de especies con diferentes distribuciones geográficas, y dentro de las mejor caracterizadas se tiene a *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, y *S. luriei* (López-Romero E. et al., 2011).

Los hongos son eucariotas inferiores que juegan un papel importante en muchas actividades humanas, incluyendo los procesos biotecnológicos, fitopatología y la investigación biomédica. Además, son excelentes modelos para los estudios moleculares y genéticos. Una clave importante en el avance de la genética y la biología molecular de un determinado organismo es el desarrollo de sistemas de transformación genética (Casas-Flores S. et al., 2011:315).

La transformación de hongos fue descrita por primera vez, hace tres décadas, para el gen de inositol en *Neurospora crassa* por Mishra y Tatum, utilizando DNA total. El resultado de sus experimentos constituye un hito para la creación de tecnologías de transferencia de genes, un proceso fundamental para el desarrollo de la genética molecular en los hongos filamentosos. Este proceso se lleva a cabo habitualmente hoy en día por el uso de vectores que contengan un gen marcador que permita la selección de células transformadas con éxito.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo Gram-negativa capaz de transferir una parte de su plásmido inductor de tumores (Ti), el DNA transferido, a una planta durante la tumorigénesis. Esta transferencia es dependiente de la inducción de genes Vir, un grupo de genes localizados en el plásmido Ti. Los compuestos fenólicos secretados por las plantas heridas, como la acetosiringona inducen estos genes. *A. tumefaciens* ha sido utilizado con éxito para transferir genes a una amplia variedad de plantas. Recientemente, varios hongos se han transformado mediante el sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens*. Una de las principales ventajas que ofrece *Agrobacterium* en comparación con las técnicas convencionales es la versatilidad en la selección del material a ser transformado. *Agrobacterium* ha sido utilizado con éxito para transformar protoplastos, hifas, esporas, y el tejido micelial (Casas-Flores S. et al., 2011:317).

Proteína Verde Fluorescente (GFP)

En sólo tres años, la proteína verde fluorescente (GFP) de la medusa *Aequorea victoria* ha saltado del anonimato para convertirse en una de las proteínas más ampliamente estudiadas y explotadas en la

bioquímica y la biología celular (Tsien-Roger Y., 1998:509). Así, la GFP se ha convertido en un marcador establecido de la expresión génica y la orientación de proteínas en células intactas así como en organismos. Descubierta por Shimomura y sus colaboradores, la proteína verde fluorescente es la acompañante natural de la proteína aequorina, convirtiendo las señales luminiscentes de ésta en la luminiscencia verde característica de la especie.

Sin embargo, los avances cruciales llegaron con la clonación del gen por Prasher y sus colaboradores y con la manifestación de que la expresión del gen en otros organismos creaba fluorescencia, hecha por Chalfie y colaboradores e Inouye y Tsuji (Tsien-Roger Y., 1998.) Así, se concluyó por lo tanto, que el gen contenía toda la información necesaria para la síntesis del cromóforo, sin necesidad de otras enzimas o agentes específicos de la medusa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos:

Para el experimento se utilizó la cepa *S. schenckii* 1099-18 ATCC MYA 4821 y dos cepas *A. tumefaciens* AGL-1 y *A. tumefaciens* AGL-1 pH1; una que contenía el vector de transformación pH1 y otra silvestre.

Condiciones de cultivo:

Pre-inóculos-Para obtener las células de *A. tumefaciens* que se usaron para transformar, inoculamos 20µL del stock de células en 20 mL de medio LB adicionado con kanamicina y ampicilina en el caso de la cepa AGL-1 pH1 y ampicilina para la cepa AGL-1 en una concentración de 100µg/mL de medio.

Inducción- Una vez alcanzada una densidad óptica igual a 1, las células se pusieron en 3 mL medio de inducción el cual se compone de un buffer de fosfatos, solución salina, MES (1M), glucosa (1M) y glicerol (al 50% v/v); adicionado con los antibióticos correspondientes para cada cepa. El anterior paso, se realizó por duplicado ya que una parte se trató con acetosiringona como inductor de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Se incubó por 5.30 horas a 28°C a 200 r.p.m.

Transformación- Se prepararon cajas con medio de co-cultivo el cual contiene, al igual que el medio de inducción, un buffer de fosfatos, solución salina, MES (1M), glucosa (1M) y glicerol (al 50% v/v); además del agar bacteriológico y el agente de selección.

Una vez obtenidas las placas con este medio, se cubrieron con papel celofán dulce, el cual fue lavado y esterilizado con anterioridad, para evitar que el hongo se sumerja en el agar.

Para la transformación, se cosecharon los conidios de *S. schenckii*, crecidas en medio YPD (extracto de levadura (1%), peptona de gelatina (2%) y dextrosa (3%)), pH 4.5, y se contaron para obtener una concentración final de 1×10^6 células/mL.

En la placa y sobre el papel celofán dulce se sembraron 100µL de los conidios de *S. schenckii* junto con 100 µL de las células de *A. tumefaciens* inducidas con anterioridad y cada condición se sembró por duplicado. Estas placas se incubaron por 3 días a 28°C.

Posteriormente, los celofanes se trasladan a placas que contienen medio de selección que son placas con medio YPD, pH 4.5, adicionada con el agente de selección y cefotaxima (200mM) la cual produce la muerte de las bacterias. Estas placas se incubaron por dos días más a 28°C.

Una vez obtenidas las posibles transformantes, se pasaron a medio YPD, pH 4.5 adicionado con el agente de selección para identificar las colonias transformadas.

Finalmente, las colonias que crecen en este medio se pasaron a cajas individuales con el mismo medio para crecerlas y observarlas al microscopio.

Transformantes:

Se realizaron preparaciones de las posibles transformantes y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia, las muestras fueron selladas con esmalte transparente y observadas bajo el microscopio de 60X, comprobando así la presencia o ausencia de fluorescencia en las muestras.

RESULTADOS

Después de un periodo de incubación de dos días de las presuntas transformantes, se empezó a observar el crecimiento de los dos organismos, tanto *S. schenckii* como *A. tumefaciens* en las placas de medio de cultivo. Como era de esperarse, el crecimiento fue más evidente en las placas en las que se inoculó el hongo junto con la bacteria que contenía el vector pH1, como se muestra en la figura 1.

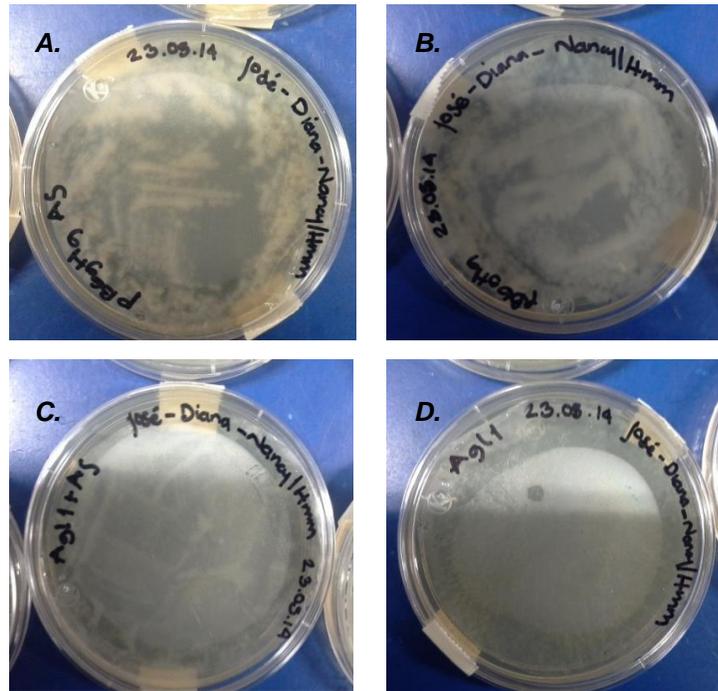


Figura 1. Crecimiento de las cepas en medio de co-cultivo. A) *S. schenckii* + AGL-1 pH1 + As. B) *S. schenckii* + AGL-1 pH1. C) *S. schenckii* + AGL-1 + As. D) *S. schenckii* + AGL-1

Se seleccionaron algunas colonias como posibles transformantes, se pasaron a medio de selección y se observó que el crecimiento, al igual que en el medio de co-cultivo era más notorio en las colonias de *S. schenckii* que habían sido inoculadas junto a la cepa AGL-1 pH1, como se muestra en la Figura 2.

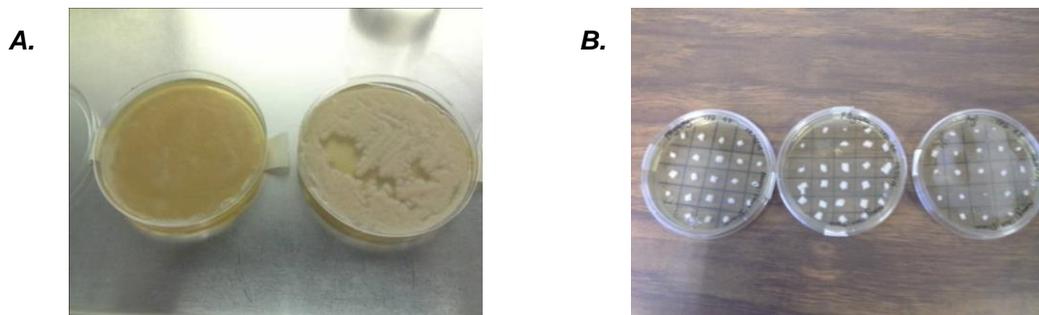


Figura 2. Crecimiento de las posibles transformantes en medio de selección. A.) A la derecha se observa el crecimiento de *S. schenckii* transformado con la cepa AGL-1 pH1; y a la izquierda la transformación con la cepa silvestre AGL-1. B) Se observa la diferencia de tamaño

entre las colonias de *S.schenckii* transformadas con la cepa de *A. tumefaciens* silvestre (derecha) y las colonias transformadas con el vector pH1 (centro e izquierda).

Usando microscopía de fluorescencia se verificó la transformación de *S. schenckii*, en células de micelio. Teniendo como resultado que el hongo presenta una fluorescencia basal, sin embargo, al ser transformado con el vector pH1 es posible obtener una intensidad mayor de fluorescencia.

Como resultado, se obtuvieron cuatro clonas que presentaron una mayor intensidad, respecto a la cepa silvestre de *S. schenckii* (WT).

Con el fin de comparar la intensidad de fluorescencia de cada cepa, las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 60X y con la misma exposición.

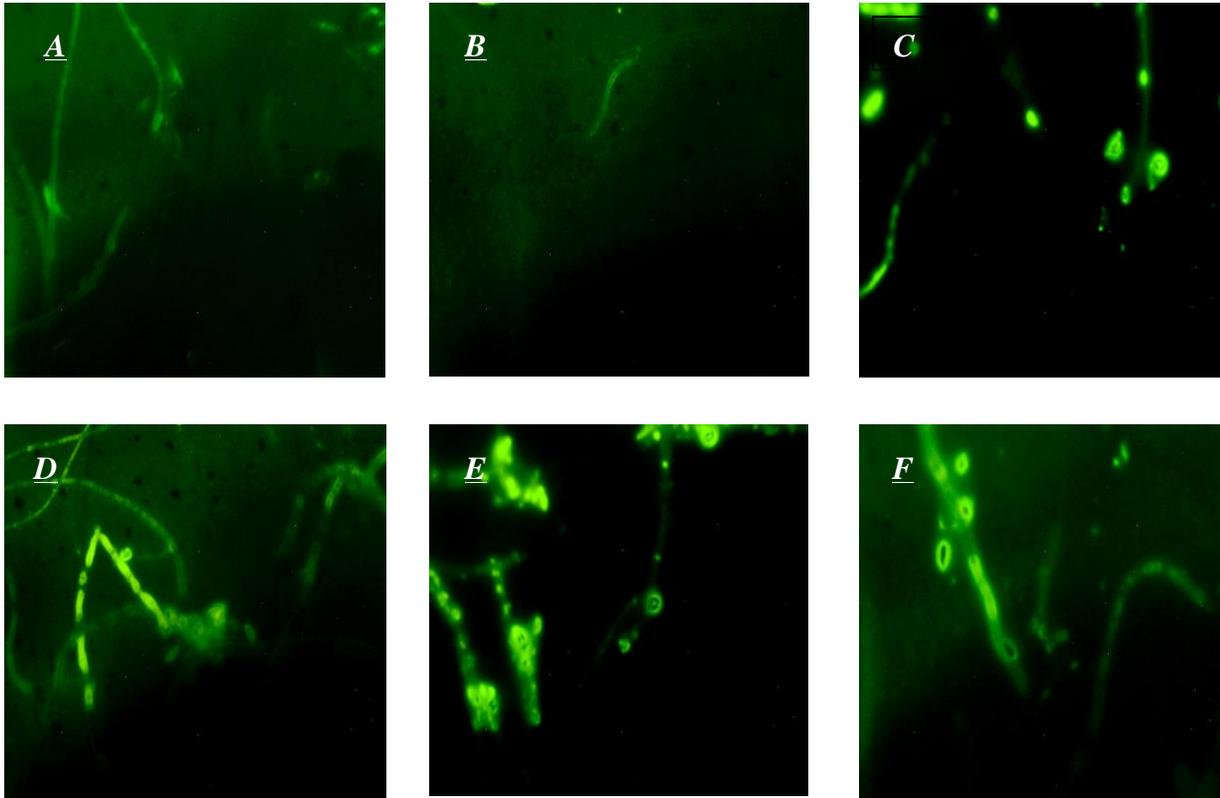


Figura 3. *S. schenckii*. Células miceliales bajo microscopía de fluorescencia. Lente de 60X. En las figuras A y B se puede observar la cepa silvestre de *S. schenckii*; que presenta una fluorescencia de baja intensidad con respecto a las figuras C, D, E y F que muestran las clonas que fueron transformadas y presentaron una fluorescencia de mayor intensidad.

CONCLUSIÓN

Con el presente trabajo se logró el objetivo de la manipulación genética de *S. schenckii*, pues se llevó a cabo la transformación de dicho hongo mediada por *Agrobacterium*; conseguimos introducir el vector pH1 y expresar la proteína verde fluorescente en la cepa de *S. schenckii*.

A pesar de encontrar una fluorescencia basal en el hongo, fue claro que tras la transformación la intensidad de la fluorescencia bajo las mismas condiciones de microscopía, aumenta en un alto grado, permitiéndonos

concluir que *S. schenckii* había sido transformado y que la expresión de la GFP fue exitosa en dicho organismo.

Este tipo de estudios generan nuevas herramientas que permiten el estudio genético y molecular de este tipo de organismos, por lo que los considero de gran importancia.

REFERENCIAS

Casas-Flores S, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A. (2011). "Methods in Molecular Biology". *Three Decades of Fungal Transformation*. Totowa, NJ: Springer. [pp: 315-325].

Lopes-Bezerra L. (2011). "*Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans". *Front. Microbio.* Número 243. Volumen 2. [pp: 1-4].

Lopes-Bezerra L, Schubach A, Costa R. "*Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras*". *Cienc.* 78(2):[pp: 293-308].

López-Romero E., Reyes-Montes MdR., Pérez-Torres A., Ruiz-Baca E., Villagómez-Castro JC., et al. (2011). "*Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem". *Future Microbiol.* 6(1): [pp: 85-102].

Romero-Cabello R, Bonifaz A, Romero-Feregrino R, Sánchez CJ, Linares Y. (2011). "*Disseminated sporotrichosis*". *BMJ case reports*. [pp: 39-40].

Tsien-Roger Y. "*The green fluorescent protein*". (1998). *Annu. Rev. Biochem.* 67:[pp: 509-44].