

TRANSFORMACIÓN DE *SPOROTHRIX SCHENCKII* MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*: GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES

Luna-Herrera, Jorge Alejandro (1), Clavijo-Giraldo, Diana Marcela (2), Mora-Montes, Héctor Manuel (3)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: ja.lunaherrera@ugto.mx

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [diamar438@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [hmora@ugto.mx]

Resumen

La esporotricosis es la micosis cutánea de mayor prevalencia en América Latina. Los agentes etiológicos de la esporotricosis son varias especies de hongos del complejo *Sporothrix schenckii*, cuyos principales factores de virulencia son su dimorfismo y termotolerancia, aunque el resto de los factores que determinan su patogenicidad siguen siendo desconocidos. En este trabajo se describe la generación de una colección de mutantes insercionales de *S. schenckii* a partir de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, buscando contribuir al descubrimiento de genes de interés que permitan entender la virulencia de *S. schenckii*. Se generaron 29 cepas mutantes, la mayoría con un fenotipo similar al de la cepa silvestre. Sin embargo, no se realizaron pruebas suficientes para determinar si se interrumpió algún gen de interés.

Abstract

Sporotrichosis is the most prevalent fungal subcutaneous infection in Latin America. The etiological agents are in fact a complex of fungal species named *Sporothrix schenckii* complex, whose main virulence factors are the dimorphism and thermotolerance; although other factors involved in their pathogenicity are still unknown. In this work, we describe the generation of insertional mutant collection of *S. schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, in order to contribute to the discovery of new genes related with *S. schenckii* virulence. Twenty-nine mutant strains were generated, most of them with a similar phenotype to the wild-type strain. However, studies were not enough to determine if a gene of interest was disrupted.

Palabras Clave

Sporothrix schenckii; Transformación; *Agrobacterium tumefaciens*; Colección de mutantes;

INTRODUCCIÓN

Las micosis son uno de los padecimientos cutáneos presentados con mayor frecuencia en seres humanos a nivel mundial [1]. En el caso particular de América Latina, la infección fúngica subcutánea de mayor prevalencia es la esporotricosis [2]. En los seres humanos, las lesiones causadas por la esporotricosis están generalmente limitadas a la piel, tejido subcutáneo y nódulos linfáticos adyacentes [3].

Los agentes etiológicos de la esporotricosis son diferentes especies del complejo *Sporothrix schenckii* [4]. De manera particular, *S. schenckii* es un hongo dimórfico cuya transformación es dependiente de la temperatura de cultivo: a 25°C se manifiesta su forma saprófita, mostrando crecimiento filamentosos o micelial; mientras que a 37°C se transforma en su forma patógena, exhibiendo una morfología levaduriforme. Si bien, su dimorfismo y termotolerancia son factores de virulencia de gran importancia, es poca la información referente a otros factores de virulencia [5]. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos factores de virulencia de *S. schenckii* ha sido la meta de una gran cantidad de estudios referentes a dicho hongo [3].

Agrobacterium tumefaciens es un microorganismo de gran importancia en el ámbito de la biotecnología. *A. tumefaciens* tiene la capacidad de infectar las raíces de plantas dicotiledóneas y producir tumores por medio de la inserción de material genético dentro del genoma de la bacteria: inserta una región denominada T-DNA contenida en el plásmido Ti. Esto fue explotado en el estudio de plantas, al sustituir los genes tumorales del T-DNA por genes marcadores y secuencias de interés, pudiéndose así manipular genéticamente plantas [6]. A partir de 1998, se empezó a utilizar *A. tumefaciens* en la transformación de hongos, al inducir dicho proceso en el medio de cultivo con la adición de acetosiringona. Eso representó un avance en el estudio de hongos, ya que las técnicas anteriormente utilizadas en su transformación resultaban difíciles o tenían bajos rendimientos [7].

Dada la relevancia de la esporotricosis como la micosis con mayor prevalencia en América Latina, el objetivo de este trabajo es la generación de una

colección de mutantes insercionales a partir de la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Al crear una colección de mutantes insercionales de *S. schenckii*, es posible que alguno de los genes que determinan su patogenicidad sea alterado, permitiendo así el descubrimiento de nuevos factores de virulencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

En la Tabla 1 se indican las cepas de organismos empleadas en este trabajo.

Se realizaron cultivos de *S. schenckii* en medio YPD pH 4,5 (extracto de levadura 1,0% [m/v], dextrosa 3,0% [m/v], peptona de gelatina 2,0% [m/v], pH ajustado a 4,5 con HCl 1 N) y a 28°C para la obtención de su forma saprófita o micelial. Para la conversión de *S. schenckii* a su forma patógena o levaduriforme, se realizaron cultivos en medio YPD pH 7,8 (extracto de levadura 1,0% [m/v], dextrosa 3,0% [m/v], peptona de gelatina 2,0% [m/v], pH ajustado a 7,8 con NaOH 1 N).

A. tumefaciens fue cultivado en medio LB (extracto de levadura 0,5% [m/v], peptona de gelatina 1,0%

Tabla 1: Cepas de organismos utilizados

Organismo	Cepa	Antibióticos a los que presenta resistencia
<i>Sporothrix schenckii</i>	WT. Cepa silvestre "WT" (abreviatura de wild-type).	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL-1.	Ampicilina.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pBHgGg. AGL-1 transformado con el vector pBHgGg, denominada como cepa "pBHgGg" en el experimento.	Ampicilina y kanamicina.

[m/v], NaCl 0,5% [m/v]) junto con 0,1% de los antibióticos de selección de acuerdo a lo establecido en la Tabla 1. *A. tumefaciens* fue previamente transformado para que su T-DNA contuviera el gen *hyg*, proveyendo una resistencia a la higromicina B, y el gen *gfp* para la expresión de la proteína verde fluorescente.

Transformación de *S. schenckii*

Se siguió el procedimiento normalizado del Laboratorio de Glicobiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Aislamiento de las cepas transformantes

Habiendo transcurrido las 72 hrs. de incubación de los medios de cocultivo, los celofanes con las colonias de *S. Schenckii* y *A. tumefaciens* fueron desplazados a medios selectivos, los cuales consistieron en medios YPD 4.5 con higromicina B y cefatoxima, con 1 µl del antibiótico por ml de medio. Los medios selectivos fueron incubados por 48 hrs. a 28°C. Después, se recuperaron colonias de *S. schenckii* a partir de los medios selectivos. Se cortaron con un bisturí pequeños fragmentos de celofán con cada una de las colonias y fueron colocados en medios YPD 4.5 con 1 µl higromicina B.

Estudio de las cepas transformantes

Las cepas transformantes obtenidas fueron posteriormente cultivadas en medios YPD 4,5 sólidos y líquidos con 1 µl higromicina B por mL de medio a 28°C, incubando los cultivos líquidos con agitación a 200 rpm. También se realizaron cultivos en medio YPD 7,8 con la misma concentración de higromicina B, incubándose de 3 a 5 días y con rotación de 200 rpm. Se cosecharon los cultivos de placas de YPD 4,5 para la obtención de conidios. A su vez, los conidios

fueron sembradas en YPD 7,8 sin higromicina B e incubadas por 5 días. Se realizaron preparaciones de todos los cultivos para el estudio de su morfología, siendo comparadas con la cepa WT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se generaron 29 cepas transformantes de *S. schenckii*, cada una fue denominada por los números del 1 al 29.

La observación al microscopio de la forma saprófita de las cepas transformantes no sugiere alguna diferencia significativa en la morfología en comparación con la cepa WT: se observó que tanto los micelios de las cepas mutantes como de la cepa WT estaban conformados por hifas delgadas, septadas y presentando algunas ramificaciones, resultando prácticamente idénticas entre sí (véase IMAGEN 1). De manera macroscópica, se observó que las colonias de las cepas mutantes y la cepa WT eran irregulares, de color blanco y presentaban una superficie húmeda y arrugada (véase IMAGEN 2).



IMAGEN 1: Preparación en fresco de la cepa transformante #2 de *S. schenckii*, con amplificación 1000x. Esta imagen presenta las características morfológicas observadas en las 29 cepas mutantes y en la cepa WT.



IMAGEN 2: Cultivo de la cepa transformante #1 de *S. schenckii* en medio YPD 4,5. En esta imagen se observan las características estructurales macroscópicas observadas en las 29 cepas mutantes y en la cepa WT.

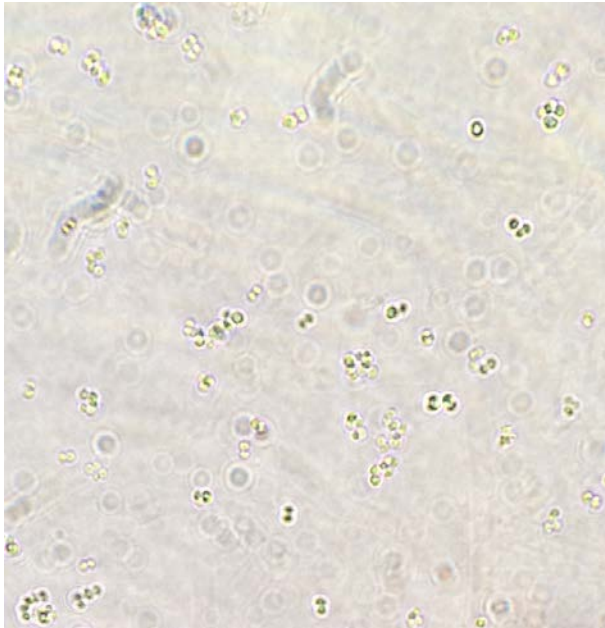


IMAGEN 3: Preparación en fresco de conidias provenientes de la cepa transformante #4 de *S. schenckii*, con amplificación 1000x. Esta imagen presenta las características observadas en los conidios provenientes de las 29 cepas mutantes y la cepa WT.

Los conidios de las cepas mutantes tampoco presentaron diferencia significativa con respecto a

la cepa WT (véase IMAGEN 3), en general estos fueron observados como cuerpos ovalados o circulares de menor tamaño en comparación con las hifas. No hubo una diferencia significativa aparente en el número de conidios producidos por cada una de las cepas.

Las observaciones microscópicas realizadas de la forma micelial y de los conidios coincide con las características reportadas en cepas patrón [8].

La transformación de la forma saprófita a la forma patógena resultó difícil de realizar. Tanto los cultivos en YPD 7,8 con y sin higromicina B, así como aquellos que partieron de conidios, presentaron una baja presencia de levaduras a los 5 días, por lo que probablemente debería de considerarse la realización de subcultivos durante un periodo mayor de tiempo; Bareja et al. (2015) [9] han reportado que han obtenido una transición completa de la forma saprófita a la forma patógena al realizar de manera sucesiva 5 subcultivos en medio agar-sangre, cada uno con incubación de 5 a 7 días. La mayoría de los cultivos en medio YPD 7,8 presentaron una misma proporción de células levaduriformes, observándose menos del 5% de cuerpos con esta morfología. La excepción a esta tendencia fue la cepa transformante #22, la cual mostró una alta tasa de formación de células levaduriformes, predominando esta morfología sobre la forma saprófita (véase IMAGEN 4). Dada esta característica particular de la cepa #22, existe la posibilidad de que la transformación de dicha cepa haya alterado alguno de las regiones reguladoras de los genes que controlan la replicación celular o la patogenicidad misma del hongo, por lo que puede que esta cepa resulte de interés para continuar su estudio. Así mismo, es probable que también esto haya sido provocado por algún error ocurrido durante el desarrollo del experimento, por lo que es necesario estudiar más a fondo esta cepa antes de poder aseverar que se haya afectado un gen de interés.

CONCLUSIONES

Se logró la realización de una colección de mutantes insercionales del hongo patógeno *Sporothrix schenckii*. Por lo general, todas las cepas transformantes presentaron un fenotipo semejante al de la cepa silvestre, con excepción de la cepa #22, en la cual se observó una

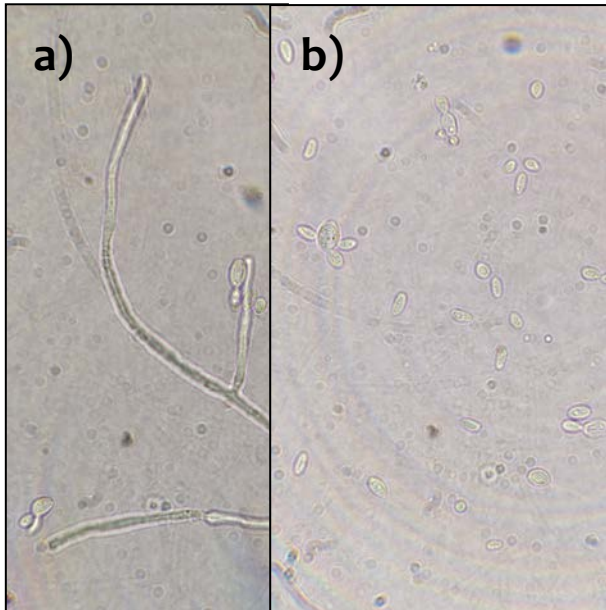


IMAGEN 4: Comparación de la transición de la forma saprófita a la forma patógena. a) Se observa a la cepa WT la cual, como la mayoría de las transformantes, mostró pocas células levaduriformes. B) Se puede observar a la cepa #22, la cual presentó una abundante cantidad de células levaduriformes. Preparaciones en fresco de *S. schenckii*, con amplificación 1000x.

producción atípica de la forma patógena al cultivarse en medio YPD 7,8 a 37°C, por lo que es posible que la transformación haya alterado algún gen de interés. Es necesario corroborar esto, así como hacer un estudio más extenso de las características de cada una de las cepas para determinar si pueden ser de utilidad o no en el estudio del genoma de *S. schenckii* y sus factores de virulencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por financiar mi participación en este trabajo, al Dr. Héctor M. Mora Montes por permitirme participar en este proyecto, a mis familiares por su gran apoyo durante mis estudios y a Diana Clavijo, Nancy Lozoya, Manuel Pérez, Cody Evans y demás personas del Lab. de Glicobiología de Hongos que me apoyaron durante la realización de este trabajo. Este trabajo fue apoyado por CONACyT, México (PDCPN2014-247109) y Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Hay, R. J. et al. (2014). The Global Burden of Skin Disease in 2010: An Analysis of the Prevalence and Impact of Skin Conditions. *J. of Investigative Dermatology*, 134(6), pp. 1527-1534.
- [2] Munro, C. (2016). Editorial: The dark side of yeast biology. *FEMS Yeast Research*, 16(3), fow026.
- [3] Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. (2006). *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(2), 293-308.
- [4] Mora-Montes, H. M., da Silva Dantas, A., Trujillo-Esquivel, E., de Souza Baptista, A. R., & Lopes-Bezerra, L. M. (2015). Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. *FEMS Yeast research*, 15(6), fov065.
- [5] Teixeira, M. M., de Almeida, L. G., Kubitschek-Barreira, P., Alves, F. L., Kioshima, É. S., Abadio, A. K., ... & Ruiz, J. C. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genomics*, 15(1), 1.
- [6] Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's Microbiology*. New York, NY: McGraw-Hill. pp. 516, 990-991.
- [7] Utermark, J., & Karlovsky, P. (2008). Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Protocols Online*, 83.
- [8] Lane, J. W., Garrison, R. G., & Field, M. F. (1969). Ultrastructural studies on the yeastlike and mycelial phases of *Sporotrichum schenckii*. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 1010-1019.
- [9] Bareja, R., Mehra, S. K. & Grover, P. S. (2015). Transition of *Sporothrix Schenckii* from Mycelial to Yeast Form and Determination of its Growth Curve. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 3(3A):1092-1095.