



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Expresión diferencial del gen de α -tubulina durante la transición dimórfica del hongo *Sporthrix schenckii*”

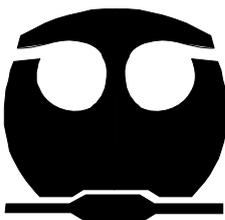
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NATALY GALICIA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Misael González Ibarra
VOCAL	Prof. Martha Alicia Menjivar Iraheta
SECRETARIO	Prof. Haydeé Torres Guerrero.
1^{er}. SUPLENTE	Prof. María del Pilar Granada Macia
2^o. SUPLENTE	Prof. León Patricio Martínez Casilla

Sitio donde se realizo el tema: Laboratorio Genética y Biología Molecular de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, Edificio "A" de Investigación, 6^o piso.

**Este trabajo fue financiado gracias al apoyo concedido por DGAPA
(IN219308)**

**Durante el desarrollo de este trabajo la autora fue becaria de la DGAPA,
en el proyecto IN219308**

Asesor del tema

Dra. Haydeé Torres Guerrero _____

Sustentante

Nataly Galicia Pérez _____

Agradecimientos:

A la Dra. Haydeé Torres por la oportunidad que me dio para realizar la tesis sobre un tema tan interesante.

A Gabina Arenas por la asesoría a lo largo de este trabajo y por la buena disponibilidad para ayudarme y sobre todo, por su constante apoyo científico y humano, por los consejos, las ideas y los ánimos que me ha brindado.

A Ricardo por el apoyo incondicional que me ha brindando todo este tiempo y por formar parte de mi vida.

A mis hermanos por el constante apoyo y los consejos brindados.

Y finalmente, a todos aquellos que de manera indirecta colaboraron en el desarrollo de esta investigación.

Abreviaturas:

GMP: Guanosin monofostato

GTP: Guanosin trifostato

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

GPDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de la transcripción reversa

CPH: cuerpo polar del huso

COMT: centro organizador de microtúbulos

ÍNDICE GENERAL

	Pags.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

RESUMEN

En este trabajo se estableció el tiempo de germinación de conidios de *Sporothrix schenckii* en medio Rodríguez del Valle (RV) pH 5.5, y se analizó morfológicamente la transición de conidio a micelio por microscopía óptica; además se estudió la expresión diferencial cualitativa del gen de α -tubulina por RT-PCR. Con base en estudios previos realizados en el laboratorio, se seleccionaron los tiempos de incubación para realizar el análisis morfológico durante la transición de conidio a micelio y los experimentos de seguimiento de la cinética de expresión del gen α tubulina asociada a ésta. Los resultados obtenidos en el análisis morfológico demostraron el establecimiento de cuatro formas diferentes del hongo a lo largo del proceso de transición: conidio, conidio hinchado, tubo germinativo y micelio; a las 0, 3, 10 y 18h respectivamente. Durante el cambio morfológico se observaron los siguientes cambios; el conidio a las 0h tiene una morfología piriforme, a las 3 h se expande isodiamétricamente para dar lugar a un conidio hinchado, del cual emerge una gema que se prolonga para formar el tubo germinativo (germínulas) (10h), posteriormente continua el crecimiento apical para dar origen a hifas largas que se ramifican y forman el micelio (18h).

En el estudio de la expresión específica del gen de α -tubulina por el método de RT-PCR, se usaron cebadores específicos del gen de α -tubulina diseñados a partir de una secuencia de *S. schenckii* clonada en pGEM, que se obtuvo por PCR utilizando cebadores inespecíficos diseñados a partir de una comparación de secuencias de genes de α tubulina de otros hongos relacionados. El resultado del estudio de expresión reveló un transcrito de α -tubulina en conidio y tubo germinativo (0h y 10h), y dos transcritos en micelio (18h). La diferencia cualitativa en la expresión de la banda esperada y la aparición de una banda adicional sugiere que es necesario más de un producto génico durante la transformación de conidio a micelio. Estos cambios en la expresión del mensajero pueden contribuir a los eventos morfológicos asociados a rearrreglos de citoesqueleto de tubulina ocurridos durante la transición.

INTRODUCCIÓN

La esporotricosis es una micosis subcutánea o profunda producida por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, de evolución subaguda o crónica, que afecta principalmente piel, tejido subcutáneo y ganglios linfáticos. En su forma sistémica, el hongo puede propagarse a hueso, pulmón, articulaciones, mucosas, sistema nervioso central y tracto genitourinario (1, 2).

El mecanismo de infección más frecuente es a través de un traumatismo en la piel con material contaminado con hifas y conidios, sin embargo, la infección también puede adquirirse por vía respiratoria y causar esporotricosis pulmonar primaria (3).

Las características clínicas de la esporotricosis dependen del mecanismo de infección y del sistema inmune del individuo (1, 4) y se clasifican en:

- a) Esporotricosis linfangítica. Se inicia con una lesión nodular “chancro esporotricósico”, que se disemina posteriormente a través de los vasos linfáticos formando lesiones secundarias nodosas supurativas, gomas. La localización más frecuente es en miembros superiores e inferiores, deteniéndose en el ganglio mayor, siendo este cuadro la forma típica de la enfermedad (1, 4).
- b) Esporotricosis fija. Las lesiones se restringen al sitio de la inoculación, y son placas ulceradas, verrucosas, infiltradas o eritomasas que no involucran linfáticos regionales (1).
- c) Esporotricosis diseminada. Es una forma secundaria de la enfermedad que se disemina a partir de un foco primario cutáneo o pulmonar y puede involucrar articulaciones, huesos, mucosas, órganos internos o sistema nervioso central (5, 6).
- d) Esporotricosis pulmonar primaria. Esta forma clínica es poco conocida, el mecanismo de infección es diferente a las formas anteriores, ya que se adquiere por la inhalación de la forma infectante. El cuadro clínico se confunde fácilmente con tuberculosis, y consiste en tos, esputo hemoptoico, dolor pleuro-torácico, fiebre, astenia y adinamia; se presenta sobre todo en individuos alcohólicos o con deficiencia en el sistema inmune (4, 7).

La esporotricosis es una micosis cosmopolita, rara en Europa, aunque fue descrita por primera vez por DeBeurmann y Gougerot en Francia (1). En la República Mexicana, es un padecimiento que ocupa el primer lugar dentro de las micosis subcutáneas (8); se presenta con mayor frecuencia en Jalisco y la meseta central del país, sobre todo en la Sierra Norte de Puebla, Nuevo León, Guanajuato, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Veracruz y Distrito Federal (6, 9). Esta micosis se considera de tipo ocupacional y afecta principalmente a floristas, campesinos, alfareros, carpinteros y personas que están en contacto con restos vegetales contaminados con la fase micelial del hongo (4). En México, afecta por igual a hombres y mujeres aunque el mayor número de casos se presenta en niños y adultos jóvenes (4).

S. schenkii pertenece a la clase de los Hyphomycetes, descrita por primera vez por Hektoen y Perkins en 1900 (10). Es un hongo dimórfico que presenta dos formas: micelial y levaduriforme. La forma micelial o infectante se encuentra en la naturaleza y en los medios que se utilizan rutinariamente en el laboratorio a temperatura ambiente. La forma levaduriforme o parasitaria se obtiene del hospedero o de medios complejos como agar sangre o BHI a 37°C, o en el medio RV a pH 7.2 a 28 o 37°C (11).

El hongo crece *in vitro* a 28° C en medios sólidos como micelio y forma colonias limitadas, de aspecto membranoso, radiadas, con coloración que puede ir desde blanca o crema hasta negra. Estas colonias están formadas microscópicamente por hifas septadas, hialinas con un diámetro de 1 a 2 µm, ramificadas, con conidióforos de 10 a 30 µm de largo de donde emergen conidios piriformes dispuestos en forma radial, elongados u ovals de 1.5 a 3µm, a estas estructuras conidiogénicas se les denomina simpodios, de ahí el nombre de simpodio-conidios, acompañados de coremium. En cultivos viejos se observan conidios cónicos o triangulares, pigmentados, de paredes gruesas con alto contenido de melanina unidos a las hifas (10). La forma parasitaria o levaduriforme crece en medios sólidos a 37°C formando colonias corrugadas con consistencia cremosa y apariencia húmeda, la morfología microscópica está formada por células fusiformes u ovoides, uni o bigemantes con un tamaño de 2.5 a 5 µm por 3.5 a 6.5 µm, se multiplican por gemación (Fig. 1).

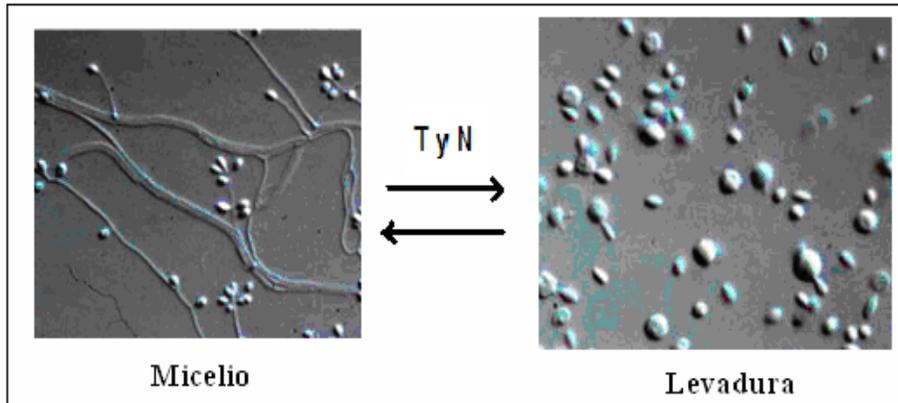


Fig. 1 Morfología microscópica de *S. schenckii*. Forma infectante (micelio) y forma parasitaria (levadura). T, temperatura. N, nutrientes.

Algunos hongos tienen la capacidad de desarrollar mecanismos que les permiten vivir dentro del hospedero en condiciones adversas y establecerse como patógenos, a estos se les denomina mecanismos de patogenicidad, los cuales favorecen la colonización, diseminación, capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles y eludir los mecanismos de respuesta inmune del hospedero; el dimorfismo se considera uno de los principales mecanismos de patogenicidad. En algunos hongos dimórficos, su fase infectante es la forma micelial compuesta por hifas y conidios que se localizan en suelo y restos orgánicos, como es el caso de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, y *S. schenckii*; estas formas infectantes penetran a través de vía aérea o traumática y llevan a cabo un proceso de transición morfológica de la fase infectiva a la fase parasitaria (levadura) para establecerse y permanecer en el hospedero (3).

El dimorfismo en *S. schenckii* es un cambio reversible en respuesta a cambios ambientales entre dos morfologías: micelio y levadura. El crecimiento de la forma micelial o filamentosa, está generado por un crecimiento apical que produce tubos largos (hifas) separados por septos que presentan poros regulados por cuerpos de Woronin, para el paso de nutrientes. En el crecimiento de la levadura se producen gemaciones a partir de conidios o hifas, este es un proceso de división mitótica que da origen a células independientes (Fig.2).

Actualmente, se sabe que el dimorfismo de *S. schenckii* está regulado por factores nutricionales, pH, temperatura y concentración de CO₂, sin embargo,

se desconoce cómo estos factores morfológicos interrelacionan para modular la expresión de genes involucrados en la respuesta dimórfica.

Una estrategia para el estudio de hongos es el uso de métodos genéticos asociados a la reproducción sexual, ligamiento entre genes y/o producción de células recombinantes por medio de cruza, sin embargo, en *S. schenckii*, no ha sido posible realizar este tipo de estudios basados en segregación meiótica, debido a que no se ha descrito un estadio sexual; por lo que el estudio del dimorfismo se ha enfocado a cambios de moléculas o respuesta asociadas a la transición morfológica. Durante el cambio de una fase morfológica a otra se presentan cambios en la expresión o regulación de macromoléculas de los componentes del citoesqueleto (12); componentes que son vitales en la germinación de conidios y en el crecimiento apical.

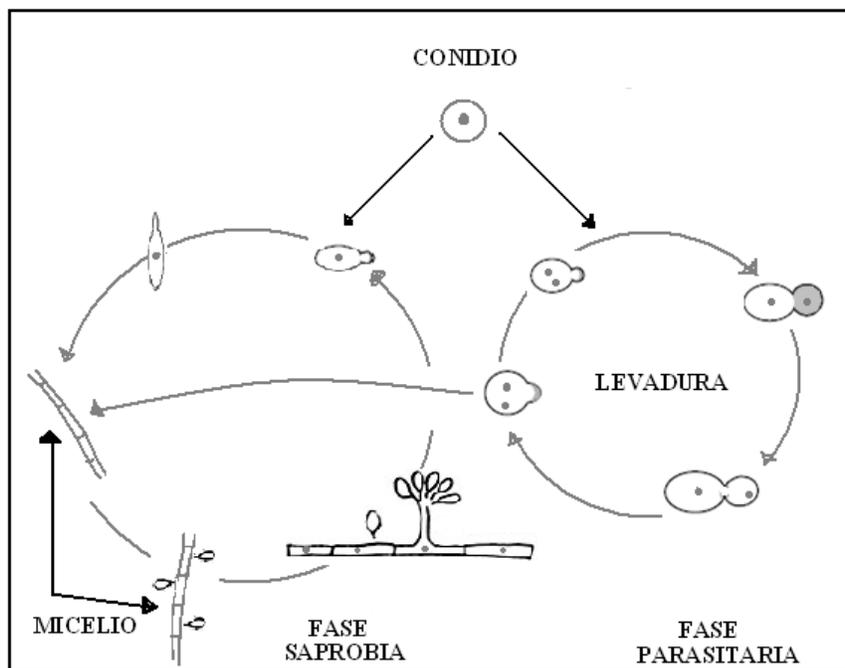


Fig. 2. Ciclo biológico de *S. schenckii* in vitro. En este esquema se muestra el proceso dimórfico, el cual depende principalmente de pH, temperatura y factores nutricionales.

Actualmente, se sabe que el dimorfismo de *S. schenckii* está regulado por factores nutricionales, pH, temperatura y concentración de CO₂, sin embargo, se desconoce cómo estos factores morfológicos interrelacionan para modular la expresión de genes involucrados en la respuesta dimórfica.

Una estrategia para el estudio de hongos es el uso de métodos genéticos asociados a la reproducción sexual, ligamiento entre genes y/o producción de células recombinantes por medio de cruza, sin embargo, en *S. schenckii*, no ha sido posible realizar este tipo de estudios basados en segregación meiótica, debido a que no se ha descrito un estadio sexual; por lo que el estudio del dimorfismo se ha enfocado a cambios de moléculas o respuesta asociadas a la transición morfológica. Durante el cambio de una fase morfológica a otra se presentan cambios en la expresión o regulación de macromoléculas de los componentes del citoesqueleto (12); componentes que son vitales en la germinación de conidios y en el crecimiento apical.

Todos los hongos filamentosos generan un crecimiento polarizado o apical continuo, para dar origen a tubos germinativos o germínulas. En esta etapa, los componentes de pared celular se sintetizan y depositan exclusivamente al ápice, si esta síntesis continua se extiende el tubo germinativo para formar hifas. Posteriormente, la hifa principal se ramifica y se establecen ejes adicionales de polaridad (13).

La morfogénesis fúngica se puede resumir en cuatro etapas: Primero, el conidio o espora inactiva rompe la inactividad y se expande isotrópicamente. Durante la expansión isotrópica, se produce la maquinaria y los materiales necesarios para formar la nueva membrana plasmática y pared celular. La maquinaria está compuesta por diferentes tipos de procesos individuales, distribuidos y arreglados conforme a distintos diseños, según el tipo de célula y de movimiento de que se trate; consta de partes fijas y móviles, que sirven de soporte y ejecutan la función. Las partes móviles se encargan de originar el movimiento, se les denomina también, motores moleculares, que convierten alguna forma de energía —térmica, química, hidrodinámica, eléctrica, etc— en energía mecánica. Ejemplos de estos motores son proteínas de microtúbulos, kinesina y dineina; y la proteína miosina de los microfilamentos de actina (13).

En una segunda etapa, se lleva a cabo el proceso llamado “establecimiento de la polaridad”, se selecciona un punto del cual emerge el tubo germinativo (o gema) y posteriormente, la maquinaria y los materiales que forman la nueva membrana plasmática y pared celular se redirigen al punto elegido, y surge el inicio del tubo germinativo (o gema), en un proceso llamado “mantenimiento de la polaridad”. Si los materiales y la maquinaria continúan depositándose en el

punto de polaridad, la gema se extiende apicalmente para formar la germínula y se divide por septación, las células adyacentes permanecen unidas y finalmente se establece un nuevo punto de polaridad para que emerja una ramificación; el crecimiento polar continúa en la hifa principal y comienza la generación de las ramificaciones a partir de nuevos puntos de polarización.

En levaduras, la maquinaria y los materiales para la gemación están más dispersos, la gema continúa extendiéndose hasta alcanzar un tamaño definido y posteriormente la célula madre e hija se separan, entonces comienza el crecimiento isotrópico en ambas células (13) (Fig. 3).

Durante estos procesos morfogenéticos, el citoesqueleto se reorganiza para cumplir funciones como: mantenimiento de la polaridad, división celular, migración de núcleos, orgánelos, vesículas, etc. Estas funciones son dirigidas por distintos componentes del citoesqueleto, principalmente por filamentos de actina y microtúbulos en combinación con los motores moleculares (14, 15). El citoesqueleto es un entramado tridimensional que provee el soporte interno en las células, anclan las estructuras internas que participan en el movimiento celular, cilios y flagelos. En hongos desempeña un papel importante en el transporte intracelular, participa en el crecimiento polarizado y en la división celular principalmente.

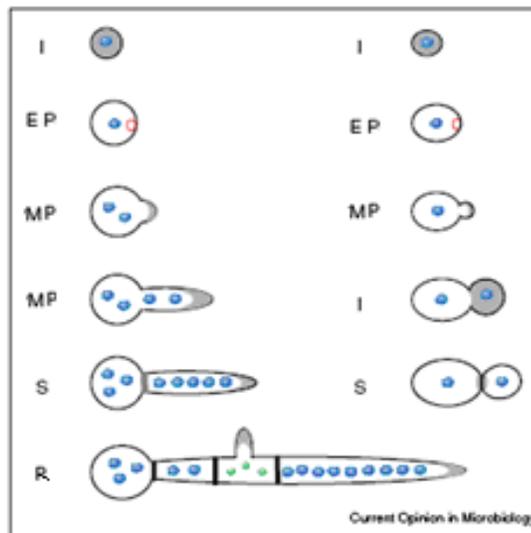


Fig. 3. Morfogénesis en hongos filamentosos y levaduras. El sombreado gris muestra áreas de crecimiento. I, Expansión isotrópica; EP, establecimiento de la polaridad; MP, mantenimiento de la polaridad; S, septación; R, ramificación. Los óvalos azules representan núcleos en interfase. Los puntos verdes, núcleos mitóticos, (Modificado de: Momany, M., 2002).

El citoesqueleto está compuesto por tres sistemas principales de filamentos: filamentos intermedios, microfilamentos y microtúbulos. (Fig. 4).

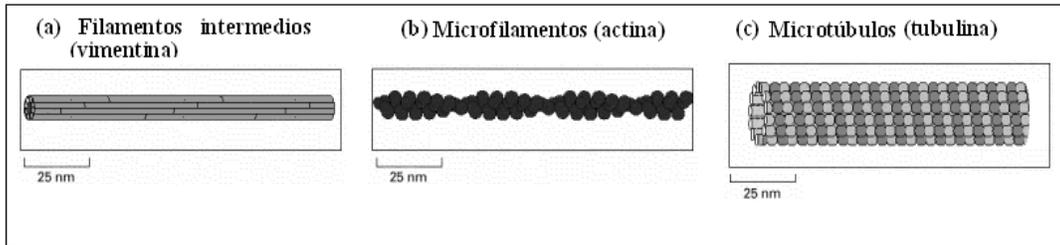


Fig. 4. Principales tipos de filamentos de proteínas que conforman el citoesqueleto. (Modificado de Alberts, 2002)

Los filamentos intermedios son filamentos entrelazados de aproximadamente 10nm de diámetro constituidos de subunidades de proteínas, las cuales varían de acuerdo al tejido en el que se encuentran.

Los microfilamentos son polímeros de actina lineales con proteínas asociadas o unidas, constituyen el citoesqueleto de actina. Los polímeros de actina forman estructuras flexibles de un diámetro aproximado de 5-9nm organizados en una red de filamentos por debajo de la membrana plasmática, pero también se encuentran en el citoplasma y en uniones celulares. Sus funciones son: participar en el movimiento, dar estructura, forma celular, y participan en la división celular (16).

Los microtúbulos son estructuras alargadas organizadas en forma de cilindros huecos individuales y constituidos de subunidades de tubulina. Generalmente se unen a un centro organizador de microtúbulos (COMT) o centrosoma, o están distribuidos en el citoplasma; poseen un diámetro de aproximadamente 25nm y son más rígidos que los filamentos de actina (16). Los microtúbulos son estructuras polares, y cada uno de sus extremos tiene diferentes propiedades de ensamble y desensamble, a estos extremos se les denomina positivo y negativo; el extremo negativo está comúnmente localizado en el COMT.

Las proteínas estructurales que forman los microtúbulos son las α y β -tubulina, proteínas altamente conservadas en eucariontes (17). Ambas proteínas se polimerizan y se unen en dímeros, que se ensamblan en un arreglo de cabeza-cola para formar el protofilamento lineal. La interacción lateral entre

protofilamentos establece la pared del microtúbulo cilíndrico (18) (Fig. 5). Los microtúbulos unidos al COMT se polimerizan y despolimerizan según las necesidades celulares.

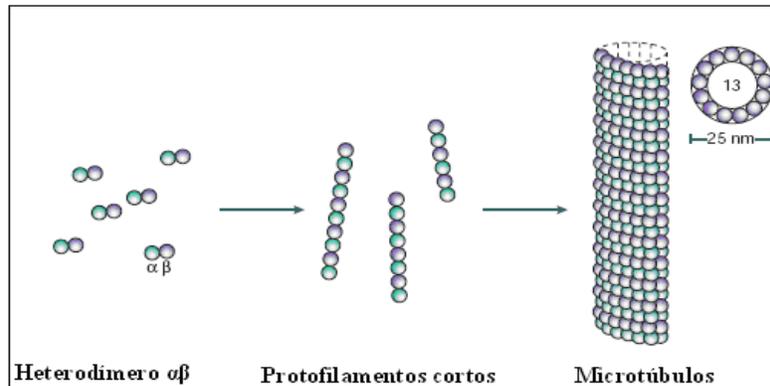


Fig. 5. Estructura de un microtúbulo y sus subunidades. La subunidad de cada heterodímero se forma de varios monómeros de α y β -tubulina. La asociación de estos heterodímeros conduce a la formación del protofilamento lineal; y la asociación lateral de protofilamentos conduce a la formación del microtúbulo cilíndrico (Modificado de Westerman S.)

En levaduras y hongos filamentosos, una estructura inmersa en la membrana conocida como cuerpo polar del huso (CPH) actúa como el centro organizador de microtúbulos (19). El CPH está formado por estructuras en forma de anillo que contienen una isoforma de tubulina, la γ -tubulina, requerida para la nucleación y polimerización del microtúbulo. Los dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina se unen al anillo de γ -tubulina con una orientación específica, siempre el extremo negativo de cada microtúbulo queda dentro del CPH y el crecimiento se produce por el extremo positivo.

Muchas especies expresan múltiples isoformas de α y β -tubulina y pertenecen a una familia multigénica. En hongos, el tamaño de las familias varía de uno a dos genes, de cinco a siete en vertebrados, y de seis a nueve en plantas. En *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus nidulans*, se han identificado dos genes de α -tubulina; en las dos primeras entidades fúngicas es esencial sólo un gen de α -tubulina para las células, pero en *A. nidulans* se han asociados los diferentes genes a funciones específicas; el gen α -*tubA* se expresa en el crecimiento vegetativo, mitosis y migración nuclear, mientras que el gen α -*tubB* es indispensable en el desarrollo sexual,

también se ha determinado que en estos organismos, isoformas diferentes tienen funciones intercambiables (20).

La familia génica de tubulina está compuesta al menos por tres subfamilias, α , β y γ presentes en todos los organismos eucariontes, cada una definida por una secuencia conservada. Sin embargo, existen otras tubulinas δ , ϵ y ζ con una distribución evolutiva restringida, tal es el caso del protozooario *Trypanosoma brucei*, el cual presenta por lo menos seis miembros de la superfamilia de tubulina (α , β , γ , δ , ϵ y ζ). De estas variedades α y β -tubulina son las más abundantes y las más extensamente estudiadas (21).

El grado de similitud de las secuencias varía entre los integrantes de familia, y entre miembros de subfamilias. En un mismo organismo, la secuencia de aminoácidos de α y β -tubulina se conserva aproximadamente en un 40 %, y entre especies en un 36 a 42%. Entre diferentes organismos, α y β -tubulina muestra una identidad del 60%. Se considera que dependiendo del organismo existen genes múltiples de α y β -tubulina y que ambas proteínas pueden conservar homologías entre e inter especies (22).

La expresión de los genes puede estar regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. Durante la transcripción los mecanismos regulatorios involucran diferentes procesos: a) sitios de inicio de la transcripción, b) mecanismos de la elongación del transcrito, c) estabilidad del RNAm, d) procesamiento del mRNA (corte y empalme), e) poliadenilación y f) transporte del mensajero hacia el citoplasma. Pero, no necesariamente la expresión del gen debe de estar sujeto a regulación transcripcional, los mecanismos regulatorios de la proteína también puede ser modificaciones postraduccionales de la proteína, regulación de la cinética de síntesis o degradación de la proteínas.

En las células eucariontes, la presencia de múltiples isotipos de $\alpha\beta$ -tubulina se deben a regulación por modificaciones post-traduccionales como: acetilación, palmitoilación, fosforilación, poliglutamilación, destirosinación y poliglicilación, de las cuales las dos últimas parecen ser específicas de tubulina. En la tabla 1 (23) se muestra los mecanismos regulatorios postraduccionales y las posibilidades de variación funcional dadas por estos mecanismos (Tabla 1).

En *Paracoccidioides brasiliensis* Silva y colaboradores estudiaron la cinética de expresión de la α -tubulina durante la transición dimorfica y mostraron que los niveles del mensajero incrementaban durante la transición de levadura a

micelio y disminuían durante el proceso inverso y estos cambios también coincidieron con los cambios morfológicos ocurridos durante la transición a la fase de crecimiento polarizado (24). En estudios similares en *H. capsulatum* var. *capsulatum*, se observaron diferencias en los niveles de expresión del gen de α -tubulina y se detectó un incremento también durante la transición de levaduras a micelio y una disminución en la transición inversa. En estos dos patógenos humanos, la α -tubulina está asociada a la generación del crecimiento polarizado durante la transición morfológica (25).

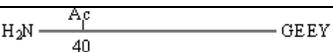
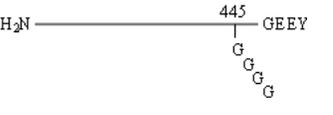
A-TUBULINA	MODIFICACIÓN	FUNCIÓN PROPUESTA
 <p>H₂N —————^{Ac} 40 ————— GEEY</p>	Acetilación/ deacetilación	Regulación de la motilidad celular, unión de MAPs a microtúbulos
 <p>H₂N ————— GEEY</p>	Tirosinación/ destirosinación	Diferenciación, posible coordinación de elementos del citoesqueleto.
 <p>H₂N —————⁴⁴⁵ GEEY E E E</p>	Poliglutamilación	Maduración de centriolos y posibles sitios de poliglutamilación, estabilidad, motilidad ciliar, regulación de interacciones con MAPs
 <p>H₂N —————⁴⁴⁵ GEEY G G G</p>	Poliglicilación	Esencial en <i>Tetrahymena</i> para: organización axonemal, ciliar, motilidad, citocinesis.
 <p>H₂N —————³⁷⁶ GEEY</p>	Palmitoilación	Posicionamiento de microtúbulos astrales en gemación de levaduras: posible interacción con corteza cerebral.
 <p>H₂N ————— GEEY P</p>	Fosforilación	Posible diferenciación neuronal.

Tabla 1. Descripción de las distintas modificaciones post-traduccionales de tubulina y sus funciones propuestas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios recientes de morfogénesis, algunos investigadores han enfatizado la importancia de los microtúbulos en la germinación y durante el crecimiento isodiamétrico y apical, por tener un papel esencial en el transporte de orgánulos y vesículas a largas distancias, y por que determinan la direccionalidad y extensión del crecimiento celular; de ahí la importancia de estudiar la interrelación entre las características morfológicas y la expresión de los componentes de citoesqueleto. Debido a que en *S. schenckii* no ha sido posible realizar estudios basados en segregación meiótica, debido a que no se ha descrito un estadio sexual en este hongo, el estudio del dimorfismo se ha enfocado a cambios de moléculas o respuesta asociadas a la transición morfológica. Por esta razón se estudió la expresión de una de las proteínas que constituyen los microtúbulos, la α -tubulina. Se propone que esta proteína tiene un papel importante en la transición de conidio a micelio de *S. schencki* durante el proceso de morfogénesis, en donde están involucrados cambios en la expresión de este componente de citoesqueleto en la célula fúngica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la expresión diferencial del gen de α -tubulina durante la etapa de transición de conidio a micelio en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar los tiempos de incubación para estudiar la morfogénesis y la cinética de expresión del gen de α -tubulina durante la transición de conidio a micelio
- Analizar morfológicamente la transición de conidio a micelio.
- Determinar y comparar los niveles de expresión génica por RT-PCR semicuantitativo en las distintas etapas de transición de conidio a micelio.

Hipótesis

La expresión del gen de α -tubulina puede variar durante la transición de conidio a micelio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa. Se utilizó la cepa de *S. schenckii* EH-217, aislada de un paciente con esporotricosis, procedente del Instituto Dermatológico de Jalisco, México donada por el Biólogo Jorge Mayorga.

Obtención de conidios de *S. schenckii*. La cepa se sembró en tubos con medio YPD- conidios compuesto por (g/100 ml): D-glucosa, 1; peptona de caseína, 0.5; extracto de levadura, 0.3; y agar, 1.5; se incubaron a 28° C por 7 días. Los conidios se obtuvieron agregando 5mL de agua estéril al cultivo y la superficie se raspó con asa micológica para obtener una suspensión. La suspensión celular se filtró a través de papel Whatman No. 40; para eliminar los fragmentos de micelio, y para tener una población celular lo más homogénea posible, compuesta principalmente de conidios, el filtrado se centrifugó a 5000 rpm/5 min, el paquete celular se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se cuantificó en cámara de Neubauer.

Análisis morfológico durante la transición de conidio a micelio. Los conidios se inocularon en matraces de un litro con 250 ml de medio RV pH 5.5 (g/L): glucosa, 20; Na₂HPO₄.12H₂O, 4.03; KH₂PO₄, 0.5; MgSO₄.7H₂O; 0.25; arginina, 1; NH₄HCO₃, 1; solución RV, 10µL, tiamina (1mg/mL), 10 µL y biotina (1 mg/mL en etanol), 10µl; a una concentración de 2 X 10⁸ conidios/ml de medio, obtenidos como se describe en el párrafo anterior. Se incubaron a 28° C en agitación y se tomaron alícuotas de 200µL a las 0, 3, 10 y 18 h. Las muestras se fijaron en formaldehído a una concentración final del 2 % durante dos horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de fijación se centrifugaron a 5000 rpm/5min y se eliminó el sobrenadante. Los paquetes celulares se lavaron dos veces con 100 µL de PBS y se resuspendieron en un volumen final de 50 µl de PBS. Las células se observaron por microscopía óptica en un microscopio Olympus BX51 DIC (Differential Interference Contrast).

Selección de conidios para la obtención de RNA total. Para obtener la cantidad suficiente de biomasa se hicieron cuatro experimentos independientes en cada uno de los tiempos seleccionados. En cada experimento, se sembraron 200 tubos y los conidios obtenidos se sembraron en las mismas condiciones como se describe en el párrafo anterior, se inocularon en matraces de 1L con 250 ml de medio RV pH 5.5, a 28° C en agitación, los tiempos de incubación fueron los mismos que para los experimentos de análisis morfológico. Una vez concluido el tiempo de incubación, se centrifugaron a 5000 r.p.m. /5 min, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y el paquete celular se transfirió a tubos Eppendorf a -20° C. Los paquetes congelados se liofilizaron en un equipo Labconco Freeze Bryer.

Obtención de cebadores utilizados para secuenciar α -tubulina. Para obtener una secuencia específica de un fragmento de α -tubulina de *S. schenckii*, se utilizaron cebadores derivados del alineamiento de secuencias del gen de α -tubulina de *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans*, organismos cercanos filogenéticamente con *S. schenckii*. Las secuencias del gen se bajaron del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). También se hizo el alineamiento de la proteína de estos mismos hongos, y se observó un grado de conservación mayor en proteína, por ello se cambió la proteína a DNA y a partir de esta secuencia se diseñaron los cebadores. Se utilizaron diferentes pares de cebadores para obtener un fragmento de mayor tamaño, sus secuencias se muestran a continuación:

	Secuencia	Tm	°C
TubaF25	5'-AACAGTGCCTGGGAGCTCTA-3'	60.01	50
TubaR483	5'-GAAGGAGTGGAAGACGAGGA-3'	59.38	
TubFora393	5'-GGCAAGGAGCTGATCGAC-3'	59.46	53-50
TubReva997	5'-AGGCACGTCGCCATGTAC-3'	58.36	
8378-010	5'-GTTGGAAAGCATGCAGACAGC-3'	67	45-50
Rev	5'-GATCTCAACGAGTTCCGAC-3'	67	
8378-011 For			

tubFora 1033	5'-AAGCGCACCATCCAGTTC-3'	59.7	50
tubReva 1358	5'-CCTCCTCGTAATCCTTCTCG-3'	58.8	

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados para secuencia α -tubulina

Obtención de cebadores específicos de α -tubulina de *S. schenckii*. Una vez obtenido el fragmento se clono en pGEM ®-T Easy Vector Systems (Promega) para su posterior secuenciación. A partir de esta secuencia, se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de α -tubulina de *S. schenckii* con el programa Primer3 Output (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) que toma como base para el diseño de los cebadores los siguientes parámetros: la longitud ideal de los oligonucleótidos (18 y 25 pb), el porcentaje de guanina-citosina (40 y 60 %), la temperatura de alineamiento (Tm) (55 y 65 °C), además deben ser 100 % complementarios al DNA molde, no autocomplementarse, ni formar estructuras secundarias que impidan el alineamiento de los cebadores al DNA molde. Las secuencias de los cebadores específicos de α -tubulina de *S. schenckii* utilizados en los estudios de expresión fueron:

El iniciador 396(Ss) 5'- GGCAAGGAGCTGATCGAC-3' sentido Tm= 63.7°C y 61.1 % GC y el iniciador 1071(Ss) 5'- GATGGTGCGCTTGGTCTT-3' anti-sentido Tm=63.9°C y 55.5 % GC que amplifican una región de 693 pb

Obtención de RNA total. Una vez obtenidos los iniciadores para el estudio de expresión se llevo a cabo la extracción del ARN, mediante el siguiente procedimiento:

Todas las soluciones utilizadas se prepararon con agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.05% (DEPC). La biomasa liofilizada se congeló con Nitrógeno líquido y se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino. El polvo se transfirió a tubos Eppendorf y las muestras se re suspendieron en Trizol (Invitrogen), 0.75 mL por cada 100 mg de biomasa liofilizada, y se mantuvieron a temperatura ambiente 5 min. Se adicionó 200 μ l de cloroformo y se agitaron los tubos en vortex durante 30 s, posteriormente se dejaron a temperatura ambiente

por 2 min. La mezcla de extracción se separó en dos fases por centrifugación (12,000 rpm/15 minutos), De la fase superior acuosa que contiene el RNA, se recuperó aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes, y se transfirió a un tubo nuevo; el RNA se precipitó con un volumen de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante toda la noche; el precipitado se recuperó por centrifugación, 12,000 rpm/10 min, y la pastilla de RNA se lavó dos veces con etanol al 75 %. Las muestras de RNA se secaron a temperatura ambiente y se disolvieron en agua destilada estéril tratada con DEPC. La fase inferior compuesta por ADN y proteínas se desechó.

La concentración y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría con Luz Ultravioleta (UV) a 260 y 280 nm y sólo se emplearon muestras de RNA total que presentaron una relación de absorbencia 260/280 nm de 1,9 a 2,0. La concentración del RNA se determinó con la absorbencia a 260 nm aplicando la siguiente fórmula:

$$[RNA]_{\mu\text{g} / \mu\text{L}} = \frac{200(\text{Absorbencia}_{260\text{nm}})40}{1000}$$

Calidad e integridad del ARN. Para determinar la calidad e integridad del ARN se realizaron geles desnaturalizantes de agarosa preparados de la siguiente manera (g/100mL): agarosa, 1.5; formaldehído al 37%, 20mL; MOPS 10X (MOPS 0,2 M; acetato de sodio 0,05 M; EDTA 10 mM; pH 8,0), 10 mL; en agua DEPC, 70 mL. Las muestras se prepararon con 1 μg de RNA, MOPS 10X, 2 μL ; formaldehído 37%, 3.5 μL ; formamida, 10 μL y agua a un volumen final de 20 μL . Se incubaron durante 5 minutos a 65°C y se enfriaron en hielo; después se adicionó 10 μL de regulador de carga 6X compuesto por: glicerol, 5 ml; bromuro de etidio (10mg/ml), 1.5 μL , EDTA (0.5M, pH8), 20 μL ; azul de bromofenol (1g/ml), 40 μL ; en agua DEPC. Se prepararon geles de 30 ml en soportes de 8cm x 9cm y se separaron por electroforesis en MOPS 1X a 1 V/cm² durante 1 h. Los geles fueron fotografiados con un equipo de fotodocumentación (Kodak DC 290, BIO-RAD).

Síntesis y amplificación de primera hebra de ADNc. El ADNc se sintetizó mediante el siguiente procedimiento: ARN total, 5 µg; Oligo dT₍₁₅₎ (0.5 µg/µl), 1 µL; y agua libre de nucleasas en un volumen final de 5 µl. Esta mezcla de reacción se calentó a 70°C por 5 minutos y se transfirió a hielo. Posteriormente se adicionó una mezcla compuesta por: regulador de primera hebra 5X (Promega), 4 µL; MgCl₂ 25mM, 1.6 µL; dNTP 10mM, 1 µL; inhibidor de ribonucleasa RNasin 40U/µL (Promega), 0.5 µL; y 1 µL de enzima Transcriptasa reversa (Promega); se mezcló muy suavemente y se llevó a 25° C por 5 minutos. Se incubó a 55° C durante 60 minutos y se inactivó la enzima calentando a 70° C por 15 minutos. Para descartar contaminación con ADN genómico durante la extracción de ARN, se realizó un control negativo, el cual consistió en una reacción bajo las mismas condiciones de síntesis de ADNc, pero sin adicionar Transcriptasa reversa. El producto de esta reacción fue utilizado para realizar una reacción de amplificación con los cebadores específicos (396 Ss; 1071 Ss) y con cebadores de un gen de mantenimiento, cebadores para la amplificación de la enzima GPDH, en las mismas condiciones de amplificación. En caso de que se obtuvieran bandas de amplificación, se procedió a realizar una segunda extracción de ARN para eliminar toda contaminación de ADN.

Para tener un control positivo de síntesis de ADNc se amplificó con cebadores del gen GPDH, gen que se transcribe independientemente de las condiciones de crecimiento. Las secuencias de estos cebadores fueron las siguientes:

1. GPDH 5-CCTGCACCACCAACTGC-3' sentido
2. 5'-CAATGCCAGCCCCAGCA-3' anti-sentido.

La amplificación se realizó a partir de 5 µL de ADNc primera hebra, Taq-DNA polimerasa (Promega) 5U, 0.2 µL; iniciador sentido 10µM, 2µL; iniciador anti-sentido 10µM, 2µL; dNTP 2 mM, 2 µL; MgCl₂ 25 mM, 1.6 µL; y agua libre de DNasas/RNasas, en un volumen final de 20 µL. Se realizaron curvas de temperatura y concentración de magnesio para determinar las condiciones óptimas de reacción que fueron: MgCl₂ 2mM, 55° C. En todas las amplificaciones se utilizó un termociclador (iCycler Thermal Cycler, BIO-RAD) con el siguiente

programa: Ciclo 1 (1X): Desnaturalización inicial 2 minutos a 92° C. Ciclo 2 (35X): 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 60 s a 72°C. Ciclo 3 (1X) Extensión final, 5 minutos a 72° C.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en regulador TAE 1X. (Tris-HCl 0,04 M; ácido acético 0,04 M; EDTA 2 mM; pH 8,0), se cargaron alícuotas de 10 µL de cada una de las reacciones de PCR con regulador de carga 10X (Ficoll 400, 20g; Na₂EDTA 0.5M, 20 mL; SDS, 1g; Azul de bromofenol, 0.25g, Xilencianol 0.25g; en un volumen final de 100 mL) y los geles se tiñeron en agua con una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5µg/ml. El gel se corrió usando el mismo amortiguador a 1V/cm². Se utilizó el marcador de peso molecular Bench Top DNA ladder (Promega) con un rango de 100 pb a 1500 pb.

Estudios de expresión de gen de α -tubulina durante la transición de conidio a micelio. Después de realizar los controles negativos y positivos de la síntesis de cDNA, se realizó una cinética de expresión utilizando las muestras de 0, 3, 10 y 18h que corresponde a muestras obtenidas durante la transición de conidio a micelio.

RESULTADOS

Selección de los tiempos de incubación

El primer objetivo fue seleccionar los tiempos de incubación de los conidios, esto nos permitió obtener diferentes fases morfológicas durante la transición. Las fases que se buscaron fueron conidio, conidio hinchado, tubo germinativo y micelio.

Los tiempos se determinaron mediante un estudio previo de porcentaje de germinación durante la transición de conidio a micelio en medio RV a pH 5.5 (Tabla 3, Fig. 6); se observó la morfología de los conidios durante un período de 18h y se determinó el porcentaje de conidios y germínulas, se observó que a las 3h inicia la germinación, a las 10 h se alcanzan valores cercanos al 100 % de germinación y a las 18 h todos los conidios generaron hifas.

Germinación de conidios de <i>Sporothrix schenckii</i> EH-217		
tiempo de incubación (hrs)	% de conidios	% de germínulas
0	100	0
3	97	3
6	84	16
8	78	22
9	24	76
10	5	95
12	2	98
18	0	100

Tabla 3. Porcentaje de germinación de conidios de *Sporothrix schenckii* durante la transición de conidio micelio en medio RV, pH 5.5.

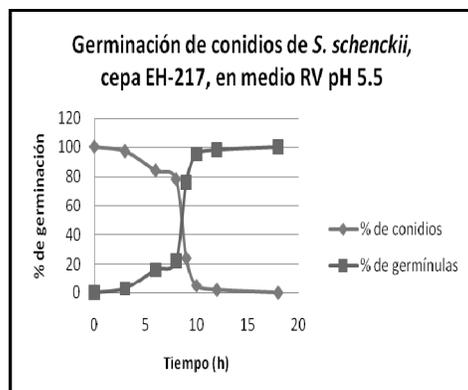


Fig. 6. Porcentajes de germinación de conidios. La cepa EH-217 de *S. schenckii* se incubó en medio RV pH 5.5, a 28° C durante 18h.

Análisis morfológico de las fases de transición dimórfica de conidio a micelio.

El seguimiento de la transición morfológica se analizó mediante microscopía óptica de las 0 a las 18 h. La morfología de cada una de estas etapas se muestra en la Fig. 7.

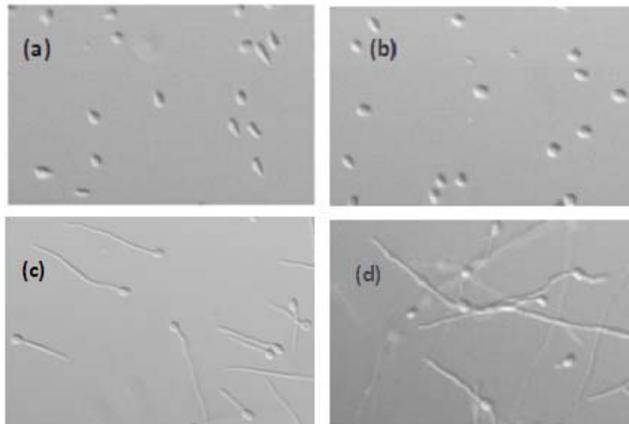


Fig. 7. Características morfológicas de transición de conidio a micelio en diferentes tiempos de germinación. (a) Conidios piriformes 0h, (b) conidio hinchado 3h, (c) germínulas 10h, (d) micelio 18h (400X).

El análisis por microscopía óptica detectó que a las 0h, los conidios tienen forma piriformes (Fig.7a); a las 3 h los conidio se redondean (conidio hinchado) (Fig. 7b), en esta fase se ha descrito en otros hongos que inicia el proceso de síntesis de ARN y proteínas, pero no de ADN. Posteriormente, a las 10h, se observa la prolongación de la gemación para generar tubos germinativos cortos (Fig.7c) y finalmente a las 18h, las germínulas se transforman a hifas cortas con algunas ramificaciones (micelio corto) (Fig. 7d).

Obtención de iniciadores específicos de α -tubulina de *S. schenckii*

La obtención de iniciadores específicos de α -tubulina se realizó a partir de la secuencia de un fragmento amplificado con DNA de *S. schenckii* obtenida con iniciadores diseñados por la comparación de secuencias de *Neurospora crassa* y *Aspergillus*. El tamaño del fragmento de *S. schenckii* a partir del cual se diseñaron los iniciadores fue de 758pb (Fig. 8).

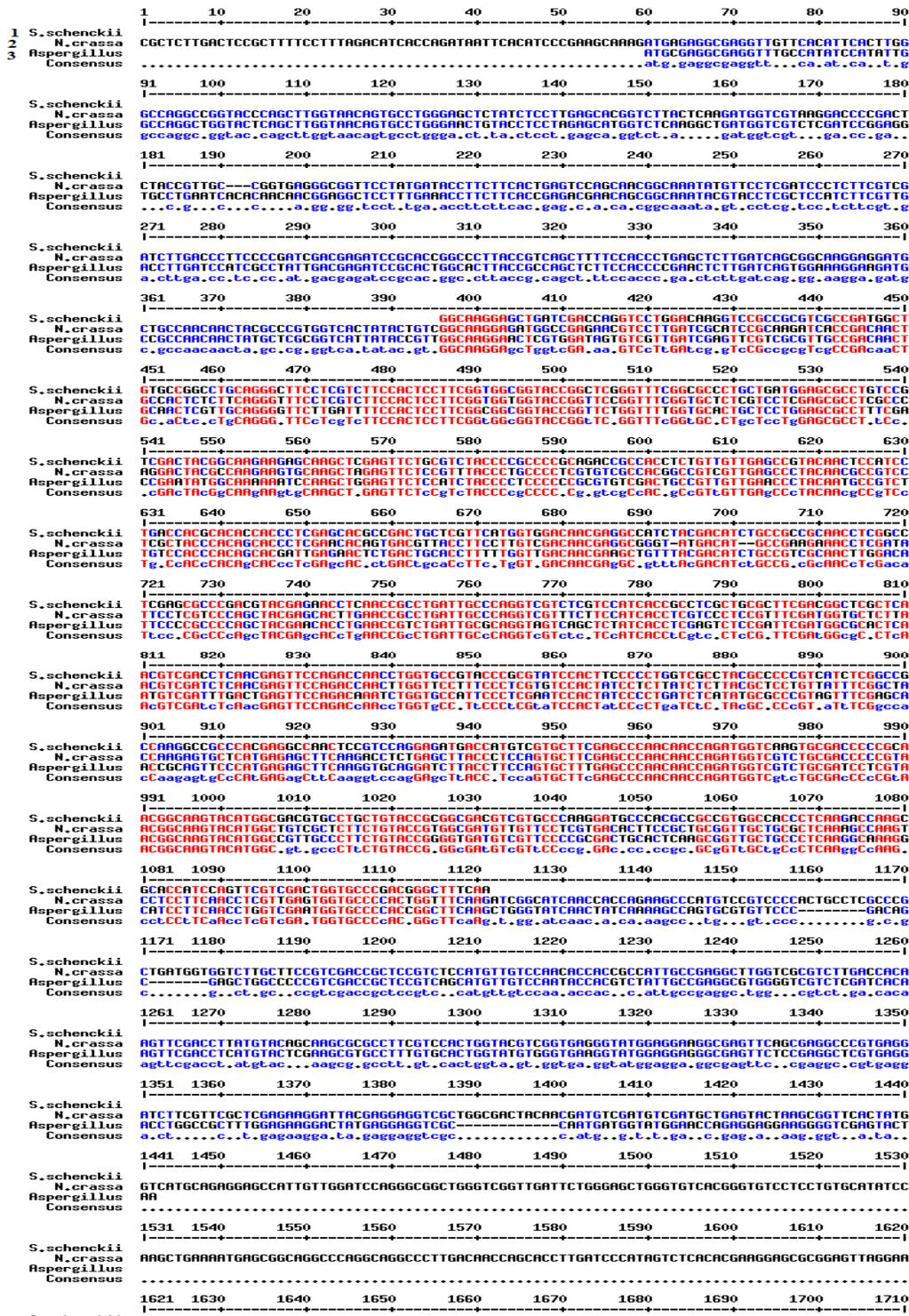
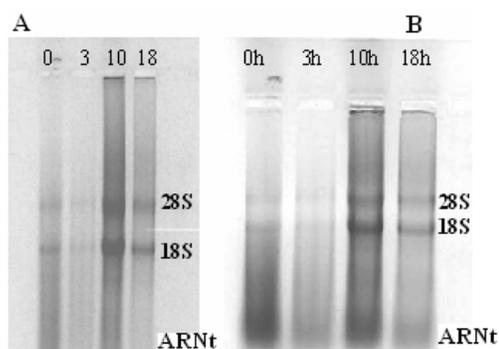


Fig 8. Comparación del fragmento de 758 pb obtenido con ADN de *S. schenckii* (1) con las secuencias de α -tubulina de *Neurospora crassa* (2) y *Aspergillus* (3). Las letras en rojo indican las regiones compartidas con estos hongos; las letras en azul indican la secuencia que se utilizó para el diseño de los cebadores para *S. schenckii*

Calidad e integridad del ARN

Para la extracción de ARN total de conidios incubados a las 0, 3, 10 y 18 h se utilizó aproximadamente 100 mg biomasa liofilizada obtenida de acuerdo al método descrito, se hicieron dos extracciones para obtener ARN con mayor grado de pureza; para cada tiempo de incubación se procesaron 800 tubos sembrados con la cepa de *S. schenckii*. La cantidad de ARN obtenida a partir de los conidios liofilizados de los 800 tubos cultivados fue de 190 a 210 μg con una relación de absorbencia 260/280 nm de 1.9 a 2.0 (30). La calidad e integridad del RNA total se determinó por electroforesis en geles desnaturalizantes (Fig. 9); en este gel se cargaron muestras de 1 μg de ARN total y se sometieron a electroforesis. Las muestras de RNA obtenidas a 0, 10 y 18h demostraron la presencia de dos bandas de RNA ribosomales, 28 y 18 S, y una tercera que corresponde a la banda de RNA de transferencia, sin embargo, la muestra de 3 horas muestra un barrido en la parte inferior y poca nitidez de las tres bandas mencionadas, lo que sugirió la degradación de la muestra demostrada más adelante por la amplificación negativa con los cebadores para GPDH. Esta imagen también muestra que el ARN permanece integro, aún después de la segunda extracción.



Síntesis y amplificación de primera hebra de ADNc

En la síntesis de ADNc se usó como templado 5 μg de ARN por reacción de transcripción reversa (RT). Se determinó la ausencia o contaminación de ADN por medio de un control negativo, reacción en la cual se agregaron todos los componentes de reacción excepto la transcriptasa reversa, en esta reacción se espera una amplificación negativa con los cebadores para GPDH; en caso

contrario se procedió a eliminar los residuos de ADN por medio de una segunda extracción.

Después de determinar la ausencia de contaminación con ADN; los productos obtenidos durante la síntesis de primera hebra de ADNc se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% (Fig. 10)

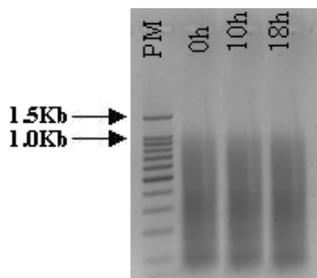


Fig. 10. Patrón electroforético de primera cadena de ADNc. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular Bench Top Ladder (Promega). Los tres carriles siguientes corresponden a las muestras de 0, 10 y 18hrs.

La imagen que se observó corresponde a un barrido que es una mezcla de los ADNc sintetizados que se tiñen con bromuro de etidio y la diversidad en el tamaño está relacionada a la longitud del ADNc obtenido durante la reacción de transcripción reversa. Este experimento sólo nos indica una posible síntesis de ADNc, para hacer la confirmación se llevó a cabo la amplificación positiva con cebadores del gen de GPDH, iniciadores que se ocuparon para normalizar el ARN y para control de síntesis de ADNc (Fig. 11). En los primeros carriles (1, 2 y 3) la amplificación generó una banda con un peso de 700 pb que corresponde a la amplificación del ADNc derivado del mensajero de GPDH presente en la muestra de ARN total. En los tres últimos no se distinguen bandas, lo cual sugiere que no hay contaminación con ADN genómico.

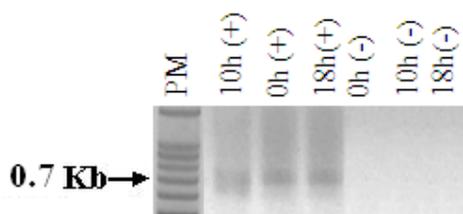


Fig. 11. Controles para ARN total con cebadores de GPDH. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular BenchTop Ladder (Promega). Los tres siguientes carriles corresponden al control positivo con cebadores de GPDH y los últimos al control negativo sin Transcriptasa reversa, para descartar contaminación con ADN genómico.

Estudios de expresión del gen de α -tubulina durante la transición de conidio a micelio

Después de diseñar los iniciadores específicos y corroborar la síntesis adecuada de ADNc, se determinaron las condiciones óptimas de la amplificación con los iniciadores específicos de α -tubulina. Todas las muestras fueron valoradas usando la amplificación con el gen de referencia GPDH, este gen se uso también como control interno para normalizar la cantidad de ARN utilizada. Las condiciones óptimas de amplificación con los cebadores de GPDH y α -tubulina fueron: $MgCl_2$ 25 mM, 55° C. Inicialmente se probó una amplificación de 30 ciclos, la cual generó una sola banda de 693 pb con todas las muestras. Sin embargo, al incrementar el número de ciclos a 35, se distinguen dos fragmentos en la muestra de 18 h, uno de ellos con un peso de aproximadamente 800 pb. Los resultados de ésta amplificación con los cebadores específicos y el control interno, se muestran en la Fig. 12.

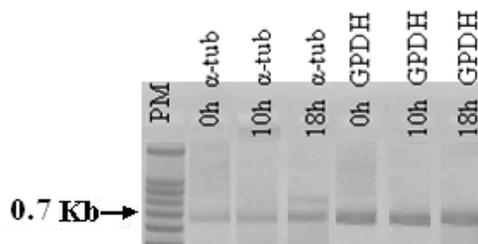


Fig. 12. RT-PCR para determinar las condiciones óptimas de amplificación. La amplificación se llevo a cabo con los iniciadores específicos de *S.scheckii*, 396(Ss) sentido y 1071(Ss) anti-sentido y con los cebadores de control interno de GPDH. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2%, el marcador de peso molecular (PM) utilizado, Bench Top Ladder (Promega) se localiza en el primer carril.

La amplificación (35 ciclos) del ADNc obtenido a las 0, 10 y 18 h con los iniciadores específicos genero un transcrito de 693 pb que se incrementa a las 10 y 18 h; pero además se observó la amplificación de un fragmento con un peso aproximado de 800 pb a las 18 h. (Fig. 13).

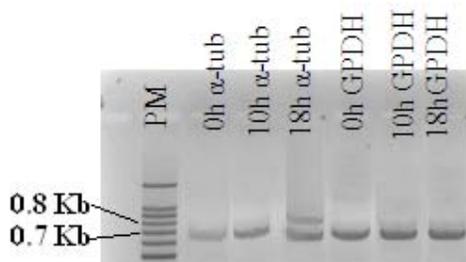


Fig. 13. Cinética de expresión de α -tubulina durante la transición de conidio a micelio de *S. schenckii* (0,10 y 18 h). PM, Bench Top Ladder

Los resultados obtenidos con los iniciadores del gen de GPDH demuestran la expresión constitutiva del transcrito de GPDH y variaciones en la expresión del ARNm con α -tubulina. El mensajero se expresa más abundantemente en micelio (18h) que en conidio (0h) y tubo germinativo (10 h). Además se observó la amplificación de un transcrito de mayor tamaño a las 18 h.

DISCUSIÓN

Los hongos sufren cambios morfológicos durante su desarrollo que requiere re-arreglos del citoesqueleto, seguido del transporte de componentes intracelulares dirigidos a regiones de crecimiento. El dimorfismo en *S. schenckii* está relacionado a cambios de morfología con crecimiento polarizado a grandes distancias, este tipo de desarrollo se ha asociado en otros hongos dimórficos a componentes de los microtúbulos, principalmente a tubulina (12). Además se ha descrito que la tubulina es esencial en la migración nuclear y durante el crecimiento hifal (28).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de detectar a través de la técnica de RT-PCR, si hay una expresión diferencial del gen de α -tubulina en *S. schenckii*, durante la transición de una morfología con crecimiento predominante isotrópico (conidios) a morfologías con desarrollo polarizado o apical (tubos germinativos e hifas).

Para determinar la expresión primero se seleccionaron tiempos de incubación que permitieran observar cambios importantes en la estructura de la célula durante la transición, estos tiempos se determinaron con base en estudios de germinación de conidios; y se monitorearon por microscopía óptica, se observaron cuatro fases: a) conidio piriforme, en esta fase la célula está aparentemente inactiva, es decir, no experimenta crecimiento, b) conidio hinchado, aquí la célula rompe la inactividad y experimenta un crecimiento isotrópico, es decir, se expande en todas direcciones, por lo que se observa redonda y da la apariencia de estar hinchada, c) tubo germinativo corto, en esta etapa comienza el proceso conocido como establecimiento y mantenimiento de la polaridad para permitir la aparición del tubo corto y d) micelio, etapa en la que continúa el crecimiento polarizado para alargar la hifa y dar lugar a la aparición de ramificaciones.

Una vez seleccionados los tiempos de incubación, se obtuvo una secuencia específica de un fragmento del gen de α -tubulina de *S. schenckii*, obtenida con iniciadores diseñados por la comparación de secuencias de *N. crassa*, *A. fumigatus* y *A. nidulans*; se llevó a cabo este procedimiento por que aún no se ha reportado la secuencia de este gen.

Se utilizaron diferentes iniciadores para obtener un fragmento de 758pb, y a partir de éste se diseñaron los cebadores específicos con los cuales se llevo a cabo el estudio de expresión, por medio de una reacción con transcriptasa reversa.

Los resultados de éste trabajo sobre los experimentos de expresión revelaron datos interesantes. Al llevar a cabo la amplificación con cebadores específicos de α -tubulina de *S. schenckii* se observó un aumento en el contenido de los mensajeros específicos de α -tubulina conforme se transformó el conidio a hifa madura; el incremento fue mayor a tiempos donde se estableció la polarización y alargamiento de la célula fúngica, 10 y 18 h, éste comportamiento es similar al que describen Harris y cols. (25) en el estudio de expresión de α - y β -tubulina de *H. capsulatum var capsulatum*, en el cual los niveles de mensajero aumentaron cuando la levadura se transformó en la forma micelial, y disminuyeron durante la transición inversa. Los autores postulan que el aumento en los transcritos durante la transición de levadura a micelio, indica que la expresión del gen de tubulina está desarrolladamente regulada, y proponen que la expresión del gen de α - y β -tubulina es regulada por el nivel de acumulación de ARNm.

En éste trabajo, el aumento en los niveles de mensajero específico de α -tubulina en micelio, pueden deberse a un incremento en la cantidad de tubulina micelial por un crecimiento excesivo del micelio; aunque también pueden reflejar un incremento en los requerimientos de la proteína en etapas de crecimiento polar, pues el aumento de los mensajeros ocurrió en tiempos significativos de diferenciación, por ejemplo a las 10h cuando emerge el tubo germinativo y a las 18h cuando se alarga y ramifica la hifa; etapas en las que se requiere el transporte a largas distancias de núcleos, vesículas, maquinaria y de los materiales para formar la nueva membrana plasmática y pared celular. Este resultado sugiere: a) que los cambios en la transcripción de tubulina están asociados al proceso de diferenciación morfológica de *S. schenckii* y b) que la α tubulina es esencial en todas las etapas de desarrollo analizadas, pero principalmente en fases de crecimiento apical y de extensión a largas distancias.

Otro dato importante en este trabajo, es la aparición de dos transcritos a las 18 h, tiempo de incubación donde predomina el crecimiento apical, y no uno solo

como ocurre a las 0 y 10 h. El transcrito no esperado tiene mayor tamaño (aproximadamente 800 pb), por lo que su aparición sugiere una regulación transcripcional o bien podría tratarse de una forma amplificada de un gen relacionado, esta hipótesis es válida debido a que en la actualidad no se sabe cuántos genes codifican la α -tubulina en *S. schenckii*. Otra hipótesis es que hay una mezcla de poblaciones celulares, ya que durante la germinación no se logro obtener un cultivo sincrónico, pues no podemos asegurar que todos los conidios estaban en fase inactiva, es posible que al inicio de la germinación la mayor parte de los conidios estuvieran inactivos, pero otra parte de ellos se encontraran en alguna otra fase de crecimiento (isotrópica o apical).

Silva y cols. (24) también estudiaron la expresión de α -tubulina durante la transición dimórfica de *P.brasiliensis*, pero a nivel proteína, y encontraron resultados similares en el contenido de la proteína: un aumento en la transición de levadura a micelio, y una disminución en el proceso de transición inverso; además de que detectaron la presencia de una isoforma en levadura y dos en micelio, y postulan que la presencia de esta segunda isoforma fue originada por una modificación postraducciona de la tubulina.

La presencia del transcrito de 800pb sugiere un papel específico en la morfogénesis de *S. schenckii*; en cambio, la expresión del transcrito presente en todas las fases morfológicas del hongo (693 pb) sugiere una expresión constitutiva. Es importante secuenciar y analizar los fragmentos obtenidos durante las amplificaciones para definir el papel de la expresión y regulación de los transcritos en la morfogénesis de *S. schenckii*.

CONCLUSIONES

- La expresión del gen de α -tubulina es esencial en todas las etapas de morfogénesis de *S. schenckii*.
- El incremento en los transcritos de ARN y la presencia de un fragmento de mayor tamaño al esperado en etapas de crecimiento polarizado, sugieren una regulación transcripcional o una forma amplificada de un gen relacionado.
- La expresión del transcrito presente en todas las fases morfológicas del hongo sugieren una expresión constitutiva, y la del transcrito presente solo en micelio sugiere un papel específico en la morfogénesis de *S. schenckii*.
- La expresión de dos transcritos en micelio sugiere un incremento en los requerimientos de tubulina en esta fase de transición, e indican la expresión diferencial del gen de tubulina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rippon, J.W. 1974. **Medical Micology**. W.B. Saunders Company, Filadelfia.
2. Ruíz, E.J., Arenas, R., Vega, M.M.E. 1996. **Esporotricosis: estudio histopatológico de 22 casos**. Dermatología Rev Mex. 40:106-112
3. Mendez, T.L.J.; López, M.R. y Hernández, H.F. 2004. Actualidades en Micología Médica. 2ª edición. Facultad de Medicina, UNAM. México D.F. pp.183-193
4. Lallave, P. 1979. Esporotricosis. Simposio Syntex: Desarrollo y estado actual de la Micología en México. Ediciones del Instituto Syntex, México D.F. pp. 115-138.
5. Castro, R.M., Flores de Sobogal, M., Cuce, L.c. & Salebien, A. 1980 **Disseminate sporotrichosis. Report of a clinical case with mucocutaneous, osteo-articular and ocular lesions**. Mycosen, 24: 137-146
6. Lynch, P.J., Voorhess, J. J. & Randall, E. R. 1971. **Systemic sporotrichosis**. Ann. Inter. Med. **73**: 23-30.
7. Mohr, J.A., Griffiths, W. & Long. H. (1979). **Pulmonary sporotrichosis in Oklahoma and susceptibilities in vitro**. Am. Rev. resp. dis., 119: 961-964.
8. Lavalle, P. 1987. **Aspectos clínicos, inmunológicos y epidemiológicos de la esporotricosis**. Memorias IV Cong. Mex. Dermatol. Tamps. México.
9. García-Vargas, A., Mayorga, J., Soto-Ortiz, A. Barba-Gómez, JF. 2008. **Esporotricosis en niños. Estudio de 133 casos en el Instituto Dermatológico de Jalisco “Dr. José Barba Rubio”**. Med Cutan Iber Lat Am. **36**:18-22
10. Mariat, F. 1971. **Adaptation of Ceratocystis stenoceras (Robak) C. Moreau a la vie parasitaire chez l’animal. Etude de la souche sauvage et desmutants pathogènes**. Comparaison avec *Sporothrix schenkii* Hektoen et Perkins Rev. mycol. **36**: 3-24
11. Rodríguez del Valle N, Rosario N, Torres-Blasini. (1983). **Effects of pH, temperatura, aeration and carbón source on the development of the**

- mycelial or yeast forms of *Sporothrix schenckii* from conidia.** Mycopathology. **82**: 83-88.
12. Steinberg, Gero Wedlich-Söldner, Roland Brill, Marianne y Schulz, Irene. 2000. **Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity.** Journal of Cell Science. **114**: 609-622.
13. Momany M, Taylor I. 2000. **Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation.** Microbiol, **146**:3279-3284
14. Heath, I.B. 1995. **The cytoskeleton. In the Growing Fungus.** ed. N.A.R. Gow and G.M. Gadd , London: Chapman & Hall. pp. 99-134
15. Nabi, I. R., **The polarization of the motile cell.** *J. Cell Biol.* 1999, **112**: 1803-1811
16. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. 2002. **Molecular Biology of the Cell.** [Garland Science](#). 4a ed. New York y Londres.
17. Little, M., Seehaus, T. 1988. **Comparative analysis of tubulin sequences.** Comp Biochem Physiol. **90**: 655-670
18. [McKean PG](#), [Vaughan S](#), [Gull K](#) (2001). **The extended tubulin superfamily.** [J Cell Sci.](#) **114**:2723-33.
19. Heath, I.B. (1981). **Nucleus associated organelles of fungi.** *Int Rev Cytol* **69**:191-221
20. Monatt, Jean., Ortega-Pérez, Rubén., Turian, Gilbert. 1997. **Molecular cloning and expression studies of two divergent α -tubulin genes in *Neurospora crassa*.** Microbiol. Lettes. **150**: 33-41
21. Burns, R.G. 1991. **Alpha, beta, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints.** Cell Motil. Cytoskeleton. **20**: 181-189
22. Oakley, B. R. 2000. **An abundance of tubulins.** *Trends Cell Biol.* **10**: 537-542.
23. Ludueña, R. F. 1998. **Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications.** *Int. Rev. Cytol.* **178**: 207-275.
24. Silva, W.P., Soares, R.B.A., Jesuino, R.S.A., Izacc, S.M.S., Felipe, M.S.S. & Soares, C.M.A. 2001. **Expression of alpha tubulin during the**

- dimorphic transition of *Pracoccidioides brasiliensis***. Med. Micol.; **39**: 457-462.
25. Harris, S.G., Keath, J.E. & Medoff, J. 1989. **Expression of α - γ β -Tubulin Genes during Dimorphic-Phase Transitions of *Histoplasma capsulatum***. Molec. Cell. Boil.; **9**: 2042-2049.
26. Hoch HC, Staples RC. **The microtubule cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germlings: its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytoskeleton**. Protoplasma 1985; **124**:112-122
27. Akashi T, Kanbe T, Tanaka K. **The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans***. Microbiology 1994; **140**:271-280
28. Fuchs, U. Manns, I. Steinberg, G. (2005). **Microtubules Are Dispensable for the Initial Pathogenic Development but Required for Long-Distance Hyphal Growth in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis***. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 2746-2758.
29. Cleveland, D.W. 1998. **Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eukaryotic regulatory mechanism**. Elsv. Publics Cambridge Reviews, pp. 339-343.
30. Ausubel, Frederick, Brent, Robert., KINGSTON, Robert E., Moore, David E., Seidman, J.G., Smith, John A., y Struhl, Kevin. **Short Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons. 2a ed. Estados Unidos de América; (1992).
31. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
32. Westermann, Stefan., Weber, Klaus. **Post-translational modifications regulate microtubule function**. Nature. (2003), **4**: 938-947
33. Barahona, I., Soares, H., Cyrne, L., Penque, D., Denoulet, P. y Rodrigues-Pousada, C. **Sequence of one alpha- and two β -tubulin genes of *Tetrahymena pyriformis* Structural and functional relationships with other eukaryotic tubulin genes**. J. Moll. Biol. (2005) **202**: 365-38

34. Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P. and Gull, K.
New tubulins in protozoal parasites. *Curr. Biol.* (2000). **10**: R258-
R259.
35. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
37. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein&itool=toolbar>
39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>