



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE OPSONINAS DEL SUERO HUMANO, QUE
PARTICIPAN EN LA FAGOCITOSIS DE LOS CONIDIOS DEL
HONGO *Sporothrix schenkii* A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE
MANOSA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SÁNCHEZ MORALES BLANCA JAZMÍN



CD. MÉXICO

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: QFB. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

VOCAL: QFB. MISAEEL GONZÁLEZ IBARRA

SECRETARIA: DRA. HAYDEE TORRES GUERRERO

1er. SUPLENTE: M. en C. GUSTAVO OLVERA GARCÍA

2° SUPLENTE: QFB. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA, UNIDAD DE MEDICINA
EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. HAYDEE TORRES GUERRERO

FIRMA _____

SUSTENTANTE:

SÁNCHEZ MORALES BLANCA JAZMÍN

FIRMA _____

Índice

Introducción	1
Marco teórico	2-20
Esporotricosis.....	2
<i>Sporothrix schenckii</i>	2-4
Pared celular	5
Inmunidad innata.....	5,6
Fagocitosis	7-9
Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).....	10
Receptor de manosa	10,11
Dectin 1	12
Receptores tipo Toll	12-14
TLR-2.....	14
Inmunidad en infecciones fúngicas.....	14,15
Respuesta inmune contra <i>Sporothrix schenckii</i>	16,17
Purificación de proteínas	17,18
Solubilidad.....	19
Cromatografía	19
Cromatografía de afinidad	19,20
Cromatografía de intercambio iónico	20
Objetivos	21
Generales.....	21
Particulares	21
Hipótesis	21
Metodología	22-29
Obtención de conidios de <i>S. schenckii</i>	22
Purificación de proteínas	22-24
Cultivo celular y ensayos de fagocitosis	25,26
Análisis de proteínas	27
Identificación de MR (WB)	27-29
Secuenciación	29
Resultados	30-46
Western blot.....	30
Fraccionamiento de suero humano, para la identificación de la proteína encargada de opsonizar al conidio de <i>S. schenckii</i>	31

Precipitación con sulfato de amonio.....	32
Fraccionamiento en columna Cibacrom Blue.....	33-35
Fraccionamiento en columna de intercambio iónico.....	36-39
Fraccionamiento con columna de afinidad ConA.....	39-42
Fraccionamiento utilizando los conidios de <i>S. schenkii</i> como método de afinidad (PUC).	42-44
Identificación mediante espectroscopia de masas (MS/MS) de las PUC.	44
Efecto de diferentes carbohidratos en la infección de Mφ con conidios de <i>S. schenkii</i> opsonizados con PUC.	45,46
Discusión	47-50
Conclusiones	51
Referencias	52-58
Anexos	59-67
1. Tinciones.....	59-61
2. Electroforesis.....	62
3. Soluciones para columnas.....	63,64
4. Soluciones y medios.....	65-67

Índice de figuras

Figura 1 Clasificación de la esporotricosis	3
Figura 2 Dimorfismo <i>Sporothrix schenckii</i>	4
Figura 3 Respuesta inmune innata	7
Figura 4 Proceso de fagocitosis	10
Figura 5 Receptor de manosa.....	11
Figura 6 Estructura del receptor Dectin-1.....	12
Figura 7 La familia de TLRs y vías proinflamatorias de transducción	13
Figura 8 Diferentes PAMPs reconocidos por receptores de membrana	16
Figura 9 Cromatografía de afinidad.....	20
Figura 10 Cromatografía de intercambio iónico.....	20
Figura 11 Western Blot	30
Figura 12 Ensayo de fagocitosis	31
Figura 13 A)Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% de suero ppt.	33
Figura 14 Fracciones obtenidas de la columna de afinidad Cibacrom Blue.....	34
Figura 15 A) Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% Cibacrom Blue.....	35
Figura 16 Gráfico del ensayo de fagocitosis retando los MΦ con las fracciones obtenidas de la columna Cibacrom Blue.	36
Figura 17 Fracciones obtenidas de la columna de Intercambio iónico	37
Figura 18 Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% de fracciones obtenidas de la columna de intercambio ionico.	38
Figura 19 Fagocitosis de conidios opsonizados con las diferentes fracciones de intercambio iónico,.....	39
Figura 20 A) Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) SDS-PAGE 15% de fracciones obtenidas de la columna de intercambio ionico.....	41
Figura 21 Gráfico de ensayo de fagocitosis retando los MΦ con las fracciones obtenidas con las proteínas eluidas con 0.3 y 0.5 M más ConA.....	42
Figura 22 Perfil SDS-PAGE 7.5% de la PUC.	43
Figura 23 Gráfico de ensayo de fagocitosis retando los MΦ con 20μg de PUC.	44
Figura 24 Perfil SDS-PAGE 7.5% de de la PUC..	45
Figura 25 Gráfico de ensayo de fagocitosis bloqueando MR con diferentes carbohidratos	46

Índice de tablas

Tabla 1 Técnicas empleadas para la purificación de proteínas según sus características fisicoquímicas.	18
Tabla 2 Curva patrón para cuantificación de proteínas.	28
Tabla 3 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas obtenidas del fraccionamiento con la columna Cibacrom Blue.	35
Tabla 4 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas obtenidas del fraccionamiento con la columna de intercambio iónico.	39
Tabla 5 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas eluidas con 0.3 y 0.5 M con la columna intercambio iónico y posteriormente tratadas con la columna de ConA (cromatografía en batch).....	41
Tabla 6 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas obtenidas del fraccionamiento utilizando los conidios de <i>Sporothrix schenkii</i> como columna de afinidad.	43
Tabla 7 Ensayo de competencia usando diferentes azúcares para el bloqueo del MR....	46
Tabla 8 Gel superior de poliacrilamida con SDS.....	62

Abreviaturas

ConA Concanavalina A

°C grados Celsius

mM mili molar

h horas

kDa kilo Daltons

MΦ macrófagos

m/v % masa volumen

μg micro gramos

mg miligramos

min minutos

M molar

MR receptor de manosa

nm nanómetros

No número

PBMC células mononucleares de sangre periférica

PUC proteína unida a conidios

PBS buffer fosfato salino

rpm revoluciones por minuto

PM peso molecular

PI punto isoelectrico

RPMI medio Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato

SHP suero humano preinmune

SFB suero fetal bovino

TLR receptores tipo Toll

Tris tris (hidroximetil)aminometano

Introducción

La aparición de infecciones fúngicas como las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeprimidos ha impulsado a su estudio y tratar de comprender cómo el hospedero reconoce a los patógenos fúngicos.

Los hongos al ser organismos eucariotes comparten ciertas características con los mamíferos, una de las diferencias más significativas, es la presencia de pared celular, su estudio ha sido una tarea difícil debido a que los hongos deben remodelarla dependiendo de sus necesidades (Levitz, 2010).

Los componentes de la pared celular fúngica son reconocidos por los receptores de superficie de las células fagocíticas pertenecientes a la inmunidad innata, que son la primer línea de defensa al ataque de cualquier organismo extraño (Barreto, *et al.* 2014) (Karkowska-Kuleta, *et al.* 2015). En este trabajo nos centraremos en el papel que juega el receptor de manosa en el reconocimiento del conidio de *Sporothrix schenckii* previamente opsonizado con proteínas plasmáticas, así como la identificación de estas.

Estudios previos del laboratorio han demostrado que para que el conidio de *Sporothrix schenckii* sea fagocitado eficientemente por los MΦ es necesario que este sea opsonizado por proteínas encontradas en el suero humano preinmune (Guzman, *et al.* 2012). Con la finalidad de encontrar cual o cuales eran las proteínas séricas encargadas en la opsonización del conidio de *Sporothrix schenckii* se realizó un fraccionamiento por diferentes métodos cromatográficos del SHP.

Marco Teórico

Esporotricosis

La esporotricosis es una micosis subcutánea causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, es una enfermedad cosmopolita, la cual predomina en África del Sur, Japón y el mayor número de casos se ha descrito en Norteamérica (Tellez, *et al.* 2014). En México es la micosis subcutánea más frecuente, y se ha encontrado principalmente en el sur del Distrito Federal, Puebla, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, Veracruz, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí y Estado de México (Arenas, *et al.* 2011) (Bonifaz, *et al.* 2012).

Se describe como una enfermedad ocupacional, principalmente desarrollada en agricultores, floricultores, etcétera, debido a que el hongo se puede encontrar en el suelo y/o plantas, también se han reportado transmisiones zoonóticas siendo los gatos los principales portadores (Bastos, *et al.* 2011).

La infección generalmente ocurre mediante traumatismos con material contaminado con hifas y/o conidios del hongo, desarrollando lesiones nódulo gomosas limitadas en piel, tejido celular subcutáneo y ganglios linfáticos, afectado preferentemente cara y extremidades, en raras ocasiones puede diseminarse a otros órganos (Sassá, *et al.* 2009) (Tellez, *et al.* 2014). La forma clínica más frecuente es la cutáneo-linfática, inicia aproximadamente a las 3 semanas de inoculación con una lesión nodular o ulcerada en el sitio de infección, posteriormente aparecen lesiones siguiendo una trayectoria hacia el ganglio linfático (Rodrigues, *et al.* 2014).

También, puede presentarse de forma más severa como la forma osteoarticular y meníngea, en la que la carga, la virulencia del inóculo, la inmunosupresión, la desnutrición y/o el alcoholismo del hospedero son factores predisponentes (Fernandes, *et al.* 2008)(Sassá, *et al.* 2009).

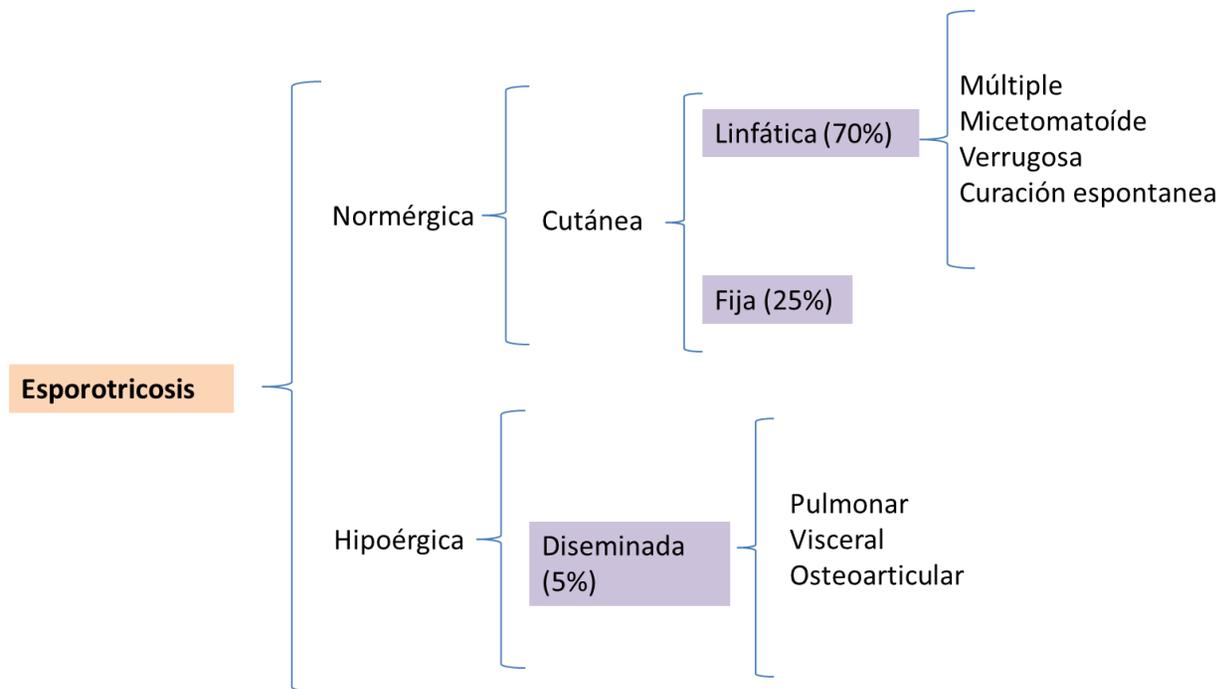


Figura 1 Clasificación de la esporotricosis (esquema adaptado Arenas 2011 y Bonifaz 2012).

Sporothrix schenckii

Sporothrix schenckii, es un organismo eucarionte, inmóvil y heterótrofo, clasificado en la división *Ascomycota*, clase *Pyrenomycetes*, orden *Ophiostomatale* y familia *Ophiostomatacea*. Estudios moleculares recientes han demostrado que *Sporothrix schenckii* constituye un complejo de numerosas especies filogenéticas como *S. schenckii* var. *schenckii*, *S. schenckii* var. *brasiliensis*, *S. schenckii* var. *globosa*, *S. schenckii* var. *mexicana*, *S. schenckii* var. *lurieii* y *S. schenckii* var. *albicans* (Romeo, et al. 2011) (Fernandes, et al. 2013) (Oliveira, et al. 2013) (Anderson, et al. 2015).

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico, es decir que tiene la capacidad de cambiar de forma filamentosa a levaduriforme. Esta última, es la fase parasitaria la cual se obtiene al cultivarlo en medios ricos tales como agar infusión de cerebro y corazón (ABHI) a 35-37 ° C. de 7 a 15 días. Macroscópicamente, se observan colonias cremosas, de color blanco o beige similares a colonias bacterianas; y microscópicamente, se observan cuerpos

asteroides (biopsias) y/o células levaduriformes redondas u ovaladas en forma de puro con un tamaño que va de los 2 a los 6µm de diámetro (Bastos, *et al.* 2011).

Su morfología filamentosa se obtiene al cultivarlo a 28°C en agar dextrosa de Saboraud o Micosel, caracterizado por presentar hifas hialinas, septadas y ramificadas de 1 a 2 µm de ancho, dando la imagen típica de “flor de margarita o durazno”, también presenta conidios unicelulares en forma de lágrima o gota, son hialinos o subhialinos que miden entre 3 y 6 µm, algunas otras especies pueden presentar conidios de mayor tamaño, triangulares, pigmentados y de paredes gruesas. Macroscópicamente, produce colonias filamentosas en medios como agar extracto de malta o agar papa dextrosa a menudo rugosas, de color blanco a cremoso tornándose de marrón a negro después de unos días (Arenas, *et al.* 2011) (Barros, *et al.* 2011) (Bonifaz, *et al.* 2012) (Rappleye, *et al.* 2006) (Fernandes, *et al.* 2008).

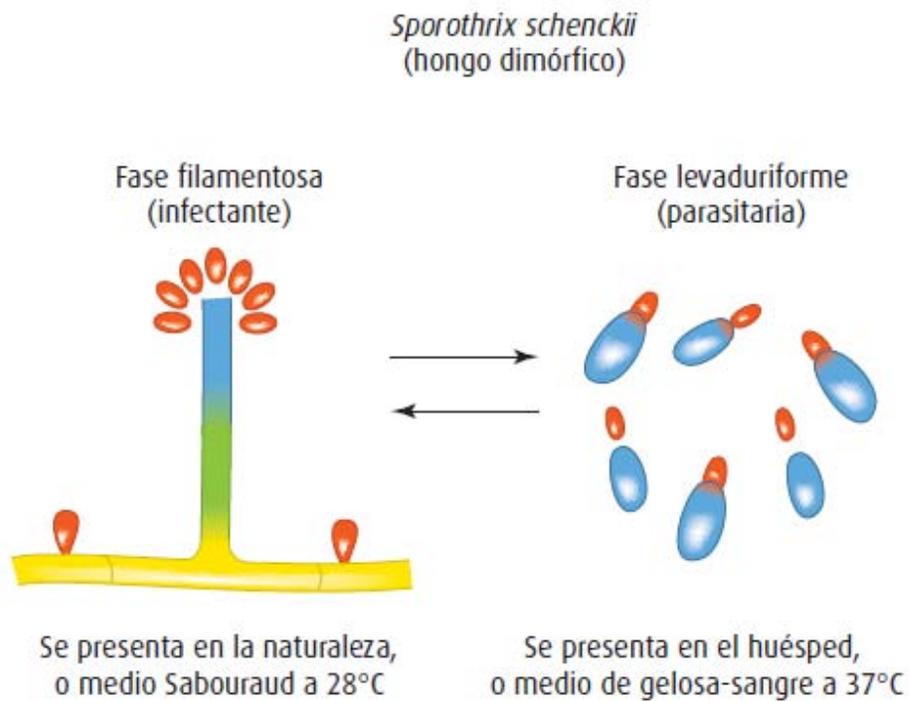


Figura 2 Dimorfismo *Sporothrix schenckii* (Bonifaz, *et al.* 2012).

Pared celular

La pared celular de los hongos está constituida principalmente de quitina y β -glucanos aunque también consta de otros polisacáridos de estructuras complejas. En el caso específico de *Sporothrix schenckii* se aislaron de la pared celular de la forma levaduriforme diversos polisacáridos entre los que se encuentran: D-manosa (50%) y L-ramnosa (33%), pequeñas cantidades de galactosa (1%), y alrededor de 16% péptidos. Al ser la estructura celular más externa de los microorganismos, conlleva importantes determinantes antigénicas estando implicada en la adhesión, colonización, señalización y reconocimiento inmune (Lopes, *et al.* 2006) (Bastos, *et al.* 2011) (Alba, *et al.* 2014) (Barreto, *et al.* 2014) (Karkowska-Kuleta, *et al.* 2015).

Los componentes de la pared celular fúngica son ampliamente estudiados ya que tienen un papel importante en la acción de los agentes antifúngicos y en el reconocimiento del hongo por parte del sistema inmune innato induciendo una respuesta celular y/o humoral. Debido a que la mayoría de sus componentes están ausentes en las células animales los convierte en objeto de estudio para el diagnóstico, así como para la elaboración de nuevas terapias (Lopes, *et al.* 2006).

Debido a la localización de manoproteínas en la parte más externa de la pared celular fúngica, la detección de mananos es uno de los primeros pasos en el reconocimiento del sistema inmune mediado por células fagocíticas. Sin embargo, otros componentes tales como glucano y quitina (a un nivel interior) también influyen en el reconocimiento de las células fúngicas por los leucocitos (Alba, *et al.* 2014) (Barreto, *et al.* 2014).

Inmunidad innata

El reconocimiento de los microorganismos por el sistema inmune innato es la primera línea de defensa del hospedero contra patógenos. Por lo tanto el contacto de la célula hospedero y el patógeno activan rápidamente la respuesta inmunológica. En los vertebrados, esta respuesta se inicia en cuestión de minutos, y se encarga de defender al

organismo de agentes nocivos como algunas sustancias o partículas inertes y contra patógenos como bacterias, hongos, parásitos y virus (Murphy, *et al.* 2009)(Brown, 2006).

Una vez que el agente extraño ha ingresado, se inicia la respuesta innata para delimitar y reducir el daño.

El sistema inmune innato está constituido de diversas barreras físicas y químicas, como es el caso de la piel, el pH y algunas enzimas como la lisozima. Otra parte importante que lo conforma, son las células fagocíticas como los macrófagos (MΦ), células dendríticas (CD) y los polimorfos nucleares (PMN) como los neutrófilos. Los MΦ localizados en los tejidos submucosos son las primeras células que encuentran a casi todos los patógenos, y son reforzados por el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de infección (Murphy, *et al.* 2009).

Las células fagocíticas reconocen a los patógenos por medio de receptores de superficie celular que pueden reconocer entre las moléculas de la superficie desplegadas por los patógenos y las del hospedero. Por ejemplo, en las bacterias se reconoce el lipopolisacarido y en los hongos el β -glucano. Estas estructuras repetidas se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores que los reconocen, son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Algunos de estos receptores, como el de manosa, estimulan directamente la fagocitosis, mientras que otros se producen como moléculas secretadas que promueven la fagocitosis mediante la opsonización o mediante la activación del complemento (Minh, *et al.* 2002) (Negrini, *et al.* 2013) (Zimmer, *et al.* 2015).

Varios de estos receptores de superficie reconocen directamente la superficie patógenos, siendo de suma importancia para determinar tiempo de internalización, la vía de señalización a seguir, los tipos de citosinas a secretar, el estallido respiratorio, etcétera.

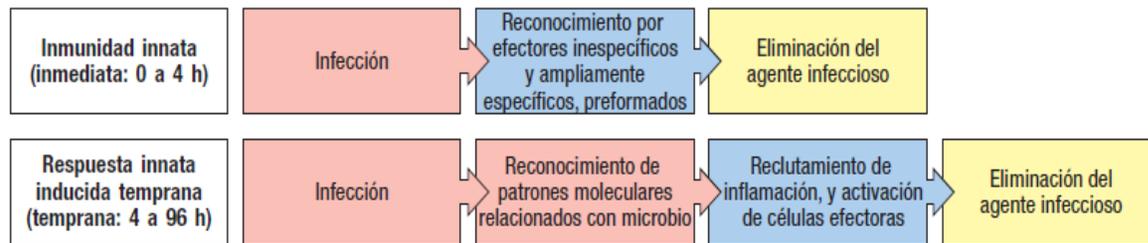


Figura 3 Respuesta inmune innata (Murphy, et al. 2009). Fases dependientes del reconocimiento de patógenos.

Fagocitosis.

La fagocitosis, es un mecanismo clave en la inmunidad innata, dicho termino fue acuñado en 1882 por primera vez por Elie Metchnikoff, al hundir espinas de rosal en larvas *bipinnaria* de estrellas de mar, donde observó la acumulación de diversas células móviles en torno a estos cuerpos extraños, observó células que migraban e internalizaban partículas explicando el mecanismo de la teoría de inmunidad celular, mencionando que el organismo posee células especializadas encargadas de la eliminación de patógenos como mecanismo de defensa (May, et al. 2011).

Hoy en día la fagocitosis está definida como el proceso dependiente de actina e independiente de clatrina, que se encarga del reconocimiento, la ingestión y eliminación de patógenos con un tamaño mayor de 0,5 μm en vacuolas unidas a la membrana conocidas como fagosomas. (Spencer, et al. 2014) (May, et al. 2011) (Underhill, et al. 2012) (Freeman, et al. 2014).

El contacto inicial del patógeno con la superficie de una célula fagocítica desencadena dos eventos: el primero es el muestreo químico del objetivo a través de la participación del receptor de superficie (reconocimiento) y el segundo es el proceso de fagocitosis o internalización. El primer proceso se puede dividir a su vez en dos etapas: la primera es la interacción del patógeno con la membrana de la célula fagocítica, si este es reconocido eficazmente, se inicia la segunda fase, que es la formación del pseudopodo mediante la polimerización de la actina, para dar lugar a la formación del fagosoma. Tal señalización

puede ser suficiente para inducir la producción de algunas citosinas proinflamatorias. Formado el fagosoma, comienza su maduración al fusionarse con componentes endosomales y lisosomales dando lugar a una nueva estructura llamada fagolisosoma (Ver Figura 4) (Underhill, *et al.* 2012).

El fagolisosoma comienza a liberar la lisozima e hidrolasas ácidas, que participan en la degradación del patógeno. Además, los fagocitos ensamblan el complejo NADPH oxidasa, que cataliza la producción de una serie de compuestos derivados del oxígeno altamente tóxicos que incluyen el superóxido, el peróxido de hidrógeno, los radicales de hidroxilo, y el óxido nítrico. La producción de estos compuestos tóxicos se acompaña de un aumento transitorio en el consumo de oxígeno por las células, llamado estallido respiratorio. Mientras que los macrófagos generalmente sobreviven a este evento y continuarán en circulación para el reconocimiento de otros patógenos, mientras que los neutrófilos suelen morir después de este proceso (Bruce, *et al.* 2002).

La célula fagocítica reúne información sobre las propiedades físicas del patógeno para determinar el procedimiento a seguir. Se cree que el reconocimiento y la internalización están estrechamente relacionados entre sí, proporcionando una mayor afinidad entre el PAMP y el receptor provocando una señalización más eficaz. Para que la célula pueda iniciar con el proceso de fagocitosis, necesita considerar diversos factores, entre los que destacan el tamaño de la partícula, la morfología, la composición química y si esta está viva o muerta (Underhill, *et al.* 2012).

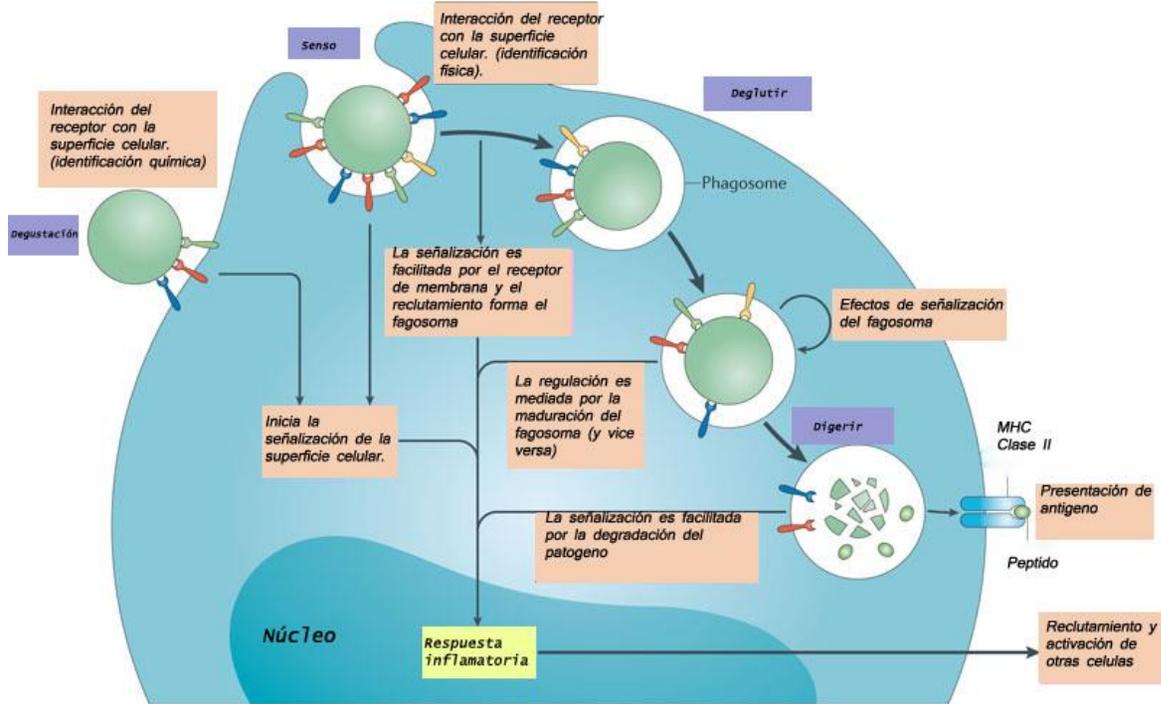
Los macrófagos son las principales células fagocíticas que expresan una amplia gama de receptores de membrana, que median la interacción y reconocimiento entre los componentes propios del organismo así como agentes externos (patógeno). El reconocimiento está mediado por cambios en la superficie, la absorción, señalización y expresión de genes alterados, lo que contribuye a la homeostasis, la defensa del hospedero, los mecanismos efectores innatos y la inducción de la inmunidad adquirida (Tylor, *et al.* 2005).

Entre los principales receptores que intervienen en el proceso de fagocitosis encontramos a los receptores tipo Toll (TLR's), Receptores de lectina tipo C (CLRs); tales como dectin

1, dectin 2, Mincle, DC-SIGN y el receptor de manosa; también cuentan con el receptor del complemento 3 (CR3) y miembros de la familia de receptores scavenger (tales como CD36).

Los TLRs y CLRs activan múltiples vías intracelulares tras la unión a PAMPs. Después de que dichos receptores son activados por la captación de PAMPs, estos median la activación y producción de moléculas pro-inflamatorias para la activación de poblaciones celulares adicionales. Los PRRs transducen la señal recibida desde la superficie hasta el núcleo a través de una vía de señalización que depende del factor de diferenciación mieloide adaptador 88 (MyD88) y sus mediadores en el caso de algunos TLRs. En el caso de dectin 1 y 2 la señalización esta mediada por SYK, mientras que manosa carece de vía de señalización (Figura 8). Debido al gran repertorio de receptores que necesitan para iniciar la respuesta algunos autores reportan que dichos receptores actúan de manera colaborativa, donde el receptor de manosa y dectin 1 actúan como receptores fagocíticos, mientras que los TLRs solo figuran en la señalización y activación de citosinas proinflamatorias (Underhill, *et al.* 2012).

Estudios previos en el laboratorio han mostrado que para favorecer la fagocitosis de conidios y blastoconidios de *S. chenkkii* es necesaria la opsonización con glicoproteínas séricas, donde los MΦ responden a la opsonización a través de diferentes receptores fagocíticos principalmente el receptor de manosa, TLR y Dectin 1 induciendo una respuesta celular diferencial. Estas interacciones dan lugar a la mejora de la internalización, que conduce a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y activación de los mecanismos antimicrobianos (Guzman, *et al.* 2012).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4 Proceso de fagocitosis (Figura tomada y editada de Underhill, *et al.* 2012) El proceso por el cual las células engullen materia sólida se llama fagocitosis. Hay cuatro pasos esenciales en la fagocitosis: (1) la membrana plasmática atrapa la partícula, (2) se forma una vacuola dentro de la célula para contener la partícula, (3) los lisosomas se fusionan con la con el fagosoma, y (4) las enzimas de los lisosomas digieren la partícula.

Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).

Receptor de manosa

Como ya se dijo entre los receptores fagocíticos encontramos al MR, este receptor es una lectina de tipo C, que reconoce e internaliza patógenos a través de moléculas glicosiladas con manosa terminal, fucosa y residuos de N-acetil glucosamina (Janeway, *et al.* 2001) (Gazi, *et al.* 2009) (Guzman, *et al.* 2012). El MR es un receptor transmembranal de 180 kDa constituido por 5 dominios: un dominio rico en cisteína extracelular NH₂-terminal en cargado en reconocer carbohidratos sulfatados de manera independiente de Ca²⁺, un

dominio fibronectina de tipo II, una sucesión de ocho dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD) donde los dominios 4, 5 y 7 reconocen principalmente a manosa y fucosa de una manera dependiente de Ca^{2+} , un único dominio transmembranal, y uno corto (cola citoplasmática carboxilo-terminal) (Azad, *et al.* 2014) (Macedo, *et al.* 2014) (Zhao, *et al.* 2015).

Otra característica importante del MR es su capacidad constitutiva a ser internalizado rápidamente de la membrana plasmática a través vesículas revestidas de clatrina para la entrega en el sistema endosomal. En estudios con ratones recientemente se ha demostrado que también está implicado en el mantenimiento de niveles normales de glicoproteínas y liquidación de hidrolasas lisosomales (Porcaro, *et al.* 2003).

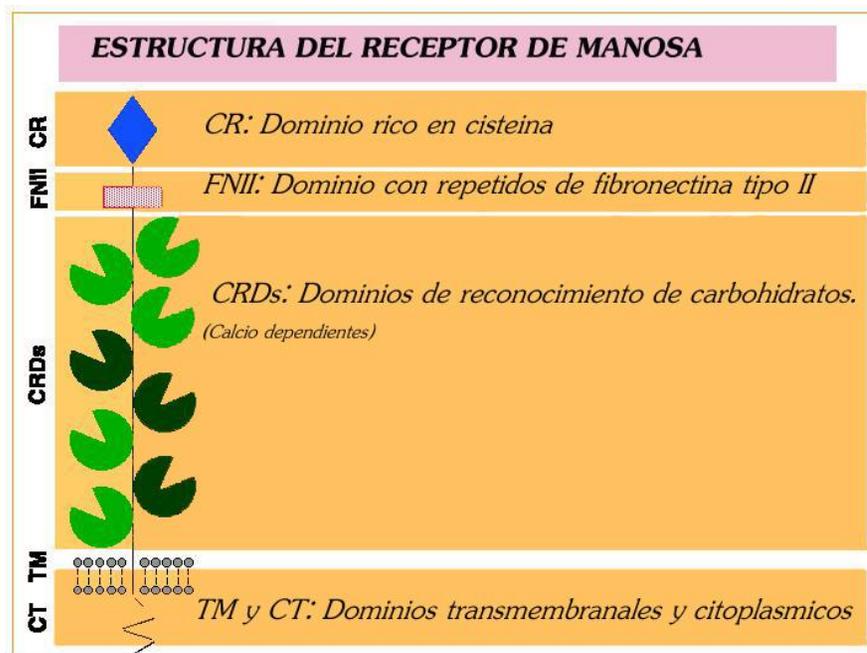


Figura 5 Receptor de manosa.

Receptor Dectin 1

Dectin-1 al igual que MR es un receptor de membrana, está constituido por un único dominio extracelular de lectina tipo C (dominio de reconocimiento de hidratos de carbono, CRD), que reconoce glucanos y un ligando endógeno indefinido en las células T. El CRD se separa de la membrana por una región del tallo, tiene una cola citoplásmica con un motivo basado en la activación de tirosina (ITAM) (Brown, *et al.* 2006).

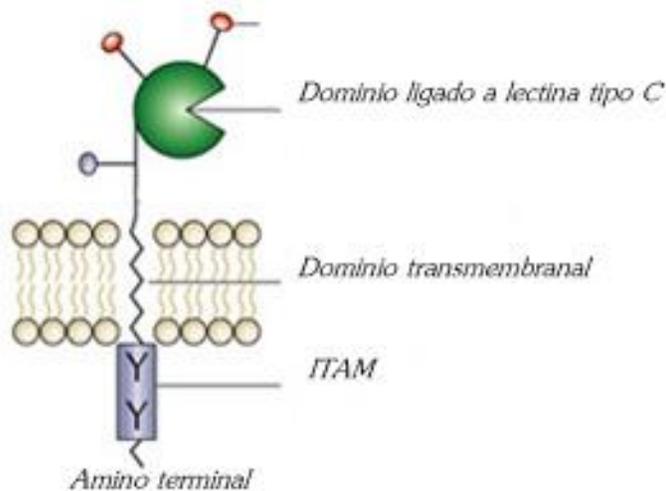


Figura 6 Estructura del receptor Dectin-1. Formado por un dominio extramembranal Lectin tipo C, un dominio transmembranal, un motivo basado en tirosina y una cola de señalización NH₂-terminal. Brown, *et al.* 2006)

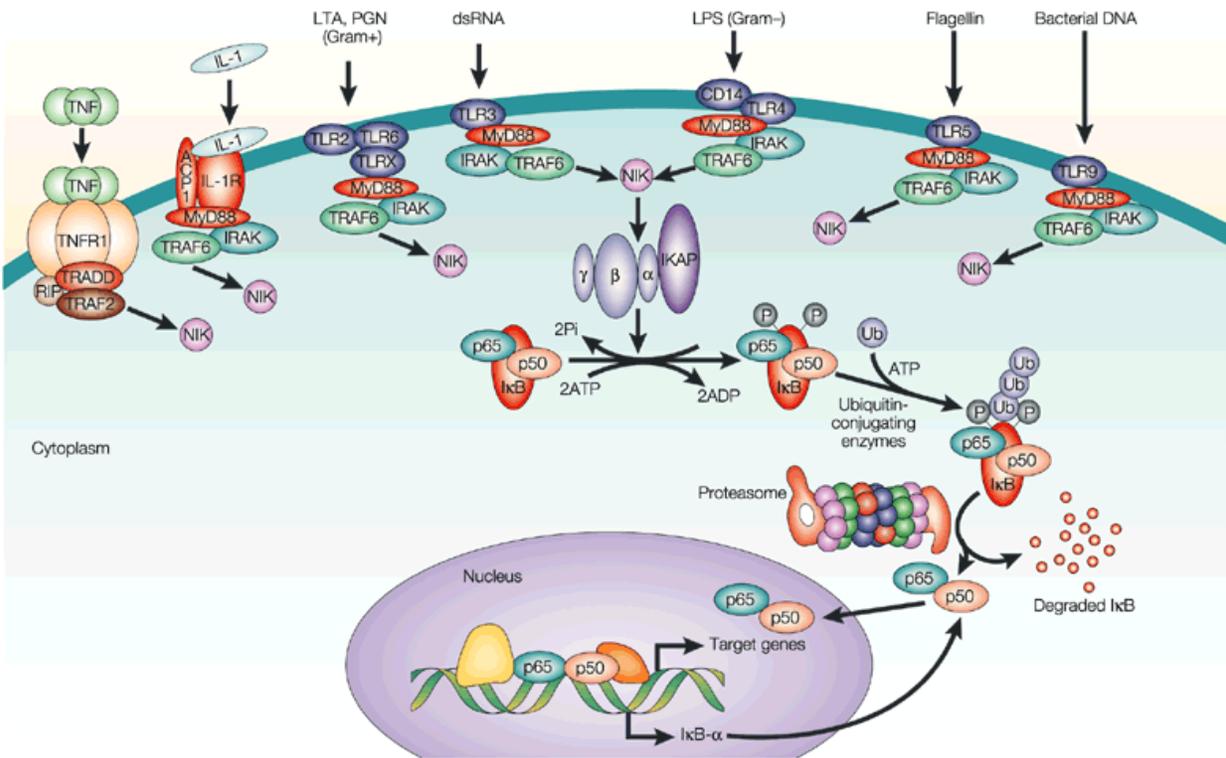
Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLR) de mamíferos pertenecen a un sistema de reconocimiento y de señalización, originalmente descubierto como resultado de su participación en el desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster*. Después se encontró que tiene un papel importante en el reconocimiento de bacterias y hongos.

Algunos TLR actúan como receptores de superficie celular, mientras que otros actúan dentro de la célula y están localizados en las membranas endosomales, donde detectan

patógenos y componentes de los mismos llevándolos al interior de la célula mediante endocitosis, fagocitosis, etcetera.

Los TLRs humanos de superficie (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6) son proteínas constituidas de 700-100 aminoácidos con un dominio extracelular, uno transmembranal y dominios citoplasmáticos. El dominio extracelular contiene el sitio de unión a ligando, y TLRs generalmente funcionan como homodímeros (asociaciones de dos proteínas idénticas) (Christmas, *et al.* 2010). Estudios han demostrado que cuando el organismo carece de ellos incrementa la susceptibilidad a infecciones se cree que esto se debe a la disminución de producción de citocinas proinflamatorias.



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 7 La familia de TLRs y vías proinflamatorias de transducción (Nguyen, *et al.* 2002).

TLR 2

TLR 2, es una glicoproteína transmembranal de tipo I con un único dominio transmembranal y un dominio intracelular conservado, tiene un papel clave en la inmunidad innata, reconoce moléculas conservadas en los patógenos, en colaboración con TLR1 y TLR6 con lo que se desencadena una respuesta inflamatoria y la producción de diferentes citocinas (Flo, *et al.* 2001) (Petnicki, *et al.* 2014).

Inmunidad en infecciones fúngicas

Los monocitos, macrófagos y neutrófilos, contribuyen principalmente a la respuesta anti fúngica a través de fagocitosis y la destrucción de patógenos.

Los hongos tienen tres principales componentes de la pared celular: β -glucanos, quitina y mananos. La pared celular varía en función de la composición, etapa de desarrollo, entre otros y es la principal fuente de PAMP's que es reconocida por los PRR's. Durante el curso de una infección por hongos, múltiples PRR's del hospedero son susceptibles de ser estimulado por PAMP's fúngicos en diferentes combinaciones, dependiendo de las especies de hongos. Por lo tanto, la respuesta inmune final dependerá no sólo en el grado relativo de estimulación de los receptores individuales, sino también en el nivel de cooperación entre receptores y la localización celular (Medzhitov, *et al.* 2007).

En el caso de los receptores fagocíticos, Dectin 1 es el primero en reconocer a los β -glucanos en los hongos levaduriformes, pero no los reconoce en las hifas, donde están protegidos por una capa de mananos (Gantner *et al.* 2005) (Blanco, *et al.* 2008). Después de que Dectin 1 reconoce al hongo se desencadena la producción de citosinas pro y anti inflamatorias, este proceso es llevado a cabo mediante dos vías de señalización, que inicia con el reconocimiento del hongo, desencadenando la fosforilación de la tirosin cinasa (SYK). La primer vía activa a la proteína adaptadora de caspasa 9 (CARD9) y la segunda activa a RAS. Estas vías actúan de forma sinérgica y, a través de mecanismos de regulación cruzada, induciendo la activación del factor-kappa B (NF- κ B) y la activación

de genes de citoquinas dentro del núcleo de la célula (Romani, *et al.* 2011) (Brown, *et al.* 2006) (Boyso, *et al.* 2005).

El receptor de manosa, reconoce e internaliza eficientemente patógenos a través de moléculas con residuos de glucosamina, reconoce NH₂-ligados a mananas, α -glucanos y quitina, promoviendo así el procesamiento y presentación de antígenos a las células T. Además de que tiene la capacidad de desencadenar la respuesta inmune, en colaboración con otros receptores como Dectin 1 y algunos TLRs (Nicola, *et al.* 2008).

Los TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9, son los principales TLRs implicados en el reconocimiento de componentes de los hongos, tal es el caso β -glucanos, zymosan, etcétera (Sassá, *et al.* 2009). Al reconocer al patógeno se desencadena una cascada de señalización que es transducida desde la superficie celular hasta el núcleo, dicha señalización depende la proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88 por sus siglas en inglés) y su mediadores como la interleucina-1 asociada al receptor de cinasa- 4 (IRAK-4) y el factor de necrosis tumoral 6 (TRAF-6) que activan el factor nuclear (NF κ B) para que las respuestas celulares apropiadas se inicien. TLRs y otros PRRs confieren reconocimiento de PAMP's, su señalización desencadena la síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias, e induce la expresión de moléculas coestimuladoras para la promoción de la activación de la inmunidad adaptativa durante la presentación de antígenos. La activación simultánea de múltiples PRRs por un patógeno fúngico le proporciona al sistema inmune diversas posibilidades para desencadenar una respuesta inmune específica y eficaz (Roeder, *et al.*, 2004).

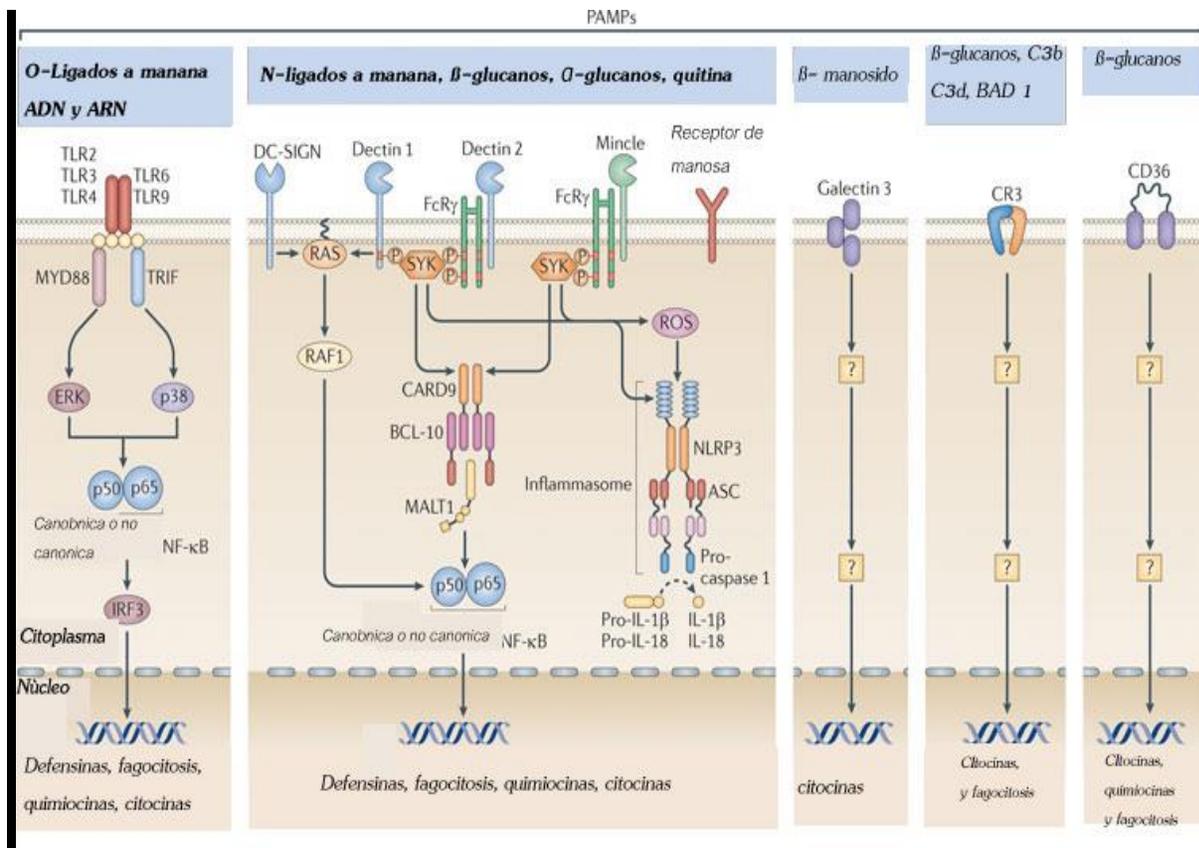


Figura 8 Diferentes PAMPs reconocidos por receptores de membrana. Imagen tomada y adaptada de Romani, *et al.* 2011

Respuesta inmune contra *Sporothrix schenckii*

La respuesta inmune del hospedero frente *S. schenckii* no está bien dilucidada, ya que son pocos los estudios que se hacen para este hongo. Hasta el momento se sabe que los mecanismos de vigilancia inmune desarrollan un papel importante en el control del hongo, al igual que con otros hongos patógenos como *C. albicans*, el sistema inmune innato es la primer línea que protege al hospedero contra *S. schenckii*, donde la forma levaduriforme es reconocida por el sistema complemento (Guzman, *et al.* 2012)(Campagne, *et al.* 2007) (Zimmer, *et al.* 2015), mientras que los conidios son reconocidos por otros receptores de membrana de los macrófagos como MR, DC, TLR-2, TLR-4, TLR-6, etcétera (Martinez, *et al.* 2013).

Algunos estudios han demostrado que las levaduras de *S. schenckii* no son internalizadas de manera eficiente por Mφs peritoneales a menos que estos hayan sido opsonizados previamente con concanavalina A (Con A) o tratadas con neuraminidasa. Sin embargo aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual los Mφ internalizan a este hongo (Guzman *et al.* 2012).

Purificación de proteínas

Las proteínas son un componente esencial de todos los organismos y algunas de ellas presentan un interés particular, por esta razón a lo largo de la historia se han desarrollado diversas técnicas para su obtención y purificación. Desde que en 1926, cuando James Summer cristalizó por primera vez una enzima, se aceptó que las proteínas son sustancias bien definidas.

Las primeras técnicas de purificación empleadas eran poco funcionales en comparación con los estándares actuales. Aunque hoy en día el desarrollo de un proceso de purificación eficiente puede representar un gran desafío.

Las proteínas son purificadas mediante diversos métodos de fraccionamiento que son elegidos dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la muestra, las cuales son aprovechadas para realizar una separación progresiva, eliminando los componentes no deseados y obtener como resultado la o las proteínas de nuestro interés.

Cuando se va a purificar una proteína, deben ser considerados diversos factores como: la solubilidad, carga iónica y tamaño de la proteína, además de su unión con otras moléculas; en la tabla 1 se muestran las principales técnicas empleadas para la purificación de proteínas.

Características	Técnicas
Solubilidad	<ol style="list-style-type: none"> 1. Salting in 2. Salting out
Carga iónica	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cromatografía de intercambio iónico <ul style="list-style-type: none"> -Catiónico -Aniónico 2. Electroforesis 3. Isoelectroenfoque
Polaridad	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Cromatografía:</i> <ul style="list-style-type: none"> - de Adsorción - en Papel - de fase inversa -de interacción hidrófoba
Tamaño molecular	<ol style="list-style-type: none"> 1. Diálisis y ultrafiltración 2. Electroforesis en gel 3. Cromatografía de filtración por geles 4. Ultracentrifugación
Especificidad de unión	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cromatografía de afinidad

Tabla 1 Técnicas empleadas para la purificación de proteínas según sus características fisicoquímicas. Tomada y editada de Voet, *et al.* 2004.

Solubilidad

Las proteínas presentan en su estructura una serie de grupos ácidos y básicos lo que hace que su solubilidad este en función de diversos factores, tal es el caso de la concentración de sales disueltas, la polaridad del solvente, el pH y la temperatura, por lo que algunas proteínas precipitaran en condiciones en que otras son solubles (Voet, *et al.* 2004) (Duong-Ly, *et al.* 2014).

Cromatografía

La cromatografía es un término adoptado por primera vez por el botánico ruso Mikahail Tswett en 1906, el cual describió la separación de los pigmentos de hojas vegetales. Él definió este proceso como “*Método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente*” (Voet, *et al.* 2004).

Hoy en día existe una gran diversidad de técnicas cromatográficas, pero el fundamento es el mismo, la I. U. P. A.C. lo define como el método usado para la separación de los componentes de una muestra, conformada por dos fases (fase estacionaria y fase móvil). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, perlas, etcétera, y la fase móvil es la encargada de transportar la muestra.

En el caso específico de la molécula de nuestro interés nos basamos principalmente en dos técnicas cromatografías:

Cromatografía de afinidad

Esta técnica cromatográfica se basa en la interacción específica entre los componentes de la muestra y otra molécula unida a la fase estacionaria; los ejemplos más comunes son las interacciones enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo y ligando-receptor. La Fase estacionaria es un soporte inerte (microesferas de vidrio o plástico, gel de agarosa, etc.) al que se une covalentemente el ligando de afinidad. Ejemplos de este ligando: sustrato, inhibidor o cofactor de una enzima, anticuerpo, antígeno, hapteno, sustancia transportada, hormona, oligosacáridos, lectinas (proteínas con afinidad por oligosacáridos) (Figura 9) (Berg, *et al.* 2002) (Voet, *et al.* 2004).

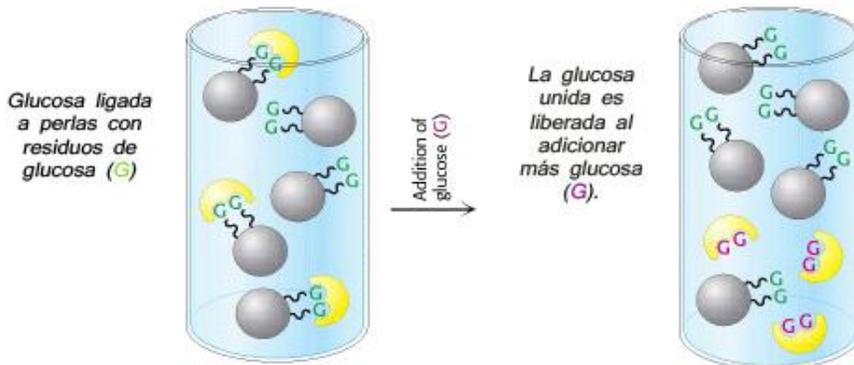


Figura 9 Cromatografía de afinidad. Imagen tomada y editada de Berg, *et al.* 2002

Cromatografía de intercambio iónico

Es una técnica cromatográfica, donde los iones se unen de manera electrostática a una matriz insoluble y químicamente inerte son reemplazados de manera reversible por los iones de la solución.

Para lograr la purificación de una proteína mediante esta técnica es necesario elegir el tipo de columna dependiendo de la carga de la molécula, el pH y la concentración salina del buffer de elución, estas dependerán de la afinidad de unión de la proteína por el intercambiador iónico (columna), por lo que es necesaria la realización de una elución escalonada, es decir incrementar progresivamente la concentración de sal en el buffer (Figura 10) (Charcosset, 1998)(Berg, *et al.* 2002) (Voet, *et al.* 2004).

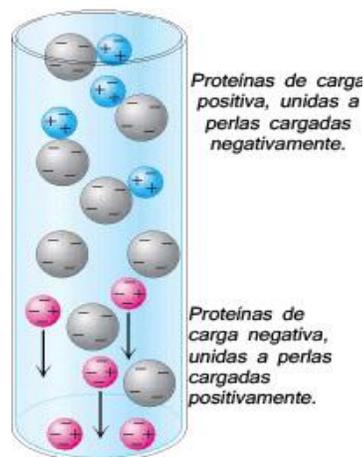


Figura 10 Cromatografía de intercambio iónico. Imagen tomada y editada de Berg, *et al.* 2002

Objetivos:

General:

Purificación de opsoninas de suero humano que potencian la fagocitosis en macrófagos de los conidios del hongo *Sporothrix schenckii* mediante el receptor de manosa.

Particulares:

1. Identificar y purificar las opsoninas del suero humano que favorecen la fagocitosis de los conidios de *S. schenckii* mediante diversas técnicas:

- a) Precipitación con sulfato de amonio.
- b) Cromatografía de afinidad con la columna Cibacrom blue.
- c) Cromatografía de intercambio iónico en columna Econo- Pac Q Cartrige.
- d) Cromatografía de afinidad con la columna Concanavalina A
- e) Implementación de los conidios de *S. schenckii* como columna de afinidad.

2. Determinar la contribución de las opsoninas presentes en el suero humano, que participan en el proceso de fagocitosis en macrófagos humanos mediante el receptor de manosa.

Hipótesis

El suero humano está constituido por una amplia gama de proteínas, de las cuales algunas desempeñan un papel de opsoninas, por dicha razón se pretende encontrar a la o las proteínas que se encargan de la opsonización del conidio de *Sporothrix schenckii*, incrementando el porcentaje de fagocitosis mediado por el receptor de manosa.

Métodos

CEPA.

Se utilizó el aislamiento EH257, el cual fue obtenido de un paciente con esporotricosis y proporcionado por el Dr. Jorge Mayorga, Instituto Dermatológico, Jalisco, México.

OBTENCIÓN DE CONIDIOS DE *S. SCHENCKII*

El aislamiento de *S. schenckii* se sembró en tubos con medio YEPD conidios, se incubaron a 28°C por 8 días. Los conidios se obtuvieron agregando agua estéril al cultivo, la superficie se raspó con asa micológica para obtener una suspensión. La suspensión celular se filtró a través de papel Whatman No 1 para eliminar los fragmentos de micelio y tener una suspensión enriquecida de conidios.

La suspensión se centrifugó por 25 minutos a 3,000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1mL de agua destilada, los conidios se contaron en cámara de *Neubauer*.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO HUMANO.

Precipitación con sulfato de amonio.

Con la finalidad de purificar las moléculas de interés contenidas en el suero humano, se adicionó 80% (m/v) de sulfato de amonio y se homogeneizó en agitación ligera por 15 min. Se incubó toda la noche a 4 °C; se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH6.5. La muestra se colocó en bolsas para diálisis (membranas de celulosa 3.5 KD Spectra/Por®); se dializaron en 1 L de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 6.5 a 4°C en agitación cambiándolo cada 24 h durante una semana, después de la diálisis el suero se concentró en azúcar. Se estimó la concentración mediante espectrofotometría a 280 nm.

Fraccionamiento en columna Cibacrom Blue (FCB)(Sigma)

En una columna se colocaron 3 mL de resina Cibacrom Blue con una capacidad de 20 mg/mL se lavó y equilibró con 100 mL de Tris 0.01 M a pH 7.5-8.0. Se inyectaron 40 mg de la proteína previamente dializada y concentrada. Se lavó con 30 mL de Tris 0.01 M a pH 7.5, se colectaron 20 tubos con 5 mL c/u. Con la finalidad de eluir la proteína unida a la columna se utilizó Tris 0.01 M pH 7.5 - NaCl 1.5 M y se colectaron 20 tubos con 5 mL c/u. Al finalizar, la columna se restituyó con 30 mL de Tris 0.01 M pH7.5, se leyó la absorbancia de cada una de las fracciones colectadas a una longitud de onda de 280 nm. Se utilizaron las fracciones donde se identificó el valor mayor de proteína y se dializaron con Tris 20 mM pH 7.5. El “buffer” de diálisis se cambió cada 24 h, durante 7 días. Las fracciones se concentraron en azúcar y se estimó la concentración de proteína a longitud de 280 nm.

Fraccionamiento en columna de intercambio iónico. (Bio-Rad)

De acuerdo a los resultados previos se utilizó una columna anionica, Econo-Pac Q cartridge con una capacidad <75 mg de proteína. La columna se lavó y equilibró con 5 volúmenes de buffer (NaCl 0.1 M, 50 mM Tris -HCl pH 8). En la columna se inyectaron 40 mg de la proteína retenida en Cibacrom Blue (alb +); se colectaron 50 tubos con 1mL c/u. La proteína fue eluida con un buffer 50 mM Tris-HCl, pH 8 y diferentes concentraciones de NaCl (0.1, 0.3 0.5, 0.7 y 1 M), colectando 10 tubos para cada concentración con 1 mL c/u. Se estimó la concentración de proteína en todas las fracciones por espectrofotometría a 280 nm. Las diferentes fracciones fueron dializadas en 1 L de Tris 20 mM pH 7.5 por 7 días (cambio de buffer cada 24 h) y concentradas en azúcar. Se estimó nuevamente la concentración de proteína.

Fraccionamiento en columna de Concanavalina A (Sigma). Cromatografía en batch.

Con el fin de separar las manoproteínas de la muestra, se colocó 1mL de resina Concanavalina A-Sepharosa con una capacidad de 20 mg/mL en tubos de centrifuga, Falcon®. La resina se lavó 5 veces con 5 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 6.5.

Se trabajó con las muestras eluidas con 0.3 y 0.5 M de NaCl colocando por separado en cada tubo lo equivalente a 15 mg de proteína, se resuspendió en agitación durante 1h a -20 °C, después se centrifugó a 1100 rpm por 3 min. Se lavó con 5 mL con buffer de corrida 5 veces. La resina se eluyó con 5 lavados de α -metilpiromanosido 1 M incubando durante 20 minutos para cada lavado resuspendiendo y centrifugando 1100 rpm por 3 min.

Fraccionamiento utilizando los conidios de *Sporothrix schenkii* como método de afinidad. (PUC)

El aislado 257 de *Sporothrix schenkii* se cultivó en YEPD líquido durante 3 días a 30 °C. Se separaron los conidios por filtración en papel Whatman No 1. La suspensión celular se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 250 μ L de RPMI sin SFB suplementado. Se interaccionaron los conidios con 20 μ g de proteína de la fracción obtenida de la elución correspondiente a NaCl 0.5 M, 50 mM Tris-HCl, pH 8 de la columna de intercambio iónico. La mezcla se incubó toda la noche en agitación lenta a 4 °C, posteriormente se lavó dos veces con PBS 1X pH 7.2. Para liberar las proteínas unidas a los conidios, se resuspendió en 0.1 M de Na₂CO₃ pH 11.5 y se incubaron durante 3 h en agitación lenta a 4 °C. La mezcla se centrifugó 15 min a 15,000 rpm, se conservó el sobrenadante. Para neutralizar al sobrenadante se agregaron 5 μ L de HCl 0.1N por cada 500 μ L y las proteínas se precipitaron agregando, 4 volúmenes de etanol. Las proteínas se incubaron toda la noche a -20 °C, los tubos se centrifugaron 15 min a 15,000 rpm; la pastilla se resuspendió con 50 μ L de Tris-HCl pH 8. La cantidad de proteína se cuantificó por método espectrofotométrico a 280 nm.

CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS DE FAGOCITOSIS

Separación de PBMC

En un tubo *Falcon* de 50 mL se mezcló sangre con PBS (1:2), se transfirieron 20mL a un tubo que contenía 15 mL de Histopaque (Sigma) para crear un gradiente, se centrifugó a 2,000 rpm durante 25 min a temperatura ambiente. La interfase entre el Histopaque y el plasma que contenía las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células fueron lavadas dos veces con 30 mL de PBS centrifugando 10 minutos a 800 rpm, desechando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet, la pastilla obtenida del segundo lavado se resuspendió en 3 mL de PBS y se transfirió a un tubo con 25 mL suero (obtenido del gradiente) Se centrifugó durante 10 min a 800 rpm, el pellet se resuspendió en 1mL de RPMI suplementado y se contaron los monocitos en cámara de *Neubauer*. La viabilidad de las células se determinó usando azul de Tripiano (viabilidad superior al 95%).

Cultivo de MΦ

En placas de poliestireno de 35x10 mm (Sarstedt) se colocaron cubreobjetos circulares de 12 mm, colocando en cada pozo 2.5×10^5 de monocitos con 500 μ L de RPMI con 10% SFB suplementado (Hepes 10mM, piruvato de sodio 1mM, L-glutamina 2mM, 2-mercaptoetanol 2.8 mM y 100 μ g/mL de antibiótico y antimicótico) , se incubaron toda la noche a 37 °C con 5% de CO₂, el medio se retiró y se adicionaron 500 μ l de RPMI con 10% SFB suplementado e incubaron durante 8 días con un cambio de medio después de 72 h. Se dejaron 8 días para que los monocitos se diferenciaron a macrófagos y se pudieran hacer los ensayos de fagocitosis.

ENSAYO DE FAGOCITOSIS

a) Oponización En tubos *Eppendorf* se colocaron 20 µg de proteína de cada fracción (obtenidas de Cibacrom, ConA y Econo PacQ) llevando a un volumen final de 500 µL con RPMI sin SFB suplementado, se añadieron 2.5×10^6 conidios y se incubaron a 37 °C durante 30 min, la muestra se centrifugó y se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 500 µL de RPMI suplementado.

b) Fagocitosis

Los conidios opsonizados se incubaron con los MΦ diferenciados a una multiplicidad de infección de 1 MΦ: 10 conidios. La mezcla celular se incubó a 37 °C con 5% CO₂ durante 35 min. Al término de la incubación se lavaron con PBS y fijaron con metanol, se realizaron 10 lavados con PBS. Las células se tiñeron con Giemsa y se fijaron en portaobjetos para su cuenta en el microscopio.

Ensayo de competencia

Para determinar que el receptor de manosa está involucrado en la internalización de los conidios opsonizados con las diferentes fracciones analizadas, se realizaron experimentos de competencia utilizando azúcares que se unen a este receptor.

Se utilizó una concentración de 100 mM de manosa, fucosa, manopiranosido azúcares que se unen al receptor de manosa y como control negativo galactosa.

Los conidios opsonizados con las proteínas obtenida de proteínas que se unieron a los conidios se incubaron con los MΦ, se añadieron los diferentes azúcares y se incubó a 37°C con 5% CO₂ durante 35 min. Al término de la incubación se lavaron las muestras con PBS, se fijaron con metanol y se hicieron varios lavados con PBS. Las células se tiñeron con Giemsa y se fijaron en portaobjetos para su cuenta en el microscopio.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Gel de poliacrilamida (PAGE)

Las proteínas de las diferentes fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema de Laemmli (Laemmli, U. K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* (London) 227:680-685) con o sin β -mercaptoetanol. Las muestras fueron corridas en geles al 7.5% y 15% de poliacrilamida en el sistema Power pac® HC (Bio Rad) a 5 W durante 15 min y posteriormente a 8 W (1 h aproximadamente). Las proteínas fueron teñidas con Coomasie o con plata.

Preparación y cargado de la muestra.

Se cuantifico la proteína de la muestra mediante método espectrofotométrico a 280 nm, se toma una alícuota correspondiente a 10 μ g de proteína y se lleva a un volumen final de 40 μ L con cóctel para la muestra, mezclar perfectamente. Tomar los 40 μ L de la muestra con el buffer de carga y cargar en el pozo correspondiente previamente identificado. Se montó el sistema y se colocó el buffer de corrida. En el sistema Power pac® HC (Bio Rad) se corrió el gel 5 W durante 15 min y posteriormente a 8 W (1 h aproximadamente). Transcurrido el tiempo se detuvo el sistema y se preparó la muestra para la tinción.

WESTERN BLOT

Lisado de células

Se incubaron 1.5×10^7 células mononucleares en cajas Petri de vidrio durante 7 días a 37 °C con 5% CO₂ en medio RPMI con SFB 10% suplementado transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio y se le adicionó 1 mL de PBS 1X con 5 mM de EDTA, las cajas se incubaron por 10 min en hielo, se retiró el PBS y se colocó en tubos de microcentrifuga Ependorff®. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm por 10 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer de lisis. La

suspensión se incubó en hielo durante 40 min, se agitó vigorosamente en vortex por 30 s cada 5 min durante 30 min; se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 µL de buffer de lisis.

Cuantificación de proteínas del lisado celular

Para cuantificar la cantidad de proteína obtenida del lisado celular se realizó una curva patrón (tabla 2) con BSA (albúmina bovina de suero). Primero se colocó el buffer de lisis, seguido de la BSA, la solución A´ (20 µL de reactivo S por 1 mL de reactivo A) y finalmente la solución B, se incubó durante 15 min en la obscuridad y finalmente se leyó la placa en el equipo Dc Protein Assay a 680 nm.

µg BSA	µL BSA 1 ó 5 mg/mL stock	µL buffer de lisis	µL reacción A´	µL reacción B
0	0	5	25	200
1	1	4	25	200
3	3	2	25	200
5	1	4	25	200
7	1.4	3.6	25	200
9	1.8	3.2	25	200
11	2.2	2.8	25	200
13	2.6	2.4	25	200

Tabla 2 Curva patrón para cuantificación de proteínas.

Transferencia

Se preparó un gel de poliacrilamida al 7.5% + SDS, se cargaron 1,3, 5 y 10 µg de muestra por pozo, el gel se corrió a 5 W los primeros 15 min y el tiempo restante a 8 W. Los gels fueron transferidos utilizando el aparato de transferencia Trans-Blot Turbo y paquetes de transferencia de PVDF Midi (Bio-Rad). Las membranas se transfirieron inmediatamente a un tampón de bloqueo para fluorescente Western Blot (Rockland), y se incubaron con una

agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche con agitación suave a 4 °C en 5 mL de solución de bloqueo y 0.001 µg/µL del anticuerpo primario (MAh-hMR, anti-hDEC-205 y anti-TLR2), se retiró la mezcla y se realizaron 4 lavados en agitación lenta de 5 min con PBS 1X más 0.1% de tween 20, posteriormente se realizó una solución 1:10,000 con el anticuerpo secundario (anti-Mouse IgG (H+L)) y la membrana se incubó con esta solución durante 1h en agitación y en oscuridad. Posteriormente se retiró y se lavó 4 veces con agitación lenta por 5 min con PBS 1X más 0.1% de tween 20, se leyó en el equipo ODYSSEY CLx a 700 y 800 nm.

SECUENCIACIÓN

Preparación de la muestra

Se usaron 40 µg de las proteínas que se unieron a los conidios, se adicionó SDS 5% final y 10% β-mercaptoetanol, se incubó durante 1 h a 4 °C. Se realizó un gel de poliacrilamida al 7.5% como se indicó en el punto 5.1, el gel se tiñó con azul de Coomassie, se identificaron y cortaron las proteínas de interés.

Procesamiento de la muestra.

Las proteínas fueron desteñidos con ACN: NH₄HCO₃ 50 mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37 °C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN: H₂O: ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf ®5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α-ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot.

Resultados

Identificación del receptor de manosa en macrófagos (MΦ) provenientes de monocitos de sangre periférica.

En un trabajo previo del laboratorio se observó que los conidios de *S. schenckii* son fagocitados eficientemente cuando estos son opsonizados con suero humano preinmune (SHP); por experimentos de competencia se concluyó que uno de los receptores involucrados en la internalización del hongo es el receptor de manosa (MR).

Para determinar la presencia de la proteína del MR en los MΦ humanos, se realizó el método de "western-blot" (WB), el cual permitió la identificación de la proteína utilizando el anticuerpo específico anti-MR (InvivoGen). El PAGE-SDS se inyectó con concentraciones crecientes de proteína de los lisados de los MΦ diferenciados por 8 días a 37°C y con una atmósfera de 5%CO₂. La figura 11 muestra el resultado, donde se observó una sola banda de 186 kDa que corresponde al receptor de manosa que está presente a partir de 3 μg de proteína.

Con este resultado se confirmó que después de 8 días de incubación el receptor de manosa ya está presente en los macrófagos.

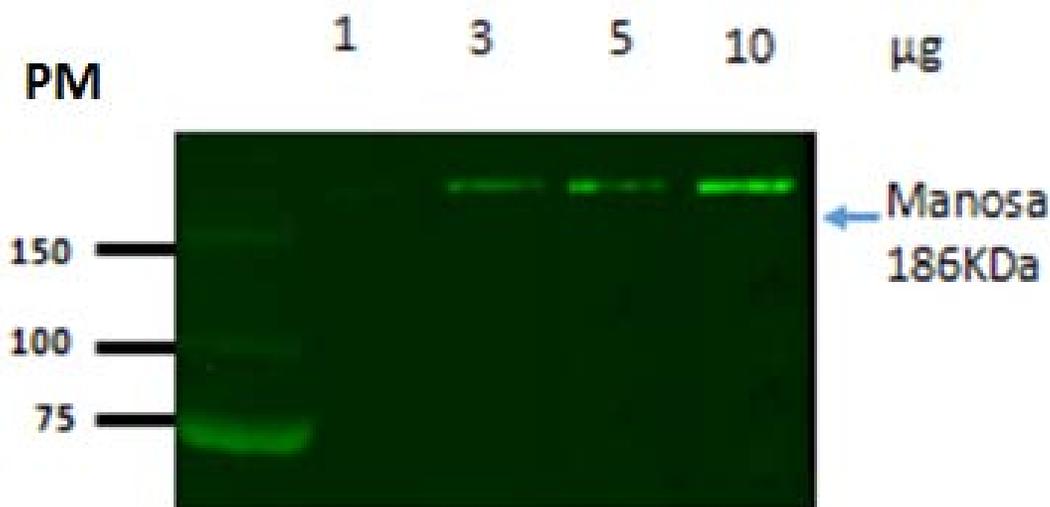


Figura 11 Western Blot realizado con diferentes concentraciones de proteínas (1,3, 5 y 10 μg), provenientes de la lisis de MΦ humanos de 8 días de incubación. PM pesos moleculares.

Análisis de fagocitosis del conidio de *S. schenkii* mediante MΦ humanos

Para realizar un seguimiento del enriquecimiento de las fracciones obtenidas por las diferentes técnicas cromatografías, los MΦ humanos fueron retados con el conidio previamente opsonizado con las proteínas obtenidas de las diferentes fracciones, se tiñeron con Giemsa y se analizaron con espectrofotometría de luz, contando los conidios internalizados en el MΦ. En la figura 12 se observan MΦ con diferentes porcentajes de fagocitosis dependiendo del tratamiento previo dado al conidio. El porcentaje de fagocitosis y de conidios internalizados se realizó con ensayos de fagocitosis por triplicado reportando promedios y desviación estándar.

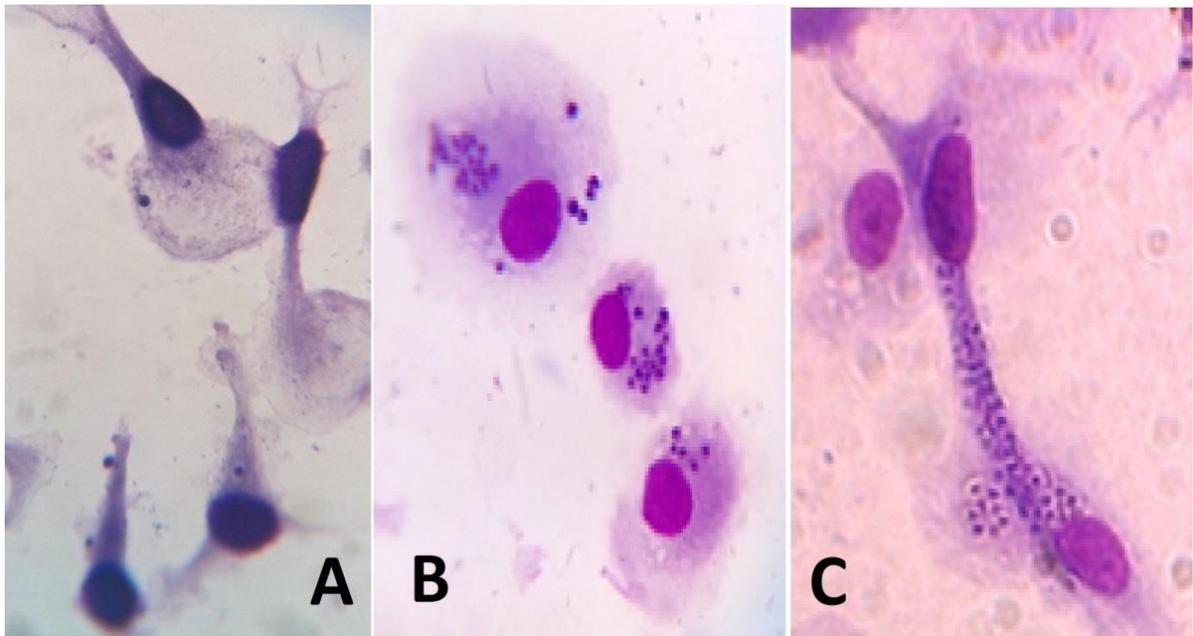


Figura 12 Ensayo de fagocitosis: MΦ incubados con A) conidios no opsonizados, B) conidios opsonizados con 20µg de SHP C) conidios opsonizados con proteínas fraccionadas. Tinción de Giemsa. Microscopía de luz 100x.

Fraccionamiento de suero humano preinmune, para la identificación de la proteína encargada de opsonizar al conidio de *S. schenkii*.

Para el enriquecimiento de las glicoproteínas que actúan como opsoninas del conidio de *S. schenkii*, el suero humano pre inmune fue fraccionado y purificado por diversas técnicas cromatográficas de acuerdo a su afinidad y carga. Las diferentes fracciones fueron analizadas en geles de acrilamida SDS-PAGE y su actividad biológica por ensayos de fagocitosis.

Preparación de la muestra proteica del suero para cromatografía.

a) Precipitación con sulfato de amonio.

Las proteínas precipitadas con sulfato de amonio se analizaron en PAGE-SDS al 7.5 y 15%, se utilizaron estas dos concentraciones para lograr separar proteínas de bajo y alto peso molecular. En la figura 13 se compara el perfil proteico del suero completo y las proteínas precipitadas con sulfato de amonio. Ambas fracciones muestran gran complejidad proteica y comparten proteínas del mismo peso molecular. También se observó que hay proteínas mayoritarias de 20, 25, 50 y 150 kDa de peso molecular.

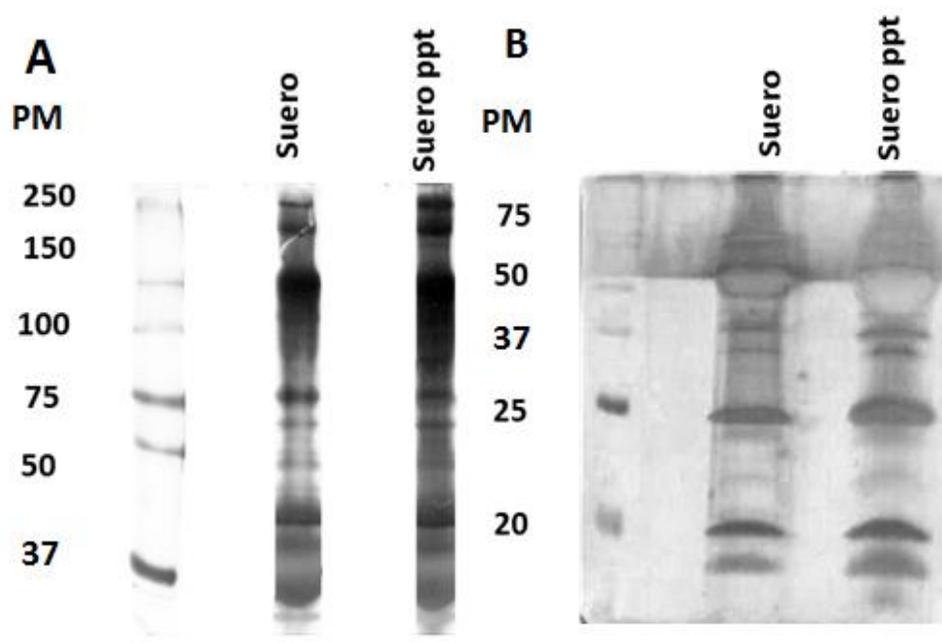


Figura 13 A) Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% de suero ppt. Se utilizó una concentración de 3µg para cada muestra. Donde la muestra marcada como suero corresponde al suero total descomplementado con calor y la muestra marcada como suero ppt, corresponde a la tratada con 80% de sulfato de amonio. Teñidos con plata.

Fraccionamiento en columna Cibacrom Blue

El porcentaje de albúmina en suero humano es superior al 50% lo que dificulta el análisis de las proteínas que se encuentran en menor proporción, para disminuir este problema se utiliza la resina Cibacrom Blue. Esta resina tiene unido un colorante que ha sido utilizado como medio cromatográfico de afinidad, una diferentes proteínas incluyendo albúmina de suero, deshidrogenasas, quinasas, interferones y varias proteínas de plasma. (Subramanian S. *et al*, 1984).

Para disminuir la cantidad de albúmina, el precipitado obtenido con sulfato de amonio se fraccionó con la resina Cibacrom Blue (ver Figura 14) y se obtuvieron dos fracciones:

- a) (Alb-) proteínas no unidas (libres de albúmina).
- b) (Alb+) proteínas unidas (fracción con albúmina).

Estas dos fracciones se analizaron por SDS-PAGE y por ensayos de fagocitosis. En la figura 15 se observa la complejidad proteica de ambas fracciones, en la fracción de Alb+ se puede ver que hay una proteína abundante de 60 kDa, que por su peso molecular presumiblemente es la albúmina, mientras que en la fracción correspondiente a Alb - se observa una disminución significativa de esta, aunque no está totalmente libre de albúmina. Por otro lado se empiezan a ver diferencias en el patrón proteico entre las muestras, lo que nos indica la diferente afinidad del colorante por las proteínas.

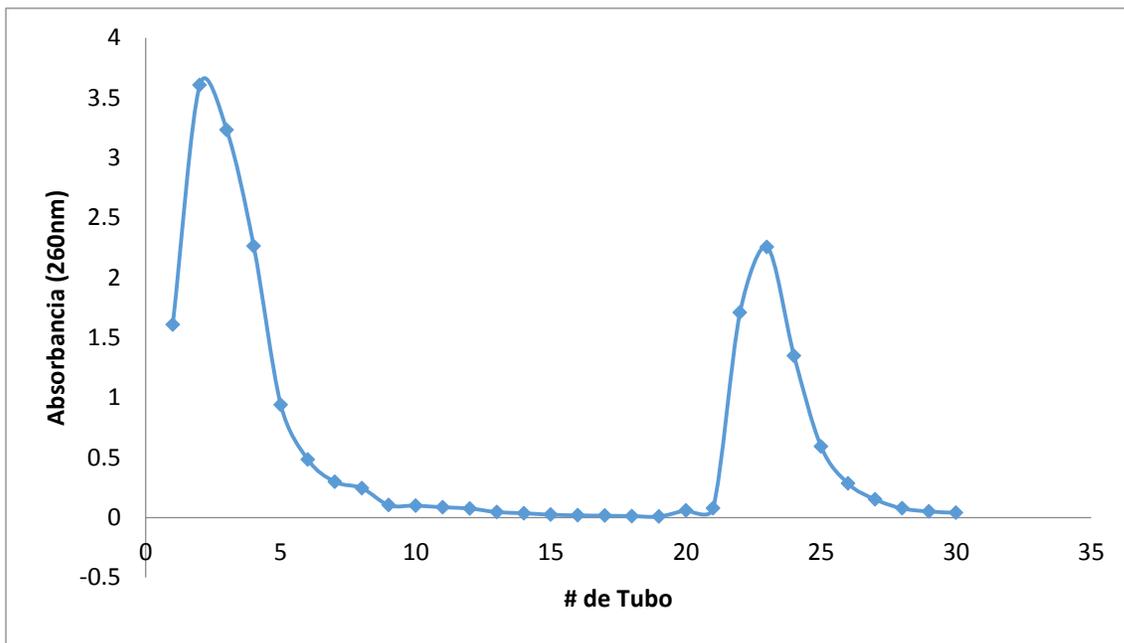


Figura 14 Fracciones obtenidas de la columna de afinidad Cibacrom Blue, el primer pico corresponde a (Alb -) proteínas que no tuvieron la capacidad de unirse a la matriz (eluido con Tris 0.01 M a pH 7.5-8.0) el segundo pico corresponde a Alb+ que corresponde a las proteínas unidas a la columna (eluidas con Tris 0.01M pH 7.5-8.0 + NaCl 1.5M).

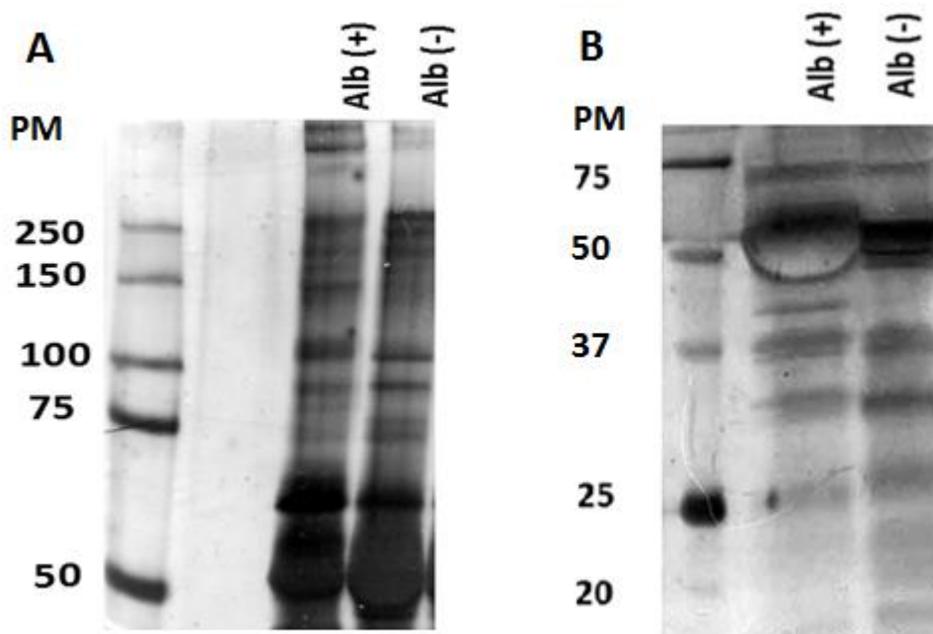


Figura 15 A) Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% Cibacrom Blue. Se utilizaron 10 μ g de proteína para cada muestra. Para ambos geles el primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, los marcados como alb+ corresponden a la fracción que se unió covalentemente a la columna y los marcados como alb – corresponden a las proteínas que no se unieron. Teñidos con plata.

El análisis de fagocitosis de conidios opsonizados con 20 μ g de proteína de cada una de las dos fracciones mostró que ambas fracciones contienen opsoninas que favorecen la fagocitosis, sin embargo la fracción retenida Alb (+) mostró mayor porcentaje de células que fagocitan y mayor número de conidios fagocitados (ver tabla 3 y Fig 16)

	NO	Suero	Alb(-)	Alb(+)
% Células que fagocitaron (%F)	-	46.2 \pm 15.3	21.1 \pm 4.7	41.8 \pm 15.1
%Conidios fagocitados (%C)	-	4.3 \pm 1.9	2.8 \pm 0.1	3.7 \pm 1.3

Tabla 3 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas obtenidas del fraccionamiento con la columna Cibacrom Blue. No opsonizado(NO) suero al 10% (Suero) Albúmina (+ y-). Resultados mostrados restando el blanco

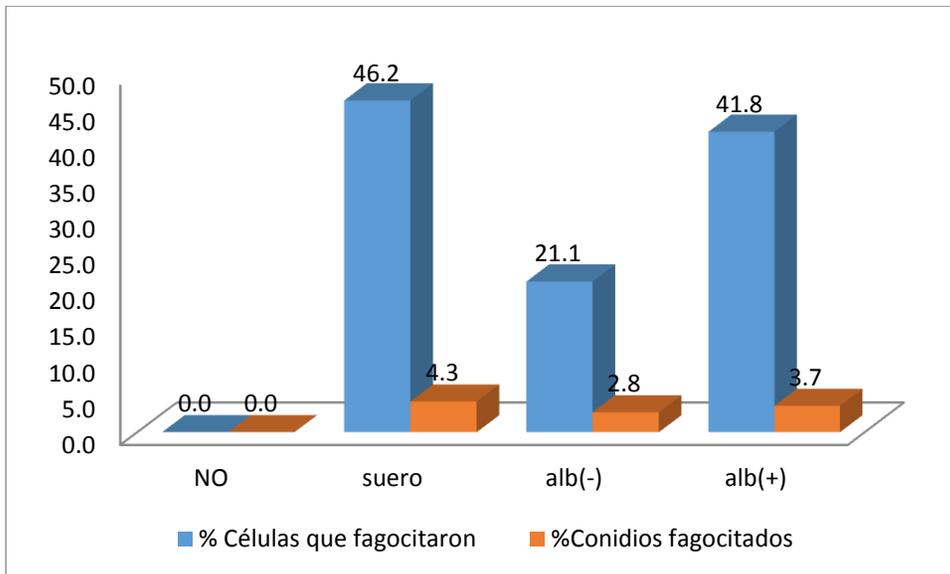


Figura 16 Gráfico del ensayo de fagocitosis retando los MΦ con las fracciones obtenidas de la columna Cibacrom Blue.

El ensayo biológico de fagocitosis mostró que la fracción Alb+ tiene mayor capacidad de opsonina por lo que se decidió continuar con esta fracción independientemente de la presencia de la albúmina (Tabla 3).

Fraccionamiento en columna de intercambio iónico.

Con el fin de enriquecer las opsoninas de interés, se utilizó la cromatografía de intercambio aniónico, en esta se fraccionaron las proteínas de Alb+.

Esta es una técnica cromatográfica que separa las moléculas en base a diferencias en punto isoeléctrico (PI), se llevó a cabo a un pH de 8, y la fracción unida se eluyó con un gradiente discontinuo de NaCl (0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 M). En estas condiciones, algunos componentes del suero se unen a la columna, y sólo los componentes más básicos como IgG, se eluyen al lavar la columna con las distintas concentraciones de NaCl (Somner, *et al.* 2015). El fraccionamiento de Alb+ utilizando el gradiente discontinuo de NaCl generó 5 fracciones: el primer pico que corresponde a la elución de las proteínas no unidas, el cual presentó mayor cantidad de proteína (aprox. 11.2 mg/mL) (Figura 17A), seguido del eluido con 0.3 M (0.2 mg/mL) y 0.5 M (0.17 mg/mL) de NaCl mientras que las fracciones

correspondientes a 0.7 M y 1 M presentaron la menor concentración de proteína (Figura 17B).

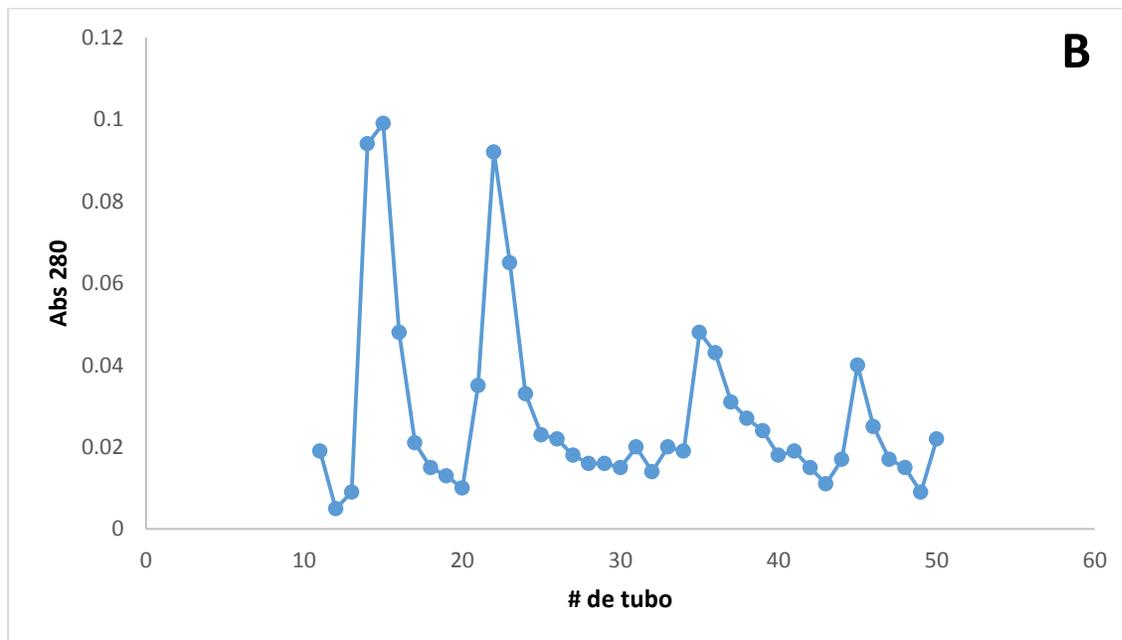
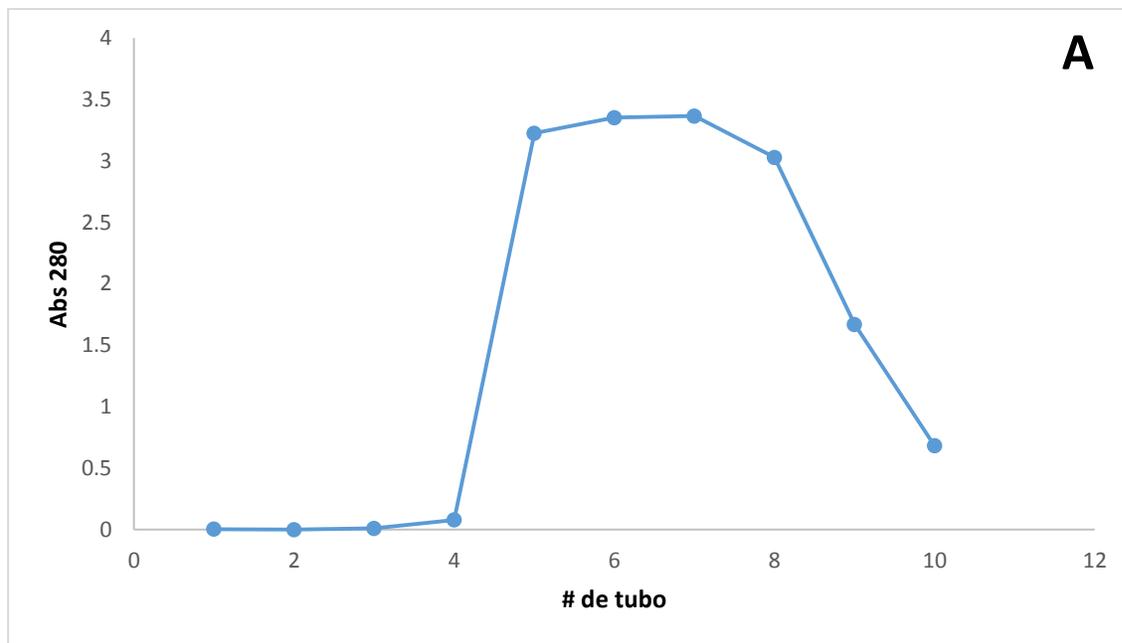


Figura 17 Fracciones obtenidas de la columna de Intercambio iónico: A) corresponde a la fracción eluida con 0.1 M de NaCl. (F1) B) El primer pico corresponde a la fracción eluida con 0.3M de NaCl (F2) los picos consecutivos corresponden a la elución con 0.5, 0.7 y 1M respectivamente(F3, F4 y F5). Valor aproximado de proteína Abs 280 x 0.8 = mg/mL.

En el análisis por PAGE-SDS al 7.5% y 15% de las cinco fracciones, se observó que el patrón de proteínas varía en cada paso de elución con las diferentes concentraciones de NaCl, la proteína de aproximadamente 60 kD (presumiblemente albúmina) está presente en todas las fracciones aunque se eluyó una parte importante a 0.1 y 0.3 M de NaCl (Figura 18).

Cada fracción se utilizó para opsonizar a los conidios y se cuantificó la fagocitosis. La opsonización con las fracciones eluidas con 0.3 y 0.5M de NaCl presentaron la mayor capacidad fagocítica, indicando que son las fracciones enriquecidas con las opsoninas. Sin embargo también se observó una pequeña activada en las otras fracciones (tabla 4 y Figura 19).

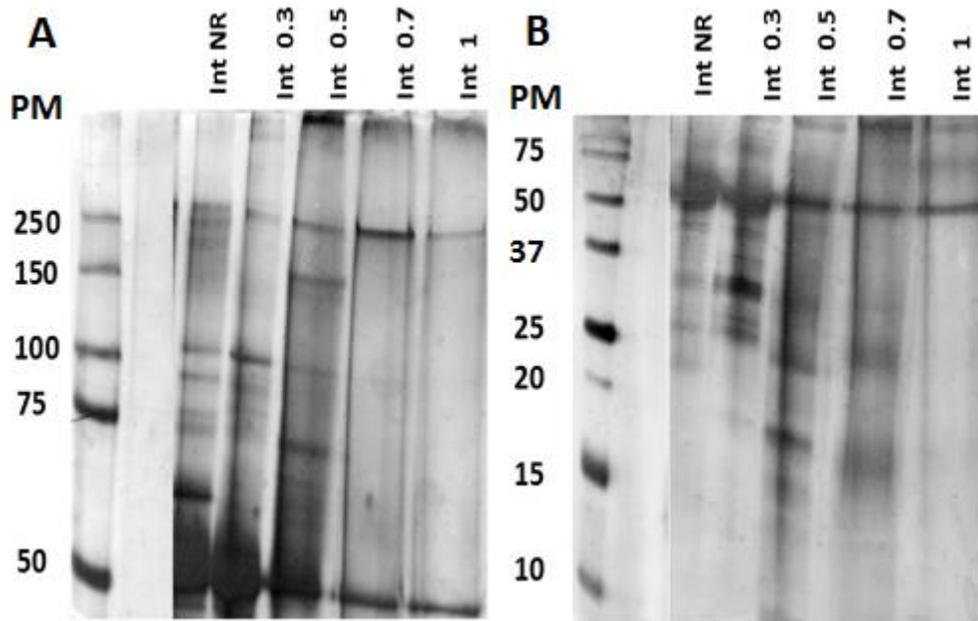


Figura 18 Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) Perfil SDS-PAGE 15% de fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico. Tinción con plata. Se utilizaron 10 µg de proteína para cada muestra. Para ambos geles el primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, el carril marcado como Int NR corresponde a la fracción eluida con 0.1M de NaCl los carriles siguientes corresponden a la elución con 0.3, 0.5, 0.7 y 1 M respectivamente.

	NO	Suero	Int 0.1	Int 0.3	Int 0.5	Int 0.7	Int 1
% Células que fagocitaron (%F)	-	45.2± 3.2	14.0 ± 15.7	30.8 ± 8.6	43.1 ± 5.1	9.1 ± 2.2	15.7 ± 3.9
%Conidios fagocitados (%C)	-	16.7 ± 1.4	2.4 ± 3.3	7.1 ± 3.5	12.0 ± 1.3	1.3 ± 0.1	3.2 ± 1.6

Tabla 4 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas obtenidas del fraccionamiento con la columna de intercambio iónico. No opsonizado (NO) suero al 10% (Suero) Intercambio iónico (Int). Resultados mostrados restando el blanco (24.0 y 3.1 % respectivamente).

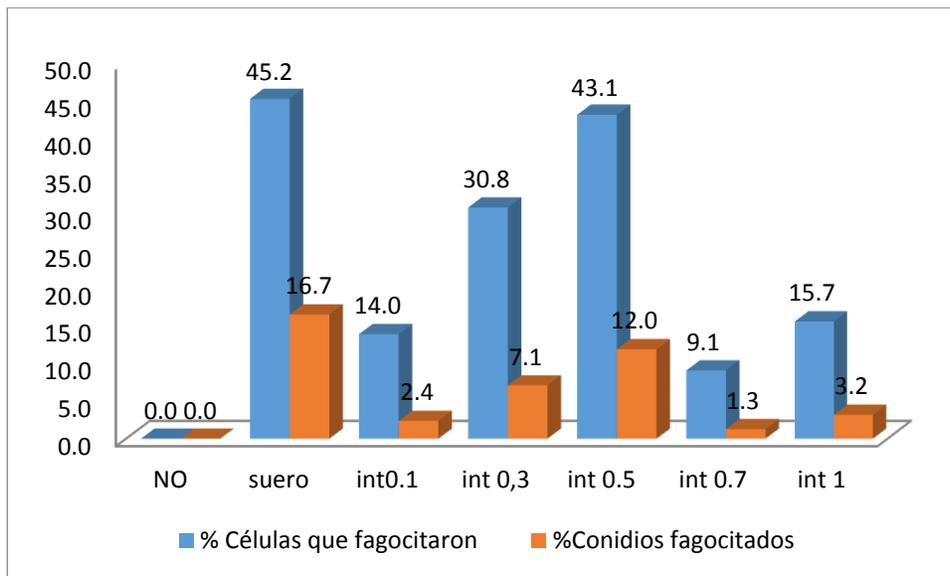


Figura 19 Fagocitosis de conidios opsonizados con las diferentes fracciones de intercambio iónico, el control son los conidios no opsonizados que en este ensayo fue de 24%, este valor se restó a cada uno de los valores de las diferentes fracciones.

Fraccionamiento con columna de afinidad ConA (cromatografía en batch).

Estudios previamente realizados en el laboratorio mostraron que las proteínas encargadas de la opsonización del conidio de *S. schenkii* son manoproteínas, con base en esta característica, se utilizó una resina que tiene acoplada Concanavalina A (Sepharosa-ConA) una lectina con afinidad por manosa.

Las fracciones obtenidas en la columna de intercambio anionico (0.3 y 0.5M de NaCl) fueron nuevamente fraccionadas por cromatografía de afinidad en Concanavalin A-Sepharose (“batch”) para separar las manoproteínas. Las proteínas retenidas (manoproteínas) fueron eluidas con 1 M de α -D-manopiranosido, dando como resultado 4 fracciones:

- a) Int 0.3 M proteínas no retenidas (0.3 M NR)
- b) Int 0.3 M proteínas retenidas eluidas con 1 M de α -D-manopiranosido (0.3 M R)
- c) Int 0.5 M proteínas no retenida (0.5 M NR)
- d) Int 0.5 M proteínas retenidas eluidas con 1 M de α -D-manopiranosido (0.5 M R)

El perfil proteico SDS-PAGE al 7.5% y 15% con las cuatro fracciones mostró que las proteínas de alto peso molecular (50-250 kDa) son muy similares en la fracciones NR (0.3 y 0.5 M) y tienen una mayor complejidad proteica en comparación con las proteínas retenidas (R) en la columna, donde se observó menor cantidad de proteínas (Figura 20A).

El perfil proteico de bajo peso molecular mostró diferencias importantes en las fracciones NR y mayor complejidad proteica comparada con la fracción R donde solo se observaron 2 bandas (Figura 20B).

El análisis de actividad biológica mostró que las fracciones R tienen la mayor capacidad de opsonina siendo la de 0.5M R la que presentó mayor porcentaje de fagocitosis sin embargo las fracciones no retenidas también tiene opsoninas que inducen la fagocitosis en menor proporción (tabla 5, Fig 21). Esto sugiere que las opsoninas mayoritarias son manoproteina pero que otra proporción importante no lo son.

Ya que nuestro objeto de estudio es la identificación de las opsoninas que se unen a la pared del hongo se planteó el utilizar al conidio como un sistema de afinidad.

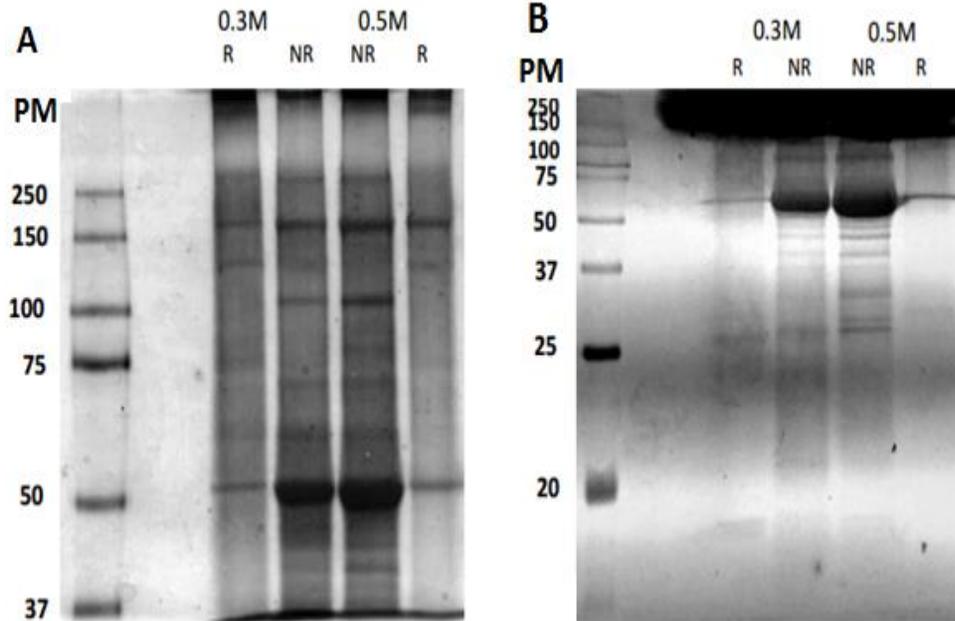


Figura 20 A) Perfil SDS-PAGE 7.5% (B) SDS-PAGE 15% de fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico (eluidas con NaCl 0.3 y 0.5 M) se trataron posteriormente en la columna ConA. Tinción con plata. Se utilizaron 10 µg de proteína para cada muestra. Para ambos geles el primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, los marcados con R corresponden a las muestras unidas a la columna con A, mientras que NR corresponde a las proteínas que no se unieron.

	NO	Suero	Int 0.3 NR	Int 0.3 R	Int 0.5 NR	Int 0.5 R
% Células que fagocitaron (%F)	-	30.8 ± 3.2	4.5 ± 1.9	8.2 ± 1.1	10.1 ± 2.3	19.7 ± 0.7
% Conidios fagocitados (%C)	-	5.9 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.8	1.1 ± 0.1	7.5 ± 0.4

Tabla 5 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las proteínas eluidas con 0.3 y 0.5 M con la columna intercambio iónico y posteriormente tratadas con la columna de ConA (cromatografía en batch). No opsonizado (NO), suero al 10% (Suero), Intercambio iónico (Int), Fracción retenida (R) Fracción no retenida (NR). Resultados mostrados restando el blanco (19.9 y 2.7% respectivamente).

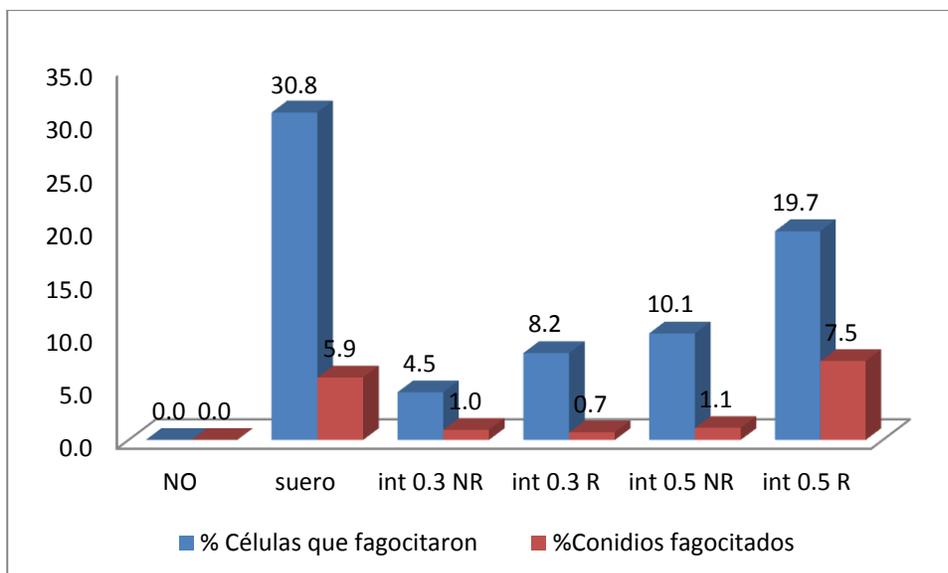


Figura 21 Gráfico de ensayo de fagocitosis retando los MΦ con las fracciones obtenidas con las proteínas eluidas con 0.3 y 0.5 M con la columna intercambio iónico y posteriormente tratadas con la columna de ConA.

Uso de conidios de *Sporothrix schenkii* como sistema de afinidad.

Para identificar las proteínas que se unen a los conidios y participan en la opsonización e internalización en los macrófagos, se decidió utilizar a los conidios de *S. schenkii* como sistema de afinidad. Las proteínas de la fracción 0.5M NaCl (intercambio iónico) se incubaron con los conidios, las proteínas que se unieron al hongo se probaron como opsoninas en ensayos de fagocitosis.

La opsonización con las PUC estimuló el proceso de fagocitosis y el número de conidios internalizados en forma similar al suero completo (tabla 6 y Figura 23).

El análisis de las PUC en geles SDS-PAGE al 7.5% y 15% teñidos con plata y con azul de Coomassie, mostraron que gran parte de la proteína se quedó retenida en el gel concentrador (resultado no mostrados) lo que sugirió que la proteína formó agregados. Por esta razón las PUC fueron tratadas con dos reductores diferentes (5% SDS más 10% de mercaptoetanol o 30 mM de TCEP*HCl) con la finalidad de desagregar las proteínas y permitir su entrada al gel separador. Como se observa en la figura 22, las proteínas tienen

un comportamiento diferente dependiendo del agente reductor con el que fueron tratadas; en la muestra tratada con 5% SDS - 10% de mercaptoetanol se observó un doblete con un peso superior a los 50 kDa, mientras que para las proteínas tratadas con TCEP*HCl se observaron de igual manera dos proteínas con PM superior a los 50kDa, pero con perfil diferente.

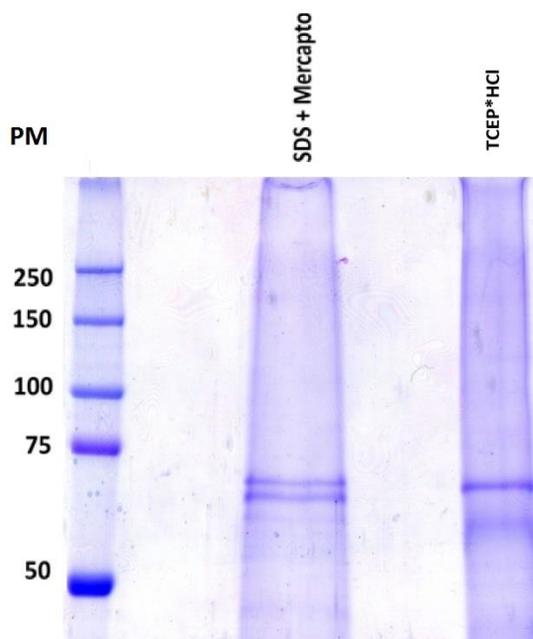


Figura 22 Perfil SDS-PAGE 7.5% de la PUC. Tinción con azul de Coomassie. Se utilizarón 20 µg de proteína para cada muestra. Primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, el carril marcado como SDS+ mercapto corresponde a la PUC tratada con 5% SDS + 10% de mercaptoetanol incubada 1 h a -20°C, el carril marcado como TCEP*HCl corresponde a la muestra tratada con 30 mM de TCEP*HCl.

	NO	Suero	20µg
% Células que fagocitaron (%F)	-	26.2 ± 0.9	32.6 ± 5.4
%Conidios fagocitados (%C)	-	13.1 ± 0.1	16.5 ± 1.0

Tabla 6 Porcentaje de células y conidios que participaron en el proceso de fagocitosis con las PUC. No opsonizado (NO), suero al 10% (Suero), 20 µg (PUC). Resultados mostrados restando el blanco (30.7 y 4.4% respectivamente).

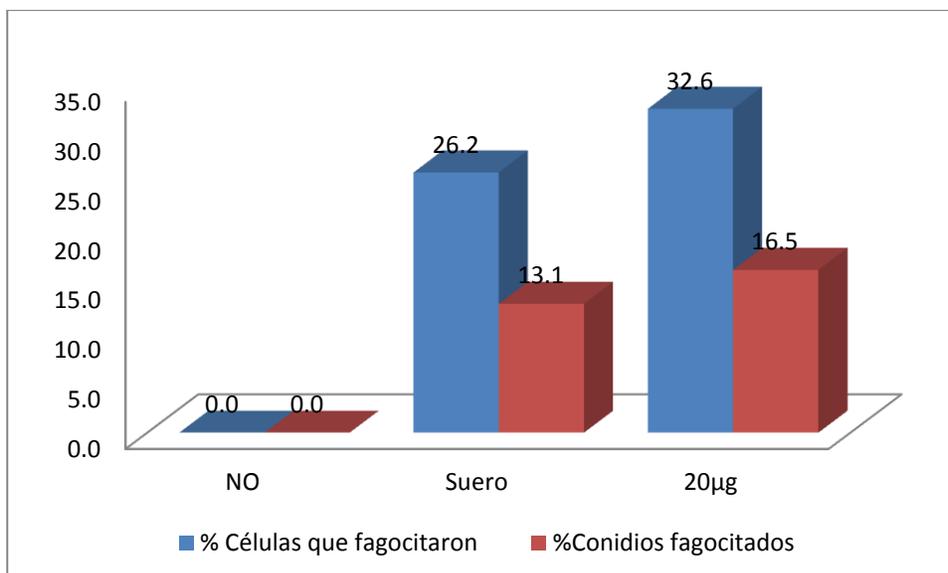


Figura 23 Gráfico de ensayo de fagocitosis retando los MΦ con 20µg de PUC.

Identificación mediante espectroscopia de masas (MS/MS) de las PUC.

Para identificar la o las proteínas séricas encargadas de opsonizar al conidio de *S. schenckii* se realizó un gel de poliacrilamida al 7.5% en el cual se colocaron 40µg de PUC por cada carril como se observa en la figura 24. Las PUC fueron tratadas con 5% SDS más 10% de mercaptoetanol e incubadas durante una hora a 4°C, las proteínas fueron identificadas y posteriormente cortadas para hacer su identificación mediante espectroscopia de masas (MS/MS); con los resultados obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo Paragon del software Protein Pilot identificando a la albúmina como principal componente de la muestra.

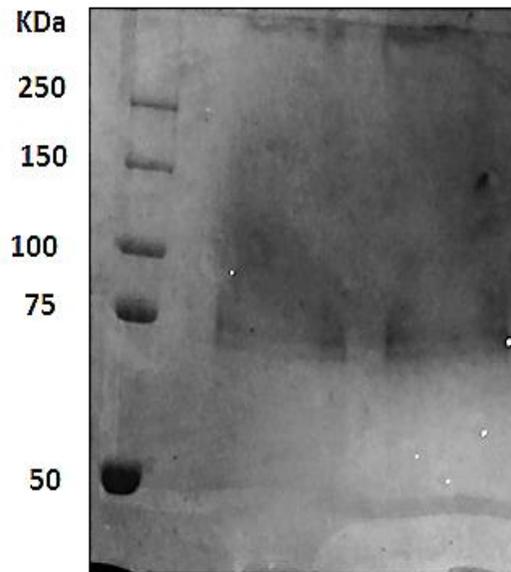


Figura 24 Perfil SDS-PAGE 7.5% de de la PUC. Se utilizarón 40µg de proteína para cada carril. Primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares, la muestra fue tratada con 5% SDS y 10% de mercaptoetanol. Tinción con azul de Coomassie.

Efecto de diferentes carbohidratos en la infección de *Mφ* con conidios de *S. schenckii* opsonizados con PUC.

Debido a que la identificación por MS/MS de las PUC solo arrojó la secuencia de la albúmina se decidió hacer un ensayo de competencia con manosa y otros carbohidratos para definir si el resultado de fagocitosis obtenido previamente al utilizar a las PUC como opsoninas presentaba otras proteínas además de la albúmina. Se utilizaron diversos azúcares con afinidad por el receptor MR como: L-fucosa, D-manosa y manopiranosido ; se usó galactosa porque no tiene sitio de unión al MR y sirvió como control negativo.

El ensayo de competencia mostró que manosa, fucosa y el manopiranosido inhiben la fagocitosis de los conidios opsonizados con las PUC lo que muestra que se encuentran presentes manoproteínas que no pudieron ser identificadas en SDS-PAGE.

En contraste con galactosa que el porcentaje de células que fagocitaron fue muy similar al obtenido con el control (conidios opsonizados con 20µg/µL de PUC), al no ser reconocido por MR (Ver tabla 7 y Figura 25).

	NO	20µg/µL	Mannosa	Fucosa	Manopiranosido	Galactosa
% Células que fagocitaron (%F)	-	32.7 ± 3.4	5.3 ± 0.8	9.3 ± 3.4	8.0 ± 0.8	30.3 ± 0.01
%Conidios fagocitados (%C)	-	7.7 ± 1.9	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	8.2 ± 1.6

Tabla 7 Ensayo de competencia usando diferentes azúcares para el bloqueo del MR (Mannosa, Fucosa y Mannopyranosido), la Galactosa se usó como control negativo y como control positivo la PUC (20µg/µL). Resultados mostrados restando el blanco (19.68 y 4.255% respectivamente).

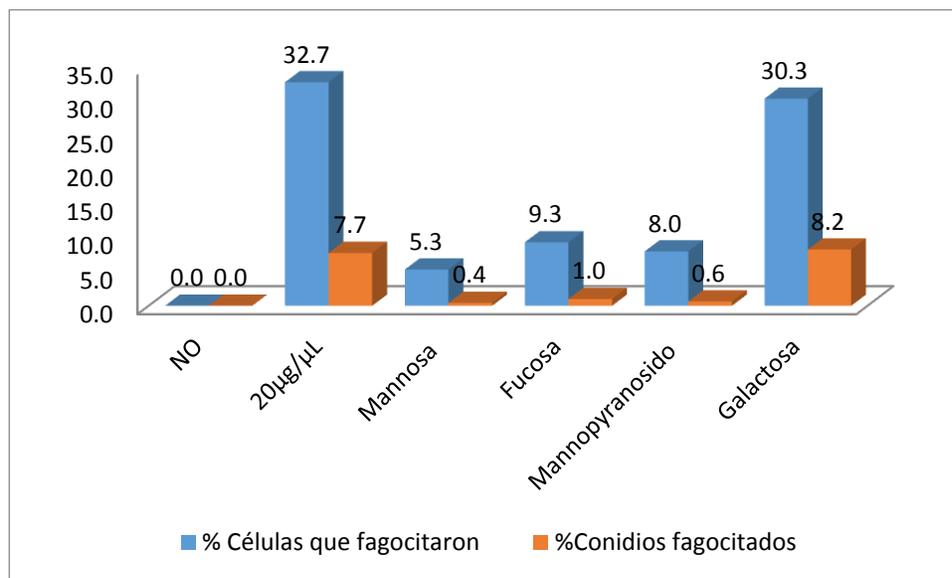


Figura 25 Gráfico de ensayo de fagocitosis bloqueando MR con diferentes carbohidratos (manosa, fucosa y manopiranosido), usando como control negativo (galactosa) y como control positivo PUC (20µg/µL).

Discusión

Sporothrix schenckii es un hongo patógeno cuya pared está compuesta de polímeros de carbohidratos donde se intercalan glicoproteínas. Los principales componentes encontrados en la mayoría de hongos importantes medicamente son β -glucanas (polímeros de glucosa), quitina (polímero de N-acetilglucosamina), y mananas (Levitz, 2010). Estos tres componentes están intercalados en la pared, la quitina tiende a estar más cerca de la membrana plasmática mientras que las mananas se encuentran principalmente en la parte externa de la pared celular (Hardison, *et al.* 2012). A pesar de que el conidio de *S. schenckii* tiene en la parte externa de su pared residuos de manosa, estos no son reconocidos eficientemente por el MR (Alba, *et al.* 2014) (Barreto, *et al.* 2014), a diferencia de otros hongos patógenos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Pneumocistis carinii* (Willment, *et al.* 2008) que son reconocidos eficientemente por el MR presente en las células del sistema inmune innato, promoviendo su fagocitosis y destrucción.

Se conoce poco sobre la participación del sistema inmune en respuesta a la infección por *S. schenckii*, sin embargo se sabe que las células del sistema inmune innato tienen un papel importante en el control del hongo. Estudios previos en el laboratorio mostraron que la fagocitosis del conidio y del blastoconidio (levadura) de *S. schenckii* se estimula cuando los hongos fueron opsonizados con proteínas sericas, en el caso del conidio con manoproteínas, mientras que los blastoconidios son opsonizados con la fracción C3 del complemento (Guzman, *et al.* 2012).

Múltiples componentes del suero humano están implicados en la opsonización del conidio favoreciendo el proceso de fagocitosis, se destaca la complejidad de esta interacción, ya que intervienen diversos factores como se evidencia con los resultados obtenidos empleando el fracciomaniento con cuatro técnicas: Cibacrom Blue, intercambio anionico, afinidad (ConA) y los conidios de *S. schenckii* como sistema de afinidad.

Por tanto, es posible que en la presencia de suero completo en niveles óptimos, favorezca significativamente la fagocitosis de los conidios previamente opsonizados, sin embargo existen algunos componentes (manoproteínas) implicados mayoritariamente en el

reconocimiento del conidio por parte de los MΦ humanos, no obstante recientes hallazgos demuestran que en la opsonización del conidio también están implicadas proteínas que carecen de residuos de manosa.

Del fraccionamiento con Cibacrom Blue se obtuvo inesperadamente que la fracción con un mayor índice de fagocitosis son los pertenecientes a la fracción Alb + (tabla 3 y Figura 16), Esto se puede deber a que la albúmina actúa como acarreador de otras proteínas de menor tamaño, como es el caso de algunas hormonas, citosinas y lipoproteínas (Radhakrishna, *et al.* 2003), aunque no solo proteínas de bajos pesos moleculares están implicadas en el proceso de opsonización, ya que el perfil de SDS-PAGE muestra proteínas con pesos moleculares inferiores a los 20 kDa y superiores a los 250 kDa, demostrando que más de un componente del SHP está implicado en el proceso de opsonización.

Los datos de intercambio aniónico (Tabla 4 y Figura 19) mostraron una distribución de proteínas en las 5 fracciones obtenidas viéndose favorecidas las fracciones eluidas con 0.3 y 0.5 M de NaCl. El perfil SDS-PAGE muestra que las proteínas presentes en estas fracciones comparten características en cuanto al número y peso molecular, esto se debe a que la columna separa a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico y afinidad a la columna. Al ser despegadas de la resina con concentraciones cercanas de NaCl las proteínas eluidas en el punto intermedio del fraccionamiento tendrán características muy similares y pueden tener proteínas en común, que son las que están favoreciendo la opsonización del conidio en ambos casos.

Para comprobar si las proteínas implicadas en la opsonización del conidio de *S. schenkii* eran únicamente manoproteínas, las fracciones se sometieron a un tratamiento con Con A, mostrando al menos un par de moléculas que se unen a la resina (manoproteínas), pero otro número importante de proteínas es eluido (Figura 20). Los datos de ConA también proporcionan pruebas de la participación de componentes con una variabilidad en cuanto a sus características fisicoquímicas y de pesos moleculares lo que complica sustancialmente la identificación de las proteínas implicadas en el proceso de opsonización. El ensayo de fagocitosis indica que las proteínas que favorecen la

opsonización del conidio son manoproteínas pero otro porcentaje es beneficiado por proteínas no manosiladas.

Las PUC forman interacciones entre si complicando su análisis, ya que estas tienden a formar agregados, las proteínas fueron tratadas con reductores diferentes, observando que al menos dos proteínas con pesos moleculares cercanos están implicadas en el proceso aunque estas tienen comportamientos diferentes dependiendo del agente reductor utilizado (Figura 22).

La opsonización con las PUC favorece el proceso de fagocitosis de manera similar a lo obtenido con el suero completo (Figura 23). El análisis de las proteínas unidas a PUC mediante espectrofotometría de masas indicó que la muestra tenía presente una sola proteína (albúmina), lo cual no corresponde con los resultados obtenidos en la electroforesis SDS-PAGE donde se mostraba un doblete (Figura 24). La identificación de la albúmina suena razonable si se considera que es la proteína más abundante en el SHP, sin embargo resultados previos obtenidos en el laboratorio indican que la albúmina no favorece la fagocitosis del conidio.

La posibilidad de que no todas las proteínas implicadas en la opsonización del conidio de *S. schenckii* se unan fuertemente al hongo o estén en una concentración muy baja es latente, lo que impidió lograr la purificación de las opsoninas.

Debido a la poca confiabilidad del resultado obtenido en la identificación por MS/MS de las PUC se realizaron ensayos de competencia con azúcares con afinidad a MR, donde se observa que el porcentaje de fagocitosis disminuye significativamente con respecto a los conidios opsonizados con las PUC, demostrando que la muestra tiene presente al menos una manoproteína que no pudo ser identificada. Por otro lado para demostrar que la muestra contiene proteínas no manosiladas que participan en la opsonización del conidio, el MR fue retado con galactosa (un carbohidrato no reconocido por el receptor), obteniendo un valor de fagocitosis muy similar al obtenido con el control (conidios opsonizados con PUC).

En el caso de *S. schenckii*, si bien es reconocido y fagocitado significativamente por el MR, se encontró que para su eliminación participa otro u otros receptores, ya que al

bloquear el MR con diferentes azúcares que compiten por el receptor, el porcentaje fagocitosis disminuye significativamente, pero la fagocitosis no se ve inhibida en su totalidad, indicando que los conidios son fagocitados mediante otro u otros receptores que pueden actuar independientemente o en colaboración con el MR.

El SHP es una mezcla muy compleja de moléculas, y muchas de estos no se han identificado en términos de su secuencia o función. Kondethimmanahalli C. *et al* 2009, reporta que la identificación de proteínas de suero humano depende de diversos factores como la concentración, la variabilidad entre individuos, la manipulación y el tratamiento, lo cual altera la fiabilidad y la reproducibilidad analítica. Esto, junto con la complejidad de la interacción con el conidio, hace que la identificación de las moléculas que participan sea una tarea difícil, lo que abre la pauta para producir una estrategia de purificación que permita además la resolución de sus componentes.

Conclusiones

- El suero humano es una muestra muy compleja, debido al elevado número de proteínas, la concentración y estabilidad de algunas de ellas, dificulta la identificación de algunos de sus componentes.
- Para lograr un enriquecimiento de las proteínas de SHP es necesario el uso de más de una técnica cromatográfica.
- La fagocitosis del conidio de *S. schenkii* se ve favorecida con la opsonización de múltiples componentes del SHP principalmente manoproteínas, aunque también hay participación de proteínas no manosiladas.
- El principal receptor en macrófagos humanos involucrado en la fagocitosis del conidio de *S. schenkii*, cuando esté esta opsonizado con manoproteínas séricas, es receptor de manosa.
- La fagocitosis del conidio esta mediada por más de un receptor fagocítico, el cual no requiere que el conidio este opsonizado, para incrementar su porcentaje de fagocitosis.

Referencias

1. Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M, Ruiz-Baca E. (2014). **Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents.** *Rev Iberoam Micol.* 31(1), 86-9.
2. Arenas R., **Micología Médica Ilustrada.** (1993). Mc Graw-Hill/Interamericana. México D.F.
3. Azad Abul K., Rajaram Murugesan V. S. y Schlesinger Larry S.(2014). **Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics.** *J Cytol Mol Biol.* 10; 1(1).
4. Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, Fernandes RK, Ikoma MR, Dias-Melicio LA, Oliveira SL, Soares ÂM. (2014). **Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1.** *Cytokine.* 67(1), 36-43.
5. Bergter, E., & Figueiredo, R. T. (2014). **Fungal glycans and the innate immune recognition.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 145. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00145>
6. Bastos de Lima Barros Mônica, de Almeida Paes Rodrigo, y Oliveira Armando. (2011). ***Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis.** *Clin Microbiol Rev.* 24(4): 633–654.
7. Blanco Jose L., Garcia Marta E. (2008). **Immune response to fungal infections.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125, 47–70.
8. Bonifaz, A. **Micología Médica Básica.** 2012. Editorial Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. México D.F.

-
9. Boyso Javier Oviedo, Ochoa Zarzosa Alejandra, López Meza Joel E., Valdez Alarcón Juan J. y Baizabal Víctor.(2005) **Interferencia molecular en la ruta de transducción de nf-kb por bacterias patógena.** REB 24 (1), 12-20.
 10. Brown D. **Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor.** Nature Reviews |Immunology 2006. Volume 6.
 11. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002). **Molecular Biology of the Cell.** 4th edition. New York: Garland Science; Innate Immunity.
 12. Campagne Menno van Lookeren, Wiesmann Christian and Brown Eric J. (2007). **Macrophage complement receptors and pathogen clearance.** Cellular Microbiology 9(9), 2095–2102.
 13. Charcosset, C. (1998), **Review: Purification of proteins by membrane chromatography.** J. Chem. Technol. Biotechnol., 71: 95–110.
 14. Christmas, P. (2010). **Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection.** Nature Education3(9), 85
 15. Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E y de Camargo ZP. (2013). **Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species.** Virulence. 1;4(3), 241-9.
 16. Fernandes Karla Simone S, Helal Neto Edward, Brito Marcelly M S, Silva João S, Cunha Fernando Q y Barja-Fidalgo Christina.(2008) **Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*.** Immunology. 123(4), 469–479.
 17. Fernandes KS, Coelho AL, Lopes Bezerra LM y Barja-Fidalgo C.(2000) **Virulence of *Sporothrix schenckii* conidia and yeast cells, and their**

-
- susceptibility to nitric oxide.** *Immunology.* 101(4), 563-9.
18. Flo T, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T. (2001). **Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells.** *J Leukoc Biol.* 69(3), 474-81.
19. Freeman SA, Grinstein S. (2014). **Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton.** *Immunol Rev.* 262(1), 193-215.
20. Gazi Umut, Martinez-Pomares Luisa. (2009). **Influence of the mannose receptor in host immune responses.** *Immunobiology* 214 554–561
21. Guzman-Beltran Silvia, Perez-Torres Armando, Coronel-Cruz Cristina, Haydee Torres-Guerrero. (2012) **Phagocytic receptors on macrophages distinguish between different *Sporothrix schenckii* morphotypes.** *Microbes and Infection* Volume 14,(12), 1093–1101.
22. Hardison, S. E., & Brown, G. D. (2012). **C-type Lectin Receptors Orchestrate Anti-Fungal Immunity.** *Nature Immunology*, 13(9), 817–822
23. immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol.* 4:145.
24. Janet A. Willment y Gordon D. **Brown C-type lectin receptors in antifungal immunity.** *Trends in Microbiology* 16:27-32 (2008)
25. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M. (2001). **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.** 5th edition. New York: Garland Science; Receptors of the innate immune system.
26. Karkowska-Kuleta J., Kozik A. (2015). **Cell wall proteome of pathogenic fungi.** *Acta Biochim. Pol.* 62, 339–351.
27. Kawai T, Akira S. (2011). **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.** *Immunity.* 34:637–650

-
28. Krisna C. Duong-Ly, Sandra B. Gabelli. (2014). **Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. Methods in Enzymology.** Volume 541: 86-94.
29. Levitz, S. M. (2010). **Innate Recognition of Fungal Cell Walls.** *PLoS Pathogens*, 6(4).
30. Lopes-Bezerra Leila M., Schubach Armando y Costa. (2006). ***Sporothrix schenckii* and sporotrichosis.** *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78(2).
31. Macedo-Ramos Hugo, Batista Andre F, Carrier-Ruiz Alvaro, Alves Lucineia, Allodi Silvana, Ribeiro-Resende Victor T, Teixeira Lucia M y Baetas-da-Cruz Wagner. (2014). **Evidence of involvement of the mannose receptor in the internalization of *Streptococcus pneumoniae* by Schwann cells.** *BMC Microbiology* 14, 211
32. Martínez-Álvarez JA, Pérez-García LA, Flores-Carreón A y Mora-Montes HM. (2014). **The immune response against *Candida spp.* and *Sporothrix schenckii*.** *Rev Iberoam Micol.* 31(1), 62-6.
33. May Robin C. y Machesky Laura M. (2011). **Phagocytosis and the actin cytoskeleton.** *Journal of Cell Science.* 114, 1061-1077
34. Medzhitov R. (2007). **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature.* 18;449(7164), 819-26.
35. Minh Dang Nguyen, Jean-Pierre Julien y Serge Rivest. (2002). **Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?** *Nature Reviews Neuroscience.* 3, 216-227.
36. Murphy K., Travers P. y Mark W. **Inmunobiologia de Janeway.** 2009. McGraw-Hill. 7ª Ed.

-
37. Negrini Thais de C., Ferreira Lucas S., Alegranci Pamela, Arthur Rodrigo A., Sundfeld Pedro P., Maia Danielle C. G., Spolidorio Luis C. y Carlos Iracilda Z. (2013). **Role of TLR-2 and Fungal Surface Antigens on Innate Immune Response Against *Sporothrix schenckii***. *Immunological Investigations*. 42(1), 36–48.
38. Netea, M. G., Gow, N. A. R., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Kullberg, B. J. (2006). **Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors**. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1642–1650.
39. Nicola AM, Casadevall A, Goldman DL. (2008). **Fungal killing by mammalian phagocytic cells**. *Curr Opin Microbiol* 11(4), 313-7.
40. Oliveira MM, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC y Zancoppe-Oliveira RM. (2014). **Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex**. *Rev Iberoam Micol*. 31(1), 2-6.
41. Petnicki-Ocwieja T, Kern A. (2014). **Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* internalization and intracellular innate immune signaling**. *Front Cell Infect Microbiol*. Dec 15;4 175.
42. Porcaro I1, Vidal M, Jouvert S, Stahl PD, Giaimis J. (2003). **Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages**. *J Leukoc Biol*. 74(2), 206-15.
43. Rappleye Chad A. y Goldman William E. (2006). **Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi**. *Annual Review of Microbiology* 60, 281-303.
44. Rappleye Chad A. y Goldman William E. (2006). **Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi**. *Microbiol*. 60, 281-303.
45. Rodrigues AM, Kubitschek-Barreira PH, Fernandes GF, de Almeida SR, Lopes-Bezerra LM, de Camargo ZP. (2014). **Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii***

complex. J Proteomics. 6; 115, 8-22.

46. Romani L. (2004). **Immunity to fungal infections.** Nature Reviews Immunology 4, 11-24.
47. Romani L. (2011). **Immunity to fungal infections.** Nature Rev Immunology. 11(4):275-88.
48. Romeo O, Scordino F, y Criseo G. (2011). **New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates.** Mycopathologia. 172(3), 179-86
49. Sassá MF, Saturi AE, Souza LF, Ribeiro LC, Sgarbi DB, Carlos IZ. (2009). **Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis.** Immunology. 128(2), 301-9.
50. Sassá Micheli F, Saturi Ana E T, Souza Lucas F, de Abreu Ribeiro Livia C, Diana B da Graça Sgarbi y Carlos Iracilda Z. (2009). **Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis.** Immunology. 128(2), 301–309.
51. Spencer Freeman A. Grinstein Sergio.(2014). **Phagocytosis: receptors, signalintegration, and the cytoskeleton.** Immunological. Reviews 262, 193–215
52. Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H-H., Brown G.D, y Gordon S. (2005). **Macrophage receptors and immune recognition.** Annual Review of Immunology. 23, 901-944
53. Téllez MD, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R y Carlos IZ. (2014). ***Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity.** Microbiology.160(11), 2352-65.

-
54. Underhill David M. y Goodridge Helen S. (2012). **Information processing during phagocytosis**. Nature Reviews Immunology 12, 492–502
55. Voet Donal, Voet Judith G. (2004). **Biochemistry**. 3er edition. Editorial médica panamericana.
56. Zhao Xiaoheng, Lichun Liu, Abeer M. Hegazy, Hong Wang, Jie Li, Feifei Zheng, Yang Zhou, Weimin Wang, Jun Li. (2015). **Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca²⁺ dependent manner**. Fish & Shellfish Immunology. 43, 2, 357–363.
57. Zimmer J, Hobkirk J, Mohamed F, J. Browning M y M. Stover C. (2015) **On the functional overlap between complement and anti-microbial peptides**. Immunol., 19.

Anexo 1

Tinciones

Reactivos

1. Tinción de Giemsa

Kariomax

Na₂HPO₄ 0.44g

KH₂PO₄ 0.55g

Llevar a un volumen final de 1L con agua destilada.

Giemsa 1:15

Giemsa 1 mL

Kariomax 14 mL

Mezclar y filtrar dos veces papel Whatman No 1.

Eosina 1:4

Eosina 1mL

Etanol 3 mL

Al terminar la incubación de los MO con los conidios, se retiró el medio, se lavaron con PBS 1x, se fijaron con metanol por 1 minuto, se lavaron nuevamente con PBS 1X (10 veces). Se incubaron a 4°C por dos horas, se retiró el PBS. Se incubaron de 3 a 5 min con eosina 1:4, se enjuago ligeramente con agua, se incubaron de 20 a 30 min con giemsa 1:15. Se lavaron con agua y se dejaron secando toda la noche.

2. Tinción de plata.

Plata 20%

(AgNO₃) 2g

Llevar a 10 mL con agua destilada.

Etanol 30% más Ácido acético 30%

Etanol 30 mL

Ácido acético 30 mL

Llevar a 100 mL con agua destilada.

Solución reveladora con plata

Solución de plata al 20% 0.5 mL

Agua destilada 20 mL

Solución de carbonato de calcio

CaCO₃ 2.5 g

Llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

El gel se dejó incubando toda la noche en 100 mL de una solución de etanol al 30% y 10% de ácido acético, posteriormente se realizaron dos lavados de 30 min con etanol al 30% y 2 lavados de 10 min con agua destilada, después de los lavados se incubó durante 1h con la solución reveladora con plata, nuevamente se realizaron dos lavados de 1 min con agua destilada, para detener la reacción, se incubó con una solución de ácido acético al 1% durante al menos 10 min, posteriormente se lavó con agua destilada.

Tinción de Coomassie.

Solución de fijación para Coomassie.

Metanol 40%

Ácido acético 10%

Solución de azul de Coomassie.

Etanol 30%

Ácido acético 10%

Azul de Coomassie 0.2%

Solución de desteñido

Metanol 50%

Ácido acético 2%

Al termina la electroforesis el gel se lavó 3 veces con agua destilada (10 min cada uno) para fijar el gel se incubó durante 30 min en una solución de fijación para Coomassie, se retiró la solución de fijación y se añadió la solución de azul de Coomassie se dejó actuar durante 2h y posteriormente se retiró la solución y destiñó con la solución de desteñido por 2h o el tiempo necesario para obtener la intensidad deseada de las bandas, haciendo cambios de solución de desteñido cada hora.

Anexo 2

Electroforesis

Buffer de corrida para PAGE

Glicina 14.4 g

Trizma base 3.1g

SDS 1 g

Llevar a 1000 mL con agua destilada

Acrilamida 30%

Acrilamida 30g

BIS 0.8g

Llevar a 100 mL y filtrar.

SDS10%

SDS 1 g

Llevar a 10 mL con agua

APS 10%

APS 1 g

Llevar a 10 mL con agua

Tabla 8 Gel superior de poliacrilamida con SDS.

	7.5%	10%	12%	15%
H2O	4.8 mL	4.0 mL	3.3 mL	2.3 mL
30% Acrilamida	2.5 mL	3.3 mL	4.0 mL	5.0 mL
1.5M Tris (pH8.8)	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10%SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
10% APS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL	0.004 mL	0.004 mL

Anexo 3

SOLUCIONES PARA COLUMNAS

Cibacrom Blue

Solución de lavado para Cibacrom Blue (0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

Diluir 1 volumen de TRIS 1M por cada 100 mL de agua destilada ajustar pH con HCl.

Buffer para Cibacrom Blue

NaCl 87.66 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Econopac Q

Solución de lavado para Econopac Q (0.1 M NaCl + 0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

NaCl 5.84 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Solución de lavado para Econopac Q (0.3 M NaCl + 0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

NaCl 17.53 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Solución de lavado para Econopac Q (0.5M NaCl + 0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

NaCl 29.22 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Solución de lavado para Econopac Q (0.7M NaCl + 0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

NaCl 40.90 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Solución de lavado para Econopac Q (1 M NaCl + 0.01 M Tris HCl pH 7.5-8.0)

NaCl 58.44 g

TRIS1M 10 mL

Llevar a 1000 mL con agua destilada ajustar pH con HCl.

Columna Con A

Acetato de sodio 1 M pH 6.5

Acetato de sodio 41 g

Se mide el pH y se lleva a un pH de 6.5 con ácido acético y después se lleva a un volumen final de 500 mL.

Acetato de sodio 0.1 M pH 6.5

Acetato de sodio 4.1 g

Se mide el pH y se lleva a un pH de 6.5 con ácido acético y después se lleva a un volumen final de 500 mL, se pasa por un filtro de 0.22 µm.

Solución de lavado columna Con A

NaCl 1 M,

MgCl₂ 5 mM

MnCl₂ 5 mM

CaCl₂ 5 mM

TRIS 1 M

Trizma (hydrochloride) 157.6 g

Se llevan a un volumen final de 1L con agua destilada.

TRIS 20 mM

Diluir 1 volumen de TRIS 1 M por cada 49 de agua destilada.

Anexo 4

SOLUCIONES Y MEDIOS

PD para conidios

Extracto de levadura	1 g
Peptona	1.5 g
Dextrosa	5 g
Agar	10 g

Llevar a volumen final de 500 mL con agua destilada, solubilizar y esterilizar en autoclave a 121°C/ 20 psi por 20 minutos.

PBS 1X

NaCl	4 g
KCl	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.12 g
Na ₂ HPO ₄	0.72 g

Se mide el pH y se lleva a pH7.2 y después se lleva a un volumen final de 500mL, se pasa por un filtro del N°1 y se esteriliza en autoclave a 121°C/ 20 psi por 20 minutos.

RPMI

Hepes	5 mL
Piruvato de sodio	5 mL
L-glutamina	5 mL
Antibiótico/ Antimicótico	5 mL
2-mercaptoetanol	2 µL

Llevar un pH 7.1-7.2 y finalmente a un volumen final de 500mL con medio RPMI-1640.

RPMI suplementado

Hepes	5 mL
Piruvato de sodio	5 mL
L-glutamina	5 mL
Antibiótico/ Antimicótico	5 mL
2-mercaptoetanol	2 μ L
Suero fetal bovino	50 mL

Llevar un pH 7.1-7.2 y finalmente a un volumen final de 500 mL con medio RPMI-1640.

Buffer de lisis de macrófagos.

NaCl 20 mM

Tris 20 mM

EDTA 50 mM

Triton 0.5%

Inhibidor de proteasas 10 μ L

Inhibidor de fosfatasas 10 μ L

Llevar a volumen de 1 mL con agua inyectable.

Solución A´ (cuantificación de proteínas)

20 μ L de reactivo S por 1 mL de reactivo A

Fucosa 1 M

Fucosa 1.64 g

Llevar a 10 mL con agua destilada

D- Galactosa 1M

D- Galactosa 1.80 g

Llevar a 10 mL con agua destilada

D- (+)- Mannosa 1M

D- (+)- Mannosa 1.80 g

Llevar a 10 mL con agua destilada

Methyl- α -D-mannopyranosido

Methyl- α -D-mannopyranosido 1.94g

Llevar a 10 mL con agua destilada

α -D-MANNOPYRANOSE 1M

α -D-mannopyranose 9.7 g

Llevar a volumen final de 50 mL con buffer de acetato de sodio 0.1 M.

α -D-MANNOPYRANOSE 200mM

Diluir un volumen de α -D-mannopyranose 1M por cada 4 volúmenes de buffer de acetato de sodio 0.1 M.