



---

---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Obtención de una construcción genética para  
generar una cepa de *Candida glabrata* SSK1 $\Delta$**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**SÁNCHEZ LEMUS JOSÉ DE JESÚS**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar**

**M. en C. Natalee Carapia Minero**



Ciudad de México, 2016.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología General y Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar y la M. en C. Natalee Carapia Minero.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos:

- SIP20143966 Análisis estructural *in vitro* de la biopelícula formada por *Aspergillus sp* y *Staphylococcus aureus*.
- SIP20151150 Caracterización de hongos y análisis de la interacción con bacterias de importancia clínica

# I. ÍNDICE GENERAL

<b>Índice general</b>	<b>ii</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>vi</b>
<b>Resumen</b>	<b>vii</b>
1 Introducción	1
1.1 <i>Candida glabrata</i>	5
1.2 Epidemiología	6
1.3 Patogenia	7
1.4 Sistema de transducción de señales de dos componentes	8
1.5 Las proteínas reguladoras de respuesta	11
1.6 La proteína Ssk1 en levaduras	13
1.7 Antecedentes	14
2 Justificación	15
3 Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4 Esquema general de trabajo	17
5 Materiales y métodos	18
5.1 Material biológico	18
5.2 Obtención de DNA genómico de <i>C. glabrata</i> CBS138	18
5.3 Obtención y caracterización de DNA plasmídico pTEF1/Zeo	19
5.4 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i>	20
5.5 Diseño de iniciadores y obtención de los fragmentos que flanquean río arriba y río abajo al gen <i>SSK1</i> y del gen marcador que codifica para la resistencia a zeocina	20
5.6 Obtención de una construcción genética por la técnica de PCR de doble fusión	22

5.7	Clonación de la construcción genética	23
5.8	Ensayos de estrés oxidativo, osmótico y susceptibilidad a zeocina en <i>C. glabrata</i>	24
6	Resultados	25
6.1	Cultivo de <i>Candida glabrata</i> CBS138	25
6.2	Análisis <i>in silico</i> del gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i>	25
6.3	Extracción de DNA genómico de <i>C. glabrata</i>	30
6.4	Extracción del DNA plasmídico pTEF1/Zeo	30
6.5	Obtención de los fragmentos que flanquean al gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i> y del cassette de resistencia a zeocina	31
6.6	Obtención de una construcción genética por la técnica de PCR de doble fusión	33
6.7	Clonación de la construcción genética	35
6.8	Ensayos de estrés oxidativo, osmótico y susceptibilidad a zeocina en <i>C. glabrata</i>	36
7	Discusión	40
8	Conclusiones	48
9	Perspectivas	49
10	Bibliografía	50
11	Apéndice	56

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Formas clínicas de la candidosis	1
<b>Figura 2</b>	Árbol filogenético que representa la relación de <i>Candida</i> spp. con algunos hongos hemiascomycetes	3
<b>Figura 3</b>	Relación filogenética entre <i>C. glabrata</i> , <i>C. braccariensis</i> y <i>C. nivariensis</i>	3
<b>Figura 4</b>	Morfología microscópica de <i>C. glabrata</i>	5
<b>Figura 5</b>	Morfología colonial de <i>C. glabrata</i>	5
<b>Figura 6</b>	Esquema general del sistema de dos componentes en levaduras, bajo condiciones de no estrés	10
<b>Figura 7</b>	Esquema general del sistema de dos componentes en levaduras, bajo condiciones de estrés osmótico.	10
<b>Figura 8</b>	Esquema general de la función de una proteína reguladora de respuesta en los procesos biológicos	12
<b>Figura 9</b>	Morfología colonial de <i>C. glabrata</i> CBS138 en medio YPD sólido	25
<b>Figura 10</b>	Representación gráfica del dominio regulador de respuesta la proteína Ssk1 de <i>C. glabrata</i>	27
<b>Figura 11</b>	Grado de ordenamiento en la proteína Ssk1 de <i>C. glabrata</i>	27
<b>Figura 12</b>	Interacción de la proteínas Ssk1 de <i>C. glabrata</i> y de <i>S. cerevisiae</i> con otras proteínas de la vía HOG1	28
<b>Figura 13</b>	Análisis filogenético de las diferentes especies reportadas con una proteína Ssk1 en Genolevures	29
<b>Figura 14</b>	Electroferograma del DNA de <i>C. glabrata</i> en agarosa al 1%	30
<b>Figura 15</b>	Perfil de restricción del plásmido pTEF1/Zeo con EcoRI y PvuI en agarosa al 1%	30
<b>Figura 16</b>	Electroferograma del gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i> en agarosa al 1%	31
<b>Figura 17</b>	Electroferograma de los fragmentos que flanquean al gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i> en agarosa al 1%	32
<b>Figura 18</b>	Electroferograma del cassette de resistencia a zeocina en agarosa al 1%	32
<b>Figura 19</b>	Electroferograma del producto de la PCR de doble fusión en agarosa al 0.8%	33

<b>Figura 20</b>	Electroferograma de los fragmentos sometidos a la reacción de PCR de doble fusión y el producto de la misma en agarosa al 0.8%	34
<b>Figura 21</b>	Electroferograma del producto de la clonación en el plásmido pJET1.2/blut en agarosa al 0.8%	35
<b>Figura 22</b>	Ensayos de estrés osmótico en <i>C. glabrata</i> CBS138	36
<b>Figura 23</b>	Ensayos de estrés oxidativo en <i>C. glabrata</i> CBS138	37
<b>Figura 24</b>	Ensayos de susceptibilidad en <i>C. glabrata</i> CBS138 a diferentes concentraciones de zeocina en medio YPD sólido	38
<b>Figura 25</b>	Ensayos de susceptibilidad de <i>C. glabrata</i> CBS138 a diferentes concentraciones de zeocina en medio YPD líquido	39
<b>Figura 26</b>	Representación esquemática de la activación alterna a Ssk1p de la vía HOG1 en <i>S. cerevisiae</i>	41
<b>Figura 27</b>	Esquema de la interrupción de un gen mediante recombinación homóloga	45
<b>Figura 28</b>	Vías de adaptación a estrés oxidativo de <i>C. glabrata</i>	47

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Incidencia de <i>Candida</i> en pacientes de la Fundación para la Lucha de las Enfermedades Neurológicas de la Infancia. Buenos Aires Argentina	2
<b>Tabla 2</b>	Comparación fenotípica y genotípica entre <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
<b>Tabla 3</b>	Genes implicados en la patogenicidad y virulencia de <i>C. glabrata</i> .	7
<b>Tabla 4</b>	Programa de PCR utilizado para la amplificación de los fragmentos flanqueantes al gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i> y del cassette de resistencia a zeocina del plásmido pTEF1/Zeo	21
<b>Tabla 5</b>	Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen <i>SSK1</i> de <i>C. glabrata</i>	21
<b>Tabla 6</b>	Preparación de la reacción de PCR de doble fusión para la obtención de una construcción genética	22
<b>Tabla 7</b>	Programa utilizado para la reacción de PCR de doble fusión.	22
<b>Tabla 8</b>	Preparación de la mezcla de ligación de la construcción genética en plásmido pJET1.2/blunt	23
<b>Tabla 9</b>	Características del gen y de la proteína Ssk1	25
<b>Tabla 10</b>	Aminoácidos presentes en la proteína Ssk1 de <i>C. glabrata</i>	26

## IV. RESUMEN

*Candida glabrata* actualmente es el segundo agente aislado más frecuentemente de infecciones superficiales e invasivas causadas por levaduras, después de *Candida albicans*, y presenta una resistencia innata a los derivados azólicos. El estudio de los sistemas de transducción de señales de dos componentes en hongos, ha revelado su participación en la respuesta a estrés ambiental y en la activación de diversos factores de virulencia.

El estudio del gen *SSK1* que codifica para la proteína reguladora de respuesta *Ssk1* en *C. glabrata*, permitirá comprender la participación de ésta en la adaptación a diferentes condiciones de estrés ambiental. Para lo cual, se realizó un análisis *in silico* del gen *SSK1* y de la proteína, el cual mostró que la proteína cuenta con un dominio tipo REC, ya descritos en los reguladores de respuesta. El análisis en la plataforma STRING 10 mostró que la *Ssk1p* puede interactuar con las proteínas de la vía HOG1 con las que hasta el momento no se había descrito una interacción directa. La plataforma MetaDisorder permitió observar el grado de ordenamiento en la estructura de la *Ssk1p*, observando que la región más ordenada correspondió a la zona del dominio REC. El análisis en el programa Mega reveló que la homología de la *Ssk1p* de *C. glabrata* es mayor con las especies de levaduras que se encuentran en su mismo clado como *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*. Se diseñaron iniciadores específicos para la obtención de dos fragmentos de un tamaño de 400 pb pertenecientes a las regiones río arriba y río abajo que flanquean al gen *SSK1* de *C. glabrata*. Igualmente se diseñaron los iniciadores que permitieron amplificar el cassette de resistencia a zeocina del plásmido pTEF1/Zeo. Posteriormente se evaluaron las condiciones adecuadas para fusionar estas tres secuencias mediante la técnica de PCR de doble fusión. La cepa de referencia de *C. glabrata* fue sometida a ensayos de adaptación a estrés osmótico y oxidativo con el fin de observar su efecto sobre el crecimiento. Así también, se evaluó la susceptibilidad a diferentes concentraciones de zeocina en medio sólido y líquido para determinar la concentración mínima inhibitoria que permitirá posteriormente seleccionar a las colonias transformantes.



# 1. INTRODUCCIÓN

Las micosis oportunistas son aquellas infecciones causadas por hongos que normalmente habitan como saprobios del ambiente, y se ven afectados individuos que presentan algún tipo de inmunosupresión (Arenas, 2008).

La candidosis es una micosis causada por levaduras oportunistas del género *Candida*, se presenta de forma localizada, diseminada o sistémica y se pueden ver afectadas mucosas, piel y órganos internos. Su incidencia ha aumentado en los últimos 30 años. De manera general abarcan un 7.45% del total de las micosis reportadas mientras que entre las micosis superficiales abarcan un total del 25% (Arenas, 2008).

Las causas predisponentes se agrupan en:

- Locales: Heridas, mala higiene, quemaduras etc.
- Fisiológicas: Embarazo, diabetes etc.
- Edad: Recién nacidos y ancianos.
- Alteración de la biota normal: Uso prolongado de antimicrobianos.
- Enfermedades debilitantes: Cáncer, SIDA, neutropenia, agammaglobulinemia etc.
- Factores iatrogénicos: Uso prolongado de corticosteroides, radioterapia, trasplantes, cirugías, uso de catéteres, hemodiálisis, prótesis, etc.

(del Palacio *et al.*, 2009).

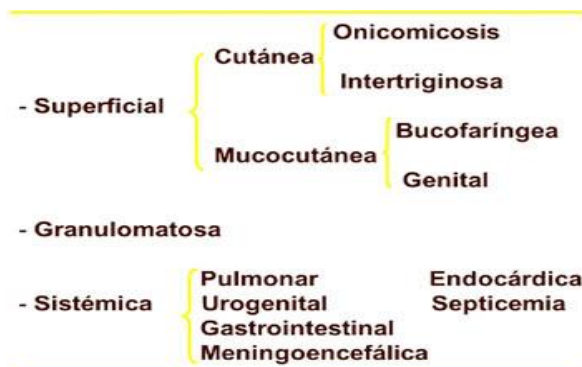


Figura 1: Formas clínicas de la candidosis.

Tomado de:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>

El agente asilado principalmente de este tipo de infecciones es *Candida albicans*, pero existen otras especies como: *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, etc (del Palacio *et al.*, 2009).

*Candida* spp., son levaduras con un tamaño de 2-6 x 3 -9 µm que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies son capaces de formar pseudomicelio; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además pueden formar hifas (Vázquez y Sobel, 2011).

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Tabla 1) (Vazquez y Sobel, 2011).

**Tabla 1: Incidencia de *Candida* en pacientes de la Fundación para la Lucha de las Enfermedades Neurológicas de la Infancia. Buenos Aires Argentina**

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	139	43.30
<i>C. tropicalis</i>	79	24.61
<i>C. glabrata</i>	26	8.10
<i>C. parapsilosis</i>	19	5.92
<i>C. krusei</i>	5	1.56
<i>Candida</i> spp.	45	14.02
<i>C. guilliermondii</i>	1	0.31
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	3	0.93
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	3	0.93
<i>C. albicans</i> + <i>Candida</i> spp.	1	0.31

Tomado de: Cornistein *et al.*, 2012.

Mientras que *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* guardan una estrecha relación filogenética. *C. glabrata* se encuentra más relacionada con *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 2), además de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* como lo indican estudios recientes (Fig. 3) (Gabaldón *et al.*, 2013).

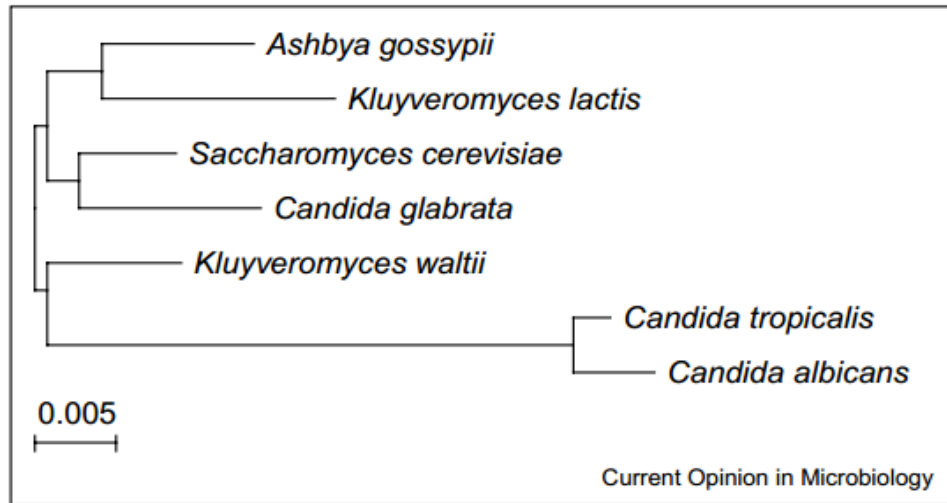


Figura 2: Árbol filogenético obtenido de las secuencias del gen 18S rDNAs de *Candida* spp. y otros hemiascomycetes, utilizando el programa ClustalW. Se muestra la estrecha relación filogenética entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae* y su poca relación con las otras especies patógenas de *Candida* (Kaur *et al.*, 2005).

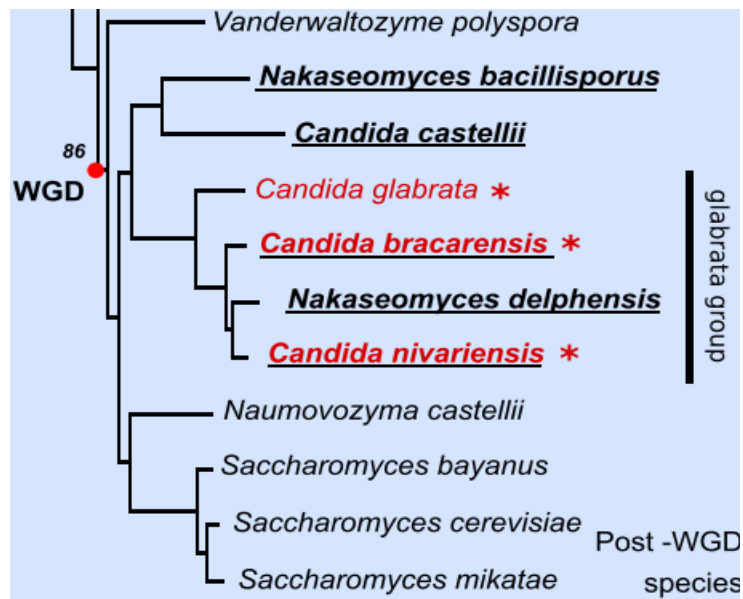


Figura 3: Relación filogenética entre *C. glabrata*, *C. bracariensis* y *C. nivariensis*.

Tomado de: Gabaldón *et al.*, 2013.

Sin embargo a diferencia de *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, ha evolucionado para sobrevivir en huéspedes mamíferos y esto se ve reflejado en algunas de sus características (Tabla 2), entre las que destacan la presencia de genes para la producción de adhesinas, resistencia a antifúngicos, resistencia a estrés nutricional y ambiental (Dujon *et al.*, 2004; Roetzet *et al.*, 2010).

**Tabla 2: Comparación fenotípica y genotípica entre *C. glabrata*, *C. albicans* y *S. cerevisiae***

<b>Característica</b>	<b><i>C. glabrata</i></b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b>
<b>Ploidía</b>	Haploide	Diploide	Diploide
<b>Virulencia</b>	Oportunista	Oportunista	No patógeno
<b>Sitios de mayor infección</b>	Oral, Vaginal, Diseminación	Oral, Vaginal, Diseminación	No infeccioso
<b>Genes de apareamiento</b>	Presentes	Presentes	Presentes
<b>Ciclo sexual</b>	Desconocido	Conocido (Ciclo parasexual)	Conocido
<b>Cambio fenotípico</b>	Presente	Presente	Ausente
<b>Hifas verdaderas</b>	Ausente	Presente	Ausente
<b>Seudohifas</b>	Ausente	Presente	Presente
<b>Formación de biopelícula</b>	Presente	Presente	Presente
<b>Adhesinas principales</b>	Lectinas, Epas	Lectinas, Hwp1, Als	Lectinas, Aglutininas
<b>Auxotrofía</b>	Niacina, Tiamina, Piridoxina	No	No
<b>Resistencia a azoles</b>	Innata	Susceptible	Susceptible

Tomado de: Kaur *et al.*, 2005.

## 1.1 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* fue considerada como un no patógeno, saprobio de la microbiota de individuos sanos. Sin embargo tras el aumento de las terapias inmunosupresoras junto con las terapias antimicóticas de amplio espectro, la frecuencia de infecciones causadas por *C. glabrata* ha aumentado significativamente (Fidel *et al.*, 1999).

*C. glabrata* forma colonias lisas de consistencia blanda de color crema, son incapaces de formar hifas, como máximo, pueden formar una cadena corta de levaduras ovoides. La gemación es multilateral, no produce cápsula, y tampoco se han descrito esporas sexuales. Se trata de una levadura haploide, a diferencia de *C. albicans* (Torres-Rodríguez, 2008). Los blastoconidios de esta levadura son considerablemente más pequeños, midiendo de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , respecto a los de *C. albicans* que miden de 4 a 6  $\mu\text{m}$  (Fidel *et al.*, 1999).

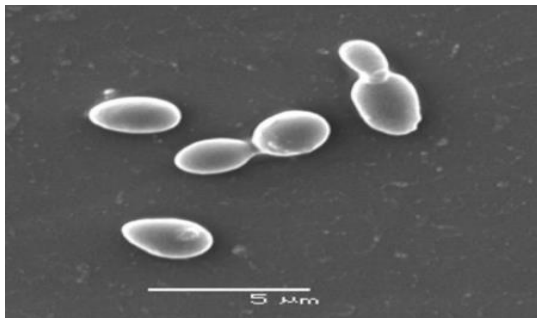


Figura 4: Morfología microscópica de *C. glabrata*.

Tomado de: Ahmad *et al.*, 2014.



Figura 5: Morfología colonial de *C. glabrata* CBS138.

*C. glabrata* no es capaz de asimilar el inositol y no posee pigmento carotenoide. Es inhibida por la cicloheximida al 0.01%. Su temperatura máxima de crecimiento está entre 43-45 °C y la temperatura óptima para las cepas de origen clínico está entre 35-37 °C. Solamente fermenta la glucosa y la  $\alpha$ -trealosa (Torres-Rodríguez 2008). Presenta auxotrofía a niacina, tiamina y piridoxina y presenta una resistencia innata a los derivados azólicos (Kaur *et al.*, 2004; 2005).

El genoma de *C. glabrata* CBS138 tiene un tamaño de 12.3 Mb, con un contenido de G+C de 38.8% y consta de 13 cromosomas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M) organizados en dos loci diferentes. Hay aproximadamente 5283 genes codificantes, y 207 genes de tRNA (URL1).

*C. glabrata* comparte un ancestro común con varias especies de *Saccharomyces*, y pertenece a un clado diferente de *Candida* spp. Como parte de esta relación evolutiva la mayoría de los genes de *S. cerevisiae* guardan una homología con los genes de *C. glabrata*. Otras características comunes incluyen, una respuesta a estrés similar y un metabolismo respiratorio caracterizado por la ausencia del complejo I. A pesar de las semejanzas generales, también existen diferencias respecto a la ausencia de algunos genes involucrados en el metabolismo de la galactosa y de compuestos nitrogenados, fosfatados y sulfurados (Roetzer *et al.*, 2011).

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Un estudio realizado en la universidad de Malaya en Malasia, del año 2000 al 2013, utilizando diferentes muestras clínicas (exudados vaginales, esputo, exudados nasofaríngeos, secreciones traqueales, lavados broncoalveolares, orina, sangre, exudados bucales, faríngeos y muestras de pus) lograron obtener 34,392 aislados correspondientes a *Candida* spp. Se identificaron 16 especies, de las cuales la más predominante fue *C. albicans* (66.70%), seguida de *C. glabrata* (11.71%) (Ng *et al.*, 2015).

*C. glabrata* puede ser aislada comúnmente como microbiota normal de los siguientes sitios corporales:

- Cavidad oral
- Tracto genitourinario
- Tracto gastrointestinal
- Tracto respiratorio

Las infecciones causadas por esta levadura son más frecuentes en ancianos e inmunocomprometidos y es conocida como un agente importante en infecciones del tracto urinario, de hecho el 20% de las infecciones urinarias causadas por levaduras se le atribuyen a *C. glabrata*. Los casos más graves de infección incluyen casos raros de endocarditis, meningitis e infecciones diseminadas (URL 2).

### 1.3 PATOGENIA

Importantes factores de virulencia que están presentes en *C. albicans*, tales como la formación de hifas verdaderas, están ausentes en *C. glabrata*, sin embargo, se ha adaptado para convertirse en un patógeno humano exitoso. Ya que posee múltiples factores de virulencia y de resistencia a fármacos (Tabla 3).

**Tabla 3: Genes implicados en la patogenicidad y virulencia de *Candida glabrata***

<b>Genes</b>	<b>Función</b>
<b>Familia de genes EPA</b>	Adherencia, colonización de órganos, formación de biopelícula
<b>Familia de genes YPS</b>	Colonización de órganos
<b><i>ACE2</i></b>	Factor de hipervirulencia
<b><i>ARO8</i></b>	Pigmentación, estrés oxidativo
<b><i>CTA1</i></b>	Estrés oxidativo
<b><i>ATG11, ATG17</i></b>	Supervivencia en fagocitos
<b><i>PDR1</i></b>	Resistencia a azoles
<b><i>CDR1, CDR2, SNQ2</i></b>	Resistencia a azoles
<b><i>FKS1, FKS2</i></b>	Resistencia a equinocandinas

Tomado de: Tscherner *et al.*, 2011.

## 1.4 SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS COMPONENTES

Descrito por primera vez en bacterias patógenas y del ambiente, el término “dos componentes” se refiere a la presencia de dos proteínas. Una histidin cinasa (HK), que es una proteína transmembranal que se autofosforila utilizando ATP ante la percepción de una señal del ambiente (Mascher *et al.*, 2006), y de una proteína citoplásmica reguladora de respuesta que modifica su actividad cuando es fosforilada (Stock *et al.*, 2000).

Una diferencia importante de esta vía de señalización entre las bacterias y los eucariontes radica en que estos últimos requieren de una proteína intermediaria, una histidin fosfotransferasa (Hpt), que transporta fosfatos de las histidin cinasas (HKs) a las proteínas reguladoras de respuesta (Hohmann, 2002).

Muchas de las vías del sistema de dos componentes en eucariotes tienen al menos dos reguladores de respuesta, uno en el núcleo y otro en el citoplasma (Li *et al.*, 2010).

El estudio de los sistemas de dos componentes en hongos ha revelado su participación en la respuesta a estrés oxidativo y estrés osmótico, sensibilidad a fungicidas, dimorfismo, producción de metabolitos secundarios, esporulación y producción de hifas (Li *et al.*, 2010).

Además los sistemas de dos componentes son importantes en la regulación de la patogenicidad en diferentes hongos como: *C. albicans* (Kruppa., *et al.*, 2004), *Cryptococcus neoformans* (Bahn *et al.*, 2006), *Penicillium marnefei* (Boyce *et al.*, 2011), y de patógenos de plantas como *Fusarium oxysporum* (Risipail y Di Pietro, 2010).



La vía clásica que se ha estudiado ampliamente en los hongos, especialmente en *S. cerevisiae*, es la vía HOG1 (glicerol hiperosmótico) activada por la vía de las MAPK. La regulación de la vía HOG1/MAPK requiere de tres proteínas localizadas río arriba de la cadena de fosforilación, que incluyen a Sln1p (Hk transmembranal), Ypd1p (Hpt citoplasmica) y Ssk1p (proteína reguladora de respuesta) (Hohmann, 2002).

En ausencia de estrés osmótico la proteína Sln1 se autofosforila en un residuo de histidina, a su vez el grupo fosfato es transferido a un residuo de aspartato de su dominio receptor. Posteriormente el grupo fosfato es transferido a un residuo de histidina de la proteína intermediaria Ypd1 y luego es recibido por un dominio conservado de aspartato de la proteína reguladora de respuesta Ssk1 lo que causa la inactivación de la vía HOG1 MAPK. En condiciones de estrés osmótico la proteína Sln1 se inactiva y por lo tanto la cadena fosforilación se ve inhibida a nivel de la Ssk1p, lo que favorece la unión a la proteína Ssk2 permitiendo la activación de la vía HOG1 (Fig. 6 y Fig. 7) (Hohmann, 2002).

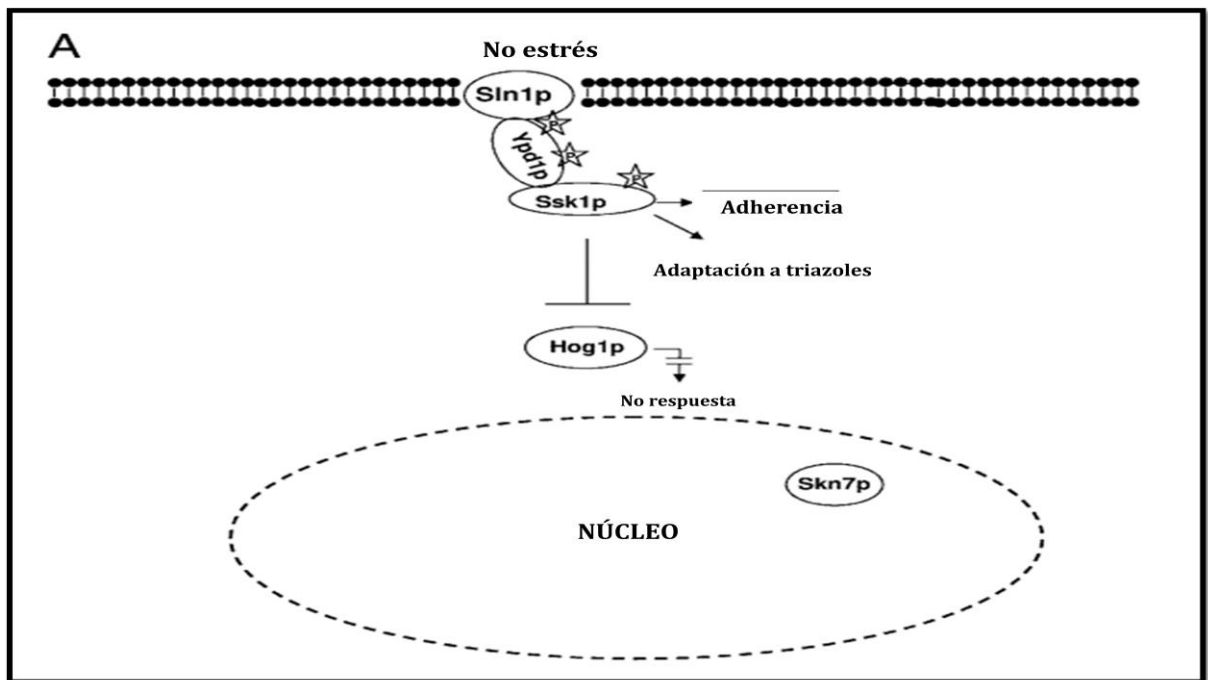


Figura 6: Esquema general del sistema de dos componentes en levaduras, bajo condiciones de no estrés. Modificado de Chauhan y Calderone, 2008.

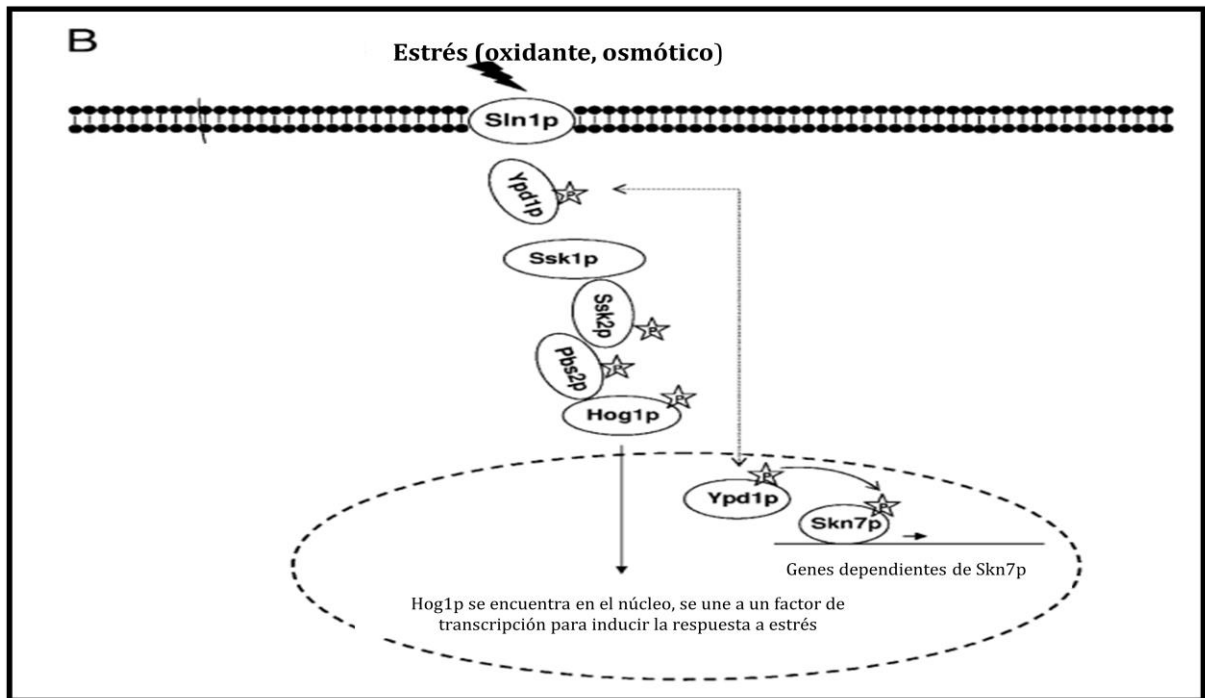


Figura 7: Esquema general del sistema de dos componentes en levaduras, bajo condiciones de estrés. Modificado de Chauhan y Calderone, 2008.

## **1.5 LAS PROTEÍNAS REGULADORAS DE RESPUESTA**

Las proteínas reguladoras de respuesta están involucradas en el sistema de transducción de señales del sistema de dos componentes. Estos sistemas se encuentran presentes en bacterias y en algunos eucariotes afectando procesos celulares mediante la regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona de la expresión génica, pero también a través de una serie de interacciones proteína-proteína. Estos procesos son llevados a cabo por las proteínas reguladoras de respuesta (RR). La mayoría de estas proteínas cuentan con dos dominios, un dominio aceptor o regulador que actúa como fosfoceptor, y un dominio efector o de salida con una actividad variable (Galperin, 2010; URL 3).

La fosforilación del dominio regulador induce un cambio conformacional que resulta en la activación del dominio asociado que efectúa la respuesta. Los dominios reguladores tienen tres actividades. Interactúan con la histidin cinasa fosforilada y catalizan la transferencia de un grupo fosfato a uno de sus residuos aspartato, catalizan su autofosforilación, y regulan las actividades de sus dominios efectores asociados de una manera dependiente de fosforilación (Fig. 8) (URL 4).

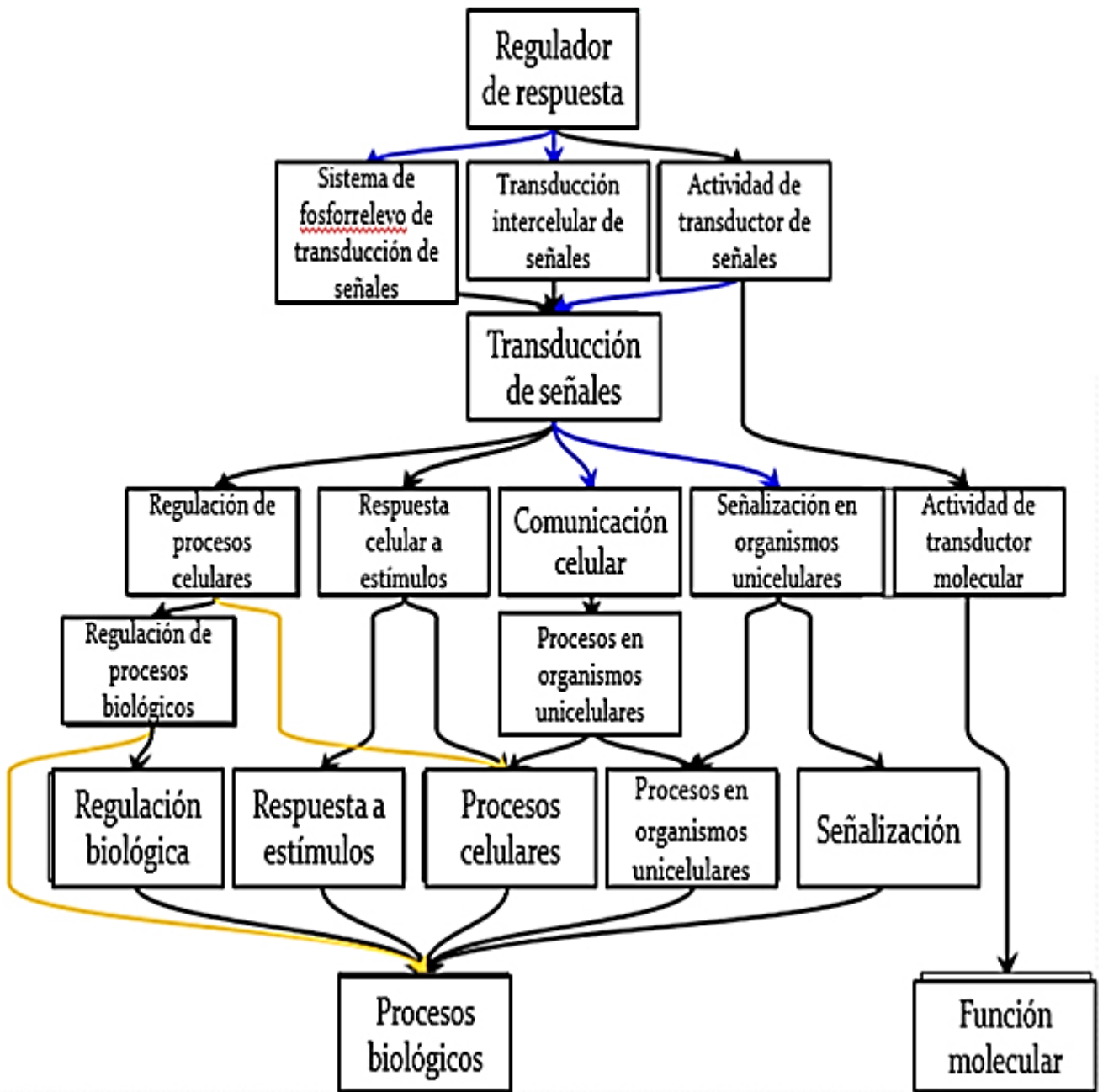


Figura 8: Esquema general de la participación de una proteína reguladora de respuesta en diferentes procesos biológicos.

Tomado de: <http://www.ebi.ac.uk>

## 1.6 LA PROTEÍNA Ssk1 EN LEVADURAS

En *S. cerevisiae* es una proteína citoplasmática de 712 aminoácidos que forma parte del sistema de dos componentes en donde participa como una proteína reguladora de respuesta, en la adaptación a estrés osmótico (URL 5).

En *C. albicans* es una proteína de 674 aminoácidos que también participa como una proteína reguladora de respuesta del sistema de dos componentes en donde se ve involucrada en diferentes mecanismos de patogenicidad y adaptación a condiciones de estrés ambiental (Chen *et al.*, 2004). Por ejemplo, la biosíntesis de pared celular, la adaptación a estrés osmótico, resistencia a antifúngicos como el fluconazol y el voriconazol (Chauhan *et al.*, 2003;2007), la formación de hifas (Calera *et al.*, 2000), la sobrevivencia dentro de neutrófilos humanos y la diseminación en modelos murinos (Du *et al.*, 2005; Menon *et al.*, 2008; URL 6).

## 1.7 ANTECEDENTES

En *C. glabrata* existe un gen que codifica para la proteína Ssk1 y se encuentra altamente conservado (Gijón, 2008).

En ensayos de infección *in vitro* utilizando fibroblastos murinos, el gen *SSK1* se expresa durante las primeras horas de infección, cesando su expresión a las 6 horas, lo que indica que es un gen de regulación negativa y que la Ssk1p codificada por el gen *SSK1* que forma parte del sistema de dos componentes, se ve involucrada en el proceso de infección (González, 2013).

En *Saccharomyces cerevisiae* la vía HOG MAPK puede ser activada en ausencia de la proteína Ssk1p, lo que sugiere un mecanismo alterno e independiente de Ssk1p aún desconocido (Zhi *et al.*, 2013).

## 2. JUSTIFICACIÓN

*Candida glabrata* es un patógeno oportunista causante de candidosis, en los últimos años se ha presentado un aumento en el aislamiento de pacientes inmunocomprometidos, por lo cual es considerado un patógeno emergente.

Estudios recientes han demostrado que el sistema de dos componentes regula la expresión de algunos factores de virulencia, así como, la adaptación a distintas condiciones ambientales en varios hongos. El estudio *in vitro* del gen SSK1 de *C. glabrata* a través de la obtención de una construcción genética que permita el remplazo del gen, permitirá establecer su participación en la adaptación a las condiciones de estrés ambiental.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

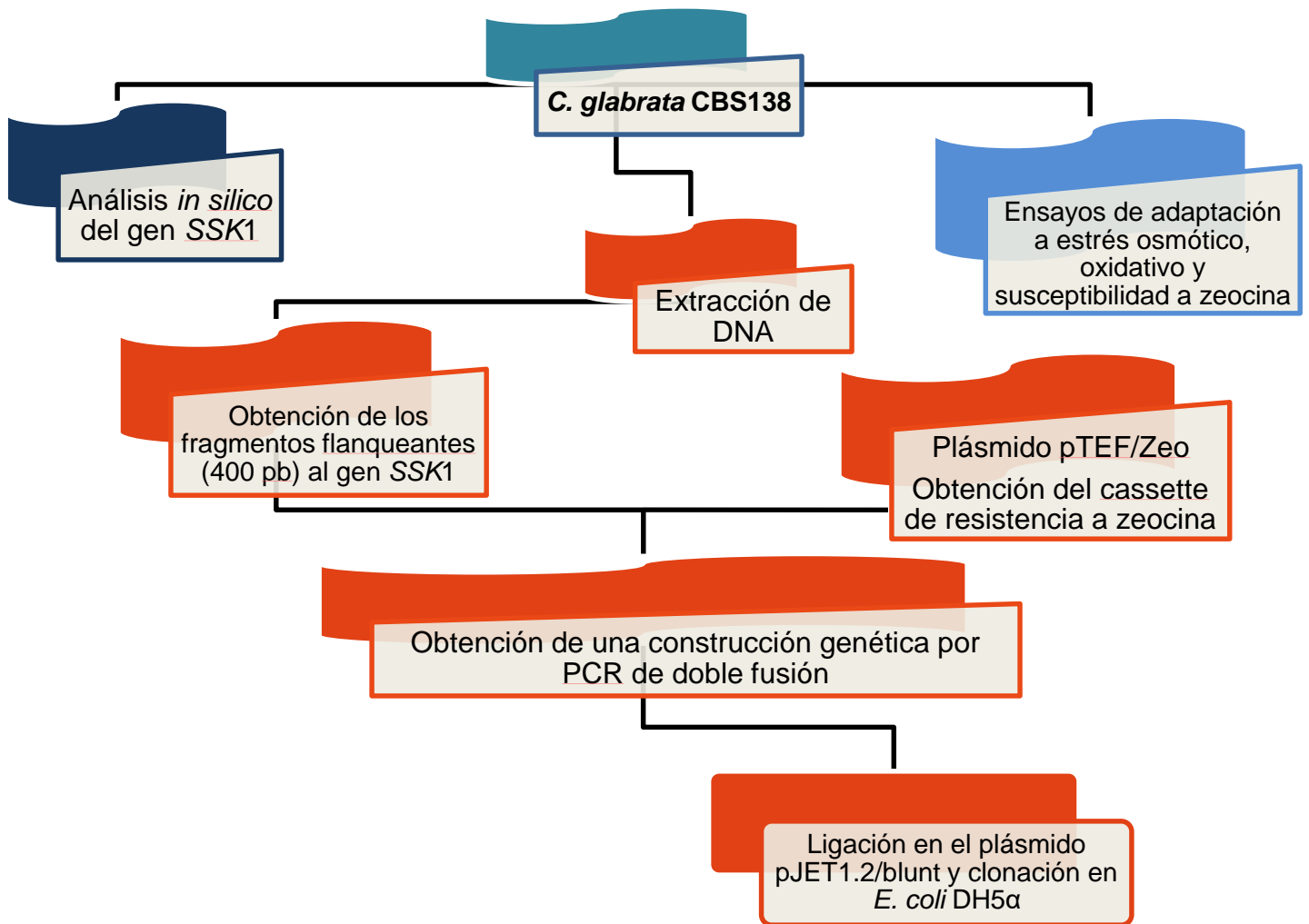
- Obtener una construcción genética que permita interrumpir el SSK1 de *Candida glabrata*.

### **3.2. Objetivos Particulares**

- Realizar un análisis *in silico* del gen SSK1 de *C. glabrata*.
- Evaluar la respuesta a estrés osmótico y oxidativo de *C. glabrata* CBS138.
- Evaluar la susceptibilidad a zeocina de *C. glabrata* CBS138.



## 4. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizó la cepa de referencia *Candida glabrata* CBS138 donada por el Dr. Dujon del Instituto Pasteur en Francia.

La cepa se propagó en medio sólido YPD (ver apéndice), se incubó por 48 horas a 37°C con el fin de obtener biomasa para la realización del trabajo experimental.

Para obtener un abasto, la cepa fue conservada en medio líquido YPD-Glicerol al 50% y almacenada a -70°C.

### **5.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO**

EL DNA genómico se obtuvo mediante la técnica de Allers y Lichten (2000). Se recuperó toda la biomasa de un cultivo masivo de *C. glabrata* en un mortero estéril al cual se le añadió nitrógeno líquido. La biomasa congelada se trituró con un pistilo estéril hasta obtener un polvo fino (este paso se repite tres veces). Posteriormente se añadieron 1 mL de CTAB nuclear (CTAB al 2%, EDTA 50 mM, Tris base 200 mM pH 8.0, NaCl 2 M y Polivinil pirrolidona 0.5%) y se mezcló hasta la obtención de una suspensión homogénea. La suspensión obtenida se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL en un volumen de 0.5 mL en cada tubo y se incubaron a 65°C por 1 hora. Pasado ese tiempo los tubos se colocaron a temperatura ambiente y se les añadió 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron en vortex hasta la obtención de una emulsión. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 Xg/10 min a temperatura ambiente y se colectó la fase acuosa en tubos nuevos. Al sobrenadante colectado se le añadió 1 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó toda la noche a -20°C. Finalmente el DNA se recuperó centrifugando a 13,000 Xg/10 min a 4°C. Se realizaron dos lavados con etanol 70% (centrifugando 5 min a máxima velocidad en cada lavado), se decantó el

sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 30 µL de agua desionizada estéril. El DNA se purificó utilizando el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (ZymoResearch®). Y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis.

### **5.3 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

La obtención del DNA plasmídico se realizó mediante la técnica de Birnboim y Doly (1983). Un cultivo previo de 24 h de la cepa de *E. coli* DH5α en caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) (ver apéndice), se centrifugo a 13,000 Xg/5 min y se resuspendió con 400 µL de la solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y se agitó en vortex. Las células se lisaron usando 400 µL de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) (Se preparó al momento de utilizar) y se agitó suavemente por inversión. El DNA genómico se eliminó añadiendo 300 µL de la solución III (Acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial 5 M pH 5.2) incubando en hielo por 10 minutos para posteriormente centrifugar a 13,000 Xg/10 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio, se le añadió 1 µL de RNAsa A (10 µg/mL) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se realizó la extracción con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugo a 13,000 Xg/5 min. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 500 µL de isopropanol frío, se incubó 5 min en hielo y se centrifugo a 13,000 Xg/5 min. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol 70%, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 30 µL de agua estéril. Posterior a esto se analizó la integridad del DNA plasmídico en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El DNA plasmídico fue purificado utilizando el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (ZymoResearch®) y caracterizado utilizando las enzimas de restricción EcoRV y PvuI.

## **5.4 ANÁLISIS *in silico* DEL GEN *SSK1***

Con base en el genoma de *C. glabrata* disponible en la base de datos de Genolevures (<http://www.genolevures.org/>) se obtuvo la secuencia completa del gen *SSK1*, una vez obtenida se realizó el análisis *in silico* del gen y de la proteína utilizando las plataformas ExPASy Prosite, ExPasy ProtParam (<http://www.expasy.org/>), STRING 10 (<http://string-db.org/>), MetadisorderService (<http://genesilico.pl/metadisorder/>) y el programa Mega (6.06). La secuencia del gen *SSK1* presentó la clave de acceso CAGL0D02882g.

## **5.5 DISEÑO DE INICIADORES Y OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS RÍO ARRIBA Y RÍO ABAJO QUE FLANQUEAN AL GEN *SSK1* Y DEL CASSETTE DE RESISTENCIA ZEOCINA**

Utilizando los datos obtenidos de Genolevures se procedió al diseño de los iniciadores para amplificar los fragmentos río arriba y río abajo que flanquean al gen *SSK1*, para lo cual se hizo la búsqueda de las secuencias correspondientes en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerando un tamaño de 400 nucleótidos río arriba y río abajo al gen. Posteriormente se consideraron como molde los primeros 20 nucleótidos de la región río arriba del gen para el iniciador directo y los últimos 20 para el iniciador reverso, así como, los primeros 20 nucleótidos de la región río abajo para el iniciador directo y los últimos 20 para el iniciador reverso. Una vez obtenidas las secuencias del iniciador reverso de la región río arriba y del iniciador directo de la región río abajo, se procedió a añadirles unas secuencias adicionales de 20 nucleótidos, pertenecientes a la región del promotor y del terminador del gen que confiere resistencia a zeocina (*Sh ble*), contenido en el plásmido pTF1/Zeo. En el diseño de los iniciadores para la amplificación del gen *Sh ble* se utilizaron las secuencias del promotor del gen (primeros 20 nucleótidos) añadiendo los últimos 20 nucleótidos de la región río arriba del gen *SSK1*, y la secuencia del terminador (últimos 20 nucleótidos)

añadiendo los primeros 20 nucleótidos de la región río abajo del gen *SSK1*. El análisis bioinformático de los iniciadores se realizó utilizando el programa DNAMAN (versión 8.0) (Lynnon Corporation Bionformatic Solutions).

Los fragmentos río arriba y río abajo flanqueantes al gen *SSK1*, así como el cassette de resistencia a zeocina se obtuvieron bajo las condiciones mostradas en la tabla 4.

**Tabla 4: Programa de PCR utilizado para la amplificación de los fragmentos flanqueantes al gen *SSK1* y del cassette de resistencia a zeocina**

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	5	1
94	1	
57	1	30
72	1	
72	10	1
4	∞	

Se amplificó el gen *SSK1* utilizando los iniciadores directo río arriba y reverso río abajo utilizando las condiciones mostradas en la tabla 5.

**Tabla 5: Programa de PCR utilizado para amplificar el gen *SSK1***

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	5	1
94	1	
58	1	30
72	3	
72	10	1
4	∞	

## **5.6 OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA POR LA TÉCNICA DE PCR DE DOBLE FUSIÓN**

Se preparó la reacción de PCR de doble fusión a un volumen final de 50  $\mu$ L con base al contenido de la tabla 6. Se aseguró que los fragmentos a fusionar mantuvieran una relación molar de 3:1 respecto a sus concentraciones iniciales. La reacción de PCR de doble fusión se llevó a cabo con base a las condiciones mostradas en la tabla 7.

**Tabla 6: Preparación de la reacción de PCR de doble fusión**

Reactivo	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
Agua	-	31.9
Buffer HF 5X (MgCl <sub>2</sub> )	1.5 mM	10
dNTP's	10 mM	1
Iniciador FwRa	0.5 $\mu$ M	0.8
Iniciador RvRab	0.5 $\mu$ M	0.8
Fragmento Zeo	500 nM	1
Fragmento Río arriba	1500 nM	1.8
Fragmento Río abajo	1500 nM	1.8
Enzima Phusion DNA polimerasa	1 U	0.5

**Tabla 7: Programa utilizado para la reacción de PCR de doble fusión**

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
98	1 min	1
98	30 seg	
55	30 seg	30
72	1 min	
72	10 min	1
4	$\infty$	

Debido a que se obtuvo un bandeo múltiple en la reacción de PCR de doble fusión, la banda de interés se cortó y purificó utilizando el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (ZymoResearch®).

## 5.7 CLONACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA

La construcción genética previamente obtenida mediante la reacción de PCR de doble fusión se ligó al vector de clonación pJET1.2/blunt utilizando el kit comercial CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific®) bajo las condiciones mostradas en la tabla 8. Y se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sambrock *et al.*, 1989).

**Tabla 8: Preparación de la mezcla de ligación de la construcción genética en plásmido pJET1.2/blunt**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer 2x	10
Construcción genética	3
Agua	4
Enzima DNA Blunting	1

La mezcla se agitó en vortex y se centrifugó a 13,000 Xg/5 seg, después se incubó a 70°C 5 min y se colocó en hielo. Posteriormente se añadió a la mezcla 1  $\mu$ L del vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de la enzima ligasa T4 (5U/ $\mu$ L). La mezcla se agitó en vortex, se centrifugó a 13,000 Xg/5 seg y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

Se seleccionaron las colonias aisladas y de mayor tamaño que presentaron crecimiento en placas de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) (ver apéndice) y se les extrajo el DNA plasmídico (Birnboim y Doly, 1983). Los plásmidos obtenidos se sometieron a una restricción con la enzima BgIII para demostrar la presencia del fragmento de interés (1900 pb).

## **5.8 ENSAYOS DE ESTRÉS OXIDATIVO, OSMÓTICO Y EVALUACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD A ZEOCINA EN *C. glabrata***

Un cultivo de *C. glabrata* CBS138 en medio YPD líquido de 24 horas en agitación constante se colocó en un tubo para centrifuga estéril de 50 mL y se centrifugó a 13,000 Xg/5 min. Al terminar se eliminó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con 1 mL de PBS 1X estéril (ver apéndice). A partir de esta suspensión se hizo una dilución 1:1000 utilizando PBS 1X estéril para realizar el conteo de células en cámara de Neubauer. De este modo se procedió a preparar inóculos a una concentración de  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  levaduras/mL. Se sembraron 10  $\mu$ L por triplicado en placas de medio YPD que contenían NaCl (0.5 y 1 M) para evaluar estrés osmótico y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 y 30 mM) para evaluar estrés oxidativo. Las placas se incubaron a 28°C y 37°C y se observaron a las 24 h, 48 h y 72 h posteriores a la incubación. La evaluación de susceptibilidad a zeocina se realizó en medio YPD sólido que contenía zeocina a diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 300  $\mu$ g/mL) y en medio YPD líquido con zeocina a concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ g/mL utilizando una microplaca de 96 pozos. Se incubaron por 48 h a 37°C realizando observaciones cada 24 h. Se utilizó medio YPD sólido y líquido como testigo positivo de crecimiento para ambos ensayos.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 CULTIVO DE *Candida glabrata* CBS138

Después de una incubación de 48 horas a 37°C se observó la morfología colonial de la cepa de referencia de *C. glabrata* CBS138 en medio YPD sólido, la cual consistió en colonias blancas, redondas, con bordes regulares, de aspecto cremoso, de un tamaño de 2-3 mm y consistencia suave (Fig. 9).

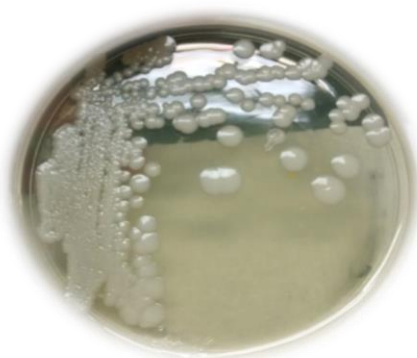


Figura 9: Morfología colonial de *C. glabrata* CBS138 en medio YPD sólido.

### 6.2 ANÁLISIS *IN SILICO* DEL GEN *SSK1* Y DE LA *Ssk1p*

Las características del gen y de la proteína *Ssk1* de *C. glabrata* se detallan en la tabla 9.

Tabla 9: Características del gen y de la proteína *Ssk1*

Característica	Gen <i>SSK1</i>	Proteína <i>Ssk1</i>
Tamaño/Numero de aminoácidos	2004 pb	667
Localización	Cromosoma D	-
Región el cromosoma	300025-302028	-
Peso molecular	-	75.2 KDa
Punto isoeléctrico	-	6.38

El aminoácido predominante en esta proteína es la serina y el menos abundante es la cisteína (Tabla 10).

**Tabla 10: Aminoácidos presentes en la proteína Ssk1**

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>% aminoácidos</b>
<b>Alanina</b>	34	5.1
<b>Arginina</b>	27	4.0
<b>Asparagina</b>	66	9.9
<b>Aspartato</b>	42	6.3
<b>Cisteína</b>	2	0.3
<b>Glutamina</b>	32	4.8
<b>Ácido glutámico</b>	39	5.8
<b>Glicina</b>	27	4.0
<b>Histidina</b>	17	2.5
<b>Isoleusina</b>	44	6.6
<b>Leucina</b>	61	9.1
<b>Lisina</b>	44	6.8
<b>Metionina</b>	12	1.8
<b>Fenilalanina</b>	16	2.4
<b>Prolina</b>	34	5.1
<b>Serina</b>	78	11.7
<b>Treonina</b>	31	4.6
<b>Triptófano</b>	10	1.5
<b>Tirosina</b>	21	3.1
<b>Valina</b>	30	4.5

La Ssk1p cuenta con un dominio regulador de respuesta ubicado entre los aminoácidos 464 y 606, también posee un residuo modificado de 4-aspartilfosfato (Fig. 10).

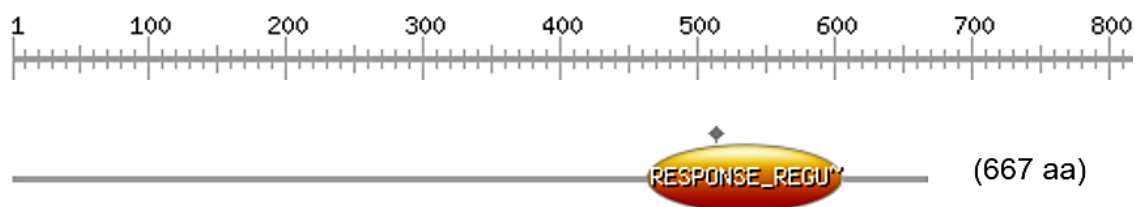


Figura 10: Representación gráfica del dominio regulador de respuesta de la Ssk1p de *Candida glabrata* (Expaxy-Prosite).

Se utilizó la herramienta informática en línea “MetaDisorder Service” la cual nos permite predecir el grado de ordenamiento y desorden en la estructura de una proteína, de este modo se puede determinar si ésta puede o no poseer una estructura terciaria. Se observa que la región que guarda un mayor ordenamiento es donde se localiza el dominio (Fig. 11).

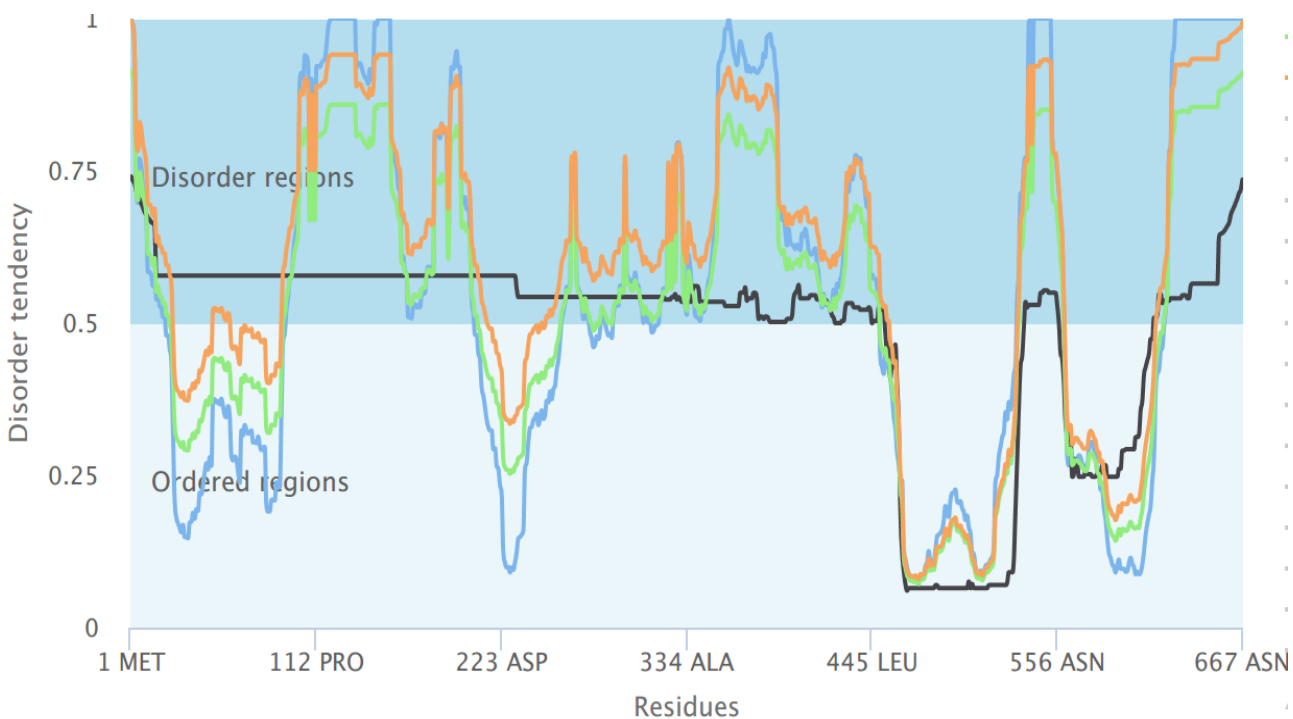


Figura 11: Grado de ordenamiento en la proteína Ssk1 de *C. glabrata* (Metadisorder Service).

De acuerdo al análisis en la plataforma STRING 10 la proteína Ssk1 de *C. glabrata* (A) interactúa de forma directa con las proteínas Ssk2p y Ypd1p, aunque también se observa que puede interactuar con otras proteínas de la vía HOG1 en menor grado (Sln1p y Sho1p), como también se muestra en el modelo descrito en *S. cerevisiae* (B). A diferencia de lo que se ha descrito de forma general en la vía, donde siempre se habla de una interacción sucesiva de las proteínas (Fig. 12).

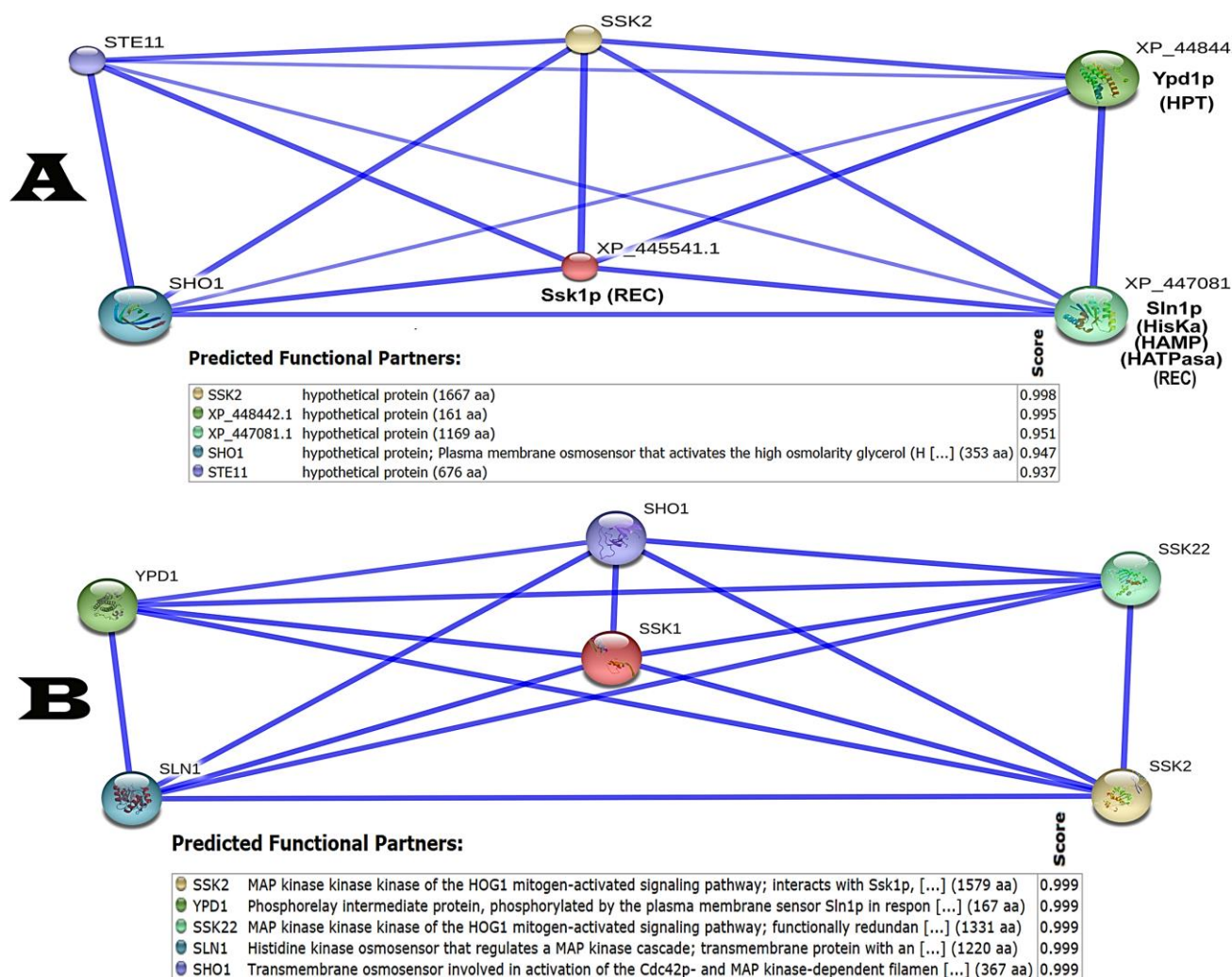


Figura 12: Interacción de la Ssk1p de *C. glabrata* (A) y de *S. cerevisiae* (B) con otras proteínas de la vía HOG1. El grosor de las líneas revela el grado de interacción entre las proteínas, además, se muestra el puntaje de confianza de las interacciones que ocurren entre éstas.

Las 7 secuencias de las Ssk1p reportadas en la base de datos de Genolevures (incluida la de *C. glabrata*) se sometieron a un análisis filogenético utilizando el programa Mega 6.06, se utilizaron un total de 376 posiciones y un bootstrap de 100. El árbol filogenético muestra la ya conocida relación entre *C. glabrata* y *S. cerevisiae*. Aunque también, se muestra que *Z. rouxii* guarda una relación filogenética con *C. glabrata*. Igualmente se comparó la secuencia de la Ssk1p de *C. albicans* donde se observa la poca relación filogenética con *C. glabrata*, además de la alta homología que guarda con la Ssk1p *D. hansenii* (Fig. 13).

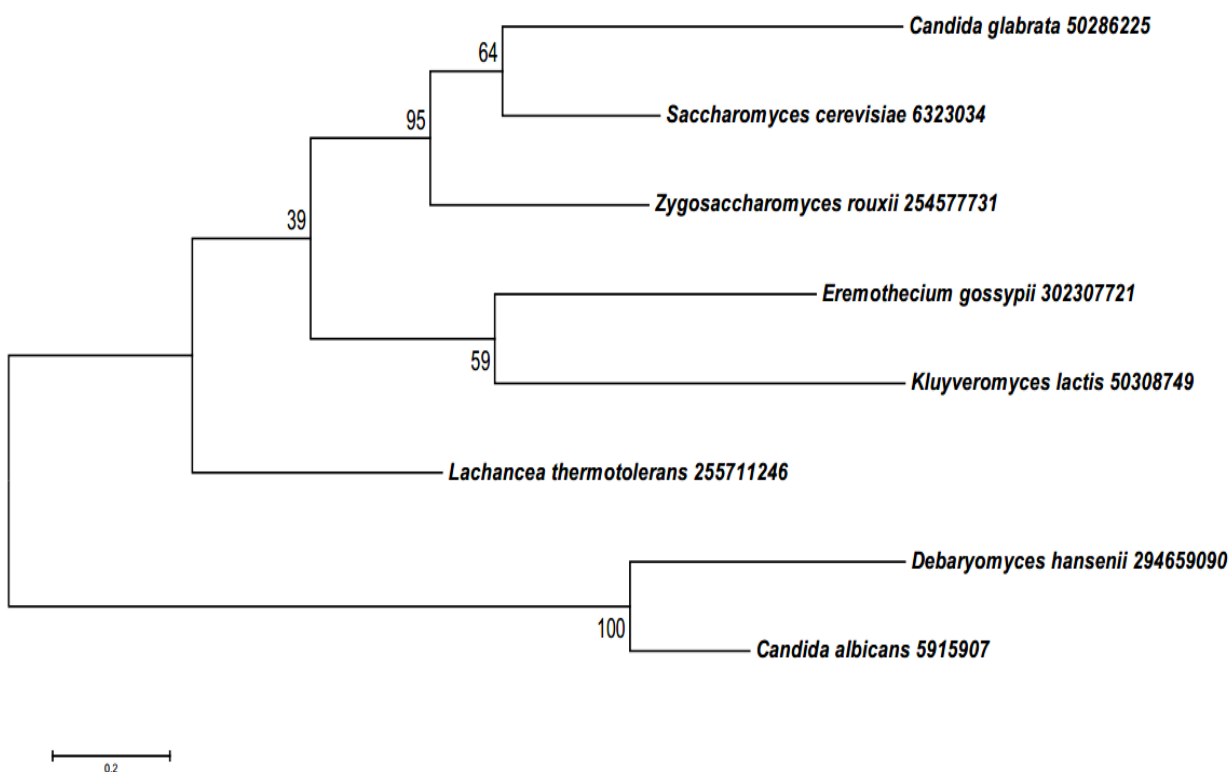


Figura 13: El análisis filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud de la Ssk1p. El análisis incluyó 8 secuencias. Todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 376 posiciones en el último conjunto de datos. El análisis evolutivo se realizó en MEGA6.

### 6.3 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Se obtuvo el DNA integro de *C. glabrata* CBS138 (Fig.14). Éste se utilizó para la obtención de los fragmentos río arriba y río abajo de 400 pb que flanquean al gen *SSK1* y el ORF del gen adicionando las secuencias flanqueantes de 400 pb.



Figura 14: Electroferograma del DNA de *C. glabrata* en agarosa al 1%

### 6.4 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Se obtuvo el plásmido pTEF1/Zeo de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El plásmido se caracterizó utilizando las enzimas de restricción EcoRV y PvuI esperando dos fragmentos de 2667 pb y 933 pb, así como, de 2658 y 948 pb respectivamente, y se utilizó para obtener el cassette de resistencia a zeocina (1100 pb) (Fig. 15).

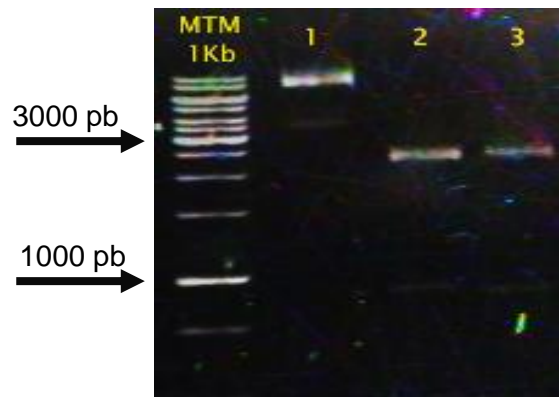


Figura 15: Electroferograma del plásmido pTEF1/Zeo sin digerir (1) y digerido con EcoRI (2) y PvuI (3) en agarosa al 1%

## 6.5 OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS QUE FLANQUEAN AL GEN *SSK1* DE *C. glabrata* Y DEL CASSETTE DE RESISTENCIA A ZEOCINA

Los iniciadores directo río arriba y reverso río abajo, que se utilizarían posteriormente para la amplificación de los fragmentos que flanquean al gen *SSK1* se probaron realizando una reacción de PCR con el fin de amplificar el ORF del gen *SSK1* de *C. glabrata* (Fig. 16), para lo cual se utilizó un gradiente de temperatura (50-60°C) con el fin de determinar la temperatura de alineamiento adecuada acordando 58°C.

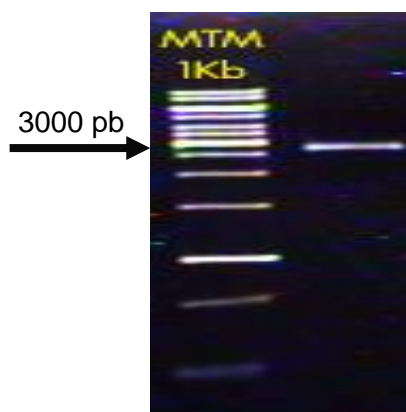


Figura 16: Electroferograma del gen *SSK1* de *C. glabrata* con sus regiones flaqueantes río arriba y río abajo (2004 pb + 800 pb) en agarosa al 1%

Para la obtención de los fragmentos río arriba y río abajo de 400 pb que flanquean al gen *SSK1* (Fig. 17). La temperatura de alineamiento de los iniciadores se determinó con base en un gradiente de temperatura de 50°C a 60°C (1-12) acordado 57°C para ambos pares de iniciadores.

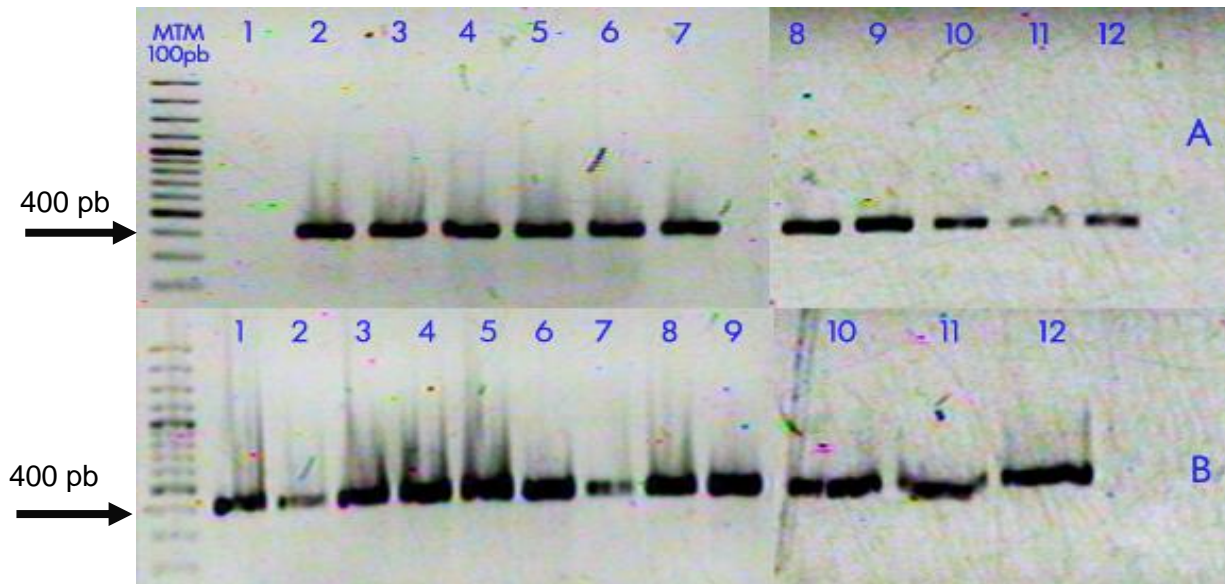


Figura 17: Electroferograma de los fragmentos río arriba (A) y río abajo (B) que flanquean al gen *SSK1* de *C. glabrata* (400 pb) en agarosa al 1%

La temperatura de alineamiento de los iniciadores que amplifican el cassette de resistencia a zeocina (Fig. 18) se determinó con base en un gradiente de temperatura de 51°C a 58°C (1-8) acordado una temperatura de 57°C.

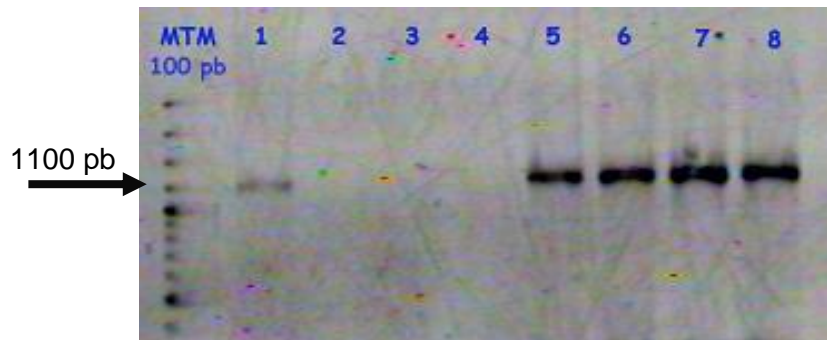


Figura 18: Electroferograma del cassette de resistencia a zeocina obtenido a partir del plásmido pTEF1/Zeo, en agarosa al 1%



## 6.6 OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA POR LA TÉCNICA DE PCR DE DOBLE FUSIÓN

Una vez finalizada la reacción se realizó la búsqueda de la banda esperada (1900 pb) por lo que los productos de la reacción de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se obtuvo el amplicon esperado de 1900 pb (Fig. 19). Finalmente se realizó el corrimiento de un gel de agarosa al 0.8% de los fragmentos que se sometieron a la reacción de PCR de doble fusión y la construcción genética obtenida previamente purificada (Fig. 20).

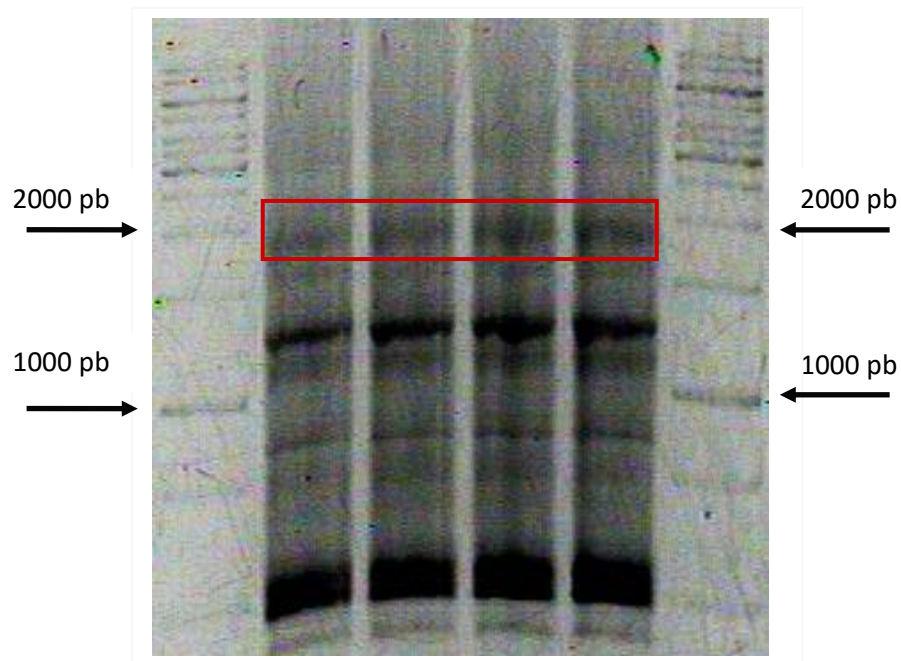


Figura 19: Electroferograma de los productos de la reacción de PCR de doble fusión (banda de interés 1900 pb) en agarosa al 0.8%

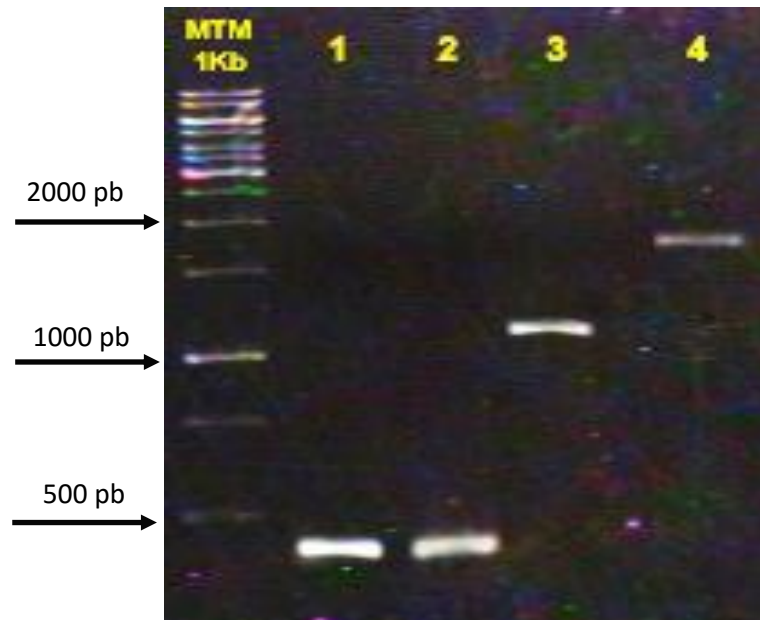


Figura 20: Electroferograma de los fragmentos que flanquean al gen SSK1 (1 y 3), el cassette de resistencia a zeocina (3) y la construcción genética (4) en agarosa al 0.8%

## 6.7 CLONACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN GENÉTICA

Mediante electroforesis en un gel de agarosa 0.8% se observó la presencia del fragmento de interés en los plásmidos previamente sometidos a restricción con la enzima BglIII (Fig. 21), obteniendo dos fragmentos, uno de 3000 pb y otro de aproximadamente 2000 pb que hace referencia a la construcción genética de 1900 pb (carril 3).

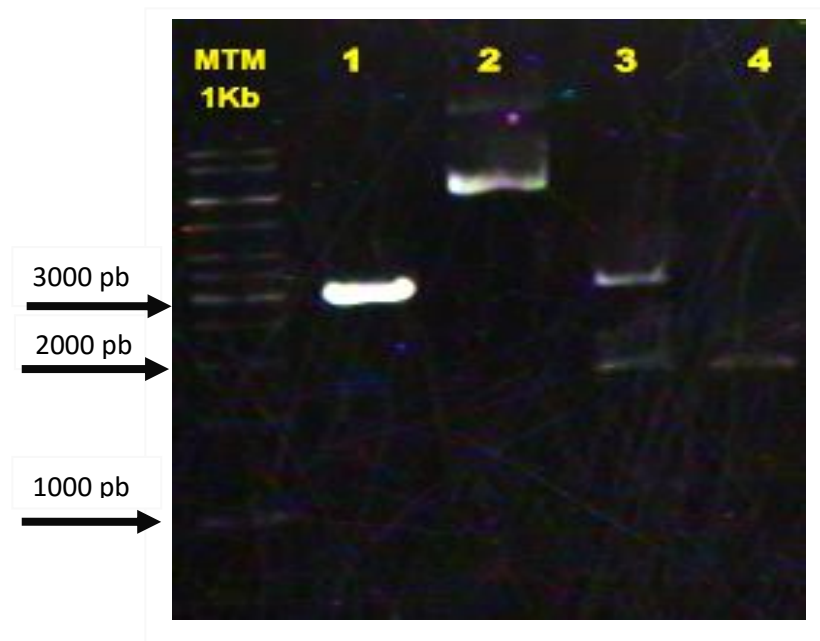


Figura 21: Electroferograma del plásmido pJET1.2/blut (1), el plásmido pJET1.2/blut + la construcción genética (2), el plásmido pJET1.2/blut digerido con BglIII (3) y la construcción genética pura obtenida por PCR de doble fusión (4) en agarosa al 0.8%

## 6.8 ENSAYOS DE ESTRÉS OSMÓTICO, OXIDATIVO Y SUSCEPTIBILIDAD A ZEOCINA EN *C. glabrata*

Se observa que *C. glabrata* CBS138 es capaz de crecer sin ningún problema en ambas concentraciones de NaCl y en las diferentes temperaturas de incubación (Fig. 22).

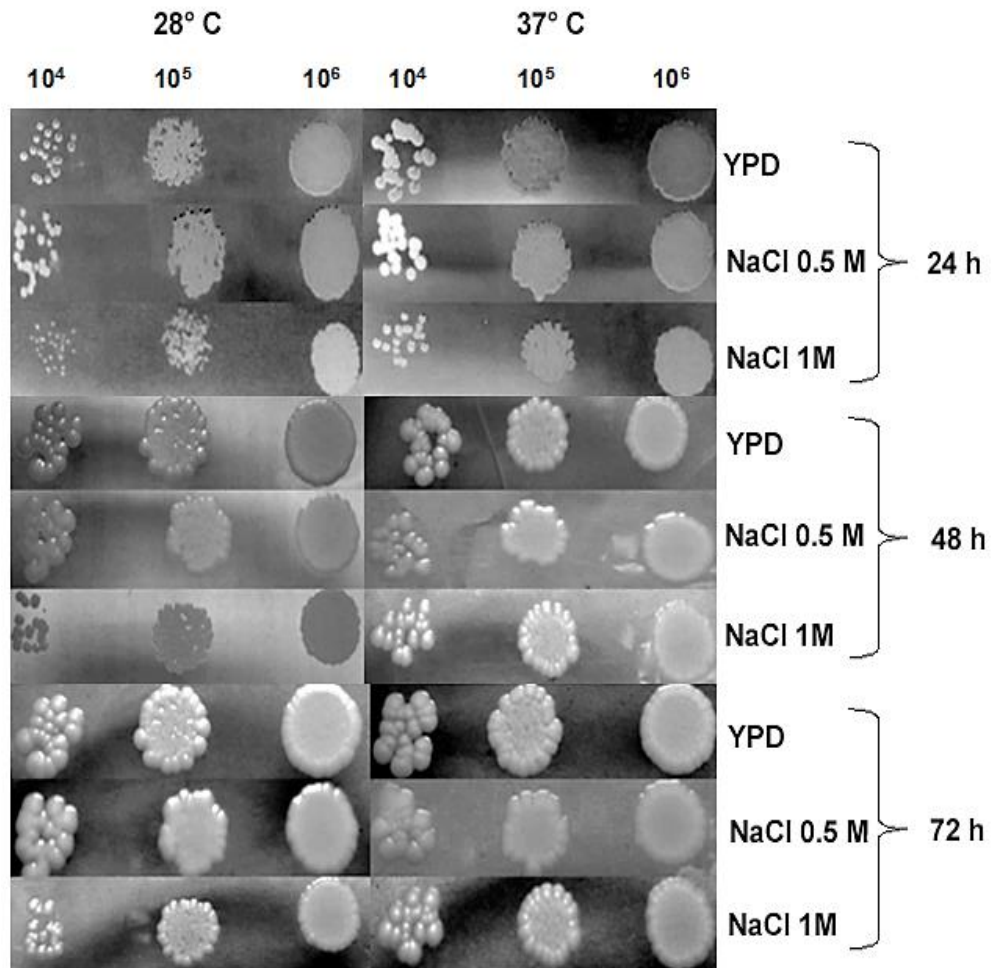


Figura 22: Ensayos de estrés osmótico en *C. glabrata* CBS138 usando NaCl a diferentes concentraciones, así como, a diferentes temperaturas de incubación.

Se observó que *C. glabrata* presenta dificultad de desarrollarse a las 24 h en ambas concentraciones de peróxido en los inóculos de  $10^4$  y  $10^5$  levaduras/mL en ambas temperaturas, en el inóculo de  $10^6$  si hay crecimiento a 20 mM en ambas temperaturas y a 30 mM solo a 37°C. A las 48 h se observa un mayor crecimiento en una concentración de 20 mM de  $H_2O_2$  en ambas temperaturas, siendo éste más abundante a 37°C. Aún no se observa crecimiento a una concentración de 30 mM a 28°C, mientras que a 37°C hay un mínimo crecimiento en el inóculo de  $10^6$ . A las 72 h el crecimiento en 30 mM de  $H_2O_2$  se ve inhibido a 28°C, mientras que éste si se observa a 37°C (Fig. 23).

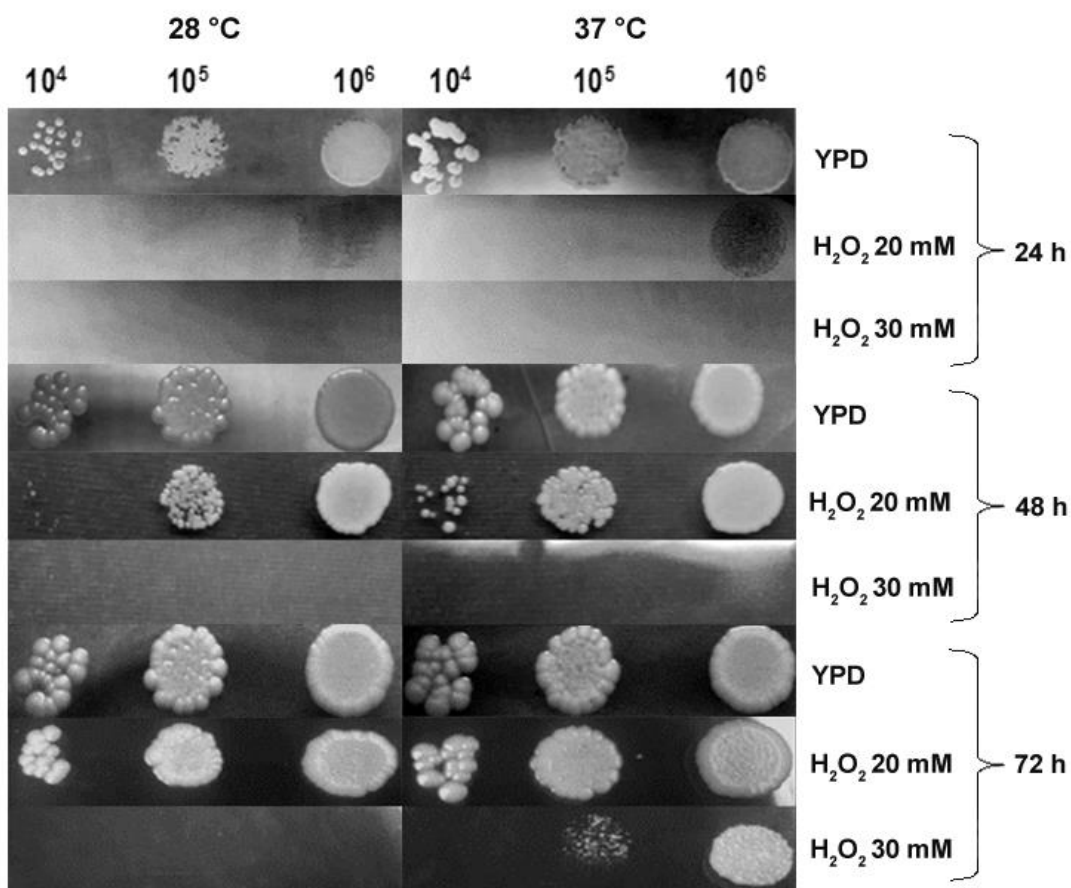


Figura 23: Ensayos de estrés oxidativo en *C. glabrata* CBS138 usando  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones, así como, a diferentes temperaturas de incubación.

Los ensayos en medio sólido muestran que la cepa es capaz de crecer en una concentración de 300 mg/μL de zeocina pero con un crecimiento muy limitado, a las 48 h (Fig. 24). En cambio el crecimiento en medio líquido se ve inhibido a una concentración de zeocina de 100 mg/μL (Fig. 25).

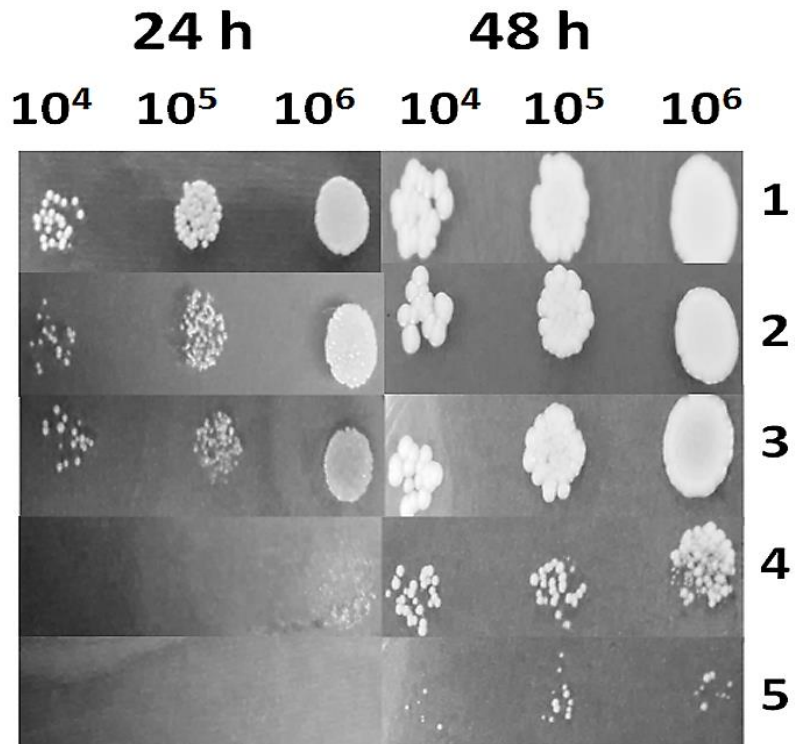


Figura 24: Ensayos de susceptibilidad en *C. glabrata* CBS138 a diferentes concentraciones de zeocina en medio YPD sólido 1 (testigo YPD), 2 (50 mg/μL), 3 (100 mg/μL), 4 (200 mg/μL), 5 (300 mg/μL).

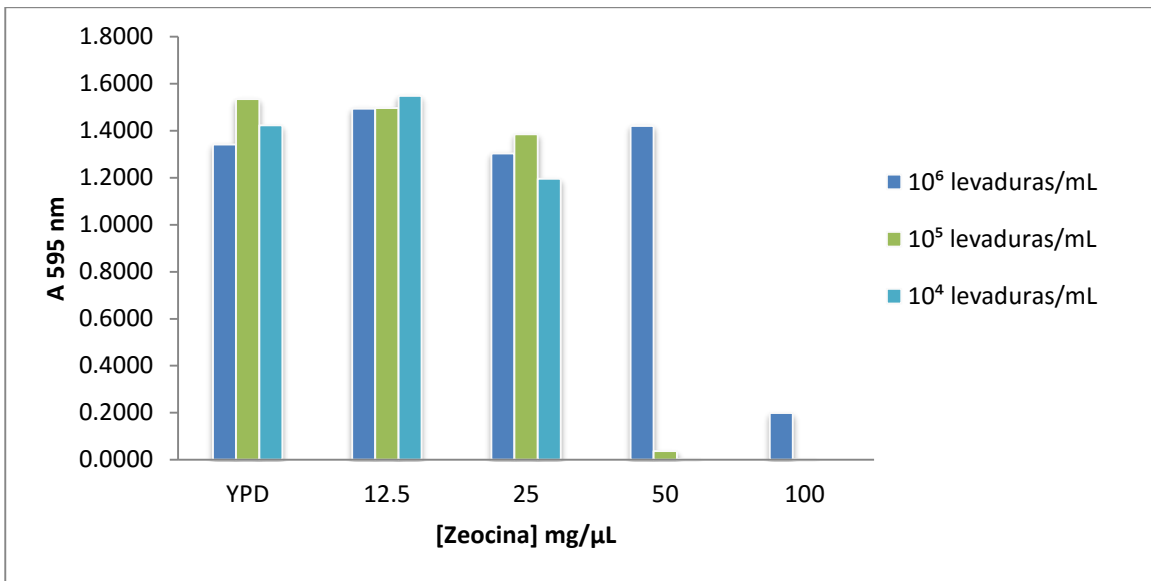


Figura 25: Ensayos de susceptibilidad en *C. glabrata* CBS138 a diferentes concentraciones de zeocina en medio YPD líquido.

## 7. DISCUSIÓN

Todos los organismos vivos, ya sean unicelulares o pluricelulares, interactúan activamente con el medio ambiente que los rodea y requieren regular su estado fisiológico para mantener la homeostasis celular. . La percepción y respuesta a una gran cantidad de estímulos ambientales son la clave para que los hongos que tienen un ciclo de vida saprofita o comensal, actúen como patógenos. El proceso de percepción y adaptación a estrés ambiental sigue siendo necesario para la supervivencia en diferentes sitios anatómicos o bien, permite contrarrestar los cambios fisiológicos que se presentan durante un proceso de infección. Este proceso de adaptación está bien coordinado a través de diversas vías de señalización, donde participan una serie de componentes que permiten que se lleve a cabo, en él, se incluyen sensores/receptores, proteínas de tipo cinasas, y factores de transcripción (Bahn, 2008).

Un gran número de vías de señalización han sido estudiadas y se ha observado su relación en la respuesta al estrés y la adaptación en los hongos, dentro de éstas se incluyen, la vía de señalización del AMP cíclico (cAMP), la vía de señalización de  $Ca^{2+}$ /calcineurina, la vía de la proteína cinasa C (PKC)/Mpk1 (también conocida como Stt2), la vía MAPK, y la vía HOG1 (glicerol hiperosmótico). Entre todas estas vías de señalización, la vía HOG1 es una de las vías de respuesta a estrés mejor caracterizadas en hongos. Como su nombre lo indica, la vía de señalización HOG1 fue originalmente identificada jugando un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio osmótico en condiciones de hipo e hiperosmolaridad en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, en los hongos patógenos se ha visto que la vía HOG1 juega un papel menor en el control de la osmolaridad. En cambio, las proteínas de esta vía participa en la regulación de la respuesta y adaptación celular ante diversos estímulos externos entre los que se encuentran: exposición a radiación UV, estrés oxidativo, a temperaturas elevadas y por supuesto al choque osmótico. También está implicada en el crecimiento y diferenciación morfológica, y en la expresión de algunos factores de virulencia (cápsula y formación de hifas) en los hongos patógenos (Bahn, 2008).



Estudios recientes han demostrado que en *S. cerevisiae* esta vía puede ser activada en ausencia de la Ssk1p en condiciones de estrés osmótico, además se ha observado que la activación de la vía es más rápida y solo responde ante un estrés osmótico elevado (Fig. 26) (Zhi *et al.*, 2013). Entonces, si *C. glabrata* y *S. cerevisiae* guardan una estrecha relación filogenética, podríamos esperar que *C. glabrata* tuviera un comportamiento similar al remplazar el gen SSK1, o bien podríamos esperar un comportamiento como el de *C. albicans*, donde la eliminación de este gen causa una deficiente expresión de algunos factores de virulencia y adaptación a estrés ambiental, tales como la formación de hifas, la sobrevivencia en células PMN (polimorfonucleares) y la adaptación a estrés oxidativo (Chauhan *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2005).

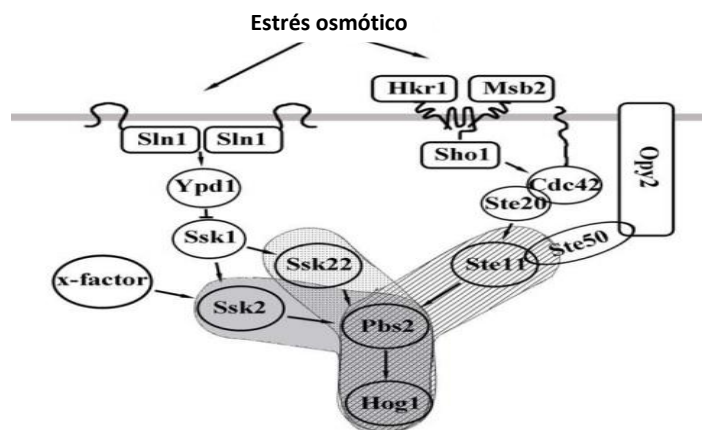


Figura 26: Representación de la activación alternativa a Ssk1p de la vía HOG1 en *S. cerevisiae* (Zhi *et al.*, 2013).

Otro estudio reciente muestra que la vía HOG1 en *S. cerevisiae* puede ser activada durante un estrés metabólico, especialmente durante los cambios en los niveles de glucosa en el medio, además de que la activación de la vía es diferente durante un estrés osmótico y un estrés metabólico. Ya que durante el estrés osmótico la vía puede ser activada a través de Sln1p/Ypd1p/Ssk1p o Sho1p, pero durante el estrés metabólico la activación es dependiente de Ssk1p e independiente de Sho1p. Esto debido a que la Ssk1p desfosforilada permanece más tiempo estable, que durante el estrés osmótico (Vallejo y Mayinger, 2015).

En los últimos años los aislamientos de *Candida glabrata* a partir de muestras clínicas se han presentado con mayor frecuencia. Se le ha encontrado como agente causal de candidosis vaginal, o produciendo micosis sistémicas y candidemia en los enfermos graves y/o con algún compromiso inmunológico (Tapia, 2008).

La candidemia se encuentra dentro de la cuarta causa más común de las infecciones intrahospitalarias, sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes en estado crítico en la unidad de cuidados intensivos. A pesar de la disponibilidad de la terapia antifúngica, la mortalidad debida a la candidemia mantiene una tasa elevada que va del 30% al 60%. Datos epidemiológicos recientes también revelan un cambio en las especies causantes de candidemia, donde ya no solo se encuentra a *Candida albicans* sino también a otras especies, como: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Se considera que el uso frecuente de fluconazol como profilaxis antifúngica ha jugado un papel importante en la aparición de estas especies. La candidemia causada por *C. glabrata* ha sido considerada como la que posee una mortalidad más alta, en comparación con las otras especies de *Candida non-albicans* (Gupta *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la obtención de una construcción genética para remplazamiento del gen *SSK1* de *C. glabrata* es fundamental para caracterizar la función del mismo, con respecto a la adaptación a diferentes condiciones de estrés ambiental. Ya que hasta la fecha no hay estudios relacionados a esta proteína en *C. glabrata*, de acuerdo a la base de datos Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>) donde el gen se reporta como no caracterizado hasta el 14 de septiembre del 2015.

Se realizó un análisis *in silico* del gen *SSK1* y de la proteína *Ssk1* en *C. glabrata* utilizando diferentes bases de datos. Se observó que la proteína *Ssk1* forma parte del sistema de fosforelevo participando como un regulador de respuesta, ya que cuenta con un dominio REC perteneciente a la familia *CheY* (descritos en los sistemas de dos componentes) ubicado entre los aminoácidos 464 y 606, y cuya

actividad radica en un residuo de 4-aspartilfosfato en el aminoácido 513 (Fig. 10). Generalmente los reguladores de respuesta (RR) consisten en dos dominios: un dominio regulador N-terminal conservado y un dominio efector C-terminal de actividad variable. La fosforilación del dominio regulador induce un cambio conformacional que resulta en la activación de un dominio asociado que efectúa la respuesta (URL 7).

Algunas proteínas no poseen una estructura terciaria bajo condiciones fisiológicas pero aun así son funcionales. El grado de ordenamiento o desorden en una proteína puede ser un indicativo de que la proteína posea o no una estructura terciaria. Para ello se utilizó la herramienta en línea MetaDisorder Service donde se analizó la secuencia de la Ssk1p, mostrando que el nivel de desorden en la proteína es bastante alto, pero cabe destacar que la región más ordenada dentro de ésta, se encontró en la región perteneciente al dominio, que es la parte funcional de la proteína (Fig. 11).

El análisis de la Ssk1p de *C. glabrata* en la plataforma STRING 10 muestra que la proteína podría estar interactuando con las proteínas sensoras Sln1 y Sho1 con las cuales no se ha descrito una interacción, como también se observa en *S. cerevisiae* (Fig. 12). Además de la proteína Ste11 que en *C. glabrata* se ha descrito que juega un papel en la adaptación a estrés osmótico, el mantenimiento de la integridad de la pared celular y la virulencia (Calcagno *et al.*, 2005). Así pues, se presenta una posible explicación del porque la vía HOG1 puede ser activada en cepas *SSK1* $\Delta$  de *S. cerevisiae*, ya que el análisis también mostro que las proteínas Sln1 y Sho1 pueden interactuar con las proteínas Ssk2 y Ypd1, proteínas con las que la Ssk1p tiene interacción directa. Y en este caso, sería la Sln1p la que podría estar remplazando la función de la Ssk1p, ya que también cuenta con un dominio regulador de respuesta (REC). Aunque deben de realizarse estudios más específicos de proteína Ssk1 de *C. glabrata* para comprender a mayor detalle estas interacciones.

El análisis de las secuencias de las Ssk1p reportadas en la base de datos de Genolevures utilizando el programa Mega se realizó con el fin de conocer la

relación filogenética entre las siete especies reportadas y la homología que existe entre ellas. El análisis revela que la mayoría de las especies reportadas a pesar de no estar tan relacionadas filogenéticamente, la homología entre sus proteínas Ssk1 no es tan baja, sin embargo las especies que se encuentran en el mismo clado de *C. glabrata* poseen una mayor homología en sus Ssk1p en comparación con las otras especies dentro del árbol (Fig. 13). Se utilizó la secuencia de la Ssk1p de *C. albicans* con el fin de conocer la relación que guarda con la de *C. glabrata*.

La obtención de la construcción genética se realizó mediante la técnica de PCR de doble fusión, con la cual, se fusionaron tres fragmentos obtenidos previamente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dos de éstos correspondían a las regiones que flanquean río arriba y río abajo al gen *SSK1* (400 pb), la finalidad de estos fragmentos es la de permitir el reconocimiento de sus secuencias homologas durante el proceso de recombinación. De acuerdo a lo establecido por Alderton *et al.*, (2006). Se pueden utilizar secuencias homologas de 90 pb a 400 pb para asegurar la recombinación homóloga una vez realizada la transformación (Fig.27). Además, se aseguró que estos fragmentos tuvieran secuencias adicionales de un tamaño de 20 pb en sus regiones río abajo y río arriba respectivamente, éstas forman parte de la región promotora y terminadora del gen *Sh ble* que otorga resistencia a zeocina. Lo mismo se hizo para el fragmento del cassette de resistencia, ya que contenía secuencias pertenecientes a los fragmentos de 400 pb antes mencionadas. Esto se hizo con el fin de facilitar la fusión de los tres fragmentos, permitiendo el reconocimiento sus secuencias complementarias, así también, como asegurar que el gen *Sh ble* se pueda expresar una vez transformada la cepa. Como marcador de resistencia se utilizó el cassette de zeocina obtenido del plásmido pTEF1/Zeo. La zeocina es un antibiótico análogo de la fleomicina producida por *Streptomyces verticillus*, es un antibiótico de amplio espectro, frente a la mayoría de bacterias, hongos filamentosos, levaduras y células vegetales y animales. Provoca la muerte de las células intercalándose en la cadena de DNA e induciendo el rompimiento de la doble cadena.

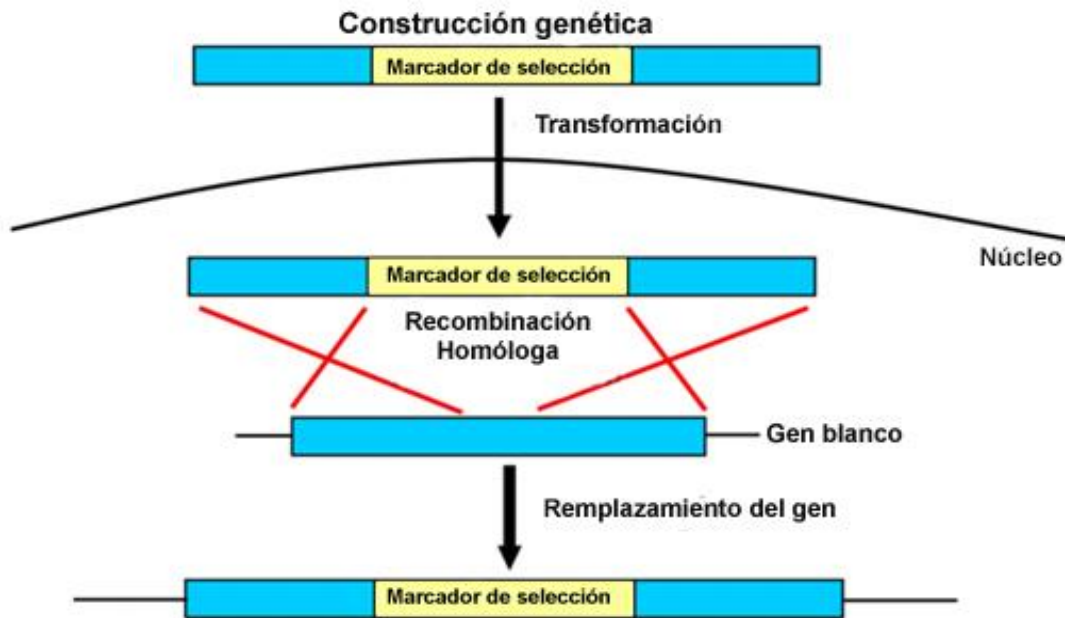


Figura 27: Esquema de la interrupción de un gen mediante recombinación homóloga. Modificado de Kuwayama, 2012.

En la aplicación de la técnica de PCR de doble fusión se observó que es muy importante que la concentración de DNA utilizada se encuentre ajustada a modo de tener una relación molar de 3:1 (3 partes de los fragmentos que flanquean al gen y 1 parte del cassette de resistencia), esto se calcula con base a los nanogramos de DNA iniciales de cada fragmento. También es importante considerar el tipo de enzima utilizada, ya que como reporta Luo *et al.*, (2013). Ésta debe tener una actividad correctora 3'-5' para obtener mejores resultados en la fusión de los fragmentos. El programa de PCR se estableció con base al distribuidor de la enzima utilizada (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Thermo Scientific®) haciendo algunas modificaciones en los tiempos de desnaturalización, alineamiento y polimerización recomendados.

La cepa de referencia de *C. glabrata* fue sometida a ensayos de susceptibilidad a zeocina con el fin de poder determinar la concentración adecuada de este antibiótico a la cual el crecimiento se ve limitado. Estos datos nos ayudaran posteriormente a seleccionar a las cepas transformantes, una vez realizada la transformación. Los resultados nos muestran que *C. glabrata* es capaz de tolerar hasta una concentración de 300 mg/mL de zeocina en medio sólido pero su crecimiento se ve bastante limitado a las 48 h de incubación en los tres inóculos utilizados ( $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  levaduras/mL). En cambio cuando la prueba se realiza en medio líquido, el crecimiento se ve afectado a partir de una concentración de zeocina de 100 mg/mL, este fenómeno se debe a que en el medio líquido la levadura tiene un mayor contacto con la zeocina, a diferencia del medio sólido, por lo que su acción se ve aumentada. Entonces, de acuerdo a estos resultados se ha decidido que una vez realizada la transformación de *C. glabrata*, se procederá a crecer a la cepa en las concentraciones de zeocina antes mencionadas (medio sólido y líquido).

Se llevaron a cabo ensayos de adaptación a estrés osmótico (NaCl) y oxidativo ( $H_2O_2$ ) en la cepa de *C. glabrata* CBS138 con el fin de conocer su respuesta ante este tipo de condiciones. Se observó que la levadura tolera perfectamente concentraciones de 1 M de NaCl a temperaturas de incubación de 28°C y 37°C y se sabe que puede tolerar hasta 1.2 M de NaCl (Gregori, 2007). Además, es capaz de tolerar concentraciones de hasta 30 mM de  $H_2O_2$  pero en este caso sólo a una temperatura de incubación de 37°C, ya que el crecimiento se ve inhibido a esta misma concentración a una temperatura 28°C. Esto se podría deber a que el tiempo de generación de *C. glabrata* se reduce a 37°C (Roetzer *et al.*, 2011), posiblemente a 28°C la temperatura podría estar actuando como un factor de estrés sumado al  $H_2O_2$ , lo que causa la inhibición del crecimiento.

Es bien sabido la que primer línea de defensa durante una infección fúngica es mediada por los fagocitos, tras la fagocitosis del patógeno, éstos producen compuestos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) con el fin de eliminarlo. Es por ello que es de suma importancia que los microorganismos cuenten con sistemas antioxidantes que los protejan del estrés oxidativo generado por los fagocitos durante un proceso de infección. En *C. glabrata* es muy importante la adaptación a condiciones de estrés oxidativo, debido a que lleva a cabo un proceso denominado autofagia, donde es capaz de persistir dentro de los fagocitos, neutralizando a las ROS, inhibiendo la maduración del fagolisosoma y de esta forma puede evadir la respuesta inmune (Roetzer *et al.*, 2011; Briones *et al.*, 2014).

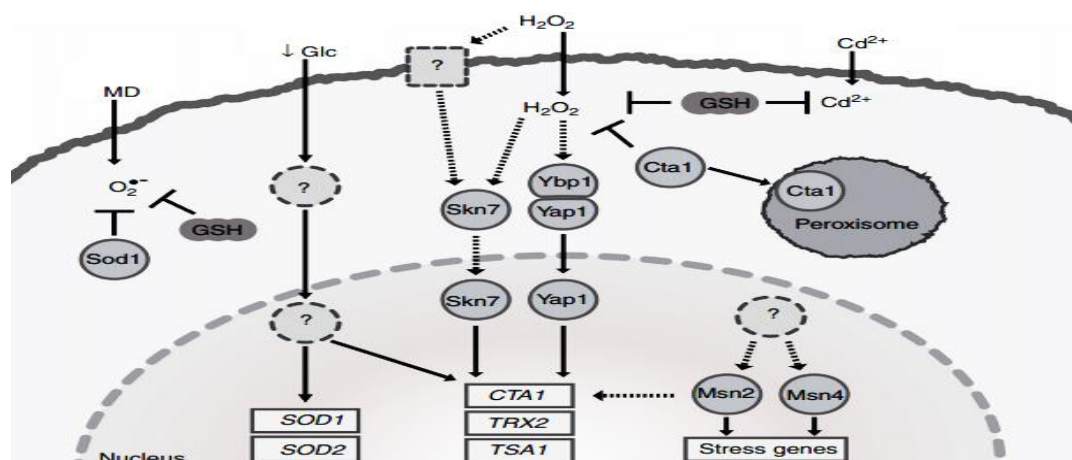


Figura 28: Vías de adaptación a estrés oxidativo en *C. glabrata* (Briones *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, la adaptación a diversas condiciones de estrés ambiental, así como la expresión de ciertos factores de virulencia, se encuentran regulados por diversas vías de señalización entre las que encontramos al sistema de dos componentes. De este modo una de las metas de este trabajo es la de incentivar al estudio de la función que ejercen las diferentes proteínas de este sistema, ya que como lo reporta Guzmán-González (2013), y Shor y Chauhan (2015). Éstas pueden ser utilizadas como un posible blanco terapéutico, y así poder implementar opciones alternativas al tratamiento con antifúngicos.

## 8. CONCLUSIONES

1. La proteína Ssk1 de *C. glabrata* guarda una mayor similitud con la de *S. cerevisiae* que con la de *C. albicans*.
2. Se obtuvo una construcción genética por la técnica de PCR de doble fusión, que posteriormente permitirá el reemplazamiento del gen *SSK1* de *C. glabrata*.
3. El adaptación de *C. glabrata* bajo condiciones de estrés osmótico y oxidativo se ve favorecida a 37°C.
4. *C. glabrata* es sensible a zeocina en una concentración de 300 µg/mL en medio sólido y a 100 µg/mL en medio líquido.



## **9. PERSPECTIVAS**

La construcción genética obtenida de este trabajo será utilizada para la transformación, y posterior caracterización fenotípica y genotípica de *C. glabrata* CBS138. Lo cual, permitirá conocer el papel que tiene el gen *SSK1* de *C. glabrata* en el sistema de transducción de señales de dos componentes y en la adaptación a las diferentes condiciones de estrés ambiental.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, K. M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O. P., & Piškur, J. (2014). Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS yeast research*, 14(4), 529-535.

Alderton, A. J., Burr, I., Mühlischlegel, F. A., & Tuite, M. F. (2006). Zeocin resistance as a dominant selective marker for transformation and targeted gene deletions in *Candida glabrata*. *Mycoses*, 49(6), 445-451.

Arenas, R., (2008). *Micología médica ilustrada.*, México DF, México: McGraw-Hill Interamericana.

Bahn, Y. S. (2008). Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryotic cell*, 7(12), 2017-2036.

Bahn, Y. S., Kojima, K., Cox, G. M., & Heitman, J. (2006). A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular biology of the cell*, 17(7), 3122-3135.

Boyce, K. J., Schreider, L., Kirszenblat, L., & Andrianopoulos, A. (2011). The two-component histidine kinases DrkA and SlnA are required for in vivo growth in the human pathogen *Penicillium marneffeii*. *Molecular microbiology*, 82(5), 1164-1184.

Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juarez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2014). The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 67-71.

Calcagno, A. M., Bignell, E., Rogers, T. R., Jones, M. D., Mühlischlegel, F. A., & Haynes, K. (2005). *Candida glabrata* Ste11 is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Medical mycology*, 43(4), 355-364.

Calera, J. A., Zhao, X. J., & Calderone, R. (2000). Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 68(2), 518-525.

Chauhan, N., & Calderone, R. (2008). Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi. *Infection and immunity*, 76(11), 4795-4803.

Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J. A., & Calderone, R. (2003). *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryotic cell*, 2(5), 1018-1024.

Chauhan, N., Kruppa, M., & Calderone, R. (2007). The Ssk1p response regulator and Chk1p histidine kinase mutants of *Candida albicans* are hypersensitive to fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(10), 3747-3751.

Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., Capparelli, F. J., & del Castillo, M. (2012). [Candida: epidemiology and risk factors for non-albicans species]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 31(6), 380-384.

del Palacio, A., Villar, J., & Alhambra, A. (2009). Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(1), 2-7.

Du, C., Calderone, R., Richert, J., & Li, D. (2005). Deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans* contributes to enhanced killing by human polymorphonuclear neutrophils. *Infection and immunity*, 73(2), 865-871.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., & Straub, M. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35-44.

Fidel, P. L., Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 80-96.

Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., & Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC genomics*, 14(1), 623.

Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 150-159.

Gijón, B. (2008). Identificación del gen *SSK1* que codifica para la proteína reguladora de respuesta en cepas de *Candida glabrata*. IPN-ENCB. México.

González, V. (2013). Análisis de la expresión del gen *SSK1* de *Candida glabrata* en ensayos de patogenicidad *in vitro* (tesis de licenciatura). IPN-ENCB. México.

Gregori, C., Schüller, C., Roetzer, A., Schwarzmüller, T., Ammerer, G., & Kuchler, K. (2007). The high-osmolarity glycerol response pathway in the human fungal pathogen *Candida glabrata* strain ATCC 2001 lacks a signaling branch that operates in baker's yeast. *Eukaryotic cell*, 6(9), 1635-1645.

Gupta, A., Gupta, A., & Varma, A. (2015). *Candida glabrata* candidemia: An emerging threat in critically ill patients. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 19(3), 15 1.

Guzmán-González, K. D., Parra-Ortega, B., Martínez-Rivera, M. A., Hernández-Rodríguez, C., Pérez, N. O., & Rodríguez-Tovar, A. V. (2013). Investigating the role of *Candida glabrata* *SLN1* gene in stress adaptation: In silico and molecular analysis. *African Journal of Microbiology Research*, 7(6), 460-470.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*66:300–372.

Kaur, R., Castaño, I., & Cormack, B. P. (2004). Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(5), 1600-1613.

Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., & Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* 8: 378–384.

Kruppa, M., Krom, B. P., Chauhan, N., Bambach, A. V., Cihlar, R. L., & Calderone, R. A. (2004). The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 1062-1065.

Kuwayama, H. (2012). *Enhancement of Homologous Recombination Efficiency by Homologous Oligonucleotides*. INTECH Open Access Publisher.

Li, D., Agrellos, O. A., & Calderone, R. (2010). Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Current opinion in microbiology*, 13(4), 424-430.

Luo, W. G., Liu, H. Z., Lin, W. H., Kabir, M. H., & Su, Y. (2013). Simultaneous splicing of multiple DNA fragments in one PCR reaction. *Biological procedures online*, 15(1), 1-9.

Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910-938.

Menon, V., De Bernardis, F., Calderone, R., & Chauhan, N. (2008). Transcriptional profiling of the *Candida albicans* Ssk1p receiver domain point mutants and their virulence. *FEMS yeast research*, 8(5), 756-763.

Ng, K. P., Kuan, C. S., Kaur, H., Na, S. L., Atiya, N., & Velayuthan, R. D. (2015). *Candida* species epidemiology 2000–2013: a laboratory-based report. *Tropical Medicine & International Health*.

Rispail, N., & Di Pietro, A. (2010). The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 11(3), 395-407.

Roetzer, A., Gabaldón, T., & Schüller, C. (2011). From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS microbiology letters*, 314(1), 1-9.

Shor, E., & Chauhan, N. (2015). A Case for Two-Component Signaling Systems As Antifungal Drug Targets. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004632-e1004632.

Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 183-215.

Tapia P, Cecilia. (2008). *Candida glabrata*. Revista chilena de infectología, 25(4), 293.

Torres-Rodríguez, J. M. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. Control de Calidad SEMC.

Tscherner, M., Schwarzmüller, T., Kuchler, K., (2011). Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*. 4(1):169-186.

Vallejo, M. C., & Mayinger, P. (2015). Delayed turnover of unphosphorylated Ssk1 during carbon stress activates the yeast Hog1 MAP kinase pathway. *PLoS one*, 10(9), e0137199.

Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (2011). Candidiasis. In *Essentials of Clinical Mycology* (pp. 167-206). Springer New York.

Zhi, H., Tang L, Xia Y, Zhang J., (2013). Ssk1p-Independent Activation of Ssk2p Plays an Important Role in the Osmotic Stress Response in *Saccharomyces cerevisiae*: Alternative Activation of Ssk2p in Osmotic Stress. *PLoS ONE* 8(2): e54867.

## URL

1. <http://www.genolevures.org/cagl.html#>
2. <http://www.hardydiagnostics.com/articles/Candida-glabrata.pdf>
3. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001789>
4. <http://prosite.expasy.org/PDOC50110#description>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EWG89805.1>
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAD55813.1>
7. <http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/nicedoc.pl?PS50110>

## 11. APÉNDICE

### Medio YPD (Peptona Dextosa Extracto de Levadura)

- Peptona 2 g
- Dextrosa 2 g
- Extracto de levadura 1 g
- Agar 1.8 g

Mezclar todos los componentes en 100 mL de agua destilada, calentar a ebullición agitando constantemente hasta disminuir la turbidez. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura tolerable al tacto y vaciar en placas Petri aproximadamente 15 mL por placa. Someter a prueba de esterilidad a temperatura ambiente por 24 h.

### Medio LB + Ampicilina (100 µg/mL)

- Triptona 1 g
- NaCl 1 g
- Extracto de levadura 0.5 g
- Agar 1.5 g

Mezclar todos los componentes en 100 mL de agua destilada, calentar a ebullición agitando constantemente hasta disminuir la turbidez. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura tolerable al tacto, añadir 200 µL de ampicilina (50 mg/mL), mezclar perfectamente y vaciar en placas Petri aproximadamente 15 mL por placa. Someter a prueba de esterilidad a temperatura ambiente por 24 h.

### Solución PBS 10x

- KCl 1 g
- NaCl 40 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 g

Mezclar todos los componentes en 500 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. (Ajustar a 1x para todos los experimentos).