



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

TEMA DE TESIS:

**“Efecto del suero sanguíneo de origen humano
en la diferenciación del hongo dimórfico *Mucor
circinelloides* “**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p. Q.F.B. MAYRA XOCHITL DURÁN MALDONADO

ASESOR DE

TESIS:

D.C. VICTOR MEZA CARMEN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS

MORELIA, MICHOACAN. FEBRERO DEL 2016

“EFECTO DEL SUERO SANGUINEO DE ORIGEN HUMANO EN LA DIFERENCIACION DEL HONGO DIMORFICO *Mucor circinelloides*”

INDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Generalidades de los hongos	9
1.2 Criterios de clasificación de los hongos	9
1.3 Factores de virulencia de los hongos.....	10
1.4 Infecciones fúngicas.....	11
1.4.1 Infecciones fúngicas no invasivas.....	13
1.4.1.1 Principales agentes etiológicos de las infecciones fúngicas no invasivas ...	14
1.4.1.2 Micosis subcutáneas	15
1.4.1.3 Epidemiología de las infecciones fúngicas no invasivas.....	15
1.4.2 Infecciones fúngicas invasivas o sistémicas	16
1.4.2.1 Principales agentes etiológicos de las infecciones fúngicas invasivas.....	17
1.4.2.1.1 <i>Candida albicans</i>	19
1.4.2.1.2 <i>Aspergillus</i>	21
1.4.2.2 Epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas (IFI).....	22
1.5 <i>Mucor circinelloides</i>	23
1.5.1 Generalidades.....	23
1.5.2 Transiciones morfológicas en <i>M. circinelloides</i>	24
1.5.3 Genes involucrados en la diferenciación morfológica en <i>M. circinelloides</i>	25
1.6 Mucormicosis	27
1.6.1 Generalidades.....	27
1.6.2 Epidemiología de la mucormicosis	31
1.6.3 Variedades clínicas de la mucormicosis	32
1.6.3.1 Mucormicosis rinocerebral.....	33
1.6.3.2 Mucormicosis pulmonar.....	34
1.6.3.3 Mucormicosis digestiva.....	35

1.6.3.4	Mucormicosis cutánea.....	35
1.6.4	Diagnóstico de las mucormicosis.....	35
1.6.5	Los componentes sanguíneos de origen humano.....	36
1.6.5.1	Obtención del plasma sanguíneo	36
1.6.5.2	Plasma fresco congelado.....	38
1.6.5.2.1	Componentes del plasma	38
1.6.5.2.2	Funciones del plasma	39
1.6.5.3	Suero sanguíneo de origen humano	39
1.6.6	Cultivos para el diagnóstico de mucormicosis	40
1.6.7	Tratamiento de la mucormicosis	42
2.	JUSTIFICACIÓN	43
3.	HIPÓTESIS.....	44
4.	OBJETIVOS.....	44
5.	MATERIALES.....	45
5.1	Cepas utilizadas.....	45
5.2	Medios de cultivo	45
5.3	Plasma de origen humano	45
5.4	Conservador CPD para sangre entera.....	45
5.6	Solución salina biológica	45
5.7	Otros materiales utilizados	46
5.8	Equipos	46
6.	MÉTODOS.....	46
6.1	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i>	46
6.2	Obtención del suero de origen humano	47
6.3	Crecimiento de <i>M. circinelloides</i> con diferentes concentraciones de suero	47
6.4	Desnaturalización de suero y plasma de origen humano.....	47
6.5	Crecimiento radial y esporulación de <i>M. circinelloides</i> con suero y plasma normales y desnaturalizados	48
6.6	Crecimiento aeróbico y anaeróbico de <i>M. circinelloides</i> con 10% de suero o plasma de origen humano	48
6.7	Germinación aeróbica y anaeróbica de <i>M. circinelloides</i> con 10% de suero o plasma de origen humano	49
6.8	Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura de <i>M. circinelloides</i>	49

6.9 Análisis de imágenes	49
6.10 Cuantificación del crecimiento celular	50
6.11 Tratamiento con el anticoagulante CPD	50
7. RESULTADOS	51
7.1 Germinación aeróbica a diferentes concentraciones de suero humano	51
7.2 Crecimiento en medio sólido de <i>M. circinelloides</i>	51
7.3 Germinación aeróbica de <i>M. circinelloides</i> en suero y plasma desnaturalizados.....	52
7.4 Germinación anaeróbica de <i>M. circinelloides</i> en suero y plasma desnaturalizados .	60
7.5 Germinación de <i>M. circinelloides</i> en solución de CPD/SSB al 10%	60
7.6 Transiciones morfológicas de <i>M. circinelloides</i> en suero humano	61
8. DISCUSIÓN	70
9. CONCLUSIÓN	75
10. REFERENCIAS	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de factores de virulencia estudiados en hongos.....	12
Tabla 2 Clasificación clínica de las micosis.....	14
Tabla 3. Principales agentes causantes de infecciones fúngicas invasivas.....	18
Tabla 4. Micosis sistémicas diagnosticadas en el Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS entre 1996 y 2005.....	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i> en cultivo líquido.....	26
---	----

Figura 2. Clasificación taxonómica de los agentes etiológicos de la mucormicosis.	30
Figura 3. Imágenes de una paciente de 16 años tomadas con 96 horas de diferencia.....	34
Figura 4. Cultivo de <i>Mucor spp.</i> desarrollado sobre Agar Sabouraud Dextrosa ADS.....	41
Figura 5. Morfología de <i>Rhizopus</i> y <i>Mucor</i> al microscopio.....	41
Figura 6. Efecto del suero sanguíneo de origen humano sobre la germinación de la cepa R7B de <i>M. circinelloides</i> en condiciones de aerobiosis.....	53
Figura 7. Aspecto morfológico de <i>M. circinelloides</i> durante la germinación aeróbica con diferentes concentraciones de suero.....	54
Figura 8. Efecto de suero sanguíneo de origen humano en el crecimiento radial de la cepa R7B de <i>M. circinelloides</i> en aerobiosis.....	55
Figura 9. Efecto del suero plasma sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado sobre la esporulación de <i>M. circinelloides</i> en condiciones aeróbicas.....	56
Figura 10. El efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en la germinación aeróbica de <i>M. circinelloides</i>	57
Figura 11. Aspecto morfológico de <i>M. circinelloides</i> durante la germinación aeróbica con suero y plasma nativos y desnaturalizados.....	58
Figura 12. Efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en el crecimiento micelial de <i>M. circinelloides</i>	59
Figura 13. El efecto del suero y plasma sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en la germinación anaeróbica de <i>M. circinelloides</i>	62
Figura 14. Aspecto morfológico de <i>M. circinelloides</i> durante la germinación anaeróbica con suero y plasma nativos y desnaturalizados.....	63
Figura 15. Efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en el crecimiento levaduriforme de <i>M. circinelloides</i>	64
Figura 16. Efecto del anticoagulante CPD en la germinación aeróbica de <i>M. circinelloides</i>	65
Figura 17. Efecto del anticoagulante CPD en el crecimiento micelial de <i>M. circinelloides</i>	66

Figura 18. Efecto del suero en la transición morfológica levadura-micelio de <i>M. circinelloides</i>	67
Figura 19. Apariencia morfológica de <i>M. circinelloides</i> durante la transición levadura-micelio.....	68
Figura 20. Efecto del suero en la transición morfológica micelio-levadura de <i>M. circinelloides</i>	69

RESUMEN

La proliferación y diferenciación celular son procesos complejos en los que intervienen de manera importante proteínas que se pueden ver afectadas en su actividad por diversos factores, tal es el caso del hongo dimórfico *Candida albicans*, el cual en presencia de suero humano cambia de un estado levaduriforme a uno micelial, a través de una vía de transducción de señal mediada por un receptor acoplado a proteína G heterotrimérica y que es dependiente de AMPc.

Mucor circinelloides es un hongo zigomiceto dimórfico, capaz de generar levaduras (en ausencia de oxígeno) o micelio (en presencia de oxígeno) dependiendo del medio de cultivo. Recientemente se ha señalado a *M. circinelloides* como un agente infeccioso en pacientes inmunocomprometidos. Por lo tanto es de nuestro interés el conocer si de igual modo que en *C. albicans*, el suero sanguíneo de origen humano puede intervenir en la diferenciación y/o crecimiento de *M. circinelloides*.

En esta investigación se realizaron ensayos para evaluar en efecto del suero sanguíneo de origen humano en los diferentes estadios de la cepa R7B de *M. circinelloides* obteniendo un aumento de hasta 80% tanto en la germinación aeróbica y anaeróbica en 10% de suero con respecto a la germinación en medio YPG de aproximadamente el 50%, al igual que en la generación de biomasa; diferencias morfológicas en las transiciones dimórficas, donde el micelio presenta mayor ramificación en el crecimiento con suero, mientras que en las levaduras se observan casi dos veces más gemaciones en suero que en YPG. Comprobamos también que dichos efectos no son debidos a una cuestión de nutrientes pues al realizar los mismos ensayos con suero desnaturalizado dichos efectos positivos sobre el crecimiento y diferenciación de *M. circinelloides* disminuyen casi al 55%.

Palabras clave: dimorfismo, suero, micosis invasiva, oportunismo, *Mucor*.

ABSTRACT

Cell proliferation and differentiation are complex processes in which proteins may be importantly involved, and as a result their activity could be affected by many factors. This is the case of the dimorphic fungus *Candida albicans*, which in the presence of human serum switches from yeast to mycelial form, through a G protein-coupled receptor-mediated and AMPc-dependent signal transduction pathway.

Mucor circinelloides is a dimorphic fungus, it is able to generate yeast (if grown in the absence of oxygen) or mycelium (if grown in oxygen) depending on the culture medium, this zygomycete can also undergo morphological transitions if certain culture conditions are met. *M. circinelloides* has been recently identified as an infectious agent for immunocompromised patients. For this reason it is of our interest to determine if just as *C. albicans*, the human blood serum may participate in the differentiation and / or growth of *M. circinelloides*.

In this research, we assessed the effect of human blood serum in the germination, biomass yield and morphological transitions of the strain of *M. circinelloides* R7B at different times. We found statistically significant increased germinations in both aerobic and anaerobic (80%) in 10% serum in comparison to YPG (50%). The biomass production was increased when *Mucor* was grown in culture medium supplemented with 10% serum when compared to YPG; in the same way human serum has an effect in morphological transitions, leading to hyperbranching and larger colony radial mycelial growth and we also noticed more yeast cells showing budding bodies. Finally, we can state that these effects are not produced by a nutrient matter, this is because when the same tests were performed with denatured human blood serum, the effects are reduced by 55%.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son componentes indispensables de los ecosistemas, son organismos eucariontes heterótrofos que contribuyen de manera importante a la conservación del ciclo del carbono, ya que son los degradadores de materia orgánica por excelencia (Bennet y col., 2002). En algunos casos, los hongos se encuentran asociados a las raíces de las plantas formando micorrizas, representando éstas un mecanismo de captura de nutrientes muy importante para las plantas. De hecho, los hongos han sido encontrados como simbioses en todas las plantas estudiadas en ecosistemas naturales (Singh y col., 2011).

Estructuralmente presentan pared celular compuesta de polisacáridos y proteínas estructurales, de los cuales los principales polisacáridos son glucana, quitina y quitosana (Xie y Lipke, 2010). La membrana celular contiene ergosterol no encontrado en los demás eucariontes (Mille-Lindblom y col., 2004).

Los hongos pueden existir entre un estado haploide, en el cual cada célula tiene una sola copia de su material genético o en estado diploide con dos copias del material genético.

El tamaño del genoma de los hongos oscila entre 10 y 45 millones de pares de bases de DNA (MB) (Maheshwari, 2005). Comparativamente el genoma del humano tiene 3000 MB (Walbot y Petrov, 2001), y el de la bacteria *Escherichia coli* 4.6 MB (Blattner y col., 1997).

Estos organismos se desarrollan adoptando distintas morfologías celulares: levaduriforme como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, y filamentosa como en *Neurospora crassa*, e incluso pueden producir cuerpos fructíferos como en el caso de *Ustilago maydis* (Papagianni 2003; Cain y col., 2012).

1.2 Criterios de clasificación de los hongos

De acuerdo a la relación que guardan con otros organismos, los hongos se clasifican como saprofitos (obtienen sus nutrientes de organismos muertos), simbioses (viviendo en cooperativismo con otros organismos) o parásitos (viven

de otros organismos sin cooperativismo) (Baron, 1996), pudiendo combinar dichas interacciones en respuesta a ciertas variaciones ambientales (Redman y col., 2001).

Los hongos se reproducen mediante la generación de esporas, las que pueden ser generadas sexual o asexualmente. Las estructuras de donde provienen estas esporas es un criterio de clasificación de los hongos, de tal forma que, si provienen de un saco llamado asco se les llama ascomicetos, si vienen de un basidio son basidiomicetos, o zigomicetos para una estructura denominada esporangio (Sharma, 2005).

Actualmente, la clasificación más aceptada para los hongos proviene del uso de técnicas moleculares tales como la comparación de la secuencia de un gen altamente conservado entre las especies, como el caso del RNA ribosomal 18S, que se encuentra en la subunidad pequeña de los ribosomas. En base a esta última clasificación, el reino *Fungi* se dividió en ocho Phyla distintos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomales*, *Zygomycota*, *Blastocladales*, *Monoblepharidales*, *Chytridiomycota* y *Microsporidia* (Mueller y col., 2004).

1.3 Factores de virulencia de los hongos.

El curso de las enfermedades micóticas, lo determina la interacción del agente con los diferentes mecanismos de defensa naturales y específicos del huésped. Las esporas o fragmentos de micelio de un hongo patógeno, pueden permanecer latentes o germinar sobre la superficie del huésped o si son inhaladas, en los alveolos de los pulmones, las hifas resultantes pueden penetrar los tejidos, colonizarlos, reproducirse y dispersarse, alterando la fisiología del huésped y causando enfermedad.

En el humano, los sistemas de defensa generalmente son efectivos, ya que la mayoría de los hongos que están en el ambiente, no causan enfermedad. El sistema inmune de los mamíferos involucra factores tanto innatos (complemento, fagocitosis, procesos inflamatorios, quimiotaxis) como adaptativos (células y anticuerpos específicos), cuya principal función es mantenernos limpios de

agentes infecciosos; sin embargo, existen situaciones que debilitan esas defensas naturales o adquiridas, haciendo susceptible al huésped.

Los factores de virulencia serán aquellas “propiedades”, generalmente moléculas, que permiten al hongo causar daño o enfermedad en quien lo hospeda. El desarrollo o expresión de tales factores, comienza por estímulos externos a la célula fúngica. Esos estímulos activan cascadas de señalización que provocan compuestos protectores (p. ej. enzimas, determinantes antigénicos, receptores), causantes a su vez del desarrollo de la patogénesis. Existe una compleja red de interacciones que incluyen la participación de muchas moléculas, tanto por parte del huésped como del hongo, que permiten la expresión de diversas vías; el resultado de esa interacción, será evaluado (enfermedad o no) según el nivel de daño causado en el huésped (DMP, UNAM, 2015).

1.4 Infecciones fúngicas

Las infecciones fúngicas también conocidas como micosis son infecciones de importancia y están aumentando su incidencia en huéspedes inmunocomprometidos, como los pacientes que han tenido trasplantes de células madre hematopoyéticas y órganos. A pesar del amplio armamento antifúngico existente, estas infecciones causan una considerable morbilidad y mortalidad. De hecho, han surgido ciertas tendencias en estas infecciones fúngicas invasivas: un aumento en la incidencia de infecciones invasivas por mohos, un aumento en las cepas no albicans de *Candida spp.* causantes de enfermedad invasiva y, por último, la aparición de cepas de hongos menos sensibles que son resistentes a los agentes antifúngicos de más amplio espectro debido a la utilización excesiva de estos agentes. (Chian-Yong y Coleman Rotstein, 2011).

TABLA 1. EJEMPLOS DE FACTORES DE VIRULENCIA ESTUDIADOS EN LOS HONGOS

Agente	Enfermedad	Factor de virulencia	Efecto
<i>Aspergillus</i> spp.	Aspergilosis	“rodlets” (hidrofobinas)	Inhibición de la fagocitosis
<i>Aspergillus</i> spp.	Aspergilosis pulmonar	Gliotoxina	Alentan el movimiento ciliar y lesionan el epitelio de vías respiratorias altas.
Dermatofitos	Tiñas	Queratinasas	Destrucción del estrato córneo
Dermatofitos	Ides	Toxinas	Hipersensibilidad
<i>Cryptococcus</i>	Criptococosis	Cápsula	Inhibición de respuesta inmune (impide migración de células de la inmunidad y propiedades antifagocíticas)
<i>Cryptococcus</i>	Criptococosis	Producción de melanina	Anti-oxidante, resistencia a anfotericina B
<i>Sporothrix</i> spp.	Esporotricosis linfangítica	Producción de melanina	Inhibe la fagocitosis por macrófagos.
Mucorales	Mucormicosis	Ceto-reductasa	Degradan los cuerpos cetónicos presentes en sangre, favoreciendo el crecimiento y diseminación del hongo.
<i>Malassezia</i> spp.	Pitiriasis versicolor hipocrómica	Ácidos dicarboxílicos	Inhibición de la tirosinasa y de la producción de melanina conllevando una menor protección contra los rayos UV y el establecimiento de agentes microbianos dañinos.
<i>Malassezia</i> spp.	Dermatitis seborréica	Fosfolipasas	Destrucción de los ácidos grasos esenciales en la piel causando sequedad
<i>Coccidioides</i> spp.	Coccidioidiomycosis	Elastasas	Destruyen las fibras elásticas de los tejidos.

En los Estados Unidos de 1980 a 1997, el número anual de muertes debido a una micosis invasiva aumentó de 1557 a 6534 casos, es decir un 320% de aumento en 17 años (Chian-Yong y Coleman, 2011). A pesar del extenso arsenal de antifúngicos ahora disponibles, las infecciones fúngicas invasivas siguen produciendo morbi-mortalidad significativas. Esto es porque, con un número creciente de trasplantes de órganos realizados (más de 23,000 órganos fueron trasplantados en los Estados Unidos en 2008, el doble de la cantidad de trasplantados 10 años atrás -Gomes y col., 2011-), junto con el uso de agentes quimioterapéuticos más nuevos y potentes, el total de pacientes inmunocomprometidos está aumentando drásticamente.

La adquisición de una micosis, depende a menudo de factores predisponentes, tales como edad, ocupación, embarazo, quemaduras, inmunodepresión, quimioterapia, radiación, uso de catéteres, procesos malignos o enfermedades metabólicas en las personas. Las formas infectantes se adquieren habitualmente del ambiente, ya sea por contacto directo (dermatofitos) por inhalación (*Coccidioides*) o lesiones de continuidad (*Sporothrix*). Otras, se pueden contraer o provienen de la microbiota normal, como sucede en la micosis oportunista ocasionada por *Candida*.

Las respuestas tisulares más frecuentes que inducen los hongos, cuando causan una micosis son: Inflamación aguda supurativa, Inflamación crónica e Inflamación granulomatosa.

1.4.1 Infecciones fúngicas no invasivas

En este grupo de infecciones se encuentran aquellas que parasitan algún órgano específico y que no llegan a extenderse a otros órganos adyacentes o viajar a través de la sangre o los ganglios linfáticos, por ejemplo, aquellas que son superficiales y que únicamente infectan la capa exterior de la piel, las uñas o las mucosas. Además estas no están condicionadas por un debilitamiento de sistema inmune del paciente, sino por otros factores predisponentes.

TABLA 2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS MICOSIS		
Tipos	Enfermedad	Hongo (Género)
Superficial: Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas	Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis	<i>Malassezia</i> <i>Hortaea</i> <i>Trichophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i>
Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo	Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis	<i>Madurella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Fonsecaea</i>
Sistémico o profundo: Uno o más órganos / tejidos profundos	Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis Coccidioidomicosis	<i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Coccidioides</i>
Oportunista: Diversos órganos. Topográficamente pueden ser superficiales, subcutáneas o sistémicas, pero son causadas por hongos inocuos En un sujeto susceptible, cualquier hongo puede ser un oportunista	Candidiasis Criptococosis Zigomicosis	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhizopus, Mucor</i>

Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011.
(<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

1.4.1.1 Principales agentes etiológicos de las infecciones fúngicas no invasivas

Dentro de estas infecciones se engloban muchos géneros y especies de hongos y diferentes tipos de infecciones según el área anatómica que infectan. Un ejemplo común son las infecciones cutáneas en el ser humano que incluyen una amplia variedad de procesos en los que pueden estar afectados la piel y sus anexos (pelos y uñas). El término dermatomicosis se refiere a cualquier proceso micótico de la piel, y el de dermatofitosis, al causado por hongos dermatofitos (Gomes et al, 2011).

Se denomina dermatofitosis a la infección de los tejidos queratinizados (piel, pelos y uñas) ocasionada por un grupo de hongos queratinofílicos, taxonómicamente relacionados, a los que se ha denominado dermatofitos. La infección puede estar limitada a la capa córnea o llegar a estratos más profundos, sin invasión linfática. Los agentes etiológicos se clasifican en tres géneros diferentes: *Microsporum* (Gruby, 1843), *Trichophyton* (Malmsten, 1845) y *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907).

1.4.1.2 Micosis subcutáneas

Son infecciones del tejido subcutáneo asociado a dermis y epidermis, causadas por hongos saprofitos cuyo hábitat es el suelo y las plantas. La puerta de entrada es la inoculación traumática de material contaminado: astillas, espinas u otros objetos punzantes, por lo que también se denominan micosis de implantación. Esta circunstancia permite agrupar a un conjunto heterogéneo de infecciones causadas por hongos taxonómicamente muy diversos y cuyo denominador común es la puerta de entrada en el huésped. En nuestro país la micosis subcutánea más importante es la esporotricosis, seguida de la feohifomicosis subcutánea.

Los agentes que producen micosis cutáneas y subcutáneas con mayor frecuencia son *Sporothrix schenckii*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala moniliae*, *Wangiella dermatitidis* y *Phialophora richarsidae* (Marak y col., 2010).

1.4.1.3 Epidemiología de las infecciones fúngicas no invasivas

Estas micosis se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en el mundo y, dado que producen lesiones fácilmente observables, su presencia en el ser humano está documentada a lo largo de la historia (Kwon-Chung, 2012). La incidencia varía notablemente de unos países a otros y también las especies

que las producen. Los hongos dermatofitos pueden clasificarse en especies antropofílicas, zoofílicas y geofílicas, según cual sea su hábitat preferente: el ser humano, los animales o el suelo. En el ser humano las especies antropofílicas suelen producir cuadros más crónicos que las zoofílicas y geofílicas. *Trichophyton mentagrophytes* es una especie zoofílica que parasita un elevado número de especies animales (conejos, caballos, cerdos, gallinas, etc.) por lo que la infección en el medio rural es más frecuente que en el urbano. *Microsporum canis* parasita a perros y gatos que son animales de compañía en las ciudades y, juntamente a *T. mentagrophytes*, son los más abundantes en Aragón (Husain y col., 2003; Leventakos y col., 2010). *Trichophyton verrucosum* infecta el ganado bovino por lo que su incidencia es alta en la provincia de Salamanca, España (Marr y col., 2002), donde existe ganadería de reses bravas y en nuestro medio da lugar a procesos supurados granulomatosos en el antebrazo. La especie *Trichophyton rubrum* produce habitualmente tiña unguium en las uñas del pie, cuadro crónico muy resistente al tratamiento.

Además de las infecciones primarias, en la piel también pueden encontrarse lesiones granulomatosas o de otro tipo, como expresión de las metástasis de una micosis sistémica o invasiva.

1.4.2 Infecciones fúngicas invasivas o sistémicas

Las infecciones fúngicas invasivas se hacen presentes en personas con sistema inmune debilitado, ya sea por enfermedades como cáncer, diabetes, SIDA o personas que han sido trasplantadas con órganos o células hematopoyéticas, lo cual los hace susceptibles a patógenos oportunistas, algunos de los cuales normalmente no causan enfermedades graves.

1.4.2.1 Principales agentes etiológicos de las infecciones fúngicas invasivas

Tres clases principales de hongos causan la infecciones invasivas: levaduras, mohos y hongos dimórficos. Las levaduras, que incluyen *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, y *Trichosporon spp.*, carecen de hifas verdaderas, y la infección se relaciona con invasión a través de las defensas del huésped comprometido. Los mohos, que incluyen *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y los agentes causantes de mucormicosis (mucorales no dimórficos, *Rhizopus*, *Absidia*), se transmiten a través de la inhalación en forma de esporas y estos organismos tienen hifas verdaderas. Los hongos dimórficos, *Blastomices*, *Histoplasma* y *Coccidioides*, tienen dos formas; de levadura y de hifas y generalmente se limitan a zonas geográficas específicas. La mayoría de las infecciones fúngicas en pacientes de cáncer son causados por *Candida* y *Aspergillus*. En las últimas dos o tres décadas, ha habido una tendencia creciente y el reconocimiento de las infecciones no candidiásicas, especialmente las causadas por hongos no *Aspergillus* (Aragon, 2014).

TABLA 3. PRINCIPALES AGENTES CAUSANTES DE INFECCIONES FUNGICAS INVASIVAS

Patógeno	Tipo de infección	Tratamiento de elección
<i>Candida spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. albicans</i> • <i>C. krusei</i> • <i>C. tropicalis</i> • <i>C. glabrata</i> • <i>C. parapsilosis</i> • <i>C. lusitaniae</i> 	Mucocutánea Infección en la sangre Endocarditis Diseminada (Hepatomegalia) Ocular	Azoles • <i>C. krusei</i> y <i>C. glabrata</i> son resistentes Equinocandinas • <i>C. parapsilosis</i> es resistente Polienos
<i>Tricosporon spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>T. asahii</i> • <i>T. asteroides</i> • <i>T. cutaneum</i> • <i>T. inkin</i> • <i>T. mucoides</i> • <i>T. ovoides</i> • <i>Geotrichum capitatum</i> 	Cutánea Neumonía	Fluconazol
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Neumonía	TMP–SMX Pentamidina Primaquina ? clindamicina Atovaquona
<i>Cryptococcus spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>C. neoformans</i> • <i>C. gattii</i> 	Neumonía Cutánea Meningoencefalitis	AMB-D/L-AMB ? 5-FC *Diseminada y enfermedad del SNC Fluconazol
<i>Aspergillus spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>A. fumigatus</i> • <i>A. terreus</i> • <i>A. flavus</i> • <i>A. niger</i> 	Neumonía Sinusitis Cerebral	Voriconazol Polienos
Mucormicosis <i>Mucor spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhizopus spp.</i> • <i>Rhizomucor spp.</i> • <i>Cunninghamella spp.</i> • <i>Absidia spp.</i> • <i>Basidiobolus spp.</i> • <i>Conidiobolus spp.</i> 	Sino-orbital Rinocerebral Neumonía	L-AMB AMB-D Posaconazol
<i>Fusarium spp.</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>F. solani</i> • <i>F. oxysporum</i> 	Sino-pulmonar Piel y tejido blando Fungemia	Voriconazol Posaconazol
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Neumonía, Linfadenitis Diseminada (SNC, medula ósea, piel)	AMB-D, L-AMB Itraconazol

AMB-D anfotericina B deoxicolato; 5-FC 5-flucitosina; L-AMB anfotericina B lipídica; TMP–SMX trimetoprim–sulfametoxazol. Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

1.4.2.1.1 *Candida albicans*

El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad (Pfaller y Diekema, 2007).

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista en mamíferos, entre ellos el hombre, que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida, predominantemente, en individuos con el sistema inmune debilitado. *C. albicans* al igual que otros patógenos tiene la capacidad de adherirse y formar biopelículas en aparatos implantados, especialmente catéteres intravasculares lo que les confiere mayor resistencia a antifúngicos. (Laforet-Aguilera, 2010).

C. albicans es una levadura comensal, presente en las mucosas de los seres humanos y los animales de sangre caliente (Brown y col., 2007; Greene y Chandler, 2006), siendo habitualmente aislada de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y urogenital, y su conversión en agente patógeno depende principalmente de la alteración del equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del hospedador. Sin embargo al infectar a pacientes inmunosuprimidos causa infecciones sistémicas en donde al estar en contacto con el suero sanguíneo hay un cambio dimórfico a micelio, el cual está mediado por un receptor acoplado a proteína G heterotrimerica, mecanismo dependiente de AMPc. Se ha demostrado que en mutantes carentes de Gpr1 (*gpr1/gpr1*) que codifica para el receptor acoplado a proteína G y Gpa1 (*gpa1/gpa1*) que codifica para una subunidad G α del heterotrímero, se interrumpe el cambio de levadura a hifas haciendo que aumente la virulencia del hongo, esto sumado al estado de inmunosupresión en el paciente genera una situación de mayor riesgo que en una infección por *C. albicans* en forma de levadura (Takuya Miwa y col., 2004).

La clasificación, de las distintas especies del género *Candida*, se basa en la capacidad de asimilar y fermentar distintos compuestos, empleándose auxonogramas con este fin. En la actualidad se emplean, además, técnicas

moleculares como movilidad electroforética de isoenzimas, polimorfismos en genes, técnicas RAPDs (“Random Amplification of Polymorphic DNA”), secuenciación de genes (subunidad ribosomal grande y pequeña, beta-tubulina etc...), entre otras técnicas (Kurtzman, 2000).

La candidiasis es una infección común producida por diferentes especies del género *Candida*. Aunque *C. albicans* ha sido la especie más significativa en las últimas décadas, las especies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, y *C. lusitanae* entre otras, se aíslan de forma frecuente como agentes causales de infecciones. Otras especies aisladas frecuentemente son, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guilliermondii* y *Debariomyces hanseii*, anteriormente incluidas dentro del género *Candida*. (Laforet- Aguilera, 2010).

Las candidiasis se clasifican generalmente en superficiales y profundas. Las candidiasis superficiales afectan principalmente a la piel y a las mucosas oral y genital. Las candidiasis profundas producen lesiones agudas o crónicas que pueden afectar a uno o más órganos, y generalmente terminan en una septicemia, denominándose entonces candidiasis sistémicas o diseminadas. Se observan principalmente en pacientes inmunocomprometidos y suelen ser de pronóstico grave.

La mortalidad puede superar el 50%, aunque hay que tener en cuenta que casi siempre aparece como complicación a una enfermedad grave, con lo que el índice de mortalidad aumenta (Verduyn Lunel y col., 1999). El diagnóstico de las candidiasis superficiales se realiza mediante criterios clínicos, junto con la observación al microscopio de muestras de lesiones o cultivos selectivos. Hay que tener en cuenta que un cultivo positivo demuestra la presencia de *Candida* pero no la infección.

En las candidiasis sistémicas resulta más complicado llegar a un diagnóstico seguro. En la actualidad se dispone de una serie de métodos sensibles y específicos, para el diagnóstico, entre ellos se encuentran: detección de antígenos circulantes contra mananos (Matthews, 1996; Mitsutake y col., 1996), utilización de anticuerpos específicos para la identificación de *Candida spp.* (Marcilla y col., 1999) y técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

(Bartie y col., 2001; Chang y col., 2001; Fujita y col., 2001; García, 2008) diseñadas especialmente para la detección de especies de *Candida* a partir de aislados clínicos.

La candidiasis invasora y la candidemia se han asociado con aumento elevado de mortalidad oscilando entre un 30 y un 81% (Chang y col., 2008). Adicionalmente, la introducción de nuevos antifúngicos durante la década pasada no ha llevado consigo una disminución significativa de estos porcentajes (Fridkin, 2005).

1.4.2.1.2 *Aspergillus*

La infección por *Aspergillus* es la infección invasiva por moho más común encontrado en individuos con malignidad. Hay más de 200 especies de *Aspergillus*, pero sólo una causa pocas enfermedades en los seres humanos, es decir, *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. niger* (Leventakos K y col, 2010).

Considerado hasta el momento como una causa inusual de infección, el género *Aspergillus* se ha revelado como una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Patterson TF y col., 2000; Denning DW y col., 2002). En la actualidad, la aspergilosis invasiva constituye la causa más frecuente de mortalidad por neumonía infecciosa en pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) y una causa importante de infección diseminada y respiratoria oportunista en otros pacientes inmunocomprometidos (Benjamin DK y col., 2002 y Wald A y col., 1997). Además, el género *Aspergillus* también produce una amplia variedad de enfermedades crónicas, saprofitas y alérgicas. Si bien otras formas de aspergilosis, como la Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), la sinusitis alérgica y la infección saprofitica, también son causas de morbilidad, rara vez son potencialmente mortales.

En *Aspergillus fumigatus* es la especie aislada con mayor frecuencia de los casos de aspergilosis invasiva (Perfect JR y col., 2001). Las especies que le siguen en frecuencia son *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* (Walsh TJ y col., 2001).

Ocasionalmente, algunas instituciones presentan un predominio de *A. flavus* o *A. terreus* como las especies aisladas más comunes de *Aspergillus* (Anaissie E, 1992).

La aspergilosis causa afecciones que se definen clásicamente como invasivas, saprofiticas o alérgicas (Barnes PD y col., 2006). Entre las enfermedades invasivas causadas por el género *Aspergillus* se encuentran las infecciones de las vías respiratorias bajas, senos paranasales y piel como sitios de acceso. El SNC, el sistema cardiovascular y otros tejidos pueden resultar contagiados por diseminación hemática o extensión directa de los focos de infección contiguos. El compromiso saprofítico incluye la otomicosis por *Aspergillus* y el aspergiloma pulmonar.

1.4.2.2 Epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas (IFI)

La epidemiología de las infecciones fúngicas invasivas en pacientes con cáncer está cambiando continuamente. En la década de 1980, las especies de *Candida* tuvieron un papel importante en la infección en pacientes de cáncer, y la candidiasis fue más frecuente que las infecciones causadas por hongos. Con la introducción de antifúngicos azoles, se observó un cambio en hongos patógenos. Los azoles ofrecidos aumentaron la tolerabilidad, en comparación con antifúngicos de polieno, y su uso generalizado como profiláctico condujo a una disminución en la incidencia de infecciones por *Candida* (Marr KA, 2010). Junto con esta disminución, ha habido un aumento en infecciones causadas por *Candida albicans* no-levadura, *Aspergillus*, y otros mohos en las dos últimas décadas.

La verdadera incidencia de las IFI es difícil de evaluar ya que gran parte de los datos provienen de centros individuales o estudios retrospectivos regionales, con la mayoría de los estudios que tienen una incidencia que oscila entre 5 y 30% en pacientes con cáncer. Durante las últimas dos décadas, ha habido un cambio en los agentes causantes de IFI, con un incremento en las infecciones por hongos tales como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y los agentes causantes de mucormicosis (Husain S y col. 2003; Marr KA et al, 2002).

Los estudios de autopsia del Anderson Cancer Center han evaluado la prevalencia de la IFI de 1989 a 2003. Durante el período de estudio, la tasa global de IFI se mantuvo estable en aproximadamente el 30%. El hallazgo importante fue un aumento en la prevalencia de infecciones invasivas por mohos, de 60 a 76%, y una disminución correspondiente en las infecciones por *Candida*, de 40 a 26%. El aumento principal se observó en las infecciones causadas por *Aspergillus spp*, hongos endémicos y en mucormicosis (Leventakos K y col., 2010; Chamilos G y col., 2005).

1.5 *Mucor circinelloides*

1.5.1 Generalidades

El hongo *M. circinelloides* es un zigomiceto dimórfico (Lübbehüsen y col., 2003). Es un modelo de estudio en la regulación de diferenciación celular, respuestas celulares a la luz (Murcia-Flores y col., 2007). Se considera como un patógeno emergente en pacientes inmunodeprimidos (Bastidas y col., 2012), se le ha asociado también a la contaminación de frutos como el noni (Nishijima y col., 2011); además recientemente se le considera como posible fuente de ácidos grasos para la obtención de fuentes de energía renovables como el biodiesel (Xia y col., 2011). Su metabolismo fermentativo ha sido investigado a la par de la obtención de etanol, además de que se ha evaluado el rendimiento de esta producción modificando condiciones de crecimiento (Wikandariy col., 2012).

El evento diferenciativo más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo (Lübbehüsen y col., 2003). No obstante *M. circinelloides* presenta otros eventos diferenciativos, como la síntesis de carotenos, inducida por la presencia de luz (Murcia-Flores y col., 2008), generando colonias con tonalidad amarillenta a diferencia de colonias crecidas en obscuridad que son albinas. Además el desarrollo de estructuras reproductivas y la esporulación igualmente se ven acelerados por la presencia de luz.

M. circinelloides ha sido estudiado como huésped heterólogo para la producción de enzimas importantes de carácter industrial, como el efecto del dimorfismo en el proceso de producción y actividad enzimática de glucosa

oxidasa. Encontrándose una mayor producción de esta enzima durante la morfología levaduriforme (Bredenkamp y col., 2010).

El genoma de este organismo ha sido secuenciado recientemente y está disponible en la red (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). El material genómico de este organismo está distribuido en 9 cromosomas tratándose de 11,719 genes en 36.6 millones pares de bases (Mb) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2804>). Se trata de un tamaño de genoma similar en comparación con otros hongos, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* tiene 12 Mb (Kruglyak y col., 2000), *Aspergillus nidulans* con 30 Mb (David y col., 2008), en el basidiomiceto *Ustilago maydis* 20 Mb (Kämper y col., 2006), y en los zigomicetos *R. oryzae* con 45.3 Mb (Ma y col., 2009), *P. blakesleeanus* con 30 Mb (Corrochano y Ruiz-Albert, 2004).

1.5.2 Transiciones morfológicas en *M. circinelloides*

Algunas especies del género *Mucor* son capaces de generar tres tipos esporas: 1) zigosporas productos de la recombinación genética, 2) las esporangiosporas sirven como mecanismo de dispersión y 3) las artrosporas aseguran la supervivencia bajo condiciones de crecimiento adversas (Orlowski, 1991). La reproducción sexual sucede cuando hay fusión de hifas de origen homotálico o heterotálico y conduce finalmente a la formación de zigosporas.

La zigospora permanece en reposo durante muchas semanas o meses antes de germinar y producir una estructura alargada conocida como esporangioforo que presenta un cuerpo esférico en la punta conocida como esporangio del cual se desprenden las esporangiosporas. Las esporangiosporas son elipsoidales y aunque derivan exclusivamente del hábitat miceliar del género *Mucor* son capaces de desarrollar hacia la morfología levaduriforme o miceliar dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y la fuente de Carbono (Lübbehüsen y col., 2003). Si las esporangiosporas se crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis *M. circinelloides* su crecimiento es polarizado (filamentos) (Figura 1). Además del ambiente gaseoso,

el crecimiento levaduriforme en el caso de *M. rouxii* requiere que una fuente de carbono fermentable (Bartnicki-Garcia, 1968).

Los crecimientos filamentosos y levaduriformes de *M. circinelloides* no son terminales y puede haber conversión de levadura a micelio o de micelio a levadura, esto modificando las condiciones de crecimiento (McIntyre y col., 2002). Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas, es decir no presentan septos (divisiones). Por otro lado, las levaduras son, esféricas y multinucleadas (Ocampo y col., 2012).

La artrospora es la estructura menos estudiada y entendida del género *Mucor*, y se ha propuesto su funcionalidad como un mecanismo de supervivencia ya que se forma al fin del crecimiento logarítmico o bajo condiciones nutricionales desfavorables (Orlowski, 1991).

1.5.3 Genes involucrados en la diferenciación morfológica en *M. circinelloides*

Se ha comprobado la participación de diversos genes cuyos productos participan en el dimorfismo de *M. circinelloides*, como es el caso de la proteína cinasa A (PKA) la cual es activada por el AMPc, que fosforila sustratos proteicos específicos en residuos de serina y treonina. La PKA consiste en dos subunidades regulatorias (PKAR) que se unen e inhiben la actividad de dos subunidades Catalíticas (PKAC). La unión del AMPc a las cadenas PKAR resulta en la liberación de las subunidades PKAC y se desencadena la cascada de fosforilación que resulta en cambios en la morfogénesis y en el dimorfismo (Wolff y col., 2002).

La participación de PKA en el crecimiento polarizado ha sido evidenciada usando análogos de AMPc como N6-monobutiril-AMPc, N6-benzoil-AMPc (Sorol y col., 2000). Estos análogos imitan la actividad del AMPc y resulta en crecimiento levaduriforme en condiciones aeróbicas. La regulación conferida por el AMPc es muy importante, ya que al remover los análogos hay una transición morfológica inmediata de crecimiento isotrópico a filamentosos (Wolff y col., 2002; Ocampo y col., 2009).

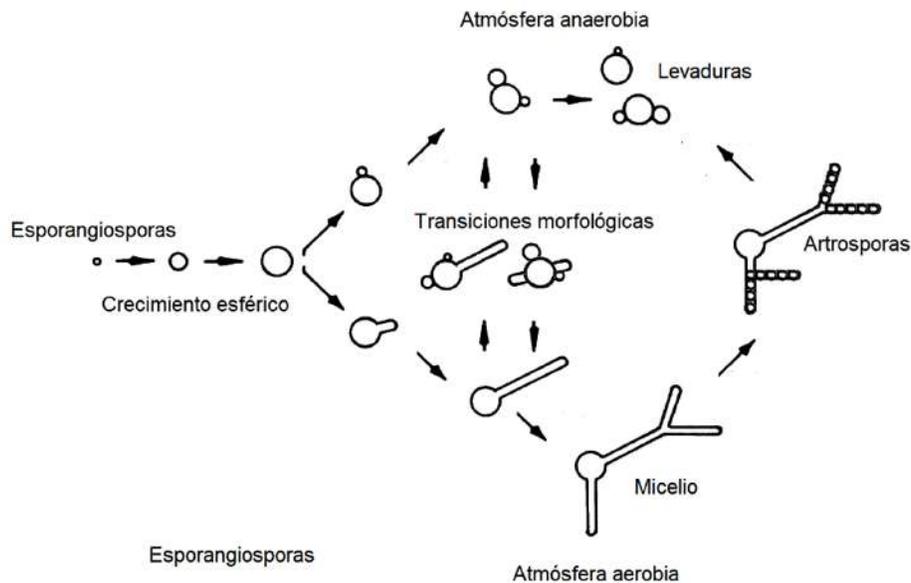


Figura 1. Ciclo de vida de *M. circinelloides* en cultivo líquido. Las esporangiosporas son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Cultivos maduros de micelio pueden conducir a la formación de artrosporas que son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones de crecimiento. Intercambios entre las morfologías de levadura y micelio son posibles modificando las condiciones atmosféricas. El cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas conduce a que el micelio produzca levaduras, el cambio de anaerobiosis a aerobiosis conduce a la formación de micelio a partir de levaduras. Modificada de Orłowski, 1991.

La enzima CrgA es una proteína con dominios tipo dedos de zinc, la cual participa en la vía de la ubiquitinación; esta proteína tiene asociada una actividad de E3 ubiquitina ligasa, la cual cataliza el último paso de la ubiquitinación y dirige al sustrato hacia el proteosoma. CrgA reprime la carotenogénesis (Navarro y col., 2000) y regula positivamente la esporulación (Lorca-Pascual y col., 2004, Nicolás y col., 2008) y el crecimiento vegetativo en *M. circinelloides* (Quiles-Rosillo y col., 2003).

Por otra parte, mutantes nulas de la O-fucosiltransferasa CigA, cuya función enzimática es la de transferir una D-fucosa proveniente de GDP-fucosa a

un sustrato aceptor, muestra alteración en el crecimiento vegetativo (Quiles-Rosillo y col., 2003). Por otra parte, los niveles de transcrito del gen *mcchs1*, que codifica a un miembro de la familia de sintasas de quitina, se acumula principalmente en la morfología miceliar (López-Matas y col., 2000).

Un patrón similar fue detectado para los niveles de los transcritos de *mras1* y *mras3*, que codifican proteínas G monoméricas del tipo RAS (Roze y col., 1999); en este mismo trabajo, a diferencia de *mras1*, niveles altos del transcrito *mras3* fueron detectados durante la esporulación.

En *M. circinelloides* Se detectaron mayores niveles de las proteínas G monoméricas Rho1p y Rho3p en el crecimiento polarizado (De la Cruz y col., 2007). Los niveles de transcrito de la subunidad *mcgpa3*, la cual codifica para una subunidad G α de proteínas G heterotriméricas, fueron evaluados en esporas y en crecimiento vegetativo, encontrándose en esporas los niveles más altos de transcrito (Meza-Carmen y col., 2006).

1.6 Mucormicosis

1.6.1 Generalidades

Con este término, nos referimos a un grupo de micosis causadas por hongos del orden Mucorales. La mayoría de los casos se presenta en personas con factores de oportunismo severos como diabetes mellitus descompensada, leucemia, o cáncer. Las infecciones causadas por hongos del orden Mucorales, generalmente se adquieren por vía respiratoria ya que las esporas de los hongos se encuentran en el ambiente, aunque en las formas cutáneas primarias, la infección se adquiere por solución de continuidad.

La primera descripción de este padecimiento aparece en el siglo XIX cuando Platauf describe un cuadro de “micosis mucorina”. Posteriormente se describieron algunos casos más y aunque habitualmente no se lograba aislar al agente, debido a las características morfológicas de los filamentos observados en los tejidos, estas infecciones fueron llamadas mucormicosis, aunque actualmente

las casuísticas mundiales demuestran que *Rhizopus* es el género que causa el mayor número de infecciones.

La mucormicosis es una enfermedad fúngica invasiva muy agresiva (Christopeit M y col., 2013; Neblett Fanfair R y col. 2012). Es una emergencia por hongos que afecta a una variedad de grupos de pacientes. La enfermedad, previamente denominada zigomicosis (Ajello L y col., 1976), es causada por hongos mucorales, que han sido llamados también colectivamente Mucormycetes (Gomes MZ y col., 2011; Kwon-Chung KJ, 2012). Sin embargo, se prefiere usar el nombre del orden, es decir, Mucorales. Los géneros que causan la mayoría de mucormicosis son *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia* (previamente clasificado como *Absidia*), *Cunninghamella*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces* y *Saksenaea*. La granulocitopenia, inmunosupresión, diabetes y trauma penetrante son las enfermedades predisponentes más frecuentes asociadas con la mucormicosis (Shikada y col., 2011). La enfermedad cavitaria pulmonar debido a *Rhizopus homothallicus* ha sido descrita como un claro patrón en pacientes diabéticos en la India (Chakrabarti y col., 2010). Además de los pacientes con estos factores de riesgo típicos, la mucormicosis se ha descrito en individuos sanos en la India y China, por ejemplo, en las formas de mucormicosis renal y sub-infecciones cutáneas crónicas debido a *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) [Chakrabarti y col., 2013]. Recientemente, las diferentes manifestaciones clínicas han sido revisadas (Petrikos y col., 2012).

Arnold Paltauf reportó el primer caso confirmado histológicamente de micosis mucorina en la Universidad de Graz, Austria en 1885 (Paltauf, 1885). Aunque la enfermedad se ha conocido durante mucho tiempo, la epidemiología no está bien definida aún. En un estudio realizado en Francia había incrementado el diagnóstico de mucormicosis cada vez más en los últimos años, culminando en una incidencia en la población general de 1,2 por millón/año (Bitary col., 1997). Dos estudios adicionales de España y California reportaron incidencias entre 0,4 y 1,7 casos por millón de la población por año (Rees y col., 2001; Torres-Narbona 2007). En los pacientes con neoplasias hematológicas la mucormicosis era menos común que la aspergilosis invasiva, pero independientemente de eso la

mucormicosis causó la muerte en estos pacientes (Pagano y col., 2001; Lewis y col., 2013). La linfocitopenia ha sido recientemente identificada en este contexto como predicción de muerte (Lewis y col., 2013). Las tasas de mortalidad en pacientes con mucormicosis se mantienen altas y en informes recientes que oscilaron entre 24% a 49% (Shikada y col., 2011; Reuping, 2010). Es necesaria una guía para el diagnóstico y tratamiento de la mucormicosis, porque en las enfermedades raras es difícil de ejecutar ensayos clínicos comparativos y acumular sustancial experiencia personal. Esto es particularmente cierto para una enfermedad que es probable que sea subdiagnosticada y en la cual el pronóstico para el individuo es impulsado por el tratamiento temprano (Neblett y col., 2011; Chamilos y col., 2008).

Por otra parte Charles H. Li y col. (2011) en un estudio realizado en subespecies de *M. circinelloides* demuestra la correlación entre el tamaño de espora y la virulencia, siendo que las que producían esporas más grandes mostraban una mayor virulencia respecto a las otras, dato de importancia para el entendimiento del desarrollo de la mucormicosis.

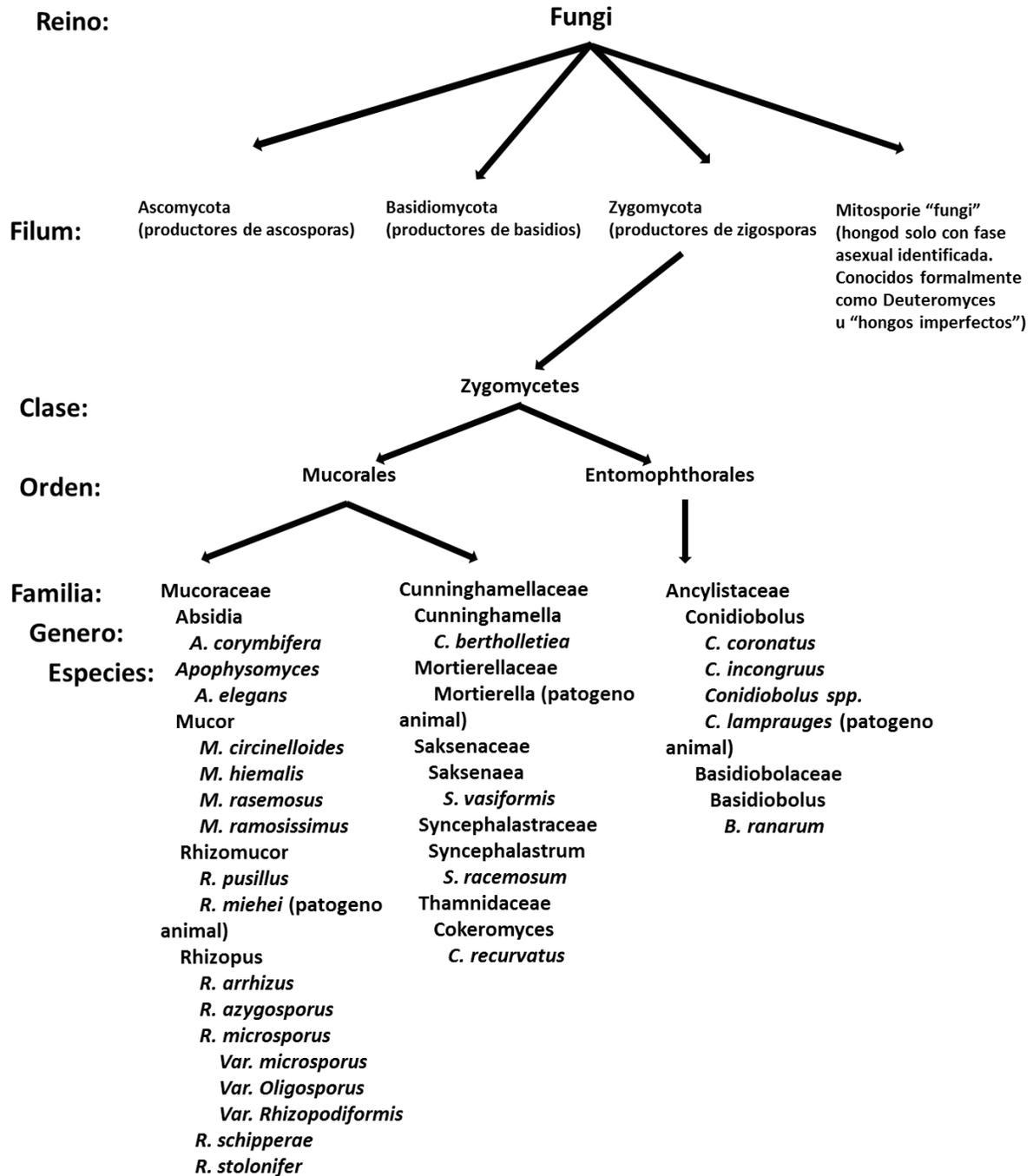


Figura 2. Clasificación taxonómica de los agentes etiológicos de la mucormicosis. Los agentes etiológicos pertenecientes al Phylum Zygomycota son considerados los hongos filamentosos más primitivos, tienen elevado potencial biótico, son aerobios pero pueden sobrevivir en condiciones microaerófilas, y como todos los hongos se nutren por absorción. La mayoría de mucorales se desarrollan bien a temperaturas de 30 a 40°C. Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

1.6.2 Epidemiología de la mucormicosis

La mucormicosis se presenta en todo el mundo y como otras muchas infecciones por hongos de bajo poder patógeno, requiere de factores debilitantes en el hospedero; de acuerdo a la variedad clínica entre las condiciones actuales que favorecen el desarrollo de esta infección tenemos: diabetes mellitus descompensada, leucemias, tratamiento con antiinflamatorios esteroideos, trasplantes de órganos, aplicación de deferoxamina, tratamientos prolongados con ácido acetil salicílico, y en años recientes también se han publicado casos de mucormicosis asociadas a SIDA. Las infecciones cutáneas primarias se asocian con quemaduras o abrasiones extensas de la piel. En una revisión de casos de micosis graves de 1995 a 2005 en el Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, IMSS, la mucormicosis ocupó el primer lugar de frecuencia de micosis oportunistas por hongos filamentosos. La variedad clínica más frecuente fue la invasión rinocerebral y fue la causa de muerte en 40% de los pacientes afectados. (Tabla 4).

Durante las últimas décadas, ha habido un aumento constante en los casos de mucormicosis con una tasa de mortalidad estable entre el 40 y el 50% (Roden y col., 2005). El aumento de estas infecciones puede estar relacionado con nuevas quimioterapias, aumento de la longevidad de las personas con enfermedad maligna, y una mayor conciencia de dicha infección en esta población (Roden y col., 2005). Las infecciones con la clase Zygomycetes de hongos pertenecen a dos órdenes, Mucorales y Entomophthorales. Múltiples géneros dentro de estas dos órdenes pueden conducir a la infección, pero los géneros más frecuentes son *Rhizopus*, *Mucor* y *Rhizomucor* (Roden y col., 2005). Estos mohos son ubicuos en el suelo y material orgánico en descomposición. La infección se produce por inhalación de esporas fúngicas en un huésped susceptible. Sin embargo, la infección también puede ocurrir a través de la inoculación cutánea directa o ingestión de alimentos contaminados (Malani-Kauffman, 2007).

Tabla 4. Micosis sistémicas diagnosticadas en el Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS entre 1996 y 2005.

MICOSIS	AÑO										
	96	97	98	99	00	01	02	03	04	05	TOTAL
Mucormicosis	4	7	4	5	6	6	5	7	3	3	50
Criptococosis	2	7	3	1	5	6	4	1	3	1	33
Aspergilosis	2	3	2	3	11	1	2	4	1		29
Histoplasmosis	1		2		1		2	4	4		14
Otras											
- Alternariosis							1				1
- Scedosporiosis							1				1
TOTAL	9	17	11	9	23	13	15	16	11	4	128

Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011.
 (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

La infección en los pacientes con neoplasia es poco frecuente, y la gran mayoría de las infecciones ocurren en personas con neoplasias hematológicas, especialmente aquellos con leucemias agudas (Pagano y col., 2006). Los principales sitios de infección son los de pulmón y de los senos nasales, con la infección de la piel, garganta y tracto gastrointestinal con menos frecuencia. Los principales hallazgos en infección de las vías respiratorias son fiebre, tos, dolor torácico y disnea. Los pacientes con infección en los senos pueden desarrollar celulitis orbitaria, paresia de los músculos extra oculares, o proptosis. Estos mohos pueden dar lugar a la invasión y destrucción del hueso que puede conducir a la invasión directa del cerebro en las infecciones de los senos paranasales infección vascular (Pagano y col., 2006; Roden y col., 2005).

1.6.3 Variedades clínicas de la mucormicosis

La mucormicosis puede ocasionar: 1) Lesión rinocerebral; 2) Invasión pulmonar; 3) Invasión digestiva y 4) Infección cutánea. Cada una de ellas tiene diferente evolución y los factores predisponentes son diversos.

1.6.3.1 Mucormicosis rinocerebral

Generalmente se asocia a diabetes mellitus mal controlada, en la que los pacientes desarrollan cuadros de cetoacidosis. Estos pacientes generalmente presentan desnutrición, fallos renales, alteraciones nerviosas y visuales además de deshidratación e hipertermia. En personas normales, las esporas de mucorales que llegan a las vías respiratorias se adhieren al moco nasal y son eliminadas ya sea por deglución o estornudos; si existe alguna herida en las mucosas, los neutrófilos polimorfonucleares fagocitan y destruyen las estructuras fúngicas en unos minutos. En los diabéticos descompensados, las mucosas están secas por lo que las esporas permanecen y se adhieren al tejido. Estudios realizados con *Rhizopus arrhizus* han demostrado que los cuerpos cetónicos presentes en estos pacientes son metabolizados con gran facilidad y favorecen el desarrollo *in situ* de los agentes. La hipertermia que generalmente presentan los diabéticos aunada a la gran cantidad de glucosa en tejidos y exudados proporciona condiciones inmejorables para el rápido desarrollo de las estructuras filamentosas que primero se unen a los vasos sanguíneos y posteriormente los penetran obstruyéndolos completamente en unos cuantos días, ocasionando extensas áreas de necrosis. La enfermedad es de evolución aguda y se considera que sin tratamiento las personas mueren en 15 o 20 días, sin embargo, existen escasos reportados de pacientes con hasta dos años de evolución. Generalmente se afecta más intensamente una mitad de la cara, aunque en algunos casos es difícil distinguir de qué lado se inició la patología. Una vez que los mucorales se adhieren e invaden los vasos, en rostro, generalmente aparece una celulitis que en dos o tres días se transforma en necrosis (Figura 3).



Figura 3. Imágenes de una paciente de 16 años tomadas con 96 horas de diferencia. En la segunda se observa necrosis, equimosis y ptosis palpebral. La paciente murió 4 días más tarde con extensa destrucción de la masa encefálica. Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

1.6.3.2 Mucormicosis pulmonar.

Se presenta principalmente en pacientes con leucemia, en quienes los macrófagos alveolares no eliminan las esporangiosporas que llegan hasta vías respiratorias inferiores. La patología es de evolución más lenta que la rinocerebral; sin embargo, los pacientes sin tratamiento adecuado fallecen en alrededor de 30 días, generalmente debido a la invasión de un gran vaso mediastinal.

Los pacientes presentan tos productiva y en algunos casos hemoptisis, hipertermia, dolor pleural intenso, disnea. El estado general del paciente se deteriora rápidamente, hay alteración en el intercambio gaseoso con modificaciones importantes en los valores de gasometría. Los estudios radiológicos muestran imágenes de neumonía, abscesos, consolidación lobar o segmentaria.

1.6.3.3 Mucormicosis digestiva.

Se presenta en pacientes con desnutrición de II o III grado quienes habitualmente tienen una dieta pobre basada en carbohidratos. Los pacientes con estos grados de desnutrición presentan con gran frecuencia parasitosis intestinales asociadas que pueden favorecer la invasión del hongo en el tejido del tubo digestivo y a partir de ahí alcanzar otros órganos de la cavidad abdominal. La muerte en estos pacientes ocurre casi siempre por septicemia debida a perforación intestinal, y la sobrevida sin tratamiento se calcula en 60 días.

1.6.3.4 Mucormicosis cutánea.

Puede presentarse en pacientes con inmunidad normal y el principal factor predisponente son quemaduras o abrasiones extensas de la piel y el ser manejadas de manera inadecuada. Los mucorales presentes en el ambiente pueden desarrollarse en la superficie de la lesión formando colonias superficiales. Los pacientes no requieren tratamiento antimicótico especial, y generalmente con medidas higiénicas locales las colonias desaparecen.

Otro grupo de pacientes lo constituyen aquellos que presentan algún padecimiento debilitante como puede ser diabetes mellitus, SIDA, este tipo de pacientes puede desarrollar complicaciones más graves a partir de la infección cutánea, e incluso puede ser necesaria la amputación para curar al paciente, o bien, la utilización de técnicas especiales como la oxigenoterapia hiperbárica.

1.6.4 Diagnóstico de las mucormicosis

El diagnóstico se basa a menudo en la combinación de los signos y síntomas clínicos, junto con imágenes radiográficas. La infección en la invasión vascular con oclusión vascular resultante y el infarto y necrosis de los tejidos infectados. Una proyección de imagen radiográfica puede identificar la hemorragia, absceso o consolidación de la inflamación en los pulmones (Horger et al, 2006).

La infección rinocerebral o sino-orbital pueden mostrar inflamación de los senos con la destrucción de las estructuras óseas y la invasión directa en la órbita o el cerebro (Horger et al, 2006). Las muestras de biopsia identificarán el ángulo característico de ramificación y pseudo septación de las hifas (Kara et al, 2009). Cultivos pueden ayudar a identificar los géneros y especies del moho; sin embargo, estos son positivos en menos de 50% de los casos (Roden et al, 2005).

1.6.5 Los componentes sanguíneos de origen humano

Durante siglos se ha considerado a la sangre como la esencia de la vida, pero su composición celular no se descubrió sino hasta la invención del microscopio (McKenzie SB, 2013).

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo especializado, con una matriz coloidal líquida y una constitución compleja. Como todo tejido, la sangre se compone de células y componentes extracelulares (su matriz extracelular). Estas dos fracciones tisulares vienen representadas por: 1) los elementos formes o celulares que son variados en tamaño, estructura y función y comprenden los eritrocitos, plaquetas y glóbulos blancos o leucocitos.; 2) el plasma sanguíneo, un líquido translúcido y amarillento que representa la matriz extracelular en la que están suspendidos los elementos formes.

1.6.5.1 Obtención del plasma sanguíneo

El fraccionamiento es el procedimiento mediante el cual se efectúa la separación de una unidad de sangre fresca en sus componentes (Vite-Casanova, 2014). Los componentes sanguíneos pueden obtenerse a partir de fraccionamiento de sangre fresca o de aféresis que también significa “separar”, pero en el banco de sangre actual es empleado para describir los procesos de donación o terapia que implican retención de un elemento sanguíneo y la reinfusión del resto de los componentes sanguíneos al donador.

Los objetivos principales de los procedimientos de extracción, fraccionamiento, preparación conservación y transporte de la sangre y sus

componentes son; mantener la viabilidad y función de los componentes más importantes; evitar los cambios físicos perjudiciales para los componentes y; minimizar la proliferación bacteriana (Vite MJ y Novelo V, 2013).

El tratamiento con base en los componentes sanguíneos fue posible gracias a la introducción del citrato de sodio como anticoagulante en 1914 (Decaro J y col., 2011). No obstante, lo que detonó el fraccionamiento de la sangre con el plasma como primer componente sanguíneo fue el descubrimiento de que los glóbulos rojos sedimentaban y quedaba el plasma sobrenadante cuando el flujo se encontraba en contenedores de sangre (Vite-Casanova, 2013).

La Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012 denominada “Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”, refiere que la recolección de sangre total proviene de donadores adultos sanos, que después se conserva en una bolsa de plástico que contiene una solución preservativa anticoagulante. Los productos que pueden obtenerse son: sangre total, concentrado de eritrocitos, plaquetas, concentrado de granulocitos y plasma. Estos productos se almacenan en bolsas plásticas que contienen los aditivos preservantes anticoagulantes con la finalidad de prolongar el almacenamiento de los eritrocitos de 21 a 42 días y a conservarlos en mejores condiciones si se agregan soluciones nutritivas (adenina y Sagman).

Para su fraccionamiento la sangre debe mantener un intervalo breve en el proceso de extracción-procesamiento. Durante el periodo referido, las unidades serán mantenidas a temperaturas por debajo de los 24°C o entre 2-10°C cuando vayan a transportarse.

La obtención de los componentes sanguíneos tiene varias generalidades a tomar en cuenta entre las que destacaremos que el tipo de componente sanguíneo a obtener estará en función del tipo de velocidad de sedimentación generada y giro, por ejemplo; con una centrifugación de 3000 a 3500 rpm en un periodo de 1015 minutos se obtendrá un concentrado eritrocitario mediante

compactación de células rojas; plasma con volumen aproximado de 200-240 mL; y capa leucoplaquetaria bien definida.

1.6.5.2 Plasma fresco congelado

Se obtiene cuando se procesa la sangre dentro de las primeras 4-6 horas luego de su extracción y debe conservarse a temperatura de entre -18 y -30°C (Vite-Casanova, 2013)).

1.6.5.2.1 Componentes del plasma

Esta compuesto por agua en su mayoría (90%), constituye el 55% del volumen sanguíneo total y es una de las reservas líquidas corporales. El 10% restante del volumen total de plasma esta constituido en su mayoría por proteínas (70%); fibrinógeno, inmunoglobulinas, albúminas y otras proteínas como VLDL, LDL, HDL, protrombina y transferrina. Estas proteínas plasmáticas tienen diversas funciones como el mantenimiento de la presión oncótica (presión hidroestática a consecuencia del efecto osmótico ejercido por las proteínas dentro de los vasos sanguíneos o la matriz extracelular, etc., delimitado por una membrana selectivamente permeable), función electroquímica, función de tampón o buffer y función relógica (aporta las características de fluido para la movilidad de los elementos formes) (Medicine ABC,2012).

Contiene metabolitos orgánicos y compuestos de desecho (20%): fosfolípidos, colesterol, triacilgliceroles, glucosa, urea, ácido láctico, ácido úrico, creatinina, bilirrubina y sales biliares. Componentes inorgánicos (8%) que le dan osmolaridad al plasma: el ion Na^+ es el más importante, pero también contiene K^+ , NaCl , bicarbonato, fosfato, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , Na_2SO_4 , etc. Otros solutos (2%); sales minerales, nutrientes, gases disueltos y vitaminas.

1.6.5.2 Funciones del plasma

Es un fluido con importante función biológica: nutritiva, excretora, homeostática, regulación de la temperatura corporal y función química o protectora frente a las infecciones. Así también, posee características fisicoquímicas que le permiten llevar a cabo dichas funciones como pH, viscosidad, flujo laminar, velocidad, etc.

1.6.5.3 Suero sanguíneo de origen humano

Por su parte el suero es el remanente del plasma sanguíneo sin el fibrinógeno, ni el resto de los factores de coagulación, pero conserva los demás componentes del plasma, compartiendo así la mayoría de sus características. Al tener propiedades nutritivas (principalmente por el alto contenido de proteínas) el suero se ha empleado en la investigación para conocer el efecto de este sobre el crecimiento de microorganismos, pues una cuestión importante en la actualidad es saber si otros organismos, aparentemente más simples, pueden responder a componentes sanguíneos que cumplen funciones “específicamente” en humanos, pues ello podría indicar una relación filogenética más estrecha entre especies que la conocida hasta el momento.

El suero con fines de investigación ha sido empleado también de manera importante en las áreas de la salud y, como parte de los que nos interesa, enfocado a la investigación de la proliferación de microorganismos dándonos un mejor conocimiento sobre los factores de patogenicidad de agentes infecciosos de humanos, principalmente hongos, por ejemplo; hay diversos estudios en *Candida albicans* que demuestran que el suero propicia la transformación de este hongo de una forma levaduriforme a una micelial (Alvarez FJ, 2007). Aunque se utiliza mucho la inducción de la filamentación en *Candida* como ensayo complementario en diferentes investigaciones, no se hayan antecedentes con otros hongos hasta el momento.

La importancia del uso de suero en el crecimiento y proliferación de hongos puede ayudar a entender el constante aumento en las micosis invasivas.

1.6.6 Cultivos para el diagnóstico de mucormicosis

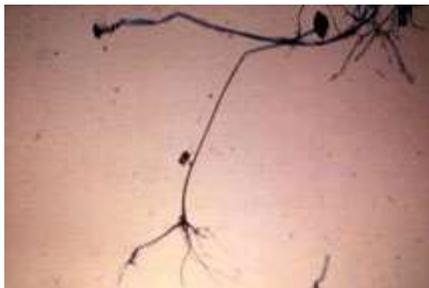
Los especímenes obtenidos por raspado, biopsia o piezas quirúrgicas, después de disgregarlos adecuadamente, se deben sembrar en medios de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple y ADS adicionado con antibióticos. La positividad del cultivo es cercana al 50%; este procedimiento no es diagnóstico, pero en caso de desarrollo permite determinar el género y especie del agente etiológico de los casos probados por examen directo o biopsia. Se observan colonias de crecimiento rápido que habitualmente en 72 horas han llenado por completo los tubos, los filamentos son gruesos y los esporangios se pueden observar a simple vista como puntos negros sobre el cultivo (Figura 4).

El examen microscópico del cultivo permite determinar el género, la clasificación de la especie generalmente requiere la realización de microcultivos. Los principales agentes de mucormicosis: *Rhizopus spp*, *Mucor spp* y *Absidia spp* se distinguen por la existencia y disposición de unas estructuras de fijación al sustrato llamadas rizoides. En *Rhizopus spp*, los rizoides se encuentran exactamente debajo del esporangio, en *Absidia spp*, los rizoides se encuentran en el filamento (estolón) que une dos grupos de esporangios; y finalmente, los hongos del género *Mucor* carecen de rizoides. (Figura 5). Otros agentes etiológicos de mucormicosis como *Syncephalastrum spp*, *Cunninghamella spp*, o *Saksenea spp* tienen esporangios tan diferentes que no tenemos que recurrir al tipo o presencia de rizoides para distinguirlos (Figura 5).



Figura 4. Cultivo de *Mucor spp.* desarrollado sobre Agar Sabouraud Dextrosa ADS. Nótese la abundancia del micelio que llega hasta el borde el tubo en un cultivo de 5 días de desarrollo a 37°C. Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

A)



B)

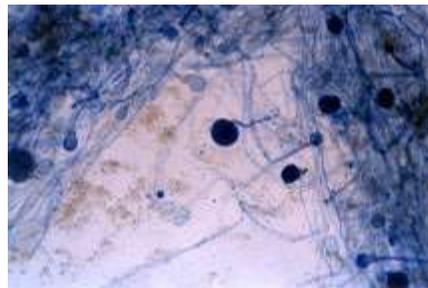


Figura 5. Morfología de *Rhizopus* y *Mucor* al microscopio. A) Se observa una preparación de *Rhizopus*. En la parte inferior del esporangio se aprecian estructuras semejantes a raíces (rizoides). B) Se observan filamentos y esporangios sin rizoides en un cultivo de *Mucor spp.* Departamento de Microbiología y Parasitología, UNAM, 2011. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/mucormicosis.html>)

1.6.7 Tratamiento de la mucormicosis

El tratamiento de la mucormicosis implica desbridamiento quirúrgico (eliminación de tejido dañado o muerto), reducción o corrección de la inmunosupresión y medicamentos antimicóticos. La resección quirúrgica de tejido necrótico infectado puede ayudar a mejorar la actividad antifúngica y disminuir la carga fúngica (Malani, 2007). La terapia antifúngica se limita a los polienos y posaconazol. Los polienos (anfotericina B desoxicolato, anfotericina B liposomal y lípidos complejo anfotericina B) siguen siendo el tratamiento de elección inicial.

Las formulaciones lipídicas de anfotericina (AmB-L) ofrecen la ventaja de dosis mayores de anfotericina y una disminución en nefrotoxicidad (Roden y col., 2005; Perfect JR, 2005). Los datos retrospectivos demuestran tasas de respuesta del 52-69% y la mejora de la supervivencia con AmB-L en comparación con anfotericina B desoxicolato (Perfect JR, 2005). Un azol de espectro extendido de nueva generación, el posaconazol, tiene actividad tanto *in vitro* e *in vivo* contra Mucorales. El posaconazol ha sido evaluado como terapia de rescate para el tratamiento de la mucormicosis (Greenberg y col., 2006; van Burik y col., 2006). En 91 pacientes tratados con saconazol como terapia de rescate para la mucormicosis, el éxito del tratamiento se observó en 60% de los pacientes a las 12 semanas, la respuesta completa se observó en el 14%, y la respuesta parcial o clínica se observó en el 46% de los pacientes (van Burik y col., 2006). Otras terapias han sido investigados para el tratamiento de la mucormicosis como factor estimulante de colonias, la terapia con interferón, la quelación del hierro, y la terapia combinada antifúngica, todos con resultados diversos, y no se recomienda su uso en este momento (Spellberg y col., 2009). Actualmente, se recomienda que la terapia inicie con un polieno y cualquier desbridamiento quirúrgico, si es posible, seguido de un cambio al posaconazol una vez que la respuesta a la terapia ha sido identificada (Spellberg y col., 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha señalado a *M. circinelloides* como un agente infeccioso en pacientes inmunocomprometidos. Se ha demostrado en otros trabajos que en infecciones sistémicas por *C. albicans*, un receptor acoplado a proteína G transduce la señalización dependiente de AMPc de moléculas presentes en el suero humano propiciando la transición de levadura a un crecimiento micelial de *Candida*.

Con base en dicho antecedente es de nuestro interés estudiar si *M. circinelloides* que también es un hongo dimórfico patógeno oportunista que eventualmente y en condiciones de inmunosupresión, ocasiona infecciones sistémicas, puede verse favorecido por la presencia del suero humano, teniendo un efecto positivo en su crecimiento y/o diferenciación, incluso teniendo repercusión en la patogenicidad del hongo.

3. HIPÓTESIS

El suero sanguíneo de origen humano regula cambios positivos en el crecimiento y la diferenciación del hongo dimórfico *Mucor circinelloides*.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Demostrar si el suero sanguíneo de origen humano genera cambios en el crecimiento y/o diferenciación de *M. circinelloides*

Objetivos específicos

- Observar el efecto del suero sanguíneo en el crecimiento aeróbico y anaeróbico de *M. circinelloides*
- Observar el efecto que tiene el suero sanguíneo en las transiciones dimórficas de *M. circinelloides*.

5. MATERIALES

5.1 Cepas utilizadas

La cepa de *M. circinelloides R7B* (ATCC 90680, cepa auxótrofa a leucina derivada de la cepa ATCC 1216b) (Roncero y col., 1989).

5.2 Medios de cultivo

-Medio YPG (Extracto de levadura, Peptona de gelatina, Glucosa).

Cada litro de medio YPG líquido contiene 20 gramos de glucosa, 10 gramos de peptona de gelatina y 3 gramos de extracto de levadura. Para el caso de medio solido se agregan 20 gramos de agar bacteriológico. Los reactivos utilizados fueron de la marca BD Bioxon®.

5.3 Plasma de origen humano

Bolsas de plasma congelado de varón, de tipo sanguíneo “A” Rh (+) nos fueron proporcionadas por el Centro Estatal de Transfusion Sanguínea de la secretería de salud en Michoacán.

5.4 Conservador CPD para sangre entera

Las bolsas para almacenaje de sangre entera fueron proporcionadas por el Centro Estatal de la Transfusiones Sanguíneas de Michoacán. Contienen una solución conservadora de glóbulos rojos compuesta por Citrato de Sodio (dihidratado) 2.63g, Ácido Cítrico (monohidratado) 2.636g, Dextrosa (monohidratada) 2.55g, Fosfato de Sodio Monobásico (monohidratado) 0.222g.

5.6 Solución salina biológica

Contiene 0.9 gramos de Cloruro de Sodio (NaCl) por cada 100 mL de agua destilada.

5.7 Otros materiales utilizados

Agua destilada, papel filtro, puntas para micro pipeta de 1000, 200 y 20 uL, tubos Falcon de 50 y 15 mL, tubos Eppendorff de 2mL, frascos herméticos de vidrio de 500 y 1000mL, matraces Erlenmeyer de 1000, 500 y 125 mL, unidad de filtración MILLIPORE® y matraz Kitazato de 1 L, cámara de Neubauer, pinzas, espátulas, porta y cubre objetos de vidrio, magnetos para agitación.

5.8 Equipos

Microscopio óptico OLYMPUS-BX40F y microscopio Optihot-2 (NIKON) con cámara Coolpix S10 (NIKON), balanza analítica OHAUS Explorer E11140, planchas de calentado y agitación Barnstead/Thermolyne SP46925 Y Corning Stirrer/Hotplate PC-320, incubadora con agitación para matraces Lab Companion 15-971 , Baño María Precision® WATER BATH 182.

6. MÉTODOS

6.1 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides*

Se prepararon placas de Petri con YPG sólido y se inocularon 50 esporas de *M. circinelloides* en cada placa bien dispersas con espátula de plástico, se incubaron a 28°C, en presencia de luz durante 4-5 días. Las esporas se colectaron agregando a cada placa 7 mL de agua destilada y raspando las esporas con espátula de plástico, se aspiraron con micropipeta y se depositaron en tubos Falcon de 50 mL. La suspensión de esporas se lavó tres veces centrifugando a 5900 rpm por 10 minutos y a 25°C, desechando el sobrenadante y re-suspendiendo en agua estéril en cada lavado. Finalmente se dejan re-suspendidas las esporas en aproximadamente 30 mL de agua. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, colocando por capilaridad 15 uL de la suspensión de esporas en el cuadrante superior de la cámara y 15 uL en el inferior, se observó en microscopio a 40x y se contaron las esporas de los cuatro cuadrantes de las esquinas y el del centro de cada compartimiento, se sumaron las cifras contadas y se multiplico por 25, 000 (factor de dilución de la cámara usada). La cantidad obtenida expresa las esporas que hay en cada mililitro de suspensión. Se

rotularon y almacenaron en refrigeración a 4°C para su uso en un tiempo no mayor a 1 mes.

6.2 Obtención del suero de origen humano

El plasma previamente descongelado en refrigeración a 4°C (por lo general 12 horas) se vertió en un frasco hermético estéril y se agregó 1 mL de solución de cloruro de calcio (CaCl₂) 1M estéril por cada 100 mL de plasma, se dejó en Baño María a 56°C hasta la formación de grumos (regularmente de 20-30 minutos y la formación de un coagulo). Se separó el sobrenadante (suero) del coagulo (fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas) mediante decantación en tubos Falcon estériles. El suero fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos para retirar restos de coagulo o grumos y se añadió 0.25 mL de solución de EDTA 0.5M estéril por cada 100 mL de suero. El suero fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.3 Crecimiento de *M. circinelloides* con diferentes concentraciones de suero

Se prepararon matraces con medio YPG para micelio con concentraciones diferentes de suero (0, 10, 25, 50 y 100%), se inocularon las esporas y se incubaron a 28°C en agitación constante. Se determinó el porcentaje de germinación a las 2 y 4 horas de incubación, observando al microscopio a 40x diferentes campos hasta contar un total de 100 células y determinando de éstas, las que ya están germinando y las que aún son esporas o apenas empiezan a hincharse y se cuantifico la biomasa filtrando el micelio y sometiéndolo a secado en estufa hasta que tuviera un peso constante.

6.4 Desnaturalización de suero y plasma de origen humano

Una fracción de suero (obtenido a partir del plasma) y una fracción de plasma fresco se descongelaron lentamente a 4°C y se colocaron por separado en frascos herméticos de vidrio (pyrex). Se sometieron a calentamiento en Baño

María a 55°C durante 12 horas y se dejaron enfriar para su posterior almacenamiento en congelación a -20°C.

6.5 Crecimiento radial y esporulación de *M. circinelloides* con suero y plasma normales y desnaturalizados

Placas de Petri con medio YPG sólido como control sin tratamiento, medio con 10% plasma normal, medio con 10% de suero normal, medio con 10% de plasma desnaturalizado y 10% de suero desnaturalizado se inocularon en el centro y sin dispersar (para obtener una única colonia). 200 esporas por placa suspendidas en 20uL de agua destilada estéril, se dejó secar la gota en ambiente estéril y se incubaron en presencia de luz a 28°C durante 5 días. Cada 24 horas se midió el crecimiento de cada colonia expresado como diámetro en cm. Posteriormente, al quinto día de incubación se extrajeron las esporas de cada placa por separado y de realizo el conteo para conocer la esporulación de cada placa.

6.6 Crecimiento aeróbico y anaeróbico de *M. circinelloides* con 10% de suero o plasma de origen humano

Para llevar a cabo los crecimientos aeróbicos y anaeróbicos fueron inoculadas 500,000 esporas por cada mililitro de medio YPG. En el caso de crecimiento micelial se incubaron 20mL de medio para los controles y 18 mL de YPG + 2 mL de suero o plasma para los diferentes tratamientos en matraces de 125 mL a 28°C, con agitación constante de 125 rpm y una n=4. Para el crecimiento levaduriforme, matraces Erlenmeyer de 125 mL fueron llenados totalmente (aprox. 137 mL), preparando los mismos tratamientos que para el crecimiento micelial. Se les colocó un tapón de corcho en la boca de cada uno de los matraces, dichos tapones estuvieron atravesados con una aguja que permitió la salida del CO₂ producido durante el metabolismo anaeróbico, dentro del matraz se colocó una barra magnética, el matraz se colocó sobre un agitador magnético

permitiendo una agitación constante. Todo este sistema se le conoce como sistema “auto-anaeróbico” (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993).

6.7 Germinación aeróbica y anaeróbica de *M. circinelloides* con 10% de suero o plasma de origen humano

Para ambos casos se prepararon los matraces de la manera descrita anteriormente y se tomaron alícuotas de cada matraz a las 3 y 6 horas de incubación de aproximadamente 100uL en tubos Eppendorff de 2mL y fueron rotulados. Después se realizó el conteo de 100 células por muestra, identificando es estas, las que están germinando, el resultado expresa el porcentaje de esporas germinando al tiempo determinado. También se tomaron fotografías con ayuda de la cámara del microscopio para saber si había diferencia en la morfología de las células en cada uno de los diferentes tratamientos.

6.8 Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura de *M. circinelloides*

Los experimentos de transición fueron realizados siguiendo las indicaciones de De la Cruz y col. (2007). Para la transición Levadura-Micelio, las esporas fueron germinadas en condiciones auto anaeróbicas en medio YPG y se mantuvieron por 10 horas en dichas condiciones para su posterior filtración y estas fueron depositadas en medio de cultivo fresco e incubadas en condiciones de crecimiento aeróbicas de 3 a 6 horas. Por otra parte, en la transición Micelio-Levadura las esporas fueron germinadas en condiciones aeróbicas en medio YPG por 5 horas antes de ser filtradas, cambiadas a medio fresco y posterior crecimiento en anaerobiosis por 3 a 6 horas. Estas transmisiones tanto aeróbicas como anaeróbicas se hicieron también para medios con 10% de suero.

6.9 Análisis de imágenes

Se empleó un microscopio Optihot-2 (NIKON) y una cámara Coolpix S10 (NIKON) para capturar las imágenes correspondientes a las morfologías obtenidas

a los diferentes tiempos de crecimiento, fueron tomadas usando el objetivo 40X. En dichas imágenes se observó el porcentaje de germinación, tomando en cuenta el número de células hinchadas, las que ya han empezado a germinar y las que aún son esporas, así como las características de las gemaciones en el caso de levaduras, o la ramificación de las hifas en el micelio.

6.10 Cuantificación del crecimiento celular

El crecimiento celular fue determinado midiendo biomasa total generada en medio líquido como peso seco. Las muestras de *M. circinelloides* (micelio o levaduras) fueron colectadas, después de 8 horas de incubación, en papel filtro previamente llevado a peso constante. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada. El papel filtro conteniendo las células fueron secados por 96 horas a 80°C. Después del secado y enfriado, los filtros fueron pesados de nuevo para determinar el peso seco de las células, hasta que este se mantuvo constante. Se realizó una diferencia entre el peso del filtro con biomasa y el filtro solo para determinar el peso neto de la biomasa.

6.11 Tratamiento con el anticoagulante CPD

Con la finalidad de descartar que los aditivos en el suero sean los responsables de un cambio en la germinación y crecimiento en *M. circinelloides*, se realizaron los mismos ensayos de crecimiento con suero pero esta vez agregando un nuevo control que consistió en poner 10% de CPD al medio de cultivo, al cual se le dio previamente un tratamiento igual que al suero.

7. RESULTADOS

7.1 Germinación aeróbica a diferentes concentraciones de suero humano

Con la finalidad de demostrar el posible efecto que el suero sanguíneo pudiera generar sobre la diferenciación y/o desarrollo de *M. circinelloides*, se empezó con la determinación de la germinación en condiciones aeróbicas a distintas concentraciones (10, 25, 50 y 100%) de suero a los tiempos de 2 y 4 horas. Como se puede observar en la Figura 6, en la cepa R7B hasta una concentración del 50% de suero a las 2 y 4 horas el efecto es positivo en el crecimiento, sin embargo al 100% se ve la inhibición de la germinación. Se muestra en la figura 7 la morfología donde concentraciones 10, 25 y 50% tienen mayor cantidad de hifas y de mayor longitud respecto al 0%; también es evidente la inhibición de la germinación en una concentración del 100% de suero.

7.2 Crecimiento en medio sólido de *M. circinelloides*

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la esporulación y crecimiento de colonias como medio de reproducción y dispersión, se analizó el crecimiento de colonias de la cepa R7B de *M. circinelloides* en condiciones de aerobiosis y presencia de luz, adicionando 10% de suero y plasma nativos al medio YPG; además de los mismos componentes sanguíneos desnaturalizados (ver métodos); se evaluó el crecimiento en la placa como una medida del diámetro en cada una de las condiciones, observándose la tendencia de un aumento en el crecimiento radial en las colonias inoculadas en medio con suero y plasma, respecto a las inoculadas en medio con suero y plasma desnaturalizados, pero sin llegar a ser iguales que en el control de medio YPG (Figura 8). Dicha tendencia se hizo presente también al determinar la esporulación de cada una de las diferentes condiciones en las que se sembraron las esporas de R7B (Figura 9), en donde, tras cinco días de incubación se nota un efecto positivo en los tratamientos con

suero y plasma nativos que disminuye significativamente cuando estos son desnaturalizados.

7.3 Germinación aeróbica de *M. circinelloides* en suero y plasma desnaturalizados

Con la finalidad de comprobar que el efecto positivo observado en la germinación aeróbica con una concentración de suero del 10% no sea debido a nutrientes en el suero y plasma (el suero y plasma contienen gran cantidad de lípidos carbohidratos, etc.) sino probablemente a una molécula que se pueda ver afectada por aumento en la temperatura, se sometió parte del suero y plasma a desnaturalización térmica y se realizó un ensayo en que se adicionara a estos en la misma concentración que el suero y plasma nativos para cuantificar las diferencias en la germinación. La Figura 10 describe el comportamiento de las esporas de *M. circinelloides* en los diferentes tratamientos en cuanto a la germinación de las hifas. En la figura 11 puede notar en la cantidad de micelio y la longitud de las hifas que suero y plasma nativos favorecen la germinación en comparación con el control YPG, mientras que al ser sometidos a desnaturalización este efecto se ve disminuido. La diferencia en el crecimiento del micelio es más notable a las tres horas de incubación, mientras que a las 6 horas el conteo de células germinando en los diferentes tratamientos ya no muestra tanta diferencia, pues a este tiempo las hifas tienen un tamaño considerable y hay pocas esporas y células hinchadas. Sin embargo una manera de comprobar que sigue existiendo dicha diferencia fue pesar el micelio después de 8 horas de incubación. Los tratamientos con suero y plasma nativos mostraron una mayor cantidad de biomasa (mayor peso) y disminuye con la desnaturalización del suero y plasma (Figura 12).

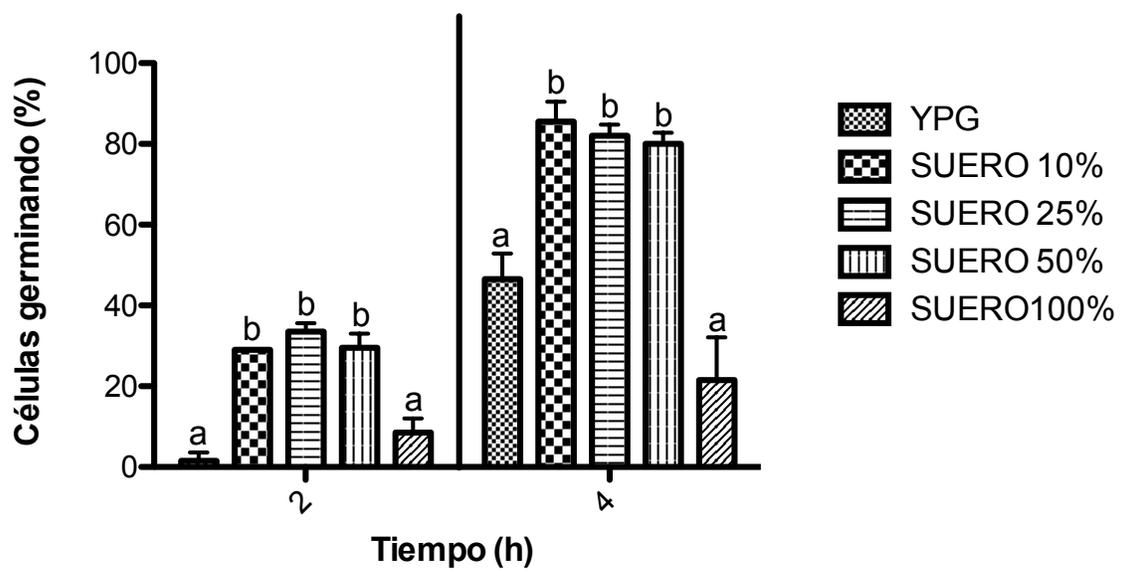


Figura 6. Efecto del suero sanguíneo de origen humano sobre la germinación de la cepa R7B de *M. circinelloides* en condiciones de aerobiosis. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el porcentaje total de células germinadas en diferentes concentraciones de suero a cada uno de los tiempos indicados, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras.

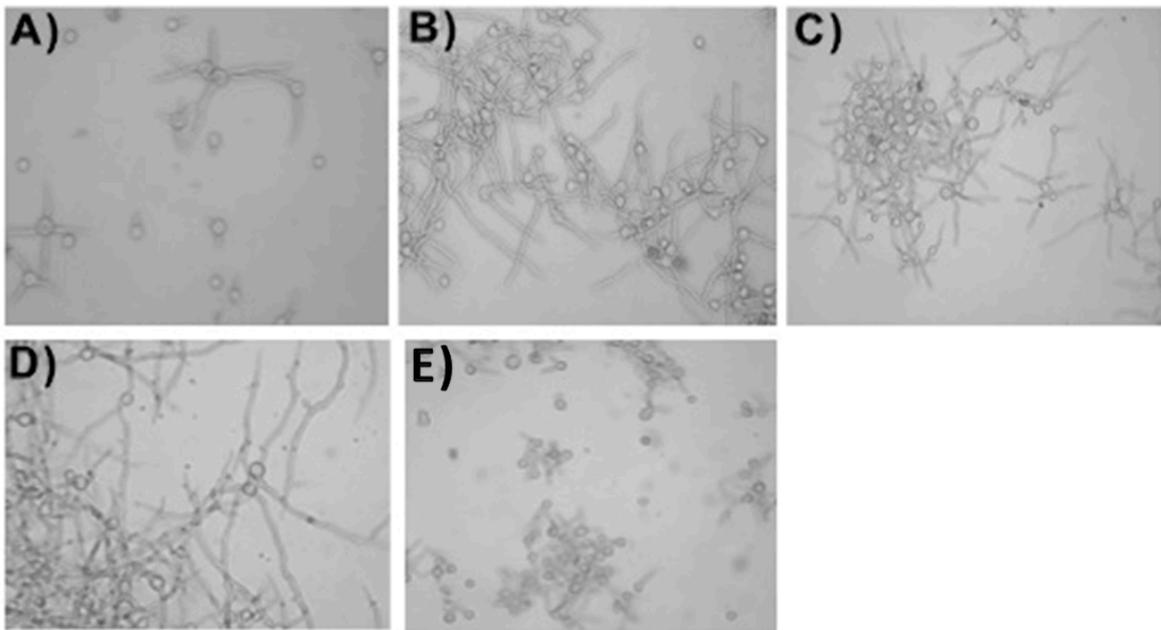


Figura 7. Aspecto morfológico de *M. circinelloides* durante la germinación aeróbica con diferentes concentraciones de suero. A) medio YPG (0% de suero); B) 10% de suero; C) 25% de suero; D) 50% de suero; E) 100% de suero.

	24h	48h	72h	96h	120h
YPG	a	a	a	a	a
SUERO	ab	b	b	b	b
PLASMA	ab	b	c	b	b
SD	b	b	bc	b	b
PD	b	b	bc	b	b

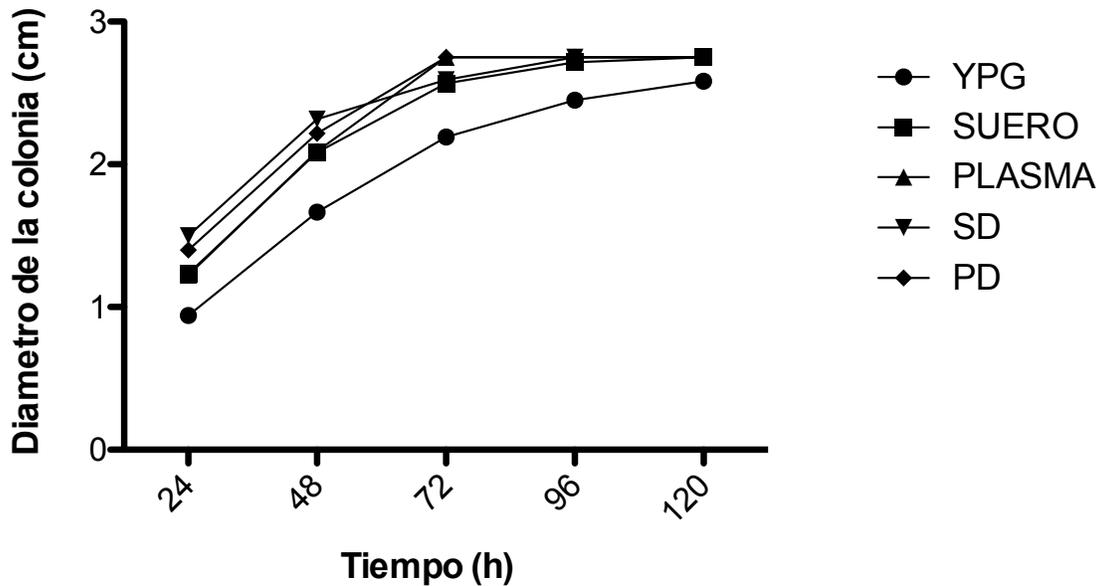


Figura 8. Efecto de suero sanguíneo de origen humano en el crecimiento radial de la cepa R7B de *M. circinelloides* en aerobiosis. Se inocularon 200 esporas contenidas en 20 microlitros de agua destilada esteril en el centro de la placa de medio YPG sólido, en presencia de luz a 28°C, se evaluó el diámetro de colonia a cada uno de los tiempos indicados N=4. Las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) en cada uno de los tiempos se muestran en letras en la tabla de arriba. SD: suero desnaturalizado; PD: plasma desnaturalizado

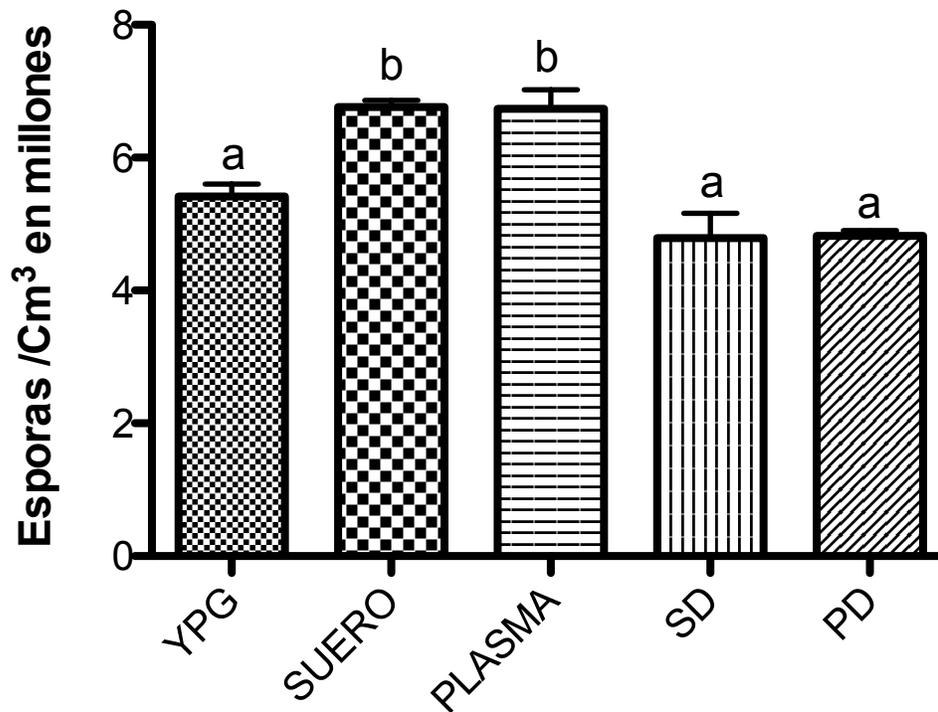


Figura 9. Efecto del suero plasma sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado sobre la esporulación de *M. circinelloides* en condiciones aeróbicas. Se inocularon 50 esporas por placa de medio YPG sólido, en presencia de luz a 28°C, se evaluó el número de esporas por Cm² a los 5 días de incubación, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, p<0.05) se muestran en letras. SD: suero desnaturalizado; PD: plasma desnaturalizado.

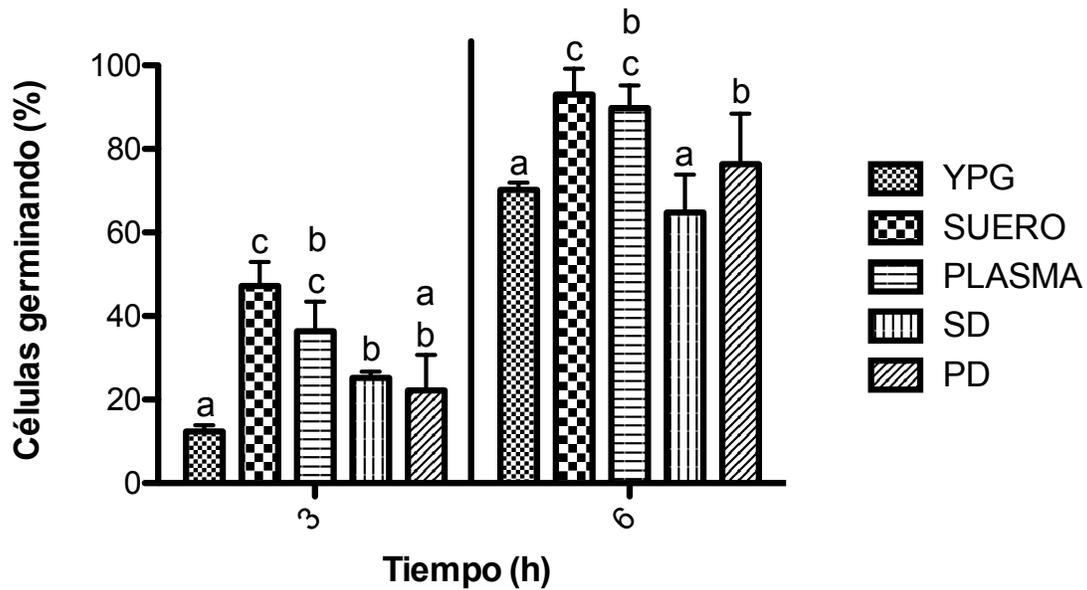


Figura 10. El efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en la germinación aeróbica de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el porcentaje total de células germinadas a cada uno de los tiempos indicados, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. SD:suero desnaturalizado; PD: plasma desnaturalizado

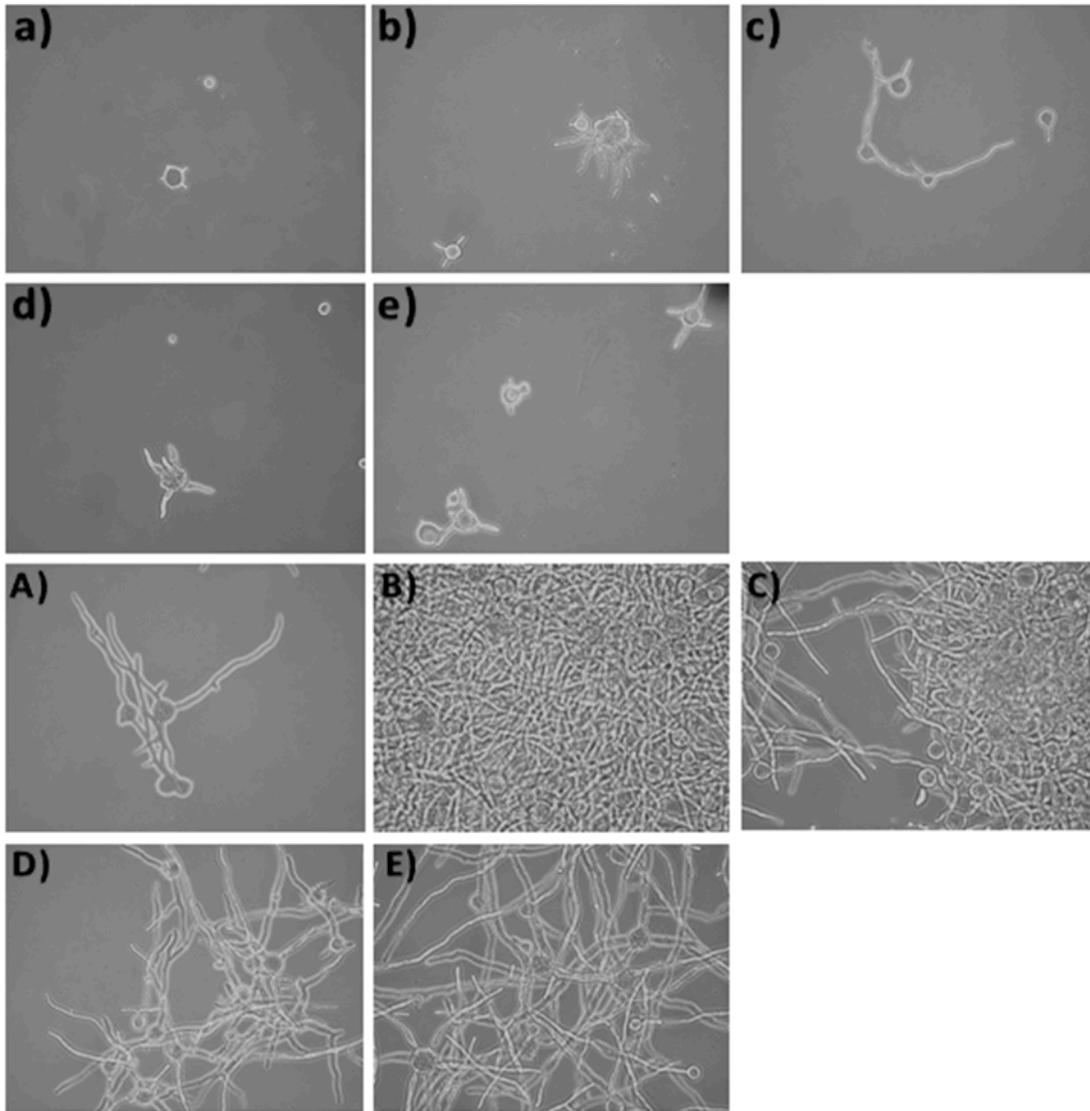


Figura 11. Aspecto morfológico de *M. circinelloides* durante la germinación aeróbica con suero y plasma nativos y desnaturalizados. 3 horas de incubación: a) YPG; b) suero nativo; c) plasma nativo; d) suero desnaturalizado; e) plasma desnaturalizado. A las 6 horas de incubación: A) YPG; B) suero nativo; C) plasma nativo; D) suero desnaturalizado; E) plasma desnaturalizado.

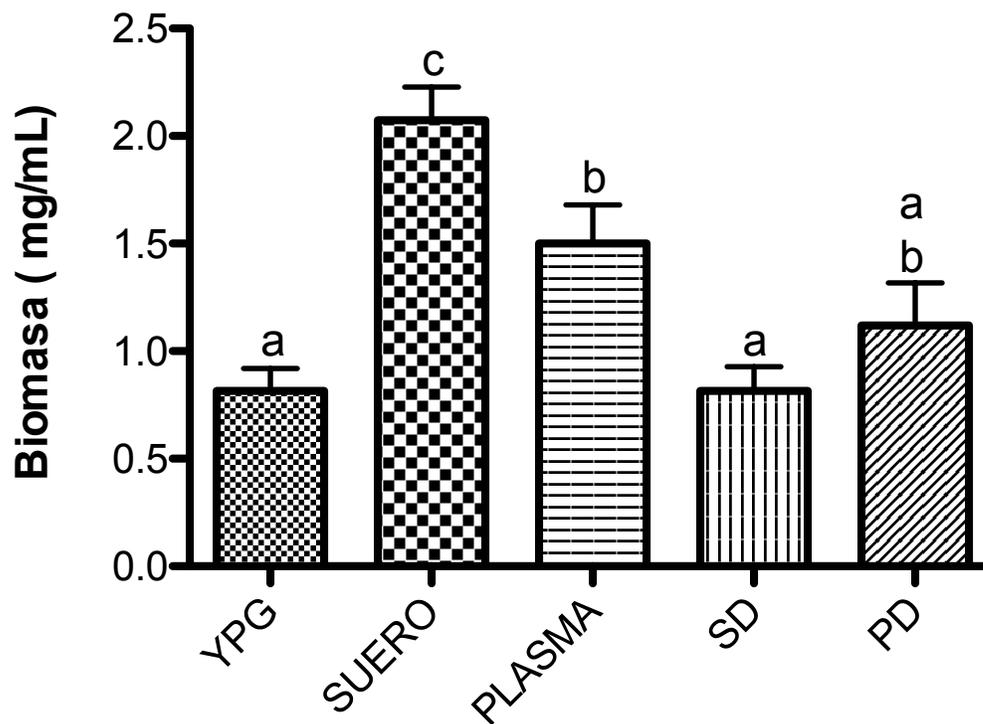


Figura 12. Efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en el crecimiento micelial de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el peso seco del micelio filtrado a las 8 horas de incubación, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. SD:suero desnaturalizado; PD plasma desnaturalizado

7.4 Germinación anaeróbica de *M. circinelloides* en suero y plasma desnaturalizados

Se inoculó la cepa R7B en medio líquido bajo condiciones de anaerobiosis con el fin de analizar el efecto del suero sanguíneo (10%) sobre el crecimiento del hongo en su forma de levadura (Figura 13); se observó el mismo comportamiento en que las células en medio con suero y plasma desnaturalizados, tienen una germinación superior que en medio YPG, pero menor que en suero y plasma no sometidos a denaturalización. En cuanto a la morfología se observa en la Figura 14 como en suero y plasma nativos las levaduras tienen casi el doble de gemaciones, más grandes y algunas un poco alargadas (ovaladas); en algunos casos se ven gemaciones que generan sobre sí mismas otras pequeñas gemaciones y también puede notarse una especie de pseudomicelio o gemaciones alargadas.

Por otra parte en un ensayo realizado bajo las mismas condiciones se analizó el crecimiento de *M. circinelloides* mediante la cuantificación de la biomasa generada tras 8 horas de incubación en gramos de levadura por mililitro de medio para comprobar si el efecto observado en la germinación de las células también se ve reflejado en el peso de estas (Figura 15). Las fotografías tomadas con el microscopio muestran la apariencia morfológica de las células germinando y también puede notarse a grandes rasgos la diferencia en la generación de levaduras.

7.5 Germinación de *M. circinelloides* en solución de CPD/SSB al 10%

El plasma donado por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea de la Secretaría de Salud en Michoacán contiene ciertos aditivos que se agregan con la finalidad de preservarlo. Una vez obtenidos los resultados anteriores en cuanto al crecimiento, esporulación y germinación de *M. circinelloides* fue necesario corroborar que dicho efecto sea debido a un componente exclusivo del suero sanguíneo humano y no a alguno de los aditivos presentes en el suero.

Las bolsas en las que se separa y almacena el plasma contienen CPD (un aditivo conservante, anticoagulante para el correcto almacenamiento del plasma) así que se preparo medio con 10% de dicho anticoagulante, previamente se adiciono solución salina biológica a un volumen similar al plasma sanguíneo (aproximadamente 200 ml) y se hicieron crecer esporas de R7B en condiciones aeróbicas. Las graficas muestran que el CPD si povoca un ligero aumento de la germinacion, sin embargo no alcanza los niveles que se obtienen con el suero y son más bien, cercanos a los niveles de germinacion del medio YPG (Figuras 16 y 17).

7.6 Transiciones morfológicas de *M. circinelloides* en suero humano

Por ultimo se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de *Mucor* para hacer transiciones en un medio con 10% de suero. La capacidad del hongo de realizar transiciones no se vio afectada por la presencia de suero.

Sin embargo, si hay pequeñas diferencias en la morfología de las hifas en la transición levadura-micelio en donde se ven hifas con más ramificaciones en el crecimiento con suero y las cuales en algunos casos presentan estructura parecida a septos en las hifas y levaduras con casi el doble de gemaciones en medio con suero respecto al control de YPG (Figura 18). En la Figura 19 se muestra que también el suero provoca que la conversión de levadura a micelio ocurra más rápidamente en 10% de suero que en el control.

Mientras que en la transición micelio levadura (Figura 20) lo más notorio es un cambio dimorfo más rápido en suero que en YPG; en cuanto a la morfología no se observaron diferencias como en la transición levadura-micelio.

Esto indica que el suero no evita que ocurran las transiciones dimorfas de manera normal, pero si genera pequeños cambios en la morfología tanto del micelio como de las levaduras de *M. circinelloides*.

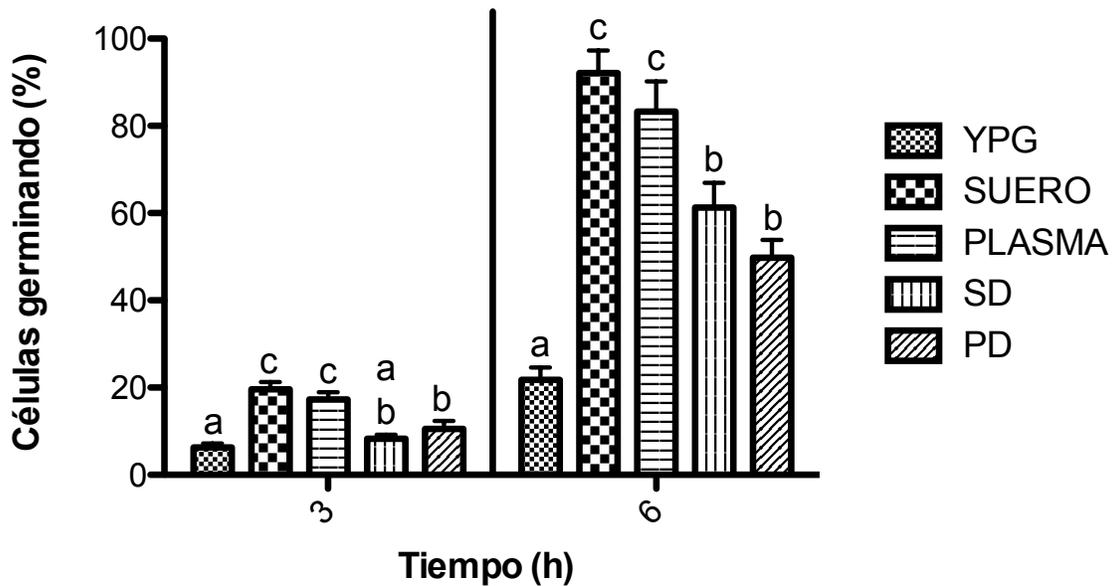


Figura 13. El efecto del suero y plasma sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en la germinación anaeróbica de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el porcentaje total de células germinadas a cada uno de los tiempos indicados, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. SD:suero desnaturalizado; PD: plasma desnaturalizado

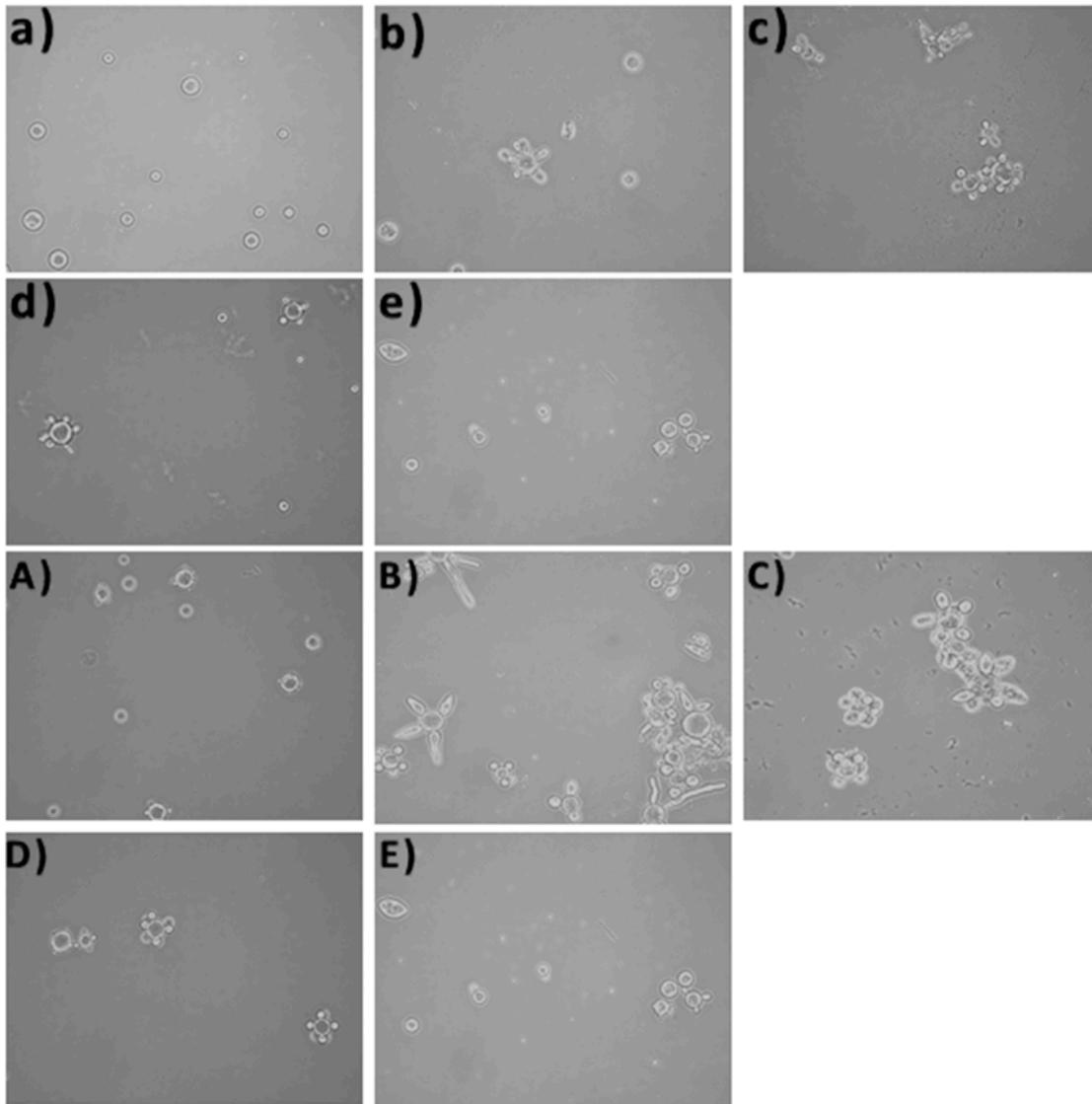


Figura 14. Aspecto morfológico de *M. circinelloides* durante la germinación anaeróbica con suero y plasma nativos y desnaturalizados. 3 horas de incubación: a) YPG; b) suero nativo; c) plasma nativo; d) suero desnaturalizado; e) plasma desnaturalizado. A las 6 horas de incubación: A) YPG; B) suero nativo; C) plasma nativo; D) suero desnaturalizado; E) plasma desnaturalizado.

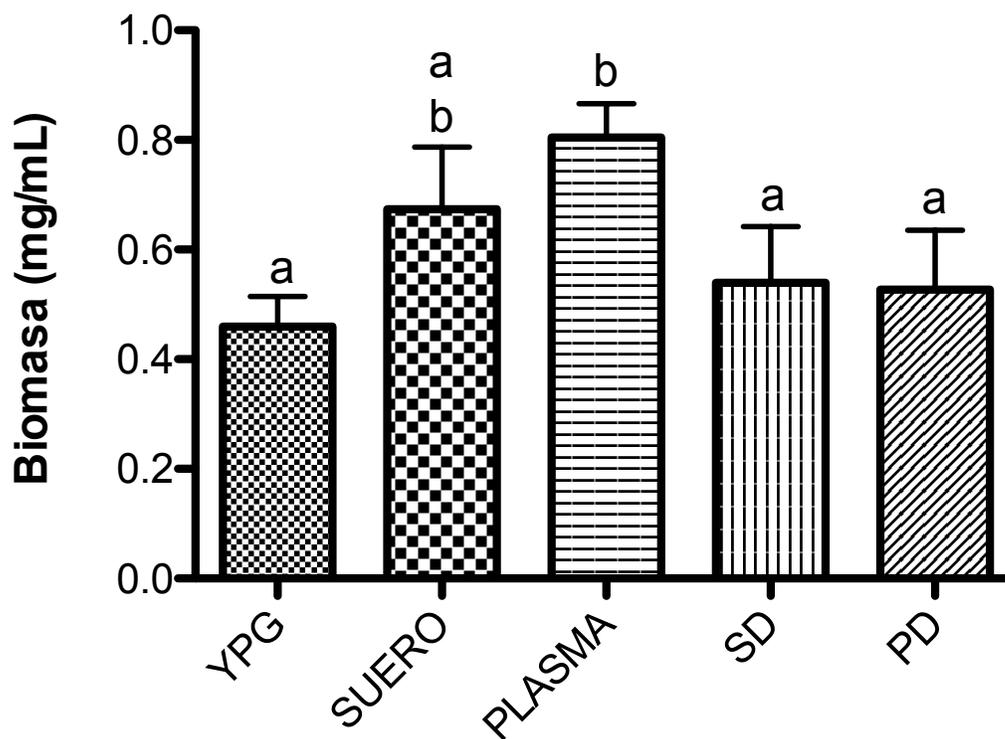


Figura 15. Efecto del suero sanguíneo de origen humano nativo y desnaturalizado en el crecimiento levaduriforme de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el peso seco de las levaduras filtradas a las 8 horas de incubación, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. SD:suero desnaturalizado; PD: plasma desnaturalizado

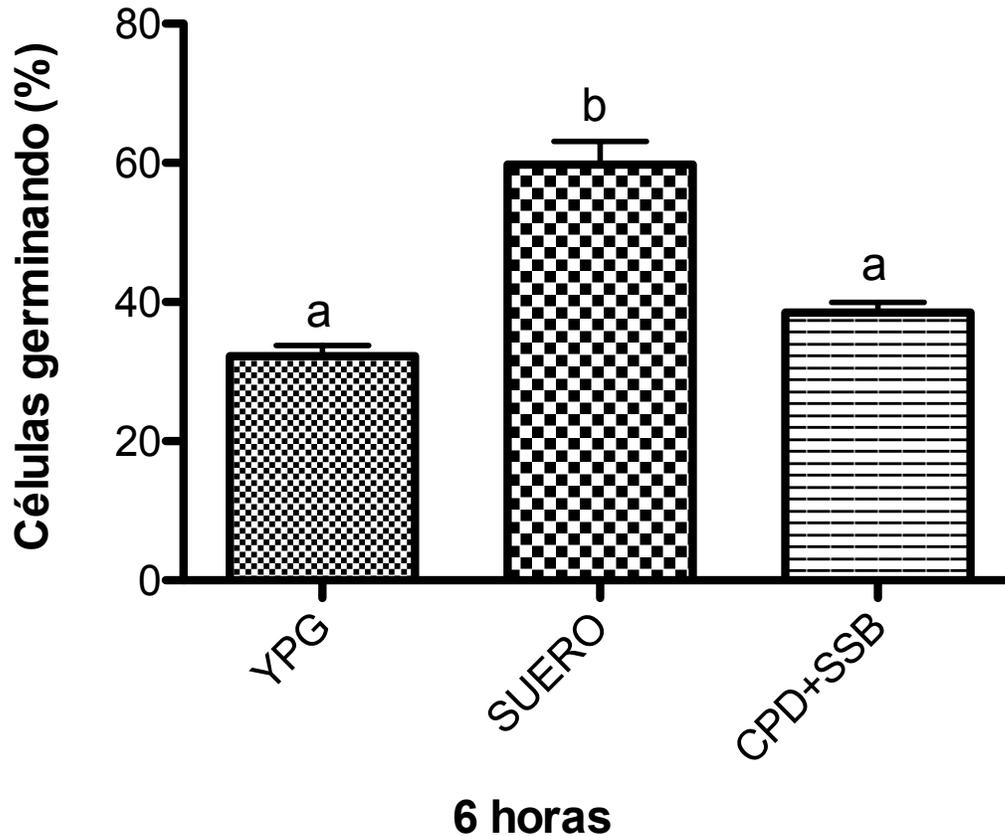


Figura 16. Efecto del anticoagulante CPD en la germinación aeróbica de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C, se evaluó el porcentaje total de células germinadas al tiempo indicado, N=4. Las barras corresponden al error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. CPD: anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa; SSB: solución salina biológica

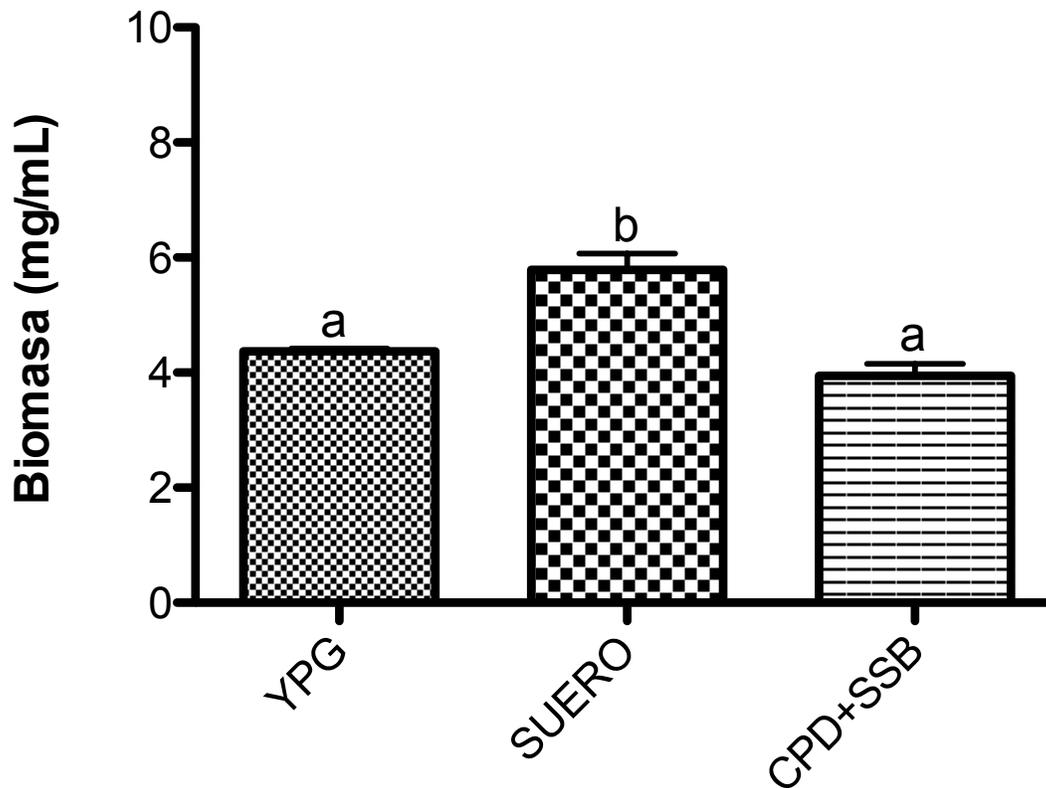


Figura 17. Efecto del anticoagulante CPD en el crecimiento micelial de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones de agitación constante (125 rpm) a 28°C , se evaluó el peso seco del micelio filtrado a las 8 horas de incubación, $N=4$. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras. CPD: anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa; SSB: solución salina biológica

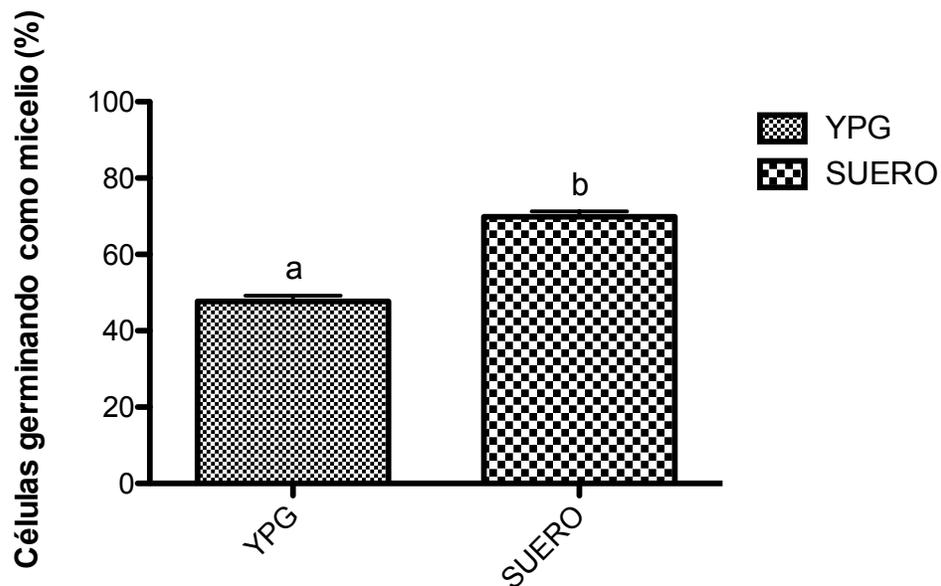


Figura 18. Efecto del suero en la transición morfológica levadura-micelio de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones anaeróbicas y agitación constante (125 rpm) a 28°C, se filtraron las levaduras y se inocularon en medio fresco para su incubación en condiciones aeróbicas, se evaluó el porcentaje total de células germinadas como micelio al tiempo de 5 horas, así como la morfología de estas, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras.

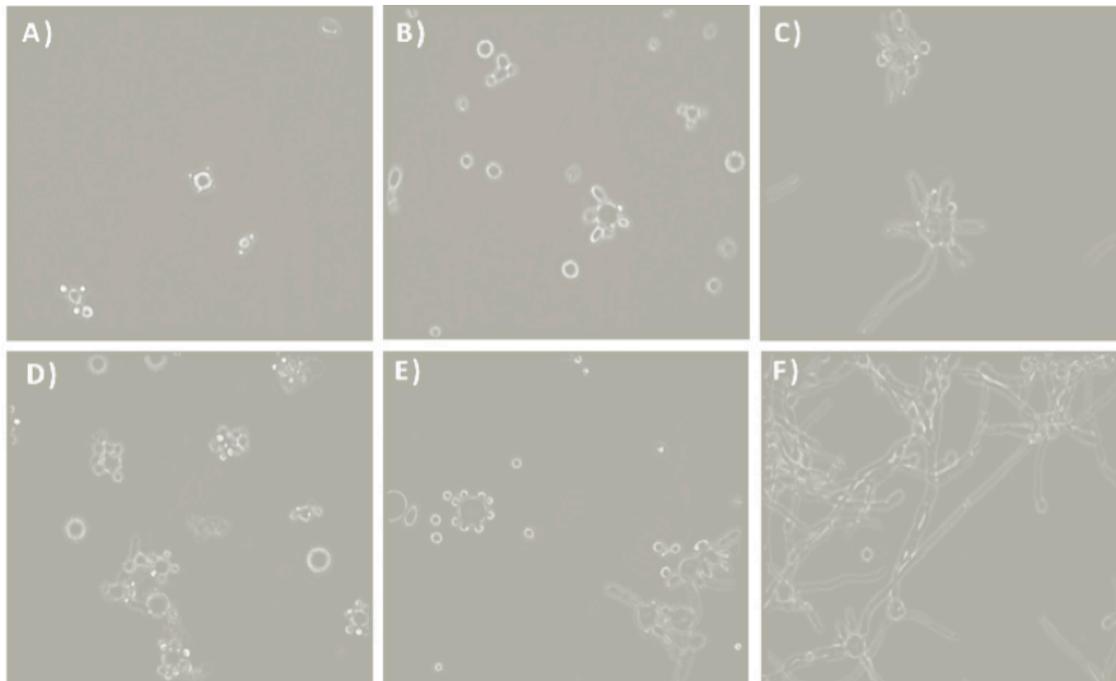


Figura 19. Apariencia morfológica de *M. circinelloides* durante la transición levadura-micelio. 6 horas de incubación anaeróbica; A) YPG, D) suero humano 10%. 3 horas de incubación aeróbica; B) YPG, E) suero humano 10%. 6 horas de incubación aeróbica; C) YPG, F) suero humano 10%. N=4 70×10^6 esporas a 28°C.

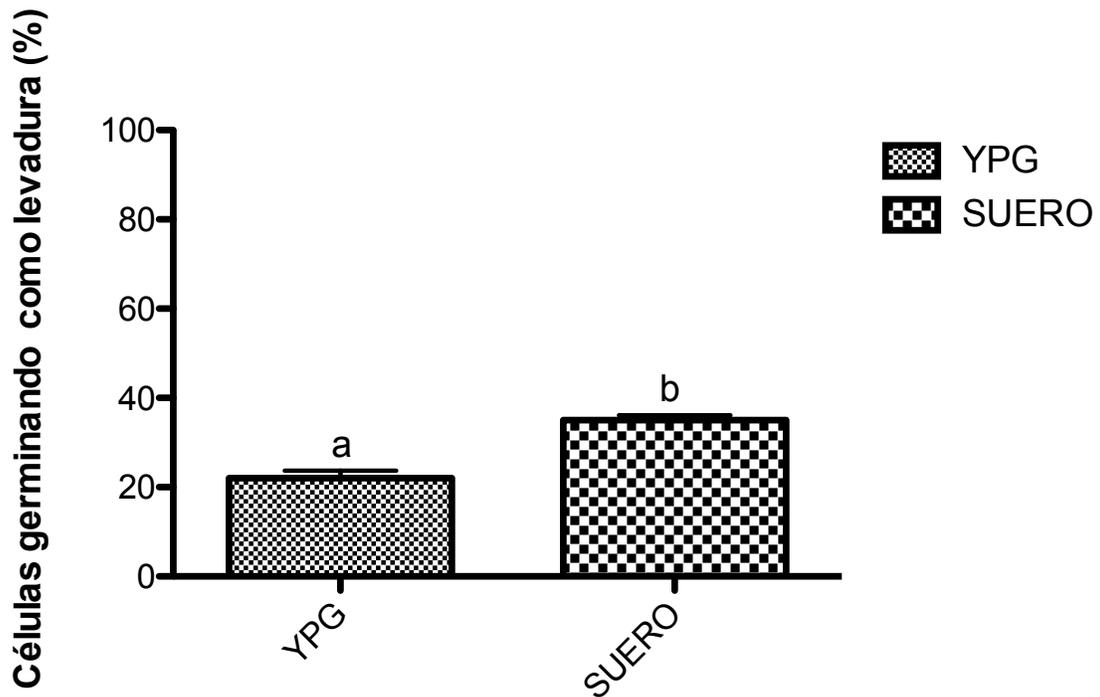


Figura 20. Efecto del suero en la transición morfológica micelio-levadura de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mililitro de medio YPG en condiciones aeróbicas y agitación constante (125 rpm) a 28°C, se filtró el micelio y se inoculó en medio fresco para su incubación en condiciones anaeróbicas, se evaluó el porcentaje total de células germinadas como levadura al tiempo de 7 horas, así como la morfología de estas, N=4. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Bonferroni, $p < 0.05$) se muestran en letras.

8. DISCUSIÓN

La diferenciación celular es un proceso muy importante en el ciclo biológico de todo organismo, pues con este, los organismos adquieren características que le permiten adaptarse a las condiciones ambientales en las que se desarrollará y por ende determinar también su forma de alimentación, cómo metabolizar ese alimento, reproducirse, etc.

El efecto del suero sanguíneo en los hongos ha sido poco estudiado pues solo se tienen antecedentes en *C. albicans* en donde se ha comprobado que el suero sanguíneo induce la transformación de las levaduras en micelio (Alvarez F y Konopka J, 2006). Se decidió estudiar el efecto del suero en *M. circinelloides* basándonos en varios puntos; 1) *M. circinelloides* es un hongo saprófito que normalmente no causa daño importante a la salud por contacto o inhalación de las esporas en personas sanas, pero cuando el huésped pasa por un estado de inmunosupresión genera una enfermedad que si es grave y que incluso compromete la vida del paciente y en donde dicho hongo puede invadir varios órganos y la sangre, teniendo contacto directo con el suero ; 2) el dimorfismo en *M. circinelloides* ha sido objeto importante de estudio por su capacidad para crecer como micelio, levadura y hacer transiciones morfológicas manipulando las condiciones de crecimiento (Murcia-Flores y col., 2007; 3) tanto *Candida* como *Mucor* son oportunistas y ocasionan infecciones importantes en pacientes con enfermedades que comprometen el sistema inmune como lo es la Diabetes tipo II, el cáncer y el SIDA o trasplantes (Chian-Yong L and Coleman R, 2011).

En el caso de *Mucor circinelloides*, patógeno oportunista de humanos, se analizó el efecto del suero en el proceso dimórfico, con la finalidad de establecer si este componente hematológico inducía un cambio en la velocidad de crecimiento o incluso en la diferenciación dimórfico, con el propósito de empezar a dilucidar un factor o factores en el suero que pudiese contribuir en el proceso de virulencia como ocurre en *C. albicans*, donde la inducción de la filamentación a través de transducción de señales mediadas por un receptor acoplado a proteína G la hace

más virulenta generando importantes infecciones sistémicas, en contraste con las infecciones causadas bajo la morfología de levadura que si bien son más frecuentes también suelen ser de más rápida solución (Pfaller MA and Diekema DJ, 2007).

Se inició evaluando la germinación aeróbica en concentraciones crecientes de suero sanguíneo (10%, 25%, 50% y 100%) en donde se vio un 80% más de germinación en las concentraciones 10, 25 y 50% de suero que el control (0% de suero) a las 2 horas de incubación y de casi el doble a las 4 horas, pero una notable inhibición (menos de la mitad de células germinando en comparación con el control) de la germinación a una concentración de 100% de suero.

Tras la evaluación de los resultados determinamos que hay un efecto positivo numéricamente muy similar las concentraciones de 10, 25 y 50% sobre el crecimiento del hongo. En el caso de la inhibición de la germinación en 100% de suero se podría estar contradiciendo el efecto positivo observado en menores concentraciones, pero se sugiere que tiene que ver con la presencia de aditivos u otras sustancias en las bolsas de recolección del plasma, además de que en el cuerpo humano este no constituye el 100% de la composición sanguínea sino aproximadamente un 55% (Medicine ABC, 2012) y que en el ensayo las esporas tienen a la mano sustancias, que si bien son nutritivas, también son muy diversas y complejas y se desconoce si al crecer en solo suero, alguna de esas sustancias interviene negativamente en las vías de señalización que determinan la germinación de *M. circinelloides*.

Una vez analizados los resultados se decidió usar la concentración de 10% para los ensayos posteriores pues comparado con 25 y 50% la germinación es casi igual, con la ventaja de que estamos usando menor cantidad de suero. Además de que en los reportes de *C. albicans* se ha utilizado una concentración también del 10% de suero humano (Laforet-Aguilera, 2009).

Nuestros datos indican que el suero sanguíneo genera un aumento en la germinación tanto en crecimiento aeróbico (aproximadamente 30% más que en el

control) como anaeróbico (hasta 35% más que en el control), efecto también observable en la generación de biomasa. Estos porcentajes de aumento en el crecimiento son comparables con los reportados en la literatura revisada en Ocampo J, 2012) y otros.

Posteriormente se realizó la desnaturalización tanto del suero como del plasma para descartar que el efecto observado fuera debido a que las sustancias como carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, hormonas, minerales, etc. del suero o plasma pudieran representar una mayor cantidad de nutrientes accesibles para las esporas que ayuden a su desarrollo para formar micelio o levaduras más rápido que en únicamente medio YPG, pues en otros trabajos utilizan el suero a modo de aportar cierto nutrientes al medio de cultivo. Lesuisse E y col. (2002), estudiaron los sistemas de captación de hierro en *C. albicans* y *S. cerevisiae* en un crecimiento con suero humano para estudiar los factores de virulencia en hongos oportunistas. En el proceso de desnaturalización se somete el suero y plasma a temperaturas altas (de hasta 55°C por un tiempo de 12 horas lo cual ocasiona que muchas proteínas termolábiles pierdan su estructura nativa y con ello sus funciones biológicas. Se esperaba que si el efecto positivo se debiera a una cuestión nutricional, aún en suero y plasma desnaturalizados, se observaría el mismo aumento en la germinación pues sin importar el estado (estructura) de las proteínas seguiría habiendo la misma cantidad de nutrientes en el medio para ser utilizadas por el hongo. Sin embargo, los resultados muestran que tras la desnaturalización, la germinación aeróbica disminuye hasta un 60% respecto a la germinación con suero (90%) y plasma (80%) nativos y acercándose más bien al porcentaje de germinación en medio YPG de también un 60% y en condiciones anaeróbicas la disminución de la germinación de 90% en suero y 80 % en plasma nativos baja hasta 50% en suero y plasma desnaturalizados , es decir, lo que este causando un aumento en la germinación en *M. circinelloides* no se debe a la cantidad nutrientes en el medio, sino a un factor con una función específica en la germinación, la cual pierde su función al someterse a una desnaturalización.

También es importante tener en cuenta que las unidades de plasma utilizadas contienen cierta cantidad de aditivos conservantes y anticoagulantes (en este caso CPD, que es una solución de Citrato de Sodio, Ácido Cítrico, Dextrosa y Fosfato de Sodio Monobásico) (Vite-Casanova, 2013) que también podrían estar interviniendo en el aumento de la germinación, así que se realizó un ensayo en el que se sustituyó el suero por anticoagulante CPD, al que se le dio el mismo tratamiento que al suero y se usó a la misma concentración que este último. Aquí observamos que al incubar esporas en medio YPG con 10% de CPD no había diferencia significativa respecto al YPG tanto en la germinación como en el crecimiento de *M. circinelloides*, por lo tanto se concluyó que este aditivo presente en las bolsas de plasma no es el responsable del efecto observado en la germinación.

En cuanto al efecto en el dimorfismo evaluamos como afecta la presencia del suero en las transiciones morfológicas.

Es importante mencionar que en los ensayos de transición los tiempos de incubación fueron variables pues las levaduras tardan más (aproximadamente 7 horas) en adquirir una morfología reconocible, mientras el micelio se desarrolla más rápido (alrededor de las 4 horas ya hay hifas pequeñas) (Valle M, 2013).

Primero se realizó la transición de levadura a micelio en donde se incubaron las esporas en condiciones de anaerobiosis durante 7 horas, se cuantificó la germinación y se filtró la biomasa, después se inoculó en condiciones de aerobiosis para ser incubada por 5 horas más y cuantificar la formación de micelio. Se evaluó la cantidad de esporas, células hinchadas (en las cuales no se identifica si son levaduras o hifas), células creciendo como levaduras y células que ya han pasado al estado de micelio.

Lo siguiente fue hacer la transición micelio-levadura primero incubando las esporas de *M. circinelloides* en aerobiosis por 5 horas con la posterior cuantificación de la germinación y filtración del micelio para pasar a medio fresco y crecer en anaerobiosis durante 7 horas.

Observamos que en ambas (micelio-levadura y levadura-micelio) el cambio de un estadio a otro ocurre hasta 30% más rápido en suero respecto al control además de que la morfología muestra pequeñas (no muy significativas, pero dignas de tomar en cuenta) diferencias en la forma de desarrollar las hifas; por ejemplo, se llegan a observar hifas más ramificadas que las crecidas en medio YPG, además de que la cantidad de esporas es mayor en YPG que en suero. En el caso de las levaduras se observa hasta dos veces más gemaciones en el crecimiento con suero respecto al control. Trabajos como el de Charles H. Li y col. (2011) demuestran que el tamaño de spora en subespecies de *M. circinelloides* esta relacionado con su virulencia; si esto se aplica al aumento en la germinación y tamaño de hifas y levaduras podríamos estar hablando de un componente específico en el suero humano al que *M. circinelloides* es capaz de responder como factor de virulencia

Aunque este trabajo es meramente descriptivo servirá como antecedente para profundizar en la investigación para conocer específicamente que es lo que causa los efectos observados en el desarrollo y diferenciación de *M. circinelloides*.

9. CONCLUSIÓN

El suero sanguíneo de origen humano ejerce un efecto positivo sobre la germinación y crecimiento de *Mucor circinelloides* en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas y así también en la esporulación, pero a pesar de ello no se observa que genere algún cambio también en la diferenciación. Aún desconocemos el componente específico causante de dicho efecto.

10. REFERENCIAS

Ajello L, Dean DF, Irwin RS, 1976. The zygomycete *Saksenaea vasiformis* as a pathogen of humans with a critical review of the etiology of zygomycosis. *Mycologia*; 68: 52–62.

Baron S, 1996. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch. United States of America. pp 1273.

Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MA, 2001. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4066-4075.

Bartnicki-Garcia S, 1968. Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journal of Bacteriology*. 96: 1586-1594.

Bastidas RJ, Shertz CA, Lee SC, Heitman J, 2012. Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryotic cell* 11:270-281.

Bennet JW, Wunch KG, Faison BD, 2002. Use of Fungi Biodegradation. *Manual of Environmental Microbiology*. Second Edition. ASM Press Washington. United States of America. pp 960-971.

Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F et al, 2009. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerging Infectious Disease*; 15: 1395–1401.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden 110 MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y, 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331): 1453-1462.

Bredenkamp A, Velankar H, Van Zyl WH, Gorgens JF, 2010. Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast* 27: 849-860

Brown CC, Baker DC, Barker IK, 2007. Mycotic diseases of the gastrointestinal tract. In: M.G. Maxie, Editor, *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, Elsevier, Philadelphia, 229-231.

Cain CW, Lohse MB, Homann OR, Sil A, Johnson A D, 2012. A conserved Transcriptional Regulator Governs Fungal Morphology in Widely Diverged Species. *Genetics* 190: 511-521.

Chakrabarti A, Marak RS, Shivaprakash MR et al, 2010. Cavitary pulmonary zygomycosis caused by *Rhizopus homothallicus*. *Journal of Clinical Microbiology*; 48: 1965–1969.

Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP, 2008. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clinical Infectious Disease*; 47: 503–509.

Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang, TC, 2001. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3466-3471.

Chian-Yong L and Coleman R, 2011. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicene Reports* 3:14: 1-3.

Christopeit M, Lindner A, Surov A et al, 2013. Right flank pain and high fever in a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukaemia. *Mycoses*; 56: 90–92.

Chugh KS, Sakhuja V, Gupta KL et al, 1993. Renal mucormycosis: computerized tomographic findings and their diagnostic significance. *American Journal of Kidney Diseases*; 22: 393–397.

Corrochano LM, Ruiz-Albert J, 2004. Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycological Research* 108(8): 858-863.

David H, Ozcelik IS, Hoffman G, Nielsen J, 2008. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BioMed Central Genomics* 9: 163.

De la Cruz JO, García-Soto J, Uriostegui C, Carranza L, Novoa G, Reyna G, Martínez-Cadena G, 2007. Differential expression of Rho1GTPase and Rho3GTPase during isotropic and polarized growth of *Mucor circinelloides*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 168-176.

Fridkin SK, 2005. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1455- 1460.

Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T, 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 3617-3622.

García JM, 2008. Biotipado molecular de hongos con interés clínico y su aplicación en el diagnóstico y la epidemiología. Tesis doctoral, Universidad de Valencia: 45-48.

Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP, 2011. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-Rhizopus, -Mucor, and -Lichtheimia species. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 411–445.

Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA et al, 2006. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 50:126–133

Greene CE, Chandler FW, 2006. *Candidiasis* and rhodotorulosis. In: C.E. Greene, Editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Elsevier, St. Louis, 627-633.

Hemashettar BM, Patil RN, O'Donnell K, Chaturvedi V, Ren P, Padhye AA, 2011. Chronic rhinofacial mucormycosis caused by *Mucor irregularis* (*Rhizomucor variabilis*) in India. *Journal Clinical Microbiology*; 49: 2372–2375.

Horger M, Hebart H, Schimmel H et al, 2006. Disseminated mucormycosis in haematological patients: CT and MRI findings with pathological correlation. *British Journal of Radiology* 79:88–95

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T et al, 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444(7115): 97-101.

Kara IO, Tasova Y, Uguz A, Sahin B, 2009. Mucormycosis-associated fungal infections in patients with haematologic malignancies. *International Journal of Clinical Practice* 63:134–139.

Kruglyak S, Durrett R, Schug MD, Aquadro CF, 2000. Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. *Molecular Biology and Evolution* 17(8): 1210-1219.

Kurtzman CP, 2000. Systematics and Taxonomy of Yeasts. In: J.F. Ernst, A. Schmidt (eds), *Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts. Contributions to Microbiology*. Basel, Karger, vol 5, 1- 14.

Kwon-Chung KJ, 2012. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clinical Infectious Disease*; 54 (Suppl. 1): S8–S15

Lanternier F et al, 2012. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study. *Clinical Infectious Disease*; 54 (Suppl. 1): S35–S43.

Laforet-Aguilera L, 2009. Estudio de Pga26, una proteína implicada en la

arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, Valencia. 85-86.

Lewis RE et al, 2013. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses*; 56: 638–645.

Lewis RE et al, 2013. Risk factors for early mortality in haematological malignancy patients with pulmonary mucormycosis. *Mycoses*. doi: 10.1111/ myc.12101.

Li DM and Lun LD, 2012. *Mucor irregularis* infection and lethal midline granuloma: a case report and review of published literature. *Mycopathologia*; 174: 429–439.

López-Matas MA, Eslava AP, Díaz-Mínguez JM, 2000. *Mchs1*, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides* is differentially expressed during dimorphism. *Current microbiology* 40(3): 169-175.

Lorca-Pascual JM, Murcia-Flores L, Garre V, Torres-Martinez S, Ruiz-Vázquez RM, 2004. The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Molecular Microbiology* 52(5): 1463-1474.

Lübbenhüsen TL, Nielsen J, McIntyre M, 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of Applied Microbiology* 95: 1152–1160.

Lu QY, Yu J, Gao LJ, Zheng G, Li RY, 2012. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of invasive fungal disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*; 92: 822–826.

Lu XL, Liu ZH, ShenYN et al, 2009. Primary cutaneous zygomycosis caused by *Rhizomucor variabilis*: a new endemic zygomycosis? A case report and review of 6 cases reported from China. *Clinical Infectious Disease*; 49: 39–43.

Maheshwari R, 2005. *Fungi: Experimental Methods in Biology*. Mycology Vol.24. Benett J.W. CRC Press. United States of America. pp 240.

Malani AN and Kauffman CA, 2007. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 67:1803–1812

Ma LJ et al, 2009. Genomic Analysis of the Basal Lineage Fungus *Rhizopus oryzae* Reveals a Whole-Genome Duplication. *PLoS Genetics* 5(7): 1000549.

Marak RS, Misra R, Ansari MS et al, 2010. Successful medical management of renal zygomycosis: a summary of two cases and a review of the Indian literature. *Medical Mycology*; 48: 1088–1095.

Mueller GM, Bills GF, Foster MS, 2004. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. United States of America. pp 777.

Maheshwari R, 2005. Fungi: Experimental Methods in Biology. Mycology Vol.24. Benett J.W. CRC Press. United States of America. pp 240.

Marcilla A, Monteagudo C, Mormeneo S, Sentandreu R, 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. Microbiology, 145: 695-701.

Matthews RC, 1996. Comparative assessment of the detection of candidal antigens as a diagnostic tool. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 34: 1-10.

McIntyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J, 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 495-502.

Meza-Carmen V, García-Soto J, Ongay-Larios L, Coria R, Pedraza-Reyes M, Arnau J, Reyna-Lopez G, Martínez-Cadena G, 2006. Molecular characterization of a G protein α -subunit-encoding gene from *Mucor circinelloides*. The Canadian Journal of Microbiology. 52: 627-635.

Murcia-Flores L, Lorca-Pascual JM, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, 2007. Non-AUG Translation Initiation of a Fungal RING Finger Repressor Involved in Photocarotenogenesis. The Journal of Biological Chemistry 282: 15394–15403.

Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kayeka H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, Kohno S, 1996. Enolase antigen, Mannan antigen, Candtec antigen and - glucan in patients with candidemia. Journal of Clinical Microbiology, 34: 1918-1921.

Mueller GM, Bills GF, Foster MS, 2004. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. United States of America. pp 777.

Navarro E, Ruiz-Pérez VL, Torres-Martínez S, 2000. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. European Journal of Biochemistry 267: 800-807.

Neblett-Fanfair R, Benedict K, Bos J et al, 2011. Necrotizing cutaneous mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri,. The New England Journal of Medicine 2012; 367: 2214–2225.

Nishijima KA and Wall MM, 2011. First Report of Association of *Mucor circinelloides* on Noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. Plant Disease 95(3): 360.

Cornely OA et al, 2013. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 20,

Orlowski M, 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews* 55: 234-258.

Ocampo J, McCormack B, Navarro E, Moreno S, Garre V, Rossi S, 2012. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell* 11(8): 989-1002.

Pagano L et al, 2006. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 91:1068–1075

Pagano L, Girmenia C, Mele L et al, 2001. Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. *Haematologica*; 86: 862–870.

Paltauf A, 1885. Mycosis mucorina. Ein Beitrag zur Kenntniss der menschlichen Fadenpilzkrankungen. *Archiv für pathologische Anatomie*; 102: 543–564.

Papagianni M, 2003. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology advances* 22 (3): 189-259.

Perfect JR, 2005. Treatment of non-Aspergillus moulds in immunocompromised patients, with amphotericin B lipid complex. *Clinical Infectious Diseases* 40(Suppl 6):S401–S408

Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*; 54 (Suppl. 1): 23–34.

Pfaller MA and Diekema DJ, 2007. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 133-163.

Quiles-Rosillo MD Torres-Martínez S, Garre V, 2003. *cig A*, a light inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crg A*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 122-132.

Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ, 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151: 705-716.

Rees JR Pinner RW, Hajjeh RA, Brandt ME, Reingold AL, 1998. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay

area, 1992–1993: results of population-based laboratory active surveillance. *Clinical Infectious Diseases*; 27: 1138–1147.

Reuping MJ, Heinz WJ, Kindo AJ et al, 2010. Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 65: 296–302.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL et al, 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clinical Infectious Diseases* 41:634–653.

Roncero MI, Jepsen LP, Strøman P, van Heeswijck R, 1989. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* 84: 335-343.

Dégano-Blaquez RM, 2011. Acetiltransferasas de histonas en *Candida albicans*: análisis del perfil transcripcional. Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Roze LV, Mahanti N, Mehig R, McConnell DG, Linz JE, 1999. Evidence that *MRas1* and *MRas3* proteins are associated with distinct cellular functions during growth and morphogenesis in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal genetics and biology* 28(3): 171-189.

Salcedo-Hernández R and Ruiz-Herrera J, 1993. Isolation and characterization of a mycelial cytochrome *aa3*-deficient mutant and the role of mitochondria in dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* 17: 142–154.

Sharma PD, 2005. *Fungi and Allied Organisms*. Alpha Science International. Oxford, United Kingdom. pp. 300.

Sharma R, Shivanand G, Kumar R et al, 2006. Isolated renal mucormycosis: an unusual cause of acute renal infarction in a boy with aplastic anaemia. *The British Journal of Radiology*; 79: e19–e21.

Singh LP, Gill SS, Tuteja N, 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 6(2): 175-191.

Skiada A, Pagano L, Groll A et al, 2011. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clinical Microbiology Infectious*; 17: 1859–1867.

Sorol MR, Pastori RL, Muro A, Moreno S, Rossi S, 2000. Structural and functional analysis of the cAMP binding domain from the regulatory subunit of *Mucor rouxii* protein kinase A. *Archives of biochemistry and biophysics* 382(2): 173-181.

Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, Edwards J Jr, Ibrahim AS 2009. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clinical Infectious Diseases* 48:1743–1751

Torres-Narbona M, Guinea J, Martinez-Alarcon J, Pelaez T, Bouza E, 2007. In vitro activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of zygomycetes: comparison of CLSI M38-95. A, Sensititre YeastOne, and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 51: 1126–1129.

Van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP, 2006. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clinical Infectious Diseases* 42:e61–e65

Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A, 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 34: 213-220.

Walbot V and Petrov DA, 2001. Gene galaxies in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(15): 8163-8164.

Wikandari R Millati R, Lennartsson PR, Harmayani E, Taherzadeh MJ, 2012. Isolation and Characterization of Zygomycetes Fungi from Tempe for Ethanol Production and Biomass Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(6):1501-1512.

Wolff AM, Appel KF, Petersen JB, Poulsen U, Arnau J, 2002. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (*syn. racemosus*). *FEMS Yeast Research* 2(2): 203-213.

Xia C, Zhang J, Zhang W, Hu Bo, 2011. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology and Biofuels* 4: 15-24.

Xia ZK, Wang WL, Yang RY, 2013. Slowly progressive cutaneous, rhinofacial, and pulmonary mucormycosis caused by *Mucor irregularis* in an immunocompetent woman. *Clinical Infectious Disease*; 56: 993–995.

Xie X and Lipke PN, 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* 27(8): 479-488.