



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LA OXIDOREDUCTASA
ADH1 EN LA VIRULENCIA DEL HONGO
Mucor circinelloides”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A:

pQFB. ALEJANDRA YITZEL GUZMÁN HERNÁNDEZ

ASESOR:

D.C VICTOR MEZA CARMEN



MORELIA, MICHOACÁN; AGOSTO 2016

ÍNDICE

A. ÍNDICE DE FIGURAS	III
B. ÍNDICE DE TABLAS	IV
C. RESUMEN.....	V
D. ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de los hongos	1
1.1.1 Clasificación de los hongos	2
1.1.2 Phylum zygomycota	3
1.2 Hongos patógenos.....	4
1.2.1 Hongos patógenos en humanos	4
1.3 Factores de virulencia de los hongos.....	5
1.4 El género <i>Mucor</i>	8
1.4.1 Generalidades del crecimiento de <i>Mucor circinelloides</i>	8
1.4.2 Factores de virulencia en <i>Mucor circinelloides</i>	10
1.5 Mucormicosis	11
1.5.1 Factores que propician la diferenciación de <i>Mucor circinelloides</i>	14
1.6 Alcohol deshidrogenasas	16
1.6.1 La alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺ en <i>Mucor circinelloides</i>	19
1.6.2 La alcohol deshidrogenasa ADH1 en la virulencia de <i>Candida albicans</i>	20
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVO GENERAL	22
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	22
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Organismos utilizados.....	24
6.2 Medios de cultivo	25

6.2.1 Medio YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)	25
6.2.2 Medios mínimos	25
6.3 Corroboración del fenotipo de las cepas utilizadas	25
6.4.1 Obtención de esporas (Medio sólido).....	26
6.4.2 Obtención de micelio (Medio líquido).....	26
6.4.3 Cuantificación del crecimiento.....	27
6.5 Velocidad de germinación.....	27
6.6 Ensayos de virulencia	27
6.6.1 Lesiones intestinales en <i>Mus musculus</i>	28
VII. RESULTADOS	29
7.1 Efecto del gen <i>adh1</i> en la germinación de <i>Mucor circinelloides</i>	29
7.2 Efecto del gen <i>adh1</i> en el crecimiento de <i>Mucor circinelloides</i>	30
7.3 Efecto en el gen <i>adh1</i> en la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	31
7.4 Lesiones intestinales en <i>Mus musculus</i>	33
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES	37
X. REFERENCIAS	38

A. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- PAPEL DE LA CALCINEURINA EN EL DIMORFISMO Y LA VIRULENCIA DE <i>M. CIRCINELLOIDES</i>.....	11
FIGURA 2. PACIENTE CON MUCORMICOSIS RINOCEREBRAL.	12
FIGURA 3. CICLO DE VIDA DE <i>MUCOR CIRCINELLOIDES</i>.	16
FIGURA 4. PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA ALCOHOL DESHIDROGENASA EN LAS DISTINTAS RUTAS METABÓLICAS DE LA GLUCOLISIS.	19
FIGURA 5. BIOPELÍCULAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>..	21
FIGURA 6. FENOTIPO DE LAS CEPAS R7B Y M5 DE <i>M. CIRCINELLOIDES</i> EN LOS DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO ANALIZADO.. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
FIGURA 7. FENOTIPOS DE LAS CEPAS R7B Y M5(<i>ADH1</i>⁻) DE <i>M. CIRCINELLOIDES</i> EN LOS MEDIOS MÍNIMOS B Y YNB. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
FIGURA 8. GERMINACIÓN AEROBIA.	29
FIGURA 9. EFECTO DEL GEN <i>ADH1</i> DE <i>M. CIRCINELLOIDES</i> EN LA GENERACIÓN DE BIOMASA.	30
FIGURA 10. VIRULENCIA EN <i>MUS MUSCULUS</i>.	32
FIGURA 11. LA CEPA MUTANTE <i>ADH1</i>⁻ DE <i>MUCOR CIRCINELLOIDES</i> GENERA LESIONES DE ÓRGANOS PERITONEALES..	34

B. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- FENOTIPO DE LAS CEPAS DE <i>MUCOR CIRCINELLOIDES</i>	24
--	----

C. RESUMEN

Mucor circinelloides es un hongo dimórfico, miembro del Phylum Zygomycota del orden Mucorales, dentro de los cuales se encuentra *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*. Algunas especies de estos hongos son causantes de la infección denominada mucormicosis y se ha descrito que sólo el 50% de los pacientes sobreviven bajo tratamiento médico adecuado, este tipo de infecciones es más frecuente en pacientes inmunodeprimidos. Los géneros *Aspergillus* y *Candida* son responsables del 80% de todas las infecciones fúngicas invasivas, la mucormicosis contribuye con el 8% de este tipo de infecciones. El gen *adh1* codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa y se encuentra involucrada en la última etapa de la síntesis de etanol. En *Candida albicans* fue demostrado que el gen *adh1* es responsable de aumentar los niveles de etanol tanto in vitro como in vivo y su supresión generó mayores niveles de acetaldehído. Además, la mutante *adh1⁻* en *C. albicans* incrementó la generación de biopelículas; las biopelículas se asocian con un aumento en la virulencia en diversos patógenos. La mutación en el gen *adh1⁻* de *M. circinelloides* mostró un aumento en los niveles de virulencia comparándolo con la cepa silvestre en ensayos con ratones sanos no inmunodeprimidos. Los resultados demostraron que cuando las esporas son inoculadas por vía intraperitoneal a cada ratón, la mutante generó un 100% de letalidad después de 24 horas post-inoculación, mientras que la sobrevivencia de los ratones con la cepa silvestre fue del 100% en el mismo lapso de tiempo. Esto indica que al igual que en *C. albicans* el producto de este gen está implicado en la virulencia, quizás el mecanismo sea muy similar, ya sea por una acumulación de acetaldehído en células de mamífero, la cual podría generar dicha toxicidad o formar biofilms. Esto no ha sido demostrado en *M. circinelloides*.

Palabras clave: *Mucor circinelloides*, mucormicosis, virulencia, alcohol deshidrogenasa, etanol.

D. ABSTRACT

Mucor circinelloides is a dimorphic fungus, a member of the phylum zygomycota of the Mucorales order, within which is Rhizopus, Mucor, Lichtheimia. Some species of these fungi are causing the infection known as mucormycosis and has been reported that only 50% of patients survive under proper medical treatment, these infections are more common in immunosuppressed patients. The genera *Aspergillus* and *Candida* are responsible for 80% of all invasive fungal infections, mucormycosis contributes 8% of these infections. The ADH1 gene encodes to the alcohol dehydrogenase enzyme and is involved in the last step of the synthesis of ethanol. In *Candida albicans* it has been demonstrated that the Adh1 gene is responsible for increasing ethanol levels both in vitro and in vivo and its suppression generates higher levels of acetaldehyde. In addition, the mutant *adh1- C. albicans* increases biofilms generation; biofilms are associated with increased virulence in various pathogens. The mutation in the gene of *M. circinelloides adh1* increased levels of virulence compared to wild type in tests on healthy immunocompetent mice. The results of this work showed that when spores are inoculated intraperitoneally into each mouse, the mutant generated a 100% lethality after 24 hours of inoculation, while the survival of mice with the wild strain was 100% in the same lapse of time. This indicates that as in *C. albicans* the product of this gene is involved in virulence, perhaps the mechanism is very similar, through an accumulation of acetaldehyde in mammalian cells, which could generate such toxicity or form biofilms. This has not been demonstrated in *M. circinelloides*.

Keywords: *Mucor circinelloides*, mucormycosis, virulence, alcohol dehydrogenase, ethanol.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas que carecen de clorofila, por lo que necesitan obtener sus requerimientos nutricionales de material orgánico ya formado. Son organismos imprescindibles para descomponer y reciclar la materia orgánica. La organización del genoma está conformada como en todos los eucariotas, en cromosomas, los cuales se hallan envueltos por la membrana nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol, que no ha sido encontrado en los demás eucariontes, además presentan una pared celular compuesta de polisacáridos (quitina, quitosana, glucana, entre otros), proteínas y glucoproteínas (Xie y Lipke, 2010).

El tamaño del genoma de los hongos oscila entre 7 y 45 millones de pares de bases (Mb) de ADN (Maheshwari, 2005).

Casi todos los hongos son aerobios, aunque algunos son anaerobios (fermentadores) facultativos y otros son anaerobios estrictos. Se reproducen de forma sexual (teleomórfica) o asexual (anamórfica). De acuerdo a su origen, las esporas asexuales reciben el nombre de talosporas, conidios y esporangiosporas, las que se producen sexualmente se clasifican como ascosporas, basidiosporas y zigospora. Las esporas son células especializadas, que al encontrar las condiciones adecuadas de humedad, temperatura, luz y nutrientes, germinan y producen hifas, las cuales son estructuras filamentosas que constituyen la unidad anatómica fundamental de los hongos. Un conjunto de hifas forman el micelio, en algunos hongos el citoplasma fluye a lo largo de las hifas sin paredes transversales que lo interrumpen y es llamado cenocítico. Si la hifa posee septos, los cuales son una estructura en forma de tabiques transversales con poros que permiten el flujo citoplasmático entre todo el citoplasma, a estas hifas se les llaman septadas. Pero no todos los hongos forman hifas, algunos hongos generan levaduras, las cuales son unicelulares,

como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, estas se producen asexualmente por brote (gemación) y división transversal (fisión). Las levaduras también pueden reproducirse sexualmente por la formación de esporas (Königstein, 2000).

Algunos hongos pueden presentar dimorfismo, es decir pueden desarrollarse en dos formas, de levadura o micelio, esto en respuesta a cambios de factores ambientales tales como: nutrientes, tensión de CO₂, potenciales Redox o la temperatura. En cuanto a su metabolismo, los hongos son heterótrofos. Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absorptivo, es decir obtienen energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica. El glucógeno es el principal polisacárido que utilizan como reserva de energía, la mayoría de los hongos utilizan carbohidratos, principalmente glucosa y maltosa, y compuestos nitrogenados para sintetizar sus propios aminoácidos y proteínas. Los hongos requieren gran cantidad de energía que no puede ser proporcionada únicamente por las vías de glucólisis anaerobia (Emden-Meyerhof; hexosa monofosfato y Entner- Doudoroff), el rendimiento energético es de 4 moles de ATP por cada molécula de glucosa, pero estas vías son muy importantes porque proveen moléculas de ácido cítrico que continúan su oxidación en el ciclo de Krebs. Otro proceso metabólico de los hongos es la fermentación alcohólica, este proceso inicia cuando el ácido pirúvico se une a la coenzima tiamina difosfato (TPP), este compuesto es descarboxilado originando acetaldehído que se convierte en alcohol etílico cuando acepta iones de hidrógenos de NADH₂ (Méndez-Tovar, 2010).

1.1.1 Clasificación de los hongos

Los hongos se clasifican de acuerdo a la relación con otros organismos, como saprofitos (obtienen sus nutrientes de organismos muertos), simbiotes (viviendo en cooperativismo con otros organismos) o parásitos (viven de otros organismos sin cooperativismo) (Baron, 1996). La clasificación de los hongos (Phylum o división), clases, familias y especies; actualmente se han reordenado, basándose en las propiedades morfológicas, reproductivas, fisiológicas y marcadores

moleculares. De acuerdo a esto, el reino fungi se divide en 4 Phyla distintos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* (Webster and Weber, 2007). En relación a sus propiedades reproductivas los hongos se clasifican en: Ascomicetos, sus esporas sexuales se producen en sacos llamados ascas, para los Basidiomicetos provienen de un basidio y las esporas de los Zigomicetos, de un esporangio (Sharma, 2005).

1.1.2 Phylum zygomycota

El phylum *Zygomycota* actualmente es dividido en dos clases, los *Zygomycetes* y *Trichomycetes*. Se divide en nueve órdenes: *Asellariales*, *Dimargaritales*, *Endogonales*, *Entomophthorales*, *Harpellales*, *Kickxellales*, *Mortierellales*, *Mucorales* y *Zoopagales*. Del orden *Mucorales* se encuentran géneros como *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizopus* y *Rhizomucor*. Existen zigomicetos dimórficos como es el caso de *Rhizopus oryzae* (Karmakar y col., 2012) y *Mucor circinelloides* o monomórficos como es el caso de *Phycomyces blakesleeanus* (Irdum y col., 2006).

Los miembros del phylum *Zygomycota* se han considerado un linaje primitivo (también llamado hongo basal), por la carencia de estructuras fructíferas complejas y la mayoría de los representantes tienen hifas cenocíticas (sin septos) durante todo o parte de su ciclo de vida, miden alrededor de 20 μm de diámetro y tienen un crecimiento rápido.

La mayoría de las especies de este phylum son saprofitos, pero algunas especies son patógenos facultativos de plantas, animales y humanos o incluso de otros hongos. Los ordenes *Entomophthorales* y *Mucorales* incluyen a especies de hongos causantes de micosis humanas (Mucormicosis). Algunos *Zygomycetes* son beneficiosos, tales como *Rhizopus*, que se utiliza en varios alimentos tradicionales fermentados, incluyendo tempeh y mandioca, también es productor de ácidos orgánicos, etanol (Thongchul y col., 2010) y enzimas hidrolíticas (Takahashi y col., 1978).

1.2 Hongos patógenos

El interés por las infecciones fúngicas, que en su mayoría son oportunistas, es debido a que los factores predisponentes se incrementaron de manera notable, entre ellos tenemos: aparición de anti-inflamatorios esteroideos, antibióticos de amplio espectro, incremento del número y tipo de cirugías, infecciones que debilitan el sistema inmunológico. Los hongos además de ocasionar micosis humanas, llevan a cabo invasiones en muchos vegetales, como el café, las papas o estructuras de los árboles ocasionando considerables pérdidas económicas. Por otra parte, los animales también presentan micosis donde incluso puede ocasionarles la muerte, estos animales cobran importancia como reservorios o vectores o de infecciones como la coccidioidomicosis en los perros o las esporotricosis y dermatofitosis en gatos (Méndez-Tovar, 2010).

1.2.1 Hongos patógenos en humanos

Se ha estimado que en la tierra existen cerca de 1,500,000 especies fúngicas, de las cuales solamente unas 300 especies han sido identificadas como patógenas para el humano (García- Solache y Casadevall, 2010; Hawksworth, 2001).

El desarrollo de una infección fúngica depende del estado de los mecanismos defensivos del huésped, los factores de virulencia del hongo y la dosis infectante o tamaño del inóculo fúngico. Estos organismos pueden causar infecciones fúngicas superficiales las cuales son muy comunes, con alta prevalencia, resultando ser las más frecuentes en la población mundial. Estos hongos patógenos también pueden causar infecciones invasivas, teniendo mayor índice de mortalidad (Havlickova y col., 2008).

Las infecciones fúngicas que se diagnostican con más frecuencia son causadas por patógenos de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* (Richardson, 2005). Estos hongos son ubicuos y pueden ser adquiridos desde el entorno del anfitrión (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) o son componentes de la flora endógena normal (*C. albicans*) (Perfect y Casadevall, 2006). Los hongos son capaces de causar una enfermedad y debilitar a los sistemas de defensa del huésped, esto debido a que posee varios genes y proteínas

asociadas con su patogenicidad, llamados factores de virulencia (Tomee y Kauffman, 2000).

Actualmente, *C. albicans* es el principal hongo patógeno en el humano, causando la candidiasis. Las infecciones por *Candida* son un problema grave, especialmente en individuos cuyos mecanismos de defensa inmune se han debilitado (Odds y col., 2006). *C. albicans* puede colonizar la piel y las mucosas superficiales de personas sanas, es un comensal en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral y de la vagina, causando a menudo infecciones superficiales (Mavor y col., 2005). Además, *C. albicans* puede entrar en el torrente sanguíneo por la penetración directa desde el epitelio después de daños en los tejidos, o por la difusión de los biofilms formados a través de los dispositivos introducidos en el organismo del paciente, por ejemplo, catéteres, implantes dentales, endoprótesis (Chandra y col., 2001; Mavory col., 2005). *Cryptococcus neoformans* puede difundir dentro del organismo causando infecciones pulmonares y posteriormente, el sistema nervioso central es colonizado por este hongo patógeno, ocasionando meningoencefalitis en pacientes inmunocomprometidos. Si la infección del sistema nervioso central no se cura, es fatal en 100% de los casos (Buchanan y Murphy, 1998), e incluso después del tratamiento la tasa de mortalidad se sitúa entre 10% y 25% (Perfect y Casadevall, 2002).

En *Aspergillus fumigatus*, especialmente los pacientes con alteraciones de la inmunidad pueden contraer aspergilosis pulmonar invasiva, infecciones diseminadas o infección del sistema nervioso central (Latgé, 2001; Rhodes y Brakhage, 2006). Una alta tasa de mortalidad, del 60% al 90%, se correlaciona con el diagnóstico tardío y por el poco conocimiento sobre la patogenicidad del hongo y los factores de virulencia (Tekaiya y Latgé, 2005; Rementeria y col., 2005).

1.3 Factores de virulencia de los hongos

Muchos de los factores de virulencia en los hongos han sido desarrollados durante la evolución del propio organismo con la finalidad de desarrollarse en condiciones medioambientales desfavorables.

Un factor de virulencia es un determinante de la patogenicidad. Los factores de virulencia son las habilidades con las cuales agentes patógenos al ser humano llegan a producir invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellos. Esto sumado a características del hospedero, de las cuales toman ventaja, como la humedad en ciertas áreas del organismo, como el estado de inmunidad y la presencia de artefactos médicos invasivos, como cateteres, propician que los hongos logren generar su estado patológico (De la Calle-Rodríguez y col., 2012). Los hongos son capaces de causar infecciones y deben superar diferentes barreras físicas y químicas en el huésped para ocasionar un daño y sobrevivir. Para vencer estas barreras los hongos han desarrollado diversos factores y mecanismos para causar un daño al hospedero (Alp y Arikan, 2008).

Dentro de los factores de virulencia que posee un hongo para aumentar el daño en el huésped, encontramos la capacidad de un hongo para crecer a 37°C y pH fisiológico, estos son factores para ciertos hongos invadan los tejidos profundos y la transición a una forma parasitaria es esencial para la patogenicidad de los hongos dimórficos (Hogan y col., 1996).

La producción y secreción de enzimas hidrolíticas son factores de virulencia muy importantes, tales como las proteasas que actúan en la degradación de las barreras estructurales del anfitrión, lo que facilita la invasión de los tejidos del huésped, recientemente se ha demostrado que la actividad de la serin proteasa fúngica en *Aspergillus fumigatus* provoca la descamación celular e induce la producción de interleucina (IL) -8, IL-6 y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) en líneas de células epiteliales de una manera dependiente de la dosis. (Latgé, 2001). Las queratinasas son un factor de virulencia de los hongos dermatofitos de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*. Las fosfolipasas actúan en la destrucción de los ácidos grasos esenciales en la piel causando sequedad (ejemplo, *Malassezia spp.*). La actividad de fosfolipasas en *C. albicans* es muy alta durante la invasión de tejidos, debido a que estas enzimas son responsables de la hidrólisis de uno o más enlaces éster de

glicerofosfolípidos, los cuales dan estructura a la membrana celular y finalmente las elastinas van a destruir las fibras elásticas de los tejidos, como en el caso de *Coccidioides spp.*

La termotolerancia es otro factor de virulencia, su patogenicidad se ha relacionado con la sensibilidad a la temperatura y el nivel de la respuesta de choque térmico, como ocurre en el caso de *Histoplasma capsulatum* y *Sporothrix schenckii* (Hogan y col., 1996). Es decir, no todos los hongos son capaces de crecer por encima de los 35°C, esta capacidad de crecer por arriba de esta temperatura ofrece una ventaja a la hora de infectar a mamíferos.

La producción de toxinas, como la gliotoxina en *Aspergillus sp.*, las cuales harán que el movimiento ciliar sea más lento, lesionando el epitelio de vías respiratorias altas ocasionando aspergilosis pulmonar (Casadevall y col., 2003).

La cápsula es un factor de virulencia, como se presenta en el género *Cryptococcus*, la cual va a inhibir la respuesta inmune del huésped, produciendo también melanina que para este caso servirá como anti-oxidante y resistencia a los antifúngicos como la anfotericina B.

La **producción de melanina** inhibe la fagocitosis de macrófagos (ejemplo, *Sporothrix spp.*).

La adhesión resulta ser muy importante en el proceso de la virulencia, un claro ejemplo de ello es *Candida albicans* que durante la formación de biopelículas, las células expresan varios genes que influyen en la patogenicidad. Productos de estos genes son las adhesinas, por ejemplo, los genes de la familia Als que codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular que están relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped (Castrillón-Rivera y col., 2005).

1.4 El género *Mucor*

Este género se encuentra dentro de la clase de los zigomicetos. Los mucorales son capaces de formar tres diferentes tipos de esporas: la zigospora, que efectúa recombinación genética; la esporangiospora (a las que comúnmente se refieren como esporas), que sirve como mecanismo de dispersión y la artrospora, que asegura la supervivencia en condiciones ambientales adversas (Orlowski, 1991).

La zigospora se forma por la fusión somática de hifas y cuando germina produce un esporangióforo que es portador de un esporangio terminal, el cual contiene esporangiosporas; estas últimas también se obtienen de esporangios formados asexualmente en la parte terminal del micelio aéreo generado sobre un sustrato sólido y bajo una atmósfera aeróbica (Orlowski, 1991). Aunque la esporangiospora deriva exclusivamente del hábito micelial, es capaz de germinar como micelio o levadura, pasando por un periodo previo de crecimiento esférico (hinchamiento) debido a síntesis de macromoléculas, en el primer caso se emergen proyecciones llamadas tubos germinales, de los que se desarrollan hifas cenocíticas por un proceso de extensión apical, mientras que, en el segundo, se producen células esféricas, multinucleadas que se propagan mediante gemación (Orlowski, 1991). Algunas especies de este género han servido como modelos experimentales para realizar investigaciones de carácter básico, tales como la relación existente entre el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y el acoplamiento entre la síntesis de RNA y de proteínas (Sypherd, 1978), así como la biosíntesis de la pared celular (Bartnicki- García y Ruíz-Herrera, 1974).

1.4.1 Generalidades del crecimiento de *Mucor circinelloides*

Mucor circinelloides es un hongo dimórfico que requiere de una atmósfera anaeróbica y la presencia de 30% de CO₂ para crecer como levadura, de lo contrario el crecimiento de las hifas predomina (Lübbehüsen y col., 2003). Es un hongo mesófilico que puede desarrollarse en presencia de oxígeno en forma de hifas tanto en medio líquido como en medio sólido. En medio sólido, el micelio es

capaz de producir una estructura aérea, denominada esporangióforo que generalmente no sobrepasan los 5 mm de altura (Van Heeswijk y col., 1988).

El evento diferenciativo más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo (Lübbehüsen y col., 2003). *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. Este organismo crece de forma optima a 28°C en el medio complejo YPG o en el medio mínimo YNB (Van Heeswijk y Roncero, 1984).

M. circinelloides presenta características que lo hacen sobresalir como modelo experimental, ya que se conoce su cariotipo electroforético (Nagy y col., 1994) y la organización de su genoma mitocondrial (Orlowski, 1993). Aunque a la fecha no esta totalmente editada la secuencia genómica de *M. circinelloides*, dicha secuencia se encuentra liberada y depositada (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>), además de que se cuenta con sistemas eficientes de transformación génica (Anaya y Roncero, 1991). Cabe mencionar que, a nivel biotecnológico es un modelo atractivo. Por ejemplo, los lípidos de *M. circinelloides* han ganado una atención especial, ya que pueden ser fácilmente convertidos en biodiesel, lo que sugiere que la biomasa de *Mucor* podría ser una alternativa como materia prima para la producción de este combustible (Xia y col., 2011). *M. circinelloides* es el agente causal de la mucormicosis la cual es una infección micótica rara pero letal (también conocido como zigomicosis). La mucormicosis es una enfermedad infecciosa emergente y se reconoce como una infección en pacientes con alteraciones inmunitarias, lo que indica actualmente un aumento significativo en la mucormicosis debido a una población creciente de pacientes inmunocomprometidos (Heitman y col., 2011).

1.4.2 Factores de virulencia en *Mucor circinelloides*

El tamaño de las esporangiosporas está vinculado a la virulencia de *M. circinelloides*. Los resultados revelan una correlación entre el tamaño esporangiosporas y la virulencia: las esporas más grandes son más virulentas que las esporas pequeñas. Las esporas más grandes inician la germinación de las hifas inmediatamente después de la fagocitosis por las células inmunitarias del huésped, mientras que las esporas más pequeñas tienen un período más prolongado en su germinación. Esto genera una respuesta inmune del huésped distinta en función del tamaño de las esporas, explicando de cierta manera su diferencia en la virulencia, las esporas más grandes logran evitar la degradación en los lisosomas y terminan albergándose en las células inmunes y germinan dentro de los macrófagos (Heitman y col., 2011).

Una proteína importante que participa en el tamaño de la espora entre otros procesos de *M. circinelloides* es la calcineurina, la cual es una fosfatasa de serinas/treoninas dependiente Ca^{+2} . En los hongos patógenos (*Cryptococcus neoformans*, *A. fumigatus*), la calcineurina está implicada en la morfogénesis y la virulencia. Estudios revelan que inhibidores de la actividad de la calcineurina, como el FK506 y la ciclosporina A inhiben el crecimiento de *Mucor*. Este hongo crece como la levadura multi-brotada en condiciones anaerobias. Sin embargo, se encontró que *Mucor* presenta crecimiento levaduriforme cuando se expone a FK506 aun en presencia de oxígeno. Además, cepas mutantes de *M. circinelloides* que carecen de la subunidad reguladora de la calcineurina, la cual es esencial para la actividad de esta enzima, son de crecimiento levaduriformes, insensibles a la presencia de oxígeno, lo que indica que se requiere de la calcineurina para el crecimiento de las hifas. Además, se demostró que estas mutantes fueron atenuadas en la virulencia, lo que demuestra que las hifas o la transición morfogénica de levadura a micelio están vinculados a la virulencia (Figura 1) (Lee y col., 2013).

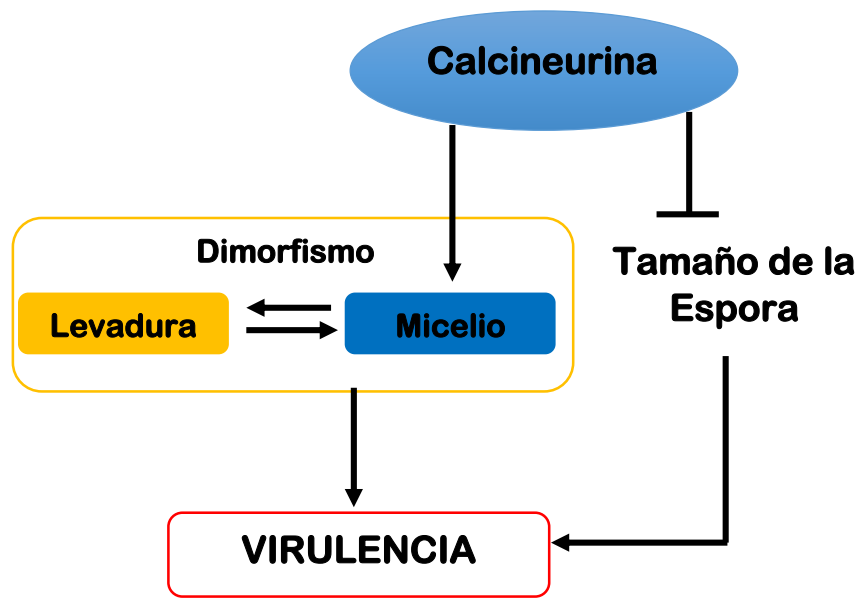


Figura 1.- Papel de la calcineurina en el dimorfismo y la virulencia de *M. circinelloides*. La calcineurina es una enzima fundamental para el crecimiento del micelio y regula negativamente el tamaño de las esporas. Teniendo así que, el tamaño de las esporas y la morfogénesis contribuyen a la virulencia de este patógeno fúngico (Lee y col., 2013).

1.5 Mucormicosis

La mucormicosis es reconocida como una enfermedad infecciosa emergente. En comparación con otras infecciones por hongos, la mucormicosis genera una alta tasa de mortalidad: 50% de las infecciones diseminadas terminan con el deceso del paciente (Chayakulkeeree y col., 2006). Las especies más frecuentes de Mucorales que se asocian a la mucormicosis son los géneros de *Rhizopus*, *Lichtheimia* (anteriormente conocido como *Absidia* y *Mycocladius*), y *Mucor*. Las especies de otros géneros de *Zygomycetes*, tales como *Rhizomucor*, *Saksenaea*, *Cunninghamella*, y *Apophysomyces*, son menos comunes. La mucormicosis se ha convertido en la tercera micosis invasiva más común en orden de importancia después de la candidiasis y aspergilosis en pacientes con trasplantes de células madre hematológicas. Basada en la localización anatómica, la mucormicosis se puede clasificar en 6 formas: 1) rinocerebral, 2) pulmonar, 3) cutánea, 4) gastrointestinal, 5) diseminada, y 6) presentaciones poco comunes (Petrikkos y col., 2012).

Invasión rinocerebral

Se presenta primordialmente en pacientes diabéticos descompensados o cetoacidóticos (el 85% de los casos de una invasión rinocerebral se encuentran relacionados con este tipo de pacientes) y además se encuentra asociada a enfermedades hematológicas como leucemias y linfoma. Su evolución es aguda, aparece en un tiempo de 2-15 días y llega a alcanzar hasta un 90% de mortalidad. Las esporas del hongo entran a través de los senos paranasales invadiendo las arterias carótida y oftálmica; también pueden ingresar por el paladar o faringe, invadiendo las arterias palatina y esfenopalatina, generando trombosis y necrosis cerebral. En general es un padecimiento de curso agudo, y la mayoría de las veces producen afección al SNC en forma de meningoencefalitis (Figura 2) (Alexandro- Bonifaz., 2010).



Figura 2. Paciente con mucormicosis rinocerebral. Paciente diabética de 86 años de edad con lesión necrótica de la hemicara derecha, la extensión a la órbita y al puente nasal fue observada, asociada a parálisis de la musculatura intrínseca y extrínseca del ojo del mismo lado y monoparesia braquial izquierda. Se realizó un exudado de secreciones de la nariz y la conjuntiva el cual fue positivo para *Mucor* (Santos-Pérez y col., 2008).

Invasión pulmonar

Es una enfermedad frecuente en pacientes neutropénicos, leucémicos y linfomatosos, y en segundo grado en diabéticos descompensados. La tasa general de mortalidad en pacientes con mucormicosis pulmonar es alta, cercana al 76%; esta es aún mayor en los pacientes gravemente inmunosuprimidos

(Torres-Narbona y col., 2007). Las características clínicas de la mucormicosis pulmonar no son específicos y no se pueden distinguir fácilmente de los síntomas de la aspergilosis pulmonar, lo cual puede conducir a un mal diagnóstico. La mucormicosis pulmonar es ocasionada por la inhalación de esporas que hay en el medio ambiente, colonizando las cavidades paranasales de forma silenciosa, donde posteriormente desciende hacia el tracto respiratorio inferior, dañando las paredes bronquiales (Ibrahim y col., 2012).

Invasión Gastrointestinal

Esta manifestación clínica es poco común y rara vez se diagnostica en pacientes vivos. En estos casos, el diagnóstico se retrasa, y la tasa de mortalidad es tan alta como un 85% (Roden y col., 2005). Sólo el 25% de los casos de mucormicosis gastrointestinal se diagnostican antes de la muerte, y los autores han reportado que esta enfermedad ocurre principalmente en neonatos prematuros, niños desnutridos, y los individuos con neoplasias hematológicas, la diabetes mellitus, o un historial de uso de corticosteroides (Hawkins y col., 2004). La mucormicosis gastrointestinal se adquiere por la ingestión de patógenos en alimentos como la leche fermentada y pan seco (Ibrahim y col., 2004). El hongo puede invadir las paredes intestinales y los vasos sanguíneos, dando lugar a una perforación intestinal, peritonitis, sepsis y hemorragia gastrointestinal masiva, que es la causa más común de muerte (Virk y col., 2004).

Infección Cutánea

Este tipo de mucormicosis es el resultado de la inoculación directa de esporas del hongo en la piel, lo que puede conducir a la enfermedad diseminada. Dependiendo de la extensión de la infección, la mucormicosis cutánea se clasifica como localizada cuando sólo afecta a la piel o al tejido subcutáneo; extensión profunda cuando invade el músculo, tendones o huesos; y diseminada cuando se trata de otros órganos no contiguos (Oliveira-Neto y col., 2006).

Invasión diseminada

La mucormicosis en un órgano puede diseminarse por vía hematógena a otros órganos (Liu y col., 2000). El órgano más frecuentemente asociado con la diseminación es el pulmón. Esta también se produce en el tracto digestivo, quemaduras y lesiones cutáneas extensas. Estudios recientes han descrito que el sitio más común de diseminación es el cerebro (Antachopoulos y col., 2015). Para el diagnóstico temprano de la mucormicosis diseminada se requiere de un alto índice de sospecha, el diagnóstico postmortem es bastante común. Una lesión de piel metastásico es una característica importante en el diagnóstico precoz. Sin un tratamiento adecuado, la mucormicosis diseminada es siempre fatal (Ingram y col., 1989).

Formas poco comunes de mucormicosis

Otras formas menos comunes o inusuales de mucormicosis incluyen la endocarditis, osteomielitis, peritonitis y pielonefritis. También es rara la participación de la cavidad peritoneal por zigomicetos en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria (Nayak y col., 2007). Otra manifestación rara de mucormicosis es la afectación cerebral (generalmente en los ganglios basales) sin la participación rino-orbital en pacientes con leucemia y adictos a drogas intravenosas (Richardson, 2003).

1.5.1 Factores que propician la diferenciación de *Mucor circinelloides*

Las esporangiosporas de *M. circinelloides* pueden desarrollar un crecimiento isotrópico (levadura), o un crecimiento polarizado (filamentos) dependiendo de las condiciones del cultivo. Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas, es decir no presentan septos (divisiones). Por otro lado, las levaduras son, esféricas y también son multinucleadas (Ocampo y col., 2012).

M. circinelloides como otras especies del género *Mucor* (*M. rouxii*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, entre otras), son capaces de experimentar el proceso diferenciativo denominado dimorfismo, existen diversos factores que participan en dicho evento, entre los cuales los más importantes son las fuentes de carbono y atmosfera en el cultivo.

La incubación en condiciones anaeróbicas en presencia de hexosas fermentables causa crecimiento como células de levadura y la presencia de oxígeno provoca el desarrollo de micelio, tanto en fuentes de carbono fermentables o como no fermentables. En una atmósfera de N₂, la morfología de crecimiento en anaerobiosis es influenciada por la concentración de glucosa; cuando existe una baja concentración de glucosa el hongo tendrá un crecimiento filamentosos mientras que a una alta concentración de glucosa lo hará como levadura (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). También, existen factores que favorecen el crecimiento levaduriforme en presencia de oxígeno, como puede ser la presencia en el medio de cultivo de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc), alcohol fenético y algunos aminoácidos. En todas estas condiciones se forman células levaduriformes si una hexosa fermentable está presente (Orlowsky, 1991).

Cabe hacer mención que 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 (Figura 3) (McIntyre y col., 2002). En términos generales un metabolismo oxidativo favorece un crecimiento micelial, mientras que un metabolismo fermentativo correlaciona con una morfología levaduriforme, por lo tanto, es importante analizar los reguladores que determinan una u otra morfología.

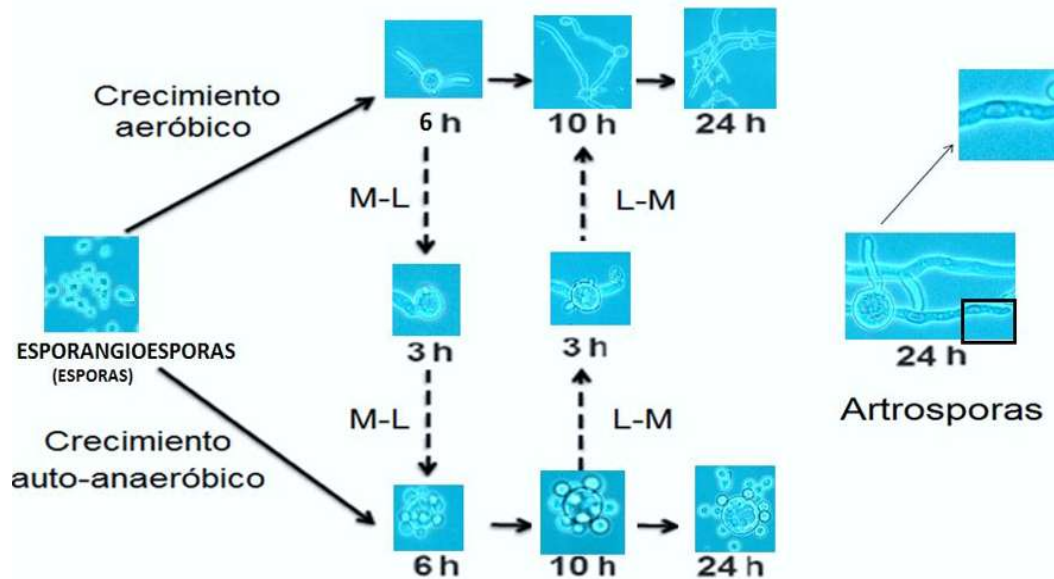


Figura 3. Ciclo de vida de *Mucor circinelloides*. A partir de las esporangioesporas (estadio inicial) su crecimiento se presenta en forma micelial (M) (en condiciones aerobicas). Mientras que en condiciones anaeróbicas crece en forma de levadura (L). Este cambio de morfología no es terminal y puede pasar de un estadio respecto a otro variando las condiciones de oxígeno disponibles en el medio. Así mismo, el micelio es capaz de desarrollar artrosporas las cuales se producen posterior a 24 horas de crecimiento, cuando los nutrientes en el cultivo ya son escasos (Valle-Maldonado, 2013)

1.6 Alcohol deshidrogenasas

Las oxidoreductasas realizan una serie de interconversiones de alcoholes, aldehídos y cetonas, procesos importantes tanto en procariotes como eucariotes.

Las oxidoreductasas que catalizan las reacciones de oxido-reducción pueden utilizar una variedad de aceptores de electrones, clasificándose en tres grupos:

- 1) Alcohol deshidrogenasas (ADHs) dependientes de NAD(P)**, siendo estas las mejor caracterizadas. Catalizan la reacción reversible de producción de aldehído a partir de alcoholes utilizando como cofactor NAD^+ o NADP ; dichas enzimas pueden utilizar como sustrato desde alcoholes simples, ramificados, aromáticos y sus correspondientes aldehídos y cetonas.

- 2) **Alcohol deshidrogenasas (ADHs) independientes de NAD(P)**, las cuales utilizan la pirrolo-quinolina quinona (PQQ), con un grupo hemo asociado con PQQ, o el cofactor F₄₂₀ como cofactores.
- 3) **Alcohol oxidasas FAD-dependientes**, las cuales catalizan la reacción oxidativa irreversible de alcoholes a aldehídos, utilizando como aceptor de protones y electrones el O₂ produciendo peróxido de hidrógeno (Reid y Fewson 1994).

El grupo de las alcohol deshidrogenasas NAD(P)-dependientes (ADHs) se divide a su vez en tres subgrupos:

Subgrupo I: ADHs dependientes de zinc de cadena larga, las cuales contienen aproximadamente 350 residuos de aminoácidos por subunidad.

Subgrupo II: ADHs independientes de zinc de cadena corta, estas contienen aproximadamente 250 residuos de aminoácidos por subunidad.

Subgrupo III: ADHs dependientes de hierro cuyo tamaño por subunidad es de 385 residuos de aminoácidos.

Las ADHs del **subgrupo I** son las más estudiadas; muchas se han caracterizado y se ha llegado a conocer el tipo de estructuración que adoptan, encontrándose que, por lo general, son homodiméricas, como la ADH de caballo o son homotetraméricas como en el caso de la ADH de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este grupo, las ADHs pueden oxidar un amplio rango de alcoholes primarios, pero el incremento del tamaño del sustrato disminuye su actividad. El mecanismo de oxidación del etanol comienza con la unión de NAD⁺ seguido por la oxidación de etanol a acetaldehído y después el NADH es liberado; la unión del NAD⁺ al sustrato se encuentra directamente relacionada con el pH en un rango óptimo entre 6 y 10. El sitio de unión al sustrato en la ADH ha sido descrito como GXGXXG y se encuentra ampliamente conservado en todas las ADHs pertenecientes a este grupo. La presencia del átomo de zinc en esta reacción es esencial para la estabilización y orientación del alcohol durante la oxidación. El sitio de unión a zinc también se encuentra conservado en las ADHs

pertenecientes a este grupo y se ha descrito la secuencia consenso GHEXXGXXXXXGXXV (Reid y Fewson, 1994).

Las ADHs pertenecientes al **subgrupo II** están representados por la alcohol deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*, sin embargo, no todas las enzimas de este grupo han sido identificadas como alcohol deshidrogenasas ya que muchas de ellas tienen diferencias en especificidad de sustrato, es por esto que incluyen otros miembros dentro de este grupo, como son: acetil-CoA deshidrogenasa, ceto-acetil reductasa, piliol azúcar reductasa y ribitol deshidrogenasa. A pesar de su variabilidad, estas enzimas presentan regiones conservadas con las ADHs del Grupo I, como el sitio de unión a NAD⁺. En este grupo, la oxidación del alcohol requiere primeramente la unión del cofactor y la unión del sustrato para la ionización del complejo enzima-coenzima, paso esencial para la formación del complejo ternario alcohol-enzima-NAD⁺ y así finalizar la reacción (Reid y Fewson., 1994; Kallberg y col., 2002).

La ADH I es una enzima fermentativa, la cual participa en la formación del etanol, mientras que la ADH II es una enzima oxidativa, realizando la reacción contraria (Yoneya y Sato, 1980).

Las ADHs del **subgrupo III** están representadas por la segunda isoforma de la ADH de *Zymomonas mobilis* (ZMADHII: Conway y col., 1987) y por la cuarta isoforma de ADH de *S. cerevisiae* (ADHIV). En este grupo las enzimas presentan una gran variedad de especificidad hacia el sustrato, como etanol, propanol y glicerol. La presencia de hierro en la reacción es indispensable.

En *M. circinelloides*, se ha observado la producción de etanol bajo condiciones aérobicas cuando se suministra un exceso de glucosa superior a la capacidad de respiración y correlaciona con la observación de que en estas condiciones se expresa el gen *adh1*, que codifica para una ADH fermentativa (McIntyre y col., 2002; Rangel-Porras y col., 2005). En hongos, la glucosa es metabolizada por la vía glucolítica y convertida a etanol después de varios pasos enzimáticos, donde la última enzima de la vía es una alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de NADH (Figura 4). Esta ADH además de formar etanol regenera el NAD⁺,

permitiendo la continuidad de la vía y la generación de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa convertida a etanol (Voet y Voet, 1995).

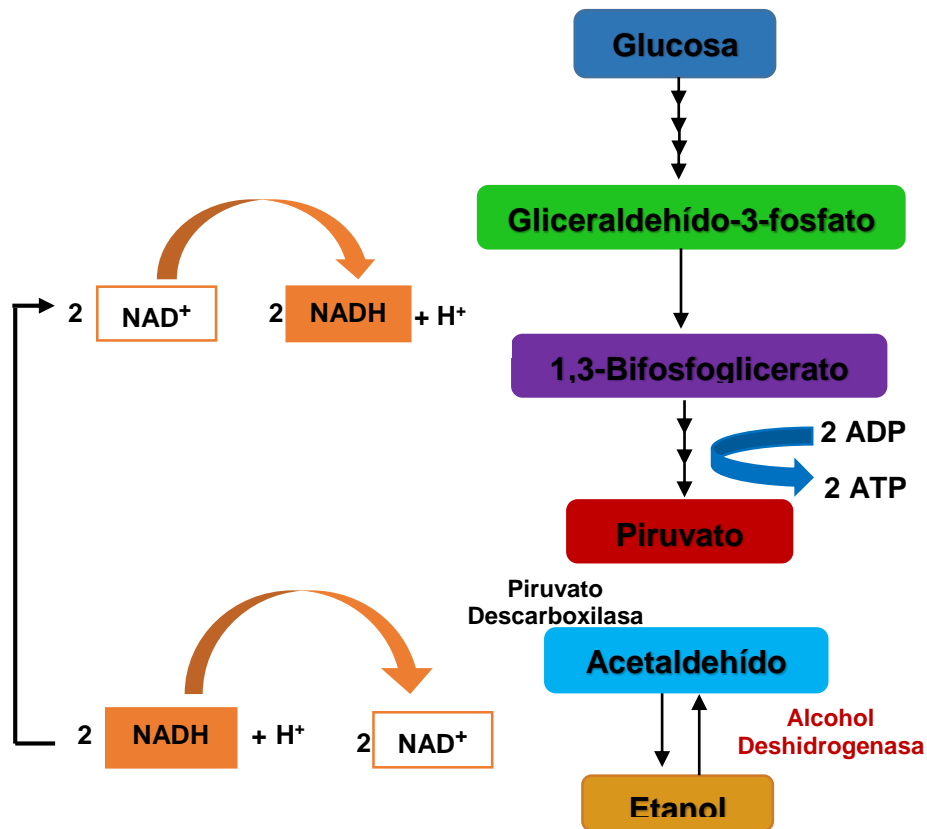


Figura 4. Participación de la enzima alcohol deshidrogenasa en las distintas rutas metabólicas de la glucólisis. En la fermentación por levaduras y bacterias anaerobias, la reacción reductiva, catalizada por la ADH, produce etanol y el cofactor oxidado NAD⁺. La regeneración del NAD⁺ es esencial para la producción de energía y así el ciclo metabólico continúe. En la oxidación de alcoholes por medio de la ADH, se producen aldehídos o cetonas y el cofactor reducido NADH + H⁺ (Zeeman y col., 2000).

1.6.1 La alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ en *Mucor circinelloides*

Mediante zimogramas se detectó una única banda de actividad de Adh con la misma movilidad electroforética tanto en micelio como en levadura en *M. circinelloides*; lo que sugiere que existe una sola enzima con actividad de Adh. Al medir la actividad específica de Adh entre los dos estadios morfológicos, se

encontró que las levaduras muestran 2.5 veces más actividad enzimática que el micelio. La enzima fue denominada como Adh1 y fue purificada a homogeneidad a partir de células levaduriformes y evidencias bioquímicas indicaron que la estructura de esta enzima es homotetramérica con un peso molecular de 150,000 Da y con un peso por subunidad de 37,500 Da. Los datos cinéticos, sugieren que esta enzima opera principalmente como una enzima fermentativa (Meza-Carmen, 1999).

Bajo condiciones aeróbicas, el etanol producido por el micelio de *M. circinelloides* se utilizó después de la depleción de glucosa. En contraste, las células de levadura producidas en ausencia de oxígeno no utilizan el etanol debido a su requisito estricto de hexosas como fuente de carbono (Sen y col., 2004).

Experimentos de obtención de zimogramas de la Adh1 en células miceliales de cepas silvestres y mutantes *adh* de *M. rouxii* y de *M. circinelloides* (Mendoza-Hernández, 2002), cultivados en medio con glucosa o con etanol, indicaron la existencia de una sola enzima con actividad de Adh en ambos organismos, lo que sugiere una similitud en el metabolismo fermentativo de estas especies de *Mucor*.

1.6.2 La alcohol deshidrogenasa ADH1 en la virulencia de *Candida albicans*

Las células de *Candida albicans* se adhieren ávidamente a diversos materiales, incluyendo catéteres, formando biopelículas (comunidad de microorganismos encapsulados en una matriz extracelular de producción propia [ECM]) (Figura 5) (Douglas, 2003). Las biopelículas de *Candida* formadas en estos dispositivos médicos se asocian cada vez más con infecciones graves.

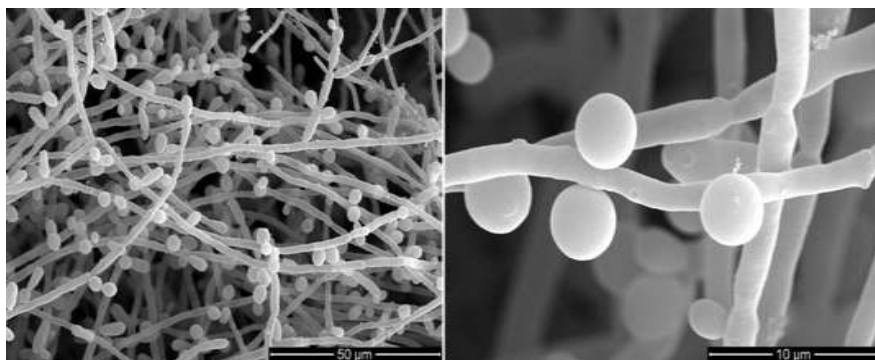


Figura 5. Biopelículas de *Candida albicans*. Las biopelículas se forman por levaduras e hifas adheridas a una superficie donde se encuentran encerradas en una matriz polimérica extracelular secretada por las células del biofilm. Las biopelículas se formaron *in vitro* en la superficie de los catéteres venosos, microscopía electrónica de barrido (Vilatt, 2011).

Se demostró en *C. albicans* la función de la enzima ADH1 en la formación de biopelículas (Mukherjee y col., 2006), así como también se describió la capacidad de una cepa mutante en el gen *ADH1* para formar estas estructuras en tejidos de ratones. Se encontró que la mutante *adh1* forma más biopelículas que la cepa parental, lo que indica que la supresión de la enzima ADH1 aumenta la formación de biopelículas *in vivo* aumentando la virulencia. La ADH1 cataliza la conversión de acetaldehído a etanol, por lo tanto, se analizaron las cantidades de estas dos sustancias en las biopelículas, mostrando un aumento y disminución significativa en sus niveles, respectivamente. Estos estudios demuestran que la mutación del gen *ADH1* mejora la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas. Por otra parte, las biopelículas formadas por la cepa mutante *adh1* producen cantidades significativamente menores de etanol, pero mayores cantidades de acetaldehído, respecto a las biopelículas formadas por la cepa parental, demostrando que el efecto de la ADH1 en la formación de biopelículas está mediada por su actividad enzimática. Por lo tanto, la ADH1 contribuye a la capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas tanto *in vitro* como *in vivo*; al aumentar los niveles de acetaldehído, la producción de biopelículas es mayor (Ghannoum y col., 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

El hongo dimórfico *Mucor circinelloides* es un patógeno oportunista causante de la mucormicosis, esta infección fúngica causa una alta tasa de mortalidad en pacientes inmunosuprimidos. En *Candida albicans* la participación del gen *adh1* se ha visto involucrado en procesos de virulencia, por lo que es importante conocer la posible participación de este gen en la virulencia de *M. circinelloides*.

III. HIPÓTESIS

El gen *adh1* participa en la virulencia de *Mucor circinelloides*.

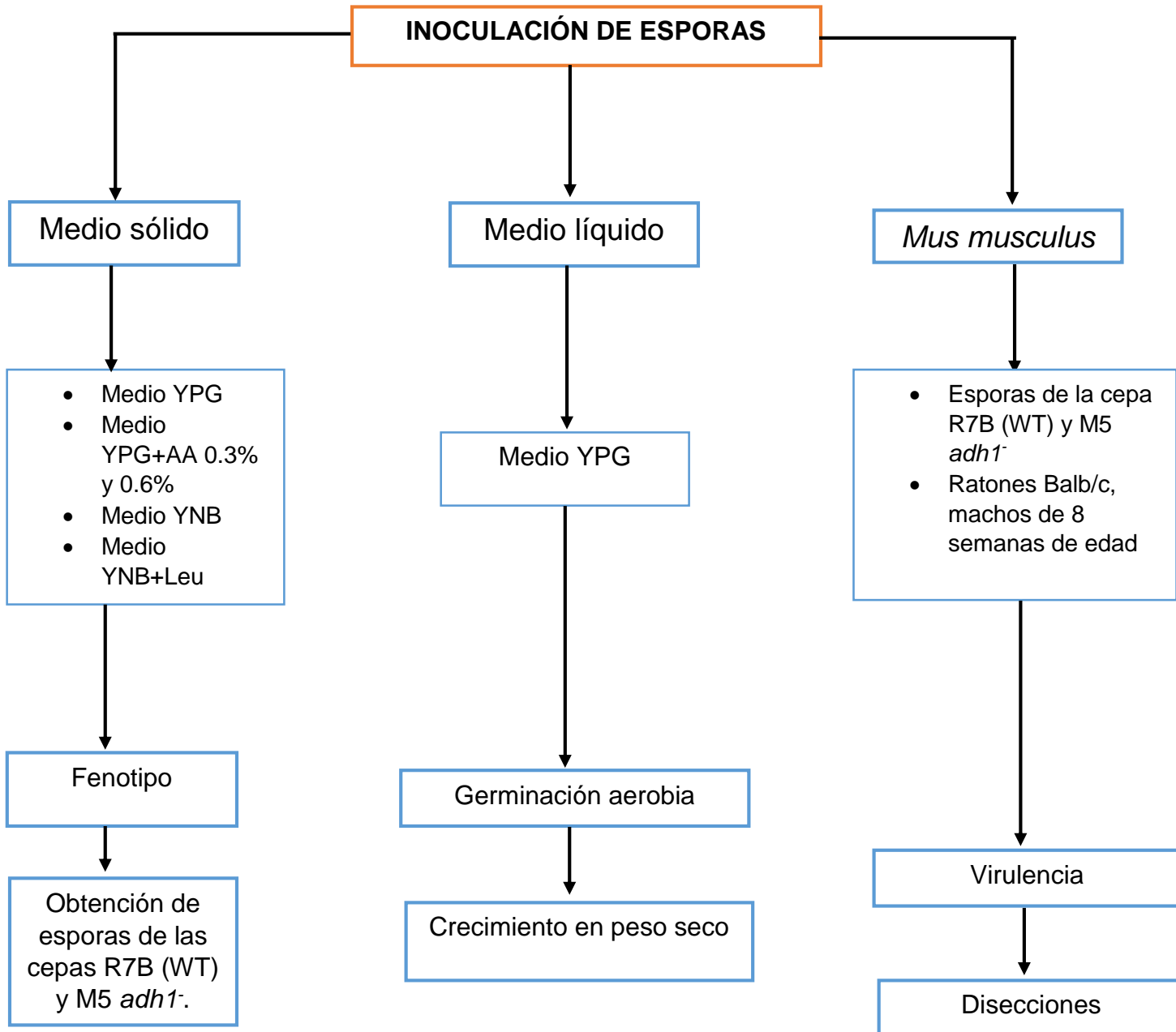
IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la mutante *adh1*⁻ en la virulencia de *Mucor circinelloides*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Demostrar si la Adh1 de *M. circinelloides* tiene influencia en la virulencia en ratones.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Organismos utilizados

Se utilizó la cepa de *M. circinelloides* **R7B** (ATCC 90680, cepa auxótrofa a leucina derivada de la cepa ATCC 1216b) (Roncero y col., 1989), y la cepa *M. circinelloides* **M5**, mutante en el gen *adh1* (derivada de la cepa silvestre **R7B** de *Mucor circinelloides*, de origen espontáneo seleccionado en presencia de alcohol alílico al 0.6%) (fué donada amablemente por el D.C. Félix Gutierrez-Corona, datos sin publicar), (Tabla 1).

. **Tabla 1.** Fenotipo de las cepas de *Mucor circinelloides*.

CEPA	FENOTIPO RELEVANTE
R7B	Aly ^S , Leu ⁻
M5	Aly ^R , Leu ⁻

Para los ensayos de infección se utilizó la cepa BALB / c (cepa albina) del ratón *Mus musculus*. La comida y el agua para la alimentación de los ratones fue de libre acceso contando con las necesidades básicas nutricionales, las jaulas se desinfectaron por lo mínimo una vez a la semana, esto para evitar posibles infecciones de los mismos., siguiendo los procedimientos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual tiene como objetivo establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales (Autor anónimo., 1996).

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Medio YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)

Cada litro de medio contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido. Se ajustó el pH a 4.5 (Bartnicky-García., 1968). Para el proceso de esterilización se hizo uso de la autoclave a 121 °C, con una presión de 25 atm durante 15 minutos.

6.2.2 Medios mínimos

a) YNB

Cada litro de medio contenía 5 g de fosfato de amonio, 6.7 g de base nitrogenada de levadura deshidratada, 20 g de Dextrosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon). El pH se ajustó a 4.5 (Bartnicky-García., 1968).

b) Medio B

Este medio contenía 20 g de dextrosa por cada litro, 7.5 g de sulfato de amonio y 20 g de agar bacteriológico (Valle-Maldonado., 2011).

Para ambos casos la esterilización se realizó a 121°C a una presión de 25 atm durante 15 minutos. Dado que las cepas utilizadas presentan auxotrofia a leucina, el medio se adicionó con 10 mL de leucina por cada litro de medio utilizando leucina con una concentración al 2%.

6.3 Corroboración del fenotipo de las cepas utilizadas

Para corroborar el fenotipo se inocularon 500 esporas/mL de las cepas R7B y M5 en medio YPG con alcohol alílico al 0.3% y 0.6%. El alcohol alílico se añadió en el medio sólido utilizando una espátula. Se dejó secar y posteriormente se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 4 a 5 días.

6.4 Condiciones de crecimiento

6.4.1 Obtención de esporas (Medio sólido)

Se inocularon 50 esporas/mL de medio de *M. circinelloides* en placas de Petri con medio YPG sólido y se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 4 a 5 días. Las esporas fueron colectadas agregando 5 mL de H₂O destilada estéril sobre las placas, se llevó a cabo un raspado con un asa de plástico sobre la superficie de la placa, arrastrando de esta manera las esporas. Posteriormente, las esporas fueron aspiradas y depositadas en un tubo corning de 50 mL. Las esporas fueron concentradas al centrifugar a 5000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, fueron lavadas con H₂O destilada estéril y centrifugadas como la condición anterior. Las esporas fueron resuspendidas en 10 mL de H₂O destilada estéril. El conteo de las esporas se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika), depositando 15 µL en la parte superior (cámara superior) y 15 µL en la parte inferior (cámara inferior), respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Dicha cantidad fue multiplicada por el factor de 25,000 la cual corresponde a la profundidad de la cámara de Neubauer (5x10⁴ mL) y el resultado obtenido corresponde a la concentración celular expresada en esporas por mililitro de cada stock de las muestras. Las esporas fueron conservadas a 4°C y empleadas en un máximo de 15 días después de su obtención.

6.4.2 Obtención de micelio (Medio líquido)

Para llevar a cabo el crecimiento aeróbico 500,000 esporas fueron inoculadas por cada mililitro de medio de cultivo. En el crecimiento filamentoso los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 200 rpm, usando 20 mL de medio en matraces de 125 mL. Este procedimiento se realizó tanto en la cepa silvestre R7B como para la mutante M5 (*adh*).

6.4.3 Cuantificación del crecimiento

El crecimiento celular fue determinado midiendo la biomasa total generada en medio líquido, la cual fue representada como peso seco por mL de medio utilizado. Las muestras biológicas de *M. circinelloides* (micelio) fueron colectadas en papel filtro previamente seco y pesado. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril. El papel filtro con la biomasa se secó 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.

6.5 Velocidad de germinación

Para observar la velocidad de germinación de las cepas R7B y M5, matraces erlenmeyer de 125 mL se inocularon 500,000 esporas por cada mililitro de medio de cultivo YPG, utilizando un total de 20 mL de medio, posteriormente se incubaron a 28°C, con agitación constante de 200 rpm. Se contaron entre 100-200 células al azar en los tiempos determinados, para determinar el porcentaje de germinación de las distintas cepas de *M. circinelloides*.

6.6 Ensayos de virulencia

Se cosecharon las esporas de las cepas R7B y M5, posteriormente se agregaron un total de 20,000; 200,000 y 2,000,000 de esporas en tubos eppendorf en un volumen final de 200 μ L de PBS para cada concentración de esporas. El ensayo se realizó utilizando ratones *Mus musculus* sanos (no inmunodeprimidos) machos de la cepa BALB/c de 12-16 semanas de edad. Un grupo de ratones se infectaron vía intraperitoneal con las concentraciones de esporas anteriormente mencionadas, tanto de la cepa silvestre R7B y la cepa mutante M5 (*adh1*), utilizando agujas de 27G X ½" para insulina, acopladas a geringas de 1 mL (marca BD). Posteriormente, se analizó cada grupo de ratones (el cual constaba de 6 ratones cada uno), la tasa de supervivencia se controló dos veces al día. Finalmente, los datos de la tasa de mortalidad se evaluaron mediante el uso de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con el software de estadísticas PRISM (GraphPad Software, Inc).

6.6.1 Lesiones intestinales en *Mus musculus*.

Para este ensayo se inocularon vía intraperitoneal (IP) 2×10^6 esporas de las cepas en estudio en ratones *Mus musculus* BALB/c sanos, haciendo uso de jeringas de 27G X ½” para insulina., de 1 mL (marca BD), estos roedores fueron monitoreados hasta su muerte. Posteriormente, con la ayuda de un equipo de disección (marca Hergom) se hicieron disecciones en cada ratón, esta iba desde la altura del corazón hasta el orificio urogenital, observando finalmente las lesiones intestinales causadas por la cepa silvestre R7B y la cepa mutante en el gen *adh1*- M5 de *M. circinelloides* y se reportaron mediante observación directa los órganos de la cavidad torácica de los animales infectados.

VII. RESULTADOS

7.1 Efecto del gen *adh1* en la germinación de *Mucor circinelloides*

El proceso de germinación es muy importante en la virulencia de los hongos, debido a que esto representa la velocidad para colonizar un nicho biológico. En este caso se analizó la velocidad de germinación en las distintas cepas, para lo cual fueron inoculadas las esporas en medio YPG líquido y sometidas a crecimiento aeróbico.

Se observa que el efecto del gen *adh1* en la velocidad de germinación juega un papel importante en dicha velocidad, la mutante M5 muestra un retraso en el crecimiento mayor de un 60% respecto a la cepa silvestre R7B durante los tiempos ensayados (figura 6). Esto nos indica que el producto del gen ADH1 participa en la germinación de *M. circinelloides*.

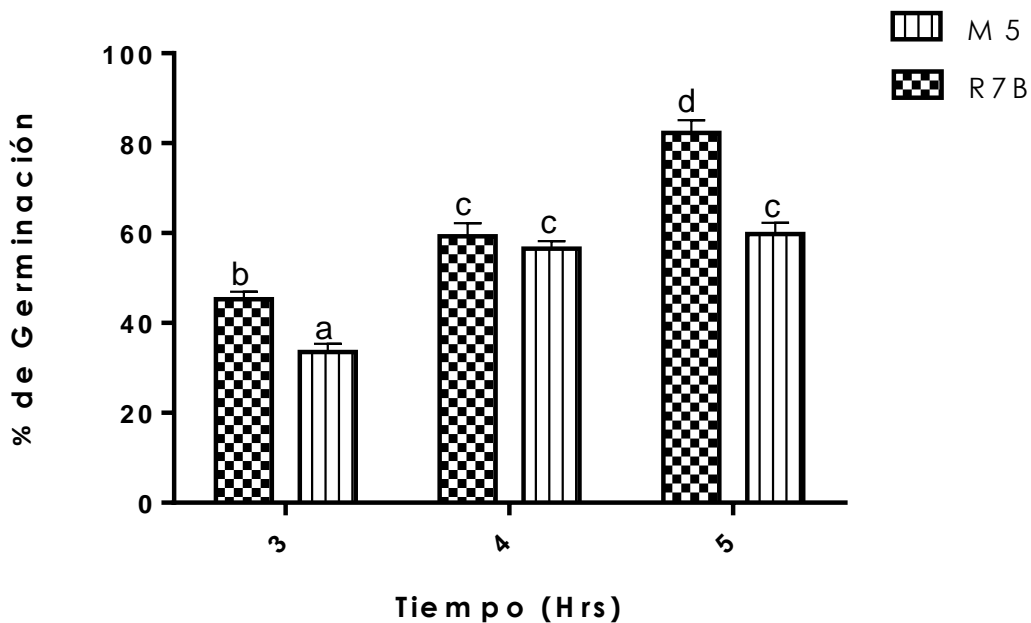


Figura 6. Germinación aerobia. Se inocularon 5×10^5 esporas/mL, e incubaron a 200 rpm durante 3, 4 y 5 horas a una temperatura de 30°C. N= 4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

7.2 Efecto del gen *adh1* en el crecimiento de *Mucor circinelloides*

Con la finalidad de saber si había diferencias en el crecimiento entre la cepa R7B y M5 se colocaron esporas de las cepas R7B y M5 en medio líquido. El crecimiento celular fue determinado midiendo la biomasa total generada en medio líquido, la cual fue representada como peso seco. La cepa silvestre mostró un crecimiento normal, observándose las tres fases características del crecimiento celular: la fase de adaptación, la fase exponencial y la fase estacionaria (Figura 7). Sin embargo, la cepa mutante mostró una menor generación de biomasa (<0.05 g/mL) respecto a la cepa silvestre (0.1 g/mL) a las 48 hrs después de la inoculación. Esto nos indica que la cepa mutante además de presentar una menor velocidad de germinación (Figura 6), generó un crecimiento menor respecto a la cepa silvestre.

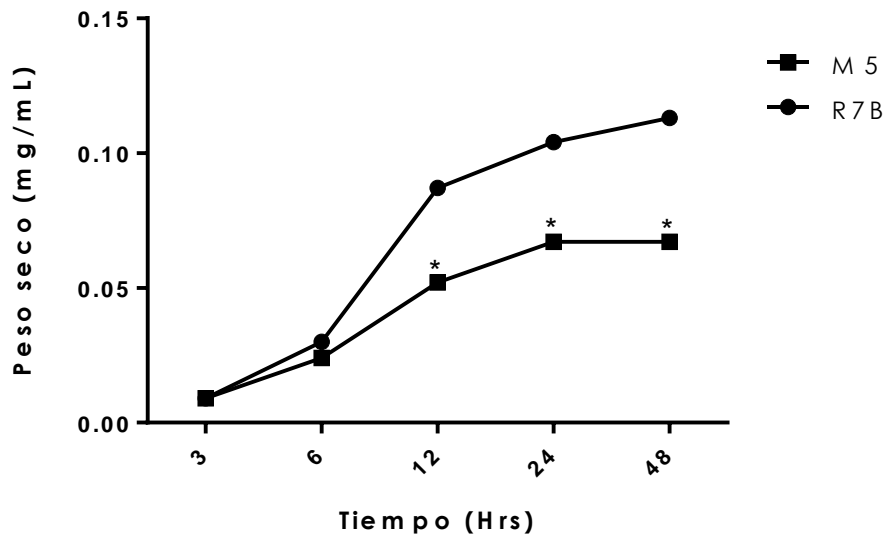


Figura 7. Efecto del gen *adh1* de *M. circinelloides* en la generación de biomasa. Esporas (5×10^5 esporas/mL) de las cepas R7B y M5 fueron inoculadas en medio YPG a velocidad constante de 200 rpm, a 30°C a los tiempos indicados. Se determinó la biomasa generada en el medio líquido y fue representada como peso seco (mg) por cada mL de medio. N= 4, análisis ANOVA, prueba de Bonferroni, $p < 0.05$.

7.3 Efecto en el gen *adh1* en la virulencia de *M. circinelloides*

Para evaluar la participación del gen *adh1* en la virulencia del hongo *M. circinelloides*, se realizaron estudios *in vivo*, infectando ratones machos, (*Mus musculus*) de la cepa Balb/C de 10-12 semanas de edad. Se administraron distintas concentraciones de esporas por vía Intraperitoneal, esto acuerdo a los procedimientos de la NOM-062-ZOO-1999.

Independientemente de la cantidad de esporas inoculadas en los animales, la cepa mutante en el gen *adh1* mostró un mayor nivel de virulencia respecto a la cepa silvestre. El 100% de los animales inoculados con 2×10^4 esporas/mL de la cepa silvestre R7B sobrevivieron 18 días del ensayo, mientras que el 100% de los animales infectados con la cepa M5 fallecieron a los 5 días Post-infección. Cuando se inocularon 2×10^5 esporas/mL de las dos cepas en estudio, M5 ocasionó la muerte de los roedores a los 3 días Posteriores a la infección. Por otra parte, al inocular 2×10^6 esporas/mL, el 100% de los animales infectados con la cepa silvestre fallecieron a los 7 días, mientras que aquellos que fueron inoculados con la cepa mutante, el 100% de los ratones murieron 24 horas después de la inoculación de esporas (Figura 8). Esto nos indica que el producto del gen *adh1* esta implicado en la virulencia de *Mucor circinelloides*.

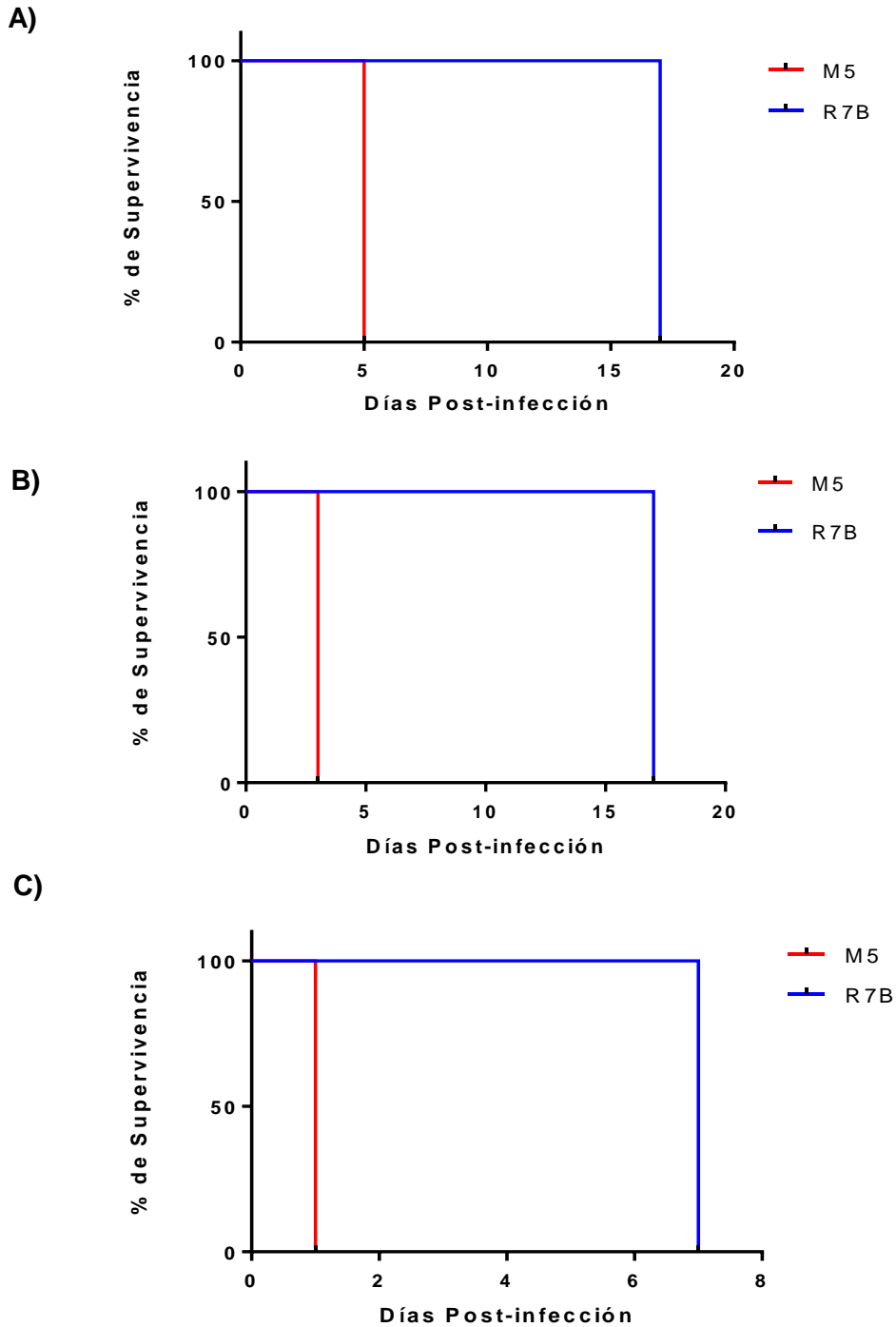


Figura 8. Virulencia en *Mus musculus*. **A)** Se muestra el efecto de las cepas en estudio al inocular 2×10^4 esporas/mL por vía IP, en un tiempo de ensayo de 18 días. **B)** existe un aumento de la concentración a 2×10^5 esporas/mL inoculadas. **C)** Inoculación de 2×10^6 esporas vía IP, indicando el % de supervivencia versus los días Post-infección para todos los casos. N=6, análisis de supervivencia Kaplan-Meier, p: 0.0009.

7.4 Lesiones intestinales en *Mus musculus*

Para conocer si la infección con las cepas de *M. circinelloides* generaron lesiones en los órganos de los ratones, se procedió a infectar y eutanizarlos a las 18 horas posterior a la infección, para posteriormente realizar la disección de dichos animales. Para este ensayo se utilizarón ratones sanos BALB/c de 10-12 semanas de edad, e inoculados vía intraperitoneal con 2×10^6 esporas de las cepas de *M. circinelloides*.

En la Figura 9 se muestran las lesiones en los intestinos de los ratones y se observó que los órganos de los animales del grupo control (animales inoculados con solución salina) no mostraron anomalías en los órganos de la región abdominal, mientras que los animales infectados con la cepa silvestre los intestinos mostraron un aumento de tamaño y presentan un color más oscuro, esto se puede deber a que la muerte de los ratones inoculados con R7B se da en 7 días, ocasionando que el daño en la región abdominal causado por esta cepa sea más lento respecto a la mutante. La cepa mutante generó lesiones intestinales, considerando que la muerte fue en un tiempo de 24 horas Post-inoculación las cuales se pueden observar en color verde (Figura 9). Este dato indica que la cepa M5 genera daños en el tejido intestinal en un tiempo menor respecto con la cepa silvestre los cuales pudiesen contribuir en el aumento de la virulencia.

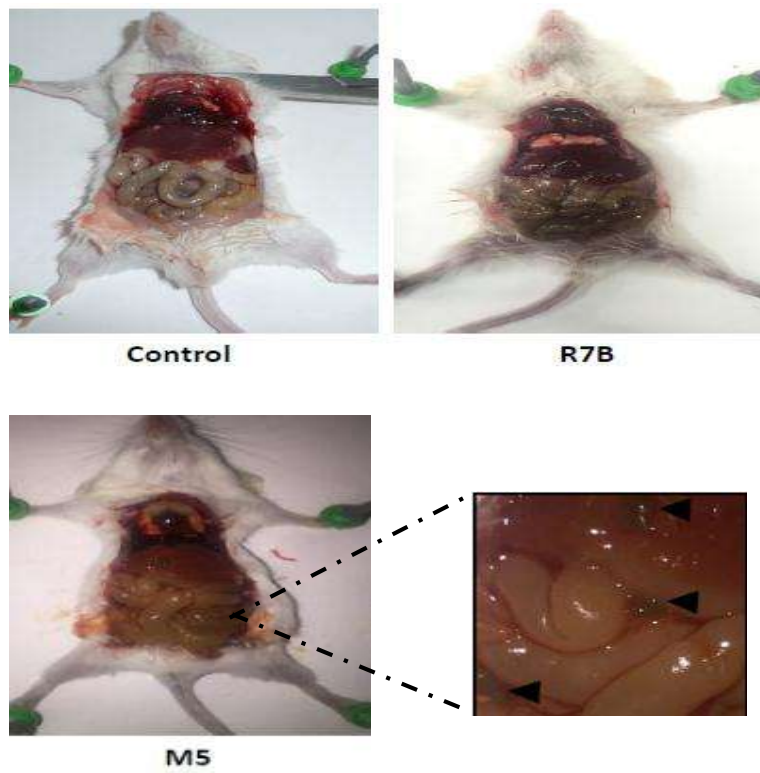


Figura 9. La cepa mutante *adh1-* de *Mucor circinelloides* genera lesiones de **órganos peritoneales**. Fotos representativas de animales infectados con las distintas cepas de *M. circinelloides*, los cuales fueron inoculados con 2×10^6 esporas a cada ratón por vía IP. N=3.

VIII. DISCUSIÓN

M. circinelloides es considerado un agente causal de la mucormicosis, se trata de una infección micótica poco común, con frecuencia letal para los seres humanos. El tamaño de las esporangiosporas está vinculado a la virulencia de este zigomiceto así como la transición morfogénica, por lo que se sabe poco de sus factores de virulencia. En para determinar si el producto del gen *adh1*- se encuentra implicado en los procesos de virulencia para este hongo, se utilizó la cepa mutante en el gen *adh1*- de *Mucor circinelloides*, que se deriva de la cepa silvestre R7B y fue seleccionada debido a su capacidad de crecer con alcohol alílico (Gutierrez-Corona, datos sin publicar).

Los resultados indican que la mutante presenta resistencia al alcohol alílico de acuerdo a su fenotipo Aly^R la cual a una concentración del 0.6% se muestra un crecimiento normal, por lo contrario, la cepa silvestre R7B tiene una inhibición en su crecimiento, esto se debe a que la cepa silvestre tiene una actividad funcional de ADH que transforma el alcohol alílico a acroleína lo cual impide su crecimiento en presencia de este alcohol. Así mismo, se demostró el fenotipo en medios mínimos suplementados con Leucina, se observa que la cepa silvestre crece en estos medios ya que esta cepa es auxótrofa a este aminoácido.

El gen *adh1* de *M. circinelloides* está involucrado en la patogénesis del hongo, ya que la ausencia del mismo generó un aumento de la virulencia en un modelo murino. Dado a este resultado, se procedió a evaluar distintos parámetros que permitieran entender dicho aumento en la virulencia, como es el caso de la germinación y crecimiento.

El proceso de germinación es muy importante para los hongos, debido a que esto representa la velocidad de colonizar un nicho biológico. Por ejemplo, las esporas grandes de *M. circinelloides* germinan más rápido respecto a las esporas pequeñas y esta diferencia en la velocidad de germinación contribuye a un aumento en la virulencia de las esporas grandes. La cepa mutante M5 germina a una velocidad menor respecto a la cepa silvestre, que no es el aumento de la

germinación lo que contribuye en la virulencia de la cepa mutante, en correlación a la disminución de la germinación de la cepa mutante, también su crecimiento fue menor respecto a la cepa silvestre, por lo tanto, no es un aumento en el crecimiento de la cepa M5 lo que aumenta la virulencia de *M. circinelloides*. Quizás al igual que en *C. albicans* es la acumulación de acetaldehído lo que propicia dicho efecto, por lo que se requieren más estudios al respecto. Una acumulación de acetaldehído en células de mamífero puede generar toxicidad o pueda formar biopelículas lo cual no ha sido demostrado en *M. circinelloides*. Existen otros zigomicetos en donde se ha demostrado la formación de biopelículas, como es el caso de *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus* y *Lichtheimia corymbifera*, los cuales son agentes etiologicos de la mucormicosis (Sinhg y col., 2011)

Se realizaron disecciones en ratones después de la infección tratando de localizar daños en la morfología de los órganos de la cavidad torácica de los animales infectados con las cepas de *M. circinelloides*, se encontraron lesiones intestinales para los ratones inoculados con la cepa mutante, por lo que se necesitan estudios histopatológicos que nos permitan esclarecer este hallazgo, mientras que para la cepa silvestre solo se observó un aumento en el tamaño tanto del intestino grueso como del intestino delgado, indicando que quizás también se generan cambios en los intestinos pero no con lesiones marcadas como en el caso de la cepa mutante. Sin embargo, se han reportado que otras cepas de *M. circinelloides* son capaces de generar lesiones en al cavidad abdominal, las cuales contribuyen a la patogénesis de este organismo (Petrikkos y col., 2012).

IX. CONCLUSIONES

La ausencia del gen *adh1* de *Mucor circinelloides* aumenta la virulencia en ratones, generando lesiones en el tejido intestinal.

X. REFERENCIAS

Anaya N., Roncero M. 1991. Transformation of methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Molecular and General Genetics* **230**: 449- 455.

Alp S., Arıkan S. 2008. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology* **48**: 331–337.

Autor Anónimo. Sacrificio Humanitario de los Animales de Laboratorio. 1996. *Animales de Experimentación* **2**: 10-18.

Antachopoulos C., Petraitiene R., Roilides E., Walsh T. J. 2015. Diagnosis and Treatment of Fungal Infections: Mucormycosis. *Springer International Publishing Switzerland* **2**: 158- 167.

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

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

Bartnicki-Garcia S., and Nickerson W. J. 1962. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology* **84**: 820-840.

Bonifaz A., Araiza-Santibañez J., Vázquez- González D. 2010. Actualidades en micología médica: Mucormycosis. Facultad de medicina, UNAM. México D.F. pp 283-286.

Buchanan K. L., Murphy J. W. 1998. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerging Infectious Diseases* **4**: 71–83.

Casadevall A. 2006. Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe* **1**: 359–364.

Casadevall A., Nosanchuk J. D., Steenbergen J. N. 2003. 'Ready-made' virulence and 'dual-use' virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology* **112**: 1164–1175.

Casadevall A., Pirofski L. 2000. Host–pathogen interactions: the basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity* **68**: 6511–6518.

Castrillón L. E., Palma R. A., Padilla D. C. 2005. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana* **49**: 12-27.

Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T and Ghannoum M. A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans* development, architecture and drug resistance. *Journal of Bacteriology* **183**: 5385–5394.

Chayakulkeeree M., Ghannoum M. A., Perfect J. R. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **25**: 215-229.

Conway T., Sewell G. W., Osman Y. A., Ingram L. O. 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* **169**:2591-2597.

De la Calle-Rodríguez N., Santa-Vélez C., Cardona-Castro N. 2012. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicine* **26(1)**: 43-55.

Douglas L. J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiology* **11**: 30–36.

García-Solache M., Casadevall A. 2010. Global Warming Will Bring New Fungal Diseases for Mammals. *mBio* **1(1)**: 1- 10.

Havlickova B., Czaika V., Friedrich M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Journal compilation. *Mycoses* **51(4)**: 2-15.

Hawkins H. K., Diven S. C Rowen J. L., Angel C. A., Hattuck K. E. 2004. Intestinal mucormycosis due to *Absidia corymbifera* mimicking necrotizing enterocolitis in a preterm neonate. *Journal of Perinatology* **24**: 794–6.

Hawksworth D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**: 1422–1432.

Hogan L., Klein B., Levitz S. 1996. Virulence Factors of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **9(4)**: 649- 488.

Ingram C. W., Sennesh J., Cooper J.N., Perfect J.R. Disseminated mucormycosis: report of four cases and review. *Reviews of Infectious Diseases* **11**: 741-54.

Ibrahim A., Edwards JE Jr., Filler S. G. 2004. *Mucormycosis*. Philadelphia: Harcourt Brace.

Ibrahim A., Spellberg B., Walsh T. J., Kontoyiannis D. P. 2012. Pathogenesis of mucormycosis. *Clinical infectious diseases* **54**: 16-22.

Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B. 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European Journal Biochemistry* **269(18)**: 4409-17.

Karmakar M., Ghosh B., Ray R. R. 2012. Effect of Extracellular Factors on Growth and Dimorphism of *Rhizopus oryzae* with Multiple Enzyme Synthesizing Ability. *Indian Journal of Microbiology* **52(2)**: 215-221.

Latgé J. P. .2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* **9**: 382–389.

Lee S. C., Li A, Calo S., Heitman J. 2013. Calcineurin Plays Key Roles in the Dimorphic Transition and Virulence of the Human Pathogenic Zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens* **9(9)**: e1003625.

Li C. H., Cervantes M. S., DeborahJ. B., Ruiz-Vázquez R. M., Torres-Martinez S. R., Heitman J., Lee S. C. 2011. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens* **7**: 1-16.

Liu M. F., Chen F. F., Hsiue T. R., Liu C. C. 2000. Disseminated mucormycosis simulating cerebrovascular disease and pulmonary alveolar haemorrhage in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology* **19**: 311–14.

Lübbehüsen T. L., Nielsen J., McIntyre, M. 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of applied microbiology* **95**: 1151-1160.

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

Mavor A. L., Thewes S., Hube B. 2005. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets* **6**: 863–874.

McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. racemosus) during submerged batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 495-502.

Mendez-Tovar L., López-Martínez J., Hernández-Hernández F. 2010. Actualidades en micología médica: Estructura y fisiología de los hongos patógenos. Facultad de medicina, UNAM. México D.F. pp 9-10.

Meza-Carmen V .1999. Purificación y caracterización parcial de la Alcohol Deshidrogenasa de *Mucor circinelloides*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato.

Mukherjee P. K., Sotohy M., Chandra J., Kuhn D., Liu S., Antar O. S., Munyon R., Mitchell A. P., Andes D., Chance M. R., Rouabhia M., Ghannoum M. A. 2006. Alcohol Dehydrogenase Restricts the Ability of the Pathogen *Candida albicans* To Form a Biofilm on Catheter Surfaces through an Ethanol-Based Mechanism. *Infection and immunity* **74(7)**: 3804-3816.

Nagy A. C., Vágvolgyi., Balla E., Ferenczy L. 1994. Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. *Current Genetics* **26**: 45-48.

Nayak S., Satish R., Gokulnath., Savio J., Rajalakshmi T. 2007. Peritoneal mucormycosis in a patient on CAPD. *Peritoneal Dialysis International* **27**: 216–17.

Neblett-Farfair R., Benedict K., Bos J., Bennett SD., Lo Y. C. 2012. Necrotizing cutaneous mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *The New England Journal of Medicine* **367**: 2214–2225.

Nicolás F. E., Calo S., Murcia-Flores L., Garre V., Ruiz-Vázquez R. M., Torres-Martínez S. 2008. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *Microbiology letters* **280**: 81-88.

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.

Odds F. C., Gow N. A., Brown A J. 2006. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press, Washington DC. Pp 305- 319.

Oliveira-Neto M. P., Da Silva M, Monteiro P. C. 2006. Cutaneous mucormycosis in a young, immunocompetent girl. *Medical Mycology* **44**: 567–70.

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

Perfect J. R., Casadevall A. 2002. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* **16**: 837–874.

Perfect J. R., Casadevall A. 2006. Fungal molecular pathogenesis: what can it do and why do we need it? ASM Press, Washington DC. Pp 3-11.

Petrikkos G., Skiada A., Lortholary O., Roilides E., Walsh T. J., Kontoyiannis D. P. 2012. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. Pp 23-34.

Rangel-Porrás R. A., Meza-Carmen V., Martínez-Cadena G., Torres-Guzmán J. C., González-Hernández G. A., Arnau J., Gutiérrez-Corona J. F. 2005. Molecular analysis of an NAD-dependent alcohol dehydrogenase from the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics* **227**(4): 354-363.

Reid M. F., Fewson C. A. 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical reviews in microbiology* **20**: 13-56.

Richardson D.M. 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**(1): 5-11.

Rhodes J. C., Brakhage A. A. 2006. Molecular determinants of virulence in *Aspergillus fumigatus*. In *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press, Washington DC. Pp 333-345.

Ruiz- Herrera J., Bartnicki- García. 1974. Synthesis of cell Wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science* **186**: 357-359.

Santos-Pérez L. A., Herrera-Cartaya C., Domínguez-Perera M., López-Ortega M. 2008. Rhinocerebral mucormycosis in a diabetic patient admitted to an ICU. *Revista Panamericana de Infectología* **10**(1): 39-42.

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

Syperd P. S., Orłowski M. 1978. Regulation of macromolecular synthesis during hyphal germ tube emergence from sporangiospores of *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* **134**: 76-83.

Spellberg B., Edwards Jr., Ibrahim A. 2005. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clinical Microbiology Reviews* **18(3)**: 556-69.

Takahashi T., Tsuchida Y., Irie M. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from *Rhizopus* species. *Journal of Biochemistry* **84(5)**: 1183-1194.

Tekaia F., Latgé J. P. 2005. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 385–392.

Thongchul N., Navankasattusas S., Yang S.T. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **33(3)**: 407-416.

Tomee J. F., Kauffman H. F. 2000. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical & Experimental Allergy* **30(4)**: 476-84.

Torres-Narbona M., Guinea J., Martínez-Alarcon J. 2007. Impact of mucormycosis on microbiology overload: a survey study in Spain. *Journal Clinical Microbiology* **45**: 2051–3.

Valle- Maldonado M. I. 2013. Identificación y expresión de los genes que codifican para proteínas G heterotriméricas en *Mucor circinelloides*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias en Biología Experimental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Van Heeswijk R., Roncero M. 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications* **49**: 691- 702.

Van Heeswijk R., Roncero M., Jepsen L. 1988. Genetic Analysis and Manipulation of *Mucor* species by DNA-mediated transformation. En: Modern methods of plant analysis, editado por Linskens H y Jackson JF.

Virk S. S., Singh R. P., Arora A. S., Grewal J. S., Puri H. 2004. Gastric mucormycosis an unusual cause of massive upper gastrointestinal bleed. *Indian Journal Gastroenterology* **23**:146–7.

Voet D. y Voet J. G. 1995. Biochemistry. Second Edition. Second edition. Editorial John Wiley & Sons, Inc. Pp. 444-445.

Webster J., Weber R. 2007. Introduction to fungi: Taxonomy of fungi. United States of America by Cambridge University Press, New York. Pp 36-37.

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

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

Yoneya T., Sato Y. 1980. Comparison of two alcohol dehydrogenase in the fungus *Rhizopus javanicus*. *Applied and Environmental Microbiology* **40**: 967- 969.

Zeeman A. M., Kuyper M., Pronk J. T., van Dijken Jp., Steensma H. Y. 2000. Regulation of pyruvate metabolism in chemostat culture of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* **16**: 611-620.

