



---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

***FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA***

**Título de la Tesis:**

***Virulencia de los genes  $arf3$  y  $arf4$  de *Mucor  
circinelloides*.***

**Parta obtener el título de Químico Farmacobiologo**

**Presenta:**

***pQFB. Viridiana Alejandre Castañeda.***

**Asesor: D.C. Víctor Meza-Carmen**

**Co Asesor: D.C. Rafael Ortiz Alvarado**

**Morelia Michoacán, Agosto 2017**

## ***Agradecimientos***

*Primeramente, quiero agradecer a mi persona por todo el esfuerzo, constancia, dedicación, perseverancia y fuerza de voluntad que fui capaz de entregar durante la realización de este proyecto que sin lugar a dudas fue extenuante, frustrante al grado de no querer regresar a trabajar, pero al mismo tiempo apasionante, siempre nutriendo mis ganas de volverlo a intentar.*

*A mis padres, sin duda agradezco a ellos por darme la oportunidad de estar aquí y sobretodo les agradezco haberme enseñado a forjar mi carácter, en especial a mi mamá por haberme enseñado a salir adelante, aunque muchas veces haya más cosas en contra que nuestro favor.*

*A mis hermanos, sé que siempre están observando a su hermana mayor y yo siempre procuraré ser un buen ejemplo para ellos.*

*A mi asesor el D.C Víctor Meza Carmen por brindarme la oportunidad de conocer el significado del trabajo y compromiso que conlleva pertenecer a su equipo de investigación, así como el apoyo constante a mi formación académica.*

*Al D.C Rafael Ortiz por su apoyo y aportaciones al proyecto, y por siempre contagiarme su buena actitud ante cada situación.*

*Al M.C “Marco Aurelio” Valle, por sus constantes palabras de motivación, por su compañía, amistad y su apoyo durante la realización de este trabajo.*

*A Mark Reyes, mi más que amigo y compañero, por encontrar la manera de apoyarme siempre y siempre estar ahí para mí, gracias también por ayudarme con la edición de este trabajo.*

*A los espacios del laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.*

## A. ÍNDICE

.....	I
<i>Agradecimientos</i> .....	II
A. ÍNDICE.....	IV
B. Índice de figuras.....	VIII
C. Índice de tablas.....	IX
No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.....	IX
D. Abreviaturas y símbolos.....	IX
E. Prefijos.....	X
<b>M: Mega (<math>1 \times 10^6</math>)</b> .....	X
<b><math>\mu</math>: micro (<math>1 \times 10^{-6}</math>)</b> .....	X
<b>n: nano (<math>1 \times 10^{-9}</math>)</b> .....	X
F. Resumen.....	XII
G. Abstract.....	XIII
I. Introducción.....	1
1.1 Tráfico vesicular.....	1
1.1.2 Vía exocítica del tráfico vesicular.....	3
1.1.3 Vía endocítica del tráfico vesicular.....	4

1.1.4 Componentes del tráfico vesicular .....	5
1.1.5 Formación y componentes de una vesícula .....	6
II. Generalidades de las proteínas ARF .....	12
1.2 Regulación de la actividad de las proteínas ARF .....	14
1.2.3 Proteínas ARF en hongos .....	16
1.2.4 Proteínas Arf en <i>Mucor circinelloides</i> .....	18
1.3 <i>Mucor circinelloides</i> .....	18
1.3.1 Generalidades .....	18
1.3.1 Ciclo de vida .....	19
III. Hipótesis .....	26
IV. Objetivo General .....	26
4.1 Objetivos Particulares.....	26
V. Metodología experimental General.....	27
VI. Materiales y Métodos .....	28
6.1 Cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> .....	28
6.1.2 Condiciones generales de crecimiento de <i>M. circinelloides</i> .....	28
6.1.3 Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i> .....	28
6. 1 Cepas de <i>M. circinelloides</i> empleadas.....	29
6.2 Crecimiento en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i> .....	29
6.3 Obtención de sobrenadante en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i> .....	29
6.4 Análisis de Imágenes .....	30
6.5 Medios de cultivo.....	30
6.5.1 YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura) .....	30
6.5.2 YNB (Yeast Nitrogen casaminoácidos, Agar) .....	30
6.5.3. Ensayos de virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	32

6.5.4. Ensayos de virulencia en <i>Mus musculus</i> .....	32
6.5.5. Análisis estadístico.....	32
VII.Resultados .....	34
7.1 Corroboración de fenotipos de las cepas de <i>M. circinelloides</i> usadas en este trabajo.....	34
.....	35
7.2 Crecimiento radial de las cepas de <i>M. circinelloides</i> . .....	36
7.3 Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> en la producción de esporas de las cepas de <i>M. circinelloides</i> . .....	39
7.4 Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf</i> en la germinación de las esporas de <i>M. circinelloides</i> bajo condiciones aerobias.....	41
7.5 Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf</i> en la generación de biomasa en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i> .....	43
7.6 Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf</i> sobre la morfología en aerobiosis de <i>M. circinelloides</i> .....	44
7.7 Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf</i> sobre la morfología en el esporangio de <i>M. circinelloides</i> .....	46
7.8 Efecto de las mutaciones de los genes <i>arf</i> en el crecimiento radial de <i>M. circinelloides</i> .....	47
7.9 Efecto del producto de los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Mus musculus</i> . .....	48
7.10 Efecto de los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre el peso de <i>Mus musculus</i> . .....	49
7.11 Efecto del sobrenadante de cultivo micelial de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i> . .....	50
VIII. Discusión.....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	55



## B. Índice de figuras

Figura 1 Esquema de las principales vías de comunicación mediante vesículas entre orgánulos..	3
Figura 2. Biogénesis de vesículas	7
Figura 3. El proceso de fusión vesicular supone una serie de pasos antes de que sus moléculas formen parte del compartimento diana.	10
Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas	15
Figura 5. Ciclo de Vida sexual de <i>Mucor circinelloides</i>	22
Figura 6. Ciclo asexual de <i>Mucor circinelloides</i> en cultivo líquido.	23
Figura 7. Corroboración de las auxotrofias de las cepas de <i>M. circinelloides</i> usadas en este trabajo	35
Figura 8. Crecimiento radial de las cepas de <i>M. circinelloides</i> al día 2 de crecimiento.	37
Figura 9. . Crecimiento radial de las cepas de <i>M. circinelloides</i> al día 5 de crecimiento.	38
Figura 10. Producción de esporas por las cepas mutantes en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i> .	40
Figura 11. . Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> en la producción de las esporas de <i>M. circinelloides</i> .	42
Figura 12. Efecto de la mutación de los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre el crecimiento radial.	47
Figura 13. Efecto del sobrenadante de cultivo miceliar de las cepas mutantes en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	51



## **C. Índice de tablas**

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

## **D. Abreviaturas y símbolos**

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GAP: Proteína activadora de GTPasa (GTPase-activating protein)

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (G Protein Coupled Receptor)

kDa: kilo Daltons

PGH: Proteínas G Heterotriméricas

PI: Punto Isoeléctrico

PM: Peso molecular

RGS: Regulador de señalización de proteínas G (Regulator of G-protein signaling)

RNA: Ácido Ribonucleico

## **E. Prefijos**

**M: Mega ( $1 \times 10^6$ )**

**$\mu$ : micro ( $1 \times 10^{-6}$ )**

**n: nano ( $1 \times 10^{-9}$ )**



## F. Resumen

*Mucor circinelloides* es un hongo dimórfico y uno de los agentes etiologicos de la mucormicosis en pacientes inmunosuprimidos, la mucormicosis presenta un índice de mortalidad hasta del 60%. Los productos de los genes *ARF* codifican a GTPasas monoméricas, los cuales son reguladores del tráfico celular durante la biogénesis de vesículas; proceso universal en todos los organismos eucariotes. Este proceso está implicado en una gran variedad de funciones biológicas, como el transporte de moléculas dentro de la célula a ciertos orgánulos, así como también en la exportación de dichas moléculas fuera de la célula y la importación de moléculas e incluso de microorganismos. Varias de las moléculas producidas por los hongos, incluyen proteínas, lípidos, polisacáridos, pigmentos, entre otras, y ciertas moléculas son exportadas de la célula a través de vesículas. Varias de estas moléculas están asociadas con la virulencia de hongos; algunas de las cuales son capaces de interferir con la actividad del sistema inmune del huésped. *M. circinelloides* es un hongo dimórfico en el que se identificaron 6 genes (*arf1* a *arf4*; *arl1* y *arl2*) los cuales codifican a probables proteínas de la familia Arf. Las proteínas Arf3 y Arf4 de *M. circinelloides* son homólogas de la proteína ArfB de *Aspergillus nidulans* implicada en el desarrollo micelial de este ascomiceto. La mutación en el gen *AGE3* de *Candida albicans*, el cual codifica a un regulador tipo GAP (Proteína activadora de GTPasa) de proteínas ARF, generó un menor nivel de virulencia respecto a la cepa silvestre, de igual forma la mutacion en el gen *ARF2* generó una menor virulencia de *C. albicans*.

Ha sido de nuestro interés determinar si los productos de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* se encuentran involucrados en el proceso de virulencia, para ello realizamos un ensayo de infección en ratones y nematodos con las cepas mutantes homocariontes en los genes *arf3* y *arf4*, encontrando que la mutación en el gen *arf3*, pero no en el gen *arf4*, generó un aumento en la virulencia respecto a la cepa parental Mu402.

**Palabras clave:** *Mucor circinelloides*, mutación, micosis, trafico vesicular, virulencia.

## G. Abstract

*Mucor circinelloides* is a dimorphic fungus and one of the ethiological agents of Mucormycosis in immunosuppressed patients; mucormycosis presents a mortality rate up to 60%. The products of the *ARF* genes encode monomeric GTPases, which are regulators of cellular trafficking during vesicle biogenesis; which is an universal process in eukaryotic organisms. This process is involved in a variety of biological functions, such as the transport of molecules to specific organelles inside the cell, as well as the export of molecules outside the cell and the import of molecules and microorganisms. Several molecules produced by the fungi include proteins, lipids, polysaccharides, pigments, among others, are exported from the cell through vesicles. Many of these molecules are associated with the virulence of fungi; some of which are capable of interfering with the activity of the host immune system. *M. circinelloides* is a dimorphic fungus in which 6 genes were identified (*arf1-arf4* and *arl1-arl2*) encoding for probable Arf proteins. The Arf3 and Arf4 proteins of *M. circinelloides* are homologous to the ArfB protein of *Aspergillus nidulans* which is involved in the growth of this ascomycete. The mutation in the *AGE3* gene from *Candida albicans*, which encodes a GAP regulator (GTPase Activating Protein) of ARF proteins, generated a lower level of virulence with respect to the wild-type strain, even more the ARF2 protein in this Ascomycota is crucial for full virulence phenotype.

It has been our interest to determine if the products of the *arf3* and *arf4* genes of *M. circinelloides* are involved in the virulence process, for this reason we performed an infection assays in mice and nematodes with the homokarion mutant strains in the *arf3* and *arf4* genes. Finding that the mutation in the *arf3Δ* gene, but not in the *arf4* gene, generated an increase in virulence with respect to the Mu402 parental strain.

**Key words:** *Mucor circinelloides*, mycoses, vesicular trafficking, virulence.

# I. Introducción

## 1.1 Tráfico vesicular

Las células eucariotas contienen membranas intracelulares que encierran más de la mitad de su volumen celular en compartimentos intracelulares e individualizados denominados organelos. Cada organelo contiene asociados a ellos una vasta gama de proteínas específicas que en conjunto generan las funciones de cada organelo. Cuando la proteína que será enviada a un organelo acaba de ser sintetizada, ésta sigue una vía específica que va desde el ribosoma donde ha sido sintetizada, hasta el organelo donde actuará. La guía de esta ruta de transporte se encuentra en señales específicas (motivos) presentes en su secuencia de aminoácidos y las cuales actúan como un péptido señal. Este sistema de transporte es guiado selectivamente a través de proteínas receptoras que se encuentran ancladas en el organelo de destino.

Existen distintos mecanismos por medio de los cuales las proteínas se desplazan desde un compartimento a otro. Uno de ellos es el tráfico vesicular, en el cual las vesículas de transporte cargan a las proteínas desde un espacio a otro. A medida que la membrana de un compartimento va generando vesículas por gemación, estas vesículas capturan las moléculas cargo en su interior. Tras el transporte y la fusión con la membrana del organelo blanco estas vesículas descargan su contenido al organelo blanco (*Alberts, 2011*).

El tráfico vesicular es un proceso estrictamente regulado, el cual tiene implicaciones directas en las respuestas celulares tanto a estímulos externos como internos, como es la presencia de factores de crecimiento o variaciones en el medio extra e intracelular. Estas respuestas son reguladas en gran parte por el tráfico vesicular, generando finalmente las alteraciones apropiadas en el metabolismo, crecimiento, movimiento e incluso en la muerte celular (*Eden y col. 2009*).

El hecho de que el transporte vesicular sea vectorial sugiere que cada paso está en una dirección específica, divididos estos a su vez en una serie de eventos.

Estos eventos incluyen componentes proteicos solubles o asociados a la membrana de la vesícula de transporte y son dirigidos a la membrana blanco. Un nivel adicional de complejidad está conferido en la vía de secreción regulada, en la que el último paso, la exocitosis, está regulada por los niveles de calcio o GTP principalmente. En los últimos años, una combinación de enfoques, que incluyen la genética molecular, la reconstitución *in vitro* de sistemas de transporte, y la caracterización bioquímica de vesículas intermediarias, ha llevado a la identificación de proteínas que están involucradas en el tráfico vesicular. (Scheller, 1993). Existen dos rutas principales de comunicación entre los organelos celulares que son reguladas por el tráfico vesicular. La primera da inicio en el retículo endoplásmico y envía vesículas al aparato de Golgi, a su vez éste envía vesículas a la membrana plasmática, este proceso se denomina vía exocítica. La otra ruta es la importadora o proceso conocido como vía endocítica y comienza en la membrana plasmática donde se forman las vesículas que permiten el ingreso a la célula de componentes extracelulares o receptores de membrana (**Figura 1**) (Ponnambalam y Baldwin, 2003).

Los mecanismos por los cuales la exocitosis y la endocitosis se acoplan funcionalmente son objeto aún de discusión, dado que existen múltiples componentes moleculares que se encuentran involucrados, cada uno con diferentes mecanismos subyacentes.

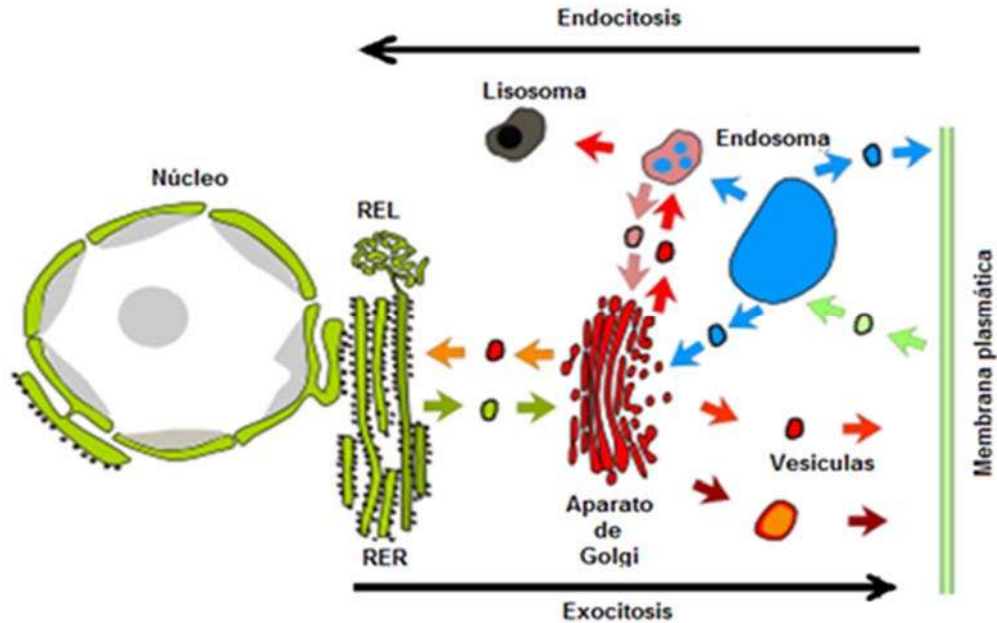


Figura 1 Esquema de las principales vías de comunicación mediante vesículas entre orgánulos..

**Figura 1. Esquema de las principales vías de comunicación mediante vesículas entre orgánulos.** Se representan las principales vías de comunicación mediadas por el tráfico vesicular, la vía de exocitosis se origina en el RER (Retículo endoplásmico rugoso) hacia el aparato de Golgi, además se representa el REL (Retículo endoplásmico liso). La otra vía representada es la vía endocítica que inicia en la membrana plasmática hacia los endosomas, ilustrada por las flechas en color verde. Existe una comunicación bidireccional entre la mayoría de los orgánulos que se comunican directamente (Modificado de Atlas de Histología Animal y Vegetal, 2008).

### 1.1.2 Vía exocítica del tráfico vesicular

El aparato de Golgi está formado por una serie de cisternas aplanadas que se disponen regularmente formando pilas (cis, media y trans). Entre las cisternas, dentro de cada pila, existen numerosas proteínas que se encuentran integradas en cada pila. Este entramado, se denomina matriz, el cual ayuda a mantener la estructura del organelo. Una vez que las vesículas formadas en el trans-Golgi contienen a las moléculas cargo, estas se pueden fusionar con la membrana plasmática para suministrar a las proteínas residentes tales como receptores,



canales iónicos, e incluso exportar diversas moléculas como enzimas, hormonas, entre otras (*Hua y col. 2000*).

Los lípidos de las vesículas que son secretados aportan componentes nuevos a la membrana plasmática celular al mismo tiempo que las proteínas solubles de estas vesículas son secretadas al espacio extracelular. La fusión de las vesículas con la membrana plasmática se denomina exocitosis, a través de la exocitosis las células de mamífero secretan la mayoría de proteoglicanos y glucoproteínas de la matriz extracelular (*Alberts, 2011*).

Existen dos tipos de exocitosis: la **ruta de secreción constitutiva**, la cual es imprescindible por todas las células, cuya función es liberar moléculas que van a formar parte de la matriz extracelular o bien sirven para regenerar la propia membrana celular. Es un proceso constante de producción, desplazamiento y fusión, con diferente intensidad de tráfico según el estado fisiológico en que se encuentre la célula (*Sollner y col. 1993*). Y la **ruta de secreción regulada** de la cual disponen las células especializadas es una ruta secretora en las que las proteínas solubles y otras sustancias primero se almacenan en vesículas de secreción y después son secretadas. A través de esta ruta las células especializadas pueden secretar rápidamente hormonas, neurotransmisores o enzimas digestivas, las dos rutas se separan en la red del *trans* Golgi (*Alberts, 2011*).

Las vesículas que participan en el proceso de secreción regulada no se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática sino que requieren de una señal que puede ser el aumento de la concentración de calcio intracelular, ATP, GTP, entre otros factores (*Gil, 2010*).

### **1.1.3 Vía endocítica del tráfico vesicular**

Las células toman material extracelular a través de variados mecanismos que colectivamente se denominan endocitosis. Los mecanismos endocíticos sirven para satisfacer importantes funciones celulares, incluyendo el consumo de nutrientes, la regulación de la función de los receptores de membrana plasmática,

el mantenimiento de la polaridad celular y la presentación de antígenos. Las rutas endocíticas son también utilizadas por virus, toxinas y organismos simbióticos o patógenos para ingresar en la célula. Uno de los mecanismos mejor caracterizados es la endocitosis de receptores mediada por vesículas cubiertas de clatrina, proceso que interviene en la respuesta inmune, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis celular. Es importante tener presente que durante cualquier tipo de endocitosis también se incorporan lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que son las que se encargan de formar la membrana de la propia vesícula (*Mukherjee y col. 1997*).

En la vía endocítica, segmentos de la membrana plasmática se invaginan para formar vesículas citoplasmáticas que se transportan al espacio intracelular (*Karp, 2014*). La endocitosis consiste en la internalización de los componentes de la membrana plasmática, ligandos asociados y líquido es un proceso elemental en las células eucariotas. Como tal, esta vía tiene un papel importante en muchas áreas de la biología celular, que van desde la absorción de nutrientes a la regulación de la señalización intercelular (*Hanser, 2009*). En función del tipo de vesículas que se forman se distinguen dos tipos de endocitosis: la *pinocitosis* implica la ingestión de fluidos y solutos por vesículas pequeñas ( $\geq 150$  nm) y la *fagocitosis*, que comprende la ingestión de grandes partículas como microorganismos o restos celulares a través de vesículas denominadas fagosomas generalmente de un rango de 250 nm (*Alberts, 2011*).

#### **1.1.4 Componentes del tráfico vesicular**

Todas las células eucarióticas poseen múltiples compartimientos que se encuentran delimitados por membranas (organelos), los organelos tienen características bioquímicas específicas que les permite realizar funciones especiales. Para su adecuado funcionamiento, cada compartimiento tiene proteínas membranales y solubles que le son características. Por ejemplo, las mitocondrias poseen en su membrana interna proteínas que forman la cadena de transporte de electrones, pieza fundamental para la función de dicho organelo, mientras que en cambio los lisosomas poseen numerosas hidrolasas ácidas asociadas solamente a este organelo (*Karp, 2014*). Por lo tanto, el correcto

funcionamiento de cada uno de estos organelos es de suma importancia para el metabolismo y la interacción de la célula con su entorno.

Los diferentes organelos interactúan entre sí y el transporte vesicular media un intercambio continuo de membranas y contenido entre ellos. Es necesario, entonces, que la célula mantenga la existencia de estructuras membranosas estables sin cerrar el tráfico de macromoléculas entre las mismas (**Figura 1**).

Se han propuesto tres modelos para explicar el flujo de material de unos orgánulos a otros: **transporte vesicular, transporte tubular y transporte por maduración**.

**En el modelo del transporte vesicular**, las moléculas transitan de un compartimiento a otro incorporadas en vesículas que se forman en el compartimiento de origen y se fusionan con el compartimiento de destino.

**De acuerdo con el modelo del transporte tubular**, las moléculas difunden de un compartimiento a otro a través de conexiones tubulares que se establecen al fusionarse las membranas de ambos.

**En el modelo de maduración**, los compartimientos se van transformando con el tiempo, y así una macromolécula puede aparecer en diferentes estructuras sin tener que ser trasvasada.

En general se considera que los tres modelos participan, de una forma u otra, en las dos vías principales de transporte: exocítica y la endocítica (*Staskevich, 2000*).

### **1.1.5 Formación y componentes de una vesícula**

De manera simplificada la vida de una vesícula se puede resumir en los siguientes pasos: concentración de las moléculas a ser transportadas (moléculas cargos), gemación de la vesícula, transporte de la misma a través del citoesqueleto, y finalmente reconocimiento por el compartimento receptor y fusión con el mismo (**Figura 2**).

**Proteínas de cubiertas y adaptadoras:** Estas proteínas median el proceso de comienzo de la formación de la gemación de la vesícula, que a su vez está acoplada con la selección de las proteínas a ser transportadas (denominados

como proteínas “carga”) las que han de incorporarse en la vesícula. Aunque algunas proteínas transmembranales poseen en su estructura primaria secuencias señales necesarias para interactuar directamente con las cubiertas, es frecuente que la interacción esté regulada por proteínas adaptadoras (por ejemplo AP-1 y AP-2) mismas que son responsables de dar la especificidad en el proceso de selección de las proteínas cargo (*Bonifacino, 2004*).

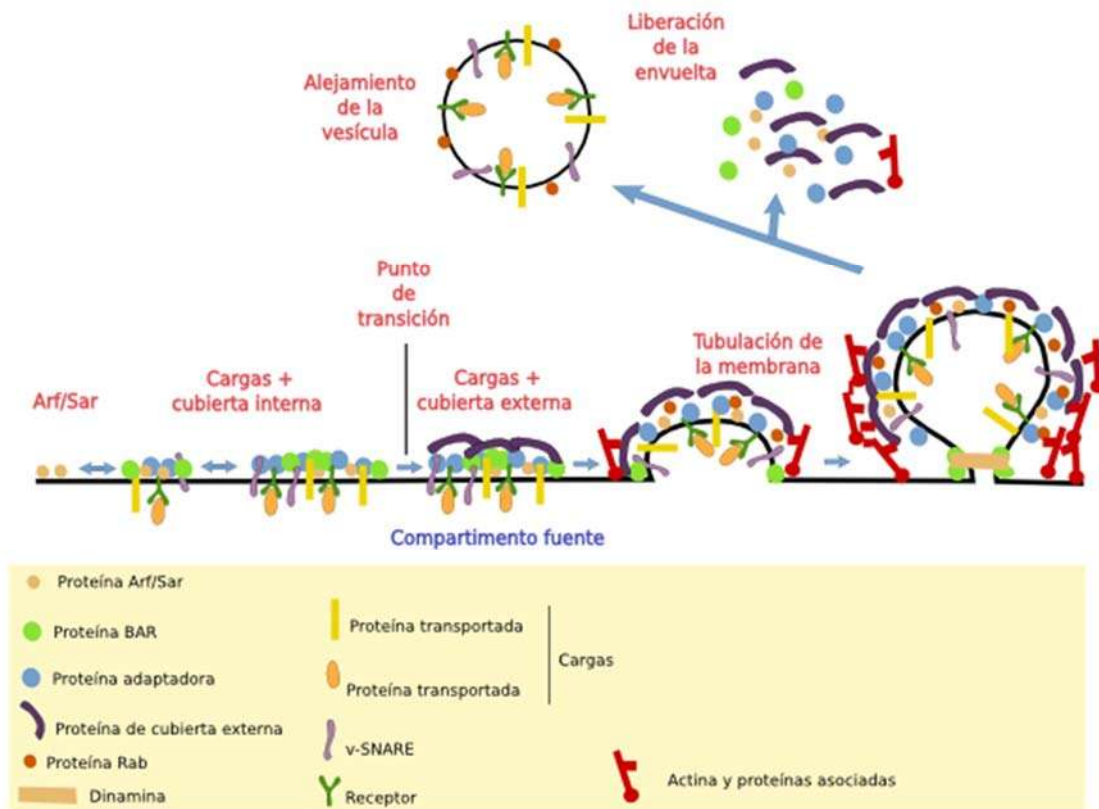


Figura 2. Biogénesis de vesículas

**Figura 2. Biogénesis de vesículas.** La formación de una vesícula recubierta da inicio mediante el reclutamiento de proteínas de la familia Arf/Sar a la membrana del orgánulo fuente. Sin embargo, aún no se sabe cómo se inicia el proceso, ni cómo se selecciona el lugar de la membrana donde tendrá lugar el brote de la gema (Modificado de Weinberg y Drubin, 2012).

**Citoesqueleto y proteínas motoras:** Una vez que la vesícula se ha generado, enseguida se dirige al compartimento receptor a través de proteínas motoras, las cuales se desplazan a través de las vías del citoesqueleto.

Las proteínas motoras que se mueven sobre los cables de actina son del tipo miosinas, mientras que las dineínas y quinesinas se desplazan sobre los microtúbulos (*Anitei y Hoflack, 2011*).

**Factores de “amarre” (tethering factors) y SNAREs:** El último paso en la vida de la vesícula es la fusión con el compartimento receptor. Este proceso necesita de selectividad por parte del compartimento receptor, y por otra requiere de una maquinaria específica que facilite un proceso termodinámicamente desfavorable como es la fusión de membranas. En el compartimento receptor se encuentran unos complejos conocidos como complejos de amarre (o “tethering factors”). Estos complejos forman un puente entre la vesícula y la membrana receptora, de tal forma que son los responsables del reconocimiento inicial de la vesícula.

Los factores de amarre son reclutados por las GTPasa tipo Rab y además son capaces de concentrar a las proteínas tipo SNAREs (de las siglas en Inglés Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein Receptor, que son los factores que se encargan de mediar la fusión de la vesícula a la membrana receptora.

Cuando la vesícula se encuentra cerca de la membrana se fusiona con ella por la acción de pares de proteínas transmembranales denominadas SNAREs. Hay dos tipos: v-SNAREs y t-SNAREs. Las v-SNAREs (v de vesicula) se incorporan en la vesícula durante su formación en el compartimento donador y las t-SNAREs (t del inglés target, diana) se encuentran en las membranas del compartimento diana.

La interacción entre v-SNARE y t-SNARE induce un acercamiento entre las dos membranas, liberando la energía necesaria para promover su fusión. Los complejos de SNAREs formados a continuación son disociados por la acción de AAA ATPasas NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) y sus proteínas

adaptadoras SNAPS (Soluble NSF attachment protein). Seguido de esto las SNAREs quedan disponibles para regular un nuevo evento de fusión (**Figura 3**) (*Risselada y Grubmüller, 2012*).

**GTPasas reguladoras del tráfico vesicular.** En el transporte dirigido, es necesario que las membranas donadoras y receptoras tengan una identidad propia para que puedan fusionarse. Esta identidad es definida, en parte, por la concentración específica de determinados tipos de lípidos, así como también por la acción de unas proteínas denominadas GTPasas pequeñas (o proteínas G monoméricas) pertenecientes a la superfamilia Ras, que son las responsables de coordinar el tráfico de vesículas en la célula. Las proteínas G oscilan entre dos conformaciones distintas, una activa cuando se encuentran unidas a GTP y otra forma inactiva cuando se encuentra unida a GDP.

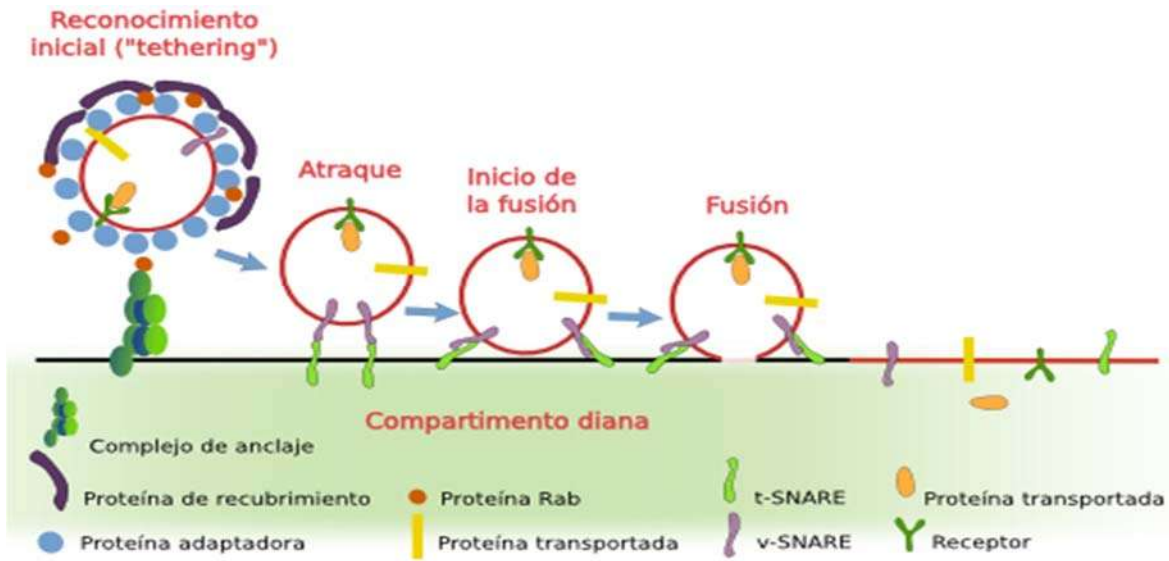


Figura 3. El proceso de fusión vesicular supone una serie de pasos antes de que sus moléculas formen parte del compartimento diana.

**Figura 3. El proceso de fusión vesicular supone una serie de pasos antes de que sus moléculas formen parte del compartimento diana.**

El primer paso es un reconocimiento inicial o anclaje (en inglés: "tethering"). Esto requiere que haya una "etiqueta" que indique qué compartimentos se han de fusionar así como moléculas que reconozcan el marcador, lo aportan las proteínas Rab. El reconocimiento inicial entre ambos es primordial para la especificidad de la fusión entre las vesícula y el compartimento diana. En seguida viene el atraque de la vesícula en el compartimento fuente. Para ello participan las proteínas transmembrana SNARE. Hay dos tipos: v-SNARE y t-SNARE. Las v-SNARE se incorporan en la vesícula durante su formación en el compartimento fuente y las t-SNARE se encuentran en las membranas del compartimento diana.

La interacción entre v-SNARE y t-SNARE provoca un acercamiento de las membranas de la vesícula y del compartimento diana, liberando la energía necesaria para la fusión de ambas membranas. Y finalmente la fusión, para la fusión de la membrana vesicular y del compartimento fuente, otras proteínas parecen cooperar con las proteínas SNARE (Modificado de Weinberg y Drubin, 2012).

La transición entre estas dos conformaciones es inducida por dos familias de proteínas accesorias, las denominadas proteínas tipo GEFs (del inglés, **G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actors) cuya función es facilitar el intercambio del nucleótido GDP por GTP, y las proteínas tipo GAP (del inglés, **G**T Pase-**A**ctivating **P**roteins) que promueven la hidrólisis del GTP a GDP. En su forma activa, estas GTPasas reclutan a sus proteínas efectoras, que promueven procesos como la formación de las cubiertas de las vesículas o la fusión de dichas vesículas a las membranas receptoras.

Las **proteínas G monoméricas** o proteínas G pequeñas (de peso molecular de 20-25 kDa en promedio, menor peso molecular respecto a las subunidades G $\alpha$  de las heterotrimericas 35-40 kDa). Todas las proteínas G monoméricas unen GTP (Levy, 2006).

Las proteínas monoméricas de unión a nucleótidos de guanina son “interruptores moleculares” cuando se activan cambian el GDP por GTP (estado activado) con ello se abre una ventana temporal en el cual las proteínas G pueden modular las proteínas efectoras como un interruptor. Después de un tiempo determinado la proteína G hidroliza su nucleótido y vuelve a su estado de reposo uniendo GDP (estado inactivo).

Las GTPasas que regulan el tráfico intracelular son las GTPasas de las familias RHO, RAB y ARF:

- a) **GTPasas de la familia RHO (Ras Homolog)**: En el tráfico vesicular estas proteínas participan regulando la direccionalidad de las vesículas al controlar la formación del citoesqueleto de actina lo que origina las vías de transporte intracelular de estas vesículas (Perez y Rincón, 2010).
- b) **GTPasas de la familia RAB (Ras-related in brain)**: son las principales reguladores del tráfico intracelular y actúan coordinando rutas específicas de transporte dentro de la célula (Schleifer y col. 1982).



- c) **GTPasas de la familia ARF (ADP-Ribosylation Factor):** estas proteínas participan principalmente en la formación de las vesículas, reclutando proteínas efectoras (Clatrina, COPI y II entre otras), que participan en la formación de la cubierta de las vesículas y por ende la formación de las mismas.

Las proteínas G monoméricas de la familia ARF han sido descritas en todas las células eucariotas. Las proteínas ARF fueron descritas por primera vez como un factor alostérico de la toxina del cólera (CTX), dicha interacción repercutía en un aumento de la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) por la ADP-Ribosil transferasa (CTX) de *Vibrio cholerae*, se encontró que el aumento de la actividad de actividad *in vitro* de la AC se relacionaba proporcionalmente con la cantidad de factor (ARF) presente en la reacción enzimática (Schleifer y col. 1982).

## II. Generalidades de las proteínas ARF

Las proteínas ARF tienen una función elemental en el metabolismo de las vesículas, incluyendo el reclutamiento de las proteínas de cubierta para iniciar la formación y gemación de las mismas (Popoff y col. 2011). De esta manera, las proteínas ARF participan en el tráfico vesicular entre diversos compartimientos celulares, como son el RE, el aparato de Golgi, los endosomas, la envoltura nuclear, etc. (Moss y Vaughan. 1995). Las proteínas ARF en su estado activado (ARF-GTP) se unen directamente con sus efectores. Algunos efectores pertenecen a los complejos de la cubierta vesicular como clatrina, COPI, las proteínas adaptadoras AP1-2 y GGA 1-3 (Golgi-associated, Gamma adaptin ear-containing ARF-binding proteins), entre otras proteínas.

Las proteínas ARF reclutan a las proteínas de cubierta y adaptadoras, conduciendo a la formación y al destino de vesículas junto con la proteína cargo contenida en el interior de éstas (Dell'Angelica y col. 2000; Donaldson y Jackson. 2011).

La familia ARF incluye tres grupos diferentes de proteínas: las ARF; las ARF-like (ARL) y SAR (Secretion-Associated and Ras-related protein), las proteínas ARL son proteínas que están estructuralmente relacionada con las proteínas ARF (50-60% de identidad) (*Tamkun y col. 1991*). Las proteínas ARL no son un grupo coherente, ya sea funcional o filogenéticamente, todas poseen una glicina en el extremo amino terminal (al igual que las ARF), pero no todas son susceptibles de las N-miristoiltransferasas ni actúan como factores alostéricos de la CTX. Las proteínas SAR1 de *S. cerevisiae* fueron uno de los primeros miembros de la familia ARF secuenciados, tienen una menor identidad con las proteínas ARF y ARL (<30%) y fue originalmente identificada como un supresor de *SEC12* (mutación en *SEC12* generó defectos en la secreción) (*Nakano y Muramatsu. 1989*).

Además, las proteínas ARF en su estado activado tienen la capacidad de interactuar y activar ciertas enzimas modificadoras de lípidos como la fosfolipasa D1 (PLD), fosfatidilinositol-4,5-cinasa (PI(4)P5K) y la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), las cuales se cree promueven la remodelación de las membranas en donde emergerán las vesículas (*Donaldson y Jackson. 2011*).

El ensamblado de las proteínas de cubierta implica a las proteínas ARF con diversas proteínas como son las proteínas GEF (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que inducen la activación y GAP (proteínas activadoras de GTPasa) que provocan la inactivación de las proteínas ARF. Las vesículas de las membranas donadoras poseen una proteína tipo (GEF), además la proteína ARF-GTP se une a la membrana donadora. La proteína ARF-GTP (activa) recluta a las proteínas de cubierta que se encargan de preparar la gemación de la vesícula, las proteínas de cubierta no se separan tras el desprendimiento de la vesícula de la membrana donadora, sino hasta que llega a la membrana receptora. Las proteínas ARF activadas sufren un cambio conformacional exponiendo la hélice anfipática, localizada en su extremo N-terminal, permitiéndole así la inserción en las membranas. Este proceso desencadena el reclutamiento y montaje de las proteínas de la cubierta a las membranas donadoras, seguido por

la formación de vesículas revestidas y su eventual escisión. En las plantas, las proteínas ARF/SAR también desempeñan un papel primordial en el mantenimiento de los orgánulos en la vía secretora. La proteína SAR1 es responsable de controlar estrictamente el transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico a través del reclutamiento de los componentes de proteína de cubierta COPII a las membranas. El transporte de vesículas COPII se encarga de la organización de las redes del retículo endoplásmico. Por el contrario, las proteínas ARF contribuyen a la regulación de múltiples rutas de tráfico, además del transporte a través del aparato de Golgi y transporte endocítico. Estos sistemas de transporte se han diversificado en el reino vegetal de forma independiente y presentan características específicas con respecto a la organización del aparato de Golgi, la vía endocítica, la polaridad celular y la citocinesis. La diversificación funcional de los sistemas de tráfico vesicular garantiza el desarrollo multicelular de las plantas superiores (*Yorimitsu y col. 2014*).

En resumen, la exactitud en el transporte de vesículas depende de: el reconocimiento específico y captura de las moléculas cargos mediante la acción de proteínas cubiertas; el reconocimiento de la vesícula por factores de amarre; y la fusión de membranas mediada por SNAREs. Al mismo tiempo de la regulación y reclutamiento de todos estos factores acción liderada por las GTPasas de la familia RAB, ARF y RHO, mecanismos del transporte vesicular que se encuentran conservados en todos los eucariotas.

## **1.2 Regulación de la actividad de las proteínas ARF**

Las proteínas ARF, al igual que otras GTPasas ciclan entre un estado activo en el cual mantienen unido al nucleótido GTP (ARF-GTP) y un estado inactivo uniéndose al GDP (ARF-GDP) (**Figura 4**). Este ciclo se inicia por la acción de proteínas intercambiadoras de nucleótidos denominadas GEP (GEP, del inglés Guanine Exchange Proteins) (*Donaldson y Jackson, 2011*).

Las proteínas GEP catalizan el intercambio del GDP a GTP desencadenando así la activación de las proteínas ARF, este intercambio es un paso de suma importancia para la regulación vesicular (**Figura 4**). Todos los complejos ARF-

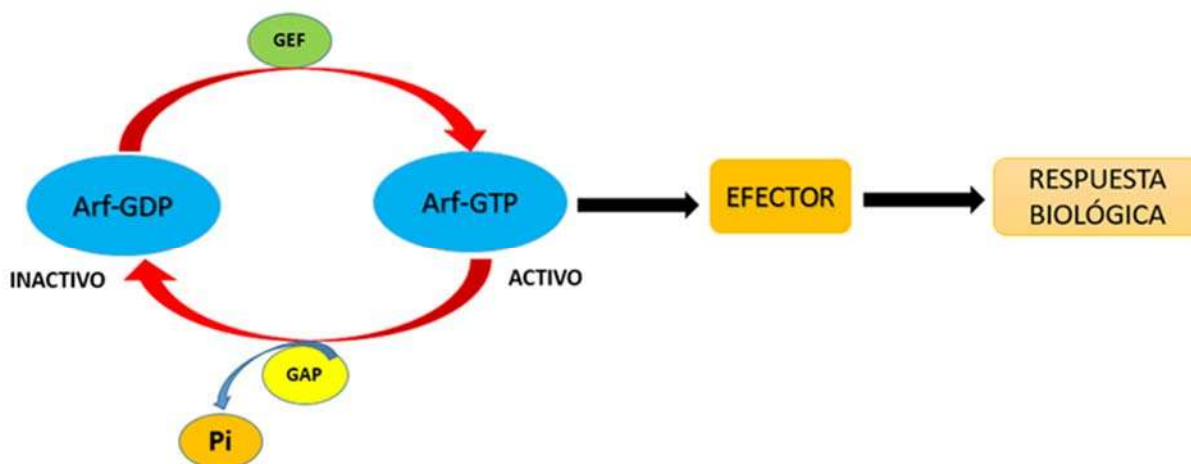


Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas

GEP identificadas hasta el momento poseen un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos denominado Sec7, el cual responsable de la actividad de GEP (Cox y col. 2004). **Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas.** La proteína ARF unida a GDP, permanece en estado inactivo, el intercambio por GTP es un proceso catalizado por una proteína llamada GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). La unión de GTP a ARF provoca un cambio conformacional en la proteína que le permite interactuar con sus efectores, desencadenando un respuesta biológica, como es el caso de la formación de vesículas, ARF entra a un estado inactivo al hidrolizarse el GTP unido, por acción de una GAP (GTPasa Activating Protein) que libera fosforo inorgánico a partir del nucleótido, produciendo GDP-ARF (East y col. 2011).

El estado activo de las proteínas ARF finaliza cuando la actividad intrínseca de GTPasa es aumentada significativamente por las proteínas activadoras de GTPasa denominadas GAP (GTPase Activating Protein) (Shin y col. 2008). En humano se han identificado más de 30 genes que codifican proteínas con dominios catalíticos de ARF-GAP (Shin y col. 2008).

De esta manera, las proteínas GEF y GAP son reguladoras de la función de las proteínas G y se denominan por sus siglas en inglés RGS (regulator of G protein signaling). Se considera que estas proteínas reguladoras son expresadas en

células específicas en momentos definidos, tienen un papel importante en la modulación de la transducción de señales de las proteínas ARF (*Vries y col. 2000*).

Las funciones biológicas de las proteínas ARF son el resultado de sus interacciones específicas con diversas proteínas efectoras (*Donaldson y Jackson, 2011*). Las proteínas ARF en su estado activado (ARF-GTP) se unen directamente con sus efectores. Algunos efectores pertenecen a los complejos de la cubierta vesicular como clatrina, COPI, las proteínas adaptadoras AP (Adaptor Protein) y GGA 1-3 (Golgi-associated, Gamma adaptin ear-containing ARF-binding proteins). Las proteínas ARF reclutan a las proteínas de cubierta y adaptadoras, conduciendo a la formación y al destino de vesículas junto con la proteína cargo contenida en el interior de éstas (*Dell'Angelica y col. 2000; Donaldson y Jackson, 2011*). Además, las proteínas ARF en su estado activado son capaces de interactuar y activar algunas enzimas modificadoras de lípidos como la fosfolipasa D1 (PLD), fosfatidilinositol-4,5-cinasa (PI(4)P5K) y la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K), las cuales se cree promueven la remodelación de las membranas (*Donaldson y Jackson, 2011*). Se ha sugerido, que algunos miembros de las proteínas ARF están involucrados incluso en la biogénesis de ciertos organelos (*Antonio y col. 2009*).

### **1.2.3 Proteínas ARF en hongos**

Las proteínas ARF son conservadas y ubicuas en todos los eucariotes, la alta identidad de estas proteínas se ha utilizado para estudiar su función en diversos sistemas biológicos y extrapolar este conocimiento a células de humano (*Stearns, 1990*).

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

Se conocen tres genes *ARF* (*ARF1-ARF3*) en *S. cerevisiae* *ARF1* y *ARF2* participan en el tráfico vesicular específicamente en la ruta exocítica (*Lee, 1994*). Las proteínas codificadas por estos dos genes son 96% idénticas entre sí. La interrupción del gen *ARF1* da como resultado un crecimiento lento y sensibilidad al

frío. La interrupción del gen *ARF2* no provoca ningún fenotipo detectable, por lo contrario la interrupción de ambos genes es letal, dado que las proteínas ARF1 y ARF2, tienen funciones parcialmente redundantes y en conjunto son esenciales para el crecimiento. Las proteínas codificadas por estos dos genes, *ARF1* Y *ARF2* son funcionalmente homólogas y las diferencias fenotípicas entre las mutaciones en los dos genes puede ser explicada por el nivel de expresión; *ARF1* produce aproximadamente el 90% del total de las proteínas ARF, pero la interrupción de uno de los dos genes (*ARF1* o *ARF2*) puede ser reparado por alguno de los dos presentes (Stearns. 1990).

Mientras que la proteína ARF3 de *S. cerevisiae* muestra un 60% de identidad con las proteínas ARF1 de la clase III de mamífero, mientras que las proteínas ARF1 y ARF2 presentan 52-56% de similitud respectivamente con ARF3. La proteína ARF3 posee una importante función en el crecimiento polarizado y en la emisión de la gema (Huang y col. 2003).

### ***Aspergillus nidulans***

Las proteínas ARF presentan una participación relevante en el crecimiento polarizado del ascomiceto *A. nidulans* el cual es un hongo monomórfico micelial, que presenta un homólogo denominado ArfB, con un 72% de identidad con ARF6 de humano y con un 59% de identidad con ARF3 de *S. cerevisiae*. La cepa mutante *arfB* presentó un crecimiento reducido mostrando una hiper-ramificación con acortamiento de las hifas (Lee y col. 2008).

### ***Candida albicans***

*C. albicans*, el principal patógeno fúngico de los seres humanos posee un gen *AGE3* el cual codifica para una proteína ARF-GAP, mutantes en *age3* mostraron sensibilidad a esteroides e inhibidores de pared, como fluconazol y caspofungina. Estudios de infección *in vivo* llevados a cabo en ratón demostraron que mutantes *age3* son virulentas en ratones normales y con un efecto atenuado en ratones

inmunocomprometidos. Estos datos indican que el metabolismo de las proteínas ARF está involucrado en procesos de virulencia en hongos (Epp y col. 2010).

Recientemente se describieron 5 genes que codifican a proteínas en *C. albicans* pertenecientes a la familia ARF, tres ARF (*ARF1-ARF3*), y dos ARL, ARL1 y ARL3. *ARF2* es requerido para la viabilidad y sensibilidad a antifungicos, además de intervenir en el crecimiento filamentoso/virulencia al igual que ARL1 (Labbaoui y col. 2017).

#### **1.2.4 Proteínas Arf en *Mucor circinelloides***

La participación de las proteínas Arf en la fisiología de *M. circinelloides*, y sus implicaciones pudiesen estar involucradas en el proceso dimórfico, incluso de la misma manera que en *C. albicans*, en donde el papel de las proteínas Arf está involucrado en la virulencia, ejemplo de esto es que una mutación en una ARF-GAP generó una menor virulencia en ratones (Epp y col. 2010), quizás ciertos factores de virulencia (proteasas, hidrolasas, entre otras) son exportados a través de vesículas o ciertas glicoproteínas de superficie que hacen contacto y reconocimiento con las células huésped, usan este mecanismo de transporte en donde las proteínas ARF son reguladores clave.

Ensayos anteriores han demostrado que mutaciones en *M. circinelloides* en los genes *arf3* y *arf4* conducen a ciertos fenotipos similares, en donde ambas proteínas se asocian en el mismo contexto, al igual que con *ArfB* de *A. nidulans*, cuya mutante mostró defectos en la emisión de tubo germinativo con estructuras dicotómicas en las mismas, dichas estructuras también fueron observadas en las mutantes *arf3*<sup>Δ</sup> y *arf4*<sup>Δ</sup> de *M. circinelloides* sugiriendo funciones similares durante la germinación de ambos hongos (Maldonado-Herrera. 2016).

### **1.3 *Mucor circinelloides***

#### **1.3.1 Generalidades**

*M. circinelloides* es un hongo filamentoso y de amplia distribución, encontrándose en suelo, estiércol y otros sustratos orgánicos en descomposición. Se ha descrito

como un hongo patógeno oportunista humano, agente causal de la mucormicosis, una enfermedad rara pero letal cuya incidencia ha ido en aumento durante los últimos años (Álvarez y col. 2009). Pertenece al subphylum Mucoromycotina, que se caracteriza por tener una reproducción sexual por fusión de gametangios, presentan un micelio generalmente cenocítico (en algunas especies pueden aparecer septos) y producir esporas aflageladas e inmóviles. Se incluye en el orden de los mucorales dado que las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena en estructuras que reciben el nombre de esporangios, y en la familia *Mucoraceae* porque el esporangióforo aparece separado del resto del esporangio por un septo llamado columela. El género *Mucor* que da nombre al subphylum, la familia y al orden presenta esporangióforos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos en su extremo.

### **1.3.1 Ciclo de vida**

*M.circinelloides* es un hongo heterotálico con dos tipos sexuales (+) y (-), idénticos morfológicamente y presenta dos ciclos de vida:

#### **- Ciclo asexual o vegetativo**

Hace posible una rápida dispersión del organismo. Se inicia con la gemación de una espora vegetativa o esporangioespora, generalmente multinucleada. Las esporas maduran en el esporangio situado en el extremo del esporangióforo. Al germinar, las esporas se hinchan y producen uno o varios tubos germinativos que dan lugar a las hifas que crecen por el ápice y se ramifican abundantemente para formar el micelio. En determinado momento las hifas que crecen ramificándose sobre el sustrato se hacen aéreas originando esporangióforos (Gooday, 1973).

#### **- Ciclo de vida sexual**

Garantiza la recombinación de material genético de las cepas que participan en el proceso, asegurándose así la variabilidad genética de la especie. Tiene lugar cuando se encuentran dos hifas de diferente tipo sexual. Esta aproximación inhibe



la formación de esporangióforos, induce la formación de  $\beta$  -caroteno, y la diferenciación de las hifas sexuales denominados zigóforos. Los zigóforos se fusionan por pares, normalmente por sus ápices, y dan lugar a los promegatangios que presentan un septo subapical que los separa del resto de cada hifa sexual. Los dos gametangios presentan poros en la pared que los separa. Esta pared sigue degenerando y se produce una mezcla de citoplasma de ambos gametangios por un fenómeno conocido como plasmogamia. Se forma una estructura rodeada por una pared gruesa y ornamentada en la que se depositan compuestos como la esporolenina un polímero de carotenoides oxidados (Gooday y col. 1973) y melanina, que actúan protegiendo a la zigospora. En ella se produce la fusión de núcleos de distinto tipo sexual. La mayor parte de los núcleos englobados no se fusionan y degeneran. Sólo algunos se fusionan y de los cuatro productos meióticos, sólo uno sobrevive. Tras un período de latencia, variable según la especie, la zigospora germina dando lugar a un germosporangio. Este germosporangio contiene los productos de la meiosis, las germosporas, que pueden iniciar un nuevo ciclo de crecimiento. En el caso de *M. circinelloides* la interacción sexual y formación de zigosporas se pueden llevar a cabo de forma eficaz en el laboratorio aunque nunca se ha observado la germinación de las zigosporas (Martínez, 2014) (Figura 5 y 6).

*M. circinelloides* se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de distintos procesos biológicos, como es la síntesis de metabolitos secundarios, dimorfismo, respuesta a la luz, síntesis de lípidos y silenciamiento génico. Contiene un genoma pequeño de 36.6 megabases (*M.circinelloides* CBS 277. 49 <http://genome.jgi-pfs.org/Mucci2/Mucci2.home.html> ) que incluye 11.719 genes y le confiere un manejo fácil y rápido crecimiento en el laboratorio. Su ventaja principal es la existencia de un sistema eficaz de transformación genética que permite la introducción de DNA exógeno dentro del hongo (Van Hesswijk, 1984; van Hesswijk y Roncero, 1984; Gutiérrez y col. 2011).

Con esta finalidad se han desarrollado vectores que portan, como marcadores seleccionables genes que complementan mutaciones auxotróficas presentes en

distintas especies de *M. circinelloides* (Roncero y col. 1989; Anaya y Roncero, 1991; Benito y col. 1995). Estos vectores son autoreplicativos y requieren de presión selectiva para su mantenimiento dentro del hongo.

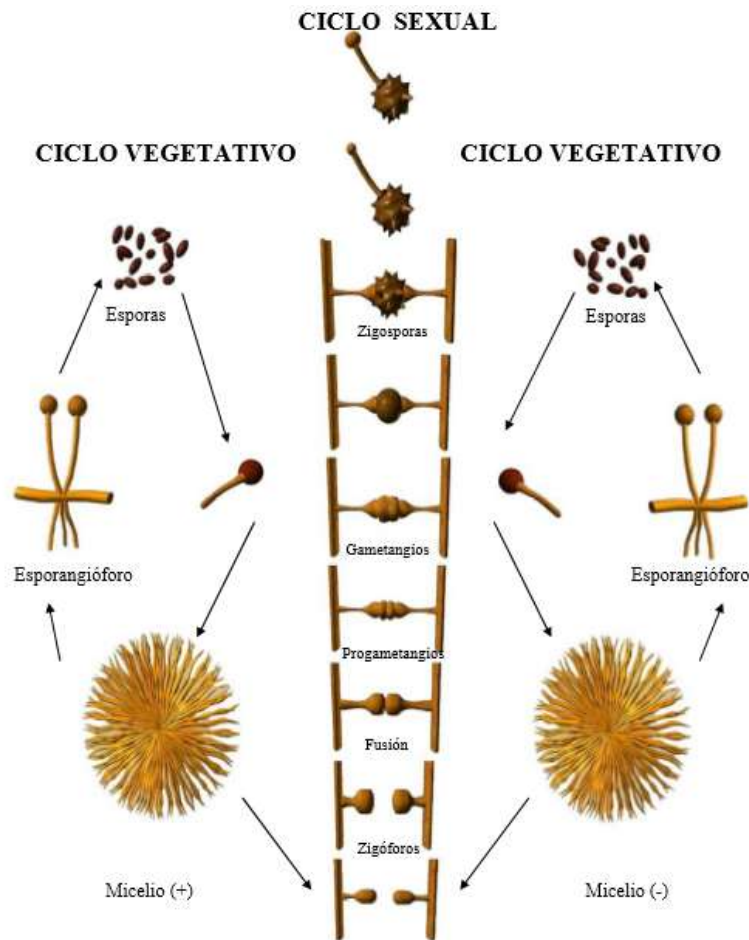


Figura 5. Ciclo de Vida sexual de *Mucor circinelloides*

**Figura 5. Ciclo de Vida sexual de *Mucor circinelloides*.** Los zigóforos se fusionan por pares dando lugar a los promegatangios, los dos gametangios poseen una pared que continua degenerándose hasta formar una mezcla de citoplasma de ambos gametangios, se forma una estructura en la cual se depositan compuestos como melanina y esporolenina que protegen la zigospora en ella se fusionan los núcleos de diferente tipo sexual, solo se fusionan algunos y de los cuatro productos meióticos solo uno sobrevive. Tras un periodo de latencia la zigospora germina originando un germosporangio que contiene germosporas

con la capacidad de originar un nuevo ciclo de crecimiento. Imagen tomada de (Martínez, 2014).

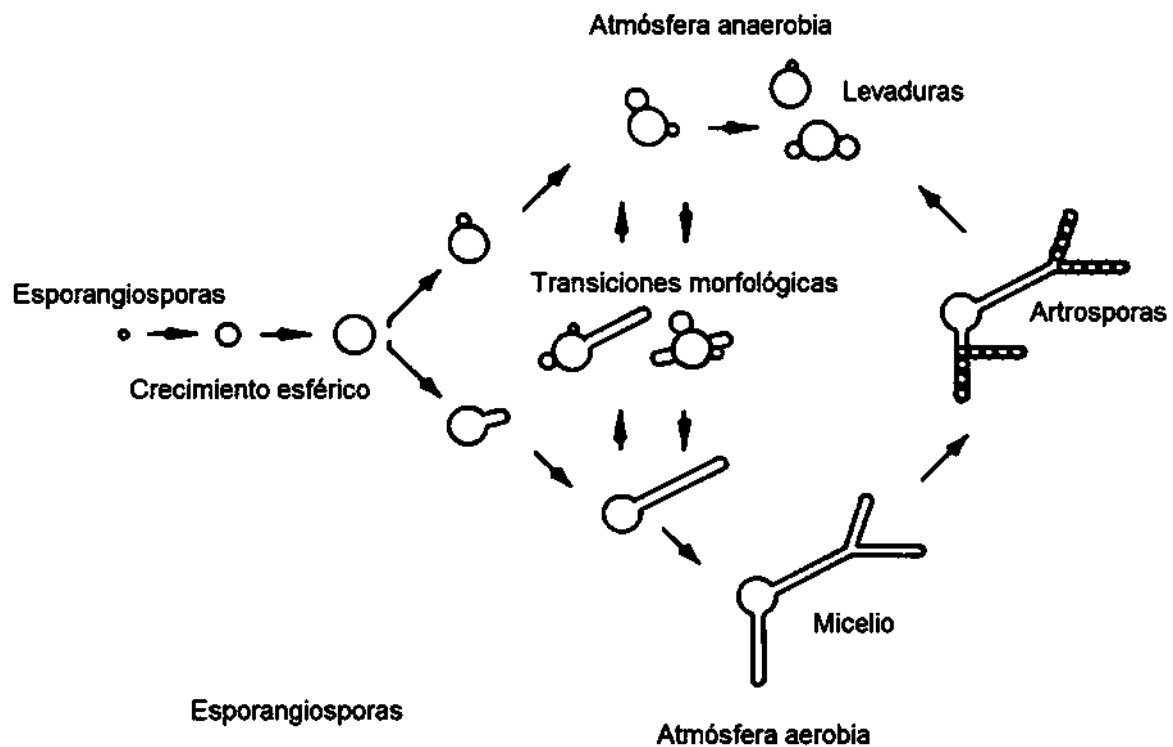


Figura 6. Ciclo asexual de *Mucor circinelloides* en cultivo líquido.

**Figura 6. Ciclo asexual de *Mucor 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. Modificando las condiciones atmosféricas intercambios entre las morfologías de levadura y micelio son posibles de este modo el cambio de condiciones aérobicas a anaeróbicas conduce a que el micelio produzca levaduras y el cambio de anaerobiosis a aerobiosis conduce a la formación de micelio a partir de levaduras (**Modificada de Orlowski, 1991**).

La capacidad que presenta *M. circinelloides* para ser transformado ha permitido el surgimiento de procedimientos para la integración, por recombinación homóloga de fragmentos lineales de DNA en sus cromosomas, permitiendo así la generación de mutantes nulos por desplazamiento génico (Navarro y col. 2001).

El conjunto de herramientas moleculares descritas con anterioridad ha convertido a *M. circinelloides* en la especie, dentro del subphylum Mucoromycotina con el mayor número de recursos para analizar la función génica. A pesar de no encontrarse establecidas aun las condiciones de laboratorio ideales para llevar a cabo cruzamientos genéticos (Vicente y col. 2009; Vicente y col. 2010).

Aunque *M. circinelloides* se ha utilizado como modelo de estudio de diversos procesos biológicos, uno de los que más interés ha generado recientemente es la patogénesis. Como se ha descrito anteriormente *M. circinelloides* ha sido identificado como un patógeno oportunista humano, agente causal de una enfermedad infecciosa extraña pero letal denominada mucormicosis (Alvarez y col. 2009).

Estudios recientes indican un incremento significativo de la mucormicosis debido al aumento en la población de pacientes inmunodeprimidos como consecuencia del SIDA, diabetes mal controlada, enfermedades hematológicas, trasplantes de órganos o de células hematopoyéticas. Una de las principales preocupaciones relacionadas con la mucormicosis es la alta tasa de mortalidad que presenta, aproximadamente un 50% en general, pero más del 90% en los casos de infecciones diseminadas. El coste económico previsto para los daños causados por mucormicosis por el sistema de salud de EE.UU se aproxima a los \$100.000 por caso (Martínez, 2014). Y, sin embargo, se sabe muy poco sobre la patogénesis de los Mucorales, comparado con otros hongos patógenos y repercute en la falta de tratamientos farmacológicos efectivos. La elevada virulencia y la mortalidad de la mucormicosis han hecho que se centre la atención en *M. circinelloides* para el estudio de nuevas dianas terapéuticas. Recientemente y empleando modelos heterólogos (larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y ratones), se ha demostrado una relación entre el tamaño de la espora

y la virulencia: las esporas más grandes presentan mayor virulencia que las pequeñas (*Li y col. 2011*). Las esporas de mayor tamaño comienzan a formar sus hifas invasivas inmediatamente después de la fagocitosis por las células inmunes del hospedador, escapando así al sistema inmune, mientras que las esporas más pequeñas presentan un largo periodo de crecimiento isotrópico antes de poder germinar, esto hace que sean neutralizadas por los macrófagos (*Li y col. 2011*).

## **Justificación**

*Mucor circinelloides* es un hongo patógeno oportunista que infecta a paciente inmunosuprimidos generando un porcentaje de decesos del 60% en pacientes inmunosuprimidos diagnosticados con mucormicosis. Además, se ha demostrado que las proteínas Arf están involucradas en el la virulencia en otros sistemas fúngicos.

El producto de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* participan en el crecimiento de dicho organismo. Por lo que es de nuestro interés saber si el metabolismo de las proteínas Arf de *M. circinelloides* está implicado en la virulencia de este organismo.

### **III. Hipótesis**

Los productos de los genes *arf3* y *arf4* están implicados en el aumento de la virulencia de *Mucor circinelloides*.

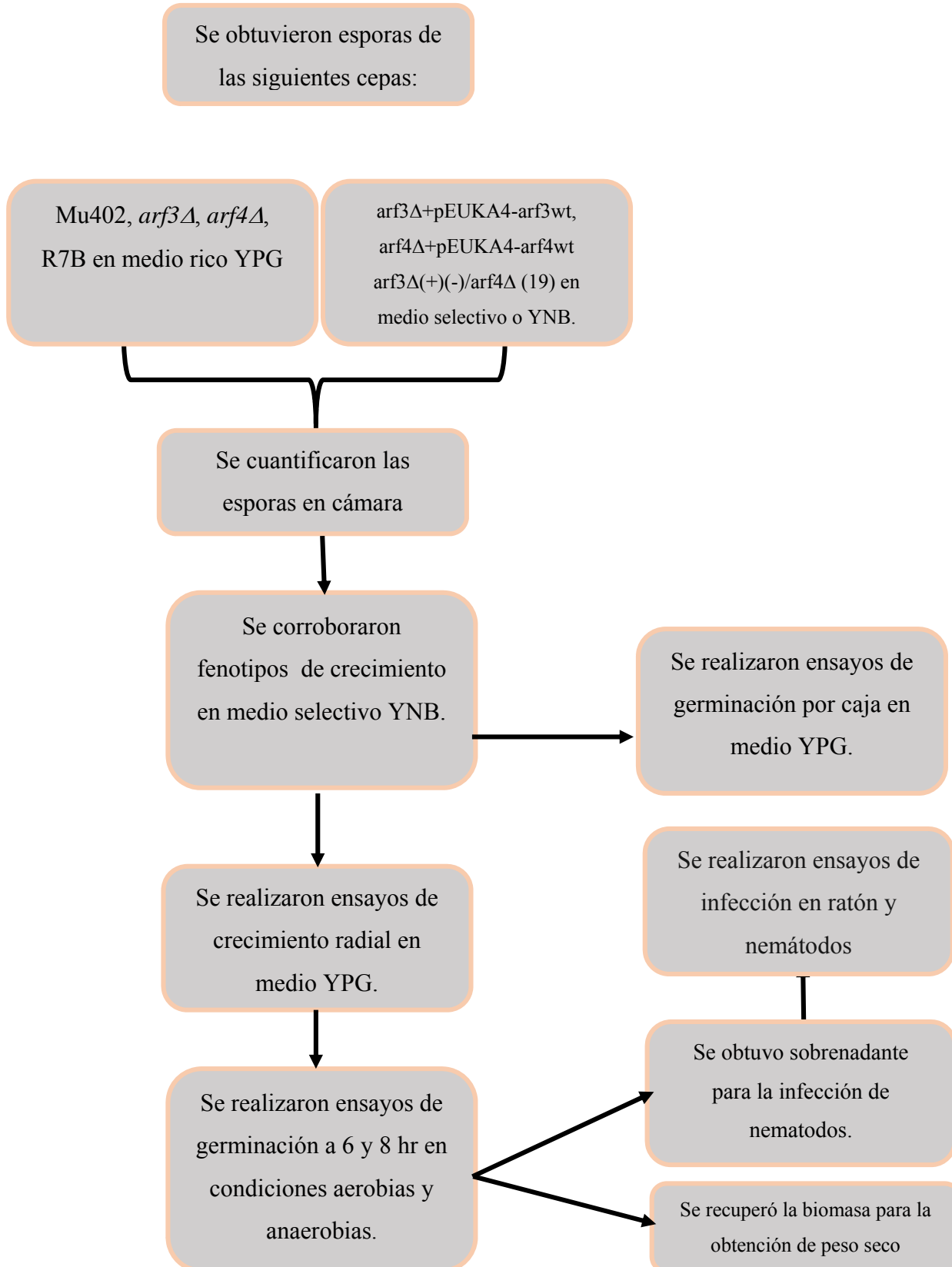
### **IV. Objetivo General**

Demostrar la participación del producto de los genes *arf3* y *arf4* en la virulencia de *Mucor circinelloides*.

#### **4.1 Objetivos Particulares**

1. Analizar el crecimiento de las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*
2. Evaluar la virulencia de las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*.

## V. Metodología experimental General





## **VI. Materiales y Métodos**

### **6.1 Cultivo de *Mucor circinelloides***

#### **6.1.2 Condiciones generales de crecimiento de *M. circinelloides***

*M. circinelloides* se cultivó a 28°C en medio nutritivo YPG, constituido por 3 g de extracto de levadura, 10 g de peptona de gelatina y 20 g de glucosa disueltos en 1 L (*Bartnicki-García. 1968*) o en medio selectivo YNB (BD Bioscience). Cuando fue necesario, antes de esterilizar, el medio selectivo YNB se adicionó uracilo (0.2 mg/mL).

#### **6.1.3 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides***

Se inocularon con 100 esporas de *M. circinelloides* en placas de Petri con medio YPG sólido y se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas fueron colectadas agregando 7 mL de H<sub>2</sub>O sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas fueron aspiradas y depositadas en un tubo de 50 mL. Las esporas fueron concentradas al centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas con H<sub>2</sub>O destilada estéril y centrifugadas de la misma manera. Las esporas fueron resuspendidas en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocitómetro o cámara de Neubauer (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika), depositando 15 µL en la parte superior y 15 µL en la 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  $2.5 \times 10^3$  y el resultado obtenido expresó las esporas por mililitro de la muestra. Las esporas fueron conservadas a 4°C y empleadas en un máximo de 15 días después de su obtención.

## **6. 1 Cepas de *M. circinelloides* empleadas**

Para la realización de este trabajo fueron empleadas cepas de *M. circinelloides*, las cepas con el prefijo MU han sido obtenidas en la Universidad de Murcia y derivan de la cepa MU402 (*leuA*<sup>-</sup>,*pyrG*<sup>-</sup>), la cepa se generó por mutagénesis química a partir de la estirpe R7B (*leuA*<sup>-</sup>), a su vez la cepa R7B, silvestre para la carotenogénesis y auxótrofa para la leucina, fue obtenida mediante mutagénesis química a partir de la cepa silvestre sexo (-) CBS 277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b; Schipper, 1976). También las cepas homocariontes *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  homocariontes que fueron obtenidas por mutagénesis dirigida por eventos de recombinación homóloga (Maldonado-Herrera, 2015). Se incluyeron además las cepas *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt y *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt (Maldonado-Herrera, 2015). Y las cepas *arf3* $\Delta$ <sup>(+)(-)</sup>/*arf4* $\Delta$  (9) y *arf3* $\Delta$ <sup>(+)(-)</sup>/*arf4* $\Delta$ (19) (Maldonado-Herrera, 2015). De la misma manera se trabajó con la cepa Mu402*pyrG* obtenida por inserción al genoma del gen *pyrG* silvestre a la cepa Mu402 (Donada por el Dr. Victoriano Garre, Universidad de Murcia , España).

## **6.2 Crecimiento en aerobiosis de *M. circinelloides***

Para la realización de los ensayos de crecimiento en condiciones aeróbicas así como en anaerobiosis fueron inoculadas 5x10<sup>5</sup> esporas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentoso o aerobio se utilizaron matraces de 125 mL usando 20 mL de medio, los cuales se incubaron a 28°C mantenidos en agitación constante de 200 rpm.

## **6.3 Obtención de sobrenadante en aerobiosis de *M. circinelloides***

Para la obtención del sobrenadante fue necesario montar los ensayos explicados con anterioridad, y mantenerlos en crecimiento por 8 y 12 horas, transcurrido el tiempo los matraces se extraían del sistema de crecimiento y bajo campana de extracción se decantaba el cultivo en tubos Falcón de 50 mL estériles, y se llevaba a centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos, esto para garantizar que el sobrenadante se encontrara libre de esporas.

## **6.4 Análisis de Imágenes**

Se empleó un microscopio Olympus CKX41 para capturar las imágenes correspondientes a las morfologías obtenidas a los diferentes tiempos de crecimiento, fueron tomadas usando el objetivo 40X, también se utilizó una cámara Panasonic DMC-T25

## **6.5 Medios de cultivo**

### **6.5.1 YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)**

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon), 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, y 0.02 gr de uracilo (BD Bioxon).

### **6.5.2 YNB (Yeast Nitrogen casaminoácidos, Agar)**

Cada litro contenía 20 g de Glucosa, 20 g de Agar de Extracto de levadura, 6.7 g de Yeast Nitrogen casaminoácidos, 0.02 g de uracilo, 2.5 mL de Leucina al 2% para la preparación de medio sólido se añade agar (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Cuando fue necesario, tras esterilizar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

**Tabla 1. Cepas empleadas de *Mucor circinelloides*.**

Tabla 1. Cepas empleadas de *Mucor circinelloides*.

Cepa	Genotipo
<b>R7B (ATCC 90680)</b>	Cepa derivada de la cepa ATCC 1216b, <i>leuA</i> <sup>-</sup> (Roncero y col. 1989).
<b>MU402</b>	Derivada de la cepa R7B, <i>leuA</i> <sup>-</sup> , <i>pyrG</i> <sup>-</sup> (Nicolás y col. 2007).
<b>arf3<math>\Delta</math></b>	Cepa homocariote derivada de MU402 obtenida por mutagénesis dirigida por evento de recombinación homóloga en el gen <i>arf3</i> (Maldonado-Herrera. 2015).
<b>arf4<math>\Delta</math></b>	Cepa homocariote derivada de MU402 obtenida por mutagénesis dirigida por eventos de recombinación homóloga en el gen <i>arf4</i> (Maldonado-Herrera. 2015).
<b>arf3<math>\square</math>+pEUKA4-<i>arf3</i>wt</b>	Cepa derivada de <i>arf3</i> $\Delta$ transformada con el gen silvestre <i>arf3</i> en el plásmido pEUKA4 (Donada amablemente por el grupo del Dr. Victoriano Garre, Murcia, España).
<b>arf4<math>\square</math>+pEUKA4-<i>arf4</i>wt</b>	Cepa derivada de <i>arf4</i> $\Delta$ transformada con el gen silvestre <i>arf4</i> en el plásmido pEUKA4 (donada amablemente por el grupo del Dr. Victoriano Garre, Murcia, España).
<b>arf3<math>\Delta</math><sup>(+)(-)</sup>/<i>arf4</i><math>\Delta</math> (19)</b>	Cepa derivada de la mutante homocariote <i>arf4</i> $\Delta$ , como mutación heterocariote en el gen <i>arf3</i> (Donada amablemente por el grupo del Dr. Victoriano Garre, Murcia, España).
<b>MU402PyrG</b>	Derivada de MU402 obtenida por inserción al genoma del gen <i>pyrG</i> silvestre a la cepa Mu402 (Donada amablemente por el grupo del Dr. Victoriano Garre, Murcia, España).

### **6.5.3. Ensayos de virulencia en *Caenorhabditis elegans***

Se transfirió 1 mL de los distintos sobrenadantes de cultivos previamente crecidos de *M. circinelloides*, a cada uno de los pozos de placas de 24 pozos (Corning). Mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75) los nematodos (10-20) fueron transferidos con un “picker” a cada uno de los pozos utilizados. Para los ensayos de virulencia con esporas de las distintas cepas de *M. circinelloides*, se colocaron 1 mL (con la cantidad de esporas a probar: 1,000 o 10,000 esporas) resuspendidas en medio Lee, con o sin leucina dependiendo de la cepa utilizada, y posteriormente se colocaron de 10 a 20 nematodos por pozo. En todos los ensayos de virulencia los nematodos fueron observados mediante un microscopio estereoscópico cada 12 horas por un tiempo no mayor a 48 horas. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo, es cuando éste permanece inmóvil a la estimulación física.

### **6.5.4. Ensayos de virulencia en *Mus musculus***

Se utilizaron ratones machos Balb/c sanos de aproximadamente 10-12 semanas, a los cuales se inocularon con 300  $\mu$ L de solución salina vía intraperitoneal conteniendo  $5 \times 10^6$  esporas con una jeringa de insulina 27G x  $\frac{1}{2}$  in., de 1 mL marca BD. Los animales se mantuvieron en observación por aproximadamente 15 días post-inoculación. Se realizó cada ensayo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, tanto en su cuidado como en su manejo. Se reportó el peso de los animales así como su fallecimiento cada 24 horas durante todo el transcurso del experimento.

### **6.5.5. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. Además, la prueba post hoc empleada fue Bonferroni para determinar la participación de la ausencia del gen *adh1*, las diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) se muestran con asteriscos. Para los ensayos de virulencia, la significancia de datos de tasa de mortalidad fue evaluada usando curvas de supervivencia Kaplan- Meier con el software de estadística PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).



## VII.Resultados

### 7.1 Corroboración de fenotipos de las cepas de *M. circinelloides* usadas en este trabajo

Para comprobar que las cepas utilizadas mostraran el fenotipo previamente reportado, se realizó la inoculación de 50 esporas medio no selectivo YPG sólido con uracilo, así como en medio selectivo YNB sin aminoácidos. Las cajas ya inoculadas se incubaron a 28°C, y finalmente se tomaron fotografías a las 24 horas de crecimiento (**Figura 7**). Todas las cepas crecieron en el medio no selectivo (YPG), mientras que únicamente las cepas  $arf3\Delta+pEUKA4-arf3wt$ ,  $arf4\Delta+pEUKA4-arf4wt$  y  $arf3\Delta^{(+)(-)}/arf4\Delta$  (19) crecieron en el medio selectivo (YNB), debido a la presencia de los dos marcadores de selección (*pyrG* y *leuA*) en estas tres cepas.

El gen *pyrG* silvestre restaura la prototrofia a uracilo, y el gen *leuA* está presente en el plásmido usado para complementar con dicho gen silvestre a cada una de las cepas mencionadas. Además en la cepa doble mutante se usó el gen *leuA* para interrumpir el gen *arf3* en el fondo genético  $arf4\Delta$ . Por lo tanto, los fenotipos que se observaron son los esperados en las cepas estudiadas.

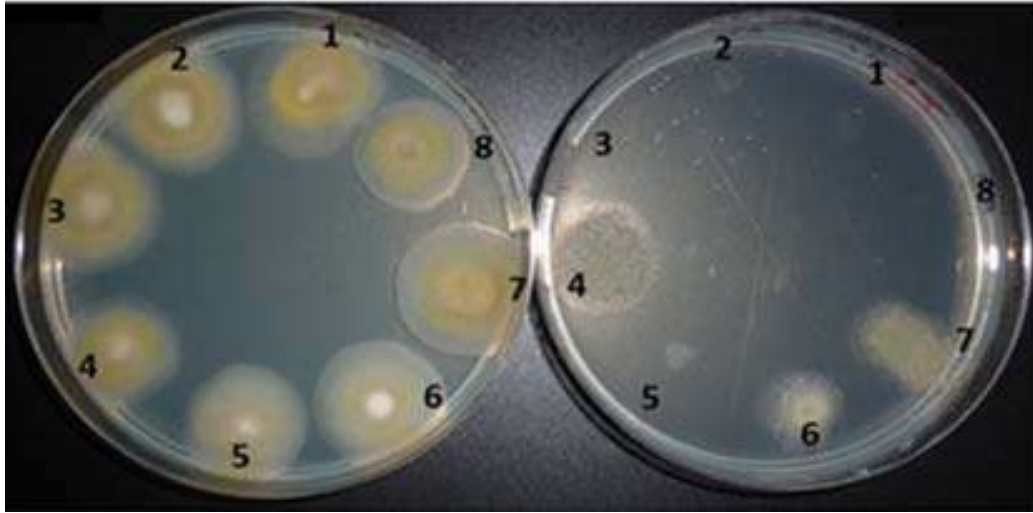


Figura 7. Corroboración de las auxotrofias de las cepas de *M. circinelloides* usadas en este trabajo

**Figura 7.** Corroboración de las auxotrofias de las cepas de *M. circinelloides* usadas en este trabajo. Fueron inoculadas 50 esporas en medio YPG suplementado con uracilo 200 µg/mL sólido (izquierda) y medio selectivo o YNB (derecha), e incubadas en presencia de luz a 28°C. 1) MU402; 2) *arf3*Δ; 3) *arf4*Δ; (4) *arf3*Δ(+)(-)/*arf4*Δ (19); 5) *arl1*; 6) *arf3*Δ+pEUKA4-*arf3*; 7) *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*; 8) R7B. Se registró el crecimiento a las 24 horas; todas las cepas crecieron en medio YPG, mientras que medio selectivo (YNB) solo crecieron las cepas: (4) *arf3*Δ(+)(-)/*arf4*Δ (19); (6) *arf3*Δ+pEUKA4-*arf3*wt y (7) *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*wt.



## 7.2 Crecimiento radial de las cepas de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de demostrar la participación de los genes *arf3* y *arf4* en el crecimiento de *M. circinelloides*, se realizó un ensayo de crecimiento radial, para lo cual se inocularon 100 esporas en placas de medio YPG más uracilo, el crecimiento radial fue determinado cada 24 horas a lo largo de 5 días.

Las cepas mutantes en los genes *arf3* ( $23 \pm 1$  mm) y *arf4* ( $24 \pm 0.5$  mm) crecieron de forma similar respecto a la cepa silvestre MU402 ( $22 \pm 1$  mm) a los 2 días de incubación. Sin embargo al mismo tiempo de incubación, el crecimiento presentado por las cepas mutantes complementadas fue menor *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt ( $19 \pm 2$  mm) y *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt ( $13 \pm 1.5$  mm), respecto a las cepa silvestre y sus respectivas mutantes. Mientras que la cepa doble mutante *arf3* $\Delta$ (+)(-)/*arf4* $\Delta$ (19) creció ( $25 \pm 1$  mm) ligeramente más respecto a las cepas *arf3* $\square$ , *arf4* $\square$  y MU402 y mostró diferencia significativa respecto al crecimiento que presentaron las cepas complementadas.

Por lo tanto, la pérdida de función de los genes *arf3* y *arf4*, disminuyó el crecimiento de las mismas (**Figura 8**). Así mismo, esta diferencia se mantuvo a lo largo del experimento pudiendo observar nuevamente un diámetro de crecimiento de  $77 \pm 1$  y  $75 \pm 1$  mm respectivamente a diferencia de la cepa parental MU402 que presentó un diámetro de  $80 \pm 1$  mm (**Figura 9**).

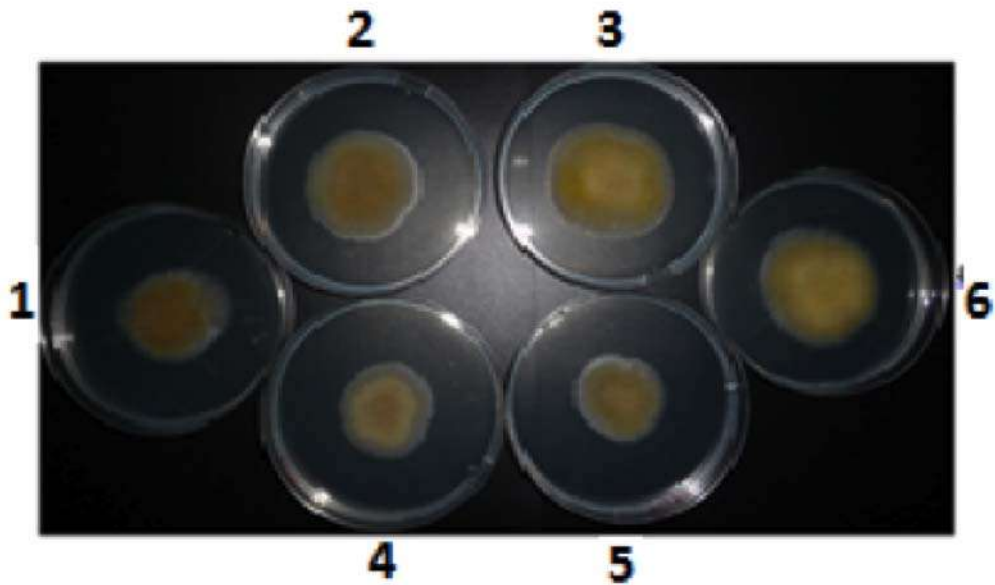


Figura 8. Crecimiento radial de las cepas de *M. circinelloides* al día 2 de crecimiento.

**Figura 8. Crecimiento radial de las cepas de *M. circinelloides* al día 2 de crecimiento.** Fueron inoculadas 100 esporas e incubadas en luz a 28°C en medio YPG, uracilo 200 µg/mL sólido. **1)** MU402; **2)** *arf3*Δ ; **3)** *arf4*Δ; **4)** *arf3*Δ<sup>(+/-)</sup>/*arf4*Δ (19) ; **5)** *arl1*; **6)** *arf3*Δ+pEUKA4-*arf3*; **7)** *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*; **8)** R7B. Se puede observar un menor crecimiento en las cepas complementadas *arf3*Δ+pEUKA4-*arf3*wt y *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*wt respecto a las mutantes en los genes *arf3* y *arf4*. N=4.

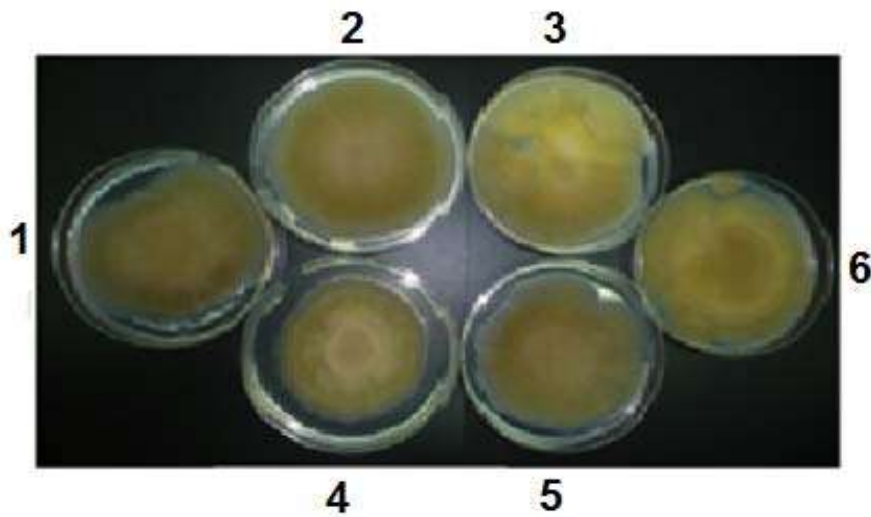


Figura 9. . Crecimiento radial de las cepas de *M. circinelloides* al día 5 de crecimiento.

**Figura 9. Crecimiento radial de las cepas de *M. circinelloides* al día 5 de crecimiento.** Imagen representativa del de crecimiento radial al 5 día de crecimiento donde puede observarse que el menor crecimiento por parte de las cepas complementadas respecto a las mutantes, se puede observar que el efecto mantiene a lo largo de los 5 días. **1)** MU402; **2)** *arf3Δ* ; **3)** *arf4Δ*; **4)** *arf3Δ<sup>(+/-)</sup>/arf4Δ* (19) ; **5)** *arl1*; **6)** *arf3Δ+pEUKA4-arf3wt*; **7)** *arf4Δ+pEUKA4-arf4wt*; **8)** R7B.

### **7.3 Efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* en la producción de esporas de las cepas de *M. circinelloides*.**

Con la finalidad de determinar si las mutaciones realizadas en los genes *arf3* y *arf4* tenía efecto sobre la cantidad de esporas producidas, se realizó un ensayo de esporulación, para lo cual se inocularon 100 esporas en placas de medio YPG más uracilo, se mantuvieron en incubación a 28°C a lo largo de 6 días, a continuación se recolectaron las esporas y se contaron empleando cámara de Neubauer dicha cantidad fue multiplicada por el factor de  $2.5 \times 10^3$  y el resultado obtenido expresó las esporas por mililitro de la muestra.

Se determinó una menor producción de esporas (alrededor de un 50-60% menos) en las cepas mutantes en los genes *arf3* ( $5.6 \pm 0.05 \times 10^6$ ) y *arf4* ( $7.5 \pm 0.02 \times 10^6$  esporas) respecto a la cepa parental MU402 ( $16.3 \pm 0.02 \times 10^6$ ) esporas. Por otra parte, la cantidad de esporas producidas por las cepas mutantes complementadas *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt ( $5.8 \pm 0.02 \times 10^6$ ) esporas y *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt ( $5.9 \pm 0.02 \times 10^6$  esporas) fue menor respecto a las cepa silvestre, mientras que la diferencia en la producción de esporas entre las cepas *arf3* $\square$  y *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt no resultó diferente de forma significativa, por otra parte la esporulación de *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt respecto a la cepa *arf4* $\Delta$  fue notablemente menor en la cepa complementada. Por otra parte la cepa doble mutante produjo ( $7.4 \pm 0.02 \times 10^6$  esporas) significativamente menor respecto a la cepa silvestre MU402, comportándose como la cepa mutante *arf4* $\square$  (**Figura 10**).

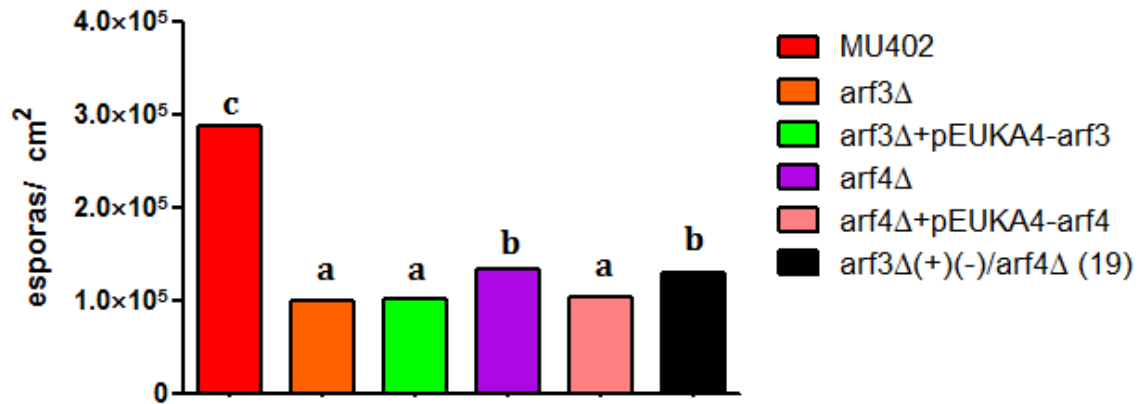


Figura 10. Producción de esporas por las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*.

**Figura 10. Producción de esporas por las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*.** Fueron inoculadas 100 esporas incubadas en luz a 28°C en medio YPG solido suplementado con uracilo 200 µg/mL y cosechadas al 5 día. Los resultados se graficaron mostrando en el eje de las Y el número de esporas obtenidas por caja de cada una de las cepas. N=4. Las barras representan el error estándar. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, Fisher p<0.05). tu grafica no tiene barra de dispersión.

## 7.4 Efecto de las mutaciones en los genes *arf* en la germinación de las esporas de *M. circinelloides* bajo condiciones aerobias.

Con el objetivo de conocer si las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* influye en el proceso de germinación de las mismas, se inocularon 10,000 esporas/mL de las cepas en 10 mL de medio YPG suplementado con uracilo; los matraces se llevaron a agitación y fue contabilizado el porcentaje de germinación a las 4 y 6 horas para cada una de las cepas analizadas. Las mutación en los genes *arf3* y *arf4* afectan positivamente la germinación de las esporas con un 46 y 42%, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre MU402 solo mostró un 14%; mientras que las cepas complementadas *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt y *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3* resultaron en 5% y 2%, respectivamente, en contraste con la cepa *arf3* $\Delta^{(+/-)}$ /*arf4* $\Delta$  (19) (42% esporas germinadas) que mostró un porcentaje de germinación similar al de las cepas *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  a las 4 horas del experimento.

Transcurridas las 6 horas de crecimiento, las esporas de todas las cepas mutantes alcanzaron mas del 90% de germinación, *arf3* $\Delta$  (99%), *arf4* $\Delta$  (95%) y *arf3* $\Delta^{(+/-)}$ /*arf4* $\Delta$  (19) (99%), Valores similares a los de la cepa silvestre (99%). Mientras que las cepas complementadas mostraron una menor germinación al mismo tiempo analizado, *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt (63%), siendo mas dramático para la cepa *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt (2%) quien mantuvo un significativa disminución de la germinación.

Con lo anterior podemos afirmar que la mutación en los genes *arf3* y *arf4* afecta significativamente y de manera negativa la germinación, y que las cepas complementadas *arf3* $\Delta$ +pEUKA4-*arf3*wt y *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt en términos generales retrasan la germinación aun mas respecto alas cepas mutantes *arf3* $\square$  y *arf4* $\square$  (**Figura 11**).

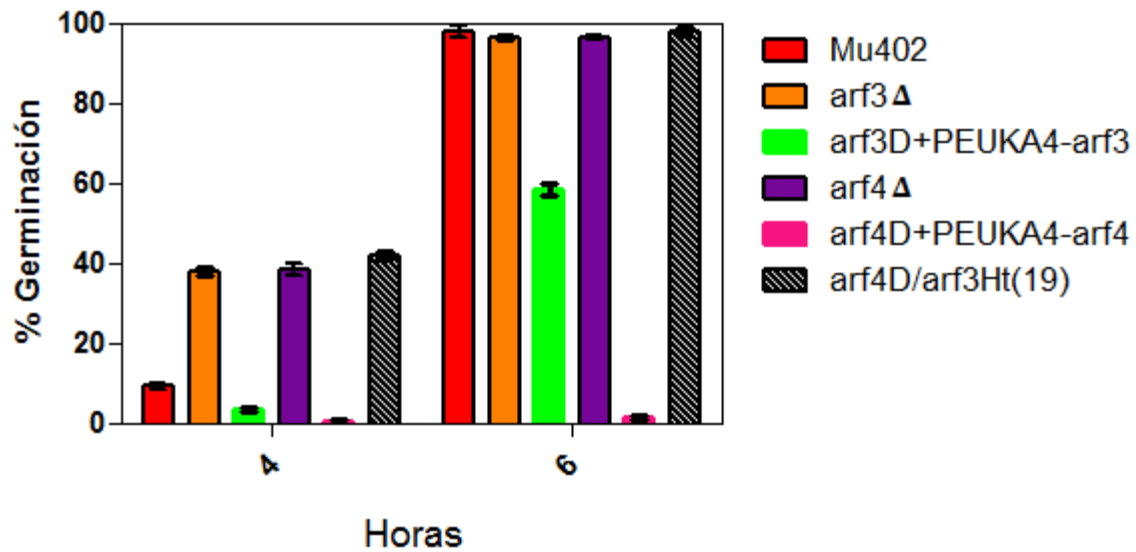


Figura 11. . Efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* en la producción de las esporas de *M. circinelloides*.

**Figura 11. Efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* en la producción de esporas de *M. circinelloides*.** Se inocularon 10,000 esporas/mL de las distintas cepas en 10 mL de medio YPG suplementado con uracilo, posteriormente los matraces se llevaron a agitación y fueron registrados los porcentajes de esporas germinadas a las 4 y 6 horas de crecimiento. N= 3

## 7.5 Efecto de las mutaciones en los genes *arf* en la generación de biomasa en aerobiosis de *M. circinelloides*.

Para determinar si existía afectación durante el crecimiento bajo condiciones aerobias, se realizó una curva de crecimiento en medio YPG líquido suplementado con uracilo 200 µg/mL, inoculando  $5 \times 10^5$  esporas /mL. Finalmente la biomasa fue cuantificada en gramos por cada 100 mL de medio al final de las 12 horas de crecimiento, la gráfica muestra que independientemente del fondo genético todas la cepas exceptuando *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*wt generan un crecimiento celular sin diferencia significativa, aunque se desconoce el motivo por el cual la cepa complementada *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*wt genera una cantidad de biomasa menor en comparación al resto, se puede sugerir que se debe al estado de activación o inactivación de dicho gen (**Figura 12**).

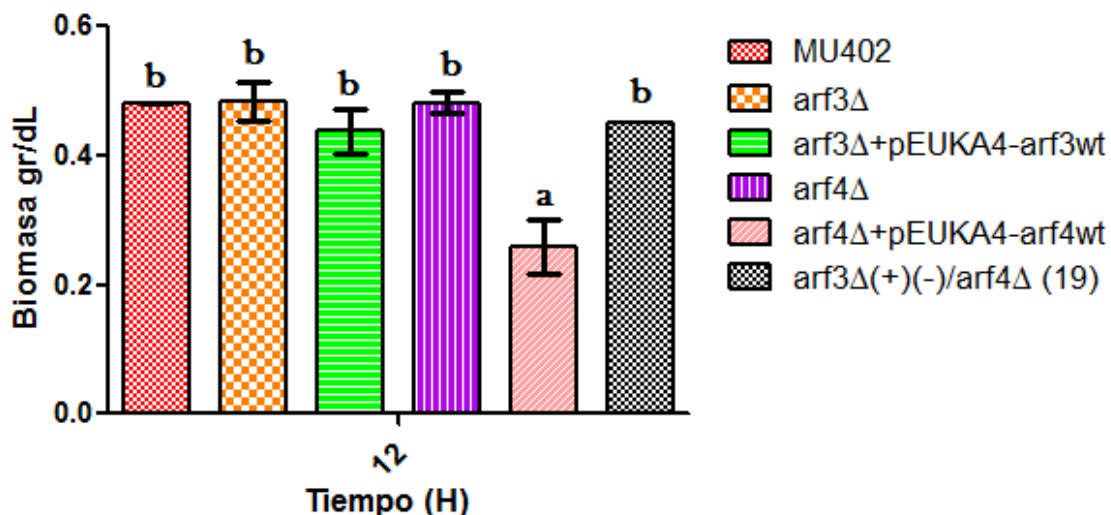


Figura 12. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sobre la biomasa generada en condiciones aerobias.

**Figura 12. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sobre la biomasa generada en condiciones aerobias.**  $5 \times 10^5$  esporas /mL esporas de las cepas mencionadas se inocularon en medio líquido YPG suplementado con uracilo (200 µg/mL), la biomasa fue cuantificada en gramos por cada 100 mL de medio, a las 12 horas de crecimiento. N=4. Las barras representan el error estándar. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, Fisher  $p < 0.05$ ).



## 7.6 Efecto de las mutaciones de los genes *arf* sobre la morfología en aerobiosis de *M. circinelloides*

Para llevar a cabo este experimento se observó la morfología de la cepa parental, silvestre y complementadas al microscopio, en condición de germinación aeróbica a las 6 horas de germinación. Puntas de flecha indican la bifurcación de las hifas en encontrando una notable diferencia entre las cepas silvestre, mutantes  $arf3\Delta$  y  $arf4\Delta$  quienes estas últimas desarrollan una bifurcación en la punta de sus hifas en contraste con la cepa  $arf3\Delta+pEUKA4-arf3wt$  que presentan un menor desarrollo de las mismas, en el caso de la doble mutante  $arf3\Delta^{(+/-)}/arf4\Delta$  (19) podemos observar la presencia de bifurcación en sus hifas similar al de las mutantes sencillas, en el caso de la cepa  $arf4\Delta$  las hifas bifurcadas también se presentan en contraste con la cepa  $arf4\Delta+pEUKA4-arf4wt$  que a las 6 horas en germinación no presenta ningún cambio, es decir no germinan como se observó en la figura 11. (Figura 13)



Figura 13. . Efecto de las mutaciones de los genes *arf3* y *arf4* sobre la morfología en aerobiosis de *Mucor circinelloides*.

**Figura 13. Efecto de las mutaciones de los genes *arf3* y *arf4* sobre la morfología en aerobiosis de *M. circinelloides*.** Se muestran fotografías de germinación en aerobiosis, puntas de flecha indican la bifurcación de las hifas en las cepas mutantes. Fotos tomadas a las 6 horas de germinación aerobia. Medio YPG, uracilo 200 µg/mL líquido, 5X10<sup>5</sup> esporas/mL, N=4, Barra 20 µm.

## 7.7 Efecto de las mutaciones de los genes *arf* sobre la morfología en el esporangio de *M. circinelloides*

También se observó el desarrollo del esporangio al sexto día de crecimiento de las cepas en estudio bajo condiciones de luz, para esto fueron inoculadas en 50 esporas en medio YPG suplementado con uracilo (200 µg/mL), y llevadas a incubar tomando registro fotográfico del desarrollo del esporangio durante 6 días. Pudiéndose observar una ligera diferencia en la cepa *arf4*Δ+pEUKA4-*arf4*wt, la cual al parecer genera un esporangio más corto respecto a las demás cepas analizadas (**Figura 14**).

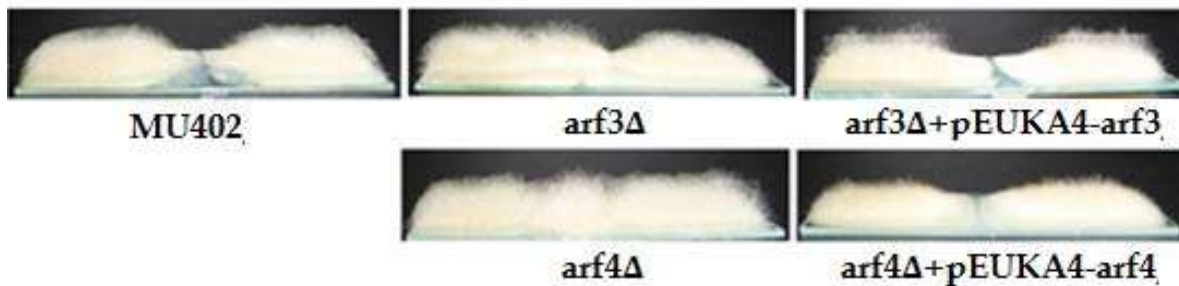


Figura 14. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* en el crecimiento del esporangioforo.

**Figura 14. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* en el crecimiento del esporangioforo.** Fueron inoculadas 50 esporas e incubadas en luz a 28°C en medio YPG, uracilo 200 µg/mL sólido se muestra una imagen representativa del desarrollo del esporangio al día 6 de crecimiento.

## 7.8 Efecto de las mutaciones de los genes *arf* en el crecimiento radial de *M. circinelloides*

Con la finalidad de conocer si el efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* influye en el crecimiento radial del mismo, se inocularon 50 esporas de las cepas en estudio sobre discos de YPG suplementado con uracilo, posteriormente se llevó a cabo el registro en cm del crecimiento de las mismas durante 4 días. La cepa *arf4* $\Delta$ +pEUKA4-*arf4*wt disminuyó su crecimiento radial en comparación con la cepa *arf4* $\Delta$ , por otra parte la cepa *arf4* $\Delta$  desarrollo más rápido un crecimiento radial respecto a la cepa silvestre en un 15 % desde el primer día que fue analizado (Figura 15).

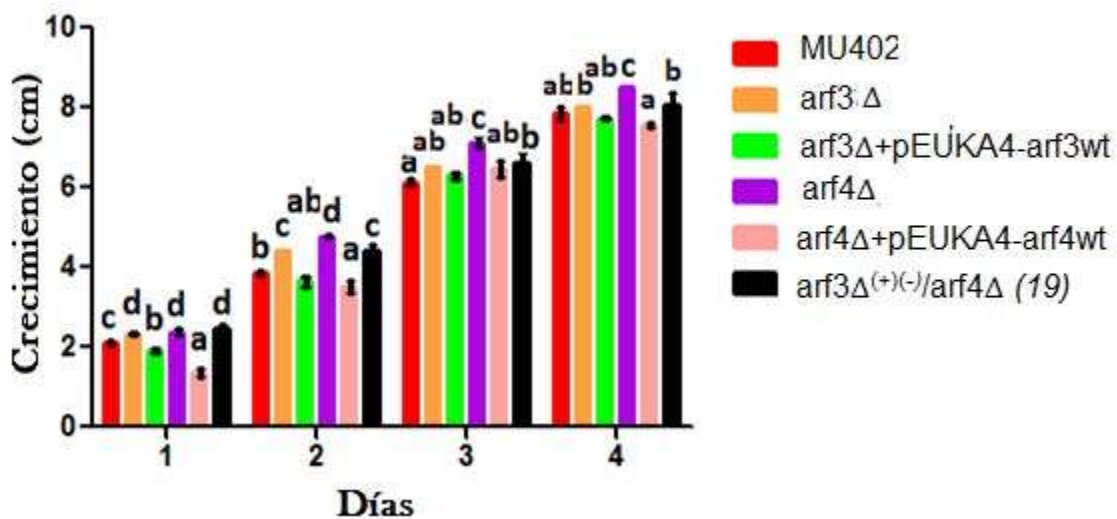


Figura 12. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento radial.

**Figura 15. Efecto de la mutación de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento radial.** Se inocularon 50 esporas por caja en medio sólido YPG suplementado con uracilo (200  $\mu$ g/mL) de las distintas cepas. El diámetro fue registrado durante 4 días de crecimiento. N=4. Las barras representan el error estándar. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, Fisher  $p < 0.05$ ).

## 7.9 Efecto del producto de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Mus musculus*.

Con el objetivo de conocer los niveles de virulencia de las cepas *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  de *M. circinelloides* sobre el modelo *Mus musculus* de la cepa Balb-c, se procedió a a inoculación vía intraperitoneal de  $1 \times 10^7$  esporas de las cepas MU402, *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  en ratones previamente pesados y distribuidos en grupos homogéneos. Posteriormente se realizó el monitoreo del peso durante 25 días post-infección para la realización de la curva de supervivencia, la cual evidenció que el porcentaje de supervivencia de la cepa *arf3* $\Delta$  (40%) es significativamente menor al porcentaje de supervivencia presentado en el grupo de individuos inoculados con la cepa *arf4* $\Delta$  (80% de supervivencia), mientras que el grupo infectado con la cepa parental MU402 (100% de supervivencia) no se presentaron decesos (**Figura 16**).

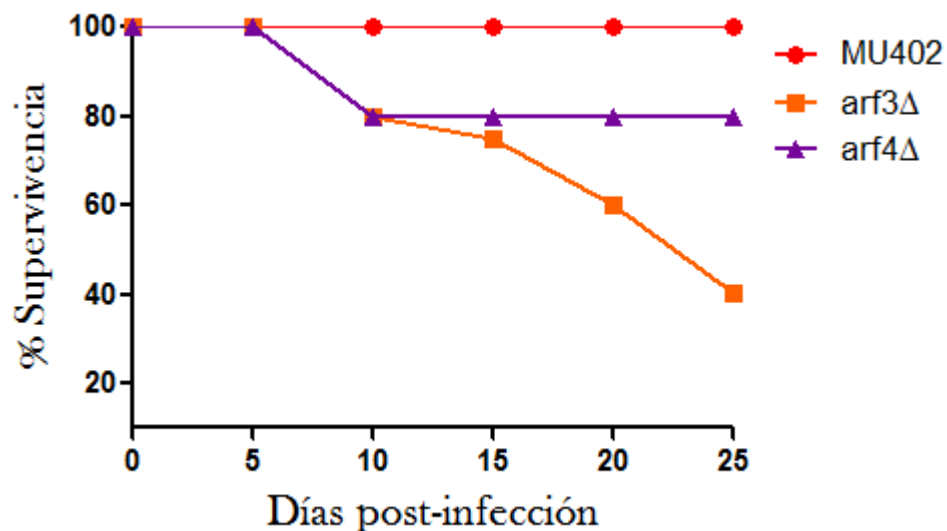


Figura 16. Efecto de las cepas mutantes *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Mus musculus*.

**Figura 16. Efecto de las cepas mutantes *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Mus musculus*.** Se usaron esporas de las distintas cepas de *M. circinelloides* (Mu402, *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$ ), tomándose registro del porcentaje de supervivencia a los 5, 10, 15, 20 y 25 días post-infección. N=7.

### 7.10 Efecto de los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* sobre el peso de *Mus musculus*.

Con la finalidad de conocer el efecto de las cepas MU402, *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  sobre el peso de los ratones, estas fueron inoculadas por vía intraperitoneal ( $1 \times 10^7$  esporas) de las cepas mencionadas en ratones Balb-c. Posterior a la inoculación se registró el peso durante 30 días y se generó una curva de pérdida de peso con la cual podemos concluir que el grupo inoculado con la cepa *arf3* $\Delta$  perdió un 48% de su peso inicial. Por otra parte, el grupo inoculado con la cepa *arf4* $\Delta$  presentó también una pérdida del 25% respecto al peso inicial, sin embargo a partir del día número 20-25 se pudo observar una ligera recuperación, caso contrario con el grupo inoculado con la cepa parental MU402 que no presentó pérdida de peso.

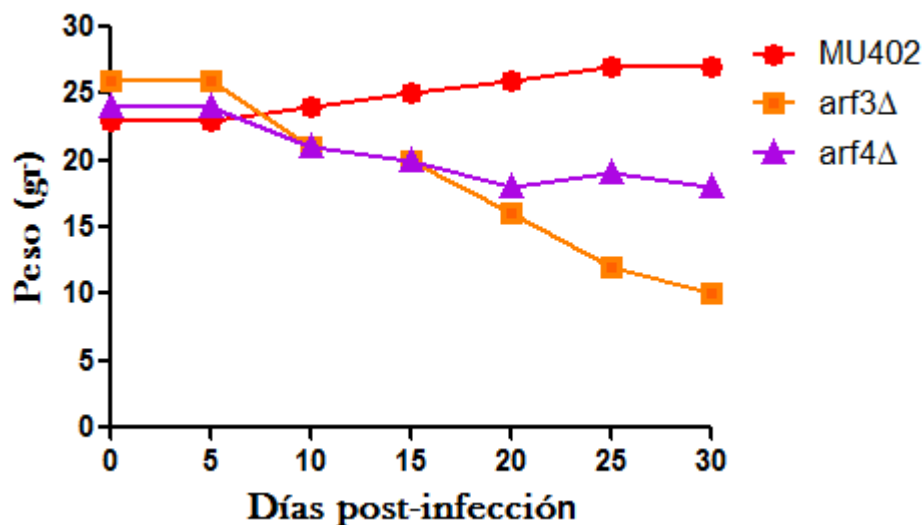


Figura 17. Efecto de las cepas *arf3* y *arf4* sobre el peso de ratones Balb-c.

**Figura 17.** Efecto de las cepas *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$  sobre el peso de ratones Balb-c. Se usaron esporas de las distintas cepas de *M. circinelloides* (Mu402, *arf3* $\Delta$  y *arf4* $\Delta$ ), tomándose registro del peso durante 30 días posterior a la infección. N=7.

### **7.11 Efecto del sobrenadante de cultivo micelial de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.**

Con la finalidad de conocer si el efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* influye en la virulencia de los sobrenadantes de las distintas cepas. Se mantuvieron en contacto los nematodos con el en medio Lee en donde previamente (2 horas) crecieron las distintas cepas. Posteriormente se obtuvo la curva de porcentaje de supervivencia versus horas post-infección, observándose que los nemátodos en contacto con los sobrenadantes de las cepas silvestre MU402 y la doble mutante  $arf3\Delta^{(+/-)}/arf4\Delta$  (19) mostraron un 80% de supervivencia a los 48 horas post-infección que duro el ensayo. En cambio, los nemátodos en contacto con los sobrenadantes de las cepas  $arf4\Delta$ ,  $arf4\Delta+pEUKA4-arf4wt$  y  $arf3\Delta+pEUKA4-arf3wt$  sobrevivieron en un 75%, mientras que los expuestos a la cepa  $arf3\Delta$  sobrevivieron en un 60% (**Figura 18**).

Estas observaciones indican que la mutación en el caso de la cepa complementada  $arf3\Delta+pEUKA4-arf3wt$  (75%) participa de manera positiva en la supervivencia de los nematodos, quizás por su menor crecimiento de dicha cepa. En contraste con la cepa  $arf3\Delta$  (60%) donde la ausencia del vector pEUKA4 con los genes silvestres causa un aumento en la virulencia de *M. circinelloides*.

Así como podemos observar que la mutación en la cepa  $arf3\Delta^{(+/-)}/arf4\Delta$  (19) presenta un comportamiento con menor grado de virulencia el mismo observado en la cepa parental MU402 (**Figura 18**).

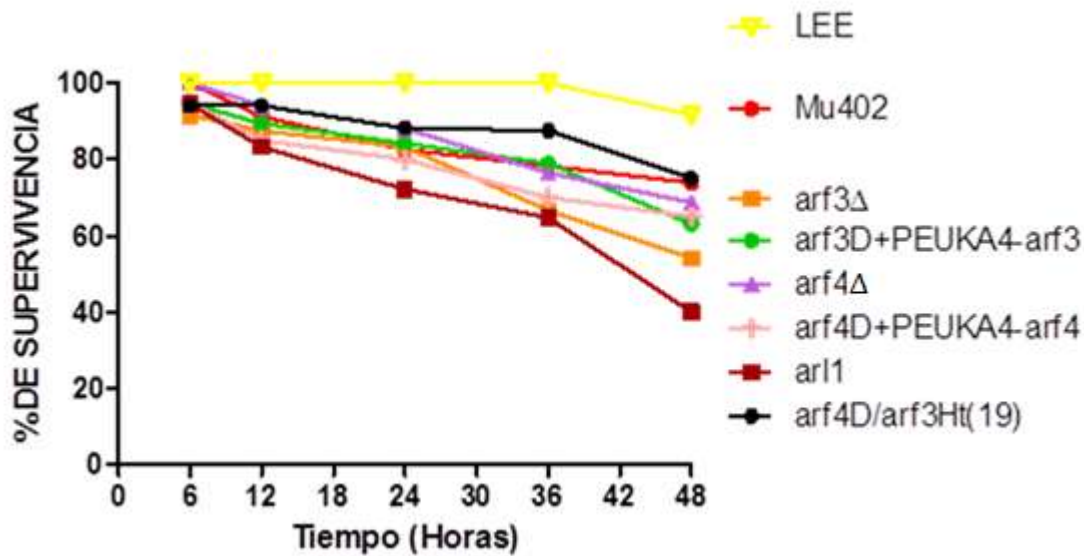


Figura 13. Efecto del sobrenadante de cultivo miceliar de las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.

**Figura 18. Efecto del sobrenadante de cultivo miceliar de las cepas mutantes en los genes *arf3* y *arf4* *M. circinelloides* en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.** Se usaron esporas de las distintas cepas de *M. circinelloides* (Mu402, *arf3*Δ, *arf3*Δ+pEUKA4-*arf*wt, *arf4*Δ, *arf4*Δ+pEUKA4-*arf*wt, *arl1*Δ y *arf3*Δ<sup>(+/-)</sup>/*arf4*Δ (19), tomándose registro del porcentaje de supervivencia a las 6, 12, 24, 36 y 48 horas de crecimiento. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 6 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. p<0.005.



## VIII. Discusión

Las proteínas ARF son importantes reguladores de la generación de vesículas en las células eucariota, y en particular en el hongo *Candida albicans* estas proteínas participan en la morfogénesis y en virulencia (Labbaoui y col., 2017).

Este trabajo demostró la participación de los productos de los genes *arf3* y *arf4* en morfogénesis, principalmente en el dimorfismo de *M. circinelloides*.

Las proteínas codificadas por los genes *arf3* y *arf4*, son un 96% idénticas entre sí, sugiriendo una redundancia en las funciones biológicas que estas posean. Un ejemplo similar se presentó en el ascomiceto levaduriforme *S. cerevisiae*, en donde las proteínas ARF1 y ARF2 tienen un 98% de identidad y una redundancia funcional, debido a que la mutación de cada uno de los genes de manera independiente no produjo un fenotipo letal, sin embargo la doble mutación de estos genes en esta levadura generó un fenotipo letal (Stearns, 1990). Las mutantes sencillas en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides* son homocariontes, mientras que la mutación  $arf3\Delta^{(-)(+)}/\Delta arf4$  es heterocarionte en el gen *arf3*, el cual fue el segundo evento de mutagénesis dentro del fondo genético  $arf4\Delta$ , sugiriendo un fenotipo letal en este organismo.

El fenotipo de disminución de esporulación, la génesis de hifas bifurcadas (dicotómicas) entre otras, no fueron más severas en la doble mutante respecto a las mutantes sencillas en los genes *arf3* y *arf4* de *M. circinelloides*. Una posibilidad es que al ser heterocarionte en el gen *arf3*, esta doble mutante genera aun un poco de transcrito/proteína de Arf3 que al final conduzca a un crecimiento no tan diferente al de las mutantes sencillas. Casos similares han sido demostrados para otros genes en donde una disminución de hasta un 90% en la expresión de un gen aún puede generar un fenotipo silvestre (Chen, 2013)

El fenotipo de hifas bifurcadas (dicotómicas) por parte de las mutantes en los genes *arf3* y *arf4*, se parecen al fenotipo mostrado por las cepa mutante en el gen *ArfB* de *A. nidullans*, sin embargo en este ascomiceto, la interrupción de dicho gen generó un fenotipo aún más drástico en términos de generación de biomasa, alcanzando casi un 90% de la reducción en este parámetro (Lee y col. 2008).

Las proteínas Arf se han involucrado con la regulación de la virulencia en hongos, como es el caso del gen *ARF2* de *C. albicans*, en donde la cepa mutante en dicho gen disminuyó la virulencia (Labbaoui y col., 2017). La mutación en el gen *arf4* al parecer es menos importante en el contexto de virulencia de *M. circinelloides* en comparación con la ausencia del gen *arf3*, tanto las esporas como el sobrenadante del medio de cultivo en donde se creció a esta cepa no generaron una mayor letalidad en ratones o el nemátodo, respectivamente.

El caso de la ausencia del gen *arf3* condujo a un aumento de la virulencia de las esporas frente a ratones y más aún el sobrenadante de cultivo de dicha mutante generó un aumento la virulencia frente a *C. elegans*, sugiriendo fuertemente que existe un compuesto secretado por esta mutante que explicaría dicho aumento de virulencia. Estudios llevados a cabo por parte de nuestro grupo de trabajo (Meza-Carmen, datos sin publicar) indican que la o las moléculas implicadas en este aumento de la virulencia son de naturaleza protéica, es decir, dichas proteínas debieron ser excretadas por vesículas en esta mutante. Quizás la ausencia del gen *arf3* (cuya proteína por predicción y comparación con otros homólogos Arf participa en endocitosis), conduce a una desregulación en la secreción del contenido de vesículas al exterior de *M. circinelloides*.

Existe evidencia de un entrecruzamiento de las vías exocíticas y endocíticas que pudiera apuntalar la idea de una desregulación en la secreción por parte de la ausencia de la proteína Arf3 en *M. circinelloides*. El transporte de macromoléculas a partir de compartimento de endocitosis tardío (late endosomes) son redireccionados a la membrana plasmática y secretados en pequeñas vesículas, llamadas exosomas. Normalmente estos MVBs (Multi Vesicular Body) son endosomas tardíos que contienen proteínas cargo rodeados por membranas.

Usualmente los MVBs son fusionados con lisosomas y mandan las proteínas cargo (Receptores de membrana plasmática) para su degradación. Sin embargo bajo ciertas condiciones estos MVBs se fusionan con la membrana plasmática, de esta manera secretan a los exosomas al medio circundante (NCBI-Madame Curie Bioscience Database). Sería interesante demostrar a nivel transcripcional o de proteína si la ausencia del gen *arf3* genera un aumento de transcritos o proteínas Arf1 y/o Arf2 de *M. circinelloides*, las cuales se ha predicho que pudieran estar participando en secreción y de esta manera contribuir con el entendimiento de la secreción de este factor de virulencia en la mutante en el gen *arf3*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2008) Intracellular compartments and protein sorting. *Molecular Biology of the Cell*. Quinta Edición Garland Science. 12: 695-7042.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2008) Intracellular vesicular traffic. *Molecular Biology of the Cell*. Quinta Edición. Garland Science. 13: 750-800.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J. (2011) *Introducción a la Biología Celular*. Tercera edición. Garland Science.
4. Alvarez E, Sutton D.A, Cano J, Fothergill A. W, Stchigel A, Rinaldi M.G, Guarro J. (2009) Spectrum of Zygomycete Species Identified in Clinically Significant Specimens in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 47 (6): 1650-1656.
5. Anitei M, Hoflack B. (2011) Exit from the trans-Golgi network: from molecules to mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*. 23(4): 443- 451.
6. Anthonio E. A, Brees C, Baumgart V. E, Hongu T, Huybrechts S, Van Dijck P, Mannaerts G. P, Kanaho Y, Van Veldhoven P. P, Fransen M. (2009) Small G proteins in peroxisome biogenesis: the potential involvement of ADP-ribosylation factor 6. *BioMed Central cell biology*. 17:10- 58.
7. Bartnicki-García S. (1968) Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of Bacteriology*. 96(5): 1586- 1594.
8. Bonifacino, J. S. (2004) The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* 116(2):153-166.
9. Bröcker C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. (2010) Multisubunit Tethering Complexes and Their Role in Membrane Fusion. *Current Biology*. 20: R943- R952.
10. Carsten G. Hansen, Benjamin J. N. (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science*. 122(11): 1713- 1721.
11. Chen D, K. N. (2013) Differential effects on ARF stability by normal versus oncogenic levels of c-Myc expression. *Molecular Cell*. 51(1): 46-56.
12. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. (2007) Coats, tethers, Rabs, SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Cell*. 12(5): 671- 82.
13. Dell'Angelica E. C, Puertollano R, Mullins C, Aguilar R. C, Vargas J. D, Hartnell L. M, Bonifacino J. S. (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding

proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 149(1): 81- 94.

14. Donaldson J. G, Jackson C L. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews*. 12(6): 362- 375.

15. Eden E. R, White I. J, Futter C. E. (2009) Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. *Biochemical Society Transactions*. 37: 173-177.

16. Epp E, Vanier G, Harcus D, Lee A. Y, Jansen G, Hallett M, Sheppard D. C, Thomas D. Y, Munro C. A, Mullick A, Whiteway M. (2010) Reverse genetics in *Candida albicans* predicts ARF cycling is essential for drug resistance and virulence. *PLoS Pathogens* . 6(2):e100075.

17. Gil A. (2010) *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Síntesis, degradación y recambio de las proteínas*. Editorial Médica Panamericana. S.A. España. Madrid.137: 1- 5.

18. Gutiérrez A, López-García, Garre V. (2011) High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*. 84(3): 442- 6.

19. Hua Z, Graham T. R. (2000) Madame Curie Bioscience Database. The Golgi Apparatu. Landes Bioscience. Available from. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6268/>

20. Jimenez L. F. (2003) *Biología celular y molecular*. Pearson educación.

21. Kahn R, Cherfils J, Elias M, Lovering R, Munro S, Schurmann A. (2006) Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *Journal Cell Biology*. 172(5): 645- 650.

22. Karp G. (2014) *Biología Celular y Molecular*. McGraw Hill.

23. Kumari S, Swetha M. G, Satyajit M. (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Research*. 20: 256- 275.

24. Hayet L, Stéphanie B, Vikram G, Norma S, Scott G. Filler, Robert A, Martine B. (2017) Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. *Plos Pathogens*. 13(2): e1006205. Doi:10.1371/ Journal.ppat.1006205

25. Lee J, Ju B.G. (2011) *Drosophila arf72A* acts as an essential regulator of endoplasmic reticulum quality control and suppresses autosomal-dominant retinopathy. *The International of Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 43 (9) 1392- 1401.

26. Lee S. C, Schmidtke S. N, Dangott L. J, Shaw B. D. (2008) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryotic Cell*. 7 (8) 1278-1288.
27. Lee S. C, Shaw B. D. (2008) Localization and function of ADP ribosylation factor A in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*. 283 (2): 216-222.
28. Li Y, Kelly W. G, Logsdon J, Schurko A. M, Harfe B. D, Hill-Harfe K. L, Kahn R. A. (2004) Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 18 (15): 1834-1850.
29. Martinez, A. V. (2014) Regulación de la expresión de los genes endógenos por la maquinaria del silenciamiento genético mediado por RNA en *Mucor circinelloides*. Murcia, España.
30. Matthew N. Levy, B. M. (2006) *Fisiología*. Sexta Edición. Elsevier Mosby. España.
31. Moss J, Vaughan M. (1995) Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 12327- 12330.
32. Mukherjee S, Ghosh R. N, Maxfield F. R. (1997) Endocytosis. *Physiological Reviews*. 77(3): 759-803.
33. Nakano A, Muramatsu M. (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. The Journal of Cell Biology*. 109: 2677; 2691.
34. Navarro E, Lorca-Pascual J.M, Quiles-Rosillo M.D, Nicolas F.E, Garre V, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez R.M. (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetic Genomics*. 266: 463- 470.
35. Nicolas F.E, de Haro J. P, Torres-Martinez S, Ruiz-Vázquez R.M. (2007) Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics Biology*. 44: 504- 516.
36. Perez P, Rincón, S. A. (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Journal of Biological Chemistry*. 426: 243- 253.
37. Ponnambalam S, Baldwin S. A. (2003) Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Molecular Membrane Biology*. 20: (2) 129- 39.

38. Popoff V, Langer J. D, Reckmann I, Hellwig A, Kahn R. A, Bruegger B, Wieland F. T. (2011) Several Arf isoforms support COPI vesicle formation. *Journal of Biological Chemistry*. 286(41): 35634–35642.
39. Risselada, H. J, Grubmüller H. (2012) How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Current Opinion In Structural Biology*. 22(2): 187- 196.
40. Roncero M.I, Jepsen L.P, Stroman P, Van Heeswijk R. (1989) Characterization of a leuA gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Genetic Transformation Systems in Fungi*. 184(1): 335- 343.
41. Salcedo-Hernández R, 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.
42. Schipper M.A, Antonie Van L. (1976) Induced azygospore formation in *Mucor (Rhizomucor) pusillus* by *Absidia corymbifera*. *PubMed Journals*. 42: 141- 144.
43. Schleifer L. S, Kahn R. A, Hanski E, Northup J. K, Sternweis P. C, Gilman A. G. (1982) Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. 257(1): 20- 23.
44. Scheller R. H, Bennett M.K. (1993) The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(7): 2559- 2563.
45. Shin H. W, Nakayama K. (2004) Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *Journal of Biological Chemistry*. 136: 761- 767.
46. Söllner T, Bennett M. K, Whiteheart S. W, Scheller R. H, Rothman J. E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75(3): 409- 418.
47. Staskevich A. S, (2000) Vesículas con cubierta y su participación en el transporte. *Microbiología General e Inmunología Básica*.
48. Stearns T, Kahn R, Botsteint D, Hoyt. (1990) ADP Ribosylation Factor Is an Essential Protein in *Saccharomyces cerevisiae* and Is Encoded by Two Genes. *Molecular Cellular Biology*. 10(12): 6690- 6699.
49. Stearns T, Willingham M, Botsteint D, Kahn R. (1990) ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(3): 1238- 1242.

50. Tamkun J.W, Kahn R.A , Kissinger M, Brizuela B.J, Rulka C, Scott M.P, Kennison J.A. (1991) The arf like gene encodes an essential GTP-binding protein in *Drosophila*. *Proceedings National Academy Science*. 88(8): 3120- 3124.
51. Van Heeswijck R. Carlsberg R .(1984) The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*. 49: 597- 609.
52. Vila Martínez A. (2014) Regulación de la expresión de los genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 3-5.
53. Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar M. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40(1): 235- 271.
54. Yorimitsu T, Sato K, Takeuchi M. (2014) Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers In Plant Science*. 21(5): 411.