



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Laboratorio de Diferenciación Celular

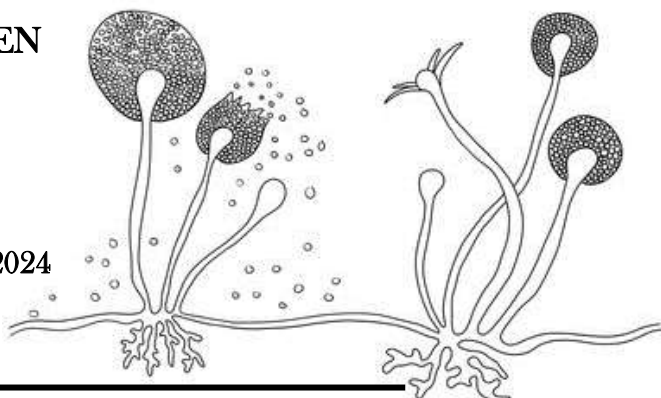
“Dilucidación de la función del factor de ADP-ribosilación
Arf3 en la fusión mitocondrial y virulencia mediada por
rizoferrina en *Mucor lusitanicus*”

Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta
IBT. Sergio Montoya Montoya

D.C. VÍCTOR MEZA CARMEN
DIRECTOR DE TESIS

Morelia, Michoacán, abril de 2024





"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas".

-Marie Skłodowska-Curie





AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su invaluable apoyo durante mi formación, por motivarme y alentarme a seguir hacia adelante y no dejarme vencer por las adversidades, porque la vida es complicada, sin embargo, no hay algo que carezca de solución. Gracias por sembrar en mis los valores que contribuyen a ser quien soy, por su amor y todo lo que me han enseñado. Son el pilar de mi vida.

A mi hermana mayor, porque siempre ha estado ahí y aunque a veces las palabras faltan, el amor y la compañía nunca faltaron.

A mi hermana menor y mis sobrinos porque compartir con ustedes me ha permitido volver a sentir esa curiosidad de la infancia, a cuestionarme el cómo y porqué de las cosas.

A mi asesor el D.C. Víctor Meza-Carmen por contribuir con mi formación científica, por inspirar en mí y compartir conmigo su pasión por la ciencia, por los retos impuestos y sobre todo por su apoyo y guía durante el desarrollo de este trabajo.

A mi comité sinodal, conformado por la D.C. Martha Isela Ramírez Díaz, los D.C. Ernesto García Pineda, Jesús Campos García y Félix Gutiérrez Corona, gracias por su retroalimentación en cada evaluación, sin duda ha sido tan valiosa su crítica para mi formación y desarrollo de este trabajo.

Al D.C. José Alberto Patiño Medina, por su invaluable apoyo en la construcción de las cepas sobreexpresantes para el desarrollo de este trabajo, pero también por el conocimiento transmitido.

Al D.C. Marco Iván Valle Maldonado por su gran apoyo y tiempo invertido en los ensayos de RT-qPCR así como el conocimiento brindado respecto a la técnica ya que fueron fundamentales para la conclusión del proyecto.

A mis amigos, a los que ya estaban y a los que llegaron...

Pao, en algún punto nos convertimos en hermanxs, gracias por acompañarme y no dejarme solx nunca. Hemos celebrado nuestros logros y espero sigamos cosechando muchos más.

Wen, me has enseñado que la palabra amigx tiene una definición muy amplia y hermosa sobre todo, gracias por el apoyo y cariño. Nunca dejemos de creer en nosotrxs mismxs y alcanzaremos todos nuestros objetivos.

Albert, gracias por tu ayuda, por inspirarme y siempre escucharme. Sin duda me ayudaste a encontrar calma en un momento de mi vida en que creía no encontrarla. Consolidaste en mí la frase “nada en esta vida debe ser temido sino comprendido...”





Kass, estuviste ahí siempre y se que lo estarás, ambos hemos sido testigos del crecimiento del otro, sin duda es un placer poder llamarte colega y amiga.

Dulce, a veces las tormentas traen calma a tu vida en forma de personas maravillosas, cuando te conocí éramos dos, ahora somos tres. Sin duda una amiga extraordinaria.

César, a veces los amigos están donde menos lo imaginas. Gracias por compartir conmigo y también por todo lo que me has enseñado.

Chantal, nos encontramos al principio del camino y es un placer terminarlo juntas, gracias por tantos momentos. Por el crecimiento personal e intelectual.

Frank, siempre será un placer escucharte y discutir contigo los temas de interés, gracias por permitirme aportar a tu vida y por lo que tú has aportado a la mía.

Bren, sin duda alguna te convertiste en alguien muy especial, gracias por todo. Desde nuestras discusiones sin sentido hasta nuestros momentos más personales. No dejen de brillar nunca.

A mis compañeros del laboratorio, Viri y Macario, gracias por formar parte de esta importante etapa de mi vida y formación.

A la UMSNH y el IIQB por recibirme y permitirme iniciar con el desarrollo de mi formación científica.

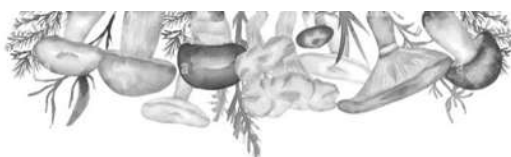
Al CONAHCYT por la beca otorgada que fue un gran apoyo para mi formación.





ÍNDICE GENERAL

A. ABREVIATURAS	XI
B. PREFIJOS	XI
C. RESUMEN	XII
D. ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mucorales	1
1.1.1 <i>M. lusitanicus</i>	3
1.1.2 Dimorfismo de <i>M. lusitanicus</i>	5
1.2 Factores de virulencia en Mucorales	7
1.2.1 Factores de transcripción asociados a la virulencia de los Mucorales	9
1.2.2 Crecimiento micelial	10
1.2.3 Factores de ADP-ribosilación	11
1.2.4 Metabolismo del hierro	12
1.2.4.1 Sistema de captación de hierro de alta afinidad	12
1.2.4.2 Captación de hierro por sideróforos en Mucorales	14
1.2.4.3 Implicación de la homeostasis de hierro en la virulencia de los Mucorales ...	19
1.3 Proteasas y proteínas de choque térmico	20
1.4 Micotoxinas	20
1.5 Proteínas de superficie tipo Cot	21
1.6 Factores de riesgo que favorecen la mucormicosis	22
1.6.1 Papel de la diabetes mellitus mal controlada en la mucormicosis	22
1.6.2 Efecto de los esteroides en la mucormicosis	23
1.7 Mucormicosis: patogénesis	24
1.7.1 Mucormicosis rino-orbital-cerebral	26
1.7.2 Mucormicosis cutánea	26
1.7.3 Mucormicosis gastrointestinal	27
1.7.4 Mucormicosis diseminada	27
1.8 Gneralidades de las proteínas G	27
1.8.1 Proteínas Ras (Ras sarcoma oncogénesis)	28
1.8.2 Proteínas Rho (Ras homólogos)	28





1.8.3 Proteínas Rab (Ras-like proteins in brain).....	28
1.8.4 Proteínas Ran (Ras-like nuclear)	29
1.8.5 Proteínas Arf (ADP ribosylation factor)	29
1.9 Proteínas de la familia Arf	29
1.9.1 Proteínas Arf y sus reguladores	31
1.10 Proteínas ArfGEF	36
1.10.1 Funciones de proteínas de la familia Arf y ArfGEF	38
1.11 Vías de señalización	42
1.11.1 La vía MAPK.....	42
1.11.2 La vía AMPc-PKA.....	43
1.12 Proteínas Arf y su relación con la mitocondria	45
1.13 Dinámica mitocondrial	45
1.14 Biogénesis mitocondrial	48
1.15 Fusión y fisión mitocondrial	50
1.16 Mitofagia	51
1.16.1 Mitofagia mediada por receptores.....	53
1.16.1.1 Atg24 en <i>M. oryzae</i>	56
1.16.2 Función de la mitofagia en la patogénesis fúngica	57
II. ANTECEDENTES	61
III. JUSTIFICACIÓN	63
IV. HIPÓTESIS	64
V. OBJETIVOS	64
5.1 Objetivo general.....	64
5.2 Objetivos específicos	64
VI. METODOLOGÍA	65
6.1 Cepas utilizadas	65
6.2 Cultivo de <i>M. lusitanicus</i>	66
6.2.1 Condiciones generales de crecimiento de <i>M. lusitanicus</i>	66
6.3 Medios de cultivo empleados	66
6.3.1 YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)	66
6.3.2 YNB (Yeast Nitrogen Base)	66
6.3.3 Medio NGM (Nematode Growth Medium)	67





Crecimiento y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	67
6.4 Obtención y conteo de esporas de <i>M. lusitanicus</i>	68
6.5 Crecimiento radial de <i>M. lusitanicus</i>	68
6.6 Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	68
6.7 Determinación de porcentajes de germinación de <i>M. lusitanicus</i>	69
6.8 Cultivo de <i>E. coli</i>	69
6.9 Obtención de SS	69
6.10 Ensayos de toxicidad	69
6.11 Ensayos de virulencia en <i>G. mellonella</i>	70
6.12 Cuantificación de rizoferrina	70
6.13 Determinación de la tasa de consumo de oxígeno	71
6.14 Cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$	71
6.15 Análisis de RT-qPCR	72
6.16 Sobreexpresión de los genes <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> en Δarf3	73
6.17 Análisis estadístico	75
VII. RESULTADOS	76
7.1 Genotipificación de las cepas mutantes en los genes <i>arf3</i> y <i>rfs</i>	76
7.2 Cuantificación de rizoferrina en los sobrenadantes	77
7.3 Función de Arf3 y Rfs en el metabolismo oxidativo mitocondrial y su relación con la virulencia	78
7.4 Importancia del metabolismo oxidativo mitocondrial en la toxicidad del sobrenadante	80
7.5 La toxicidad del sobrenadante la mutante Δarf3 es regulada negativamente por la adición de Fe^{2+} durante el crecimiento	81
7.6 Participación de Arf3 y Rfs en la termotolerancia de <i>M. lusitanicus</i>	82
7.7 Participación de Arf3 y Rfs en la germinación de <i>M. lusitanicus</i> a bajos niveles de oxígeno	83
7.8 Función de Arf3 y Rfs de <i>M. lusitanicus</i> en el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable	85
7.9 Efecto de Arf3 y Rfs sobre el consumo de O_2 y producción de $\text{OH}^\cdot$ en <i>M. lusitanicus</i>	86
7.10 Función de Arf3 en la regulación transcripcional de los genes <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i>	88





7.11 Efecto de la sobreexpresión de <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> en la toxicidad del sobrenadante en ausencia de Arf3	89
7.12 Efecto de la sobreexpresión de <i>fzo</i> y <i>dnm1</i> en el consumo de oxígeno y producción de OH ⁻ en ausencia de Arf3	91
7.13 Importancia de los sistemas antioxidantes (superoxido dismutasa y catalasa) en la toxicidad de los sobrenadantes de <i>M. lusitanicus</i>	93
7.14 Implicación de la mitofagia en la toxicidad del sobrenadante de <i>M. lusitanicus</i> ante la ausencia de Arf3.....	95
7.15 Análisis <i>in silico</i> del promotor y secuencia aminoacídica de <i>arf3</i> y <i>rfs</i>	97
VIII. DISCUSIÓN	100
IX. CONCLUSIÓN.....	111
X. BIBLIOGRAFÍA.....	112





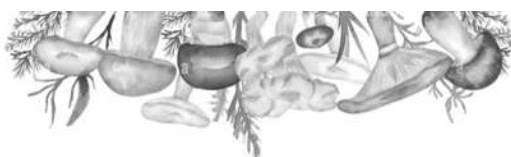
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del esporangio de <i>M. lusitanicus</i> CBS 108.17.	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>M. lusitanicus</i>	5
Figura 3. Crecimiento en medio líquido de <i>M. lusitanicus</i>	6
Figura 4. Tipos y estructuras de los sideróforos.	15
Figura 5. Estructura química de la rizoferina.	16
Figura 6. Biosíntesis de la estafiloferrina A.	17
Figura 7. Vía de síntesis propuesta de la rizoferina en Mucorales.	18
Figura 8. Patogénesis de la mucormicosis.	25
Figura 9. Interacción de las proteínas Rab y Arf.	31
Figura 10. Regulación de las proteínas Arf.	33
Figura 11. El ensamblaje de las proteínas COPI y COPII estimula la formación de vesículas.	35
Figura 12. Descripción general de la vía AMPc-PKA.	44
Figura 13. Fusión y fisión mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i>	51
Figura 14. La mitofagia es mediada por la proteína Atg32 en <i>S. cerevisiae</i>	53
Figura 15. Modelos de localización, activación y acción del receptor de mitofagia en hongos.	55
Figura 16. Modelo para la regulación de la mitofagia en hongos.	56
Figura 17. Genotipificación de las cepas mutantes en <i>arf3</i> y <i>rfs</i>	76
Figura 18. Acumulación de rizoferina en la cepa $\Delta arf3$	77
Figura 19. Participación de Arf3 y Rfs en el metabolismo oxidativo mitocondrial y su relación con la virulencia.	79
Figura 20. Arf3 regula negativamente metabolismo oxidativo mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno.	80
Figura 21. La adición de hierro en el medio de cultivo reprime la toxicidad del sobrenadante de la cepa $\Delta arf3$ de <i>M. lusitanicus</i>	81





Figura 22. Participación de Arf3 y Rfs en la termotolerancia de <i>M. lusitanicus</i>	82
Figura 23. Arf3 regula negativamente el desarrollo micelial a bajas concentraciones de oxígeno.	84
Figura 24. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de las cepas $\Delta arf3$ y Δrfs	85
Figura 25. Efecto de Arf3 y Rfs en la tasa de consumo de oxígeno y producción de OH^- en <i>M. lusitanicus</i>	87
Figura 26. Cuantificación del transcrito de <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> en la mutante $\Delta arf3$ de <i>M. lusitanicus</i> por RT-qPCR.....	88
Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> en la toxicidad del SS de $\Delta arf3$	90
Figura 28. Tasa de consumo de oxígeno y producción de OH^- en las sobreexpresantes de <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> en las cepas WT y $\Delta arf3$	92
Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de los sistemas antioxidantes Sod y Cat en la cepa $\Delta arf3$ en la toxicidad y consumo de oxígeno.....	94
Figura 30. Efecto de la mitofagia en la toxicidad del sobrenadante de la cepa $\Delta arf3$	96
Figura 31. Modelo propuesto de la regulación de Arf3 sobre el metabolismo oxidativo mitocondrial en <i>M. lusitanicus</i>	99





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función asociada a proteínas Arf según su clasificación en mamíferos	32
Tabla 2. Función de proteínas Arf en hongos	39
Tabla 3. Funciones de las proteínas de la familia ArfGEF en hongos.....	41
Tabla 4. Receptores de mitofagia en hongos y reguladores de mitofagia en hongos patógenos	59
Tabla 5. Cepas empleadas en este estudio.....	65
Tabla 6. Oligonucleótidos y sondas utilizados para RT-qPCR.....	73
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de sobreexpresión en <i>M. lusitanicus</i>	75
Tabla 8. Motivos consenso de Tec1, Hap4 y Yap1 en los promotores de <i>arf3</i> y <i>rfs</i> y péptidos señal de direccionalidad a mitocondria de la proteína Arf3 de <i>M. lusitanicus</i>	98





A. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ERO: especies reactivas de oxígeno

GAP: proteína activadora de GTPasa (GTPase-Activating Protein)

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Guanine nucleotide Exchange Factor)

GDP: guanosín difosfato

GTP: guanosín trifosfato

h: hora (s)

IMS: espacio intermembranal (Intermembrane Space)

INN: membrana interna mitocondrial (Inner Mitochondrial Membrane)

KCN: cianuro de potasio

kDa: kilo Daltons

K_f: constante de formación

OMM: membrana externa mitocondrial (Outer Mitochondrial Membrane)

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa en tiempo real

rpm: revoluciones por minuto

B. PREFIJOS

K: kilo (1×10^3)

μ: micro (1×10^{-6})





C. RESUMEN

Mucor lusitanicus es un modelo biológico para comprender las bases moleculares de la mucormicosis, infección de baja incidencia, pero letal, la cual se ha asociado con casos graves de COVID-19. *M. lusitanicus* es un hongo dimórfico, cuyas esporas son capaces de crecer como levadura o micelio dependiendo de las condiciones de crecimiento. La levadura es de fenotipo no virulento, asociada a un metabolismo fermentativo; en cambio, el micelio es considerado como el estadio virulento cuando está asociado al incremento del metabolismo oxidativo mitocondrial (MOM). La síntesis del sideróforo rizoferrina, que involucra la participación de la enzima Rfs (rizoferrina sintetasa), depende del MOM. Este sideróforo es considerado un factor de virulencia secretable de *M. lusitanicus*. Se ha demostrado que las proteínas Arf son cruciales en la biogénesis de vesículas, las cuales participan en procesos celulares como la secreción la formación de organelos como la mitocondria. Se describió por nuestro grupo de trabajo que al igual que la cepa mutante en el gen *arf3* ($\Delta arf3$), la sobreexpresión del gen *rfs* en la cepa silvestre (WT), mostró un fenotipo más virulento que la cepa WT. El objetivo de este trabajo fue conocer posible regulación del producto del gen *arf3* en la virulencia conferida por rizoferrina. Mediante ensayos de toxicidad en *Caenorhabditis elegans* empleando el sobrenadante libre de células postcultivo (SS) de la cepa doble mutante en los genes *arf3* y *rfs* ($\Delta arf3/\Delta rfs$), se observó la anulación tanto de la toxicidad del SS como de la secreción de rizoferrina, contrario a lo observado en la mutante sencilla $\Delta arf3$. Además, la sobreexpresión del gen *dnm1* (que induce el proceso de fisión mitocondrial) en la cepa $\Delta arf3$, produjo la disminución de la toxicidad del SS, así como del consumo de oxígeno y la producción de $\text{OH}^\cdot$. Estos datos sugieren una posible regulación por parte de Arf3 durante la fisión mitocondrial, lo cual conduce a una disminución del fenotipo virulento.

Palabras clave: sideróforo, mitocondria, fusión, fisión, toxicidad.

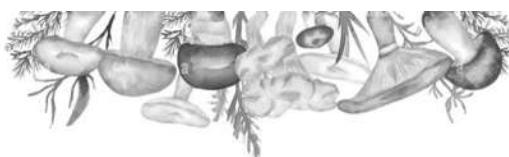




D. ABSTRACT

Mucor lusitanicus is a biological model for understanding the molecular basis of mucormycosis, a low incidence but lethal infection has been associated with severe cases of COVID-19. *M. lusitanicus* is a dimorphic fungus, whose spores are capable of growing as yeast or mycelium depending on growth conditions. The yeast has a non-virulent phenotype, associated with fermentative metabolism; mycelium, on the other hand, is considered the virulent stage when associated with the increase of mitochondrial oxidative metabolism (MOM). The synthesis of the siderophore rizoferin, which involves the enzyme Rfs (rizoferin synthetase), depends of MOM. This siderophore is considered a secretable virulence factor of *M. lusitanicus*. It has been demonstrated that Arf proteins are crucial in the biogenesis of vesicles, which participate in cellular processes such as secretion and formation of organelles like mitochondria. It was described by our working group that as well as the mutant strain in the *arf3* gene ($\Delta arf3$), the overexpression of the *rfs* gene in the wild-type strain (WT), showed a more virulent phenotype than the WT strain. The aim of this work was to know possible regulation of the *arf3* gene product in the virulence conferred by rhizoferrin. Toxicity assays in *Caenorhabditis elegans* with the post-culture cell-free supernatant (SS) obtained from the double mutant strain in the *arf3* and *rfs* genes ($\Delta arf3/\Delta rfs$), revealed the abrogation of both SSs toxicity and rhizoferrin secretion, contrary to what was observed in the $\Delta arf3$ strain. Furthermore, overexpression of the *dnm1* gene (which induces the mitochondrial fission process) in the $\Delta arf3$ strain resulted in the decrease of both SS toxicity, as well as oxygen consumption and OH^- production. These data suggest a possible negative regulation of mitochondrial fission by Arf3 that lead to the decreased of the virulent phenotype in the WT strain.

Keywords: siderophore, mitochondria, fusion, fission, toxicity.





I. INTRODUCCIÓN

1.1 Mucorales

El orden de los Mucorales representa un grupo antiguo de hongos superiores que han sido clasificados dentro del subfilo *Mucoromycotina*, los cuales sitúan basalmente a los grupos *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Spatafora *et al.* 2016). Los miembros de este orden se caracterizan por un crecimiento exacerbado y la formación de prominentes micelios. En la mayoría de los taxones mucoraleanos, las esporangiosporas (esporas) se forman dentro de una estructura conocida como esporangio, de forma esférica y que forma parte del esporangio (Fig. 1A-B) que es observable a simple vista. Es característico de los Mucorales la aparición de una vesícula pronunciada llamada columela, ubicada dentro del esporangio (Fig. 1C) que permanece intacto cuando se liberan las esporas (Fig. 1B, D). Los Mucorales se encuentran comúnmente como saprótrofos en el suelo y en materia vegetal en descomposición. Debido a que sus esporas pueden ser aerotransportadas y su rápido crecimiento, a menudo son los primeros en colonizar la materia orgánica en deterioro. Algunas especies de mucorales, como *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*) o *Mucor circinelloides*, pueden encontrarse prácticamente en cualquier lugar del entorno humano. En comparación con la mayoría de los hongos ascomicetos, los Mucorales necesitan una mayor humedad para su crecimiento y la germinación de sus esporas (Walther *et al.* 2020).

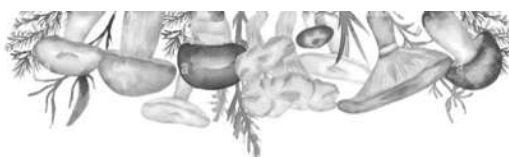
Algunas especies de Mucorales son capaces de tolerar temperaturas relativamente altas para la mayoría de los hongos (37°C); entre estas especies, varias son capaces de causar infecciones en humanos (mucormicosis). La mucormicosis es una enfermedad caracterizada por una rápida propagación local, angioinvasión y necrosis tisular. Clínicamente, estas infecciones, de progresión rápida, se asocian a altas tasas de mortalidad. En Europa y EE.UU., los pacientes inmunocomprometidos debido a una neoplasia maligna, un trasplante de órganos o un trasplante de células madre hematopoyéticas son los afectados con mayor





frecuencia, presentando principalmente una infección pulmonar invasiva o lesiones cutáneas. En otras partes del mundo, por ejemplo, la India, los pacientes con diabetes no controlada constituyen la principal cohorte de riesgo y a menudo desarrollan sinusitis e infecciones necrotizantes de tejidos blandos. El ciclo de vida de los Mucorales no incluye una fase en el interior de un huésped ya que son hongos oportunistas y sus esporas entran en el cuerpo humano por accidente, sobreviven y se desarrollan causando mucormicosis. No se ha reportado aún la transmisión de huésped a huésped. En general, los brotes de hongos oportunistas se originan a partir de una fuente consistiendo de materia no viva, pero contaminada con el hongo y se designan como sapronosis (de Hoog *et al.* 2018).

Los Mucorales comprenden unas 260 especies de 55 géneros, de las cuales 38 especies se han descrito en infecciones humanas (Wijayawardene *et al.* 2018). Basándose en el número de casos, los géneros más importantes en el contexto clínico son *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Apophysomyces* y *Mucor*. La taxonomía de estos géneros ha cambiado profundamente en los últimos años: varias especies de *Rhizopus* como *R. rhizopodiformis* o *R. oligosporus* fueron cambiadas a *R. microsporus* (Dolatabadi *et al.* 2014). El género *Lichtheimia* se separó de *Absidia* (Hoffmann *et al.* 2007) y se reconoció que *Lichtheimia ramosa* era una especie distinta de *L. corymbifera* (Alastruey-Izquierdo *et al.* 2010). En el género *Apophysomyces*, se describieron cinco nuevas especies; cuatro de ellas se conocían por fuentes clínicas (Alvarez *et al.* 2010; Bonifaz *et al.* 2014; Khuna *et al.* 2019). En el complejo *M. circinelloides*, se describieron cinco especies nuevas y las formas anteriores de *M. circinelloides* se reconocieron como especies separadas, tal es el caso de *M. circinelloides f. lusitanicus* renombrado como *M. lusitanicus* (Wagner *et al.* 2020; Walther *et al.* 2019, 2020).



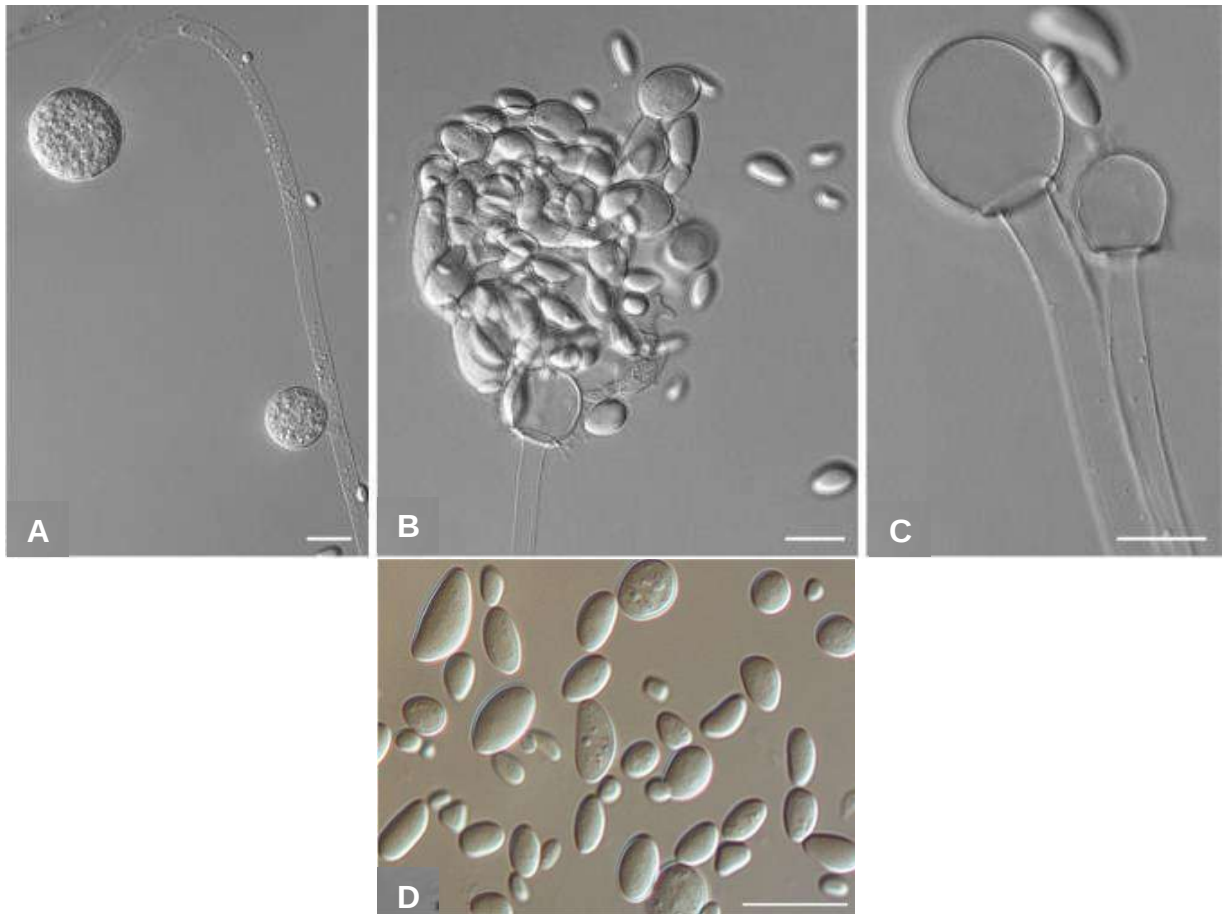
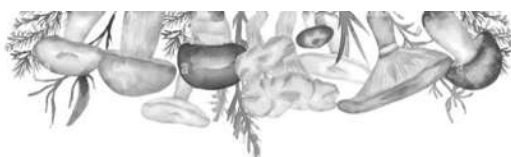


Figura 1. Estructura del esporangio de *M. lusitanicus* CBS 108.17. Se muestra el esporangióforo con un esporangio lleno de esporas (A) y una vez que se ha roto el esporangio (B) así como las columelas (C) y la morfología de las esporas (D). Barra de escala= 20 μ m (tomado y modificado de Wagner *et al.* 2020).

1.1.1 *M. lusitanicus*

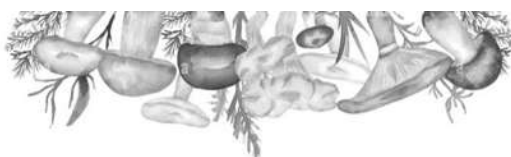
M. lusitanicus, anteriormente llamado *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (Wagner *et al.* 2020), es un hongo filamentoso y dimórfico perteneciente al orden de los Mucorales. Este orden pertenece al filo Mucoromycota y, dentro de este, al subfilo Mucoromycotina (Spatafora *et al.* 2016). Es un modelo de estudio para la comprensión de la señalización mediada por luz, la cual estimula la producción de carotenos y el fototropismo (Iturriaga *et al.* 2018); para entender el control del ciclo circadiano (Silva *et al.* 2006); el proceso de esporulación asexual (Pérez-Arques *et al.* 2021); para comprender el silenciamiento génico en donde se han descrito





los elementos reguladores del ARN de interferencia (ARNi) que controlan este evento (Nicolás y Ruiz-Vázquez, 2013; Lax *et al.* 2020; Pérez-Arques *et al.* 2021); la diferenciación celular durante el dimorfismo y la patogénesis fúngica (Lax *et al.* 2020b). Este Mucoral cuenta con el mayor número de herramientas moleculares tales como la delección de genes, mutaciones sitio específicas, sobreexpresión de genes mediante plásmidos o por integración al genoma, silenciamiento génico, entre otros (Vellanky *et al.* 2018; García *et al.* 2018).

M. lusitanicus tiene un ciclo de vida sexual y uno asexual (Fig. 2). Se ha descrito en mayor detalle el ciclo de vida asexual del cual derivan las esporangiosporas (las cuales se nombraran como esporas en este texto); además, presenta múltiples eventos de diferenciación como la capacidad de crecer como hifa o levadura o bien interconvertirse de una morfología a otra. En presencia de luz, las síntesis de carotenos y el proceso de esporulación se ven favorecidos además de que la señalización mediada por luz es necesaria para la virulencia (Pérez-Arques *et al.* 2021). *M. lusitanicus* puede formar cuatro tipos de esporas, las esporangiosporas de tipo asexual producidas en sustrato sólido, zigosporas de tipo sexual producidas en sustrato sólido, germoesporas producidas después de la meiosis y germinación de las zigosporas y artrosporas de tipo asexual producidas en medio líquido al final de la fase estacionaria (Orlowski, 1990; Walther *et al.* 2019). Además, es un hongo Crab-tree positivo, es decir, a concentraciones elevadas ($\geq 2\%$) de una fuente de carbono fermentable como la glucosa, puede fermentar en presencia de oxígeno (McIntyre *et al.* 2002).



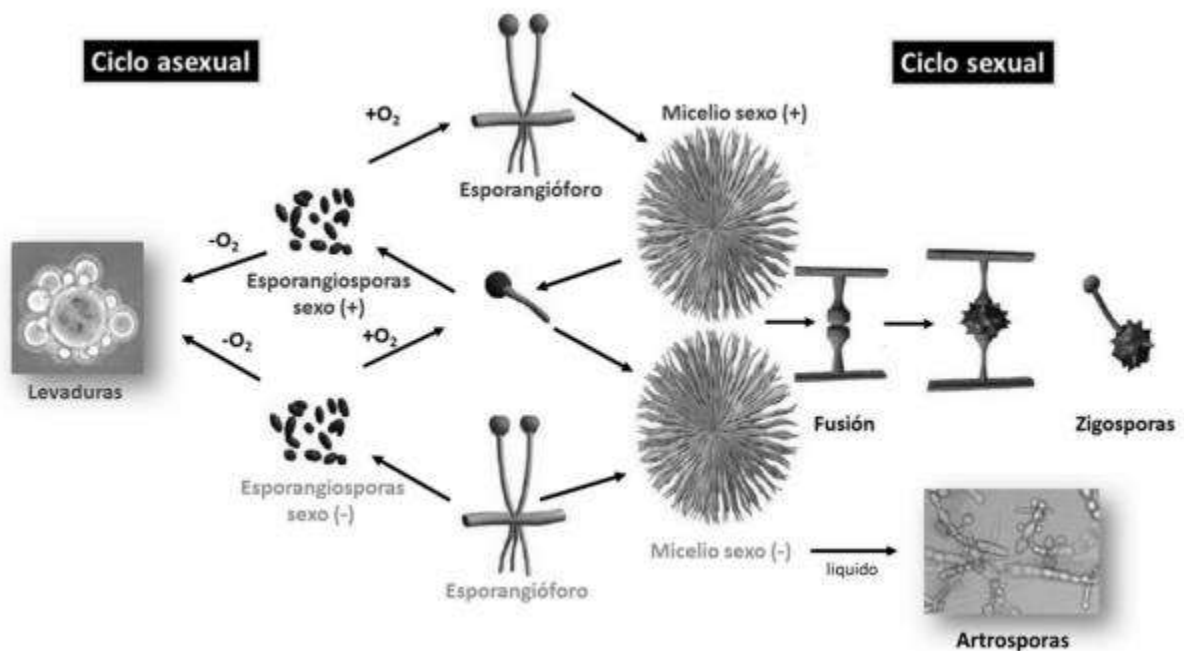


Figura 2. Ciclo de vida de *M. lusitanicus*. Las especies del género *Mucor*, son heterotálicas (con dos tipos sexuales), y capaz de generar tres tipos de esporas, las esporangiosporas asexuales, las zigosporas, que se forman al fusionarse dos hifas de los diferentes tipos sexuales y las artrosporas (también asexuales) que se producen en medio líquido al final de la fase estacionaria. Las diferentes esporas son capaces de dar lugar a ambas morfologías y de igual forma, el micelio o levadura en sustrato sólido son capaces de llevar a cabo el proceso de esporulación como mecanismo de sobrevivencia y dispersión (Tomada y modificada de López-García, 2015).

1.1.2 Dimorfismo de *M. lusitanicus*

El dimorfismo alude a la capacidad de un microorganismo para desarrollarse en dos morfologías, en el caso de *M. lusitanicus* y dependiendo de las condiciones de crecimiento este es capaz de desarrollarse como micelio (hifa) y levadura (Fig. 3). Cuando las esporas perciben una determinada atmósfera y nutrientes en el medio, rompen el estado de dormancia y comienza la activación del metabolismo, proceso que se refleja fisiológicamente en el aumento de tamaño de la espora que adquiere una forma esférica. Posterior a ese proceso de activación comenzará el surgimiento del crecimiento vegetativo, el cual, si las esporas se





desarrollan en ausencia de oxígeno, una fuente de carbono fermentable y una fuente orgánica de nitrógeno, se desarrollará la morfología levaduriforme, las cuales son esféricas y multinucleadas, dicha morfología está asociada a un metabolismo fermentativo y un fenotipo no virulento (McIntyre *et al.* 2002, Patiño-Medina *et al.* 2018). Por otra parte, si las esporas crecen en presencia de oxígeno y cualquier tipo de fuente de carbono y nitrógeno, se desarrollará la morfología micelial, en donde sus hifas son multinucleadas y cenocíticas, dicha morfología se asocia con un incremento del metabolismo oxidativo y exhibe un fenotipo virulento (Díaz-Pérez *et al.* 2020). Estas morfologías no son terminales, ya que, si las condiciones de crecimiento son alteradas para favorecer la morfología opuesta, el hongo es capaz de realizar la transición tanto morfológica como metabólica para adaptarse correctamente al entorno.

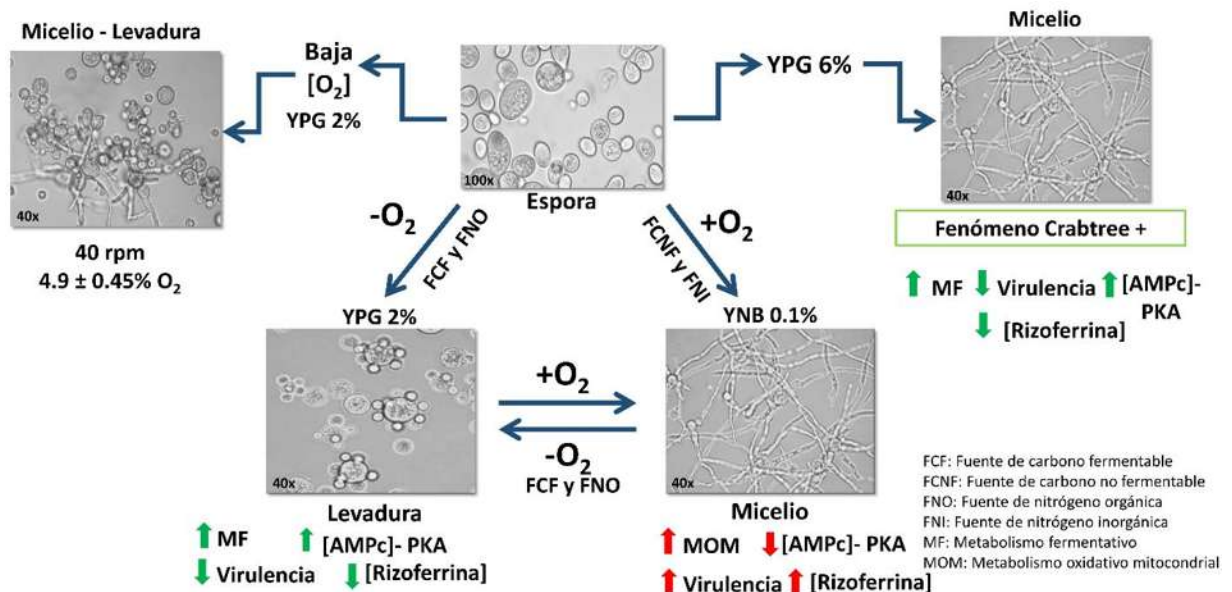
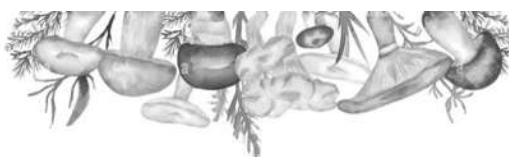


Figura 3. Crecimiento en medio líquido de *M. lusitanicus*. A partir de las esporas y dependiendo de las condiciones de crecimiento, el hongo puede crecer como levadura o como micelio. Si la espора se crece en condiciones anaerobias, en presencia de una fuente de carbono fermentable como la glucosa y una fuente de nitrógeno orgánica como peptona, se desarrollará la morfología levaduriforme, a la cual está asociado un metabolismo fermentativo así como un fenotipo no virulento y altas concentraciones de AMPc correlacionadas con una actividad aumentada de la proteína cinasa A (PKA) asociada a una





baja acumulación de rizoferrina, mientras que si se crece en condiciones aerobias, en presencia de una fuente de carbono fermentable o no fermentable, una fuente de nitrógeno orgánica o inorgánica, desarrollará la morfología micelial, a la cual se asocia un metabolismo oxidativo y un fenotipo virulento, así como bajas concentraciones de AMPc correlacionadas a una baja actividad de la PKA asociada a una alta acumulación de rizoferrina; por otro lado, si las esporas germinan en una concentración baja de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$) se obtendrá un porcentaje de ~50-60% células germinadas como levadura y el resto como hifas, finalmente, si las esporas germinan en concentraciones altas de glucosa (6%) la morfología resultante será micelial, a la cual se asocia un metabolismo fermentativo así como un fenotipo no virulento y altas concentraciones de AMPc asociado a una alta actividad de la PKA y baja acumulación de rizoferrina, explicado en parte al fenómeno Crabtree positivo de *M. lusitanicus*. Estos estadios no son terminales ya que si las condiciones de crecimiento son modificadas puede haber conversión de micelio a levadura o de levadura a micelio (Lübbehüsen *et al.* 2003).

1.2 Factores de virulencia en Mucorales

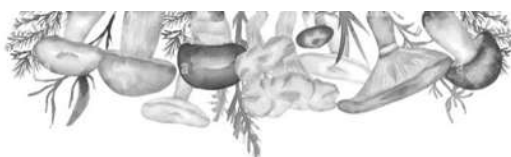
Un factor de virulencia es cualquier característica o componente de una bacteria, hongo, parásito o virus que le confiere la capacidad de causar enfermedad en un huésped. Estos factores pueden ser estructurales como los flagelos en las bacterias que favorecen la motilidad, por ejemplo, en *Helicobacter pylori* se ha reportado que sus flagelos producen diferentes tipos de motilidad, incluida la "motilidad de natación", la "motilidad de extensión" y la "motilidad de enjambre"; estos flagelos influyen en su colonización, inflamación y evasión inmune (Gu, 2017). Los factores de virulencia moleculares como algunos factores de transcripción que estimulan la expresión de genes involucrados en la patogenicidad como es el caso de Crz1 (Calcineurin responsive zinc finger 1) (Gupta *et al.* 2022) que en hongos como *Candida albicans* se ha correlacionado con la resistencia a antifúngicos basados en azoles (Santos y de Larrinoa, 2005) mientras que en *Aspergillus fumigatus* se correlacionó con el aumento de la germinación, crecimiento y polaridad de las hifas así como en la esporulación y resistencia al estrés térmico (Soriani *et al.* 2008). Los factores de virulencia funcionales refieren a aquellos como la secreción de adhesinas y sideróforos o la formación de





biopelículas, este último es un factor de virulencia importante para *C. albicans* por su capacidad para formar biopelículas en superficies bióticas o abióticas como los catéteres, las dentaduras postizas (abióticas) y las superficies de las células mucosas (bióticas) son los sustratos más comunes (Fanning y Mitchell, 2012). Las biopelículas se forman en un proceso secuencial que incluye la adherencia de células de levadura al sustrato, la proliferación de estas células de levadura, la formación de hifas en la parte superior de la biopelícula, la acumulación de material de matriz extracelular y, finalmente, la dispersión de las células de levadura de la biopelícula (Finkel y Mitchell, 2011). Las biopelículas maduras son mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del huésped en comparación con las células planctónicas (Fanning y Mitchell, 2012; Mayer *et al.* 2013), y desempeñan un papel importante en la capacidad del microorganismo para colonizar, invadir, replicarse y evadir las defensas del huésped. Un ejemplo común de un factor de virulencia es la toxina del cólera (CT) producida por la bacteria *Vibrio cholerae*, que es responsable de la enfermedad del cólera. Esta bacteria coloniza el intestino delgado mediante TCP (pilus corregulado por toxinas, del inglés toxin-co-regulated pilus) e interactúa con los receptores del epitelio intestinal y una vez adherida, la bacteria secreta su toxina, que va acompañada de la liberación de hemaglutinina/proteasa (HA/proteasa). Esta HA/proteasa extracelular se encarga de descomponer la subunidad CT-A en el residuo Arg192, dando lugar a subunidades CT-A₁ y CT-A₂ discretas unidas únicamente por un enlace disulfuro. Esta modificación post-traducciona es crítica para la correcta actividad de la toxina, lo que lleva a un aumento de la producción de AMPc, provocando una secreción masiva de electrolitos y agua en el lumen intestinal, paralela a la excreción de la bacteria, lo que conduce a los síntomas característicos de la enfermedad (Sanchez y Holmgren, 2005; Vanden Broeck *et al.* 2007).

Los factores de virulencia pueden variar según el tipo de microorganismo y la enfermedad que causan. Su estudio es importante para comprender los mecanismos mediante





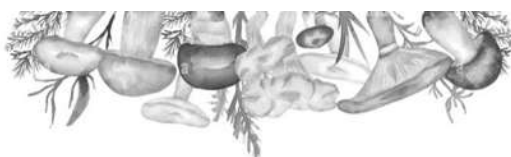
los cuales los patógenos interactúan con los huéspedes y para desarrollar enfoques terapéuticos y preventivos efectivos (Finlay y Falkow, 1997; Tahiri *et al.* 2023).

Los patógenos humanos causan enfermedades en el huésped basándose en dos pasos: (1) la capacidad de infectar microorganismos para evadir el sistema inmunológico y sobrevivir dentro del huésped, y (2) la alteración del sistema inmunológico y daño a las células huésped. Los factores de virulencia de los patógenos juegan un papel clave para lograr el proceso de daño.

A continuación, se abordan los estudios previos que indagaron en diversos factores de virulencia de los Mucorales que son conocidos y contribuyen a la invasión inmune. Mientras que la tolerancia a los factores estresantes fisiológicos (alta temperatura, osmolaridad, hipoxia) y la capacidad de crecimiento dimórfico aparecen entre los factores de virulencia generales igualmente válidos para las infecciones fúngicas (Hassan y Voigt, 2019; Tahiri *et al.* 2023; Alqarihi *et al.* 2023). A continuación, se describen algunos de los factores de virulencia descritos en los Mucorales.

1.2.1 Factores de transcripción asociados a la virulencia de los Mucorales

La regulación por factores de transcripción puede desempeñar un papel clave en el desarrollo micelial y la patogenicidad de algunos hongos como *M. lusitanicus*. Aunque se han identificado varias proteínas que participan en la regulación de la virulencia de los Mucorales, los diversos factores de transcripción implicados se encuentran apenas descritos. Hasta la fecha, se ha demostrado el papel de los factores de transcripción Atf (activating transcription factor), Atf1 y Atf2 en *M. lusitanicus*, los cuales están implicados en la supervivencia del hongo dentro de los fagosomas de los macrófagos, mientras que la delección de estos genes redujo su virulencia en un modelo murino de mucormicosis, así como la supervivencia de las esporas al ser fagocitadas por los macrófagos (Pérez-Arques *et al.* 2019). Por otro lado, el factor de transcripción Tec1 (TEA transcription factor) del cual, la mayoría de especies de los Mucorales



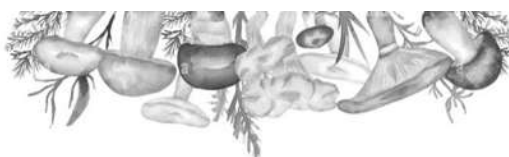


poseen dos homólogos, *tec1* y *tec2*, a excepción de *Phycomyces blakesleeanus*, (que sólo se posee un homólogo de Tec). Este factor de transcripción controla la virulencia y el desarrollo de hifas en varios hongos. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* requiere Tec1 para el desarrollo pseudohifal (Chou *et al.* 2006). En *Ustilago maydis*, la delección de *tec1* provocó un fenotipo poco virulento (León-Ramírez *et al.* 2022). En *C. albicans*, Tec1 promovió la virulencia y el desarrollo de hifas (Schwartz *et al.* 2000), mientras que la delección de *tec1* condujo a una disminución en la formación de biopelículas (Panariello *et al.* 2017). Además, la producción de biopelículas y la tolerancia a condiciones de pH bajo requieren de Tec1 en *Candida glabrata* (Purohit y Gajjar, 2022). En *M. lusitanicus* se ha descrito la regulación de los factores de transcripción Tec a través de la represión de la vía AMPc-PKA al mismo tiempo que aumenta la virulencia a través del incremento en el metabolismo oxidativo mitocondrial, crecimiento micelial y la secreción de rizoferina (Alejandre-Castañeda *et al.* 2023).

1.2.2 Crecimiento micelial

En respuesta a estímulos ambientales, los Mucorales pueden cambiar rápidamente su diferenciación morfogénica entre esporas e hifas (micelio) (Orlowski, 1991). El desarrollo de la morfología levaduriforme en *Mucor spp.* es estimulada por la presencia de una hexosa fermentable y anaerobiosis (metabolismo fermentativo), mientras que la restricción de oxígeno y nutrientes promueve el crecimiento de las hifas (metabolismo oxidativo) (Wolff *et al.* 2002). La vía de la calcineurina (CaN) gobierna la transición de levadura a micelio e influye en la patogenicidad en *M. lusitanicus*. Específicamente, la inhibición química de la calcineurina o la alteración del gen de la subunidad reguladora de la calcineurina (CnbR) genera la forma de levadura, haciéndola sustancialmente menos virulenta en ratones (Lee *et al.* 2013).

Por otra parte, el aumento de los niveles de AMPc y la actividad de la PKA también participan en el control de la morfogénesis al estimular el desarrollo levaduriforme (Ocampo *et al.* 2009), se cree existe una interacción entre ambas vías (PKA y CaN), posiblemente la

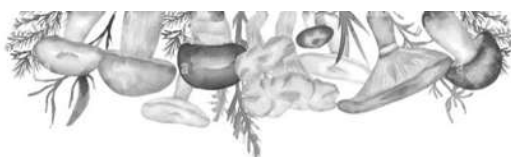




calcineurina inhibe la actividad de PKA (Lee *et al.* 2013). Finalmente, se especula que el tamaño de las esporas de *M. circinelloides* desempeña un papel en la patogenicidad, ya que en el modelo de *Galleria mellonella*, las esporas multinucleadas de mayor tamaño son capaces de germinar con mayor rapidez y son más virulentas que las esporas mononucleadas y de menor tamaño. Las esporas pequeñas son fagocitadas con mayor eficacia, mientras que las esporas más grandes pueden geminar dentro de los macrófagos y con ello provocar la lisis celular inhibiendo así la respuesta inmune del huésped (Li *et al.* 2011).

1.2.3 Factores de ADP-ribosilación

Los factores de ADP-ribosilación (Arf) son proteínas implicadas en la regulación del tráfico vesicular, así como en el modelado de los organelos celulares mediante el reclutamiento de proteínas de las cubiertas de las vesículas, la regulación del metabolismo de los fosfolípidos y la modulación de la estructura de actina en las superficies de las membranas. Además, se han identificado como factores de virulencia necesarios para el crecimiento, el dimorfismo y la virulencia en *M. lusitanicus*, quien posee 4 genes (*arf1-arf4*). La mutación tanto de *arf1* como de *arf2* reveló que sus productos son necesarios para la esporulación, pero estas proteínas también realizan otras funciones diferentes; Arf2 participa en el desarrollo de la levadura, mientras que Arf1 está involucrada en el crecimiento aeróbico. Las proteínas Arf3 y Arf4 tienen también una participación durante el crecimiento aeróbico, aunque en menor grado que sus homólogos Arf1 y Arf2. Además, todas las cepas mutantes en los genes *arf* resultaron más virulentas que la cepa silvestre en modelos de ratón y nematodo, siendo la cepa $\Delta arf3$ la que presentó el mayor nivel de virulencia. Por último, las mutaciones en $\Delta arf1/\Delta arf2$ y $\Delta arf3/\Delta arf4$ produjeron cepas heterocariontes que no alcanzaron el estado homocarionte, lo que indica que estos genes participan en funciones esenciales y redundantes (Patiño-Medina *et al.* 2018).



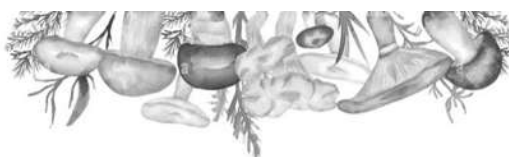


1.2.4 Metabolismo del hierro

El hierro es un micronutriente esencial para los diferentes organismos vivos debido a sus funciones fundamentales en la fisiología de los mismos, por ejemplo, tiene un papel sustancial en el mantenimiento de la virulencia de los patógenos, sin embargo, los huéspedes han evolucionado para ocultar sus reservas de hierro de los patógenos y así disminuir su virulencia para asegurar su supervivencia (Bullen *et al.* 2006). En el caso de los Mucorales y la mucormicosis, varios estudios registraron lo que parece ser un aumento de la virulencia cuando fallan los sistemas quelantes de hierro del huésped, y como consecuencia se produce un nivel anormalmente alto de hierro libre en el torrente sanguíneo (Gebremariam *et al.* 2016). Además, los Mucorales han desarrollado diversos sistemas para adquirir hierro del huésped como el sistema de captación de alta afinidad o la captación por sideróforos, lo que destaca el papel vital del hierro para estos patógenos durante la infección (Carroll *et al.* 2017; Alejandre-Castañeda *et al.* 2022; Tahiri *et al.* 2023).

1.2.4.1 Sistema de captación de hierro de alta afinidad

Estos sistemas están basados en tres componentes que dependen de las actividades de reducción, oxidación e incorporación de hierro. Estas actividades enzimáticas son realizadas por la hierro reductasa Fre, la ferroxidasa Fet3 y la permeasa Ftr1 (Ibrahim *et al.* 2010; Schwartze *et al.* 2014; Navarro-Mendoza *et al.* 2018). Una falla en el sistema de absorción de hierro de alta afinidad de los Mucorales conduce a una disminución de la virulencia (Ibrahim *et al.* 2010; Shirazi *et al.* 2015). *M. lusitanicus* tiene tres genes parálogos de ferroxidasas, *fet3a*, *fet3b* y *fet3c*, siendo *fet3c* el factor clave en la virulencia, aunque existe una redundancia parcial con los otros dos parálogos. Los genes *fet3b* y *fet3c* se expresan principalmente en la forma micelial, mientras que *fet3a* solo se expresa en la levadura (Navarro-Mendoza *et al.* 2018). Solo la forma micelial es capaz de desarrollar mucormicosis en el caso de los Mucorales dimorficos, lo que establece el proceso de dimorfismo como otro

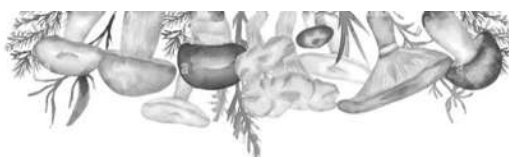




determinante implicado en la virulencia. La expresión diferencial de los tres genes *fet3a-c* en los dos estados dimórficos de *M. lusitanicus* fue la primera evidencia que conecta el mecanismo de absorción de hierro de alta afinidad y el dimorfismo, vinculando dos procesos cruciales involucrados en la virulencia de los Mucorales. Además, una expresión reducida de la permeasa de hierro Ftr1 en *R. delemar* correlacionó con una disminución de la virulencia (Ibrahim *et al.* 2010).

La permeasa de hierro de alta afinidad (FTR1) tiene un papel en la absorción y el transporte de hierro, especialmente durante la falta de hierro en el medio ambiente. Las proteínas Fob1 y Fob2 son receptores para la captación de hierro en la superficie de los Mucorales y los genes que codifican a estas proteínas se expresan fuertemente en presencia de ferrioxamina, la cual es una molécula que media la transferencia de hierro a través del sistema reductasa/permeasa sin interferir con el complejo sideróforo-hierro en las células fúngicas (Liu *et al.* 2015).

Por otro lado, el silenciamiento génico de *fob1/fob2* con ARNi en *R. oryzae* afectó la absorción de hierro, la germinación y el crecimiento en un medio con ferrioxamina como única fuente de hierro. Esta cepa también mostró una virulencia reducida en un modelo de mucormicosis en ratones tratados con deferoxamina, pero no en el modelo de mucormicosis con cetoacidosis diabética (CAD). El mecanismo por el cual *R. oryzae* obtiene hierro de la ferrioxamina implica el sistema de absorción de reductasa/permeasa ya que el crecimiento en un medio suplementado con ferrioxamina se asocia con una actividad elevada de la reductasa y el uso del quelante del ión ferroso, el disulfonato de batofenantrolina anuló la absorción y el crecimiento en un medio suplementado con ferrioxamina como única fuente de hierro. Finalmente, cuando se mutó al gen que codifica a Ftr1 en *R. oryzae*, este tuvo una absorción alterada de hierro de ferrioxamina *in vitro* así como una virulencia reducida en el modelo de mucormicosis en ratones tratados con deferoxamina (Liu *et al.* 2015).





1.2.4.2 Captación de hierro por sideróforos en Mucorales

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (500-1500 Da) que poseen una alta afinidad por el hierro (III), con una constante de formación de $K_f > 10^{30}$, cuya biosíntesis es regulada de manera negativa por niveles elevados de hierro libre. La función de estos sideróforos es captar y suministrar el hierro a la célula asegurando su supervivencia (Hider y Kong, 2010).

Los sideróforos de tipo hidroxamato (llamados así por la fracción que forma el complejo con el hierro férrico) son el tipo de sideróforos producido más comúnmente por hongos que no pertenecen al orden de los Mucorales. Por el contrario, se ha demostrado que los Mucorales producen el sideróforo de tipo policarboxilato llamado rizoferrina (Fig. 4) (Drechsel *et al.* 1991; Thieken y Winkelmann, 1992), cuya estructura química consiste en una cadena principal de diaminobutano (putrescina) unida a dos residuos de ácido cítrico (citrato), con una configuración R,R alrededor del centro quiral para el caso de los Mucorales (Fig. 5) (Drechsel *et al.* 1992). La rizoferrina es igualmente producida por *Francisella tularensis* y *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii*, ambos sideróforos tienen la misma fórmula molecular; sin embargo, la rizoferrina bacteriana es un enantiómero de la rizoferrina fúngica con una configuración S,S alrededor del centro quiral (Münzinger *et al.* 1999; Sullivan *et al.* 2006).



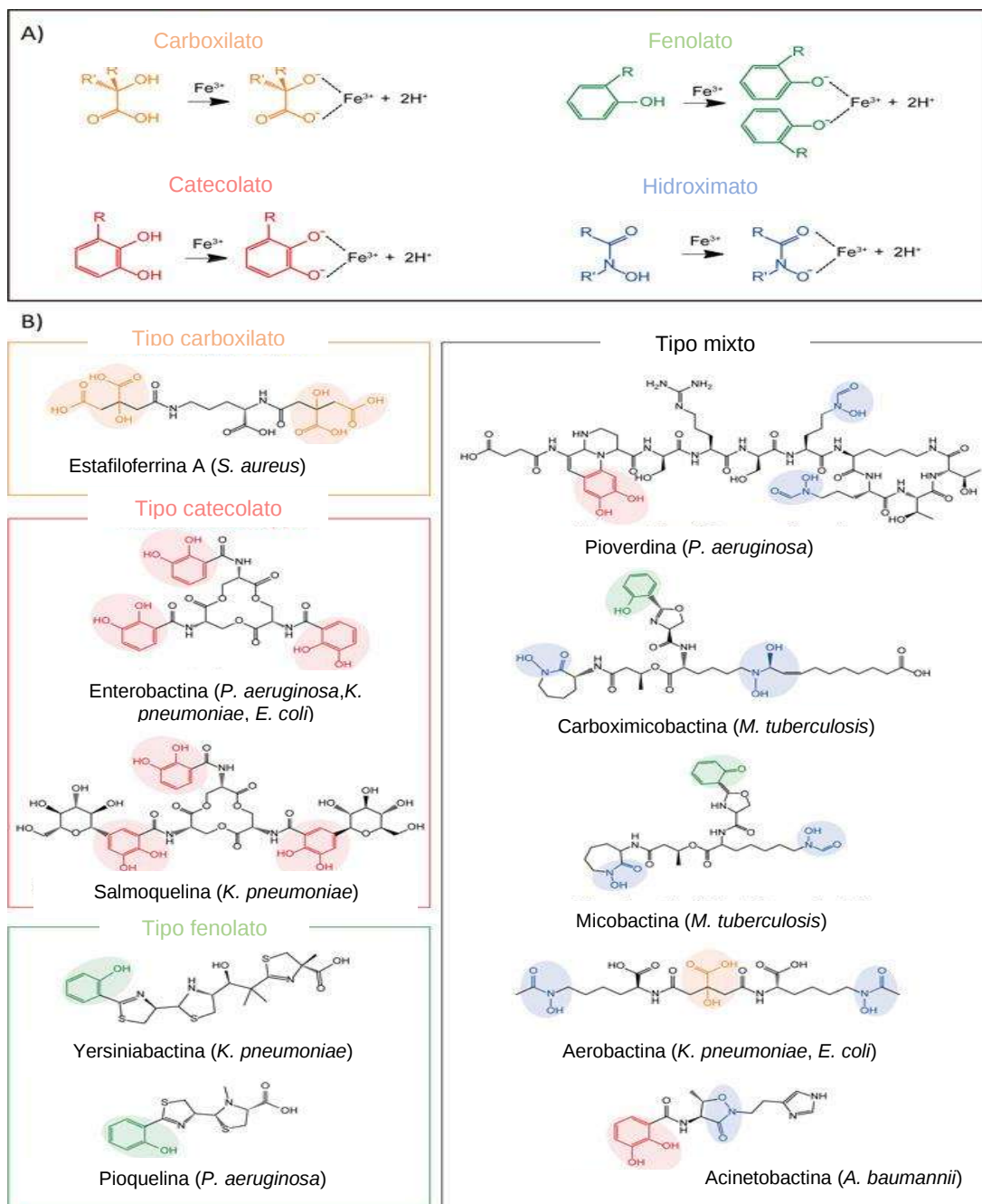


Figura 4. Tipos y estructuras de los sideróforos. Se ilustran los cuatro tipos estructurales que confieren capacidad de unión del hierro a los sideróforos: carboxilato (naranja), fenolato (verde), catecolato (rojo) e hidroxamato (azul) (A). Se muestran las estructuras de sideróforos, así como los microorganismos que los producen; los sideróforos de tipo mixto contienen más de un tipo de fracción de unión al hierro (B) (Tomado y modificado de Wilson et al. 2016).



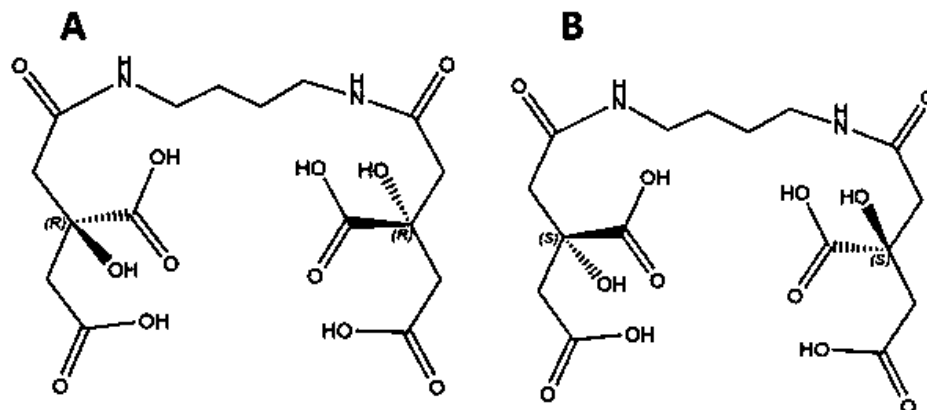
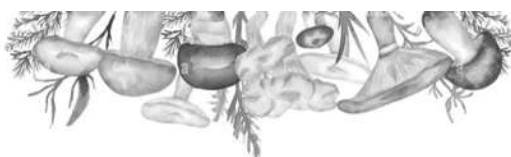


Figura 5. Estructura química de la rizoferina. Se ilustra la estructura química de la R,R-rizoferina (A) de origen fúngico y la S,S-rizoferina de origen bacteriano (tomada de Sullivan *et al.* 2006; Carroll *et al.* 2017).

Se ha reportado que la biosíntesis de sideróforos se produce a través de dos vías principales. El primero involucra péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS) que catalizan la condensación de múltiples aminoácidos para formar sideróforos. El segundo se basa en una vía sideróforo-independiente de NRPS (NIS). Las enzimas NIS funcionan adenilando un grupo carboxilo (sustrato) para su posterior condensación con una poliamina o aminoalcohol (Gulick, 2009). Existen cuatro clases propuestas para enzimas NIS según su especificidad de sustrato para poliaminas o aminoalcoholes y el sustrato que se activa para la condensación posterior (Cotton *et al.* 2009; Oves-Costales *et al.* 2009). Las sintetetasas NIS tipo A catalizan la condensación de ácido cítrico con diversas aminas y alcoholes. La subcategoría de sintetetasa NIS tipo A' cataliza la condensación de ácido cítrico específicamente con aminas. Mientras que las sintetetasas NIS de tipo B catalizan la condensación de α -cetoglutarato con aminas; sin embargo, solo se ha caracterizado bioquímicamente una de esas enzimas (Kadi y Challis, 2009). Las sintetetasas NIS tipo C son específicas para monoaminas o derivados monoéster del ácido cítrico, o derivados monohidroxamato del ácido succínico, y se sabe que algunas





sintetasas NIS tipo C catalizan la formación de sideróforos oligoméricos/macrocíclicos (Oves-Costales *et al.* 2009).

Las enzimas NIS, SfnaD y SfnaB son responsables de la biosíntesis del sideróforo policarboxilato, estafiloferrina A (Fig. 6) en el patógeno bacteriano *Staphylococcus aureus*. En *S. aureus*, SfnaD condensa una molécula de ácido cítrico con una molécula de D-ornitina, formando el intermediario citril-ornitina que luego SfnaB utiliza como sustrato para condensar una segunda molécula de citrato, produciendo el producto final estafiloferrina A (Cotton *et al.* 2009). A diferencia de la estafiloferrina A, la rizoferrina es una molécula simétrica; por lo tanto, la rizoferrina requiere solo de una enzima similar a Sfna para catalizar la condensación de dos moléculas de citrato en una molécula de diaminobutano en reacciones secuenciales, tal enzima (Rfs) es codificada por el gen *rfs* en Mucorales como *R. delemar* y *M. lusitanicus* (Fig. 7) (Carroll *et al.* 2017; Alejandre-Castañeda *et al.* 2022).

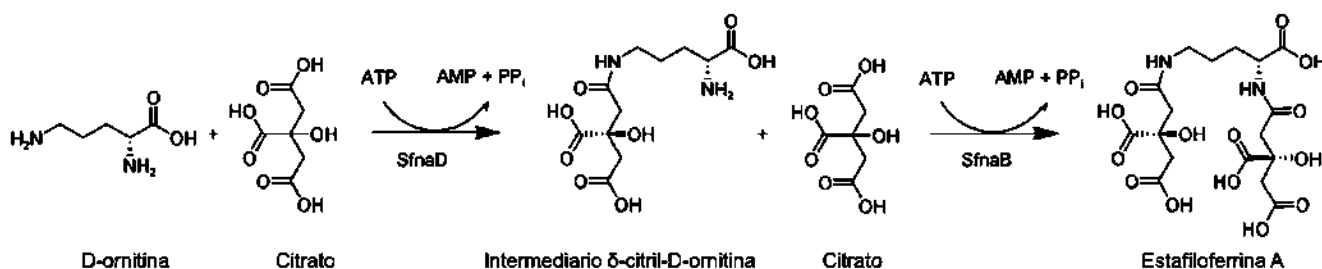
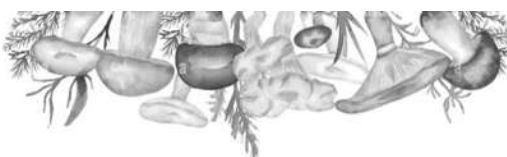


Figura 6. Biosíntesis de la estafiloferrina A. Se muestra la vía de biosíntesis reportada para la estafiloferrina A, cuya reacción requiere de ATP y es catalizada en el siguiente orden, primero SfnaD condensa una molécula de ácido cítrico con una molécula de D-ornitina, formando el intermediario citril-ornitina, posteriormente SfnaB, formando el intermediario citril-D-ornitina, a través de un enlace amida en la δ-amina (tomado y modificado de Cotton *et al.* 2009)



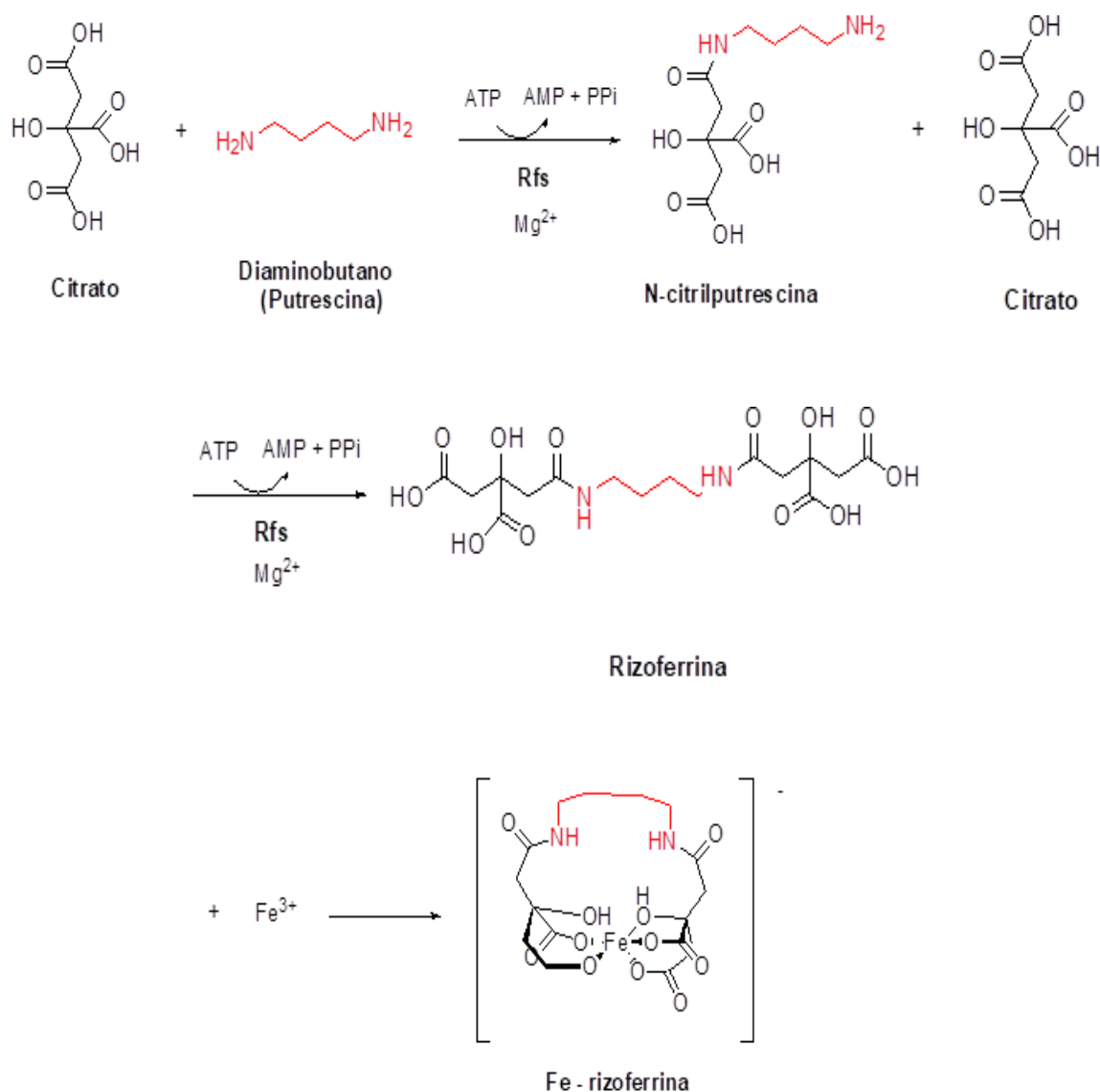


Figura 7. Vía de síntesis propuesta de la rizoferina en Mucorales. La enzima Rfs dependiente de Mg²⁺ cataliza dos reacciones de condensación (dependientes de ATP), en la primera se condensa una molécula de citrato en la molécula de diaminobutano (putrescina) dando lugar al intermediario N-citrilputrescina y en la segunda, se agrega otra molécula de citrato al intermediario dando como resultado final una molécula de rizoferina (Ácido (2 R)-2-[2-({4-[(3 S)-3,4-Dicarboxi-3-hidroxiutanamido]butil}amino)-2-oxoetil]-2-hidroxiutanodioico, nombre IUPAC). Se ilustra la molécula de rizoferina al final de la síntesis y formando el complejo con el Fe³⁺ (Tomado y modificado de Carroll *et al.* 2017; Li *et al.* 2021).





1.2.4.3 Implicación de la homeostasis de hierro en la virulencia de los Mucorales

El hierro es crucial para la supervivencia de los organismos, incluidos los Mucorales. Las células de mamíferos, almacenan hierro unido a proteínas transportadoras como la ferritina, la lactoferrina y la transferrina (Howard, 1999). La CAD u otros tipos de acidosis, niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglicemia) y niveles bajos de pH sanguíneo, en pacientes con hipoglucemia, alteran la afinidad de estas proteínas del huésped para unirse al hierro, lo que resulta en un aumento en la concentración sérica de hierro férrico (Fe^{3+}) libre (Artis *et al.* 1982; Ibrahim, 2014; Gebremariam *et al.* 2016). La mayor disponibilidad de niveles de hierro sérico libre en el huésped puede mejorar la capacidad de los Mucorales para producir una infección rápidamente invasiva (Boelaert, 1994; Boelaert *et al.* 1994; Ibrahim *et al.* 2007). En ratones con CAD, la reducción del número de copias del gen *ftr1* o la inhibición de su expresión empleando ARNi alteró negativamente la capacidad de *R. delemar* para acumular hierro *in vitro* y redujo su patogenicidad (Ibrahim, 2010).

Se describió que los pacientes en hemodiálisis que toman deferoxamina para tratar la toxicidad por sobrecarga de hierro tienen un riesgo muy alto de mucormicosis diseminada y frecuentemente letal (Boelaert *et al.* 1987; Boelaert *et al.* 1989; Boelaert *et al.* 1991; Boelaert, 1994). Para su crecimiento, *R. delemar* utiliza hierro de la ferrioxamina (forma de deferoxamina rica en hierro) como xenosideróforo. De acuerdo a lo reportado *R. delemar* tiene dos receptores de superficie (Fob1 y Fob2) capaces de unir ferrioxamina y mejoran la captación de hierro a través de la vía mediada por la reductasa, Ftr1 lo que explica su capacidad para desarrollarse en ambientes ricos en hierro (Liu *et al.* 2015).



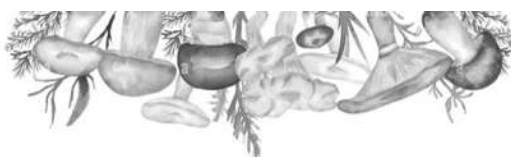


1.3 Proteasas y proteínas de choque térmico

Las proteasas de serina y aspartato (SAP) se reportaron como las proteasas más comunes secretadas por *L. corymbifera* con el 55% y el 36% del total de las proteínas detectadas, respectivamente. Además, las proteínas de choque térmico (HSP) que funcionan como chaperonas (Hassan *et al.* 2020) son predominantes en el genoma de *L. corymbifera* en comparación con otros patógenos fúngicos, hecho que podría explicar la termotolerancia de las especies de los Mucorales (Schwartz *et al.* 2014).

1.4 Micotoxinas

La primera evidencia de la producción de toxinas producidas por Mucorales provino de la observación de que incluso las esporas muertas de *R. oryzae* podían causar daños significativos a las células huésped (Ibrahim *et al.* 2005). A esto le siguió un estudio que relacionaba el brote de intoxicación alimentaria con yogurt por *M. circinelloides* (Lee *et al.* 2014). Recientemente, Soliman *et al.* (2021) revelaron que los Mucorales como *R. oryzae*, *L. corymbifera* y *Cunninghamella bertholletiae* albergan una proteína toxina similar a la ricina de 17 kDa que se expresa durante la fase micelial. La toxina tiene una similitud estructural con la cadena B de ricina y funcionalmente se parece a la cadena A de la ricina al bloquear la síntesis de proteínas del huésped mediante la inactivación ribosómica. Por lo tanto, esta toxina se denominó *mucoricina* y demostró ser crítica para la patogénesis, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica mediante la inactivación de los ribosomas (albergando así actividad RIP, ribosome-inactivating protein), alterar la permeabilidad vascular e inducir tanto necrosis como apoptosis de las células huésped. Además, se reportó que la mucoricina se expresaba en los tejidos pulmonares de un paciente con mucormicosis pulmonar (Soliman *et al.* 2021). Es importante destacar que se demostró que los anticuerpos policlonales dirigidos a la mucoricina protegen a los ratones contra la mucormicosis (Soliman *et al.* 2021), lo que sugiere que un mayor desarrollo de inmunoterapias contra la toxina probablemente ayude en



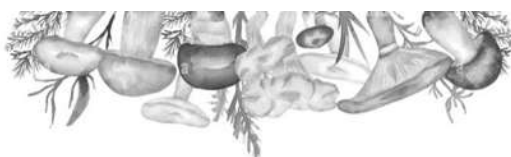


el tratamiento de los pacientes con mucormicosis pero es probable que existan otras toxinas no identificadas, ya que la atenuación de la expresión de mucoricina redujo, pero no anuló, la capacidad de *R. oryzae* para causar daño a las células del huésped (Soliman *et al.* 2021; Alqarihi *et al.* 2023).

1.5 Proteínas de superficie tipo Cot

La familia de genes *cot* codifica proteínas cinasas no convencionales que se encuentran en esporas de diferentes organismos, tanto procariotas como eucariotas (McKenney *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2016). Están relacionados con la regulación de la integridad de las esporas y las cepas mutantes de *Bacillus subtilis* se asocian frecuentemente con una germinación defectuosa (Saggese *et al.* 2014). Los genomas de diferentes Mucorales contienen varias copias de genes *cotH*, y estas proteínas se encuentran en la superficie de las esporas (Saggese *et al.* 2014; Chibucos *et al.* 2016). Por lo general, las especies mucoraleanas que carecen de estas proteínas son avirulentas, y un mayor número de copias de genes *cotH* se asocia con especies más virulentas (Gebremariam *et al.* 2014; Chibucos *et al.* 2016). El mecanismo que relaciona las proteínas CotH con la virulencia se asocia con la adherencia e invasión tisular. Así, las proteínas CotH podrían contener un motivo conservado que interactúa con las células endoteliales del huésped, iniciando la invasión tisular (Chibucos *et al.* 2016; Lebreton *et al.* 2019; Alqarihi *et al.* 2020).

Un estudio reciente mostró 17 genes similares a *cotH* en el genoma de *M. lusitanicus*. La disrupción de cinco de ellos provocó defectos en la adaptación a la temperatura y en el desarrollo de la pared celular. De igual manera, su papel en la virulencia se confirmó en un modelo de ratón (Szebenyi *et al.* 2023). Las proteínas CotH se encuentran en algunas bacterias y Mucorales, pero no en otros hongos como *Candida* y *Aspergillus*, lo que las convierte en un objetivo específico para enfoques terapéuticos y diagnósticos (Baldin *et al.* 2018; Gebremariam *et al.* 2019).





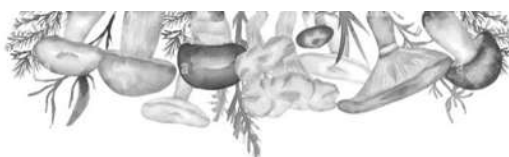
En conclusión, la proteína CotH juega un papel clave durante la patogénesis de la mucormicosis ya que contribuye en el daño a las células inmunitarias (alteración de la respuesta inmune), además, se reportó que CotH es un ligando específico del receptor GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78) de células de mamíferos (Gebremariam *et al.* 2014)

1.6 Factores de riesgo que favorecen la mucormicosis

La mucormicosis es una infección de baja incidencia, pero se han notificado casos esporádicos y pequeños brotes en todo el mundo. Los factores de riesgo de la infección invasiva en casos distintos de COVID-19 incluyen neutropenia prolongada, especialmente en contextos de neoplasias hematológicas, terapia prolongada con esteroides, diabetes mellitus (DM) no controlada y asociada a cetoacidosis diabética, terapia de quelación de hierro y enfermedad renal crónica. Los factores de riesgo adicionales incluyen una ruptura de la barrera cutánea de la inoculación debido a heridas punzantes, incluidas heridas sufridas por explosiones o desastres naturales, quemaduras, heridas quirúrgicas y uso de drogas inyectables (Jeong *et al.* 2019; Narayanan *et al.* 2022).

1.6.1 Papel de la diabetes mellitus mal controlada en la mucormicosis

La hiperglucemia glicosila a la ferritina y la transferrina mientras que el beta-hidroxibutirato (BHB) elevado en la cetoacidosis reduce el pH sérico, estos cambios se observan en la DM no controlada, los cuales disminuyen la afinidad de las proteínas de unión al hierro, permitiendo así que el hierro se libere al torrente sanguíneo dejándolo susceptible de captación por los Mucorales (Ibrahim *et al.* 2012). Mientras que el pH sérico bajo disminuye la quimiotaxis y el efecto fagocítico de los macrófagos y neutrófilos por vías oxidativas y no oxidativas. Los niveles elevados de glucosa, hierro y acidosis metabólica mediada por BHB pueden aumentar la expresión de GRP78 y el ligando fúngico, CotH. Una vez que las esporas entran al organismo, estas germinan y las germinulas se adhieren e invaden las células endoteliales mediante el reconocimiento específico de GRP78, lo que facilita la angiоinvasión





por los Mucorales. La acidosis relacionada con BHB ejerce un efecto directo sobre la expresión de los genes que codifican a GRP78 y CotH (un efecto que no se observa con el ácido láctico) y un efecto indirecto al comprometer la capacidad de la transferrina para unirse al hierro. Además, los niveles elevados de glucosa, hierro y BHB también suprimen la actividad de los linfocitos T y el interferón- γ (IFN- γ) así como la muerte mediada por fagocitosis, creando un entorno único que favorece la proliferación de los Mucorales en el entorno (Narayanan *et al.* 2022).

1.6.2 Efecto de los esteroides en la mucormicosis

La muerte oxidativa y no oxidativa generada por los neutrófilos y macrófagos es la principal línea de defensa contra las esporas fúngicas que entran en el organismo. Los glucocorticoides suprimen varias funciones de los leucocitos polimorfonucleares como la quimiotaxis debido a la disminución de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y la fagocitosis. También suprimen el estallido oxidativo y la generación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno, ERO) y disminuyen la apoptosis de los neutrófilos disfuncionales. Los esteroides causan monocitopenia reversible y alteran la fagocitosis de los macrófagos residentes, así como la maduración, la quimiotaxis y la fusión fagolisosómica del sistema monocito/macrófago. Además, los glucocorticoides disminuyen la secreción de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de los macrófagos; también causan linfopenia y desregulación de los linfocitos T con una respuesta de citoquinas predominantemente TH2, lo que provoca una disminución de IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ , lo que provoca la supresión de la función de las células efectoras de los fagocitos y con ello la progresión de la infección fúngica invasiva. Los glucocorticoides pueden agravar la hiperglucemia en pacientes diabéticos o inducir DM en pacientes predispuestos al causar disfunción aguda de las células beta y resistencia a la insulina en el músculo esquelético y los adipocitos con su uso continuo. Además, pueden





atenuar los signos clínicos de la infección, como la fiebre al bloquear la síntesis de prostaglandinas, los signos radiológicos y contribuir así al retraso del diagnóstico clínico (Lionakis y Kontoyiannis, 2003).

1.7 Mucormicosis: patogénesis

La mucormicosis es una enfermedad cuya letalidad depende de la manifestación clínica presentada, es causada por algunas especies de mucorales, siendo más frecuente *R. oryzae*, seguido de *M. circinelloides* y *L. corymbifera*. En el pasado, la mucormicosis se consideraba una infección rara relacionada con pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, recientemente, una revisión de 851 casos durante el período comprendido entre enero de 2000 y enero de 2017 indica que la incidencia de la infección es mayor en Europa que en Asia, ya que se encontró un 34% en Europa, seguida de Asia (31%), América del Norte y del Sur (28%), África (3%), Australia y Nueva Zelanda (3%). Explicado en parte por el aumento en los casos de pacientes inmunocomprometidos, como personas con trasplantes de órganos, con diabetes mellitus mal controlada asociada a cetoacidosis y cánceres hematológicos, entre otras afectaciones. Sin embargo, se ha reportado que un 19% de los casos de mucormicosis ocurren en pacientes inmunocompetentes que tienen como predisposición la exposición a infecciones traumáticas y por quemaduras, incluidas las heridas por explosiones (Jeong *et al.* 2019; Prakash y Chakrabarti, 2019). Actualmente, la mucormicosis se ha asociado con casos graves de COVID-19 en todo el mundo, especialmente en la India (Hoenigl *et al.* 2022), donde se observó una tasa de mortalidad acumulada del 53% a los 21 días después del ingreso de pacientes con mucormicosis rino-orbito-cerebral asociada con COVID-19 (Choksi *et al.* 2022). Además, la mucormicosis se ha asociado a pacientes con COVID-19, posiblemente debido a dos factores principales: el uso excesivo de esteroides para tratar la infección por COVID-19 y la diabetes no controlada como enfermedad subyacente (Kumar, 2022). La mortalidad asociada a la mucormicosis varía dependiendo de la manifestación clínica presentada, por ejemplo, la mucormicosis cutánea tiene tasas de mortalidad que van del 10 al 25% (Skiada y





Petrikkos, 2013), mientras que la mucormicosis pulmonar presenta una mortalidad de ~57% (Muthu *et al.* 2021), por otro lado, en los casos de infección diseminada por el torrente sanguíneo la mortalidad incrementa hasta un 90% (Lax *et al.* 2022).

Se ha descrito que las esporas fúngicas ingresan al tracto respiratorio por inhalación, a través de la piel por la inoculación directa en áreas de trauma o se ingieren a través del tracto gastrointestinal (Petrikkos y Tsioutis, 2018; Steinbrink y Miceli 2021). Luego de la entrada inicial, las esporas germinan en hifas, lo que resulta en una angioinvasión con el potencial de diseminación hematológica y comprometiendo múltiples órganos. Los factores subyacentes del huésped que deterioran la función del sistema inmunitario también pueden contribuir a la gravedad de la infección por mucormicosis. Por ejemplo, se sabe que los glucocorticoides alteran negativamente la función de los macrófagos, lo que conduce a la progresión de la infección y la enfermedad invasiva (Lionakis y Kontoyiannis, 2003). También se ha documentado que la CAD y la sobrecarga de hierro desempeñan un papel positivo en la patogenia de los Mucorales (Fig. 8) (Ribes *et al.* 2000; Binder *et al.* 2014).

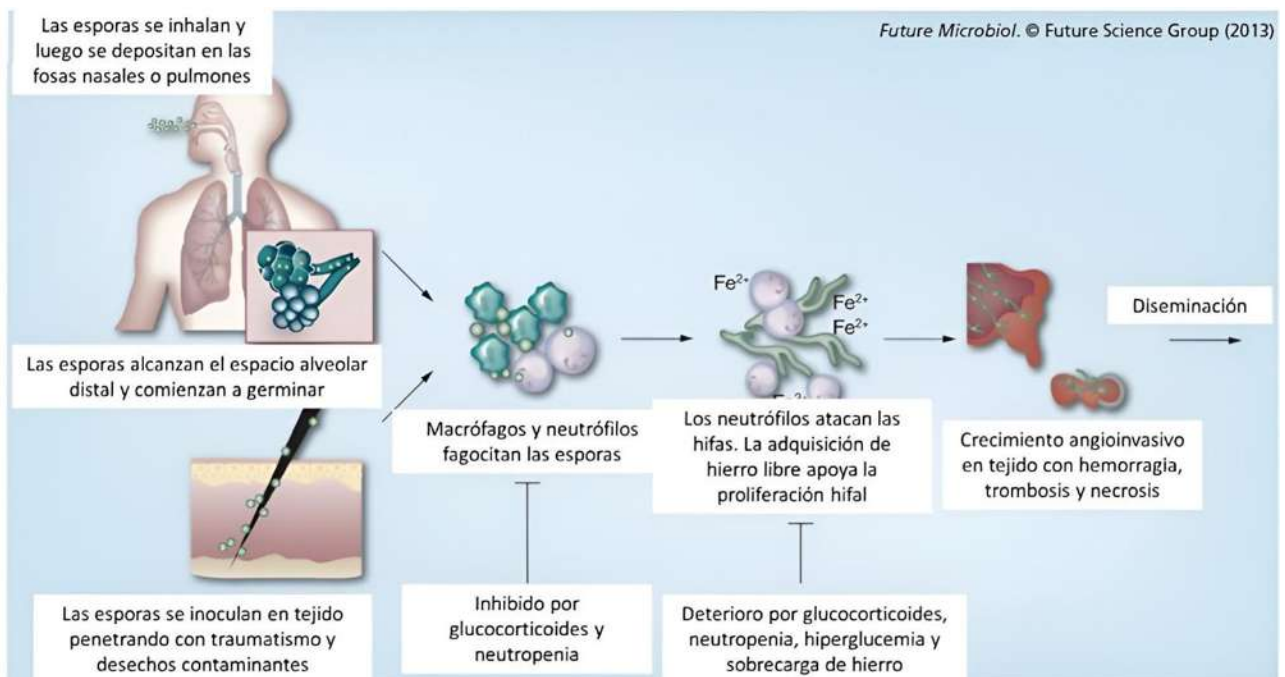
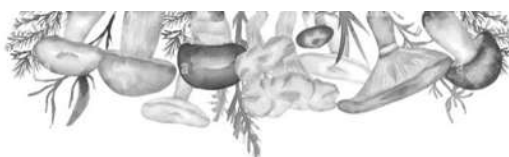


Figura 8. Patogénesis de la mucormicosis. Las esporas de mucorales inhaladas o inoculadas provocan una robusta respuesta inflamatoria. Para establecer la infección, las esporas deben evitar la





muerte por fagocitos mononucleares y polimorfonucleares residentes, lo cual les permitirá germinar en hifas de la forma angioinvasiva de la infección, que eventualmente se disemina a otros órganos (Tomada y modificada de Lewis y Kontoyiannis, 2013).

1.7.1 Mucormicosis rino-orbital-cerebral

La manifestación clínica más común entre los pacientes con diabetes asociada a CAD es la infección rino-orbital-cerebral, que generalmente ocurre cuando las esporas se inhalan a través de los senos paranasales. A partir de ahí, la infección puede permanecer localizada, con síntomas consistentes con sinusitis aguda junto con fiebre, dolor de cabeza, dolor de senos paranasales y congestión nasal. Sin embargo, en huéspedes inmunocomprometidos puede ocurrir una progresión de la infección con invasión de la órbita y el paladar y una mayor extensión al cerebro. Esto puede resultar en una serie de anomalías clínicas significativas que incluyen pérdida de la visión, parálisis de los nervios craneales y cambios en el estado mental (McNulty, 1982). La mucormicosis también puede presentarse como infección pulmonar después de la inhalación de esporas que llegan hasta los pulmones. Esto es más común entre pacientes con neutropenia debido a neoplasias hematológicas, receptores de células madre hematopoyéticas o trasplantes de órganos sólidos (Roden *et al.* 2005; Almyroudis *et al.* 2006; Sun *et al.* 2010; Feng y Sun, 2018). A menudo se presentan síntomas como fiebre, dolor torácico, disnea y hemoptisis (potencialmente masiva y mortal), debido a la invasión de hifas de los vasos sanguíneos y la hemorragia subsiguiente (Connor *et al.* 1979; Hamilos *et al.* 2011). Se ha reportado una tasa de mortalidad del 48-87% para la mucormicosis pulmonar (Kontoyiannis *et al.* 2000; Roden *et al.* 2005; Almyroudis *et al.* 2006; Kontoyiannis *et al.* 2010; Lanternier *et al.* 2012).

1.7.2 Mucormicosis cutánea

La mucormicosis cutánea se puede observar tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos ya que los afectados suelen presentar este tipo de mucormicosis





después de traumatismos, quemaduras, cirugía, uso de apósitos contaminados e inyecciones. Sin embargo, es la forma de infección que posee una menor probabilidad de estar asociada con una enfermedad subyacente del huésped. Las lesiones cutáneas comienzan con eritema doloroso e induración, y progresivamente se vuelven necróticas a medida que evolucionan durante varios días, a menudo con progresión a fascitis necrosante. La mortalidad en esta manifestación clínica es más baja (~25%) que la observada en otras formas de mucormicosis.

1.7.3 Mucormicosis gastrointestinal

Esta es secundaria a la ingestión de esporas. Esta forma clínica puede involucrar múltiples componentes del tracto gastrointestinal, incluida la ulceración gástrica del estómago y la afectación intestinal, así como la perforación intestinal. Muchos pacientes pueden presentar hemorragia gastrointestinal (Roden *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2009).

1.7.4 Mucormicosis diseminada

Esta se observa en pacientes cuyo sistema inmunológico se encuentra gravemente comprometido. Esta manifestación tiene la tasa de mortalidad más alta reportada con un 90-96% en ciertos pacientes a pesar del tratamiento adecuado (Roden *et al.* 2005; Steinbrink y Miceli 2021).

1.8 Generalidades de las proteínas G

La regulación espacio-temporal de muchos procesos celulares está determinada por proteínas que unen nucleótidos de guanina, conocidas como proteínas G, las cuales actúan como interruptores moleculares en la regulación de la actividad y/o localización de una gran variedad de proteínas. Las proteínas G se dividen en dos grandes familias: las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas. Las proteínas G heterotriméricas (PGH) están conformadas por las subunidades α , β y γ , las cuales participan como componentes transductores en vías de señalización tales como la vía AMPc-PKA, la vía MAPK (por sus siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinase), mTOR, mediadas por calcio, lípidos, pH,





luz, estrés oxidativo o por silenciamiento génico, entre otras. Estas proteínas regulan procesos como la división, migración y polaridad celular, así como la organización del citoesqueleto en células de mamífero (Syrovatkina *et al.* 2016), mientras que en hongos regulan el crecimiento vegetativo, la esporulación, la producción de pigmentos y toxinas, la virulencia y la reproducción sexual (El-Defrawy *et al.* 2020).

Por otro lado, las proteínas G monoméricas comprende 5 familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf, las cuales son reguladas por el intercambio de GDP en su estado inactivo a un estado activo cuando se unen a GTP (Wennerberg *et al.* 2005).

1.8.1 Proteínas Ras (Ras sarcoma oncogénesis)

Son proteínas que han sido ampliamente estudiadas por su rol en la oncogénesis humana. Las proteínas Ras sirven como nodos de señalización activados en respuesta a diferentes estímulos extracelulares. Las proteínas Ras activadas interactúan con múltiples efectores río abajo, los cuales regulan la red de señalización citoplasmática involucrada en el control de la expresión génica, regulación de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Wennerberg *et al.* 2005).

1.8.2 Proteínas Rho (Ras homólogos)

Son proteínas que también son clave en la red de señalización que regula la organización del citoesqueleto de actina, la progresión del ciclo celular y la expresión génica (Wennerberg *et al.* 2005).

1.8.3 Proteínas Rab (Ras-like proteins in brain)

Su primera descripción fue como proteínas parecidas a Ras en cerebro. Son reguladores en el transporte intracelular de vesículas y en el tráfico de proteínas entre orgánulos de la vía endocítica y secretora. Estas proteínas facilitan la formación de vesículas, la gemación, la fusión y liberación del contenido de las mismas. La localización de las proteínas





Rab es dependiente del motivo y la especificidad esta dictada por secuencias divergentes en la región C-terminal de las proteínas (Wennerberg *et al.* 2005).

1.8.4 Proteínas Ran (Ras-like nuclear)

Son conocidas por su función en el transporte núcleo-citoplasma de ARN y proteínas, además, funcionan de forma dependiente a un gradiente de Ran-GTP, el cual facilita la importación y exportación nuclear. También regulan la formación del huso mitótico, la replicación del ADN y el ensamble de la envoltura nuclear.

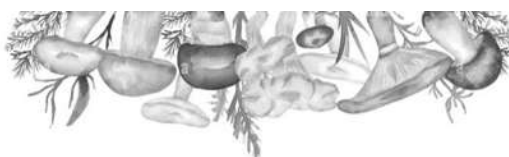
Las proteínas Ran son bien conocidas por su función en el transporte núcleo-citoplasma de ARN y proteínas. Estas proteínas funcionan de forma dependiente a un gradiente de Ran-GTP núcleo-citoplasmático, el cual facilita la importación y exportación nuclear; este gradiente surge de la localización nuclear exclusiva de Ran-GEFs, proteínas que intercambian GDP por GTP en moléculas Ran. Por lo tanto, hay una concentración elevada de RanGTP en el núcleo comparada con el citoplasma. También regulan la formación del huso mitótico, la replicación del ADN y el ensamble de la envoltura nuclear (Wennerberg *et al.* 2005).

1.8.5 Proteínas Arf (ADP ribosylation factor)

Al igual que las proteínas Rab, la familia de las proteínas Arf también está involucrada en la regulación del transporte vesicular. Ciclan entre estados activos e inactivos. Poseen un motivo de miristoilación en la región N-terminal. Regulan la formación de vesículas en diferentes pasos, a diferencia de las proteínas Rab que actúan en un solo paso. Estas participan en el transporte retrogrado entre el Golgi y el RE (COPI), con proteínas adaptadoras 1 y 3 (clatrina y trans-Golgi), en la organización del citoesqueleto de actina y en la regulación de COPII en el retículo endoplasmático (Wennerberg *et al.* 2005).

1.9 Proteínas de la familia Arf

Las proteínas G monoméricas de la familia Arf tienen un peso molecular de alrededor 20 kDa y han sido descritas en todas las células eucariotas. Los miembros de la familia Arf





fueron identificados como un factor requerido por la toxina del cólera, enzima con actividad de ADP-ribosilación, uno de sus sustratos es la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas, dicha subunidad activa a la adenilato ciclasa promoviendo que esta enzima ejerza su efecto tóxico (Kahn y Gilman, 1986). Sin embargo, las funciones fisiológicas de las proteínas Arf no involucran la ADP-ribosilación o la regulación directa de las proteínas G heterotriméricas, sino su participación en el tráfico de membrana y la organización del citoesqueleto (Li y Guo, 2022). Las proteínas Arf tienen una hélice anfipática en el extremo N-terminal, a la cual se le agrega un grupo miristoilo (C:14) que les permite anclarse a la membrana objetivo (Fig. 9). También presentan motivos conservados conocidos como cajas G (G1-G5), responsables de la interacción con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, Guanine Exchange Factor) y la proteína activadora de GTPasa (GAP, GTPase Activator Protein) (Gillingham y Munro, 2007).

La familia de proteínas Arf incluyen a tres grupos diferentes de proteínas: las proteínas Arf, las proteínas Arl (Arf-like) y las proteínas Sar (Secretion-Associated and Ras-related protein). Las proteínas Arl son proteínas que están estructuralmente relacionadas con las proteínas Arf (50-60% identidad), poseen una glicina en la posición +2 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 toxina del cólera.

El nombre de las proteínas Sar se deriva de su identificación como una proteína relacionada con Ras y asociada a la secreción. Las proteínas Sar son ligeramente más cercanas (34-39% identidad) en secuencia con las proteínas Arf que a otras familias de GTPasas monoméricas, pero también comparten una considerable relación funcional con las proteínas Arf, ya que actúan a través del reclutamiento de proteínas de cubierta para iniciar la gemación de vesículas (Kahn *et al.* 2006). Las proteínas Sar1/Arf1 son las principales responsables del reclutamiento de proteínas COP en las membranas y del inicio de la formación de vesículas mediadas por COP, además, gestionan bidireccionalmente el tráfico





vesicular en la vía secretora temprana entre el RE y Golgi: la vía anterógrada del RE a Golgi depende de Sar1, mientras que la vía retrógrada opuesta del Golgi al RE depende de Arf1 (Yorimitsu *et al.* 2014).

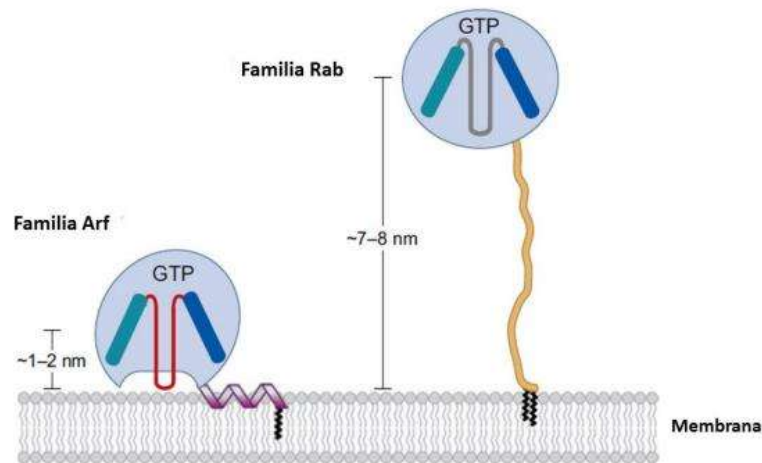
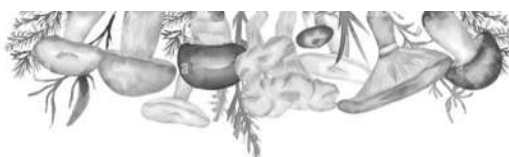


Figura 9. Interacción de las proteínas Rab y Arf con membranas biológicas. Representación esquemática de las proteínas Arf y Rab en una membrana. En las proteínas Rab, la región hipervariable extendida (amarilla) que conecta la proteína G al anclaje lipídico permite que los efectores unidos se alejen más de la bicapa que en el caso de las proteínas Arf. Esta característica de las proteínas Arf puede explicar porque sus efectores son proteínas de cubierta o enzimas modificadoras de lípidos y porque algunas de ellas pueden ayudar a la distorsión de la membrana en la formación de vesículas (Tomada y modificada de Gillingham y Munro, 2007).

1.9.1 Proteínas Arf y sus reguladores

En *S. cerevisiae* se han descrito tres genes que codifican a proteínas Arf (Arf1-3) (Stearns *et al.* 1990a; Hsu y Lee, 2013), en mamíferos, las proteínas Arf se dividen en tres clases, I-III (Jackson y Bouvet, 2014); las Arf fúngicas se agrupan filogenéticamente en las clases I y III respecto a las Arf de mamíferos (Yorimitsu *et al.* 2014). Las proteínas Arf1 y Arf2 de *S. cerevisiae*, que pertenecen a la clase I, participan en la vía exocítica y son esenciales, ya que la doble mutación $\Delta arf1/\Delta arf2$ no es viable (Stearns *et al.* 1990a). Por el contrario, Arf3 de *S. cerevisiae*, que pertenece a la clase III, participa en la organización del citoesqueleto





(Lambert *et al.* 2007) y aparentemente en la endocitosis (Smaczynska-de *et al.* 2008). En *Aspergillus nidulans*, ArfB, el homólogo de Arf3 de *S. cerevisiae*, interviene en el crecimiento polarizado y la endocitosis (Lee *et al.* 2008a). Se demostró que *C. albicans* alberga cinco genes *arf* homólogos: tres genes *arf*(1-3) y dos genes *arl*1 (1 y 3); curiosamente, la reducción de la expresión de *arf2* causó alteraciones en la polarización de las hifas, así como en la virulencia, mientras que el producto *arl1* también era necesario para el crecimiento filamentoso invasivo (Labbaoui *et al.* 2017). *M. lusitanicus* posee cuatro genes *arf* (1-4) y dos *arl* (1-2) (Patiño-Medina *et al.* 2018, 2019b).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas Arf de mamífero se clasifican en tres grupos en base a su secuencia y relación filogenética (Tabla 1). La clase I está conformada por las proteínas Arf1-Arf3, la clase II por las proteínas Arf4-Arf5 y la clase III por la proteína Arf6. Las plantas y levaduras carecen de proteínas Arf de clase II (Yorimitsu *et al.* 2014)

Tabla 1. Función asociada a proteínas Arf según su clasificación en mamíferos

Clase	Función
I	Reclutan efectores en el aparato de Golgi, participan en la formación de COPI, en el reclutamiento de la proteína adaptadora de clatrina I, en el reclutamiento de proteínas transportadoras de lípidos en el trans-Golgi y regulan el intercambio de enzimas sintetizadoras de quitina en levadura.
II	La función de las proteínas de clase II no es del todo clara. Mediante silenciamiento génico se observó que había redundancia de función entre la clase I y II en el tráfico de membrana del aparato de Golgi y la mutación de genes <i>arf</i> pertenecientes a la clase II, muestra efectos similares a funciones asociadas con genes <i>arf</i> de la clase I.
III	Son las más divergentes en secuencia. Se localizan en la membrana plasmática regulando procesos como la endocitosis, citocinesis y la organización del citoesqueleto de actina (motilidad celular). La disrupción del gen <i>arf6</i> en ratón causó la pérdida de viabilidad a los pocos días del nacimiento por defectos en el desarrollo del hígado.

Tomado y modificado de Gillingham y Munro, 2007.





Una característica distintiva de las proteínas Arf es la presencia de una hélice anfipática N-terminal miristoilada. Tras la unión de GTP, esta hélice se inserta en la bicapa lipídica, lo que da como resultado una fuerte asociación con la membrana (Antonny *et al.* 1997). Por lo tanto, además de los cambios en las regiones de recambio (de unión a GTP), hay un segundo cambio en la conformación en la forma de Arf unida a GTP, debido al movimiento de la región de cambio hacia la región hidrofóbica que alberga la hélice anfipática en la forma unida a GDP (Fig. 10) (Goldberg, 1998; Pasqualato *et al.* 2001; Liu *et al.* 2010).

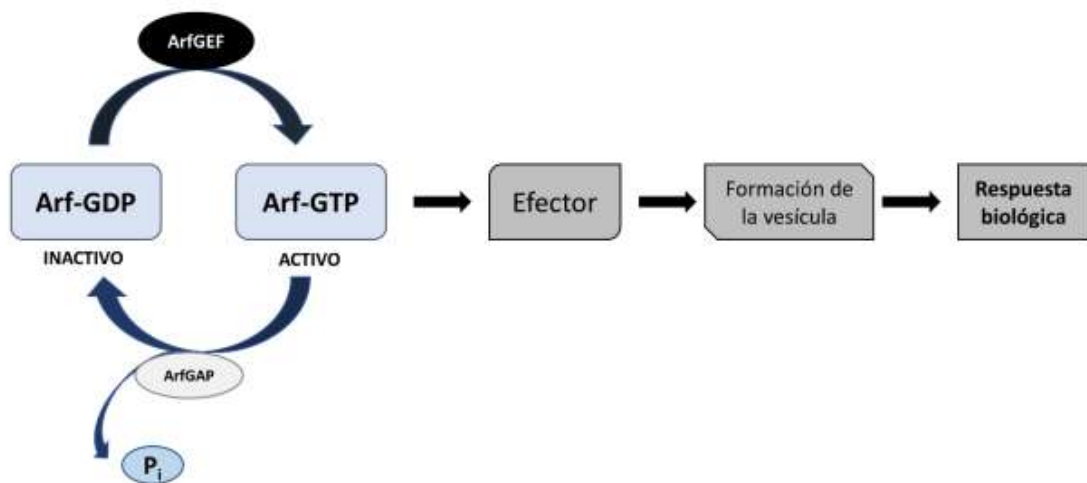


Figura 10. Regulación de las proteínas Arf. Las proteínas Arf oscilan entre un estado activo cuando unen GTP y un estado inactivo cuando unen GDP. El Factor Intercambiador de nucleótidos de guanina (ArfGEF) contribuye a la activación de las proteínas Arf, lo que conduce a la interacción con un efector, la formación de la vesícula y por consiguiente una función asociada a una respuesta biológica específica. Por otro lado, la Proteína Activadora de GTPasa (ArfGAP) contribuye a la desactivación de las proteínas Arfs al estimular la actividad intrínseca de GTPasa de las proteínas Arf conduciendo a la hidrólisis de un grupo fosfato del GTP y disociación de la proteína Arf del anclaje a la membrana (Tomada y modificada de East *et al.* 2011).

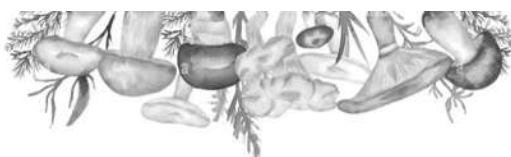
Los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de proteínas Arf catalizan la liberación de GDP de su sustrato Arf, lo que permite que una GTP. Esta actividad la lleva a cabo el dominio Sec7 de las proteínas ArfGEF, el cual está conservado evolutivamente (Chardin *et al.* 1996; Peyroche *et al.* 1996). Las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) de





proteínas Arf, catalizan la hidrólisis de un grupo fosfato de GTP a GDP en su sustrato Arf a través de un dominio invariable (conservado) C-X₂-CX₁₆₋₁₇-C-X₂-C-X₄-R, las cuatro cisteínas forman el dedo de zinc que desempeña una función estructural, en cambio, la arginina es soluble, sugiriendo que esta puede mediar la acción catalítica de varias otras clases de GAP, incluidas las de Ras, Rho, Rab y Sar1 (Vetter y Wittinghofer, 2001), al insertarse en el sitio activo de la proteína G donde directamente cataliza la hidrólisis de GTP. En conclusión, la arginina es esencial para la actividad de varias ArfGAP (Cukierman *et al.* 1995; Mandiyan *et al.* 1999; Szafer *et al.* 2000; Gillingham y Munro, 2007).

Tras la activación, Arf-GTP recluta proteínas específicas llamadas efectores en la superficie de la membrana con la finalidad de generar la vesícula (Fig. 11). Aunque los efectores de Arf generalmente se unen a la forma de la proteína unida a GTP, para al menos un subconjunto de Arf (Arf4, Arf5 y Arf6), la forma unida a GDP también puede interactuar con un conjunto separado de proteínas en las membranas, lo que aumenta la capacidad de señalización (Donaldson y Jackson, 2011). Los efectores clásicos incluyen complejos de cubierta, enzimas modificadoras de lípidos, proteínas de transferencia de lípidos, anclas de membrana, proteínas de andamiaje y reguladores de actina (Jackson *et al.* 2014).



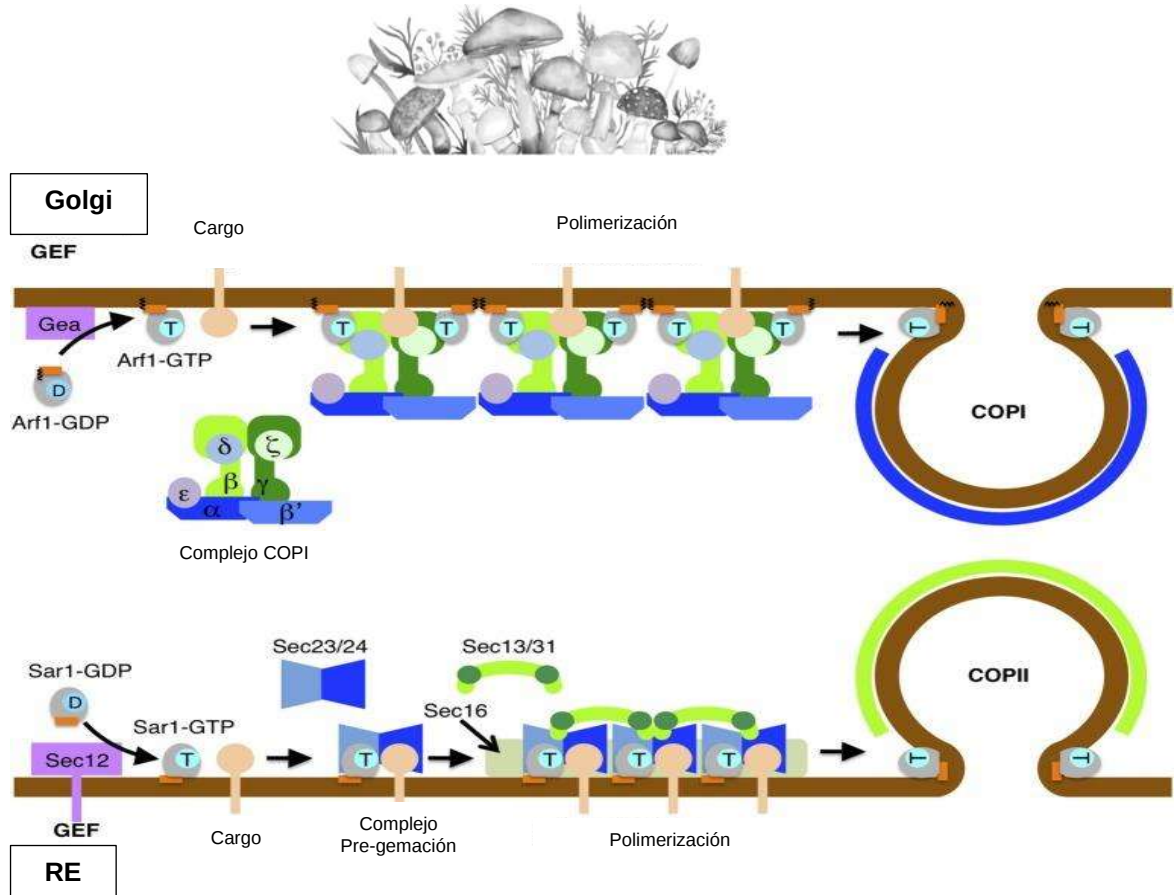


Figura 11. El ensamblaje de las proteínas COPI y COPII estimula la formación de vesículas. La formación de vesículas comienza con el reclutamiento de Sar1 y Arf1 en las membranas retículo endoplásmico RE (inferior) y aparato de Golgi (superior), respectivamente. En la formación de vesículas COPII, la proteína de membrana integral del RE, Sec12 intercambia GDP por GTP en Sar1, a través de su actividad GEF. La proteína Sar1 unida a GTP, se asocia a la membrana reclutando el complejo Sec23/24 y luego se ensambla junto con la proteína cargo en el complejo de pre-gemación. Los complejos Sec13/31 de la capa exterior se reclutan a los complejos de pre-gemación y se autoensamblan mediante reticulación. La polimerización de Sec13/31 por autoensamblaje impulsa la curvatura de la membrana para formar una vesícula de forma esférica. La formación de vesículas COPI también se inicia por el intercambio GTP-GDP en Arf1 a través de la acción de la proteína GEF Gea (Gea1 o Gea2), que se encuentra periféricamente en la membrana de Golgi. Arf1 unido a GTP se une de manera estable a la membrana mediante una hélice anfipática miristoilada, al igual que Sar1. El complejo heptámero de la capa COPI se recluta en bloque y se asocia con la proteína cargo, así como con dos moléculas de Arf1 a través del complejo de la capa interna ($\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -COP). Al igual que en COPII, las vesículas se forman tras la polimerización de la capa externa ($\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP). La hélice anfipática de Sar1 y Arf1 participan en la gemación de las vesículas (Tomado y modificado de Yorimitsu *et al.* 2014).



1.10 Proteínas ArfGEF

La mayoría de las funciones celulares que involucran a las proteínas de la familia Arf comienza con el intercambio de GDP a GTP, proceso que llevan a cabo las proteínas ArfGEF. Las proteínas ArfGEF son factores intercambiadores de nucleótidos de guanina específicos para proteínas de la familia Arf. Estas proteínas son consideradas altamente divergentes en cuanto al número de aminoácidos que las conforman, sin embargo, todas las proteínas ArfGEF poseen el dominio SEC7. Este dominio está formado por aproximadamente 200 aminoácidos y es el que lleva a cabo la función de intercambio de nucleótidos de guanina (Jackson y Casanova, 2000). Presenta dos regiones importantes, la primera conocida como F-G lazo, en donde se encuentra un residuo crítico de glutamato que lleva a cabo la catálisis, y la segunda conocida como hélice alfa H, en donde se encuentran residuos que son importantes en la eficiencia de la actividad de intercambio de nucleótidos de guanina y donde ejerce su efecto negativo la brefeldina A (Sztul *et al.* 2019).

Una característica importante de las proteínas ArfGEF es la inhibición de su función por la brefeldina A, un metabolito fúngico que se ha demostrado interferir de manera reversible con el transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, esto debido a que la brefeldina A estabiliza el complejo ternario Arf-GDP-GEF y mantiene a la proteína ArfGEF en un complejo inactivo con su sustrato. Un análisis estructural reveló que la brefeldina A se une a la interfaz de unión entre el dominio SEC7 y Arf1 y por lo tanto estabiliza la interacción (Renault *et al.* 2003).

Las proteínas ArfGEF se clasifican de acuerdo a su peso molecular como proteínas ArfGEF de bajo peso molecular (<500 kDa), de mediano peso molecular (>500 kDa y <1500 kDa) o alto peso molecular (>1500 kDa); por su sensibilidad a la brefeldina A; como sensibles o insensibles y finalmente respecto a la familia, como proteínas de la familia BIG/Sec7, la familia GBF1/Gea o citohesina/derivados.





Las proteínas ArfGEF de la familia BIG/Sec7 son proteínas de alto peso molecular, todas ellas con pesos de alrededor de 2000 kDa y sensibles a brefeldina A. Además del dominio SEC7 poseen 6 dominios adicionales: el dominio DBC (Dimerization/Cyclophilin Binding) con ~150 aa, el dominio HUS (Homology Upstream of SEC7) con ~170 aa, los dominios HDS1-4 (Homology Downstream of Sec7) con ~130 aa, ~160 aa, ~120 aa y ~100 aa, respectivamente. Las funciones propuestas para los dominios conservados incluyen la oligomerización (dominio DBC), la percepción de señales, localización específica de membrana, regulación de la actividad de intercambio de GDP/GTP, andamiaje de proteínas Arf a sus efectores río abajo, sin excluir la señalización de otras vías que no incluyan proteínas Arf (los dominios restantes) (Mouratou *et al.* 2005). Algunos representantes de esta familia son las proteínas BIG1 y BIG2 de humano, la proteína Sec7p de *S. cerevisiae*, la proteína Sec72p de *Schizosaccharomyces pombe*, la proteína HypB de *A. nidulans*, BIG1-5 de *Arabidopsis thaliana*, entre otros.

Las proteínas de la familia GFB1/Gea son proteínas de mediano peso molecular e insensibles a brefeldina A. Además del dominio SEC7 poseen los dominios DBC, HUS, HDS1, HDS2 y HDS3 (Mouratou *et al.* 2005). Algunos miembros representativos de esta familia son la proteína GFB1 de humano, las proteínas Gea1 y Gea2 de *S. cerevisiae*, la proteína GNOM de *A. thaliana*, entre otros.

Las proteínas ArfGEF de la familia citohesina/derivados son proteínas de bajo y medio peso molecular. Además de poseer el dominio SEC7 también poseen el dominio PH, el cual está involucrado en la interacción con la membrana específica y en la señalización mediada por membranas (Feng *et al.* 2019). Algunos miembros representativos de esta familia son las proteínas citohesinas 1-4, GRP1 y EFA6 de humano, SYT1 de *S. cerevisiae*, entre otros. En plantas no se han encontrado miembros de esta familia (Singh *et al.* 2018).





1.10.1 Funciones de proteínas de la familia Arf y ArfGEF

Las proteínas de la familia Arf son reguladores clave de una gran variedad de funciones celulares, que en conjunto con las proteínas ArfGEF y ArfGAP tienen participación en procesos como el tráfico de membrana bidireccional, ciliogénesis, metabolismo de lípidos, señalización, energía, motilidad, división celular, diferenciación, apoptosis y regulación transcripcional (Sztul *et al.* 2019). En humano ha sido descrita la participación de 27 miembros de la familia Arf, incluyendo 5 proteínas Arf, 20 proteínas Arl y dos proteínas Sar (Sztul *et al.* 2019).

Las proteínas Arf han mostrado ser relevantes en el mantenimiento del aparato de Golgi, retículo endoplasmático, endosomas, membrana plasmática y citoesqueleto. Presentan interactores como la toxina del cólera, proteínas de cubierta como COPI, COPII, proteínas adaptadoras (AP), proteínas adaptadoras del aparato de Golgi (GGAs), fosfolipasa D, fosfatidil inositol cinasas, filamentos de actina, proteínas ArfGEF y proteínas ArfGAP (Sztul *et al.* 2019).

Las proteínas Arl han mostrado ser relevantes en el mantenimiento del aparato de Golgi, membrana plasmática, mitocondria, núcleo, lisosomas y cilios. Presentan interactores como fosfolipasas, golginas, filamentos de tubulina, otras Arfs y citohesinas. Por otro lado, las proteínas Sar se han encontrado en el retículo endoplasmático y participan en la formación de vesículas con cubierta COPII (Sztul *et al.* 2019).

Las proteínas de la familia Arf han sido poco caracterizadas en plantas. Sin embargo, en las plantas solo hay miembros de la clase I que se dividen en dos grupos A y B. Se ha observado la localización de ArfB en la membrana plasmática y Arf1 ha sido implicada en el tráfico RE-Golgi, endocitosis y tráfico a la vacuola (Singh *et al.* 2018). Por el contrario, en hongos, las proteínas de la familia Arf han sido más estudiadas y se ha observado que algunas de ellas son necesarias para la viabilidad celular (Tabla 2).

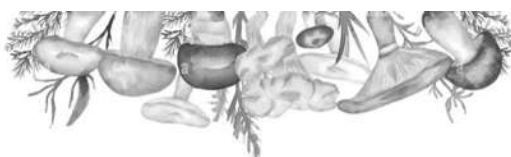




Tabla 2. Función de proteínas Arf en hongos

Gen	Fenotipo	Referencia
<i>Scarf1</i>	Crecimiento adecuado en medio rico y en presencia de frío y ion F ⁻ y homeostasis mitocondrial	(Stearns <i>et al.</i> 1990; Ackema <i>et al.</i> 2014)
<i>Scarf2</i>	Fenotipo no detectable	
<i>Scarf3</i>	Organización de los filamentos de actina y crecimiento invasivo en baja glucosa	(Lambert <i>et al.</i> 2007; Hsu y Lee, 2013)
<i>Scarl1</i>	Participa en la ruta secretora, resistencia a hygromicina B, asimilación de Li ⁺ , transporte anterógrado del Golgi a la membrana plasmática de Gas1p, regulación espacial de la organización de membrana del tras-Golgi y autofagia	(Rosenwald <i>et al.</i> 2002; Munson y col., 2004; Liu <i>et al.</i> 2006; Tsai <i>et al.</i> 2013; Yang y Rosenwald, 2016)
<i>Scarl2</i>	Regulación positiva la dinámica de los microtúbulos.	(Nithianantham <i>et al.</i> 2015)
<i>Scarl3</i>	Mantenimiento del aparato de Golgi y es acetilada en lugar de miristoilada	(Panic <i>et al.</i> 2003; Setty <i>et al.</i> 2004)
<i>Sparf1</i>	No caracterizado	(Erickson <i>et al.</i> 1993)
<i>Sparf6</i>	Regulación positiva del crecimiento bipolar	(Fujita, 2008)
<i>Spsar1</i>	Trafico entre el RE-Golgi	(d'Enfert <i>et al.</i> 1992)
<i>AnarfA</i>	Esencial para el hongo y participa en la ruta secretora	(Lee <i>et al.</i> 2008a)
<i>AnarfB</i>	Establecimiento de la polaridad por endocitosis y mantenimiento de la polaridad de la hifa	(Lee <i>et al.</i> 2008b)
<i>AnsarA</i>	Esencial para el hongo y regula el mantenimiento del RE	(Hernández-González <i>et al.</i> 2015)
<i>AniarfA</i>	Esencial para el hongo y participa en el crecimiento, morfología y en la ruta secretora	(Fiedler <i>et al.</i> 2018)
<i>Caarf1</i>	Fenotipo no detectable	Labbaoui <i>et al.</i> 2017)
<i>Caarf2</i>	Esencial para el hongo y necesario para el crecimiento filamentosos y virulencia	
<i>Caarf3</i>	Necesario para el crecimiento invasivo y la integridad de la pared celular	
<i>Caarl1</i>	Necesario para el crecimiento filamentosos, secreción y virulencia	
<i>Caarl3</i>	Necesario para el crecimiento invasivo y la integridad de la pared celular	
<i>Casar1</i>	No caracterizado	(Jiang <i>et al.</i> 2002)
<i>Moarf1</i>	Esencial para el hongo	(Zhang <i>et al.</i> 2019)
<i>Moarl1</i>	Participa en la endocitosis, conidiación, crecimiento invasivo y virulencia	
<i>Moarl3</i>	Regulador positivo de la conidiación	
<i>Moarl8</i>	Fenotipo no detectable	
<i>Mosar1</i>	Esencial para el hongo	
<i>Moarf6</i>	Participa en la endocitosis y el establecimiento de la polaridad durante el desarrollo asexual	(Zhu <i>et al.</i> 2016)
<i>Foarf1</i>	Esencial para el hongo	(Araiza-Cervantes <i>et al.</i> 2021)
<i>Foarl3</i>	Regulador positivo de la virulencia	
<i>Mlarf1</i>	Regula de forma positiva el crecimiento micelial en sustrato sólido, el desarrollo del esporangióforo, la	(Patiño-Medina <i>et al.</i> 2018)





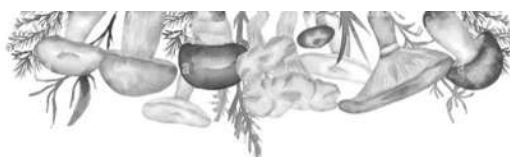
	esporulación y el tamaño de espora. En medio líquido regula el tamaño de célula madre, el número de hifas y la longitud de las mismas. Es un regulador positivo de la formación de zigosporas (reproducción sexual) y un regulador negativo de la virulencia	
<i>Mlarf2</i>	Es esencial para el desarrollo levaduriforme. Regula de forma positiva la esporulación y la polaridad de la hifa. Es un regulador negativo de la virulencia	
<i>Mlarf3</i>	Regulan de forma positiva y parcialmente la esporulación y la polaridad de la hifa. Es un regulador negativo de la virulencia	
<i>Mlarf4</i>	Regulan de forma positiva y parcialmente la esporulación y la polaridad de la hifa	
<i>Mlar1</i>	Esencial para el hongo. Regula de forma positiva el desarrollo de micelio y esporulación en sustrato sólido y el desarrollo de micelio en medio líquido. Es un regulador negativo de la virulencia y regula de forma positiva el mantenimiento mitocondrial	Patiño-Medina <i>et al.</i> 2019; Patiño-Medina <i>et al.</i> 2020)
<i>Mlar2</i>	Regula de forma positiva el mantenimiento mitocondrial	

Tomada y modificada de Patiño-Medina, 2022.

Los prefijos hacen referencia a los organismos estudiados: *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), *A. nidulans* (An), *A. niger* (Ani), *C. albicans* (Ca), *Magnaporthe oryzae* (Mo), *Fusarium oxysporum* y *M. lusitanicus* (Ml).

Para el caso de proteínas ArfGEF, se han caracterizado 15 miembros de esta familia en el humano (Sztul *et al.* 2019). Las funciones asociadas a algunas de ellas son las siguientes: las proteínas BIG1 y BIG2 son sensibles a brefeldina A y activadores de proteínas Arf de clase I (Arf1 y Arf3) y regulan el mantenimiento del trans-Golgi; la proteína GBF1 es insensible a brefeldina A y regula el mantenimiento del cis-Golgi; las proteínas citohesina1-4 regulan la adhesión y migración celular, así como el reciclamiento de endosomas y remodelamiento del citoesqueleto y se ubican en la membrana plasmática, endosomas y retículo endoplasmático. Otras proteínas de esta última familia como GRP1 y EFA6 regulan la migración celular y el reciclamiento de endosomas y se ubican en la membrana plasmática y endosomas.

En plantas se ha descrito la participación de 8 miembros de la familia Arf (Singh *et al.* 2018). Las proteínas GN, GNL1 y GNL2, homologas a GFB1, participan el reciclamiento polar del flujo de auxinas a través del transportador de auxinas PIN1 y en el transporte retrogrado





en la formación de las vesículas cubiertas con COPI del aparato de Golgi al RE. Por otro lado, las proteínas BIG1-5 tienen funciones redundantes en la ruta secretora, el tráfico vesicular en la vacuola y la división celular. También BIG5 regula la respuesta a patógenos y el reciclamiento de endosomas. Interesantemente, todas las proteínas ArfGEF de *A. thaliana* activan a proteínas Arf de clase I (proteínas Arf del grupo A y B).

De igual forma esta familia de proteínas ha sido más estudiada en los hongos que en las plantas y también existen reportes en donde su función es vital para la fisiología de los hongos (Tabla 3).

Tabla 3. Funciones de las proteínas de la familia ArfGEF en hongos

Gen	Función	Referencia
<i>Scsec7</i>	Sensible a brefeldina A. Regulación de la ruta secretora y biogénesis del Golgi	(Deitz <i>et al.</i> 2000)
<i>Scgea1</i>	Sensible a brefeldina A y regula el transporte entre el RE-Golgi. También regula el mantenimiento mitocondrial y el reciclamiento de mitocondrias a través de la mitofagia	(Pyroche <i>et al.</i> 1996; Ackema <i>et al.</i> 2014)
<i>Scgea2</i>	Regula el transporte anterógrado independientemente a su rol en el transporte retrogrado. También regula el mantenimiento mitocondrial y el reciclamiento de mitocondrias a través de la mitofagia	(Pyroche <i>et al.</i> 2001; Park <i>et al.</i> 2005; Ackema <i>et al.</i> 2014)
<i>Scyel1</i>	Activador de Arf3. Regula el crecimiento polarizado y se ubica en la membrana plasmática	(Gillingham y Munro, 2007)
<i>Scsyt1</i>	Activador de Arf2 y Arl1	(Jones <i>et al.</i> 1999; Chen <i>et al.</i> 2010)
<i>Scsnf1</i>	Es un receptor tirosin cinasa que posee un dominio SEC7 no canónico que activa a Arf3 en deficiencia de glucosa para promover un crecimiento invasivo	(Hsu <i>et al.</i> 2015)
<i>Scsec12</i>	Activador de Sar1	(Barlowe y Schekman, 1993)
<i>Spspo14</i>	Esencial para el hongo y participa como activador de Sar1	(Nakamura-Kubo <i>et al.</i> 2003)
<i>AnhypB</i>	Esencial para el hongo y regula el crecimiento polarizado y división celular	(Yang <i>et al.</i> 2008; Arts <i>et al.</i> 2014)
<i>Ansec12</i>	Esencial para el hongo, activador de SarA y se ubica en el RE	(Bravo-Plaza <i>et al.</i> 2019)

Tomada y modificada de Patiño-Medina, 2022.

Los prefijos hacen referencia a los organismos estudiados: *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), *A. nidulans* (An).





1.11 Vías de señalización

Los seres vivos al estar en constante interacción con su entorno, deben de tener mecanismos que les permitan detectar y responder ante los cambios del mismo. A nivel molecular esto lo hacen a través de las vías de señalización, las cuales son una serie de reacciones químicas consecutivas en donde se percibe una señal del entorno y esta se traduce en una cascada de señalización hasta un efector final que conllevará a la activación o represión de factores de transcripción que regulan la expresión génica asociada a la función biológica específica a la que se adaptará el ser vivo (Azpeitia *et al.* 2020).

1.11.1 La vía MAPK

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos, también llamada vía de las MAP cinasas o vía MAPK (del inglés mitogen-activated protein kinases) ha sido asociada a la regulación de procesos como el ciclo celular, reproducción sexual, morfogénesis, respuesta a estrés, homeostasis de la pared celular y virulencia (Martínez-Soto y Ruiz-Herrera, 2017); la vía mTOR ha sido asociada en la regulación del crecimiento en respuesta a los cambios del entorno y como un sensor en el estatus nutricional (Otsubo y Yamamoto, 2008). La señalización mediada por calcio ha sido asociada a la regulación de procesos como crecimiento, desarrollo, secreción, transporte y estrés (Li *et al.* 2019); la señalización mediada por lípidos (diacil glicerol, farnesol, eicosanoides, entre otros) ha sido asociada a la regulación de procesos como crecimiento, diferenciación, apoptosis y virulencia (Shea y Del Poeta, 2006). La señalización mediada por pH ha sido asociada a la regulación de procesos como la biosíntesis de sideróforos, homeostasis de hierro y cobre, producción de proteasas y permeasas alcalinas y acidas, remodelación de membrana y pared celular, esporulación, morfogénesis, crecimiento invasivo y formación de biofilm (Cornet y Gaillardin, 2014); la señalización mediada por luz, ha sido asociada a la regulación de procesos como la esporulación, crecimiento vegetativo, desarrollo sexual y asexual, respuesta a estrés,



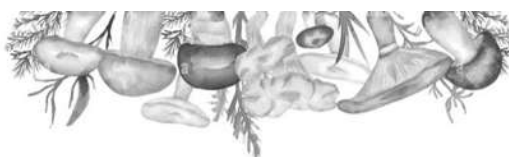


metabolismo secundario, toma de nutrientes y virulencia (Yu y Fischer, 2019); la señalización mediada por estrés oxidativo participa en la regulación de procesos como crecimiento y desarrollo, metabolismo secundario y respuesta a estrés (Zhao *et al.* 2020) así como en la morfogénesis y virulencia (Heller y Tudzynski, 2011) y finalmente la señalización mediada por el silenciamiento génico regula procesos como defensa de ADN potencialmente dañino, integridad del genoma, esporulación, desarrollo sexual y asexual, resistencia a antifúngicos y virulencia (Lax *et al.* 2020a).

1.11.2 La vía AMPc-PKA

La vía AMPc-PKA constituye una de las vías más importantes en eucariotas y se ha conservado a lo largo de la evolución. Regula procesos como el ciclo celular, el metabolismo de lípidos y azúcares, el citoesqueleto, el tráfico vesicular, entre otros (Shabb, 2001). En hongos ha sido asociada en la regulación de procesos como la percepción de nutrientes, la morfogénesis, la reproducción sexual, la homeostasis mitocondrial y la virulencia (Choi *et al.* 2015).

Los componentes de la vía AMPc-PKA han sido descritos en gran detalle en el hongo *S. cerevisiae*. En general la ruta es activada por nutrientes o estímulos del entorno, que son percibidos en la superficie celular por receptores acoplados a proteínas G, GPCR, por sus siglas en inglés, G-protein coupled receptors. La detección de un estímulo o señal a través de un receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas (GPCR) resulta en la activación de las proteínas G heterotriméricas, en donde la subunidad α se disocia del heterotetrámero e intercambia GDP por GTP, así la subunidad α -GTP y el dímero $\beta\gamma$ se consideran como unidades funcionales, o bien la activación de proteínas Ras con el intercambio de GDP por GTP. Posteriormente la subunidad α -GTP o Ras-GTP estimularan la actividad de la adenilato ciclasa (Cyr) para la síntesis de AMPc, incrementando así los niveles intracelulares de dicho mensajero. El impacto de elevar los niveles intracelulares de AMPc es activar a la PKA





dependiente de AMPc. La proteína PKA es un homotetrámero conformado por un homodímero con actividad regulatoria (PkaR) y un homodímero con actividad catalítica (PkaC). Dos moléculas de AMPc se unen al homodímero PkaR para regular la disociación de la PKA de forma alostérica dejando libre al homodímero PkaC, el cual fosforilará proteínas río abajo (enzimas de las rutas metabólicas, proteínas estructurales, factores de transcripción). Una vez que la función ha sido realizada, la fosfodiesterasa (Pde2) llevará a cabo la degradación del AMPc en AMP (Choi *et al.* 2015) (Fig. 12).

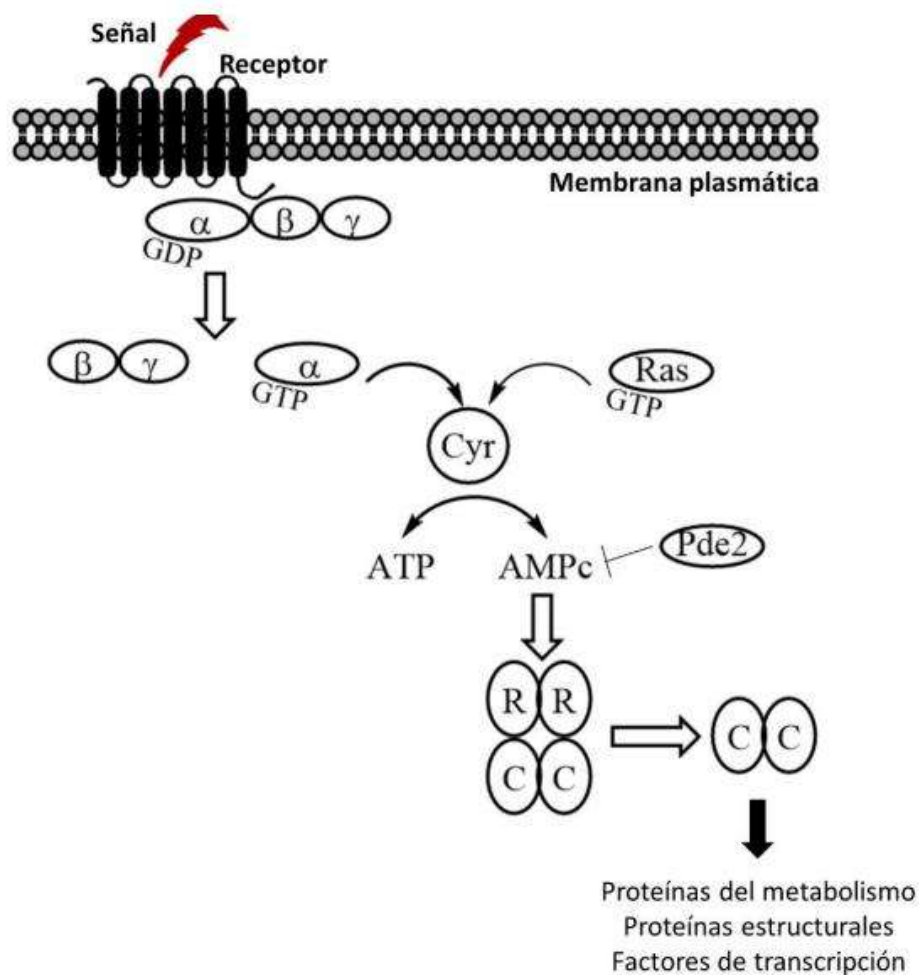


Figura 12. Descripción general de la vía AMPc-PKA. Esta es una vía canónica en células eucariotas que mediante la fosforilación de proteínas blanco en sitios consenso (R/K-R/K/-X-T/S) regula positiva o negativamente una gran variedad de procesos celulares. Los componentes de la vía son, un receptor ubicado en la membrana plasmática, un componente transductor (las proteínas G heterotriméricas o las





proteínas Ras), la adenilato ciclasa (Cyr), la proteína PKA y una fosfodiesterasa (Pde2). En presencia de niveles elevados de AMPc sintetizados por Cyr, dos moléculas de AMPc se unen al homodímero de una subunidad regulatoria (PkaR), dejando libre al homodímero de una subunidad catalítica (PkaC) conduciendo así a la fosforilación de proteínas río abajo (Tomado y modificado de Choi *et al.* 2015).

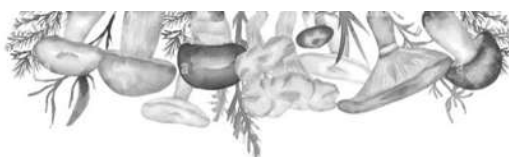
Interesantemente, en hongos como *S. cerevisiae* y *C. albicans* el incremento de AMPc intracelular conduce a un metabolismo oxidativo, un crecimiento invasivo y un fenotipo virulento (Pan *et al.* 2000; Lin y Chen, 2018), mientras que en *M. lusitanicus* se asocia a niveles elevados de AMPc, metabolismo fermentativo, crecimiento levaduriforme, fenotipo no virulento y poca acumulación del sideróforo rizoferrina (Vellanky *et al.* 2020; Alejandre-Castañeda *et al.* 2022).

1.12 Proteínas Arf y su relación con la mitocondria

Las proteínas Arf se encuentran ampliamente conservadas en organismos eucariotas, además de que intervienen en diversos procesos celulares asociados a organelos como la mitocondria, se ha documentado la participación de Arf1 y su ArfGEF GBF-1/Gea1/2 de *S. cerevisiae* en el modelamiento, homeostasis y dinámica mitocondrial, donde se encarga de la homeostasis de Fzo1 a través de la AAA-ATPasa Cdc48; mientras que en *C. elegans* Arf1 participa en la morfología y funcionamiento de la mitocondria (Ackema *et al.* 2014); por otro lado, en humano se observó la localización de la proteína Arl2 en el IMS de la mitocondria donde regula el proceso conocido como fusión mitocondrial (Newman *et al.* 2017). Aunque aún se desconoce el mecanismo de regulación, los datos sugieren una estrecha relación de las proteínas Arf con organelos como la mitocondria regulando procesos como la dinámica mitocondrial (Newman *et al.* 2017).

1.13 Dinámica mitocondrial

El comportamiento dinámico de las mitocondrias es fundamental para el control de su estructura y función en respuesta a diferentes estímulos como es el suministro de ATP a la célula generado por el proceso de fosforilación oxidativa, las mitocondrias tienen un papel





clave en el ensamblaje de grupos de hierro/azufre (Lill y Mühlenhoff, 2005). Las mitocondrias son reguladores centrales de la muerte celular programada (apoptosis), ya que se han identificado dos vías apoptóticas principales; es decir, la vía exógena y endógena, ambas con la muerte celular como objetivo final. Entre ellas, la vía exógena, también llamada vía del "receptor de muerte", es activada por estímulos pro-apoptóticos fuera de la célula, mientras que la vía endógena (mitocondrial), como su nombre lo indica, es activada por mecanismos intrínsecos de la propia célula (Qian *et al.* 2022). Ya que las mitocondrias son capaces de liberar al citosol proteínas que participan en la apoptosis, una de estas proteínas es el citocromo c que una vez liberado en el citosol produce la activación de algunas caspasas (cisteína aspartasa) que conducen a la liberación de proteínas mitocondriales como las pertenecientes a la familia Bcl-2, conduciendo a la pérdida de su función como orgánulo generador de energía, ya que se compromete el proceso de transporte de electrones (Altmann y Westermann, 2005). Las proteínas pro-apoptóticas Bax o Bak, provocan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, conduciendo a que las proteínas pro-apoptóticas ubicadas en el espacio intermembranal se liberen al citoplasma, desencadenando así una cascada de caspasas que favorece la apoptosis celular y escinden directamente el ADN nuclear (Gulbins *et al.* 2003; Qian *et al.* 2022). Por otra parte, el Ca^{2+} es un importante regulador en las vías apoptóticas al modular y sincronizar la señalización de dicha vía, ya que la acumulación masiva de Ca^{2+} en las mitocondrias conduce a apoptosis a través de los factores Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) que incluye tanto miembros pro-apoptóticos como antiapoptóticos, los cuales son clave en tal proceso. Los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-x_L y Mcl-1, se localizan en la membrana mitocondrial externa e impiden la liberación de citocromo c de las mitocondrias, inhibiendo así la apoptosis. Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak, promueven la liberación de citocromo c de las mitocondrias al dañar la membrana mitocondrial, lo que conduce a la activación de las caspasas que conducen a apoptosis. Por lo tanto, Bcl-2 desempeña un papel crucial en la





regulación de la vía intrínseca de la apoptosis (Willis *et al.* 2003; Jeong y Seol, 2008; Qian *et al.* 2022). Además, las mitocondrias son capaces de alargarse y fusionarse en condiciones de estrés e inanición (Newman *et al.* 2017). Tres GTPasas altamente conservadas, están relacionadas con la dinámica mitocondrial (es decir, mitofusina, Opa1 y Drp1 en mamíferos y Fzo1, Mgm1 y Dnm1 en levadura). Estas proteínas median la fusión y fisión mitocondrial (Zhang *et al.* 2014). Se reportó que las células de *S. cerevisiae* que carecen de componentes de la vía secretora con frecuencia exhiben mitocondrias aberrantes, lo que apunta a una función importante del sistema de endomembranas en la dinámica mitocondrial (Altmann y Westermann, 2005; Ackema *et al.* 2014). Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la función de los componentes de la vía secretora implicados en la dinámica y fisiología de las mitocondrias (Ackema *et al.* 2014).

Las mitocondrias regulan el funcionamiento de ciertas cascadas de señalización intracelular, generan especies reactivas de oxígeno, participan en la β -oxidación de ácidos grasos, están involucradas en el metabolismo de los aminoácidos ya que en la mayoría de los aminoácidos, el grupo amino ($-\text{NH}_2$) procede del glutamato mediante una reacción de transaminación, este aminoácido en células de origen humano, se sintetiza a partir del ion amonio (NH_4^+) y el α -cetoglutarato (metabolito del ciclo de Krebs). En una reacción de aminación directa catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), la misma enzima encargada de realizar la desaminación y localizada en la matriz mitocondrial, la diferencia radica en que en la ruta biosintética esta enzima utiliza como coenzima al NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y no al NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido); mediante la glutamina sintetasa (GS) se realiza una segunda reacción de aminación sobre el glutamato obteniendo la glutamina, molécula que funciona como uno de los principales sustratos utilizados por las transaminasas o aminotransferasas, para incorporar los grupos amino sobre los esqueletos carbonados de los aminoácidos (Meister, 1955). Las mitocondrias también participan en la síntesis de piridina, las modificaciones de fosfolípidos, la regulación y





homeostasis del hierro y calcio, así como la supervivencia, senescencia y muerte celular (Popov L. V., 2020; Onishi *et al.* 2021). Además, la mitocondria experimenta biogénesis, fusión, fisión y mitofagia en respuesta a estímulos o tensiones que lo requieran (por ejemplo, la restricción de nutrientes o una demanda energética elevada). En general estos eventos conforman el proceso conocido como dinámica mitocondrial. Dichos eventos son secuenciales, pero no lineales; es decir, una mitocondria que se ha separado de la red mitocondrial por fisión puede volver a fusionarse (Yu *et al.* 2020).

1.14 Biogénesis mitocondrial

La caja consenso 5'-CCAAT es uno de los motivos que aparecen con más frecuencia en las regiones promotoras de las células eucariotas (Bucher, 1990). Está altamente conservado y presente en aproximadamente el 30% de las regiones promotoras de los eucariotas, ubicadas aproximadamente de 60 a 100 pb río arriba de los sitios de inicio de la transcripción (Maity y de Crombrughe, 1998; Dolfini *et al.* 2009). El reconocimiento de la caja 5'-CCAAT se da por numerosas proteínas de unión al ADN permitiendo la activación transcripcional de diversos genes (Osada *et al.* 1996; Do *et al.* 2020). Las proteínas de unión al ADN que reconocen y se unen a la caja CCAAT forman el complejo de unión a CCAAT (CBC) y generalmente están compuestas de un complejo heterotrimérico que se conserva desde levaduras hasta vertebrados (Mao y Chen 2019). Los CBC regulan diversas funciones celulares, como el metabolismo primario/secundario, el desarrollo celular y las respuestas al estrés (Maity, 2017).

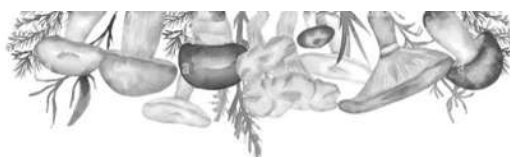
En los mamíferos, el factor nuclear Y (NF-Y) fue el primer CBC identificado y estudiado (Dorn *et al.* 1987; Zorbas *et al.* 1992). NF-Y desempeña funciones críticas e indispensables en la regulación genética, el metabolismo respiratorio, la proliferación celular y el desarrollo embrionario temprano al unirse a la caja CCAAT (Benatti *et al.* 2016). NF-Y se compone de tres subunidades conservadas evolutivamente, que son NF-YA, NF-YB y NF-YC (Mantovani,





1999). NF-YA consta de dos dominios α -helicoidales; el dominio N-terminal es necesario para la interacción con el heterodímero NF-YB/NF-YC, y el dominio C-terminal participa en el reconocimiento y la unión a elementos CCAAT. Además, tanto NF-YA como NF-YC contienen el dominio de activación para este complejo heterotrimérico. En especies eucariotas se han identificado diversos factores de transcripción pertenecientes a la familia NF-Y. En especies de levadura como *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *Candida glabrata*, la familia NF-Y ha sido denominada complejo de proteína activadora del hemo (Hap, heme activation protein). Las proteínas Hap regulan la biogénesis mitocondrial a través de la regulación de genes que codifican a proteínas en los complejos respiratorios como el citocromo c, producción de especies reactivas de oxígeno y homeostasis del hierro (Mao y Chen 2019).

El complejo Hap en *S. cerevisiae* se ha identificado como un activador transcripcional dependiente de hemo y está compuesto por cuatro subunidades (Hap2, Hap3, Hap4 y Hap5) y, por lo tanto, es estructural y funcionalmente diferente en la unión y activación del ADN del NF-Y heterotrimérico de mamíferos (McNabb *et al.* 1995). El dominio de unión al ADN del complejo Hap consta de tres subunidades esenciales, Hap2, Hap3 y Hap5 (abreviado Hap2/3/5), y el dominio de activación lo confiere Hap4 (Forsburg y Guarente, 1989; Bolotin-Fukuhara, 2017). Aunque Hap2, 3 y 5 se expresan constitutivamente y están presentes como un complejo heterotrimérico, se debe reclutar Hap4 para desencadenar la activación transcripcional (Forsburg y Guarente, 1989). Una vez que Hap2/3/5 se une al motivo 5'-CCAAT, el dominio de reclutamiento presente en Hap5 recluta a Hap4 para asociarlo con el heterotrímero. Aún no se han encontrado otros dominios que confieren este reclutamiento de Hap4 dentro del complejo Hap (McNabb *et al.* 1997; McNabb y Pinto, 2005; Mao y Chen, 2019). Los homólogos de Hap4 solo se han encontrado en hongos y no en organismos superiores, lo que sugiere que estas tres subunidades son suficientes para la unión y activación del ADN en humano (Forsburg y Guarente, 1989; Bolotin-Fukuhara, 2017; Mao y Chen, 2019).

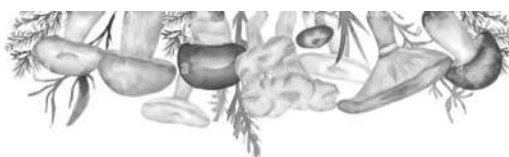




El complejo Hap se ha caracterizado funcionalmente en *C. neoformans* y se descubrió que HapX desempeña un papel importante en la homeostasis del hierro como subunidad reguladora del CBC en este hongo, donde regula negativamente la expresión de genes implicados en las funciones del ciclo respiratorio y del ácido tricarboxílico (TCA) en condiciones bajas en hierro y además regula positivamente los genes implicados en la absorción de hierro. Por otro lado, la eliminación de Hap3, Hap5 o HapX atenúa el crecimiento de *C. neoformans* en hemina, lo que demuestra que contribuyen a la utilización del hierro de la hemina (Jung *et al.* 2010). Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre el complejo Hap en hongos se han centrado en su papel en la utilización del hierro, sin embargo, resta por dilucidar el papel del complejo Hap en el desarrollo y diferenciación de los hongos (Kim y Bahn, 2022).

1.15 Fusión y fisión mitocondrial

Las mitocondrias constan de dos membranas: la membrana externa y la interna (Wallace, 2013) (Fig. 8) las cuales tienen mecanismos de fusión separados pero vinculados, que están muy conservados desde la levadura (*S. cerevisiae*) hasta los humanos (Chen y Chan, 2010; Kageyama *et al.* 2011). La fusión de la membrana externa está controlada por dos GTPasas relacionadas con la dinamina: mitofusina (humanos)/Fzo1 (en *S. cerevisiae*) y Opa1/Mgm1 (Song *et al.* 2009). La mitofusina/Fzo1 se inserta en la membrana externa a través de dos dominios transmembranales, con el dominio GTPasa mirando hacia el citosol. Por el contrario, Opa1/Mgm1 exhibe dos formas: una forma contiene un dominio transmembranal que se inserta en la membrana interna y la otra forma carece del dominio transmembrana y está ubicada en el espacio entre membranas. Las proteínas mitofusina/Fzo1 y Opa1/Mgm1 forman un complejo que conecta las dos membranas; por lo tanto, Opa1/Mgm1 también contribuyen a la fusión completa y estable de la membrana externa además de su papel en la fusión de la membrana interna. En *S. cerevisiae*, la proteína mitocondrial Ugo1 conecta físicamente Fzo1 y Mgm1 y forma el sitio de contacto de fusión entre las dos membranas (Sesaki y Jensen,





2001; Hoppins *et al.* 2009) (Fig. 8). Un componente central de la fisión mitocondrial es la GTPasa Drp1 (mamíferos)/Dnm1 (levadura) relacionada con dinamina soluble, que se ensambla en la superficie de las mitocondrias por proteínas receptoras separadas, pero potencialmente colaboradoras en mamíferos (es decir, Mff, Fis1 y Mid/MIEF) y por complejos receptor-adaptador en levadura (Fig. 13) (es decir, Fis1-Mdv1 y Num1-Mdm36) (Zhang *et al.* 2014).

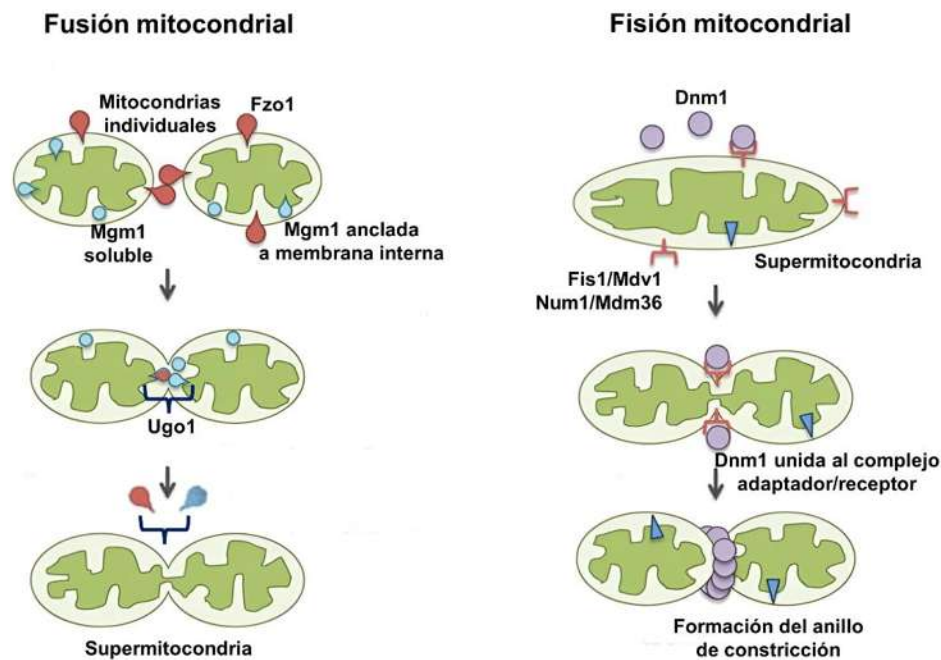


Figura 13. Fusión y fisión mitocondrial en *S. cerevisiae*. En el proceso de fusión mitocondrial la proteína clave es Fzo1 la cual hace contacto físico con Mgm1 unida a la membrana externa, el cual es mediado por Ugo1 y así fusionar a las mitocondrias. Durante la fisión mitocondrial la proteína Dnm1 es reclutada por los complejos Fis1-Mdv1/Num1-Mdm36 que promueven la formación del anillo de constricción para separar las mitocondrias (Tomada y modificada de Zhang *et al.* 2014).

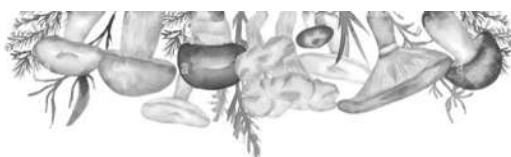
1.16 Mitofagia

La degradación de las mitocondrias es un mecanismo fundamental conservado en todos los eucariontes y se realiza a través de una forma selectiva de autofagia, llamada mitofagia. La función de la mitofagia es regular el control de la cantidad y la calidad de las





mitocondrias. El sistema autofágico se dirige a las mitocondrias deterioradas y las dirige a los lisosomas para su degradación. La mitofagia en *S. cerevisiae* está mediada principalmente por Atg32, esta es una proteína de un solo paso transmembranal en la membrana mitocondrial externa (OMM del inglés outer mitochondrial membrane) (Okamoto *et al.* 2009; Kanki *et al.* 2009). En este modelo, la mitofagia se induce cuando las células alcanzan la fase estacionaria o cuando se carece de nitrógeno (Tal *et al.* 2007; Kanki y Klionsky, 2008; Okamoto *et al.* 2009). En tales condiciones, la expresión de Atg32 se induce a nivel transcripcional y se acumula en la OMM, formando un complejo con Atg8 y Atg11 en la superficie de las mitocondrias. La proteína Atg8 se localiza en los autofagosomas y la proteína Atg11 actúa como un andamio para otras proteínas Atg, promoviendo la formación de autofagosomas. La pérdida de Atg32 suprime casi por completo la mitofagia, mientras que su sobreexpresión aumenta la actividad de la mitofagia, lo que sugiere que esta molécula es un factor limitante para regular la cantidad de mitocondrias que se degradarán. La proteína Atg32 es específicamente importante para degradar las mitocondrias y es prescindible para otros tipos de procesos relacionados con la autofagia, incluida la autofagia masiva, la vía de orientación del citoplasma a la vacuola, así como la autofagia del retículo endoplasmático (ER) y la peroxifagia que es la autofagia de los peroxisomas. La fosforilación de Atg32 es un evento clave para la mitofagia (Fig.14). Durante la respiración o tras un cambio de respiración a inanición, Atg32 se fosforila dependiente de su motivo de interacción con Atg11, el cual contiene los residuos Ser114 y Ser119 (Aoki *et al.* 2011; Kondo-Okamoto *et al.* 2012; Onishi *et al.* 2021).



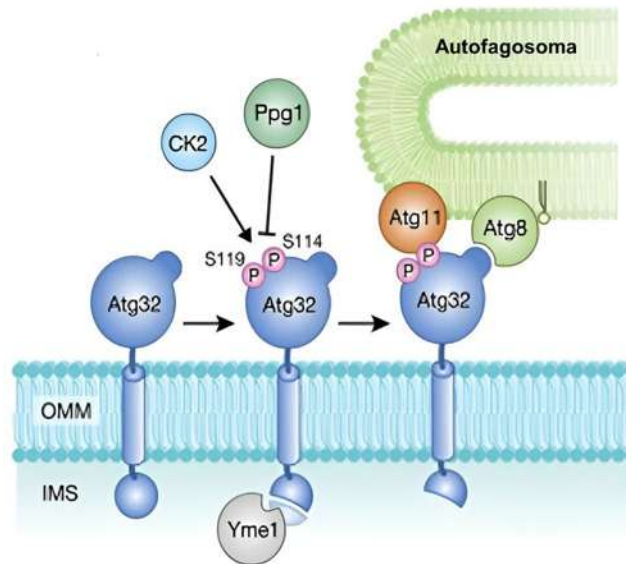


Figura 14. La mitofagia es mediada por la proteína Atg32 en *S. cerevisiae*. Atg32 se acumula en la OMM (membrana externa mitocondrial), formando un complejo con las proteínas Atg8 y Atg11 en la superficie de las mitocondrias. Atg8 se localiza en los autofagosomas y Atg11 actúa como un andamio para otras proteínas Atg y así promover la formación de autofagosomas (Tomada y modificada de Onishi *et al.* 2021).

1.16.1 Mitofagia mediada por receptores

La mitofagia mediada por receptores generalmente se conserva desde levaduras hasta humanos y se ha encontrado en hongos patógenos. En la actualidad, todos los receptores de autofagia selectiva identificados poseen una región de interacción LC3 (LIR) o un motivo de interacción de la familia Atg8 (AIM). Los motivos AIM o LIR se caracterizan por secuencias W/F/Y-X-X-L/I/V, en las que X puede ser cualquier aminoácido ácido (Noda *et al.* 2010). Cuando se inicia la mitofagia, Atg8 se localiza en el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) después de ser conjugado covalentemente con fosfatidiletanolamina, y el receptor de mitofagia interactúa con Atg8 a través de su motivo AIM/LIR para reclutar el fagóforo, que promueve así el aislamiento selectivo de una porción de las mitocondrias (Nakatogawa *et al.* 2007; Birgisdottir *et al.* 2013; Zaffagnini y Martens, 2016). Después de eso, el mecanismo central de





autofagia sigue para formar autofagosomas que posteriormente se fusionan con vacuolas o lisosomas para degradar las mitocondrias secuestradas, controlando así la calidad y cantidad de este organelo (Shen *et al.* 2023).

La mayoría de los receptores de mitofagia, como Atg32 y Atg43 en la levadura y BNIP3L/NIX, BNIP3, FUNDC1, BCL2L13 y FKBP8 en las células de mamíferos, se encuentran en la OMM. El receptor de mitofagia PHB2 (prohibitina 2) se localiza en la IMM de células de mamíferos, lo cual abre nuevos horizontes para la investigación de la mitofagia y la identificación de receptores (Wei *et al.* 2017). La proteína PHB2 es un receptor de mitofagia crucial involucrado en el objetivo de las mitocondrias para la degradación autofágica contiene un motivo LIR (región de interacción con LC3, que promueve el reclutamiento del fagoforo) canónico y es necesario como parte de la maquinaria de mitofagia mediada por PRKN (una ubiquitina ligasa E3 citoplasmática). Se demostró que la reducción de PHB2, empleando ARNi, previene la reducción en el número de mitocondrias después del tratamiento con antimicina A y oligomicina en las células HeLa, lo que confirma que la deficiencia de PHB2 resulta en una defectuosa eliminación mitocondrial. PHB2 interactúa con LC3 para reclutar la membrana del fagoforo después de la ruptura de la OMM. La sobreexpresión de PHB2 promueve el reclutamiento de PRKN, mientras que el agotamiento de PHB2 activa PARL (una proteasa residente en IMM) para escindir PINK1 (cinasa de la OMM); PINK1 desestabilizado previene el reclutamiento de PRKN y, por lo tanto, la deficiencia de PHB2 inhibe la mitofagia (Wei *et al.* 2017; Shen *et al.* 2023).

Además de los motivos típicos de AIM/LIR, la mitofagia está regulada por la fosforilación, un proceso crucial de modificación postraduccional, y múltiples evidencias han demostrado que la fosforilación es un evento clave en la mitofagia mediada por receptores (Wild *et al.* 2011; Richter *et al.* 2016; Wang *et al.* 2018). En *S. cerevisiae*, la fosforilación del Atg32 en los residuos Ser114 y Ser119, son modificados por la caseína cinasa 2 (CK2), una





serina/treonina quinasa evolutivamente altamente conservada que regula una variedad de procesos celulares (Kanki *et al.* 2013). La fosforilación de Atg32 por CK2 promueve su interacción con la proteína de andamiaje, Atg11, una proteína común en la mayoría de los tipos de autofagia selectiva, incluida la mitofagia. En consecuencia, el deterioro funcional de CK2 conduce a una inhibición severa de la mitofagia (Fig. 15-16) (Furukawa *et al.* 2018). Estudios recientes han demostrado que la proteína similar a la proteína fosfatasa 2A (PP2A), Ppg1, coopera con el complejo Far (Far3, Far7, Far8, Vps64/Far9, Far10 y Far11) para defosforilar Atg32 compitiendo con CK2 por los sitios de fosforilación en condiciones no inductoras de mitofagia, inhibiendo así este proceso. En las células con delección de Ppg1, la interacción entre Atg32 y Atg11 aumenta incluso en condiciones no inductoras de mitofagia, lo que acelera la degradación mitocondrial (Furukawa *et al.* 2018; Shen *et al.* 2023).

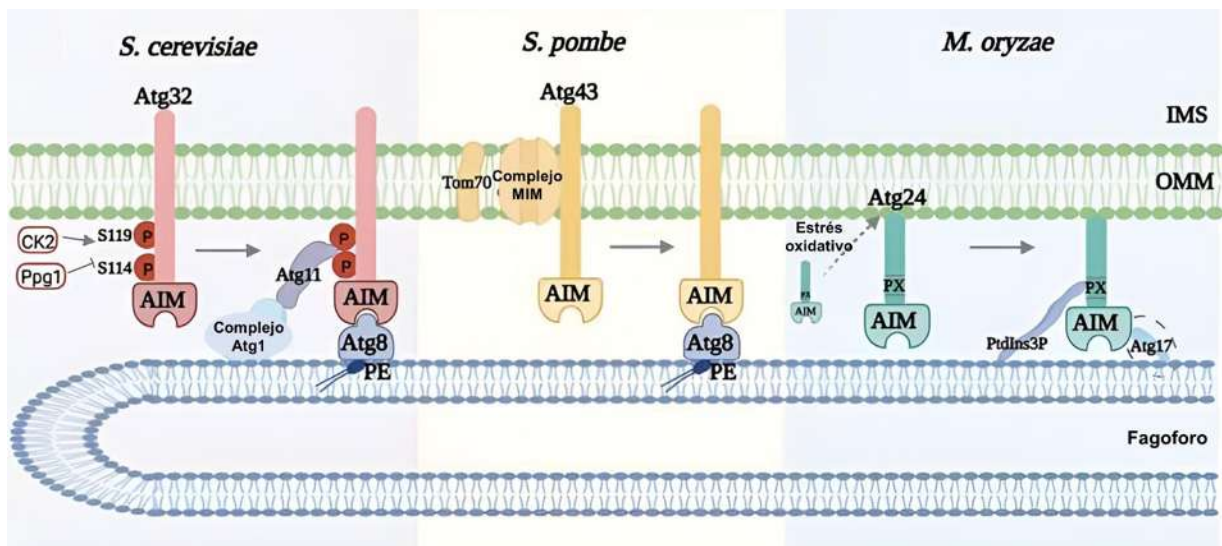


Figura 15. Modelos de localización, activación y acción del receptor de mitofagia en hongos. El receptor de mitofagia Atg32 de *S. cerevisiae* está regulado por fosforilación y defosforilación. Atg32 es fosforilada y activada por CK2 para reclutar la proteína de andamiaje de autofagia Atg11 e interactúa con Atg8 a través del motivo AIM para reclutar la membrana del fagóforo para envolver selectivamente las mitocondrias para su degradación. El receptor de mitofagia Atg43 de *S. pombe* se localiza en la OMM a través del complejo MIM del factor de entrada mitocondrial, y el factor de entrada mitocondrial Tom70 rodea y degrada las mitocondrias mediante el reclutamiento de la maquinaria central de autofagia a través del motivo AIM. El receptor de mitofagia Atg24 de *M. oryzae* se localiza en las





mitocondrias a través de los dominios PX y BAR, e interactúa con PtdIns3P en la membrana a través del dominio PX. El homólogo de *S. cerevisiae* de Atg24, Snx4, puede interactuar con Atg17 (Tomada y modificado de Shen *et al.* 2023).

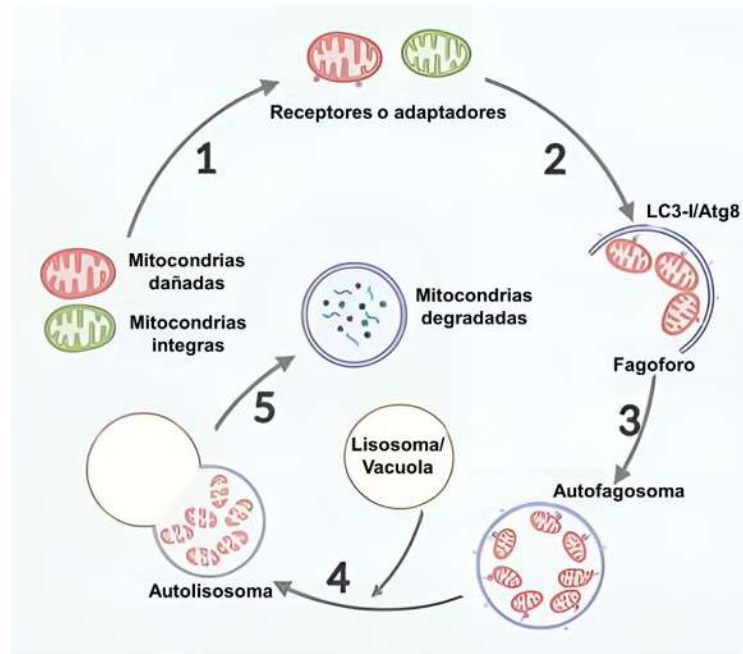
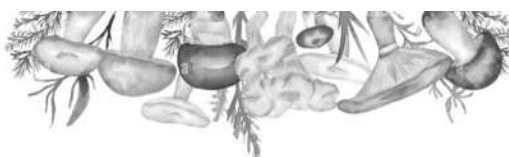


Figura 16. Modelo para la regulación de la mitofagia en hongos. 1. Activación de receptores de mitofagia en la superficie mitocondrial o reclutamiento de adaptadores que median la autofagia mediada por ubiquitina. 2. Reclutamiento al fagóforo interactuando con la maquinaria central de autofagia. 3. Las mitocondrias que se van a degradar están secuestradas dentro de los autofagosomas. 4. Fusión con vacuolas o lisosomas. 5. El exceso de y las mitocondrias dañadas se degradan y los productos de degradación se liberan de nuevo en el citosol para su reutilización (Tomada y modificada de Shen *et al.* 2023).

1.16.1.1 Atg24 en *M. oryzae*

Se ha identificado a una proteína perteneciente al grupo de las nexinas clasificadoras, la cual se asoció con la nexina clasificadora Snx4/Atg24 en levadura y se identificó como Atg24 en *M. oryzae*, convirtiendo a Atg24 en el primer receptor de mitofagia estudiado en hongos patógenos (He *et al.* 2013; Shen *et al.* 2023). La delección del gen *atg24* bloquea la mitofagia





en las células que conectan las hifas aéreas con los micelios vegetativos, lo que lleva a una gran reducción de las hifas aéreas y los conidios, pero no tiene ningún efecto sobre la autofagia o la pexofagia. La proteína Atg24 se colocaliza con mitocondrias bajo inanición o estrés oxidativo, lo que puede reclutar directamente mitocondrias en estructuras autofágicas durante la mitofagia. Aunque carece del dominio TM típico de los receptores de mitofagia de mamíferos y levaduras, Atg24 tiene un dominio PX (homólogo de Phox) y un dominio BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) que son necesarios para la localización mitocondrial, y la eliminación del dominio PX conduce a la localización citoplásmica. En condiciones de estrés oxidativo, la focalización mitocondrial de Atg24 puede estar mediada por PX-fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P) en la membrana mitocondrial. Además, el homólogo de levadura de Atg24 interactúa con Atg17 (un componente del complejo cinasa Atg1) para iniciar la formación de autofagosomas, y el motivo W/F/YXXL/I/V también se encuentra en el extremo N de Atg24 (He *et al.* 2013; Shen *et al.* 2023). Según las comparaciones anteriores, el mecanismo de la mitofagia parece conservarse entre levaduras, hongos filamentosos y mamíferos: un receptor mitocondrial localizado puede interactuar con una proteína de la familia Atg8 y reclutar la maquinaria central de autofagia necesaria en la superficie del fagoforo (Shen *et al.* 2023).

1.16.2 Función de la mitofagia en la patogénesis fúngica

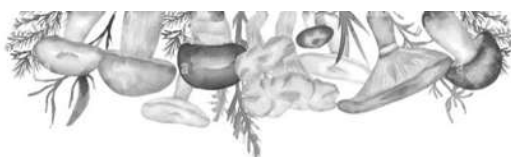
Se ha confirmado la importancia del papel de la mitofagia en células de humano y levaduras como *S. cerevisiae*, aunque su función crucial en hongos patógenos no se ha esclarecido del todo. Se ha reportado que la mitofagia es indispensable en la patogenicidad del hongo causante del añublo del arroz *M. oryzae*, lo que indica que la mitofagia juega un papel indispensable no sólo en la regulación de la calidad y cantidad mitocondrial sino también en el mantenimiento de la virulencia de los hongos patógenos (He *et al.* 2013). Por otro lado, se confirmó la relevancia de la mitofagia en la patogenicidad de *C. albicans*, un patógeno oportunista. La proteína complementaria a Mdm10 o Mcp1 (Mdm10 complementing protein)





es una proteína de la membrana externa mitocondrial que desempeña un papel importante en la homeostasis de los lípidos mitocondriales de la levadura (Tan *et al.* 2013), mientras que en *C. albicans*, Mcp1 es esencial para la mitofagia y la función mitocondrial (Mao *et al.* 2021). La eliminación de Mcp1 bloqueó la mitofagia, lo que resultó en una acumulación mitocondrial anormal en *C. albicans*. Además, el crecimiento de las hifas y la virulencia de las mutantes $\Delta mcp1$ de *M. oryzae* resultaron alterados; sin embargo, la regulación de la mitofagia en la virulencia no ha sido aún esclarecido en su totalidad (Tabla 1) (Mao *et al.* 2021; Shen *et al.* 2023).

M. oryzae tiene un ciclo de infección complejo, que incluye crecimiento micelial, producción de conidios, germinación del tubo germinal, formación de apresorio e infección de plantas, lo que lo convierte en un organismo modelo para estudiar las interacciones entre hongos patógenos y plantas hospederas (Liu *et al.* 2007a; Liu *et al.* 2007b; Foster *et al.* 2017; Zhu *et al.* 2021). El tubo germinal emerge a partir de la célula apical del conidio y posteriormente, la punta del tubo germinal se hincha para formar una estructura de infección especial en forma de cúpula, el apresorio, el cual, una vez maduro tiene una densa capa exterior de melanina, con una gran cantidad de glicerol acumulado en su interior, lo que resulta en una presión mecánica de hasta 8,0 Mpa, que tiene como función perforar las células vegetales (Fernandez y Orth, 2018). En *M. oryzae*, el factor de transcripción Msn2 regula la expresión de la proteína Auh1 (3-metilglutaconil-CoA hidratasa), y la delección de *msn2* o *auh1* conduce a una mitofagia disfuncional, alteración de la morfología mitocondrial y deterioro del crecimiento de las hifas durante la infección (Xiao *et al.* 2021), sin embargo, no se ha aclarado su posible mecanismo en la patogénesis. Estudios recientes han demostrado que las mutantes $\Delta whi2$ (Whiskey 2) una proteína general de respuesta al estrés que en *S. cerevisiae* inactiva la vía de señalización AMPc-PKA dirigiendo Ras2 (GTPasa) a las vacuolas y además regula negativamente la actividad del complejo de señalización TOR 1 (TORC1) en condiciones





limitadas de aminoácidos (Leadsham *et al.* 2009), exhiben una patogenicidad significativamente reducida. La eliminación de *Whi2*, por un lado, conduce a una mitofagia interrumpida en las células que conectan las hifas aéreas con los micelios vegetativos, lo que resulta en una conidiación reducida; por otro lado, conduce al bloqueo de la mitofagia en las hifas invasoras, lo que resulta en una reducción de la virulencia en *M. oryzae* (Tabla 4) (Meny *et al.* 2022; Shen *et al.* 2023).

Tabla 4. Receptores de mitofagia en hongos y reguladores de mitofagia en hongos patógenos

Receptores de mitofagia			
Genes	Fenotipo	Funciones	Referencias
<i>Scatg32</i>	Mitofagia bloqueada	Interactúa con Atg8 y Atg11 para reclutar fagóforos	(Okamoto <i>et al.</i> 2009; Kanki <i>et al.</i> 2009)
<i>Moatg24</i>	Mitofagia bloqueada, crecimiento deficiente y conidiación	Regula la mitofagia en las células del pie	(He <i>et al.</i> 2013)
<i>Spatg43</i>	Mitofagia bloqueada, crecimiento deficiente	Interactúa con Atg8 para reclutar fagóforos	(Fukuda <i>et al.</i> 2020; Fukuda <i>et al.</i> 2021)
Otros factores regulatorios			
<i>Aoatg11</i>	Las mitocondrias se acumulan en el citoplasma	Implicado en mitofagia y pexofagia	(Tadokoro <i>et al.</i> 2015)
<i>Acatg11</i>	Mitofagia y pexofagia bloqueadas	Implicado en la autofagia selectiva y la autofagia no selectiva	(Lu <i>et al.</i> 2017)
<i>Modnm1</i>	Deterioro del crecimiento, virulencia y formación de apresorio	Implicado en la morfología mitocondrial y la mitofagia	(Zhong <i>et al.</i> 2016)
<i>Mofis1</i>	Conidiación y virulencia deterioradas	Implicado en la morfología mitocondrial y la mitofagia	(Khan <i>et al.</i> 2015; Zhong <i>et al.</i> 2016)

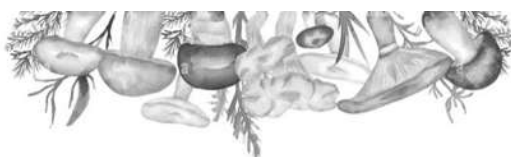




<i>Momdv1</i>	Conidiación y virulencia deterioradas	Implicado en la morfología mitocondrial y la mitofagia	(Zhong <i>et al.</i> 2016)
<i>Bbdnm1</i>	Deterioro del crecimiento y virulencia y desarrollo asexual	Regula la fisión mitocondrial y la mitofagia	(Wang <i>et al.</i> 2020)
<i>Bbfis1</i>	Deterioro del crecimiento y virulencia y desarrollo asexual	Regula la fisión mitocondrial y la mitofagia	(Wang <i>et al.</i> 2020)
<i>Bbmdv1</i>	Deterioro del crecimiento y virulencia y desarrollo asexual	Regula la fisión mitocondrial y la mitofagia	
<i>Momsn2</i>	Crecimiento infeccioso deteriorado	Controla la mitofagia y la morfología mitocondrial	(Xiao <i>et al.</i> 2021)
<i>Moauh1</i>	Crecimiento infeccioso deteriorado	Controla la mitofagia y la morfología mitocondrial	
<i>Mowhi2</i>	Conidiación y virulencia reducidas	Regula la mitofagia en las células del pie y las hifas invasoras.	(Meng <i>et al.</i> 2022)
<i>Camcp1</i>	Deterioro del crecimiento y virulencia; mitocondrias acumuladas	Regula la mitofagia y mantiene la función mitocondrial	(Mao <i>et al.</i> 2021)

Tomada y modificada de Shen *et al.* 2023.

Los prefijos hacen referencia a los organismos estudiados: *S. cerevisiae* (Sc), *M. oryzae* (Mo), *S. pombe* (Sp), *Aspergillus oryzae* (Ao), *Acremonium crisogenum* (Ac), *Beauveria bassiana* (Bb), *C. albicans* (Ca).





II. ANTECEDENTES

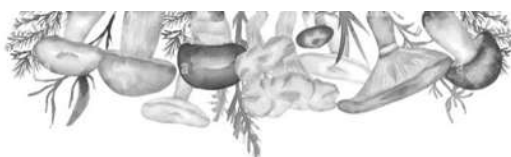
M. lusitanicus es un hongo dimorfo perteneciente al orden de los mucorales (McIntyre *et al.* 2002; Lee *et al.* 2013), que ha sido empleado como modelo de estudio en el entendimiento de la mucormicosis una infección de incidencia baja, pero mortal causada por hongos de este orden y a la cual son susceptibles pacientes con deficiencias inmunológicas (Chayakulkeeree *et al.* 2006). En este mucoral, se han descrito a 4 distintas proteínas, conocidas como Arf1-Arf4 (Patiño-Medina *et al.* 2018) y 2 genes codificantes a proteínas Arl (Arf like) (Patiño-Medina *et al.* 2019b). Las proteínas Arf son reguladores clave del proceso de tráfico vesicular y están asociados con el crecimiento y la virulencia en los hongos (Labbaoui *et al.* 2017). De acuerdo a lo reportado por Patiño-Medina *et al.* (2018, 2019), la delección del gen *arf3* en *M. lusitanicus* generó el aumento de la secreción de moléculas al medio extracelular, es decir, el SS de la cepa mutante generó un aumento de la actividad toxica contra el nematodo *C. elegans*. La molécula secretada reveló un peso molecular bajo, menor a los 3 kDa. Además, mostró una relación estructural con proteínas, ya que, en el caso del SS de la cepa mutante en *arf3*, el factor tóxico secretado fue sensible a la acción proteolítica (Patiño-Medina *et al.* 2018). La enzima Rfs es una péptido sintetasa no ribosomal que utiliza citrato y diaminobutano (putrescina) como sustratos para la síntesis del sideróforo rizoferrina (Carroll *et al.* 2017), implicando al metabolismo oxidativo mitocondrial para su síntesis. Rizoferrina es producida por diversos microorganismos como los hongos pertenecientes al orden de los Mucorales, no se ha reportado en otra clase de hongos, con la finalidad de competir por el hierro disponible en el ambiente (Carroll *et al.* 2017). El aumento de los niveles de ARNm de *rfs* en ausencia de Fe^{2+} fue reportado en *M. lusitanicus*, así como durante el estrés oxidativo y durante la infección del ratón (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). La mutación del gen *rfs* propició una disminución de la virulencia, aunado a esto, la mutación de *rfs* en la cepa mutantes $\Delta arf3$ condujo a una pérdida de la actividad virulenta de la doble mutante, sugiriendo que Arf3 regula negativamente la producción de rizoferrina en este Mucoral.





Finalmente, se reportó que en *M. lusitanicus* la regulación transcripcional de *rfs* y la acumulación de rizoferrina dependen de la vía AMPc-PKA e interesantemente, ha sido el primer informe de un sideróforo fúngico regulado por esta vía (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). Además, la proteína Rfs es importante para aumentar la resistencia al estrés oxidativo, así como en el aumento de la invasión en los tejidos de ratones diabéticos y en la virulencia de *M. lusitanicus*, lo que llevó a concluir que la transcripción del gen que codifica a Rfs y la acumulación de rizoferrina están reguladas por el metabolismo oxidativo mitocondrial.

Sin embargo, aún queda por dilucidar la regulación en la producción de rizoferrina a través de la proteína Arf3 en *M. lusitanicus* durante el metabolismo oxidativo mitocondrial.





III. JUSTIFICACIÓN

M. lusitanicus es un modelo de estudio para el entendimiento de la infección conocida como mucormicosis, una infección de baja incidencia, pero con una letalidad elevada a la cual son susceptibles los pacientes inmunocomprometidos. El entendimiento de los procesos bioquímicos y moleculares en la patogenicidad de estos microorganismos es indispensable para elucidar su mecanismo de virulencia. En *M. lusitanicus* se ha demostrado que la pérdida de la proteína Arf3 genera un fenotipo más virulento respecto a la cepa silvestre, mediante la secreción de moléculas tóxicas. En este sentido, se ha descrito al sideróforo rizoferrina como un factor de virulencia secretable en este mucoral, cuya síntesis depende de un metabolismo oxidativo mitocondrial, al requerir sustratos provenientes de dicho metabolismo. Esta información sugiere la posible participación de componentes de la dinámica mitocondrial que pudieran ser regulados por Arf3. El metabolismo mitocondrial es escasamente entendido en los mucorales y puede ser un elemento clave en la comprensión de la mucormicosis, por ello resulta indispensable el conocer la participación de la proteína Arf3 durante el metabolismo oxidativo mitocondrial, lo que podría ayudar a generar información sobre la clase de moléculas reguladas por Arf3 que actúan como factores de virulencia, como la rizoferrina, por lo que resulta importante dilucidar la función de Arf3 en la regulación de la virulencia mediada por rizoferrina de *M. lusitanicus*.





IV. HIPÓTESIS

La proteína Arf3 controla negativamente la producción de rizoferina a través de la represión de la fusión mitocondrial en *M. lusitanicus*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- ❖ Dilucidar la función del factor de ADP-ribosilación Arf3 en la fusión mitocondrial y virulencia en *M. lusitanicus*.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar si la mutación en *arf3* aumenta los niveles del factor de virulencia rizoferina.
2. Analizar la función de Arf3 y Rfs en el metabolismo oxidativo mitocondrial y su relación con la virulencia.
3. Determinar la función de la proteína Arf3 en la regulación de los procesos de fusión y fisión mitocondrial en la virulencia.





VI. METODOLOGÍA

6.1 Cepas utilizadas

Se utilizó la cepa MU402, la cual es auxótrofa a leucina y uracilo (*leuA*⁻, *pyrG*⁻). De la cual derivó la cepa con la delección en el gen *arf3*. También se utilizó a la cepa MU636 (*leuA*⁻, *pyrG*⁺) a la cual se le reinsertó el gen *pyrG* silvestre en el locus del gen *pyrG*⁻, la cual fue usada como cepa silvestre (WT), así como la cepa mutante en el gen *arf3* y silvestre (WT) sobreexpresando a los genes *fzo1*, *dnm1*, *sod1*, *sod2a* y *cat1a*. También se usó la cepa de *E. coli* OP50 como alimento para *C. elegans* cepa N2 (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas empleadas en este estudio

#	Cepa	Genotipo	Referencia
1	MU402	Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y uracilo (<i>pyrG</i> ⁻); obtenida mediante mutagénesis química. Derivada de la cepa R7B	(Nicolás <i>et al.</i> 2007)
2	MU636	Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y protótrofa a uracilo (<i>pyrG</i> ⁺); obtenida mediante recombinación homologa restaurando el gen <i>pyrG</i> en el locus del gen <i>pyrG</i> . Derivada de la cepa MU402	(Navarro-Mendoza <i>et al.</i> 2019)
3	$\Delta arf3$	Derivada de MU402, mutante homocarionte en el gen <i>arf3</i> (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁻)	(Patiño-Medina <i>et al.</i> 2018)
4	Δrfs	Derivada de MU402, mutante homocarionte en el gen <i>rfs</i> (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁻)	(Alejandre-Castañeda <i>et al.</i> 2022)
5	$\Delta arf3/\Delta rfs$	Derivada de $\Delta arf3$, doble mutante, homocarionte en los genes <i>arf3</i> y <i>rfs</i> (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	(Alejandre-Castañeda, 2020)
6	MU636 <i>rfs</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>rfs</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	(Alejandre- Castañeda <i>et al.</i> 2022)
7	MU636 <i>fzo1</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	(Patiño-Medina, 2022)
8	MU636 <i>dnm1</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
9	MU636 <i>sod1</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>sod1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
10	MU636 <i>sod2a</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>sod2a</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
11	MU636 <i>cat1a</i> ^{O/E}	Derivada de MU636; sobreexpresa el gen <i>cat1a</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	





12	$\Delta arf3 fzo1^{O/E}$	Derivada de $\Delta arf3$; sobreexpresa el gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	(Este trabajo)
13	$\Delta arf3 dnm1^{O/E}$	Derivada de $\Delta arf3$; sobreexpresa el gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
14	$\Delta arf3 sod1^{O/E}$	Derivada de $\Delta arf3$; sobreexpresa el gen <i>sod1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
15	$\Delta arf3 sod2a^{O/E}$	Derivada de $\Delta arf3$; sobreexpresa el gen <i>sod2a</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
16	$\Delta arf3 cat1a^{O/E}$	Derivada de $\Delta arf3$; sobreexpresa el gen <i>cat1a</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	
17	<i>E. coli</i> OP50	Cepa resistente a estreptomicina, auxótrofa a uracilo, usada como alimento de nematodos	(Brenner, 1974)
18	<i>C. elegans</i> N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol. Cepa estándar utilizada en investigación	

6.2 Cultivo de *M. lusitanicus*

6.2.1 Condiciones generales de crecimiento de *M. lusitanicus*

M. lusitanicus fue cultivado a condición estándar de 28°C en cada uno de los diferentes medios.

6.3 Medios de cultivo empleados

6.3.1 YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon, East Rutherford, NJ, USA), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de glucosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH a 4.5 (Bartnicki-García, 1968).

6.3.2 YNB (Yeast Nitrogen Base)

Cada litro de medio contenía 1.5 g de sulfato de amonio, 1.5 g de ácido glutámico, 0.5 g de yeast nitrogen w/o aminoacids and ammonium sulfate (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA),





10 g de glucosa (BD Bioxon) y 20 g de agar (BD Bioxon) en caso de medio sólido. Para los experimentos fisiológicos se adiciono 20 g de glucosa. Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina y niacina a una concentración de 1 µg/ml respectivamente (Lasker y Borgia, 1980).

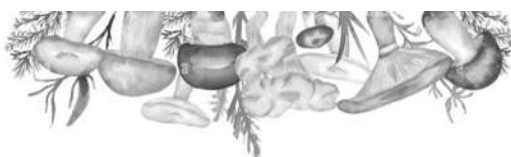
Los medios de cultivo fueron suplementados con leucina (10 µg/ml) cuando fue necesario. El pH fue 4.5 cuando se requirió un crecimiento micelial estándar mientras que la concentración de glucosa varió desde el 0.1% hasta el 6.0% según los requerimientos.

6.3.3 Medio NGM (Nematode Growth Medium)

Medio utilizado para la obtención de *C. elegans*. Se preparó con 2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ), 4 g de peptona de caseína (Solbiosa, RoC, Delhi), 3 g de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell, Orange, CA, USA), 0.05 g de fosfato de potasio dibásico (Meyer, Hamburgo, Alemania), y 20 g de agar (BD Bioxon) por cada litro de medio. Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente se adicionó 1 ml de una solución de colesterol (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker) y 0.5 mg de estreptomina por cada litro de medio.

Crecimiento y mantenimiento de *C. elegans*

Para la preparación de la fuente de comida de *C. elegans*, se inoculó *E. coli* OP50 en medio LB líquido con estreptomina (10 µg/ml), se incubó a 37°C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) por 48 h. Posteriormente se tomaron 500 µl del precultivo de *E. coli* OP50, el cual fue esparcido con un hisopo estéril en cada caja Petri con medio NGM a utilizar. Se incubaron a 37°C por 48 h hasta su crecimiento total. Para la propagación de *C. elegans* se transfirieron pequeñas porciones del agar conteniendo al menos un nematodo a cajas Petri previamente inoculadas con la cepa de *E. coli* OP50 y se dejó incubar por 3 días a 18°C hasta que se alcanzó la fase adulta del nematodo.





6.4 Obtención y conteo de esporas de *M. lusitanicus*

Placas de Petri con medio YPG sólido, fueron inoculadas con 100 esporas de *M. lusitanicus* y se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas se colectaron agregando 10 ml de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas se recuperaron con ayuda de una micropipeta y se depositaron en un tubo de 50 ml estéril. Las esporas se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se centrifugaron de la misma manera tres veces. Finalmente, las esporas se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific, California) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leica, Wetzlar, Alemania). Se depositaron 20 µl en la parte superior y 20 µl en la inferior, respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Las esporas cuantificadas se multiplicaron por el factor de dilución 2.5×10^4 . El resultado expresa las esporas por ml de muestra. Las esporas contadas y lavadas se conservaron a 4°C y se emplearon en un máximo de 15 días después de su obtención.

6.5 Crecimiento radial de *M. lusitanicus*

Placas de Petri con medio YPG sólido (estándar) o YNB (2% de glucosa o 111 mM de glicerol, concentración equimolar al 2% de glucosa), se inocularon con 100 esporas de las diferentes cepas en el centro de la placa y se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 6 días. Se midió el diámetro colonial (cm) cada día de incubación.

6.6 Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de *M. lusitanicus*

Para llevar a cabo el crecimiento aeróbico y anaeróbico se inocularon 5×10^5 esporas por cada ml de medio de cultivo. En el caso de crecimiento aerobio los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 150 rpm, usando 10 ml de medio en matraces de 125 ml.





Para el crecimiento anaerobio, se usaron vasos de precipitado de 10 ml con 8.5 ml de medio de cultivo en reposo, tapados con un tapón de corcho, dichos tapones se atravesaron con una aguja para formar una atmosfera de CO₂ (sistema auto-anaeróbico) (Salcedo-Hernández y Ruiz-Herrera, 1993).

6.7 Determinación de porcentajes de germinación de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^3 esporas por cada ml de medio de cultivo, se tomaron alícuotas (200 µl) de cada matraz cada 2 h hasta las 8 o 12 de h incubación (según requerimientos) y se fijaron en 200 µl de formol al 10%. Inmediatamente se realizó el conteo de 100 células por muestra, identificando las células germinadas. El resultado determina el porcentaje de esporas germinadas al tiempo evaluado.

6.8 Cultivo de *E. coli*

E. coli se cultivó a 37°C en medio LB. Cada litro de LB contenía 10 g de peptona de caseína (Solbiosa), 5 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker) y 15 g de agar bacteriológico en caso de medio sólido. Cuando fue necesario, tras esterilizar, se añadió ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, cloranfenicol a 34 µg/ml o estreptomycin a 10 µg/ml.

6.9 Obtención de SS

Se colocaron 5 millones de esporas de cada una de las siguientes cepas MU636, Δrfs , $\Delta arf3$ y $\Delta arf3/\Delta rfs$ en 10 ml de los medios de cultivo líquidos YNB (medio mínimo) al 2 y 0.1% de glucosa, YPG (medio rico) al 2% y 6% de glucosa, se sometieron a agitación constante de 150 rpm a 28°C en condiciones aerobias por 48 h. Una vez concluido el tiempo de agitación, los medios de cultivo fueron filtrados (filtros con tamaño de poro de 3 µm) en condiciones de esterilidad para recuperar el sobrenadante libre de células miceliales (SS).

6.10 Ensayos de toxicidad





Una vez obtenidos los SS, se colocaron 200 µl de cada uno de ellos en placas de 96 pozos, posteriormente se colocaron de 15 a 20 nematodos de la cepa N2 de *C. elegans* los cuales fueron incubados a 18°C, finalmente se evaluó la toxicidad de los SS al contabilizar la supervivencia de los nematodos en lapsos de 12 h hasta alcanzar las 60 h.

6.11 Ensayos de virulencia en *G. mellonella*

Los ensayos de virulencia en *G. mellonella* se llevaron a cabo inyectando a cada larva 20 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía 10,000 esporas de cada una de las cepas. Se emplearon veinte larvas por cada una de las cepas evaluadas y se evaluó la supervivencia cada 24 h durante seis días.

6.12 Cuantificación de rizoferrina

Se adicionaron 200 µl de acetonitrilo a un volumen de 800 µl de cada SS obtenido en medio YNB al 0.1% de glucosa; la mezcla se limpió en un cartucho de extracción en fase sólida (Supelco select HLB) preactivado y equilibrado con acetonitrilo al 20% (v/v). Los extractos se filtraron utilizando una membrana de PTFE de 0.22 µm y se almacenaron a -20°C hasta el análisis cromatográfico.

El análisis de rizoferrina se realizó mediante UPLC-ESI-TOF-MS (cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada con espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo de ionización por electropulverización, en inglés, ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry) utilizando un sistema ACQUITY UPLC I-Class (Waters, Singapur) junto con un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters, Reino Unido) equipado con una fuente ESI, controlado por el software MassLynx 4.1 (Waters, Reino Unido). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Luna Omega C18 (150 mm × 2.1 mm y 1.6 µm; Phenomenex) mantenida a 40°C. Se inyectaron cinco µl de cada muestra pretratada en el sistema cromatográfico y se eluyeron con las fases móviles: ácido fórmico acuoso al 0.1% (A) y acetonitrilo (B). La separación se realizó





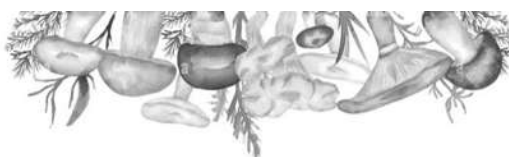
a un caudal total de 150 μl /minuto usando el siguiente programa de gradiente: 0 minutos, 10% B y 0–5 minutos, 20% B. El espectrómetro de masas se operó en modo ESI positivo usando los siguientes parámetros: tensión capilar 3,000 V; voltaje del cono 30 V; temperatura de la fuente 120°C; temperatura del gas de desolvatación 350°C; caudal de gas de desolvatación 800 L/h; rango de masa de adquisición 50–1,000 m/z; tiempo de exploración 0.4 s; formato de datos centroide. La rizoferina se controló a $m/z = 437.141 \pm 0.01$ Da.

6.13 Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

La respiración de las células se determinó a 28°C, 3 y 4 h posteriores a la germinación en medio líquido YPG (2 y 6% de glucosa) o YNB (0.1% de glucosa) respectivamente, utilizando 5×10^7 esporas de cada cepa. Tras lavarlas en agua destilada estéril, las células se suspendieron en tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7.4) que contenía 20 mM de glucosa. El consumo de oxígeno se midió a 28°C con un oxígrafo Oxytherm (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Inglaterra). Las tasas de respiración se expresaron como nanomoles de oxígeno consumido por ml por segundo.

6.14 Cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$

Las esporas de cada una de las cepas se incubaron en agitación constante (150 rpm) con el medio requerido por 2 h, posteriormente las células se recuperaron y se lavaron en buffer HEPES 10 mM, pH 7 a 2,000 rpm por 5 minutos tres veces, después se adiciono 10 μM de 3'-aminofenill fluoresceína (APF) disuelto en 0.1 % de dimetilformamida en buffer HEPES con 110 mM de glucosa por 30 minutos en oscuridad, posteriormente las células se recuperaron y se lavaron tres veces con HEPES y se resuspendieron en HEPES con glucosa. Las muestras procesadas se mantuvieron en oscuridad hasta la cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$. Se usó el equipo VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) con filtro de emisión a 520 nm y línea de excitación a 490 nm.





6.15 Análisis de RT-qPCR

Se realizó la extracción de ARN de micelio de 6 h (YPG 2 y 6%) y 12 h (YNB 0.1%) de las cepas de interés con el método reportado anteriormente (Valle-Maldonado *et al.* 2015). Las muestras de ARN fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad, Hercules, CA) a $\lambda = 260\text{nm}$ y $\lambda = 280\text{nm}$, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (Krebs *et al.* 2009). Se evaluó la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$, en donde una relación $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.90 - 2.0$, indica una calidad óptima del ácido nucleico (Yamaguchi *et al.* 1992; Wilfinger *et al.* 1997). Las muestras de ARN total cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR. La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas, Tabla 6) con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 μl de volumen de reacción contenía 5 μl de ARN templado (100 μg), 0.5 μl de mezcla de enzimas (retrotranscriptasa y ADN polimerasa), 12.5 μl de mezcla de reacción 2X, 0.5 μl de oligonucleótido directo (10 μM), 0.5 μl de oligonucleótido reverso (10 μM), 0.5 μl de sonda (5 μM), y 5.5 μl de agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción fue preparada en un gabinete para PCR (UVP). La RT-qPCR se inició por la adición de la transcriptasa reversa (50°C, 30 minutos) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 minutos), seguidas por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron detectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de





530 nm. En cada experimento fueron incluidos genes de expresión constitutiva (*tfc-1*) como controles positivos y agua como control negativo.

Tabla 6. Oligonucleótidos y sondas utilizados para RT-qPCR

Gen (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM- BHQ1	Tm (°C) / GC (%)
<i>tfc-1</i> (106349)	ATGGCGGTGACGAGGGTTT	67.21 / 57.9
	GGGCATCTGTGGCAATCTTTC	66.32 / 52.4
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	68.48 / 52.6
<i>arf3</i> (155350)	TTGGACGCTGCAGGAAAGAC	68.00 / 55.0
	CCAACGGTTGGGATAGTAGTGA	65.10 / 50.0
	TCTCTACAAGCTGAAACTGAACCAATCA	68.70 / 39.29
<i>rfs</i> (168439)	CTGGCGAATTAAAGGGCTTTGTC	65.04 / 47.83
	GGACTGCTTGAGGGTCTCATTG	65.74 / 54.55
	TCGTGATTTTCGGTGGCGTCAA	67.72 / 52.38
<i>fzo1</i> (1299828)	TGTCGGCTTCTTGGTCTATGTC	64.88 / 50.00
	CAGCCTGCTTGAACCTTCTTGAC	64.47 / 50.00
	CAGCGACATGCGCAGTGCTGT	70.43 / 61.90
<i>dnm1</i> (1296413)	CGCTCGGTGGAGATGGTATC	64.96 / 60.00
	CGACTTGTTGCCGCACTTTAC	65.08 / 52.38
	TGTAGCAACTCGTCAAAGTTCTCCTCCT	69.98 / 46.43

*Los números entre paréntesis indican el número ID en la base de datos de *M. lusitanicus* (https://genome.jgi.doe.gov/Muccir1_3/Muccir1_3.home.html)

6.16 Sobreexpresión de los genes *fzo1* y *dnm1* en $\Delta arf3$

La sobreexpresión de los genes de interés se llevó a cabo con el plásmido pEUKA4 que contiene el gen *leuA* que restaura la auxotrofia a leucina y el promotor del gen *gpd1* el cual es inducible por glucosa: el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *A. niger* (Wolff y Arnau, 2002). Se generaron los plásmidos que contenían los genes *fzo1* y *dnm1* silvestres con los cuales se transformó a la cepa $\Delta arf3$.

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (Gutiérrez et al. 2011) generados según el protocolo descrito por Heeswijk y Roncero, 1984. Los protoplastos al carecer de pared celular permiten la incorporación de ADN exógeno mediante electroporación. Para obtener protoplastos transformables se inocularon 1×10^7 esporas/ml en





25 ml de medio líquido YPG, pH 4.5 suplementado cuando se requería con 200 µg/ml de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación (250 rpm) durante un período de 3 a 4 h, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las germínulas se precipitaron durante 5 minutos a 2,000 rpm en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en buffer fosfato-sorbitol (Sorbitol 0.5 M, fosfato sódico pH 6.5 10 mM), finalmente se resuspendieron en buffer fosfato-sorbitol a razón de 5 ml por cada 5×10^6 esporas inoculadas inicialmente. Para la digestión de la pared celular se añadió 1 mg/ml de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0.15 mg/ml de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals, Massachussets). Las germínulas se incubaron a 30°C con agitación suave (50 rpm) durante 90 minutos o hasta que se observó al microscopio la pérdida de pared celular. Para detener la digestión se añadieron 5 ml de sorbitol 0.5 M frío, se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 1,000 rpm, se resuspendieron las células nuevamente en 5 ml de sorbitol 0.5 M frío y se centrifugaron en las mismas condiciones. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de sorbitol 0.5 M.

Para la transformación se añadieron 20 µl de ADN que contuvieran 1 µg de ADN plasmídico o 3 µg de ADN lineal a 200 µl de protoplastos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm estéril previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en electroporador Bio-Rad Gene Pulser Xcell con los siguientes parámetros de electroporación: 0.8 Kv, 25 Mf de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω. Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico se añadió 1 ml de YPG pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol frío y se transfirió a un tubo eppendorf estéril. La mezcla de transformación se incubó durante 1 h a 26°C con una agitación de 150 rpm para permitir la recuperación de los protoplastos. Seguido los protoplastos se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm, se resuspendieron en 600 µl de YNB pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol + niacina + tiamina (+ leucina





cuando fue necesario). Los protoplastos transformados se sembraron cuidadosamente en cajas del medio mínimo adecuado para la selección de las transformantes.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de sobreexpresión en *M. lusitanicus*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (°C) / GC (%)
fzo1 FWR XhoI	GGGGGctcgagATGTCGCAATCACAGATATT	71.51 / 51.61
fzo1 REV NotI	GACTAgcgggccgcTTAAGCATCTTCTTTGGCAA	74.92 / 51.52
dnm1 FWR XhoI	GGGGGctcgagATGAATGATTTAATCGAGTT	70.75 / 45.16
dnm1 REV NotI	GCCTAgcgggccgcCTACATGACATTTTTGATGA	75.08 / 51.52
sod1 FWR XhoI	CGGTTctcgagATGGTCAACGCTATTGCTGT	73.78 / 51.61
sod1 REV NotI	GCCTTgcggccgcTTATTTGGTAACTACAAGGA	75.03 / 51.52
sod2a FWR XhoI	CGGTTctcgagATGCTATCCATTGCTACCAA	71.84 / 48.39
sod2a REV NotI	GAATTgcggccgcTTAATGCTGAGCCTTTGCAA	75.89 / 51.52
cat1a FWR XhoI	CGGTTctcgagATGTCCAAGAACAACCTTTGAC	71.57 / 48.39
cta1a REV NotI	GAATTgcggccgcTTAAGCCTTGGAGCTAAGAG	75.13 / 54.55

*Las letras en minúsculas ilustran la secuencia diana de los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos.

6.17 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron mediante el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA). Se usó el software GraphPad Prism 8.4. La prueba post hoc empleada fue Dunett. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.





VII. RESULTADOS

7.1 Genotipificación de las cepas mutantes en los genes *arf3* y *rfs*

Con el objetivo de corroborar que los fondos genéticos mutantes de las cepas a utilizar presentaran la delección correspondiente, se realizó un análisis del nivel del transcrito mediante RT-qPCR. Los datos mostraron que la cepa mutante en el gen *arf3* no acumuló transcrito de dicho gen, a diferencia de la cepa WT MU636 (Fig. 17). Resultados similares fueron registrados para la mutante en el gen *rfs* y en la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ (Fig. 10). Estos datos corroboran el genotipo mutante de cada una de las cepas.

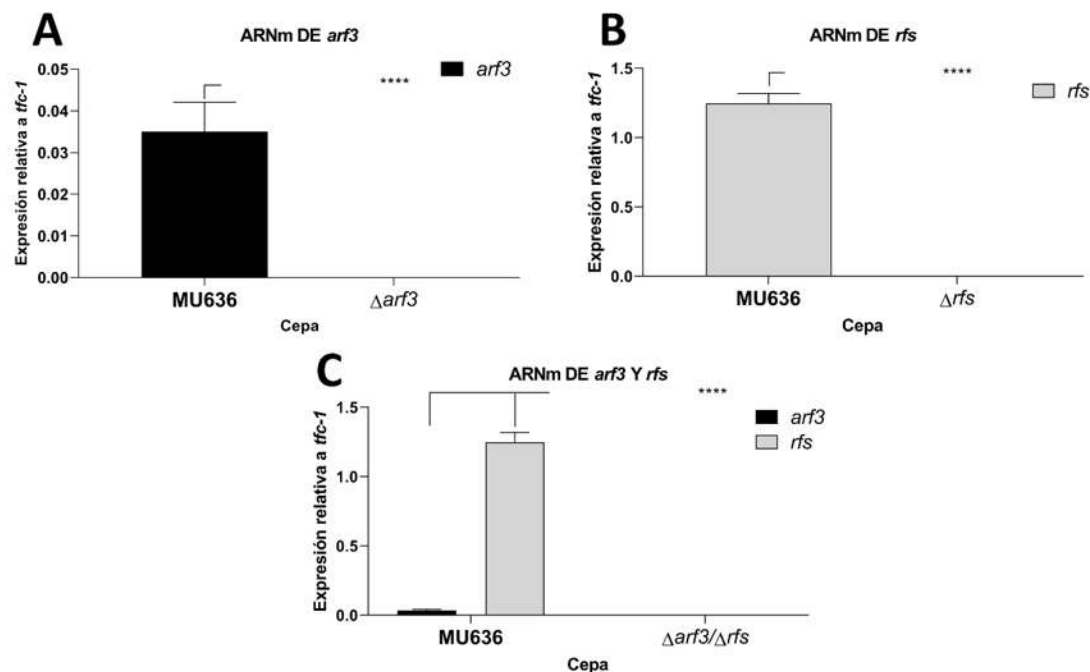


Figura 17. Genotipificación de las cepas mutantes en *arf3* y *rfs*. La genotipificación de las cepas se llevó a cabo mediante RT-qPCR. Se observó la ausencia del transcrito de los genes, *arf3* en la cepa $\Delta arf3$ (A), *rfs* en la cepa Δrfs (B) y ambos genes en la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ (C). Muestras provenientes de esporas, se usó el gen *tfc-1* como gen de referencia. Se realizó un análisis de tipo Δct para la comparación de los niveles de transcrito, $n = 3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, **** $p < 0.0001$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.2 Cuantificación de rizoferrina en los sobrenadantes

Con el objetivo de demostrar la posible correlación del incremento de la virulencia de la mutante $\Deltaarf3$ con una mayor cantidad de rizoferrina secretada, se llevó a cabo su cuantificación relativa por el método de UPLC-ESI-TOF-MS. Para ello, se produjo SS en YNB al 0.1% de glucosa (YNB-0.1%) suplementado o no con 0.5 mM de KCN, un inhibidor de la cadena transportadora de electrones. No se observó secreción de rizoferrina en la cepa Δrfs , mientras, la cepa WT sobreexpresando al gen *rfs* (MU636 *rfs*^{O/E}) aumentó los niveles de rizoferrina 10 veces más que la cepa WT (Fig. 16 A). Por otro lado, la cepa $\Deltaarf3$ generó aproximadamente 12 veces más rizoferrina respecto a la cepa WT, mientras que en el caso de la doble mutante $\Deltaarf3/\Delta rfs$ no se detectó acumulación de rizoferrina en el sobrenadante (Fig. 18A). Por otro lado, se determinaron los niveles de rizoferrina en los sobrenadantes de las cepas crecidas en YNB-0.1% suplementado con 0.5 mM de KCN, lo cual generó una disminución de los niveles de rizoferrina en los SS de todas las cepas (Fig. 18B). Estos datos demuestran que la toxicidad del sobrenadante de $\Deltaarf3$, descritos previamente (Patiño-Medina *et al.* 2018) correlacionan con altos niveles de rizoferrina cuya producción depende de una actividad mitocondrial adecuada. Además, la anulación de la síntesis de este sideróforo abolió el carácter toxico del SS de $\Deltaarf3$.

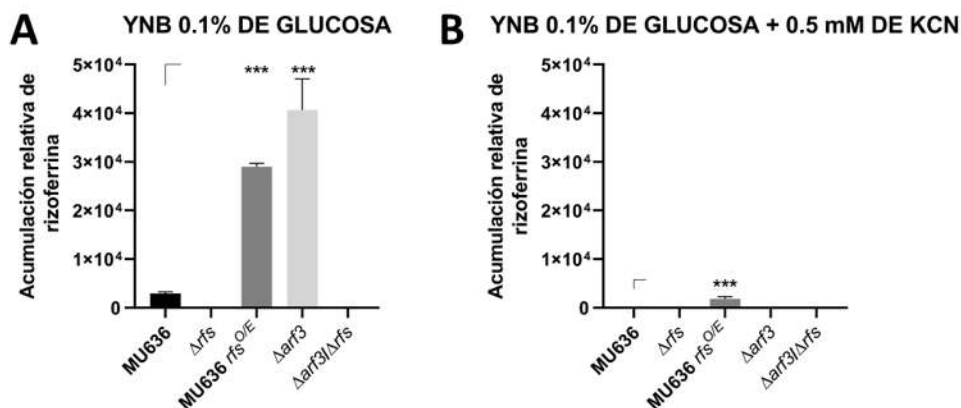


Figura 18. Acumulación de rizoferrina en la cepa $\Deltaarf3$. Se determinó la acumulación de rizoferrina de las cepas MU636 *rfs*^{O/E} y $\Deltaarf3$ por el método UPLC-ESI-TOF-MS en el SS producido medio de





cultivo YNB-0.1% (A). Con la adición de KCN al medio de cultivo en todas las cepas (B), $n=3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, $***p<0.001$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.3 Función de Arf3 y Rfs en el metabolismo oxidativo mitocondrial y su relación con la virulencia

Con el objetivo de demostrar si el aumento de la virulencia en la cepa $\Delta arf3$ dependía del metabolismo oxidativo mitocondrial (MOM), se obtuvieron los SSs de las distintas cepas producidos en condiciones aeróbicas en los medios YPG suplementado con 2% de glucosa (condición estándar, YPG-2%), en dicho medio se estimula tanto el MOM como el metabolismo fermentativo (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022), medio YNB suplementado con 0.1% de glucosa (YNB-0.1%) que estimula el MOM (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022) y medio YPG suplementado con 6% de glucosa (YPG-6%) que promueve el metabolismo fermentativo (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). Con dichos SSs se probó la toxicidad frente al nematodo *C. elegans* (Fig. 19). La tasa de supervivencia de *C. elegans* en presencia de los SSs obtenidos en medio YPG-2% de la cepa $\Delta arf3$ reveló una menor supervivencia de los mismos (Fig. 19A) respecto a la cepa WT. Mientras que los SSs de las cepas Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ no mostraron toxicidad respecto a la cepa WT (Fig. 19A). Los SSs generados en medio YNB-0.1%, reveló que el SS de la cepa WT presentó una tasa de supervivencia del 60% aproximadamente y el SS de la mutante $\Delta arf3$ generó una supervivencia de aproximadamente el 20%. Por otro lado, los SSs producidos en el medio YNB-0.1% de las cepas Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ generaron una supervivencia mayor respecto a la cepa WT (Fig. 19B). Cuando se estimuló el metabolismo fermentativo mediante el crecimiento en medio YPG-6% la tasa de supervivencia de *C. elegans* generada por los SSs aumentó notablemente en todas las cepas incluidas $\Delta arf3$ (Fig. 19C). Estos datos sugieren que concentraciones elevadas de glucosa (6%) están posiblemente estimulando la vía PKA, como se ha descrito anteriormente (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022;





Patiño-Medina *et al.* 2022), sugiriendo que dicha vía está implicada en la regulación de la proteína Arf3. De igual manera, cuando se inocularon larvas de *G. mellonella* con esporas de cada una de las cepas, se observó que las cepas Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ mostraron un fenotipo no virulento en este modelo, respecto a la WT, mientras que la cepa $\Delta arf3$, tuvo una mayor virulencia disminuyendo la supervivencia de las larvas hasta 4.5 veces que la cepa WT. Estos datos en conjunto demuestran la importancia de Arf3 y Rfs como reguladores negativo y positivo, respectivamente, en la toxicidad del SS y virulencia de *M. lusitanicus*.

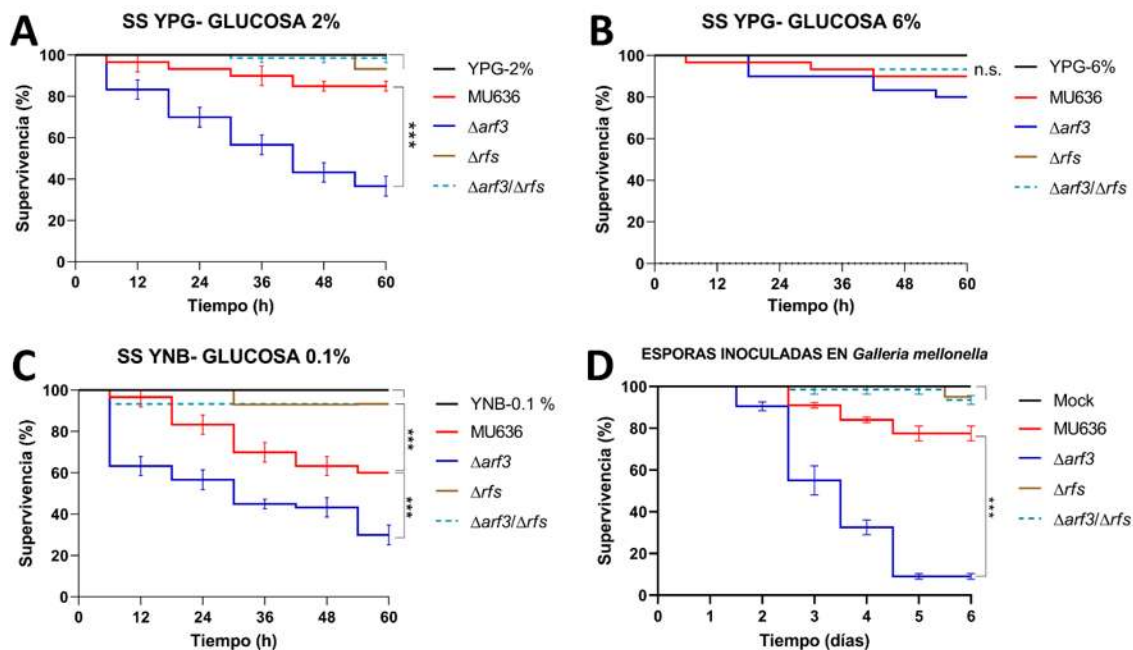


Figura 19. Participación de Arf3 y Rfs en el metabolismo oxidativo mitocondrial y su relación con la virulencia. Se evaluó la toxicidad de los SSs producidos en los medios YPG-2% (A), YNB-0.1% (B) y YPG-6% (C), dichos SSs se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18°C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo y 20 larvas de *G. mellonella* por ensayo inoculadas con 10,000 esporas cada una de las cepas, evaluando su supervivencia durante 6 días, n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox ***p<0 .001.





7.4 Importancia del metabolismo oxidativo mitocondrial en la toxicidad del sobrenadante

Con el objetivo de demostrar la importancia del MOM en la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*, se obtuvo el SS proveniente del crecimiento aeróbico en medio YNB-0.1% suplementado con concentraciones subinhibitorias de 5 mM de KCN (inhibidor del flujo de electrones en la cadena transportadora, Fig. 20A) y 10 mM de N-acetilcisteína (quelante de ERO, Fig. 20B), respectivamente. En dichos SS se procedió a evaluar la tasa de supervivencia del nematodo *C. elegans*. Se observó que la adición de KCN y N-acetilcisteína condujo a un aumento considerable de la supervivencia del nematodo, sugiriendo así que la proteína Arf3 reprime el metabolismo oxidativo mitocondrial, así como la generación de moléculas tipo ERO las cuales regulan la toxicidad del SS, la cual depende de un adecuado metabolismo oxidativo mitocondrial.

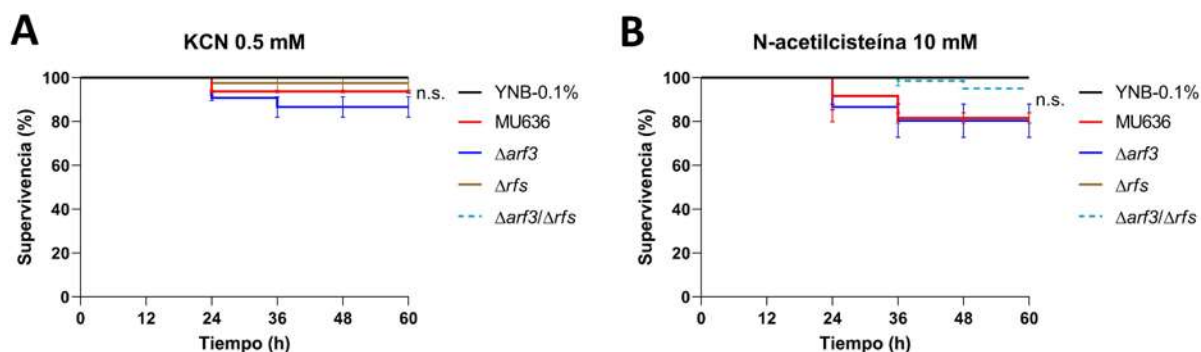


Figura 20. Arf3 regula negativamente metabolismo oxidativo mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno. Se adicionó 0.5 mM de KCN (A) y 10 mM de N-acetilcisteína (B) al medio de cultivo de la cepa $\Delta arf3$, dichos SSs se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18°C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox, sin diferencias significativas.





7.5 La toxicidad del sobrenadante la mutante $\Delta arf3$ es regulada negativamente por la adición de Fe^{2+} durante el crecimiento

Nuestros datos mostraron que la acumulación de rizoferrina en el medio de cultivo de la cepa $\Delta arf3$ (Fig. 21A) correlaciona con el aumento de la toxicidad de su SS (Fig. 19C). Además, se ha reportado que la síntesis de sideróforos es regulada negativamente por la presencia de hierro en el medio (Bendale *et al.* 2009). Al suplementar el medio de cultivo YNB-0.1% con 22.5 μM (Fig. 21A) y 45 μM (Fig. 21B) de $FeCl_2$ disminuyó la toxicidad de los SSs, generando un aumento en la supervivencia del nematodo considerablemente para la cepa $\Delta arf3$ al igual que en la cepa WT. Estos datos indican que la toxicidad del SS de la cepa $\Delta arf3$ es suprimida por la adición de Fe^{2+} en el medio de cultivo, sugiriendo que la toxicidad es mediada en gran parte por rizoferrina, cuya producción es regulada negativamente por la presencia de hierro libre.

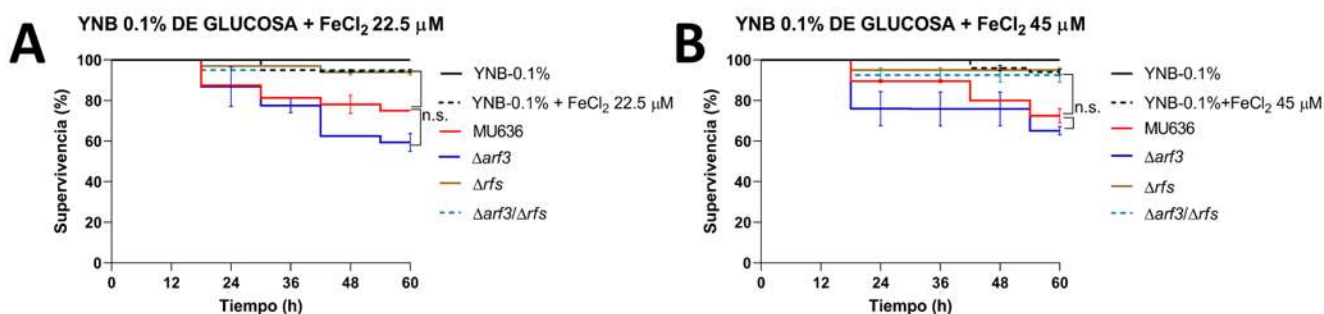


Figura 21. La adición de hierro en el medio de cultivo reprime la toxicidad del sobrenadante de la cepa $\Delta arf3$ de *M. lusitanicus*. La adición de Fe^{2+} 22.5 μM (A) y 45 μM (B) al medio YNB-0.1% disminuyeron la toxicidad de los SSs, los cuales se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18°C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, $n = 3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox, sin diferencias significativas.





7.6 Participación de Arf3 y Rfs en la termotolerancia de *M. lusitanicus*

Se ha descrito en *S. cerevisiae* que las proteínas Arf son necesarias para la resistencia tanto al incremento como a la disminución de la temperatura (Click y Botstein, 2002). Con el objetivo de conocer si las proteínas Arf3 y Rfs estaban implicadas en la resistencia al aumento de la temperatura, las cepas se crecieron a 28°C (Fig. 22A), la cual es la temperatura optima de crecimiento de *M. lusitanicus*, y a 37°C la cual está implicada en la virulencia de hongos patógenos de humanos como *Rhizopus spp.* (Takashima *et al.* 2023) (Fig. 22B). Se observó que a 28°C las cepas no presentaron diferencias en su crecimiento mientras que a 37°C las cepas $\Delta arf3$, Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ tuvieron un menor crecimiento (~25-50%) respecto a la cepa WT. Estos resultados sugieren que las proteínas Arf3 y Rfs son necesarias para la termotolerancia de *M. lusitanicus*.

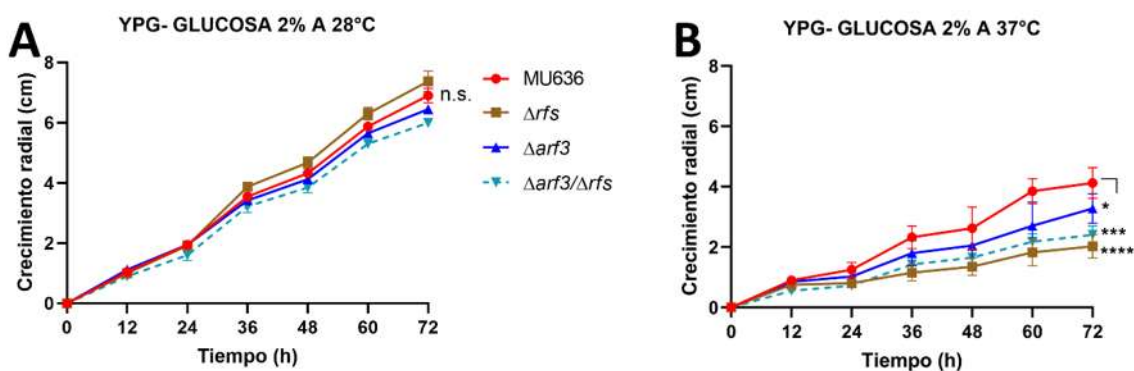


Figura 22. Participación de Arf3 y Rfs en la termotolerancia de *M. lusitanicus*. Las esporas de cada cepa se colocaron en el centro de las placas con medio YPG-2%, las cuales se incubaron a 28°C (A) y a 37°C (B). Se midió el diámetro de crecimiento cada 12 h durante 72 h, n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, *p<0.05, ***p<0.001 y ****p<0.0001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.7 Participación de Arf3 y Rfs en la germinación de *M. lusitanicus* a bajos niveles de oxígeno

Con el objetivo de demostrar la participación de Arf3 en la germinación de *M. lusitanicus* a baja concentración de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$) se inocularon 5×10^6 esporas en medio YPG-2% líquido y se cuantificó el porcentaje de germinación después de 6 h, en donde se ha descrito que las esporas de la cepa WT germinan como levadura en un 50-60% y el resto de las esporas germinan como hifa (Patiño-Medina *et al.* 2023). Se observó que la cepa WT germinó como levadura y micelio en un 50% para cada morfología. Mientras que la cepa $\Delta arf3$ presentó una mayor proporción de hifas (60-65%) y la longitud de estas fue de hasta 2.5 veces más largas respecto a la cepa WT (Fig. 23A-C). Mientras que las cepas Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ tuvieron una germinación similar a la WT, asimismo, la longitud de sus hifas fue de aproximadamente 0.5 veces menos largas que las de la WT (Fig. 23A-C). Estos datos en conjunto sugieren que Arf3 es un regulador negativo del desarrollo micelial a concentraciones bajas de oxígeno.



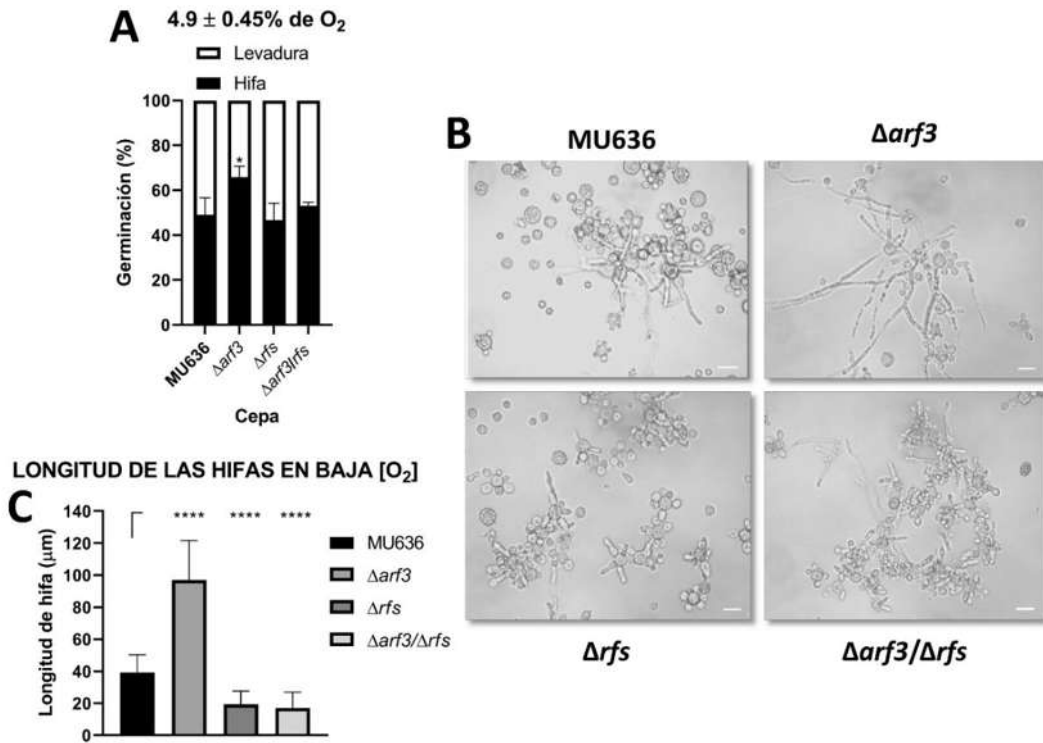


Figura 23. Arf3 regula negativamente el desarrollo micelial a bajas concentraciones de oxígeno.

Las esporas se germinaron por 6 h a una concentración baja de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$) en medio YPG-2% (A). Se muestran imágenes representativas de la germinación de cada una de las cepas a 6 h de germinación (B). Se determinó la longitud de las hifas de las distintas cepas a las 6 h (C). Barra de escala= 20 μm , $n = 3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, $*p < 0.05$ y $****p < 0.0001$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.8 Función de Arf3 y Rfs de *M. lusitanicus* en el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable

Con el objetivo de observar si las cepas $\Delta arf3$, Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ tenían defectos en el metabolismo oxidativo mitocondrial (MOM), se realizó un ensayo de crecimiento radial en medio YNB-2% o en presencia de una fuente de carbono no fermentable (glicerol 2%, YNG). Cuando las cepas se crecieron en presencia de YNB-2%, todas tuvieron un crecimiento similar al de la cepa WT (Fig. 24A). Por otro lado, el crecimiento radial en YNG de las mutantes sencillas fue similar a la cepa WT, en cambio la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ presentó un crecimiento disminuido (40% menos que la WT) (Fig. 24B). Estos resultados sugieren que la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ de *M. lusitanicus* podría tener defectos en su MOM, teniendo como consecuencia la desventaja para utilizar glicerol de manera eficiente como única fuente de carbono.

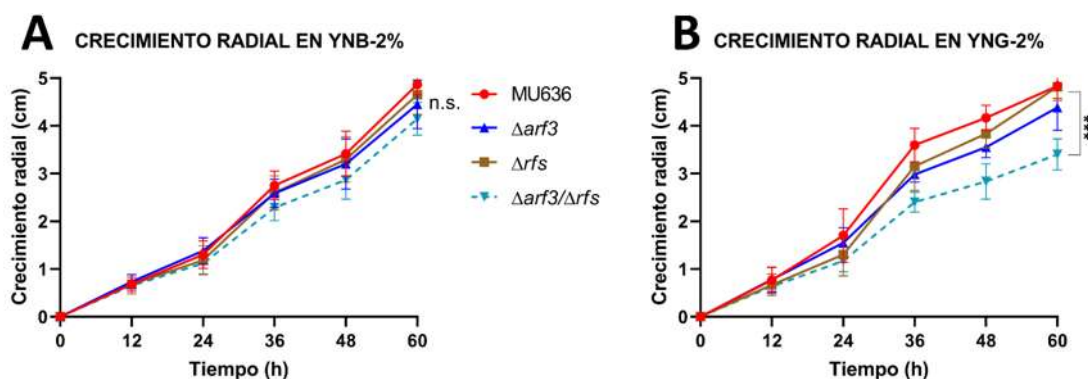


Figura 24. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de las cepas $\Delta arf3$ y Δrfs . Las esporas de cada cepa se inocularon en el centro de las placas YNB-2% (A) y YNG (glicerol al 2%) (B). Se midió el diámetro de crecimiento cada 12 h por 60 h, n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, ***p<0.001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.9 Efecto de Arf3 y Rfs sobre el consumo de O₂ y producción de OH⁻ en *M.*

lusitanicus

Con el objetivo de correlacionar el MOM y la producción del radical OH⁻ en cada una de las cepas estudiadas. Se procedió a cuantificar los niveles del consumo de oxígeno posterior a la germinación por 3 h en agitación constante (150 rpm) en los medios YPG-2% (Fig. 25A) y YPG-6% (Fig. 25B) y 6 h en el medio YNB-0.1% (Fig. 25C), encontrando niveles denominados como basales en cada uno de los medios para la cepa WT. Además, se cuantificó la producción de OH⁻ en medio YNB-0.1% (Fig. 25D). En el caso de la cepa $\Delta arf3$ mostró un consumo de oxígeno similar al de la cepa WT en medio YPG-2% (Fig. 25A), mientras que en los medios YNB-0.1% (Fig. 25B) y YPG-6% (Fig. 25C) la cepa $\Delta arf3$ tuvo un aumento de aproximadamente 1.5 y 0.5 veces más consumo de oxígeno que aquellos de la cepa WT. De igual manera la cepa $\Delta arf3$ tuvo un incremento de aproximadamente 0.5 veces en los niveles de OH⁻ respecto a la cepa WT (Fig. 23D). Por otro lado, la cepa Δrfs tuvo un aumento de aproximadamente 2, 2.5 y 2 veces más en el consumo de oxígeno posterior al crecimiento en los medios de YPG-2% (Fig. 25A), YNB-0.1% (Fig. 25B) y YPG-6% (Fig. 25C), respectivamente. Por otra parte, se observó una producción de 1.75 veces más en los niveles de OH⁻ respecto a la cepa WT. Interesantemente, la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ tuvo un decremento de aproximadamente 0.5-0.7 veces menos en el consumo de oxígeno en los tres medios distintos (Fig. 25A-C), de igual manera esta cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ mostró una reducción en la producción de OH⁻ de al menos 0.25 veces menos que la cepa WT (Fig. 25D).

Estos datos sugieren que la virulencia incrementada de la cepa $\Delta arf3$ correlaciona con un aumento del MOM respecto a la cepa WT. En cambio, la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ presentó un consumo de oxígeno disminuido respecto al de la cepa WT, sugiriendo la disminución del MOM. Estos datos en conjunto demuestran que la proteína Arf3 es un regulador negativo del MOM y las ERO generadas mediante este proceso.



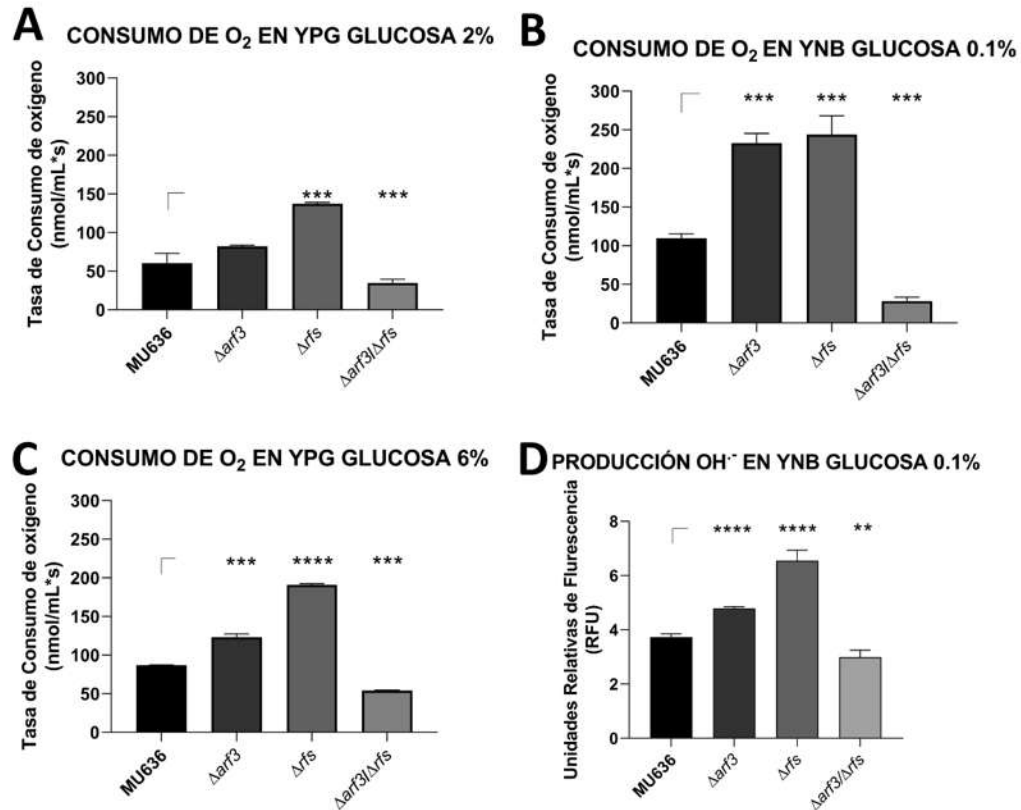


Figura 25. Efecto de Arf3 y Rfs en la tasa de consumo de oxígeno y producción de OH⁻ en *M. lusitanicus*. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno en las cepas WT, $\Delta arf3$, Δrfs y $\Delta arf3/\Delta rfs$ en los medios YNB-2% (A) y YPG-6% (B) en germinulas de 3 h para ambos medios y en medio YNB-0.1% en germinulas de 4 h (C). La cuantificación de la producción de OH⁻ para todas las cepas se realizó en medio YNB-0.1% en germinulas de 3 h empleando la sonda 3'-p-aminofenilfluoresceína (D), n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.10 Función de Arf3 en la regulación transcripcional de los genes *fzo1* y *dnm1*

Con el objetivo de determinar si existía una posible desregulación de los genes implicados en la fusión y fisión mitocondrial, *fzo1* y *dnm1*, respectivamente se llevó a cabo la cuantificación del transcrito de cada uno de estos genes en el contexto de la cepa mutante en el gen *arf3*. Para lo cual se aisló el ARN total proveniente de muestras de micelio de 12 h producido en YNB-0.1% de las distintas cepas. Se observó que respecto a la cepa WT, $\Delta arf3$ presentó un aumento de 0.3 veces más en los niveles de transcrito de *fzo1* (Fig. 26A), mientras que para los niveles de ARNm de *dnm1* mostraron una disminución de 0.68 veces (Fig. 26B). Estos datos sugieren una discreta desregulación positiva del gen *fzo1* en $\Delta arf3$ así como una desregulación negativa para el gen *dnm1*.

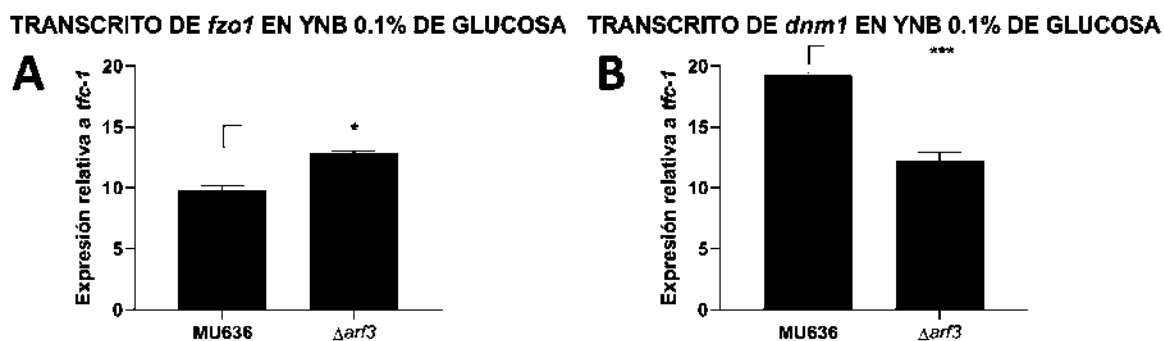


Figura 26. Cuantificación del transcrito de *fzo1* y *dnm1* en la mutante $\Delta arf3$ de *M. lusitanicus* por RT-qPCR. Se aisló el ARN total de micelio de 12 h producido en agitación constante (150 rpm) de la cepa $\Delta arf3$ de *M. lusitanicus*, con el cual se cuantificó el ARNm del gen *fzo1* (A) y del gen *dnm1* (B), se usó el gen *tfc-1* como gen de referencia. Se realizó un análisis de tipo Δct para la comparación de los niveles de transcrito, $n=3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, $*p<0.05$ y $***p<0.001$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.11 Efecto de la sobreexpresión de *fzo1* y *dnm1* en la toxicidad del sobrenadante en ausencia de Arf3

Se sobreexpresaron los genes *fzo1* y *dnm1* en la cepa $\Deltaarf3$ con el objetivo de averiguar la posible participación de Arf3 en la regulación de la fusión y fisión mitocondrial en el MOM y su relación con la toxicidad del SS frente al nematodo *C. elegans*.

Respecto a la cepa WT, el SS producido en el medio YNB-0.1% a partir de la cepa WT sobreexpresando el gen *fzo1* generó una disminución en la supervivencia del nematodo, mientras que la sobreexpresión del gen *dnm1* no generó cambios (Fig. 27A). Cuando en el SS fue producido en YPG-6%, anuló la toxicidad del mismo para todas las cepas excepto en el SS proveniente de la cepa WT sobreexpresando a *fzo1* cuyo SS siguió mostrando una ligera disminución en la supervivencia del nematodo (Fig. 27B). Por otro lado, cuando los genes *fzo1* y *dnm1* fueron sobreexpresados en $\Deltaarf3$, el SS producido a partir del medio YNB-0.1% de la cepa $\Deltaarf3$ sobreexpresando a *fzo1* generó un nivel de supervivencia similar a $\Deltaarf3$, mientras que la sobreexpresión de *dnm1* aumentó la supervivencia del nematodo en aproximadamente 3 veces más respecto a la cepa $\Deltaarf3$ (Fig. 27C). Finalmente, el SS obtenido a partir del medio YPG-6% aumentó la supervivencia del nematodo para las cepas sobreexpresantes en $\Deltaarf3$ (Fig. 27D).

Estos datos en conjunto demuestran la posible regulación de Fzo1 y Dnm1 por la proteína Arf3 en los niveles de toxicidad del SS de *M. lusitanicus*, sugiriendo que estos elementos podrían encontrarse en la misma vía de señalización.



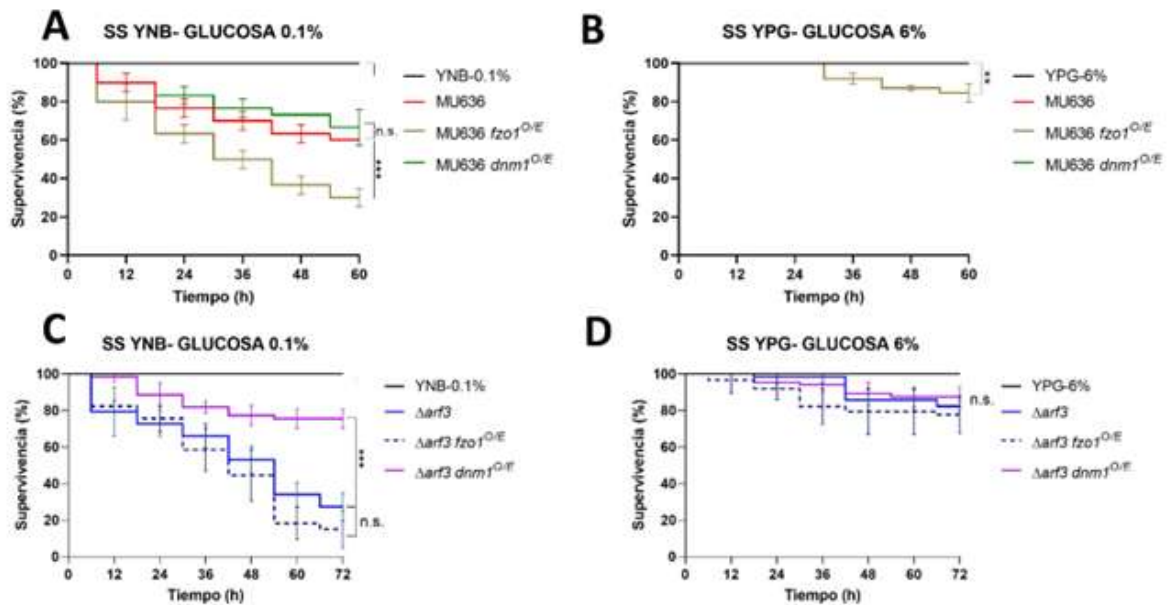


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de *fzo1* y *dnm1* en la toxicidad del SS de $\Deltaarf3$. Se evaluó la toxicidad de los SSs de las cepas sobreexpresantes de *fzo1* y *dnm1* en la WT producidos en los medios YNB-0.1% (A) y YPG-6% (B) así como los SSs de las cepas sobreexpresantes en la cepa $\Deltaarf3$ producidos YNB-0.1% (C) y YPG-6% (D), dichos SSs se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18°C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox ** p<0 .01 y *** p<0 .001.





7.12 Efecto de la sobreexpresión de *fzo* y *dnm1* en el consumo de oxígeno y producción de OH^- en ausencia de *Arf3*

Con el objetivo de demostrar si las sobreexpresiones de los genes *fzo1* y *dnm1* en la cepa WT y en la cepa $\Delta arf3$ afectaban parámetros de actividad mitocondrial. Se procedió a medir el consumo de oxígeno posterior a las 3 h de germinación en agitación constante (150 rpm) en los medios YPG-2% (Fig. 28A) y YPG-6% (Fig. 28B) y 6 h en el medio YNB-0.1% (Fig. 28C), así también se cuantificaron los niveles de OH^- en medio YNB-0.1% (Fig. 28D). Los resultados mostraron un consumo de oxígeno y producción de OH^- los cuales denominamos como basales para la cepa WT y sus sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* (Fig. 28A-D). La sobreexpresión de *fzo1* en $\Delta arf3$ generó un ligero aumento en el consumo de oxígeno en los medios YPG-2% y YPG-6% de aproximadamente 0.3-0.5 veces más, respectivamente (Fig. 28A y C); mientras que en el medio YNB-0.1% no hubo diferencias en el consumo de oxígeno ni en la producción de OH^- (Fig. 28B y D). Por otra parte, respecto a la cepa $\Delta arf3$, la sobreexpresión de *dnm1* en $\Delta arf3$ redujo aproximadamente 0.4, 1.2 y 0.3 veces menos el consumo de oxígeno en los medios YPG-2%, YPG-6% y YNB-0.1% (Fig. 28A-C) respectivamente. También se observó una reducción de aproximadamente 0.2 veces menos en los niveles de OH^- en el medio YNB-0.1% (Fig. 28D). Estos datos en conjunto sugieren que los elementos de fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial están influyendo en los niveles de toxicidad del SS de la cepa $\Delta arf3$ probablemente mediante la regulación del MOM y producción de OH^- .



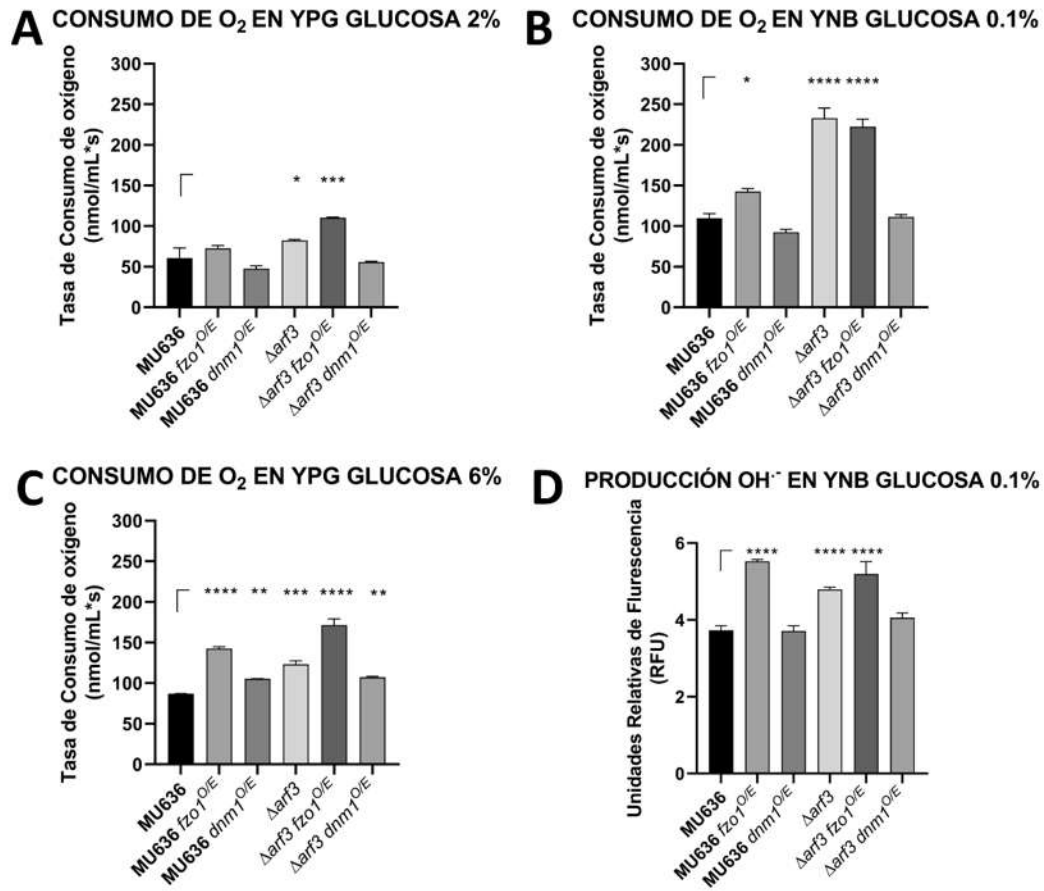


Figura 28. Tasa de consumo de oxígeno y producción de OH⁻ en las sobreexpresantes de *fzo1* y *dnm1* en las cepas WT y Δ arf3. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* en la WT y en Δ arf3, en los medios YNB-2% (A) y YPG-6% (B) en germinulas de 3 h para ambos medios y en medio YNB-0.1% en germinulas de 4 h (C). La cuantificación de la producción de OH⁻ para todas las cepas se realizó en medio YNB-0.1% en germinulas de 3 h empleando la sonda 3'-p-aminofenilfluoresceína (D), n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.13 Importancia de los sistemas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa) en la toxicidad de los sobrenadantes de *M. lusitanicus*

Debido a que los niveles de OH^- aumentaron en la cepa $\Delta arf3$ respecto a la cepa WT (Fig. 25D), se evaluó la correlación de sus niveles con el grado de virulencia. Para lo cual se analizó la función de los sistemas antioxidantes, superóxido dismutasa (Sod) y catalasa (Cat), en la toxicidad de los SSs de *M. lusitanicus*. Se generaron las cepas sobreexpresantes de los sistemas antioxidantes Sod (Sod1 citosólica y Sod2a mitocondrial) y Cat (Cat1a citosólica) en las cepas WT y $\Delta arf3$ y se evaluó la toxicidad de sus SSs en los diferentes medios YPG-2% (Fig. 29A y D), YNB-0.1% (Fig. 29B y E) y YPG-6% (Fig. 29C y F). Se observó que la sobreexpresión de los genes *sod1*, *sod2a* y *cat1a* en las cepas WT y $\Delta arf3$ redujo considerablemente la toxicidad de los SSs respecto a las cepas WT (reducción del 25-63% aproximadamente en YNB0.1%) y $\Delta arf3$ (reducción del 33-42% en YPG-2% y 29-43% en YNB-0.1%, aproximadamente) (Fig. 29A, B y 29D, E); mientras que los SSs provenientes del medio YPG-6% aumentaron la supervivencia del nematodo para todas las cepas evaluadas (Fig. 29C, F). De igual manera, la sobreexpresión de los distintos genes que codifican a los sistemas antioxidantes en la cepa $\Delta arf3$ condujeron a una disminución significativa del consumo de oxígeno en medio YNB-0.1% respecto a la cepa $\Delta arf3$ (~4.8 veces menos), incluso por debajo del consumo de oxígeno de la cepa WT (~2.5 veces menos) (Fig. 29G). Finalmente, cuando se evaluó la producción de OH^- por las cepas sobreexpresantes se observó que la sobreexpresión de los genes *sod1* y *sod2a* en el fondo genético silvestre no generaron diferencias respecto a la cepa WT, mientras que la sobreexpresión del gen *cat1a* en el mismo fondo genético generó un aumento de ~10% de producción de OH^- respecto a la cepa WT, mientras que la sobreexpresión de los genes *sod1* y *sod1a* en la cepa $\Delta arf3$ generó una disminución de ~17-20% en la producción de OH^- respecto a la mutante sencilla mientras que cuando se sobreexpresó el gen *cat1a* en la misma cepa, se observó una disminución de ~14%





en la producción de OH^- (Fig. 29H). Estos datos en conjunto demuestran la importancia de los subproductos del metabolismo oxidativo mitocondrial (ERO) para la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*.

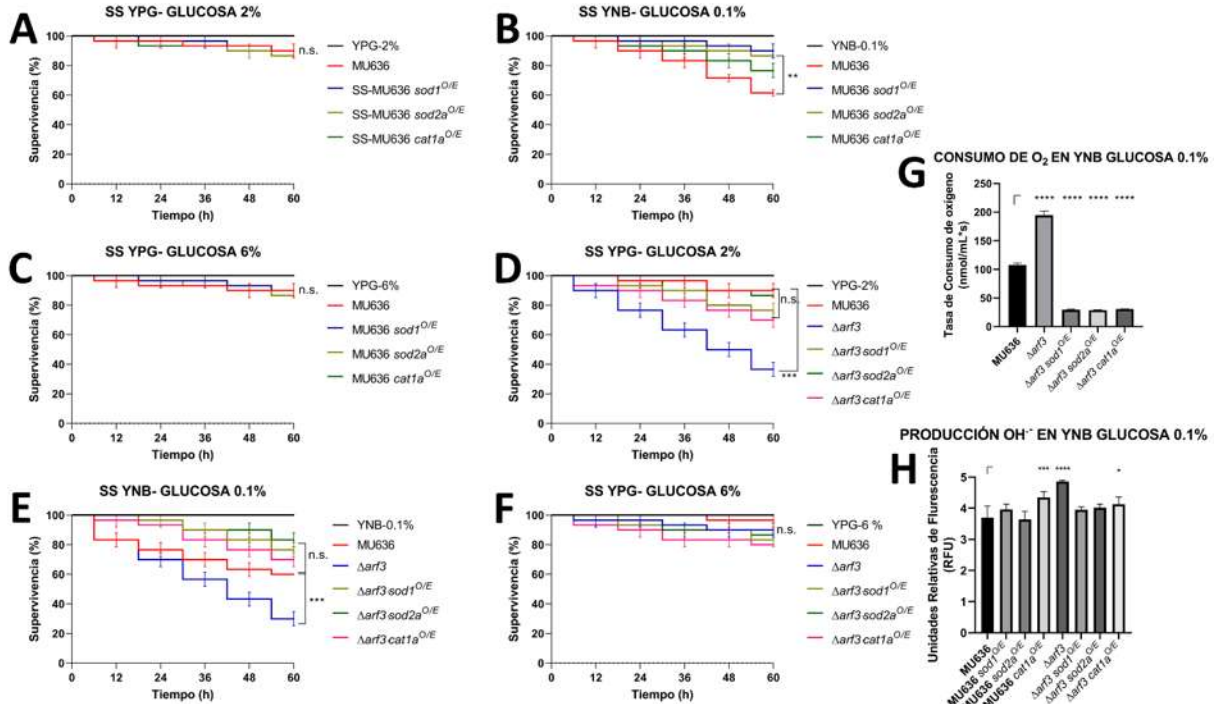


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de los sistemas antioxidantes Sod y Cat en la cepa *Δarf3* en la toxicidad y consumo de oxígeno. Se evaluó la toxicidad de los SSs de las cepas sobreexpresantes de *sod1*, *sod2a* y *cat1* en la WT y *Δarf3* producidos en los medios YPG-2% (A y D), YNB-0.1% (B y E) y YPG-6% (C y F), dichos SSs se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18 °C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. La tasa de consumo de oxígeno se cuantificó en medio YNB-0.1% en germinulas de 4 h (G). La cuantificación de la producción de OH^- para todas las cepas se realizó en medio YNB-0.1% en germinulas de 3 h empleando la sonda 3'-p-aminofenilfluoresceína (H), n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox ***p<0 .001, análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba de comparación de medias Dunnett, *p<0.05, **p<0 .01 y ****p<0.0001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.





7.14 Implicación de la mitofagia en la toxicidad del sobrenadante de *M.*

lusitanicus ante la ausencia de Arf3

Con el objetivo de demostrar la mitofagia y su correlación con la toxicidad del SS, se empleó un enfoque farmacológico. Se produjeron los SSs en medio YNB-0.1% (Fig. 30A) adicionado con 100 μ M de Mdivi-1 (Mitochondrial división inhibitor, inhibidor de la fisión mitocondrial) (Fig. 30B) (Qiang *et al.* 2014) o con 100 μ M de AICAR (Fig. 30C) (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido que estimula la mitofagia) (Wang *et al.* 2019). Dichos SSs se probaron frente al nematodo *C. elegans* observándose que el SS producido en medio YNB-0.1% suplementado con Mdivi-1, estimuló ligeramente (~10% para cada cepa) la toxicidad de los SS provenientes de las cepas WT, $\Delta arf3$ y MU636 *rfs*^{O/E} (Fig. 30B) respecto a la condición control YNB 0.1% (Fig. 30A). En cambio, la adición del estimulador de la mitofagia (AICAR) al medio de cultivo redujo considerablemente la toxicidad (~25% para cada cepa) del SS de todas las cepas a niveles muy similares (Fig. 30C). De esta manera se evidencia la importancia de la mitofagia para el control de la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*.



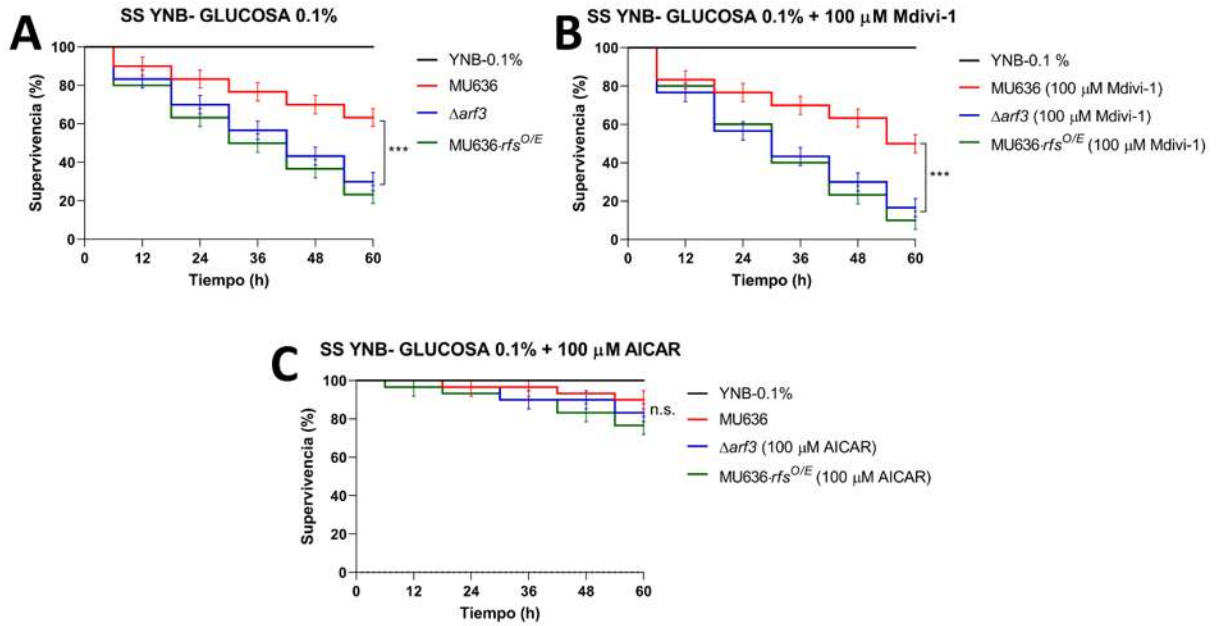


Figura 30. Efecto de la mitofagia en la toxicidad del sobrenadante de la cepa Δ arf3. Se muestra la toxicidad de los SSs producidos en medio YNB-0.1% (A), adicionado con 100 μ M de Mdivi-1 (B) y 100 μ M de AICAR (C), dichos SSs se produjeron en agitación constante (150 rpm) y se evaluó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18 °C y registrando su tasa de supervivencia durante 60 h. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, n= 3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** p<0.001. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.



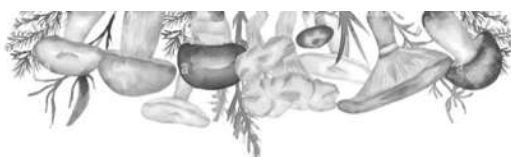


7.15 Análisis *in silico* del promotor y secuencia aminoacídica de *arf3* y *rfs*

Con el objetivo de demostrar la posible regulación de los genes *arf3* y *rfs* a través de los factores de transcripción Tec1 (implicado en el crecimiento micelial en *M. lusitanicus*; Alejandre-Castañeda *et al.* 2023) y el complejo Hap (implicado en la biogénesis mitocondrial en *S. cerevisiae*; Mao y Chen, 2019), se realizó un análisis *in silico* para identificar motivos consenso de estos factores de transcripción en el promotor de *arf3* y *rfs*. Se encontraron para ambos genes un motivo consenso para Tec1 y uno para Hap4, así mismo, se identificó un motivo consenso para Yap1 en *arf3* mientras que en *rfs* este factor de transcripción ya había sido reportado anteriormente (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). También se analizó si estas proteínas (Arf3 y Rfs) presentaban sitios de fosforilación por la PKA pero no se obtuvieron resultados positivos.

Por otro lado, se analizó la secuencia aminoacídica de Arf3 y Rfs con el software MitoFates (Fukasawa *et al.* 2015) para identificar posibles péptidos señal de direccionalidad a mitocondria, encontrándose en la secuencia de Arf3 posibles péptidos señal que dirigen a mitocondria, y que podrían ser reconocidos por TOM20 (translocasa de la membrana externa mitocondrial, en inglés, translocase of the outer membrane), se encontraron 3 de estos péptidos en la secuencia aminoacídica de Arf3 resaltados en color azul ubicados en las posiciones 5-9 (LSKAL), 9-13 (LSKMF) y 78-82 (WRHYY) donde la terminación del primer péptido señal se traslapa con el inicio del segundo (Tabla 8); mientras que en la secuencia de Rfs no se encontraron secuencias de direccionalidad a mitocondria. Asimismo, los softwares Predotar, iPSORT y CELLO (Sun y Habermann, 2017), sugirieron que Arf3 podría ser una proteína con localización mitocondrial mientras que Rfs sería una proteína citoplasmática.

La presencia de estos motivos consenso en los promotores de los genes sugiere una posible regulación de *arf3* y *rfs* a través de Tec1 y Hap4 en el desarrollo micelial a través del metabolismo oxidativo mitocondrial, así como la importancia de estos genes durante la





respuesta a estrés oxidativo, mientras que la presencia de los péptidos señal de direccionalidad a mitocondria apunta a que la proteína Arf3 de *M. lusitanicus* podría ser transportada a la mitocondria.

Tabla 8. Motivos consenso de Tec1, Hap4 y Yap1 en los promotores de *arf3* y *rfs* y péptidos señal de direccionalidad a mitocondria de la proteína Arf3 de *M. lusitanicus*

Función	En la biogénesis mitocondrial a través de la regulación de genes que codifican a proteínas en los complejos respiratorios como el citocromo c, producción de ERO y homeostasis del hierro	Estimulación del crecimiento micelial y virulencia	Necesario para la tolerancia al estrés oxidativo, es activado por H ₂ O ₂
<i>arf3</i>			
Factor de transcripción	Hap4 (TTCCAT)	Tec1 (AAATTCCC)	Yap1 (GTGACAA)
Posición	-153 F	-458 F	-644 R
<i>rfs</i>			
Factor de transcripción	Hap4 (TTCCAT)	Tec1 (CATTCT)	Yap1 (TTACTCA)
Posición	-290 R	-624 R	-154 R
Péptidos señal de direccionalidad a mitocondria			
>Arf3 MGANL <u>SKALSKM</u> FGSKEMRILMLGLDAAGKTTILYKLKLNQSVTTIPTVGFNVESVTYKNVKFNVDVGGQDKIRNL <u>WRHY</u> YTGQTGLIFVI			

Las letras F (forward) y R (reverse) refieren a la hebra de ADN en la cual se ubica cada motivo consenso. El guion debajo de las letras indica el inicio de cada péptido señal.



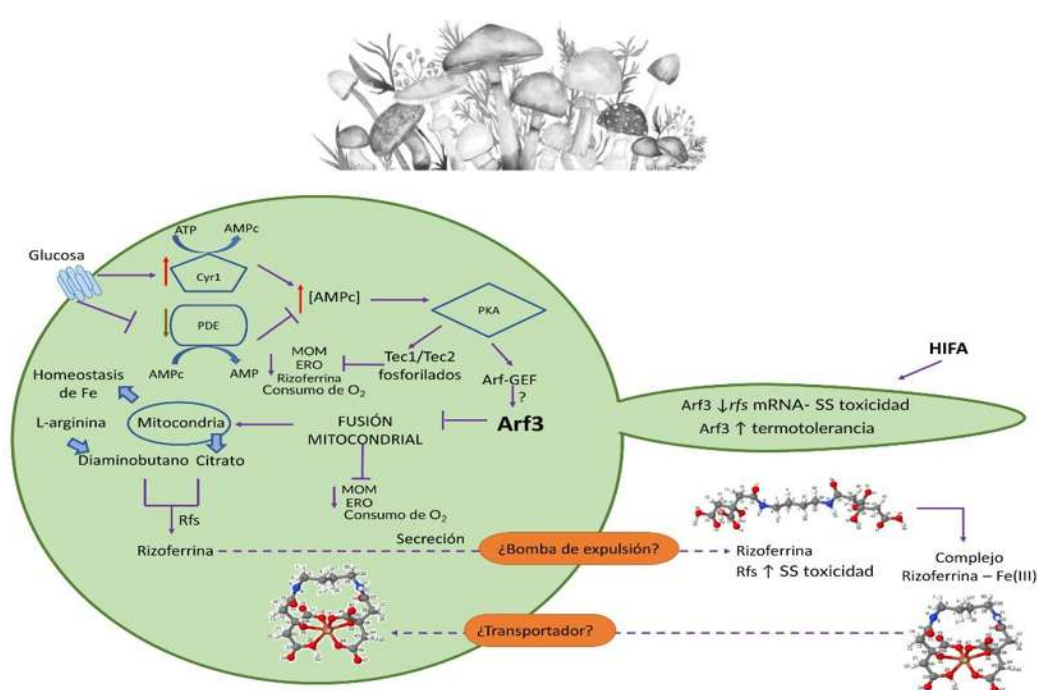


Figura 31. Modelo propuesto de la regulación de Arf3 sobre el metabolismo oxidativo

mitocondrial en *M. lusitanicus*. La presencia de altos niveles de glucosa, posiblemente estimuló la actividad enzimática de la adenilato ciclasa (Cyr1) e inhibió a la fosfodiesterasa (Pde2), induciendo finalmente la generación de niveles elevados de AMPc, el cual se une a PkaR1 (subunidad reguladora 1) de la PKA, activando así una de las 10 subunidades catalíticas de la PKA (PkaC desconocida) para activar un ArfGEF desconocido y probablemente activar a la proteína Arf3, o bien fosforilar a Tec1 o Tec2 inhibiendo el desarrollo micelial así como el metabolismo oxidativo mitocondrial. Esto estimula el metabolismo fermentativo y disminuye el MOM, donde Arf3 regula negativamente el desarrollo micelial aún en bajas concentraciones de oxígeno, el consumo de oxígeno y la producción de ERO (OH.-) al parecer mediante la represión de la fusión mitocondrial donde los sistemas antioxidantes (Sod y Cat) y el aumento de la mitofagia regulan negativamente la toxicidad del SS, además disminuye los niveles de ARNm de *rfs*, probablemente a través de la regulación negativa de la transcripción de SreA y Yap1, además de estar implicada en la termotolerancia. La disminución en el MOM se correlacionó con la regulación negativa de Rfs, lo que conduce a niveles más bajos de acumulación de rizoferrina en el exterior celular, lo que se correlaciona con una menor toxicidad del SS. En el mismo contexto, el exceso de Fe^{2+} condujo a una regulación negativa de la transcripción de *rfs*, que se correlacionó con una menor toxicidad del sobrenadante. La rizoferrina quela el hierro extracelular y lo transporta al espacio intracelular o posiblemente a la mitocondria para la síntesis de centros Fe-S, restando aún por dilucidar su mecanismo de entrada; mientras que la rizoferrina intracelular podría almacenar hierro y ayudar a evitar la toxicidad del hierro libre al inhibir la reacción de Fenton en *M. lusitanicus*.



VIII. DISCUSIÓN

Se ha demostrado en algunos hongos patógenos la secreción de factores de virulencia, incluyendo enzimas líticas, las cuales deben alcanzar la superficie celular o el espacio extracelular para ser efectivas; la secreción de estas moléculas podría implicar un transporte activo mediante vesículas (Köhler *et al.* 2017). Así, ciertas proteínas Arf y sus reguladores podrían estar implicadas en la virulencia, como la proteína Age3 de *C. albicans*, que es una proteína GAP (un efector alostérico que estimula la actividad Arf GTPasa) necesaria para el crecimiento de las hifas (Lettner *et al.* 2010); Age3 además es necesaria para un fenotipo virulento (Epp *et al.* 2010). De igual forma, se demostró en *C. albicans* que la delección de los genes *arf2* y *arl1* redujeron virulencia y mostraron un crecimiento micelial defectuoso (Labbaoui *et al.* 2017). Sugiriendo la participación de las proteínas Arf en la secreción de factores de virulencia. *M. lusitanicus*, posee 4 genes *arf(1-4)*; en donde los productos de *arf1* como de *arf2* son necesarios para la esporulación, Arf2 participa en el desarrollo de la levadura, mientras que Arf1 está involucrado en el crecimiento aeróbico. Por el contrario, los productos de *arf3* y *arf4*, aparentemente poseen una función menos relevante durante el crecimiento aeróbico. Estudios mostraron que el SS de la cepa $\Delta arf3$ producido en YPG-2% generó una reducción en la supervivencia del nematodo *C. elegans* respecto al SS de la cepa WT, de igual forma las esporas de la cepa $\Delta arf3$ exhibieron una mayor virulencia en comparación con las esporas de la cepa WT, lo que sugirió que la virulencia de esta mutante podría deberse a un desequilibrio en los procesos de exportación e importación que podría resultar en la acumulación de moléculas tóxicas en el medio extracelular. La disminución en la supervivencia de los nematodos en presencia del SS de la cepa $\Delta arf3$ fue atribuida a la secreción de una molécula (o moléculas) estructuralmente similar a una proteína, ya que el factor de virulencia secretado fue susceptible a la actividad lítica de una proteasa (pronasa), aumentando así la supervivencia del nematodo (Patiño-Medina *et al.* 2018).



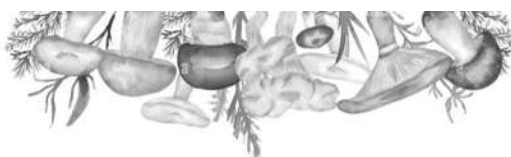


Asimismo, se describió que la enzima Rfs, de tipo NIS A' es la única enzima identificada en Mucorales responsable de sintetizar al sideróforo rizoferrina cuya estructura consta de la unión de dos moléculas de citrato a una molécula de diaminobutano mediante la formación de enlaces de tipo amida, lo que le confiere una estructura con enlaces amida similares a los peptídicos y potencialmente susceptibles a las proteasas (Carroll *et al.* 2017). La delección del gen *rfs* en *M. lusitanicus* condujo a un fenotipo no virulento en todas las condiciones evaluadas mientras que su sobreexpresión en el fondo genético silvestre MU636 exacerbó el fenotipo virulento (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). La acumulación del transcrito del gen *rfs* en la cepa WT aumentó en ausencia de la suplementación de hierro en el medio. Además, respecto a la cepa WT, la acumulación del transcrito de *rfs* en la cepa $\Deltaarf3$ fue aproximadamente dos veces mayor independientemente de la presencia de hierro, sugiriendo que la toxicidad del SS de la cepa $\Deltaarf3$ podría deberse a un aumento en la secreción de rizoferrina al medio extracelular. La generación de la doble mutante $\Deltaarf3/\Delta rfs$ demostró que el gen *rfs* participa positivamente en la virulencia de la cepa $\Deltaarf3$ (Alejandre-Castañeda, 2020). Los datos de este trabajo mostraron que la cepa Δrfs presentó parámetros de actividad mitocondrial elevados como el consumo de oxígeno que correlaciona con una alta producción de OH^- reportada anteriormente (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022), a pesar de que sus SSs no presentaron toxicidad contra *C. elegans* y sus esporas no fueron virulentas frente a *G. mellonella* y generar principalmente levaduras a baja concentración de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$) respecto a la cepa WT, lo que sugiere que la rizoferrina no solo funge como un quelante de hierro, y posiblemente sea capaz de participar en la homeostasis de hierro intracelular al comportarse como un almacén de este elemento para evitar la producción de ERO mediante la reacción de Fenton, o bien de transportarlo a la mitocondria para su utilización en la síntesis de centros hierro-azufre (Fe-S) tal cual ocurre en otros organismos como *Erwinia chrysanthemi* (Expert *et al.* 2008; Alejandre-Castañeda *et al.* 2022) .





Por otro lado, nuestros datos mostraron que el SS de la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ no mostró toxicidad frente al nematodo en ninguna de las condiciones evaluadas aun cuando se estimuló el metabolismo oxidativo mitocondrial durante el crecimiento en YNB-0.1%. Las esporas de la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ tampoco resultaron virulentas cuando se inocularon en las larvas de *G. mellonella* e incluso generó principalmente levaduras en baja concentración de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$) dato que correlaciona con su fenotipo no virulento. En cambio, la cepa $\Delta arf3$ en las mismas condiciones germinó principalmente como hifas correlacionando con un fenotipo más virulento que la cepa WT. Estos datos demuestran una regulación negativa por la proteína Arf3 en la toxicidad del SS y su correlación con el metabolismo oxidativo mitocondrial; además que dicha toxicidad involucra la participación del producto del gen *rfs*. Cabe mencionar que el promotor de *rfs* posee secuencias consenso de reconocimiento para los reguladores transcripcionales SreA (5'-ATCWGATAA-3'), el cual es un elemento de respuesta ante la disponibilidad de hierro y Yap1 (3'-TTACTCA-5') que es un elemento de respuesta al estrés oxidativo (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). Por otro lado, recientemente se demostró que los factores de transcripción Tec1 y Tec2 promueven el desarrollo micelial, así como la virulencia, probablemente mediante el reconocimiento del motivo consenso (5'-CATTCTT-3'), de *M. lusitanicus*, conduciendo al aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial y secreción de rizoferrina, posiblemente ambas proteínas Tec son reguladas negativamente por la vía PKA (Alejandre-Castañeda *et al.* 2023). Mediante un análisis de la secuencia promotora de los genes *arf3* y *rfs* se identificó un motivo consenso para el factor de transcripción Tec en el promotor de *arf3* y uno en el promotor de *rfs*. Además, en ambos promotores también se identificaron motivos consenso para el complejo Hap (5'-CCAAT-3'), el cual está implicado en la biogénesis mitocondrial (Mao y Chen, 2019), para ambos genes (*arf3* y *rfs*) se encontró un motivo consenso para Hap4, estos datos sugieren una posible regulación de *arf3* y *rfs* a través de Tec1 y Hap4 en el desarrollo micelial a través del metabolismo oxidativo mitocondrial. Interesantemente, para el gen *arf3* también se identificó un motivo consenso para Yap1 que





es un elemento de respuesta a estrés oxidativo, lo que sugiere la importancia de este gen durante la respuesta a estrés oxidativo en *M. lusitanicus*. El análisis *in silico* empleando el software MitoFates (Fukasawa *et al.* 2015) reveló que Arf3 posee 3 péptidos señal de direccionalidad a mitocondria, lo que correlaciona con lo arrojado por los softwares Predotar, iPSORT y CELLO (Sun y Habermann, 2017), los cuales sugirieron que Arf3 podría ser una proteína con localización mitocondrial mientras que Rfs sería una proteína citoplasmática, sin embargo, resta determinar la localización y/o transporte de Arf3 a la mitocondria. Adicionalmente, la cuantificación de rizoferrina demostró que la proteína Arf3 regula negativamente su acumulación en el SS producido en YNB 0.1%, ya que el SS de la cepa $\Delta arf3$ contenía hasta 12 veces más rizoferrina que el de la cepa WT; mientras que la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ no mostró acumulación del sideróforo dato que correlacionó con su fenotipo avirulento. La acumulación de rizoferrina mostró ser dependiente de un metabolismo oxidativo mitocondrial adecuado puesto que la adición al medio de cultivo del inhibidor del flujo de electrones, KCN al 0.5 mM, disminuyó la acumulación del sideróforo, así como la toxicidad del SS en todas las cepas evaluadas, lo que demuestra la importancia de este tipo de metabolismo en la toxicidad del SS y en la producción de rizoferrina.

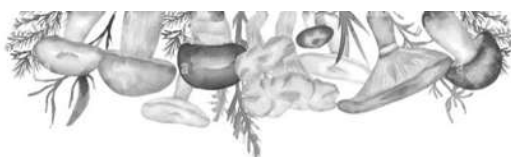
Las proteínas Arf al ser reguladores clave del tráfico vesicular pueden tener relevancia en la virulencia, posiblemente por la regulación en la secreción de moléculas al medio extracelular, crecimiento y diferenciación celular. Por ejemplo, se encontró que en *M. lusitanicus* la proteína Myo5, una proteína motora involucrada en el tráfico de vesículas basadas en actina y que es necesaria para el crecimiento polarizado así como un fenotipo virulento, lo que sugiere que Myo5 sería capaz interactuar con diversos tipos de vesículas, lo que podría explicar su papel esencial en el crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus* (Trieu *et al.* 2017). Además, en *C. albicans*, se reportó que Arf2 y Arl1 son reguladores para el crecimiento de hifas invasivas y resultaron ser fundamentales para la virulencia utilizando





diferentes modelos de infección, aunque se desconoce si el proceso es mediado en parte por moléculas tóxicas secretables (Labbaoui *et al.* 2017). En *S. cerevisiae*, así como en mamíferos, Arf1 es activada por una proteína tipo GEF perteneciente a la familia GBF/Gea1/2 y BIG/Sec7, en el aparato de Golgi temprano y tardío, respectivamente (Donaldson y Jackson, 2011). En *A. nidulans*, el homólogo de Sec7, HypB, es fundamental para el crecimiento de las hifas (Yang *et al.* 2008). En el genoma de *M. lusitanicus* se han identificado al menos 6 genes que codifican a proteínas ArfGEF. ArfGEF2 una proteína de alto peso molecular de la familia Sec7/Big, ArfGEF4 una proteína de medio peso molecular de la familia GBF/Gea y ArfGEF1 una proteína de bajo peso molecular, ArfGEF3, ArfGEF5-6 proteínas de medio peso molecular, estas últimas pertenecientes a la familia citohesina y derivados (Patiño-Medina, 2022). Se observó que el transcrito de los genes *arfGEF3-4* se acumulan durante el crecimiento levaduriforme, mientras que *arfGEF1,5-6* se acumulan durante el crecimiento micelial y *arfGEF2* se acumula en ambas morfologías. Se ha descrito que la proteína Arf2 es activada por ArfGEF2 a través de la vía AMPc-PKA y participa en la fisión mitocondrial y mitofagia para permitir el desarrollo levaduriforme en *M. lusitanicus* (Patiño-Medina, 2022), por lo que sería interesante esclarecer la interacción de algún ArfGEF con la proteína Arf3 y su relación con la virulencia de este hongo.

Interesantemente cuando la cepa $\Delta arf3$ fue crecida en altas concentraciones de glucosa (YPG-6%) disminuyó la toxicidad del SS, al igual que el SS de la cepa WT obtenido en las mismas condiciones. Esto podría ser explicado por la estimulación de la vía AMPc-PKA en la cepa $\Delta arf3$, ya que en *M. lusitanicus* se ha reportado que dicha vía es activada por el incremento de glucosa, conduciendo a la disminución de la virulencia (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022; Patiño-Medina, 2022). Aunado a esto, la activación de la vía PKA puede estar regulando el efecto Crabtree en *M. lusitanicus* ya que este hongo puede fermentar [$\geq 2\%$ de glucosa] en presencia de oxígeno (McIntyre *et al.* 2002). Además, se documentó que la





activación de esta vía controla negativamente la virulencia de *M. lusitanicus* al reprimir la secreción de rizoferrina al medio de cultivo (Alejandre-Castañeda *et al.* 2022). Ante un estímulo por altas concentraciones glucosa en el medio se estimula la producción de AMPc en *M. lusitanicus* por la adenilato ciclasa (Cyr1); este segundo mensajero se une a una de las subunidades regulatorias (posiblemente PkaR1) y activa a una subunidad catalítica (PkaC aún desconocida) de la PKA, la cual se encarga de fosforilar a diversas proteínas como ArfGEF2 que activa a la proteína Arf2 que promueve el desarrollo levaduriforme (Patiño-Medina, 2022). Este hallazgo sugiere que al reprimirse la toxicidad del SS producido en altas concentraciones de glucosa (YPG 6%), la proteína Arf3 podría estar sujeta a una regulación dependiente de la vía PKA, lo cual podría generar un efecto en la dinámica mitocondrial al inhibir la función de proteínas clave en este proceso. En células humanas se ha reportado que la fosforilación de Drp1 (homólogo en humano de Dnm1) dependiente de la vía AMPc-PKA promueve la fosforilación de un residuo conservado S637 (S656 en rata) situado en el extremo N-terminal del dominio GTPasa de Drp1 y además, la fosforilación de esta proteína regula su localización, ya que Drp1 una vez fosforilada en el residuo S637 no es reclutada a las mitocondrias y se queda en el citosol, inhibiendo así la fisión mitocondrial, lo cual promueve que se lleve a cabo una fusión mitocondrial descontrolada dando lugar a mitocondrias alargadas, mientras que la defosforilación de Drp1 en S637 está bajo el control de la calcineurina, una enzima con actividad de fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina que defosforila a Drp1 promoviendo así la fisión mitocondrial (Cribbs y Strack, 2007). En *S. cerevisiae*, la vía AMPc-PKA regula el contenido y actividad mitocondrial a través de la subunidad catalítica Tpk3 de PKA que promueve la mitocondriogénesis a través del complejo de proteínas Hap a medida que aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno (Ackema *et al.* 2014). Aunque en *M. lusitanicus* se desconoce el papel de las especies reactivas de oxígeno en el aumento del fenotipo virulento, se especula que estas pudieran actuar como moléculas de señalización que activan el complejo Hap en este hongo (Alejandre-Castañeda *et al.* 2023). De esta manera se





demuestra que la vía PKA puede desempeñar un papel importante durante la dinámica mitocondrial.

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos que presentan fusión y fisión (Hoppins *et al.* 2007; Westermann, 2010a), lo que refleja un equilibrio entre las funciones antagonistas de las GTPasas similares a dinamina que median la fisión (Dnm1 en *M. lusitanicus* y *S. cerevisiae*, DRP-1 en *C. elegans* y DRP1 en humanos) y la fusión (Fzo1 en *M. lusitanicus* y *S. cerevisiae*, FZO-1 en *C. elegans*, mitofusinas Mfn1 y Mfn2 en humanos) (Hales y Fuller, 1997; Smirnova *et al.* 1998; Hoppins *et al.* 2007; Westermann, 2010b; Patiño-Medina, 2022). Además, *S. cerevisiae* careciendo de los componentes de la vía secretora como Sec17 y Sec18 exhibe mitocondrias aberrantes lo que sugiere un papel importante del sistema de endomembrana en la dinámica mitocondrial (Altmann y Westermann, 2005). Las proteínas Arf participan en el mantenimiento y modelado de organelos como la mitocondria, así como su participación como reguladores en procesos como la fusión mitocondrial. Las proteínas Arf1 y su ArfGEF GBF-1/Gea1/2 son importantes para la dinámica y función mitocondrial donde tal función conservada de Arf1 es independiente de su función en la generación de vesículas COPI ya que la mutación de *arf1-11Δarf2* en *S. cerevisiae* ocasionó una agregación de Fzo1 (Ackema *et al.* 2014). Además, la proteína Arf1 es necesaria para la mitofagia, al parecer a través de su función en la regulación de la macroautofagia (van der Vaart *et al.* 2010; Orlichenko *et al.* 2012). De igual manera, la proteína Arl2 de origen humano actúa en la mitocondria para regular la morfología, la motilidad y la producción de ATP. Se describió que la importación de Arl2 a la membrana interna mitocondrial es un proceso regulado ya que aproximadamente solo un 10% de esta proteína se encuentra en esa ubicación mientras que el 90% restante está en el citoplasma celular (Newman *et al.* 2014). La fragmentación (fisión) de las mitocondrias fue anulada en células que expresaban tanto Arl2[T30N] (mutante negativo dominante que tiene una afinidad disminuida por nucleótidos de guanina) como Drp1[K38A]





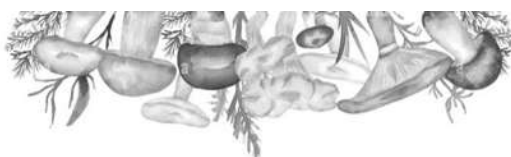
(mutante que bloquea la fisión mitocondrial), mientras que la fusión se produce adecuadamente, generando mitocondrias alargadas (Boldogh y Pon, 2007). Finalmente, Arl2 actúa río arriba de Drp1 regulando la fisión mitocondrial. El análisis de acumulación de transcrito de *fzo1* y *dnm1* en la cepa $\Delta arf3$ demostró que existe una discreta acumulación de transcrito de *fzo1*; mientras que el ARN de *dnm1* se encontraba disminuido respecto a la cepa WT. Este dato podría explicar el aumento en la cepa $\Delta arf3$ y disminución en la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$, respectivamente en los parámetros de actividad mitocondrial, tales como consumo de oxígeno y producción de OH^- así como la elevada y reducida toxicidad del SS cuando se estimuló el metabolismo oxidativo mitocondrial. Sugiriendo que la cepa $\Delta arf3$ posee defectos mitocondriales que resultan en una actividad mitocondrial aumentada, contrario a la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$ cuyo metabolismo oxidativo mitocondrial está disminuido, al presentar disminución del crecimiento al emplear una fuente de carbono no fermentable, así como parámetros de actividad mitocondrial disminuidos (consumo de oxígeno y producción de OH^-), respecto a la cepa $\Delta arf3$ e incluso menos que la WT. Esto sugiere la presencia de mitocondrias defectuosas e ineficientes en la cepa $\Delta arf3/\Delta rfs$. La sobreexpresión del gen de fisión mitocondrial en $\Delta arf3$, *dnm1* redujo considerablemente la toxicidad del SS aun cuando se estimuló el metabolismo oxidativo mitocondrial respecto a la cepa $\Delta arf3$, mientras que la sobreexpresión del gen *fzo1* involucrado en la fusión mitocondrial no generó una diferencia en la toxicidad del SS respecto a la cepa $\Delta arf3$. Por otro lado, cuando los SSs fueron producidos en YPG-6% la toxicidad fue casi nula para las cepas $\Delta arf3 fzo1^{O/E}$ y $\Delta arf3 dnm1^{O/E}$, lo que demuestra que el elemento de fisión reduce la toxicidad del SS. Estos datos sugieren que Fzo1 y Dnm1 pueden ser regulados por la proteína Arf3 en *M. lusitanicus* y probablemente podrían ubicarse en la misma vía de señalización (AMPc-PKA). Además, cuando se estimuló y reprimió la mitofagia con AICAR y Mdivi1, respectivamente, se observó que el SS de las cepas disminuyó e incrementó su toxicidad de manera respectiva, lo que sugiere que ante una mayor actividad mitocondrial pueden producirse más subproductos tóxicos (ERO) así como metabolitos que participan en





la síntesis de factores de virulencia como el citrato y diaminobutano que son necesarios para la síntesis de rizoferina, mientras que una actividad mitocondrial disminuida a través de la degradación de las mitocondrias, resulta en una menor generación de subproductos y metabolitos necesarios para la virulencia y toxicidad del SS. Considerando esta evidencia experimental, se sugiere que la proteína Arf3 de *M. lusitanicus* podría desempeñar un papel importante en la regulación del balance entre la fusión y fisión mitocondrial al regular negativamente la secreción de moléculas tóxicas como la rizoferina al medio extracelular.

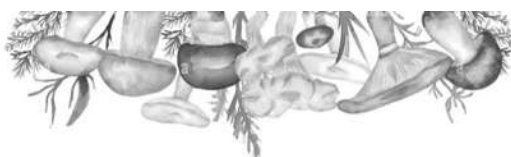
Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno como el $O_2^{\cdot-}$, el $OH^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son formas parcialmente reducidas o excitadas de oxígeno atmosférico y funcionan en las células como moléculas de señalización, pero también se consideran subproductos tóxicos inevitables del metabolismo oxidativo mitocondrial (Vaahter *et al.* 2014). En hongos patógenos se ha reportado la producción de ERO tales como el $O_2^{\cdot-}$ y el $OH^{\cdot-}$, por ejemplo, en *C. albicans* se ha descrito que el suero sanguíneo estimula la producción de $OH^{\cdot-}$ mediante la regulación del AMPc (Nasution *et al.* 2008) mientras que en algunas especies de Mucorales, exceptuando *L. corymbifera*, se reportó el aumento en la producción de $OH^{\cdot-}$ ante la presencia de suero sanguíneo, aunque resta por esclarecer el origen de estas ERO que afectan el crecimiento y virulencia de estos hongos (Patiño-Medina *et al.* 2023). Por otro lado, en *C. neoformans* se reportó que la Sod2 (manganeso-superóxido dismutasa mitocondrial) es importante durante la exposición a altas temperaturas y la función de esta enzima para desintoxicar estos importantes organelos de los productos generados ante un estrés oxidativo (Perfect, 2006). *C. neoformans* parece producir más ERO a medida que aumenta la temperatura de crecimiento, por lo que una mutante en *sod2* mostró varios niveles de crecimiento disminuido a medida que aumentaba la temperatura, hasta que se observó una viabilidad muy reducida a 37°C (Giles *et al.* 2005). En *S. cerevisiae* se demostró que las proteínas similares a Hsp70 son necesarias para la translocación de polipéptidos precursores a las mitocondrias y al retículo endoplásmico;





mientras que la proteína Hsp60 es necesaria para el ensamblaje de polipéptidos precursores en complejos oligoméricos después de su incorporación a la matriz mitocondrial y se informó que un choque de temperatura 44°C comprometió el acoplamiento de la fosforilación oxidativa, requiriendo de la traslocación de Hsp70 y 60 para su restauración. De esta manera, nuestros datos aportan evidencia suficiente para sugerir que los sistemas antioxidantes Sod y Cat desempeñan un papel crucial en la toxicidad de los SS de la cepa $\Delta arf3$ ya que una vez que se sobreexpresaron los genes *sod1*, *sod2a* y *cat1a* la toxicidad de los SSs se redujo considerablemente respecto a la cepa $\Delta arf3$ a niveles muy parecidos a la cepa WT, lo que demuestra que la cepa $\Delta arf3$ posee una desregulación positiva en la producción de ERO durante el metabolismo oxidativo mitocondrial ya que la sobreexpresión de los sistemas antioxidantes también redujo la producción de OH^- en esta mutante, lo cual, de acuerdo a nuestra evidencia y a los parámetros de actividad mitocondrial evaluados, posee un mayor consumo de oxígeno y producción de ERO respecto a la WT, lo que correlaciona con su fenotipo más virulento, sugiriendo que las ERO juegan un papel importante en la toxicidad de los SSs de *M. lusitanicus*.

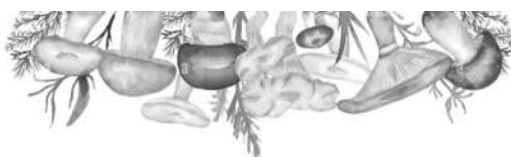
Por otro lado, la termotolerancia en los Mucorales se ha descrito como uno de los factores que les permite comportarse como patógenos oportunistas de humanos capaces, en algunos casos, de crecer hasta a 40°C (*Rhizopus spp.* y *Saksenaea spp.*) (Takashima et al. 2023). Se ha registrado la presencia de proteínas de shock térmico Hsp (chaperonas moleculares esenciales que regulan la forma y función de diversas proteínas en eucariotas) en el genoma de algunos Mucorales, como *L. corymbifera* lo que le podría conferir la resistencia a temperaturas elevadas durante el proceso infeccioso, sin embargo, estas proteínas no han sido exploradas del todo en los Mucorales (Schwartz et al. 2014), por otro lado, se ha descrito que la proteína Hsp90 regula la morfogénesis de *C. albicans* y que la represión de la morfogénesis mediada por Hsp90 regula negativamente la vía Ras1-PKA ante





temperaturas elevadas (Shapiro *et al.* 2009). Por lo tanto, la inhibición de Hsp90 conduce a la activación de PKA y a la inducción del crecimiento filamentoso. Así mismo, se reportó que la delección de *arf1* en *S. cerevisiae* es sensible a bajas temperaturas (11°C) al mostrar un crecimiento lento pero viable (Click y Botstein, 2002) además, en el mismo estudio se describieron mutaciones condicionales en alelos específicos, los cuales mostraron un fenotipo letal condicional a temperatura alta y/o baja. Los alelos *arf1-105* y *arf1-114* fueron sensibles al frío y a la temperatura (11°C y 37°C), mientras que *arf1-107* y *arf1-110* fueron sensibles únicamente a la temperatura (37°C). Estos alelos son sensibles al frío y/o a la temperatura en el entorno *arf2* (homólogo de *arf1* con un 96% de identidad) de tipo salvaje y, por tanto, tienen un fenotipo más sensible que la mutante $\Delta arf1$, lo que sugiere que estas mutaciones no resultan simplemente en una pérdida de función, sino que confieren una función aberrante a la proteína (Click y Botstein, 2002), también se ha reportado la importancia de otras proteínas G monoméricas en la termotolerancia de algunos hongos como la proteína Ras1 que es necesaria para el crecimiento y la patogénesis a altas temperaturas (37°C) en *C. neoformans* (Alspaugh *et al.* 2000). De esta manera es posible correlacionar nuestra evidencia experimental que son los defectos observados en el crecimiento a temperatura elevada (37°C) de la cepa $\Delta arf3$ con lo descrito por otros autores y sugerir que la proteína Arf3 es necesaria para la termotolerancia de *M. lusitanicus* probablemente a través de una interacción aún desconocida con la mitocondria.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la proteína Arf3 es un regulador negativo del metabolismo oxidativo mitocondrial, desarrollo micelial y virulencia a través de la represión de la fusión mitocondrial y secreción del sideróforo rizoferrina en *M. lusitanicus* (Fig. 31).





IX. CONCLUSIÓN

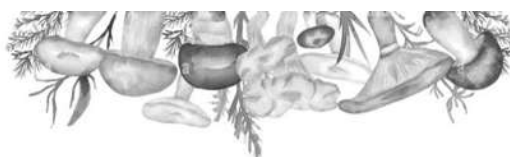
La proteína Arf3 regula negativamente la actividad mitocondrial y la secreción de rizoferina en el sobrenadante producido en condiciones aeróbicas de *M. lusitanicus* a través de la represión de la fusión mitocondrial.





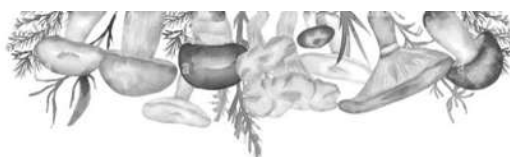
X. BIBLIOGRAFÍA

- Ackema, K. B.; Hench, J.; Böckler, S.; Wang, S. C.; Sauder, U.; Mergentaler, H.; Westermann, B.; Bard, F.; Frank, S.; Spang, A. (2014). The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function. *The EMBO journal*, 33(22), 2659–2675. <https://doi.org/10.15252/embj.201489039>
- Alastruey-Izquierdo, A.; Hoffmann, K.; de Hoog, G. S.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Voigt, K.; Bibashi, E.; Walther, G. (2010). Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* pro parte, *Mycoclados*). *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2154–2170. <https://doi.org/10.1128/JCM.01744-09>
- Alejandre-Castañeda, V. (2020). Identificación de lo(s) factor(es) con capacidad virulenta secretado(s) por cepas mutantes en genes *arf* de *Mucor circinelloides*. Tesis de Maestría- UMSNH.
- Alejandre-Castañeda, V.; Patiño-Medina, J. A.; Valle-Maldonado, M. I.; Nuñez-Anita, R. E., Santoyo, G.; Castro-Cerritos, K. V.; Ortiz-Alvarado, R.; Corrales-Escobosa, A. R.; Ramírez-Díaz, M. I.; Gutiérrez-Corona, J. F.; López-Torres, A.; Garre, V.; Meza-Carmen, V. (2022). Secretion of the siderophore rhizoferrin is regulated by the cAMP-PKA pathway and is involved in the virulence of *Mucor lusitanicus*. *Scientific reports*, 12(1), 10649. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14515-0>
- Almyroudis, N. G.; Sutton, D. A.; Linden, P.; Rinaldi, M. G.; Fung, J.; Kusne, S. (2006). Zygomycosis in solid organ transplant recipients in a tertiary transplant center and review of the literature. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(10), 2365–2374. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01496.x>
- Alqarihi, A.; Gebremariam, T.; Gu, Y.; Swidergall, M.; Alkhazraji, S.; Soliman, S. S. M.; Bruno, V. M.; Edwards, J. E.; Jr, Filler, S. G.; Uppuluri, P.; Ibrahim, A. S. (2020). GRP78 and integrins play different roles in host cell invasion during mucormycosis. *mBio*, 11(3), e01087-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01087-20>
- Alqarihi, A.; Kontoyiannis, D. P.; Ibrahim, A. S. (2023). Mucormycosis in 2023: an update on pathogenesis and management. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1254919. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1254919>
- Alspaugh, J. A.; Cavallo, L. M.; Perfect, J. R.; Heitman, J. (2000). RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 36(2), 352–365. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01852.x>



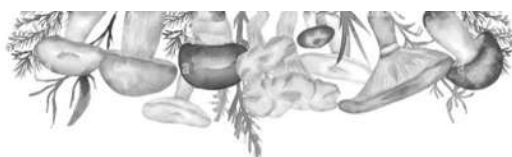


- Altmann, K. y Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 16(11), 5410–5417. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0678>
- Alvarez, E.; Stchigel, A. M.; Cano, J.; Sutton, D. A.; Fothergill, A. W.; Chander, J.; Salas, V.; Rinaldi, M. G.; Guarro, J. (2010). Molecular phylogenetic diversity of the emerging mucoralean fungus *Apophysomyces*: proposal of three new species. *Revista iberoamericana de micología*, 27(2), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.006>
- Artis, W. M.; Fountain, J. A.; Delcher, H. K.; Jones, H. E. (1982). A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. *Diabetes*, 31(12), 1109–1114. <https://doi.org/10.2337/diacare.31.12.1109>
- Azpeitia, E.; Balanzario, E. P.; Wagner, A. (2020). Signaling pathways have an inherent need for noise to acquire information. *BMC bioinformatics*, 21(1), 462. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03778-x>
- Baldin, C.; Soliman, S. S. M.; Jeon, H. H.; Alkhazraji, S.; Gebremariam, T.; Gu, Y.; Bruno, V. M.; Cornely, O. A.; Leather, H. L.; Sugrue, M. W.; Wingard, J. R.; Stevens, D. A.; Edwards, J. E., Jr.; Ibrahim, A. S. (2018). PCR-Based Approach Targeting Mucorales-Specific Gene Family for Diagnosis of Mucormycosis. *Journal of clinical microbiology*, 56(10), e00746-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00746-18>
- Binder, U.; Maurer, E.; Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis—from the pathogens to the disease. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 6, 60–66. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12566>
- Birgisdottir, Å. B.; Lamark, T.; Johansen, T. (2013). The LIR motif - crucial for selective autophagy. *Journal of cell science*, 126(Pt 15), 3237–3247. <https://doi.org/10.1242/jcs.126128>
- Bleazard, W.; McCaffery, J. M.; King, E. J.; Bale, S.; Mozdy, A.; Tieu, Q.; Nunnari, J.; Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology*, 1(5), 298–304. <https://doi.org/10.1038/13014>
- Boelaert, J. R. (1994). Mucormycosis (zygomycosis): is there news for the clinician? *The Journal of infection*, 28 Suppl 1, 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(94\)95896-3](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(94)95896-3)



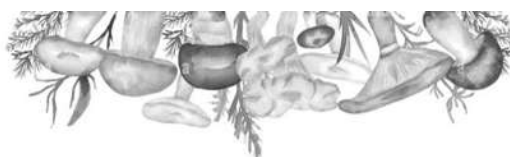


- Boelaert, J. R.; Fenves, A. Z.; Coburn, J. W. (1989). Registry on mucormycosis in dialysis patients. *The Journal of infectious diseases*, 160(5), 914. <https://doi.org/10.1093/infdis/160.5.914>
- Boelaert, J. R.; Fenves, A. Z.; Coburn, J. W. (1991). Deferoxamine therapy and mucormycosis in dialysis patients: report of an international registry. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 18(6), 660–667. [https://doi.org/10.1016/s0272-6386\(12\)80606-8](https://doi.org/10.1016/s0272-6386(12)80606-8)
- Boelaert, J. R.; Van Cutsem, J.; de Locht, M.; Schneider, Y. J.; Crichton, R. R. (1994). Deferoxamine augments growth and pathogenicity of *Rhizopus*, while hydroxypyridinone chelators have no effect. *Kidney international*, 45(3), 667–671. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.89>
- Boelaert, J. R.; Vergauwe, P. L.; Vandepitte, J. M. (1987). Mucormycosis infection in dialysis patients. *Annals of internal medicine*, 107(5), 782–783. https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-5-782_2
- Boldogh, I. R. y Pon, L. A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends in cell biology*, 17(10), 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.008>
- Bonifaz, A.; Stchigel, A. M.; Guarro, J.; Guevara, E.; Pintos, L.; Sanchis, M.; Cano-Lira, J. F. (2014). Primary cutaneous mucormycosis produced by the new species *Apophysomyces mexicanus*. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4428–4431. <https://doi.org/10.1128/JCM.02138-14>
- Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Bullen, J. J.; Rogers, H. J.; Spalding, P. B.; Ward, C. G. (2006). Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 3), 251–258. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46386-0>
- Carroll, C. S.; Grieve, C. L.; Murugathasan, I.; Bennet, A. J.; Czekster, C. M.; Liu, H.; Naismith, J. y Moore, M. M. (2017). The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the NIS gene family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 89, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.005>
- Cervený, K. L.; Studer, S. L.; Jensen, R. E.; Sesaki, H. (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical Num1 protein. *Developmental cell*, 12(3), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.017>



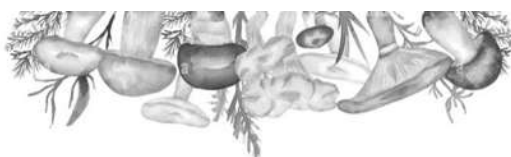


- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M. A.; Perfect, J. R. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 25(4), 215–229. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0107-1>
- Chen, H. y Chan, D. C. (2010). Physiological functions of mitochondrial fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, 21–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05615.x>
- Cheng, V. C.; Chan, J. F.; Ngan, A. H.; To, K. K.; Leung, S. Y.; Tsoi, H. W.; Yam, W. C.; Tai, J. W.; Wong, S. S.; Tse, H.; Li, I. W.; Lau, S. K.; Woo, P. C.; Leung, A. Y.; Lie, A. K.; Liang, R. H.; Que, T. L.; Ho, P. L.; Yuen, K. Y. (2009). Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2834–2843. <https://doi.org/10.1128/JCM.00908-09>
- Chibucos, M. C.; Soliman, S.; Gebremariam, T.; Lee, H.; Daugherty, S.; Orvis, J.; Shetty, A. C.; Crabtree, J.; Hazen, T. H.; Etienne, K. A.; Kumari, P.; O'Connor, T. D.; Rasko, D. A.; Filler, S. G.; Fraser, C. M.; Lockhart, S. R.; Skory, C. D.; Ibrahim, A. S.; Bruno, V. M. (2016). An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nature communications*, 7, 12218. <https://doi.org/10.1038/ncomms12218>
- Choi, J.; Jung, W. H.; Kronstad, J. W. (2015). The cAMP/protein kinase A signaling pathway in pathogenic *basidiomycete* fungi: Connections with iron homeostasis. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 53(9), 579–587. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5247-5>
- Choksi, T.; Agrawal, A.; Date, P.; Rathod, D.; Gharat, A.; Ingole, A.; Chaudhari, B.; Pawar, N. (2022). Cumulative mortality and factors associated with outcomes of mucormycosis after COVID-19 at a multispecialty tertiary care center in India. *JAMA ophthalmology*, 140(1), 66–72. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2021.5201>
- Connor, B. A.; Anderson, R. J.; Smith, J. W. (1979). *Mucor mediastinitis*. *Chest*, 75(4), 525–526. <https://doi.org/10.1378/chest.75.4.525>
- Cornet, M. y Gaillardin, C. (2014). pH signaling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies. *Eukaryotic cell*, 13(3), 342–352. <https://doi.org/10.1128/EC.00313-13>
- Cotton, J. L.; Tao, J.; Balibar, C. J. (2009). Identification and characterization of the *Staphylococcus aureus* gene cluster coding for staphyloferrin A. *Biochemistry*, 48(5), 1025–1035. <https://doi.org/10.1021/bi801844c>



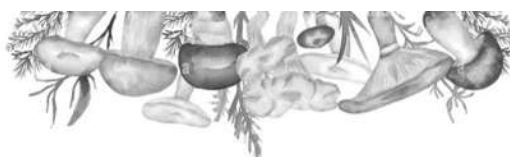


- de Hoog, G.S.; Ahmed, S.A.; Danesi, P.; Guillot, J.; Gräser, Y. (2018). Distribution of pathogens and outbreak fungi in the fungal kingdom. In: Seyedmousavi, S.; de Hoog, G.; Guillot, J.; Verweij, P. editors. Emerging and epizootic fungal infections in animals. *Cham: Springer*; 2018. P. 3–16.
- Díaz-Pérez, S. P.; Patiño-Medina, J. A.; Valle-Maldonado, M. I.; López-Torres, A.; Jácome-Galarza, I. E.; Anaya-Martínez, V.; Gómez-Ruiz, V.; Campos-García, J.; Nuñez-Anita, R. E.; Ortiz-Alvarado, R.; Ramírez-Díaz, M. I.; Gutiérrez-Corona, J. F.; Meza-Carmen, V. (2020). Alteration of fermentative metabolism enhances *Mucor circinelloides* virulence. *Infection and immunity*, 88(2), e00434-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00434-19>
- Dolatabadi, S.; de Hoog, G. S.; Meis, J. F.; Walther, G. (2014). Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). *Mycoses*, 57 Suppl 3, 108–127. <https://doi.org/10.1111/myc.12228>
- Donaldson, J. G. Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(6), 362–375. <https://doi.org/10.1038/nrm3117>
- Drechsel, H.; Jung, G.; Winkelmann, G. (1992). Stereochemical characterization of rhizoferrin and identification of its dehydration products. *Biometals* 5, 141–148 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF01061320>
- Drechsel, H.; Metzger, J.; Freund, S.; Jung, G.; Boelaert, J.; Winkelmann, G. (1991). Rhizoferrin - a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Biometals*. 4. 238-243. [10.1007/BF01141187](https://doi.org/10.1007/BF01141187).
- Dubey, A. y Heinonen, O. (2013). First-principles electronic structure study of rhizoferrin and its Fe(III) complexes. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 26(6), 1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9677-4>
- Feng, J. y Sun, X. (2018). Characteristics of pulmonary mucormycosis and predictive risk factors for the outcome. *Infection*, 46(4), 503–512. <https://doi.org/10.1007/s15010-018-1149-x>
- Finlay, B. B. y Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(2), 136–169. <https://doi.org/10.1128/mmb.61.2.136-169.1997>



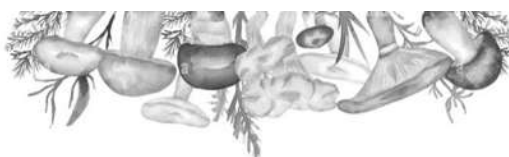


- Foster, A. J.; Ryder, L. S.; Kershaw, M. J.; Talbot, N. J. (2017). The role of glycerol in the pathogenic lifestyle of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Environmental microbiology*, 19(3), 1008–1016. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13688>
- Fu, Y.; Lee, H.; Collins, M.; Tsai, H. F.; Spellberg, B.; Edwards, J. E., Jr.; Kwon-Chung, K. J.; Ibrahim, A. S. (2004). Cloning and functional characterization of the *Rhizopus oryzae* high affinity iron permease (Rftr1) gene. *FEMS microbiology letters*, 235(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.031>
- Furukawa, K.; Fukuda, T.; Yamashita, S. I.; Saigusa, T.; Kurihara, Y.; Yoshida, Y.; Kirisako, H.; Nakatogawa, H.; Kanki, T. (2018). The PP2A-like protein phosphatase Ppg1 and the far complex cooperatively counteract CK2-mediated phosphorylation of Atg32 to inhibit mitophagy. *Cell reports*, 23(12), 3579–3590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.064>
- Gandre-Babbe, S. y van der Blik, A. M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 19(6), 2402–2412. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1287>
- Gebremariam, T.; Alkhazraji, S.; Soliman, S. S. M.; Gu, Y.; Jeon, H. H.; Zhang, L.; French, S. W.; Stevens, D. A.; Edwards, J. E.; Jr, Filler, S. G.; Uppuluri, P.; Ibrahim, A. S. (2019). Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Science advances*, 5(6), eaaw1327. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1327>
- Gebremariam, T.; Lin, L.; Liu, M.; Kontoyiannis, D. P.; French, S.; Edwards, J. E.; Filler, S. G.; Ibrahim, A. S. (2016). Bicarbonate correction of ketoacidosis alters host-pathogen interactions and alleviates mucormycosis. *The Journal of clinical investigation*, 126(6), 2280–2294. <https://doi.org/10.1172/JCI82744>
- Gebremariam, T.; Liu, M.; Luo, G.; Bruno, V.; Phan, Q. T.; Waring, A. J.; Edwards, J. E. Jr.; Filler, S. G.; Yeaman, M. R.; Ibrahim, A. S. (2014). CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(1), 237–250. <https://doi.org/10.1172/JCI71349>
- Giles, S. S.; Batinic-Haberle, I.; Perfect, J. R.; Cox, G. M. (2005). *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. *Eukaryotic cell*, 4(1), 46–54. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.46-54.2005>



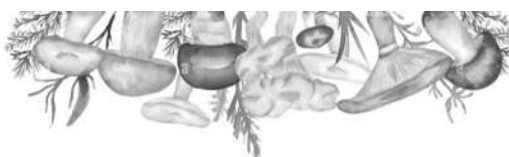


- Gillingham, A. K. y Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 579–611. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123209>
- Gu, H. (2017). Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Current microbiology*, 74(7), 863–869. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1256-4>
- Gulbins, E.; Dreschers, S.; Bock, J. (2003). Role of mitochondria in apoptosis. *Experimental physiology*, 88(1), 85–90. <https://doi.org/10.1113/eph8802503>
- Gulick, A. M. (2009). Ironing out a new siderophore synthesis strategy. *Nature chemical biology*, 5(3), 143–144. <https://doi.org/10.1038/nchembio0309-143>
- Gupta, S.; Kumar, A.; Tamuli, R. (2022). CRZ1 transcription factor is involved in cell survival, stress tolerance, and virulence in fungi. *Journal of biosciences*, 47, 66.
- Hamilos, G.; Samonis, G.; Kontoyiannis, D. P. (2011). Pulmonary mucormycosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32(6), 693–702. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1295717>
- Hammermeister, M.; Schödel, K.; Westermann, B. (2010). Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 21(14), 2443–2452. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0096>
- Hassan, M. I. A. y Voigt, K. (2019). Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Medical mycology*, 57(Supplement_2), S245–S256. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz011>
- Hassan, M. I. A.; Kruse, J. M.; Krüger, T.; Dahse, H. M.; Cseresnyés, Z.; Blango, M. G.; Slevogt, H.; Hörhold, F.; Ast, V.; König, R.; Figge, M. T.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A. A.; Voigt, K. (2020). Functional surface proteomic profiling reveals the host heat-shock protein A8 as a mediator of *Lichtheimia corymbifera* recognition by murine alveolar macrophages. *Environmental microbiology*, 22(9), 3722–3740. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15140>
- He, Y.; Deng, Y. Z.; Naqvi, N. I. (2013). Atg24-assisted mitophagy in the foot cells is necessary for proper asexual differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *Autophagy*, 9(11), 1818–1827. <https://doi.org/10.4161/auto.26057>



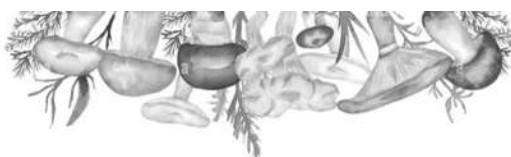


- Heller, J. y Tudzynski, P. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, 49, 369–390. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355>
- Hider, R. C. y Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, 27(5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hoenigl, M.; Seidel, D.; Sprute, R.; Cunha, C.; Oliverio, M.; Goldman, G. H.; Ibrahim, A. S.; Carvalho, A. (2022). COVID-19-associated fungal infections. *Nature microbiology*, 7(8), 1127–1140. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01172-2>
- Hoffmann, K.; Discher, S.; Voigt, K. (2007). Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, *Mycocladiaceae* fam. *Mycological research*, 111(Pt 10), 1169–1183. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.07.002>
- Hoppins, S.; Horner, J.; Song, C.; McCaffery, J. M.; Nunnari, J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *The Journal of cell biology*, 184(4), 569–581. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hoppins, S.; Lackner, L.; Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 76, 751–780. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048>
- Howard, D. H. (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 394–404. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.394>
- Hsu, J. W. y Lee, F. J. (2013). Arf3p GTPase is a key regulator of Bud2p activation for invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 24(15), 2328–2339. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0136>
- Ibrahim, A. S. (2014). Host-iron assimilation: pathogenesis and novel therapies of mucormycosis. *Mycoses*, 57 Suppl 3(0 3), 13–17. <https://doi.org/10.1111/myc.12232>
- Ibrahim, A. S.; Gebermarian, T.; Fu, Y.; Lin, L.; Hussein, M. I.; French, S. W.; Schwartz, J.; Skory, C. D.; Edwards, J. E., Jr.; Spellberg, B. J. (2007). The iron chelator deferiprone protects mice from mucormycosis through iron starvation. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), 2649–2657. <https://doi.org/10.1172/JCI32338>



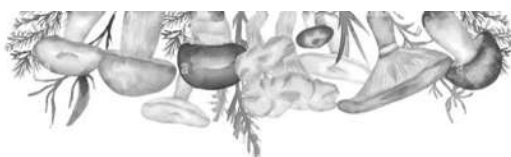


- Ibrahim, A. S.; Gebremariam, T.; Lin, L.; Luo, G.; Hussein, M. I.; Skory, C. D.; Fu, Y.; French, S. W.; Edwards, J. E., Jr.; Spellberg, B. (2010). The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Molecular microbiology*, 77(3), 587–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07234.x>
- Ibrahim, A. S.; Spellberg, B.; Avanesian, V.; Fu, Y.; Edwards, J. E., Jr (2005). *Rhizopus oryzae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells in vitro. *Infection and immunity*, 73(2), 778–783. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.778-783.2005>
- Iturriaga, E. A.; Alvarez, M. I.; Eslava, A. P.; Papp, T. (2018). Expression vectors and gene fusions for the directed modification of the carotenoid biosynthesis pathway in *Mucor circinelloides*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1852, 239–256. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_14
- Jackson, C. L. y Bouvet, S. (2014). Arfs at a glance. *Journal of cell science*, 127(Pt 19), 4103–4109. <https://doi.org/10.1242/jcs.144899>
- Jackson, C. L. y Casanova, J. E. (2000). Turning on Arf: The Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in cell biology*, 10(2), 60–67. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(99\)01699-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(99)01699-2)
- Jeong, S. Y. y Seol, D. W. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*, 41(1), 11–22. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.1.011>
- Jeong, W.; Keighley, C.; Wolfe, R.; Lee, W. L.; Slavin, M. A.; Kong, D. C. M; Chen, S. C. (2019). The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.011>
- Kadi, N.; Challis, G. L. (2009). Chapter 17. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. *Methods in enzymology*, 458, 431–457. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04817-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04817-4)
- Kageyama, Y.; Zhang, Z.; Sesaki, H. (2011). Mitochondrial division: molecular machinery and physiological functions. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.009>



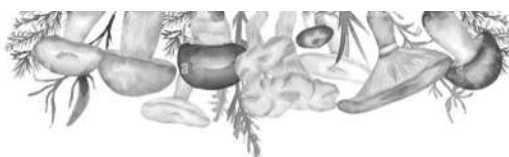


- Kanki, T.; Kurihara, Y.; Jin, X.; Goda, T.; Ono, Y.; Aihara, M.; Hirota, Y.; Saigusa, T.; Aoki, Y.; Uchiumi, T.; Kang, D. (2013). Casein kinase 2 is essential for mitophagy. *EMBO reports*, 14(9), 788–794. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.114>
- Khuna, S.; Suwannarach, N.; Kumla, J.; Jomkhwan Meerak; Nuangmek, W.; Kiatsiroat, T.; Saisamorn Lumyong. (2019). *Apophysomyces thailandensis* (Mucorales, *Mucoromycota*), a new species isolated from soil in northern Thailand and its solubilization of non-soluble minerals. *MycKeys*, (45), 75–92. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.45.30813>
- Kontoyiannis, D. P.; Lionakis, M. S.; Lewis, R. E.; Chamilos, G.; Healy, M.; Perego, C.; Safdar, A.; Kantarjian, H.; Champlin, R.; Walsh, T. J.; Raad, I. I. (2005). Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of *Aspergillus*-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *The Journal of infectious diseases*, 191(8), 1350–1360. <https://doi.org/10.1086/428780>
- Kontoyiannis, D. P.; Wessel, V. C.; Bodey, G. P.; Rolston, K. V. (2000). Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30(6), 851–856. <https://doi.org/10.1086/313803>
- Kozubowski, L.; Lee, S. C.; Heitman, J. (2009). Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cellular microbiology*, 11(3), 370–380. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x>
- Kumar, A. (2022). Mucormycosis in COVID-19 recovered patients. *Journal of medical virology*, 94(4), 1272–1273. <https://doi.org/10.1002/jmv.27522>
- Labbaoui, H.; Bogliolo, S.; Ghugtyal, V.; Solis, N.V.; Filler, S.G.; Arkowitz R.A. y Bassilana, M. (2017). Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. *PloS Pathog.* 13(2): e1006205.
- Lax, C., Cánovas-Márquez, J. T., Tahiri, G., Navarro, E., Garre, V., y Nicolás, F. E. (2022). Genetic manipulation in Mucorales and new developments to study mucormycosis. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3454. <https://doi.org/10.3390/ijms23073454>
- Lax, C.; Pérez-Arques, C.; Navarro-Mendoza, M. I.; Cánovas-Márquez, J. T.; Tahiri, G.; Pérez-Ruiz, J. A.; Osorio-Concepción, M.; Murcia-Flores, L.; Navarro, E.; Garre, V.; Nicolás, F. E. (2020b). Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes*, 11(3), 317. <https://doi.org/10.3390/genes11030317>



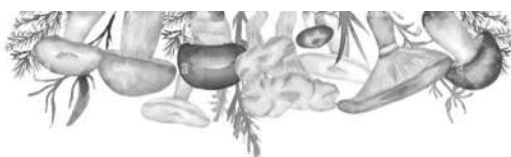


- Lax, C.; Tahiri, G.; Patiño-Medina, J. A.; Cánovas-Márquez, J. T.; Pérez-Ruiz, J. A.; Osorio-Concepción, M.; Navarro, E.; Calo, S. (2020a). The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9348. <https://doi.org/10.3390/ijms21249348>
- Lebreton, A.; Meslet-Cladière, L.; Morin-Sardin, S.; Coton, E.; Jany, J. L.; Barbier, G.; Corre, E. (2019). Comparative analysis of five *Mucor* species transcriptomes. *Genomics*, 111(6), 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.09.003>
- Lee, S. C.; Billmyre, R. B.; Li, A.; Carson, S.; Sykes, S. M.; Huh, E. Y.; Mieczkowski, P.; Ko, D. C.; Cuomo, C. A.; Heitman, J. (2014). Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *mBio*, 5(4), e01390-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01390-14>
- Lee, S. C.; Li, A.; Calo, S.; Heitman, J. (2013). Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003625. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>
- Lee, S. C.; Li, A.; Calo, S.; Inoue, M.; Tonthat, N. K.; Bain, J. M.; Louw, J.; Shinohara, M. L.; Erwig, L. P.; Schumacher, M. A.; Ko, D. C.; Heitman, J. (2015). Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular microbiology*, 97(5), 844–865. <https://doi.org/10.1111/mmi.13071>
- Lewis, R. E. y Kontoyiannis, D. P. (2013) Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future Microbiology*. 8(9): 1163–1175
- Li, B.; Deng, X.; Kim, S. H.; Buhrow, L.; Tomchick, D. R.; Phillips, M. A.; Michael, A. J. (2021). Alternative pathways utilize or circumvent putrescine for biosynthesis of putrescine-containing rhizoferrin. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100146. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016738>
- Li, C. H.; Cervantes, M.; Springer, D. J.; Boekhout, T.; Ruiz-Vazquez, R. M.; Torres-Martinez, S. R.; Heitman, J.; Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS pathogens*, 7(6), e1002086. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002086>
- Li, Y.; Zhang, Y.; Lu, L. (2019). Calcium signaling pathway is involved in non-CYP51 azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*, 57(Supplement_2), S233–S238. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy075>
- Lill, R. y Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 30(3), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.01.006>



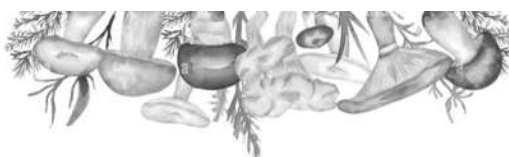


- Lin, C. J. y Chen, Y. L. (2018). Conserved and divergent functions of the cAMP/PKA signaling pathway in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(2), 68. <https://doi.org/10.3390/jof4020068>
- Lionakis, M. S. y Kontoyiannis, D. P. (2003). Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet (London, England)*, 362(9398), 1828–1838. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14904-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14904-5)
- Liu, M.; Lin, L.; Gebremariam, T.; Luo, G.; Skory, C. D.; French, S. W.; Chou, T. F.; Edwards, J. E., Jr; Ibrahim, A. S. (2015). Fob1 and Fob2 proteins are virulence determinants of *Rhizopus oryzae* via facilitating iron uptake from ferrioxamine. *PloS pathogens*, 11(5), e1004842. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004842>
- Liu, X. H.; Lu, J. P.; Lin, F. C. (2007b). Autophagy during conidiation, conidial germination and turgor generation in *Magnaporthe grisea*. *Autophagy*, 3(5), 472–473. <https://doi.org/10.4161/auto.4339>
- Liu, X. H.; Lu, J. P.; Zhang, L.; Dong, B.; Min, H.; Lin, F. C. (2007a). Involvement of a *Magnaporthe grisea* serine/threonine kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis. *Eukaryotic cell*, 6(6), 997–1005. <https://doi.org/10.1128/EC.00011-07>
- Mandiyani, V.; Andreev, J.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R. (1999). Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *The EMBO journal*, 18(24), 6890–6898. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6890>
- Mao, Y. y Chen, C. (2019). The Hap Complex in Yeasts: Structure, Assembly Mode, and Gene Regulation. *Frontiers in microbiology*. 10, 1645.
- Martínez-Soto, D. y Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 34(4), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>
- Mattingly, J. K. y Ramakrishnan, V. R. (2016). Rhinocerebral mucormycosis of the optic nerve. *Otolaryngology—head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 155(5), 888–889. <https://doi.org/10.1177/0194599816658024>
- Mayer, F. L.; Wilson, D.; Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>





- McIntyre, M.; Breum, J.; Arnau, J., y Nielsen, J. (2002). Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *Racemosus*) during submerged batch cultivation. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 495–502. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0916-1>
- McKenney, P. T.; Driks, A.; Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature reviews. Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Meister, A. (1955). Transamination. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, 16, 185–246. <https://doi.org/10.1002/9780470122617.ch4>
- Montaño, D. E. y Voigt, K. (2020). Host immune defense upon fungal infections with Mucorales: pathogen-immune cell interactions as drivers of inflammatory responses. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(3), 173. <https://doi.org/10.3390/jof6030173>
- Mouratou, B.; Biou, V.; Joubert, A.; Cohen, J.; Shields, D. J.; Geldner, N.; Jürgens, G.; Melançon, P.; Cherfils, J. (2005). The domain architecture of large guanine nucleotide exchange factors for the small GTP-binding protein Arf. *BMC genomics*, 6, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-20>
- Mozdy, A. D.; McCaffery, J. M.; Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *The Journal of cell biology*, 151(2), 367–380. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.367>
- Münzinger, M.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H.; Drechsel, H.; Heymann, P.; Winkelmann, G.; Meyer, J. M. (1999). S, S-rhizoferrin (enantio-rhizoferrin)—a siderophore of *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii* DSM 6297—the optical antipode of R, R-rhizoferrin isolated from fungi. *Biometals*, 12, 189–193.
- Muthu, V.; Agarwal, R.; Dhooria, S.; Sehgal, I. S.; Prasad, K. T.; Aggarwal, A. N.; Chakrabarti, A. (2021). Has the mortality from pulmonary mucormycosis changed over time? A systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(4), 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.035>
- Nakatogawa, H.; Ichimura, Y.; Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130(1), 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>
- Navarro-Mendoza, M. I.; Pérez-Arques, C.; Murcia, L.; Martínez-García, P.; Lax, C.; Sanchis, M.; Capilla, J.; Nicolás, F. E.; Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved





in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific reports*, 8(1), 7660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26051-x>

Navarro-Mendoza, M. I.; Pérez-Arques, C.; Panchal, S.; Nicolás, F. E.; Mondo, S. J.; Ganguly, P.; Pangilinan, J.; Grigoriev, I. V.; Heitman, J.; Sanyal, K.; Garre, V. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current biology: CB*, 29(22), 3791–3802.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.024>

Newman, L. E., Schiavon, C. R., Turn, R. E., & Kahn, R. A. (2017). The ARL2 GTPase regulates mitochondrial fusion from the intermembrane space. *Cellular logistics*, 7(3), e1340104. <https://doi.org/10.1080/21592799.2017.1340104>

Nguyen, K. B.; Sreelatha, A.; Durrant, E. S.; Lopez-Garrido, J.; Muszewska, A.; Dudkiewicz, M.; Grynberg, M.; Yee, S.; Pogliano, K.; Tomchick, D. R.; Pawłowski, K.; Dixon, J. E.; Tagliabracci, V. S. (2016). Phosphorylation of spore coat proteins by a family of atypical protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(25), E3482–E3491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605917113>

Nicolás, F. E. y Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). Functional diversity of RNAi-associated sRNAs in fungi. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15348–15360. <https://doi.org/10.3390/ijms140815348>

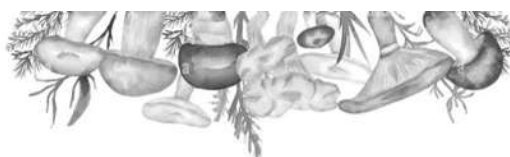
Noda, N. N.; Ohsumi, Y.; Inagaki, F. (2010). Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.018>

Onishi, M.; Yamano, K.; Sato, M.; Matsuda, N.; Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, 40(3), e104705. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104705>

Orlowski, M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological reviews*, 55(2), 234–258. <https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991>

Otsubo, Y. y Yamamoto, M. (2008). TOR signaling in fission yeast. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(4), 277–283. <https://doi.org/10.1080/10409230802254911>

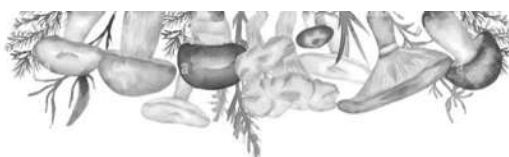
Oves-Costales, D.; Kadi, N.; Challis, G. L. (2009). The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis.





Chemical communications (Cambridge, England), (43), 6530–6541.
<https://doi.org/10.1039/b913092f>

- Palmer, C. S.; Osellame, L. D.; Laine, D.; Koutsopoulos, O. S.; Frazier, A. E.; Ryan, M. T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO reports*, 12(6), 565–573. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.54>
- Pan, X.; Harashima, T.; Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in microbiology*, 3(6), 567–572. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00142-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00142-9)
- Patiño-Medina, J. A.; Maldonado-Herrera, G.; Pérez-Arques, C.; Alejandre-Castañeda, V.; Reyes-Mares, N. Y.; Valle-Maldonado, M. I.; Campos-García, J.; Ortiz-Alvarado, R.; Jácome-Galarza, I. E.; Ramírez-Díaz, M. I.; Garre, V.; Meza-Carmen, V. (2018). Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current genetics*, 64(4), 853–869. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0798-0>
- Patiño-Medina, J. A.; Reyes-Mares, N. Y.; Valle-Maldonado, M. I.; Jácome-Galarza, I. E.; Pérez-Arques, C.; Nuñez-Anita, R. E.; Campos-García, J.; Anaya-Martínez, V.; Ortiz-Alvarado, R.; Ramírez-Díaz, M. I.; Chan Lee, S.; Garre, V. y Meza-Carmen, V. (2019a). Heterotrimeric G-alpha subunits Gpa11 and Gpa12 define a transduction pathway that control spore size and virulence in *Mucor circinelloides*. *PLOS ONE*, 14(12), e0226682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226682>
- Patiño-Medina, J.A.; Valle-Maldonado, M.I.; Maldonado-Herrera, G.; Pérez-Arques, C.; Jácome-Galarza, I.E.; Díaz-Pérez, A.L.; Araiza-Cervantes, C.A.; Villagomez-Castro, J.C.; Campos-García, J.; Ramirez-Díaz, M.I.; Garre, V. y Meza-Carmen, V. (2019b). Role of Arf-like (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal Genetics and Biology*. 129:40-51.
- Pérez-Arques, C.; Navarro-Mendoza, M. I.; Murcia, L.; Lax, C.; Sanchis, M.; Capilla, J.; Navarro, E.; Garre, V.; Nicolás, F. E. (2021). A mucoralean white Collar-1 photoreceptor controls virulence by regulating an intricate gene network during host interactions. *Microorganisms*, 9(2), 459. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020459>
- Pérez-Arques, C.; Navarro-Mendoza, M. I.; Murcia, L.; Navarro, E.; Garre, V.; Nicolás, F. E. (2021). The RNAi mechanism regulates a new exonuclease gene involved in the virulence of Mucorales. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2282. <https://doi.org/10.3390/ijms22052282>
- Perfect, J. R. (2006). *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS yeast research*, 6(4), 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x>



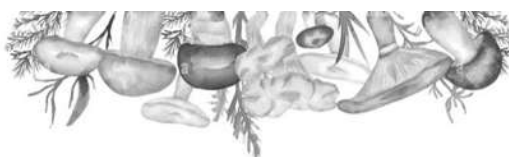


- Petrikkos, G. y Tsioutis, C. (2018). Recent advances in the pathogenesis of mucormycoses. *Clinical therapeutics*, 40(6), 894–902. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.03.009>
- Popov L. D. (2020). Mitochondrial biogenesis: an update. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(9), 4892–4899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>
- Prakash, H. y Chakrabarti, A. (2019). Global epidemiology of mucormycosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 5(1), 26. <https://doi.org/10.3390/jof5010026>
- Qian, S.; Wei, Z.; Yang, W.; Huang, J.; Yang, Y.; Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in oncology*, 12, 985363. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- Renault, L.; Guibert, B.; Cherfils, J. (2003). Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*, 426(6966), 525–530. <https://doi.org/10.1038/nature02197>
- Ribes, J. A.; Vanover-Sams, C. L.; Baker, D. J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews*, 13(2), 236–301. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.236>
- Richter, B.; Sliter, D. A.; Herhaus, L.; Stolz, A.; Wang, C.; Beli, P.; Zaffagnini, G.; Wild, P.; Martens, S.; Wagner, S. A.; Youle, R. J.; Dikic, I. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(15), 4039–4044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523926113>
- Roden, M. M.; Zaoutis, T. E.; Buchanan, W. L.; Knudsen, T. A.; Sarkisova, T. A.; Schaufele, R. L.; Sein, M.; Sein, T.; Chiou, C. C.; Chu, J. H.; Kontoyiannis, D. P.; Walsh, T. J. (2005). Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(5), 634–653. <https://doi.org/10.1086/432579>
- Saggese, A.; Scamardella, V.; Sirec, T.; Cangiano, G.; Istatico, R.; Pane, F.; Amoresano, A.; Ricca, E.; Baccigalupi, L. (2014). Antagonistic role of CotG and CotH on spore germination and coat formation in *Bacillus subtilis*. *PloS one*, 9(8), e104900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104900>



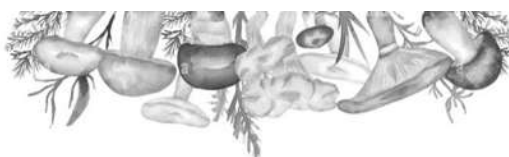


- Santos, M. y de Larrinoa, I. F. (2005). Functional characterization of the *Candida albicans* *CRZ1* gene encoding a calcineurin-regulated transcription factor. *Current genetics*, 48(2), 88–100. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0003-8>
- Schwartz, V. U.; Winter, S.; Shelest, E.; Marcet-Houben, M.; Horn, F.; Wehner, S.; Linde, J.; Valiante, V.; Sammeth, M.; Riege, K.; Nowrousian, M.; Kaerger, K.; Jacobsen, I. D.; Marz, M.; Brakhage, A. A.; Gabaldón, T.; Böcker, S.; Voigt, K. (2014). Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: an evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial mucorales (*Mucoromycotina*). *PloS genetics*, 10(8), e1004496. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004496>
- Sesaki, H. y Jensen, R. E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *The Journal of cell biology*, 147(4), 699–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.4.699>
- Shabb J. B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chemical reviews*, 101(8), 2381–2411. <https://doi.org/10.1021/cr000236l>
- Shapiro, R. S.; Uppuluri, P.; Zaas, A. K.; Collins, C.; Senn, H.; Perfect, J. R.; Heitman, J.; Cowen, L. E. (2009). Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Current biology*: CB, 19(8), 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.017>
- Shea, J. M. y Del Poeta, M. (2006). Lipid signaling in pathogenic fungi. *Current opinion in microbiology*, 9(4), 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.003>
- Shirazi, F.; Kontoyiannis, D. P.; Ibrahim, A. S. (2015). Iron starvation induces apoptosis in *Rhizopus oryzae* in vitro. *Virulence*, 6(2), 121–126. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1009732>
- Silva, F.; Torres-Martínez, S.; Garre, V. (2006). Distinct white *collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular microbiology*, 61(4), 1023–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05291.x>
- Singh, M. K.; Richter, S.; Beckmann, H.; Kientz, M.; Stierhof, Y. D.; Anders, N.; Fäßler, F.; Nielsen, M.; Knöll, C.; Thomann, A.; Franz-Wachtel, M.; Macek, B.; Skriver, K.; Pimpl, P.; Jürgens, G. (2018). A single class of ARF GTPase activated by several pathway-specific ARF-GEFs regulates essential membrane traffic in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 14(11), e1007795. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007795>
- Skiada, A. y Petrikos, G. (2013). Cutaneous mucormycosis. *Skinmed*, 11(3), 155–160.



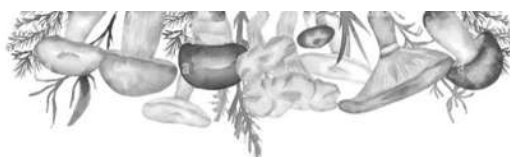


- Smirnova, E.; Shurland, D. L.; Ryazantsev, S. N.; van der Blik, A. M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *The Journal of cell biology*, 143(2), 351–358. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.351>
- Soliman, S. S. M.; Baldin, C.; Gu, Y.; Singh, S.; Gebremariam, T.; Swidergall, M.; Alqarihi, A.; Youssef, E. G.; Alkhazraji, S.; Pikoulas, A.; Perske, C.; Venkataramani, V.; Rich, A.; Bruno, V. M.; Hotopp, J. D.; Mantis, N. J.; Edwards, J. E. Jr.; Filler, S. G.; Chamilos, G.; Vitetta, E. S., ... Ibrahim, A. S. (2021). Mucoricin is a ricin-like toxin that is critical for the pathogenesis of mucormycosis. *Nature microbiology*, 6(3), 313–326. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00837-0>
- Song, Z.; Ghochani, M.; McCaffery, J. M.; Frey, T. G.; Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular biology of the cell*, 20(15), 3525–3532. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-03-0252>
- Soriani, F. M.; Malavazi, I.; da Silva Ferreira, M. E.; Savoldi, M.; Von Zeska Kress, M. R.; de Souza Goldman, M. H.; Loss, O.; Bignell, E.; Goldman, G. H. (2008). Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Molecular microbiology*, 67(6), 1274–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06122.x>
- Spatafora, J. W.; Chang, Y.; Benny, G. L.; Lazarus, K.; Smith, M. E.; Berbee, M.L.; Bonito, G.; Corradi, N.; Grigoriev, I.; Gryganskyi, A.; James, T. Y.; O'Donnell, K.; Roberson, R. W.; Taylor, T. N.; Uehling, J.; Vilgalys, R.; White, M. M.; Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.
- Stearns, T.; Kahn, R. A.; Botstein, D.; Hoyt, M. A. (1990). ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Molecular and cellular biology*, 10(12), 6690–6699. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.12.6690-6699.1990>
- Steinbrink, J. M. y Miceli, M. H. (2021). Mucormycosis. *Infectious disease clinics of North America*, 35(2), 435–452. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.009>
- Sullivan, J. T.; Jeffery, E. F.; Shannon, J. D.; Ramakrishnan, G. (2006). Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of fslA in siderophore production. *Journal of bacteriology*, 188(11), 3785–3795. <https://doi.org/10.1128/JB.00027-06>
- Sun, H. Y.; Forrest, G.; Gupta, K. L.; Aguado, J. M.; Lortholary, O.; Julia, M. B.; Safdar, N.; Patel, R.; Kusne, S.; Singh, N. (2010). Rhino-orbital-cerebral zygomycosis in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 90(1), 85–92. <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e3181dde8fc>





- Szafer, E.; Pick, E.; Rotman, M.; Zuck, S.; Huber, I.; Cassel, D. (2000). Role of coatomer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *The Journal of biological chemistry*, 275(31), 23615–23619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003171200>
- Szebenyi, C.; Gu, Y.; Gebremariam, T.; Kocsubé, S.; Kiss-Vetráb, S.; Jáger, O.; Patai, R.; Spisák, K.; Sinka, R.; Binder, U.; Homa, M.; Vágvolgyi, C.; Ibrahim, A. S.; Nagy, G.; Papp, T. (2023). *cotH* genes are necessary for normal spore formation and virulence in *Mucor lusitanicus*. *mBio*, 14(1), e0338622. <https://doi.org/10.1128/mbio.03386-22>
- Sztul, E.; Chen, P. W.; Casanova, J. E.; Cherfils, J.; Dacks, J. B.; Lambright, D. G.; Lee, F. S.; Randazzo, P. A.; Santy, L. C.; Schürmann, A.; Wilhelmi, I.; Yohe, M. E.; Kahn, R. A. (2019). ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges. *Molecular biology of the cell*, 30(11), 1249–1271. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-12-0820>
- Tahiri, G.; Lax, C.; Cánovas-Márquez, J. T.; Carrillo-Marín, P.; Sanchis, M.; Navarro, E.; Garre, V.; Nicolás, F. E. (2023). Mucorales and mucormycosis: recent insights and future prospects. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(3), 335. <https://doi.org/10.3390/jof9030335>
- Tamura, Y.; Itoh, K.; Sesaki, H. (2011). SnapShot: mitochondrial dynamics. *Cell*, 145(7), 1158–1158.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.018>
- Thieken, A. y Winkelmann G. (1992). Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters*. 73(1-2):37-41.
- Thieken, A. y Winkelmann, G. (1992). Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS microbiology letters*, 73(1-2), 37–41. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90579-d](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90579-d)
- Tieu, Q.; Okreglak, V.; Naylor, K.; Nunnari, J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *The Journal of cell biology*, 158(3), 445–452. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205031>
- Vanden Broeck, D.; Horvath, C.; De Wolf, M. J. (2007). *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(10), 1771–1775. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.005>





- Vellanki, S.; Billmyre, R. B.; Lorenzen, A.; Campbell, M.; Turner, B.; Huh, E. Y.; Heitman, J.; Lee, S. C. (2020). A novel resistance pathway for calcineurin inhibitors in the human-pathogenic *Mucorales* *Mucor circinelloides*. *mBio*, 11(1), e02949-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02949-19>
- Vetter, I. R. y Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Wagner, L.; Stielow, J. B.; de Hoog, G. S.; Bensch, K.; Schwartz, V. U.; Voigt, K.; Alastruey-Izquierdo, A.; Kurzai, O.; Walther, G. (2020). A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia*, 44, 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Wallace, D. C. (2013). Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1622), 20120267. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0267>
- Walther, G.; Wagner, L.; Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of *Mucorales* with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 5(4), 106. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>
- Walther, G.; Wagner, L.; Kurzai, O. (2020). Outbreaks of *Mucorales* and the species involved. *Mycopathologia*, 185(5), 765–781. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00403-1>
- Wang, L.; Cho, Y. L.; Tang, Y.; Wang, J.; Park, J. E.; Wu, Y.; Wang, C.; Tong, Y.; Chawla, R.; Zhang, J.; Shi, Y.; Deng, S.; Lu, G.; Wu, Y.; Tan, H. W.; Pawijit, P.; Lim, G. G.; Chan, H. Y.; Zhang, J.; Fang, L.; ... Shen, H. M. (2018). PTEN-L is a novel protein phosphatase for ubiquitin dephosphorylation to inhibit PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Cell research*, 28(8), 787–802. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0056-0>
- Wei, Y.; Chiang, W. C.; Sumpter, R., Jr; Mishra, P.; Levine, B. (2017). Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell*, 168(1-2), 224–238.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.042>
- Westermann, B. (2010a). Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria. *Seminars in cell & developmental biology*, 21(6), 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.003>
- Westermann, B. (2010b). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>





- Wijayawardene, N. N.; Pawłowska, J.; Letcher, P. M.; Kirk, P. M.; Humber, R. A.; Schüßler, A.; Wrzosek, M.; Muszewska, A.; Okraśińska, A.; Istel, Ł.; Gęsiorska, A.; Mungai, P.; Lateef, A. A.; Rajeshkumar, K. C.; Singh, R. V.; Radek, R.; Walther, G.; Wagner, L.; Walker, C.; . . . Hyde, K. D. (2018). Notes for genera: basal clades of Fungi (including *Aphelidiomycota*, *Basidiobolomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Caulochytriomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota* and *Zoopagomycota*). *Fungal Diversity*, 92(1), 43-129. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0409-5>
- Wild, P.; Farhan, H.; McEwan, D. G.; Wagner, S.; Rogov, V. V.; Brady, N. R.; Richter, B.; Korac, J.; Waidmann, O.; Choudhary, C.; Dötsch, V.; Bumann, D.; Dikic, I. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6039), 228–233. <https://doi.org/10.1126/science.1205405>
- Willis, S.; Day, C. L.; Hinds, M. G.; Huang, D. C. (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of cell science*, 116(Pt 20), 4053–4056. <https://doi.org/10.1242/jcs.00754>
- Wilson, B. R.; Bogdan, A. R.; Miyazawa, M.; Hashimoto, K.; Tsuji, Y. (2016). Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. *Trends in molecular medicine*, 22(12), 1077–1090. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Wolff, A. M. y Arnau, J. (2002). Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 35(1), 21–29. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1313>
- Wolff, A. M.; Appel, K. F.; Petersen, J. B.; Poulsen, U.; Arnau, J. (2002). Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS yeast research*, 2(2), 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00085.x>
- Yang, Y.; El-Ganiny, A. M.; Bray, G. E.; Sanders, D. A.; Kaminskyj, S. G. (2008). *Aspergillus nidulans hypB* encodes a Sec7-domain protein important for hyphal morphogenesis. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 45(5), 749–759. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.11.005>
- Yoon, Y.; Krueger, E. W.; Oswald, B. J.; McNiven, M. A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Molecular and cellular biology*, 23(15), 5409–5420. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5409-5420.2003>





- Yorimitsu, T.; Sato, K.; Takeuchi, M. (2014). Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers in plant science*, 5, 411. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00411>
- Yu, B.; Ma, J.; Li, J.; Wang, D.; Wang, Z.; Wang, S. (2020). Mitochondrial phosphatase PGAM5 modulates cellular senescence by regulating mitochondrial dynamics. *Nature communications*, 11(1), 2549. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16312-7>
- Yu, Z. y Fischer, R. (2019). Light sensing and responses in fungi. *Nature reviews. Microbiology*, 17(1), 25–36. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0109-x>
- Zaffagnini, G. y Martens, S. (2016). Mechanisms of selective autophagy. *Journal of molecular biology*, 428(9 Pt A), 1714–1724. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.004>
- Zhang, Q.; Tamura, Y.; Roy, M.; Adachi, Y.; Iijima, M.; Sesaki, H. (2014). Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(19), 3767–3778. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1648-6>
- Zhao, J.; Liu, T.; Jin, S.; Wang, X.; Qu, M.; Uhlén, P.; Tomilin, N.; Shupliakov, O.; Lendahl, U.; Nistér, M. (2011). Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *The EMBO journal*, 30(14), 2762–2778. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.198>
- Zhao, Y.; Lim, J.; Xu, J.; Yu, J. H.; Zheng, W. (2020). Nitric oxide as a developmental and metabolic signal in filamentous fungi. *Molecular microbiology*, 113(5), 872–882. <https://doi.org/10.1111/mmi.14465>
- Zhu, X. M.; Li, L.; Cai, Y. Y.; Wu, X. Y.; Shi, H. B.; Liang, S.; Qu, Y. M.; Naqvi, N. I.; Del Poeta, M.; Dong, B.; Lin, F. C.; Liu, X. H. (2021). A VAS domain protein regulates autophagy, membrane tension, and sterol homeostasis in rice blast fungus. *Autophagy*, 17(10), 2939–2961. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1848129>

