



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de tesis para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Título:

**“Implicación de la vía AMPc-PKA en la regulación de la dinámica mitocondrial
(fusión y fisión) en el crecimiento y virulencia de *Mucor lusitanicus*”**

Aspirante:

Q.F.B.- César Javier Torres Cortés

Director de tesis:

Dr. Víctor Meza Carmen

Morelia, Michoacán a Junio del 2024.

Agradecimientos:

A mi madre Clara por su apoyo incondicional, por siempre creer en mi y respaldarme en cada decisión que he tomado. A mi hermana Viridiana, por estar a mi lado en todo momento y siempre levantarme los ánimos para poder seguir adelante. A mi abuela Alicia por siempre cuidar de mí, por alentarme a perseguir mis sueños. A ellas tres por ser siempre un gran ejemplo de esfuerzo, perseverancia y fuerza, además de ser los tres pilares que me han sostenido siempre, con amor, muchas gracias.

A mi asesor, el D. C. Víctor Meza Carmen, por su confianza al permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su guía, consejo y apoyo a lo largo de mi formación durante este tiempo y por retarme a alcanzar metas cada vez más altas.

A mi comité sinodal, la D. C. Rosa Elvira Núñez Anita, el D. C. Marco Iván Valle Maldonado, el D. C. Alejandro Bravo Patiño y el D. C. Juan José Valdez Alarcón, por sus observaciones, críticas y consejos para enriquecer y fortalecer mi proyecto, sumado al apoyo técnico brindado.

Al D. C. José Alberto Patiño Medina por todo tu apoyo, guía, consejo y amistad incondicional a lo largo de mi formación durante la maestría, muchas gracias.

A la M. C. Viridiana Alejandre Castañeda, por invitarme al laboratorio de Diferenciación Celular para a estudiar la maestría y por tu amistad.

A mis amigos de laboratorio, Albert por todo tu apoyo, paciencia, guía y consejo, por llevarme a comer antes de mi primer seminario y tranquilizarme por solo mencionar algunas cosas de muchas por las que estoy muy agradecido; Sergio, por todo tu apoyo y consejo incondicional dentro y fuera del laboratorio; Chantal, por siempre levantarme los ánimos y por todo tu apoyo, además de la oportunidad de compartir contigo la experiencia de la estancia en Oaxaca; Dulce, que sin conocerme te acercaste a mi desde el primer día a platicar como si fuéramos amigos de muchos años, por la confianza que me has brindado y los buenos momentos que hemos compartido; Frank, por ayudarme a creer en mi siempre que dudo de mis conocimientos, por tener la calma de explicarme temas que se me complican y por todo el apoyo que me has brindado; Kass, la más pequeña del laboratorio, por todos

los buenos momentos que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio; Bren, por la amistad y confianza que me has brindado a pesar de que cuando fui tu instructor en la facultad no te caía bien, por las risas y platicas que hemos compartido.

A mis amigos Jessy, Checo y Brenda, que nos conocemos desde la facultad, gracias por su apoyo, por las risas y buenos momentos que hemos compartido.

A mis amigos y roomies Any, José, Daniel, Angeles, Lucy y Nadia, por todos los momentos que compartimos juntos mientras vivimos en la casa de Villalongín, los desvelos para ver lluvias de estrellas y eclipses lunares.

A la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, por ser mi casa de estudios desde la Licenciatura hasta la Maestría.

A CONAHCYT por la beca otorgada durante estos dos años.

INDICE. -

I.	Introducción-----	1
1.1.	<i>Mucor lusitanicus</i> -----	1
1.1.1.	El dimorfismo de <i>M. lusitanicus</i> -----	3
1.2.	Mucormicosis-----	6
1.2.1.	Mucormicosis rino-orbito-cerebral-----	7
1.2.2.	Mucormicosis pulmonar-----	7
1.2.3.	Mucormicosis cutánea-----	7
1.2.4.	Mucormicosis gastrointestinal-----	8
1.2.5.	Mucormicosis diseminada-----	8
1.2.6.	Clasificación de hongos patógenos prioritarios de acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS)-----	10
1.3.	Proteínas G-----	11
1.4.	Generalidades de un vía de señalización-----	13
1.4.1.	Vía de la PKA dependiente de AMPc-----	13
1.5.	Factores de transcripción Tec1 y Tec2-----	18
1.6.	Dinámica mitocondrial-----	18
1.6.1.	Biogénesis mitocondrial-----	20
1.6.2.	Fusión mitocondrial-----	20
1.6.3.	Fisión mitocondrial-----	22
1.6.4.	Mitofagia-----	23
II.	Justificación-----	27
III.	Hipótesis-----	27
IV.	Objetivos-----	27
4.1.	Objetivo general-----	27
4.2.	Objetivos específicos-----	27
V.	Estrategia metodológica-----	28
VI.	Materiales y métodos-----	29
6.1.	Cepas a utilizar-----	29
6.2.	Obtención de <i>M. lusitanicus</i> -----	30
6.2.1.	Condiciones generales de crecimiento-----	30

6.2.2. Obtención y conteo de esporas-----	31
6.2.3. Crecimiento radial de <i>M. lusitanicus</i> -----	31
6.2.4. Crecimiento aerobio y anaerobio de <i>M. lusitanicus</i> -----	31
6.2.5. Determinación de porcentajes de germinación-----	32
6.2.6. Cuantificación del crecimiento (peso seco) -----	32
6.2.7. Obtención de sobrenadantes (SS)-----	32
6.2.8. Ensayos de toxicidad-----	32
6.2.9. Cultivo de <i>E. coli</i> -----	33
6.2.10. Crecimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i> -----	33
6.2.11. Medio de cultivo NGM para crecimiento de <i>C. elegans</i> -----	33
6.3. Cuantificación de rizoferrina-----	34
6.4. Determinación de la tasa de consumo de oxígeno-----	34
6.5. Cuantificación de OH [•] -----	35
6.6. Reacción en cadena de la polimerasa RT-qPCR-----	35
6.7. Procesamiento de imágenes-----	37
6.8. Análisis estadístico-----	37
VII. Resultados-----	38
7.1. Papel de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial sobre el crecimiento de <i>M. lusitanicus</i> en diferentes fuentes de carbono-----	38
7.2. Implicación de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial de <i>M. lusitanicus</i> en la germinación a baja concentración de oxígeno-----	40
7.3. Participación de los elementos de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en el consumo de oxígeno de <i>M. lusitanicus</i> -----	44
7.4. Participación de las proteínas involucradas en la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en la producción del radical OH [•] en <i>M. lusitanicus</i> -----	45
7.5. Función de los elementos de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) sobre la toxicidad de los sobrenadantes de <i>M. lusitanicus</i> -----	46
7.6. Corroboración de las mutaciones en los genes <i>pkaR1</i> , <i>pkaR2</i> , <i>pkaR3</i> y <i>pkaR4</i> en <i>M. lusitanicus</i> mediante RT-qPCR-----	49

7.7.	Efecto de la mutación de los genes que codifican a las subunidades regulatorias de la PKA (<i>pkaR1-pkaR4^(+/-)</i>) en el crecimiento de <i>M. lusitanicus</i> en presencia de una fuente de carbono no fermentables----	50
7.8.	Participación de las subunidades regulatorias 1 y 3 de la PKA de <i>M. lusitanicus</i> en la germinación a baja concentración de oxígeno-----	53
7.9.	Implicación de las subunidades regulatorias de la PKA en el consumo de oxígeno de <i>M. lusitanicus</i> -----	54
7.10.	Participación de las subunidades regulatorias de la PKA en la producción del radical OH [·] -----	56
7.11.	Papel de las subunidades regulatorias de la PKA en la toxicidad de los sobrenadantes de <i>M. lusitanicus</i> -----	57
7.12.	Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en el crecimiento de <i>M. lusitanicus</i> ----	59
7.13.	Implicación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial de <i>M. lusitanicus</i> en la germinación a baja concentración de oxígeno-----	62
7.14.	Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en el consumo de oxígeno de <i>M. lusitanicus</i> -----	63
7.15.	Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en la producción del radical OH [·] -----	64
7.16.	Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en la toxicidad de <i>M. lusitanicus</i> -----	65
7.17.	Modulación transcripcional de los genes que codifican a las subunidades regulatorias y catalíticas de la PKA-----	68
7.18.	Análisis bioinformático para la búsqueda de promotores y factores de transcripción de los genes <i>pkaR1-pkaR4</i> -----	71
VIII.	Discusión-----	74
IX.	Conclusión-----	85
X.	Bibliografía-----	86

XI. Anexos-----	100
------------------------	------------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>M. lusitanicus</i>-----	2
Figura 2: Dimorfismo en <i>M. lusitanicus</i>-----	5
Figura 3: Patogénesis de la mucormicosis-----	9
Figura 4: Clasificación de los patógenos fúngicos prioritarios según la Organización Mundial de la Salud-----	11
Figura 5: Estructura general de la proteína cinasa A-----	15
Figura 6: Descripción general de la Vía de la PKA dependiente de AMPc-----	16
Figura 7: Red tubular mitocondrial-----	19
Figura 8: Descripción general de la fusión mitocondrial en levadura de <i>S. cerevisiae</i>-----	21
Figura 9: Descripción general de la fisión mitocondrial en levadura de <i>S. cerevisiae</i>-----	23
Figura 10: Esquema de la dinámica mitocondria-----	24
Figura 11: Sitios de fosforilación en elementos de la dinámica mitocondrial---	26
Figura 12: Porcentaje de germinación de las cepas sobrepresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i> (MU636-<i>fzo1</i>^{O/E} y MU636-<i>dnm1</i>^{O/E}) en presencia de distintas fuentes de carbono-----	38
Figura 13: Generación de biomasa de las de las cepas sobrepresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dnm1</i>(MU636-<i>fzo1</i>^{O/E} y MU636-<i>dnm1</i>^{O/E}) en presencia de distintas fuentes de carbono-----	40

Figura 14: Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) -----	41
Figura 15: Evaluación de la longitud de las hifas de las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) germinadas a una concentración de $7.3 \pm 56\%$ de O ₂ -----	43
Figura 16: Morfología de las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) germinadas a una concentración de $4.9 \pm 0.45\%$ de O ₂ . -----	43
Figura 17: Tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) -----	45
Figura 18: Tasa de generación de ROS en las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) -----	46
Figura 19: Toxicidad de los SS provenientes de las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) generados en medios que favorecen el metabolismo oxidativo y el metabolismo fermentativo-----	47
Figura 20: Toxicidad de los SS provenientes de las cepas sobrexpresantes en los genes <i>fzo1</i> y <i>dmn1</i> (MU636- <i>fzo1</i> ^{O/E} y MU636- <i>dmn1</i> ^{O/E}) tratados con cianuro de potasio y N-acetilcisteína-----	48
Figura 21: Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>pkaR</i> en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$, $\Delta pkaR3$ y $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ de <i>M. lusitanicus</i> -----	50
Figura 22: Porcentaje de germinación de las cepas mutantes en los genes <i>pkaR</i> en presencia de distintas fuentes de carbono-----	51
Figura 23: Generación de biomasa de las cepas mutantes en los genes <i>pkaR1</i> y <i>pkaR3</i> en presencia de distintas fuentes de carbono-----	52
Figura 24: Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ -----	53

Figura 25: Fotografías representativas del crecimiento de las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ a baja concentración de oxígeno-----	54
Figura 26: Tasa de consumo de oxígeno en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ -----	55
Figura 27: Tasa de generación de ROS en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ -----	56
Figura 28: Papel de las subunidades regulatorias PkaR1 y PkaR3 en la toxicidad del SS de <i>M. lusitanicus</i> -----	58
Figura 29: Papel de metabolismo oxidativo mitocondrial a través de la subunidad regulatoria PkaR1 y PkaR3 en la toxicidad del SS <i>M. lusitanicus</i> ----	59
Figura 30: Porcentaje de germinación de las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ en presencia de distintas fuentes de carbono--	60
Figura 31: Generación de biomasa de las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ en presencia de distintas fuentes de carbono--	61
Figura 32: Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ -----	62
Figura 33: Tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ -----	63
Figura 34: Tasa de generación de ROS en las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ -----	65
Figura 35: Toxicidad de las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ -----	66
Figura 36: Papel del metabolismo oxidativo mitocondrial a través de la subunidad regulatoria PkaR1 y el elemento de fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en la toxicidad del SS de <i>M. lusitanicus</i> -----	67

Figura 37: Análisis de expresión de los genes <i>pkaR</i> en la cepa WT y en las cepas mutantes $\Delta pkaR1\text{-}\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ durante el desarrollo micelial de 6 horas en diferentes condiciones de crecimiento-----	69
Figura 38: Análisis de expresión de los genes <i>pkaC1-pkaC10</i> en la cepa WT y en las cepas mutantes $\Delta pkaR1\text{-}\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ durante el desarrollo de micelio de 6 horas en diferentes condiciones de crecimiento-----	70
Figura 39: Búsqueda de posibles sitios de fosforilación por PKA en Fzo1 y Dnm1 de <i>S. cerevisiae</i> y <i>M. lusitanicus</i> -----	73
Figura 40: Modelo propuesto de la regulación de la fusión y fisión mitocondrial a través de la vía AMPc-PKA y su participación en el crecimiento y virulencia de <i>M. lusitanicus</i> -----	85
Figura A1: Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1\text{-}cnaB^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\text{-}cnaC^{O/E}$ -----	100
Figura A2: Tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobrepresantes $\Delta\text{+}\Delta pkaR1\text{-}cnaB^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\text{-}cnaC^{O/E}$ -----	102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas a utilizar-----	29
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR-----	36
Tabla 3: Factores de transcripción encontrados en el promotor de las subunidades PkaR1-PkaR4-----	72
Tabla 4: Motivos de reconocimiento a TOM 20 encontrados en la secuencia aminoacídica de PkaR3-----	72

Resumen

Mucor lusitanicus es un hongo dimórfico perteneciente al orden de los mucorales, el cual es empleado como modelo para el estudio de la diferenciación celular y la virulencia fúngica. La proteína cinasa A (PKA) está formada por dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. En los hongos, la vía del AMPc-PKA participa en diversos procesos, entre ellos la morfogénesis, la virulencia y la homeostasis mitocondrial. La mitocondria es un organelo dinámico, y para mantener su homeostasis requiere entre otras cosas, de un proceso conocido como dinámica mitocondrial. Dicho proceso involucra cuatro eventos, los cuales son: biogénesis mitocondrial, fusión, fisión y mitofagia. La finalidad de este proyecto fue demostrar que subunidad regulatoria de la PKA está involucrada en la promoción del crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus* a través de la posible regulación de la fusión o la fisión mitocondrial. Para ello se utilizaron las cepas silvestre MU636 y las mutantes en las subunidades regulatorias de la PKA ($\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$). Además, se usaron la cepas MU636 Y $\Delta pkaR1$ sobreexpresando a los genes silvestres *fzo1* y *dnm1*. Mediante ensayos fisiológicos se demostró que la mutación en el gen *pkaR1* conduce a una disminución en la germinación, favoreciendo el desarrollo levaduriforme, una disminución de la tasa de respiración, así como en la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), respecto a la cepa WT; además, la cepa $\Delta pkaR1$ mostró nula toxicidad de sus sobrenadantes post-cultivo contra el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Por el contrario, la cepa $\Delta pkaR3$ mostró fenotipos contrarios a la cepa $\Delta pkaR1$. Interessantemente, la sobreexpresión del gen silvestre *fzo1* en la cepa $\Delta pkaR1$, restauró parcialmente el fenotipo silvestre, mostrando un porcentaje de germinación y toxicidad de su sobrenadante similar a la cepa WT, sugiriendo que Fzo1 podría estar bajo la regulación de la vía AMPc-PKA, a través de PkaR1. En conclusión, en *M. lusitanicus* la vía AMPc-PKA regula la virulencia a través de la regulación del metabolismo mitocondrial, posiblemente influyendo en la dinámica mitocondrial.

Palabras clave: Metabolismo Oxidativo, Dimorfismo, Toxicidad, Crecimiento Micelial, Vía PKA

Abstract

Mucor lusitanicus is a dimorphic fungus belonging to the order Mucorales, which is used as a model for the study of cell differentiation and fungal virulence. Protein kinase A (PKA) is made up of two regulatory subunits and two catalytic subunits. In fungi, the cAMP-PKA pathway participates in various processes, including morphogenesis, virulence, and mitochondrial homeostasis. The mitochondria are a dynamic organelle, and to maintain its homeostasis it requires, among other things, a process known as mitochondrial dynamics. This process involves four events, which are: mitochondrial biogenesis, fusion, fission and mitophagy. The purpose of this project was to demonstrate that the regulatory subunit of PKA is involved in promoting the growth and virulence of *M. lusitanicus* through the possible regulation of mitochondrial fusion or fission. For this, wild strains MU636 and mutants in the regulatory subunits of PKA ($\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$) were used. In addition, MU636 and $\Delta pkaR1$ strains were used overexpressing the wild genes *fzo1* and *dnm1*. Through physiological tests, it was shown that the mutation in the *pkaR1* gene leads to a decrease in germination, favoring yeast development, a decrease in the respiration rate, as well as in the generation of ROS (reactive oxygen species), compared to the WT strain; Furthermore, the $\Delta pkaR1$ strain showed no toxicity of its post-culture supernatants against the nematode *Caenorhabditis elegans*. On the contrary, the $\Delta pkaR3$ strain showed opposite phenotypes to the $\Delta pkaR1$ strain. Interestingly, overexpression of the wild *fzo1* gene in the $\Delta pkaR1$ strain partially restored the wild phenotype, showing a percentage of germination and toxicity of its supernatant similar to the WT strain, suggesting that Fzo1 could be under the regulation of the cAMP-PKA pathway. through PkaR1. In conclusion, in *M. lusitanicus* the cAMP-PKA pathway regulates virulence through the regulation of mitochondrial metabolism, possibly influencing mitochondrial dynamics.

Keywords: Oxidative Metabolism, Dimorphism, Toxicity, Mycelial Growth, PKA Pathway.

I.- Introducción:

1.1 Generalidades de *Mucor lusitanicus*

M. lusitanicus es un hongo dimórfico perteneciente al orden de los mucorales, es utilizado como modelo de estudio para entender la diferenciación celular y patogenicidad de los mucorales (Lax y col., 2020a). Anteriormente, este hongo era conocido como *M. circinelloides f. lusitanicus*, pero por una reclasificación en la taxonomía cambió su nombre a *M. lusitanicus* (Wagner y col., 2019). Dentro de los Mucorales, *M. lusitanicus* cuenta con el mayor número de herramientas moleculares para su manipulación, como la delección de genes, mutaciones en sitios específicos, sobreexpresión de genes en plásmidos o por la integración al genoma, el silenciamiento génico, por mencionar a algunas (Vellanky y col., 2018, García y col., 2018); permitiendo evaluar las funciones de diversos genes. Además, tiene un ciclo de vida sexual y uno asexual, siendo el ciclo de vida asexual el más estudiado. *M. lusitanicus* presenta múltiples eventos de diferenciación como el dimorfismo, el cual se refiere, ya que 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 y col., 2021). Este hongo tiene la capacidad de generar diferentes tipos de esporas como: la zigospora, la cual es el producto meiótico de la reproducción sexual, de coloración negra y paredes gruesas; la esporangiospora producida al final de la reproducción asexual, caracterizándose por su forma elipsoidal, variando en sus dimensiones y masa (Orlowski, 1990).

M. lusitanicus puede desarrollarse como micelio en condiciones de aerobiosis y cuando las concentraciones de glucosa disminuyen o se utiliza una fuente de carbono no fermentable, muestra principalmente un metabolismo oxidativo, correlacionando con un fenotipo virulento (Díaz-Pérez y col., 2020). Por otro lado, al crecer en anaerobiosis, el hongo utiliza principalmente un metabolismo fermentativo, generando un fenotipo avirulento (McIntyre y col., 2002; Patiño-Medina y col., 2018). El efecto Crabtree ha sido muy estudiado en el hongo

Saccharomyces cerevisiae, y revela los procesos que conducen a la formación aeróbica de etanol, por lo que podemos definir como Crabtree-positivo, a un organismo que tiene la capacidad de fermentar aun en un ambiente aeróbico. Se ha descrito que al crecer a *M. lusitanicus* en condiciones de aerobiosis en presencia de altas concentraciones de glucosa (2-6% de glucosa), este tiene la capacidad de crecer como micelio, el cual, está asociado a un metabolismo fermentativo, indicando que se trata de un organismo Crabtree-positivo (McIntyre y col., 2002; Patiño-Medina, 2022).

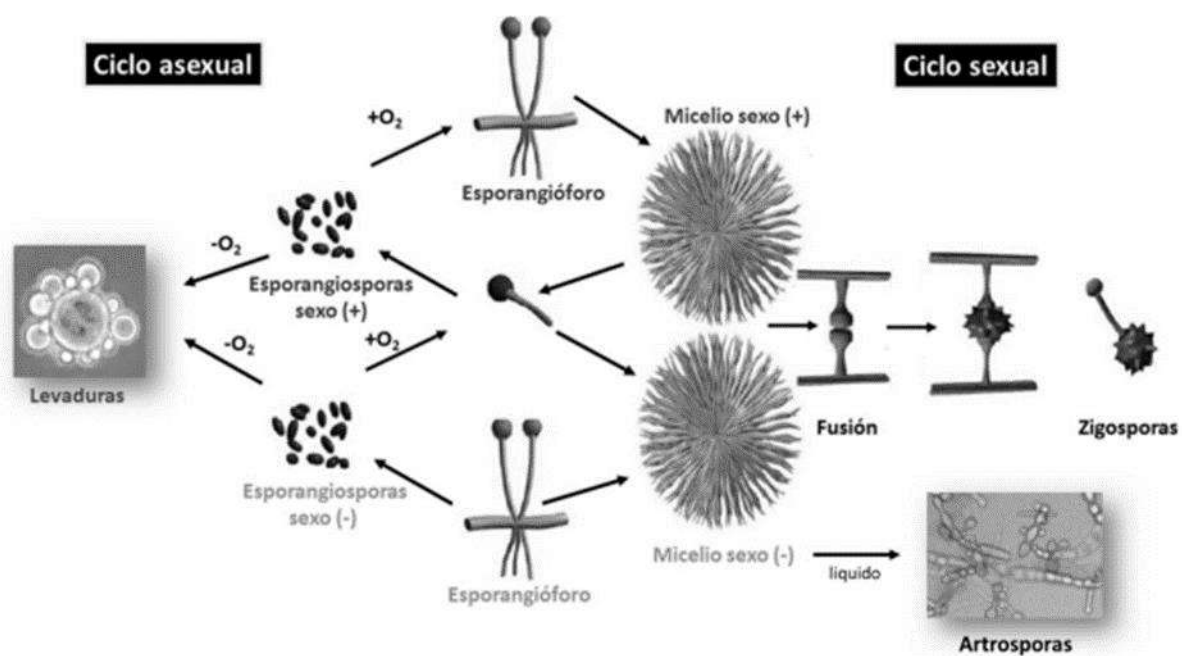


Figura 1. Ciclo de vida de *M. lusitanicus*. Las especies del género *Mucor*, son heterotáticas (que posee dos tipos sexuales), es capaz de generar tres tipos de esporas, las esporangiosporas asexuales, las zigosporas, que se forman al fusionarse dos hifas de los diferentes tipos sexuales y las artrosporas (también asexuales) que se producen en medio líquido al final de la fase estacionaria. Los tres tipos de esporas pueden generar 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).

1.1.1 El dimorfismo en *M. lusitanicus*

El dimorfismo es la capacidad que tiene un hongo de desarrollarse en dos morfologías diferentes, es decir, dependiendo de las condiciones de crecimiento bajo las que se encuentre, este puede crecer como micelio o levadura (Orlowski, 1990). Cuando la espora detecta la atmosfera y la presencia de nutrientes en la que se encuentra, comienza su proceso de activación metabólica, la cual es evidente fisiológicamente por el aumento de tamaño y el cambio a una forma esférica (Orlowski, 1990). Este periodo es conocido como fase de activación de la espora. A partir de este punto, si la espora se encuentra en condiciones de anaerobiosis, una fuente de carbono fermentable y una fuente de nitrógeno orgánica, se desarrollará la morfología levaduriforme, asociada a un metabolismo fermentativo y un fenotipo no virulento (Lübbehüsen y col., 2003; Vellanki y col., 2020). Por otro lado, si la espora se encuentra en condiciones de aerobiosis, en presencia de una fuente de carbono de cualquier tipo y una fuente de nitrógeno de orgánica o inorgánica, esta se desarrollará como micelio, esta morfología la cual está asociada al metabolismo oxidativo y un fenotipo virulento (Lübbehüsen y col., 2003; Diaz-Pérez y col., 2020). En *M. lusitanicus* tanto la morfología micelial como la levaduriforme no son morfologías terminales, ya que, si las condiciones de crecimiento son modificadas para favorecer al otro tipo de morfología, el hongo llevara a cabo la transición morfológica y metabólica correspondiente a las nuevas condiciones.

Además de las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como las diferentes atmosferas de crecimiento (aerobiosis o anaerobiosis), existen otros factores que influyen sobre el dimorfismo de *M. lusitanicus*. Por ejemplo, la adición de inhibidores de la cadena transportadora de electrones al medio de cultivo, tales como antimicina A y el cianuro de potasio, o inhibidores de la fosforilación oxidativa, tal como la oligomicina A o el alcohol fenetílico, conducen a una morfología levaduriforme aún en presencia de aire, así como la adición de cerulenina (inhibidor de sintasas de ácidos grasos) o cicloleucina (inhibidor de S-adenosilmetionina) evita la transición de levadura a hifa aún en una atmósfera de

aerobiosis; también, la adición de AMPc exógeno, conduce al desarrollo levaduriforme (Orloski, 1991).

Por otro lado, se ha reportado que la subunidad regulatoria PkaR1 de la PKA es necesaria para el crecimiento hifal, ya que al evaluar a la cepa mutante en el gen que codifica para dicha subunidad, esta mostró una reducción en el crecimiento hifal, la disminución en la longitud del tubo germinativo y en la esporulación (Ocampo y col., 2009). Además, se describió que la subunidad regulatoria PkaR1 está involucrada en la virulencia del hongo, ya que al inyectar esporas de la cepa $\Delta pkaR1$ y la cepa silvestre (WT) MU636 contra un modelo murino diabético, se observó que la cepa $\Delta pkaR1$ mostró una virulencia y carga fúngica significativamente menor comparada con la cepa WT (Valle Maldonado y col., 2020).

Otro elemento importante involucrado en el dimorfismo es la calcineurina, la cual es una proteína serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Se ha descrito que al mutar el gen *cnbR*, el cual codifica a la subunidad regulatoria de la calcineurina, generó una mutante bloqueada en la morfología levaduriforme y menos virulenta con respecto a la cepa WT. Además, se reportó una mayor actividad de la PKA en la cepa mutante *cnbR*, sugiriendo una conexión entre la vía PKA y calcineurina (Lee y col., 2013). El tamaño de la espora es un factor de virulencia en *M. lusitanicus*; es decir, esporas más grandes generan una mayor virulencia (Lee y col., 2013). En este sentido, la subunidad catalítica CnaA participa en el control del tamaño y la virulencia de las esporas de *M. lusitanicus*, ya que al mutar al gen *cnaA* se generaron esporas más grandes con respecto a la cepa silvestre y al inocular estas esporas en larvas de *Galleria mellonella* fueron significativamente más virulentas con respecto a la cepa silvestre, demostrando que la subunidad CnaA es un regulador negativo del tamaño de la espora, y participa en la virulencia de *M. lusitanicus* (Lee y col., 2013).

Las proteínas Arf (ADP-ribosylation factors) son proteínas G monoméricas pertenecientes a la superfamilia Ras, las cuales son reguladores en el proceso del tráfico vesicular y se sabe que participan en el crecimiento y virulencia de los

hongos (Patiño-Medina y col., 2018). En *M. lusitanicus*, se identificaron cuatro genes que codifican proteínas Arfs (Arf1-Arf4) y se reportó que Arf1, Arf3 y Arf4 son necesarias para un adecuado desarrollo micelial y virulencia, mientras que Arf2 participa en el desarrollo levaduriforme (Patiño-Medina y col., 2018). Dentro de la familia de las proteínas Arf, se encuentran las proteínas Arl (Arf-like) las cuales participan en el tráfico vesicular. En el año 2019 se identificaron dos genes en *M. lusitanicus* que codifican para Arl (*arl1* y *arl2*) y se reportó que Arl1 es esencial y participa en el adecuado crecimiento micelial y virulencia del hongo (Patiño-Medina y col., 2019).

Se ha descrito que la proteína Adh1 juega un papel importante en el metabolismo fermentativo ya que se encarga de reducir el acetaldehído en etanol. En *M. lusitanicus* se describió que esta enzima tiene una función importante en diversos procesos tales como el dimorfismo y el metabolismo fermentativo-oxidativo, ya que al mutar el gen *adh1*, se generó una cepa mutante monomórfica (M5) bloqueada en la fase micelial. Además, la mutante M5 mostró defectos metabólicos importantes, tales como la incapacidad de crecer en un medio adicionado con glucosa en ausencia de oxígeno, no poder utilizar el etanol como fuente de carbono en una atmosfera de aerobiosis y una disminución en la capacidad de producir etanol a partir de glucosa en presencia de oxígeno (Rangel-Porras y col., 2019).

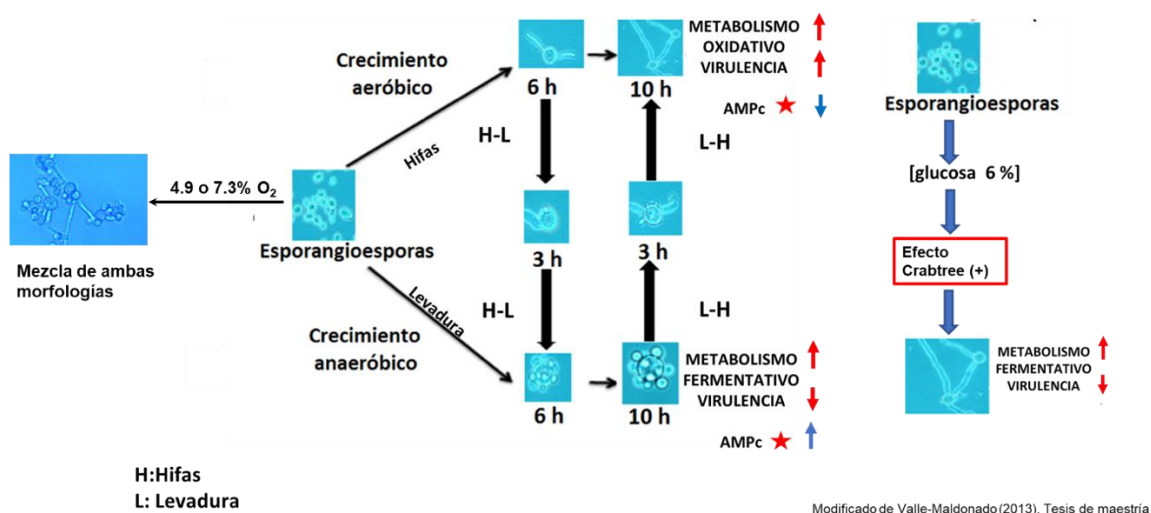


Figura 2. Dimorfismo en *M. lusitanicus*. A partir de las esporangiosporas, dependiendo de las condiciones de crecimiento presentes, crece como hifas en presencia de oxígeno, cualquier tipo de fuente de carbono y de nitrógeno. Por el contrario, si se encuentra una atmosfera de anaerobiosis, en presencia de una fuente de carbono fermentable y una fuente de nitrógeno orgánica, crecerá como levadura. Al crecer en presencia de oxígeno y de altas concentraciones de glucosa (6%), el hongo crecerá como hifas las cuales serán tan fermentativas como la levadura. Si se encuentra en un ambiente con bajas concentraciones de oxígeno, las esporas crecerán como una mezcla de ambas morfologías y el porcentaje de una u otra dependerá de la concentración de oxígeno (Tomado y modificado de Valle-Maldonado 2013 y de Patiño-Medina 2022).

1.2 Mucormicosis

La mucormicosis es una infección emergente causada por hongos del orden Mucorales. Los géneros aislados con mayor frecuencia corresponden a *Rhizopus*, seguido de *Mucor* y *Lichtheimia*. Además, está considerada como una infección con una elevada tasa de mortalidad, aunque de baja incidencia (2%) en comparación con la candidiasis (53%) o la aspergilosis (19%) (Garre, 2022).

Actualmente, la mucormicosis ha ganado relevancia en diversos países, especialmente en India, debido a su alta incidencia en pacientes graves infectados por el virus SARS-CoV-2 causante de la enfermedad infecciosa COVID-19. La forma clínica que se manifiesta con mayor frecuencia es la mucormicosis rino-orbito-cerebral seguida de la cutánea, pulmonar, diseminada y gastrointestinal (Garre, 2022). A la fecha, se han descrito diversos mecanismos involucrados en la virulencia, entre los que se encuentra el dimorfismo, la captación de hierro, las vías de señalización de calcineurina y de la proteína cinasa A (PKA) (Lax y col., 2020b).

1.2.1 Mucormicosis rino-orbital-cerebral

Dentro de los distintos tipos de mucormicosis, la más común entre los pacientes con diabetes asociada a cetoacidosis diabética es la infección rino-orbital-cerebral presentando una tasa de mortalidad del 33% (Roden y col., 2005), la cual ocurre cuando las esporas son inhaladas a través de los senos paranasales. A partir de ahí, la infección puede permanecer localizada, manifestando síntomas tales como sinusitis aguda junto con fiebre, dolor de cabeza, dolor de senos paranasales y congestión nasal. Sin embargo, en huéspedes vulnerables, la infección puede mostrar una progresión caracterizada por la invasión de la órbita y el paladar y una mayor extensión al cerebro, lo que puede resultar en una serie de anomalías clínicas significativas que van desde la pérdida de la visión, parálisis de los nervios craneales hasta cambios en el estado mental (McNulty, 1982; Sun y col., 2010).

1.2.2 Mucormicosis pulmonar

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 y col., 2005; Almyroudis y col., 2006; Feng y Sun, 2018). La principal sintomatología que manifiesta es: fiebre, dolor torácico, disnea y hemoptisis (potencialmente masiva y mortal), debido a la invasión de hifas en vasos sanguíneos y la hemorragia subsiguiente (Connor y col., 1979; Hamilos y col., 2011). Se ha reportado una tasa de mortalidad del 48-87% para la mucormicosis pulmonar (Kontoyiannis y col., 2000; Roden y col., 2005; Almyroudis y col., 2006; Kontoyiannis y col., 2010; Lanternier y col., 2012).

1.2.3 Mucormicosis cutánea

La mucormicosis cutánea puede manifestarse tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Esta forma de mucormicosis suele derivarse tras sufrir traumatismos, quemaduras, cirugía, uso de apósitos contaminados e inyecciones. La mucormicosis cutánea es la que está asociada en

menor medida que con una enfermedad subyacente del huésped. Las lesiones cutáneas se manifiestan como eritema doloroso, 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 la más baja (~25%) comparada con las otras formas de mucormicosis.

1.2.4 Mucormicosis gastrointestinal

Derivada de la ingesta de esporas y presenta una tasa de mortalidad del 85%. Esta forma clínica puede afectar múltiples componentes del tracto gastrointestinal, conduciendo a afecciones como la ulceración gástrica del estómago y la afectación intestinal, incluida la perforación intestinal. Muchos pacientes pueden presentar hemorragia gastrointestinal. (Roden y col., 2005; Cheng y col., 2009).

1.2.5 Mucormicosis diseminada

Se manifiesta en pacientes cuyo sistema inmunológico se encuentra gravemente comprometido. se caracteriza por generar una infección general en múltiples partes del cuerpo a derivada de una mucormicosis localizada. Por ejemplo, el 91.2% de mucormicosis pulmonar deriva en diseminación. El 53% de los casos de Las infecciones en el sistema nervioso central avanza a una infección diseminada. Esta manifestación clínica tiene la tasa de mortalidad más alta reportada, con un 90-96% en ciertos pacientes a pesar del tratamiento adecuado (Roden y col., 2005; Steinbrink y Miceli, 2021).

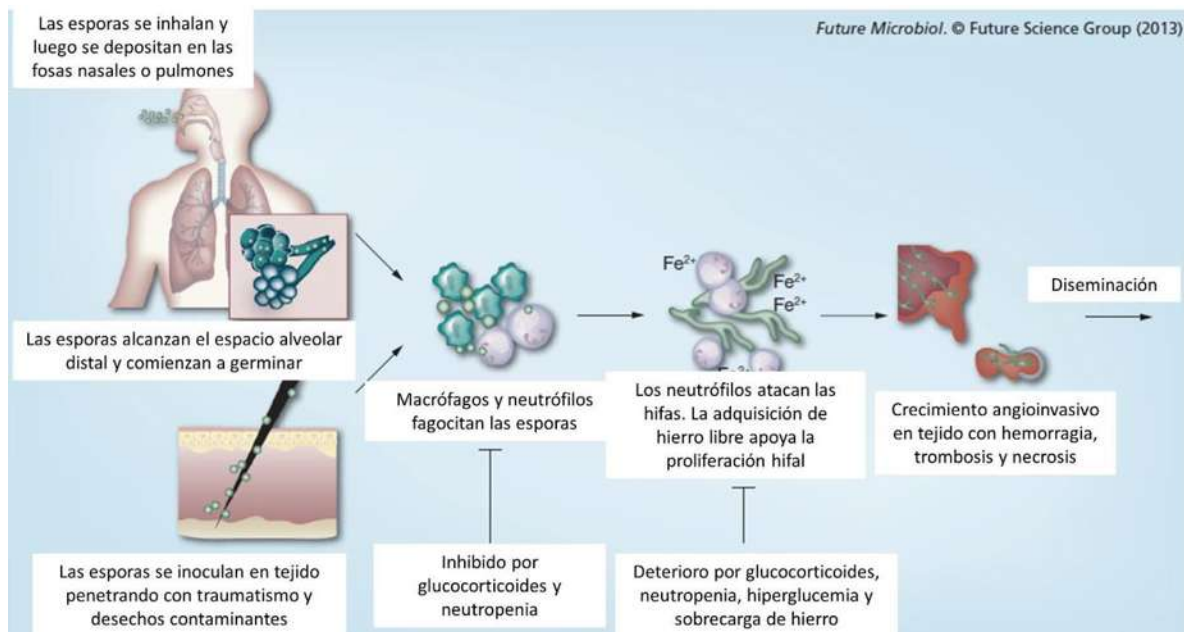


Figura 3. Patogénesis de la mucormicosis. Las esporas, al ser inhaladas o inoculadas, conducen a una robusta respuesta inflamatoria. Para establecer la infección, las esporas deben evitar la muerte por fagocitos mononucleares y polimorfonucleares residentes para desarrollarse como hifas, la forma angioinvasiva de la infección, para eventualmente diseminarse a otros órganos (Tomada y modificada de Lewis y Kontoyiannis, 2013).

Recientemente, una revisión de 851 casos durante el período entre enero del 2000 y enero del 2017 mostró que la incidencia de mucormicosis fue mayor (34%) en Europa que en otras regiones como en Asia (31%), América del Norte y del Sur (28%), África (3%), Australia y Nueva Zelanda (3%). Explicado, en parte, por el aumento de casos de pacientes inmunocomprometidos, como personas con trasplantes de órganos, diabetes mellitus tipo II mal controlada asociada a cetoacidosis y cánceres hematológicos, entre otras afectaciones (Jeong y col., 2019; Prakash y Chakrabarti, 2019).

La tasa de mortalidad asociada a mucormicosis varía dependiendo de la manifestación clínica presentada. Por ejemplo, en mucormicosis cutánea están registradas tasas de mortalidad que van del 10 al 25% (Skiada y Petrikos, 2013),

mientras que la mucormicosis pulmonar registra una mortalidad del 57% (Muthu y col., 2021). Por otro lado, en los casos de infección diseminada por el torrente sanguíneo la mortalidad alcanza tasas de hasta un 90% (Lax y col., 2022).

1.2.6 Clasificación de hongos patógenos prioritarios de acuerdo con la OMS

Debido al aumento en el número de casos de infecciones fúngicas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado recientemente una “lista de hongos patógenos prioritarios”. Es sabido que la población con alto riesgo de contraer una enfermedad fúngica invasiva (EFI) son aquellos pacientes con un sistema inmune disminuido, enfermedad renal crónica (ERC), tuberculosis, VIH, cáncer y diabetes mellitus mal controlada (cetoacidosis diabética) (Bongomin y col., 2017). Sin embargo, los grupos de personas con riesgos asociados se han expandido, ya que se han reportado como vulnerables a aquellos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades virales en el tracto respiratorio como influenza, y recientemente asociados a infección por SARS-CoV-2 (COVID-19) (Raut y col., 2021).

La clasificación de hongos patógenos publicada por la OMS se desarrolló con base en cuatro aspectos clave para determinar el nivel de prioridad y así formar los tres grupos principales, dichos aspectos fueron: La importancia de salud pública (considerando aspectos como incidencia anual, mortalidad y morbilidad. Como segundo criterio consideraron la resistencia a antifúngicos. En el tercer aspecto consideraron la falta de conocimiento concreto sobre la morbilidad de dichos hongos debido a diferentes aspectos como la falta de vigilancia formal y vinculación con los resultados clínicos, además del limitado acceso a los diferentes laboratorios fúngicos clínicos. Finalmente consideraron la distribución y la epidemiología de los patógenos fúngicos y como varían significativamente según la región. Como resultado de los diversos estudios realizados en cada uno de los cuatro rubros principales, se obtuvo la siguiente lista, donde los mucorales se encuentran dentro del grupo de alta prioridad (OMS, 2022).

Grupo critico	Grupo alto	Grupo medio
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffeii</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figura 4. Clasificación de patógenos fúngicos prioritarios según la Organización Mundial de la Salud. Lista obtenida por la OMS considerando aspectos tales como su importancia en salud pública, resistencia a antifúngicos y su epidemiología según la región. Dentro de este listado se encuentran los mucorales como parte del grupo de alta importancia. (Tomado de Geneva: World Health Organization, 2022).

1.3 Proteínas G

Las proteínas G son aquellas que unen nucleótidos de guanina, y participan en la regulación de la actividad de múltiples proteínas y se encuentran divididas en dos grandes familias, las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas. El grupo de las proteínas G monoméricas comprende 5 familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (Wennerberg y col., 2005).

Proteínas Ras: Las proteínas Ras actúan como nodos de señalización que se activan en respuesta a múltiples estímulos extracelulares. Las proteínas Ras en su estado activado interactúan con múltiples efectores catalíticamente distintos, que

se encargan de regular las redes de señalización citoplásmica controlando la expresión genética y la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Repasky y col., 2004).

Proteínas Rho: Esta familia está implicada en la regulación de la polaridad celular, movimiento celular, forma celular y las interacciones célula-célula y matriz-célula, así como en la regulación de la endocitosis y exocitosis (Ridley, 2001).

Proteínas Rab: Se han descrito como reguladores del transporte vesicular intracelular y tráfico de proteínas entre diferentes orgánulos de las vías endocítica y secretora. Además, se ha descrito que facilitan la formación y gemación de vesículas desde el compartimento donante, el transporte al compartimento aceptor y la fusión de vesículas y liberación del contenido vesicular en el compartimento aceptor (Zerial y McBride, 2001).

Proteínas Ran: Las proteínas Ran son bien conocidas por su función en el transporte nucleocitoplasmático tanto de ARN como de proteínas. La función de Ran depende de un gradiente espacial de la forma de Ran unida a GTP (Weis, 2003).

Proteínas Arf: Este grupo de proteínas están involucradas en la regulación del transporte vesicular. Regulan la formación de vesículas en diferentes pasos a diferencia de las proteínas Rab que actúan en un solo paso. Participan en el transporte retrogrado entre el Golgi y el RE (Retículo endoplásmico), 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 RE (Nie y col., 2003; Memon, 2004).

Por otro lado, el grupo de las proteínas G heterotriméricas está conformado por tres subunidades (α), (β) y (γ), se ha descrito que estas participan como elementos transductores en vías de señalización tales como la vía AMPc-PKA (por sus siglas en ingles Protein Kinase A), la vía MAPK (por sus siglas en ingles Mitogen-Activated Protein Kinase), etc. Estas proteínas regulan procesos como la división, migración y polaridad celular, así como la organización del citoesqueleto en células de mamífero (Syrovatkina y col., 2016). Por otro lado, en hongos, estas

proteínas se encargan de regular procesos tales como el crecimiento vegetativo, la esporulación, producción de pigmentos y toxinas, la virulencia y la reproducción sexual (El-Defrawy y col., 2020). *M. lusitanicus* posee doce subunidades G α , tres subunidades G β y tres subunidades G γ . Se ha descrito que la subunidad Gpb1 de *M. lusitanicus* regula positivamente el crecimiento micelial y la virulencia, ya que controla la vía de AMPc-PKA a través de la subunidad PkaR1, ya que la mutación del gen *gpb1* generó un crecimiento micelial reducido, además de aumentar el desarrollo de levaduras en condiciones de baja concentración de oxígeno; ambos defectos en el desarrollo micelial o levaduriforme están asociados a un fenotipo avirulento (Valle-Maldonado y col., 2015).

1.4 Generalidades de una vía de señalización

Todos los seres vivos captan información sobre su entorno a través de diferentes mecanismos. A nivel celular esta captación de información se realiza a través de las vías de señalización. Estas vías se basan en interacciones de unión reversibles entre moléculas que detectan y transmiten la presencia de una señal o señal extracelular hacia el interior de la célula (Azpeitia y col., 2020). Existe una gran variedad de vías de señalización que gobiernan los diferentes procesos biológicos en hongos, algunas de ellas son la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la vía AMPc-PKA y que están involucradas en el desarrollo filamentoso de diversos hongos dimórficos.

Se ha descrito que la vía de la MAPK es uno de los mecanismos más importantes y conservados en células eucariotas involucrada en la captación de estímulos extracelulares. Esta vía ha sido asociada a la regulación de diversos procesos tales como: el ciclo celular, la reproducción sexual, la morfogénesis, la respuesta a estrés, la homeostasis de la pared celular y la virulencia (Martínez-Soto y Ruiz-Herrera, 2017).

1.4.1 Vía de la PKA dependiente de AMPc (AMPc-PKA)

La vía de la PKA es una de las vías más importantes y conservadas en eucariotas ya que se encarga de regular procesos tales como el ciclo celular, el metabolismo

de lípidos y azúcares, el citoesqueleto, el tráfico vesicular, entre otros (Shabb, 2001). Por otra parte, en hongos, esta vía ha sido asociada en la regulación de procesos como la captación de nutrientes, la morfogénesis, la reproducción sexual, la homeostasis mitocondrial y la virulencia (Choi y col., 2015).

La proteína cinasa A en estado basal, se encuentra en su forma inactiva, la cual es un tetrámero que está conformado por dos subunidades catalíticas y dos subunidades regulatorias y que en respuesta a estímulos que incrementan la concentración de AMPc, cada unidad regulatoria se unirá a dos moléculas de AMPc en sitios alostéricos distintos (un sitio de alta afinidad y un sitio de baja afinidad), generando una respuesta que conduce a la reducción de afinidad de las subunidades regulatorias con las subunidades catalíticas separándose así la holoenzima de la PKA en un dímero de las subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas monoméricas, las cuales, una vez liberadas se encontraran en estado activo, fosforilando a sus proteínas diana en sitios serina/treonina lo que llevara a la regulación de su función celular (Fig. 5) (Ocampo y col., 2009; Dalton y Dewey, 2006).

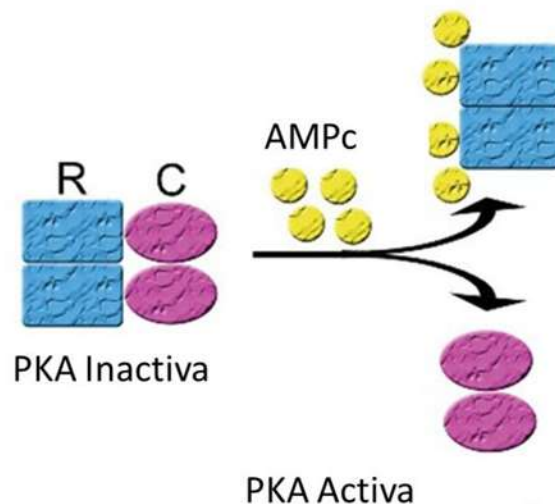


Figura 5. Estructura general de la proteína cinasa A. En los rectángulos color azul, se representa a las subunidades regulatorias, los óvalos morados representan las subunidades catalíticas, las esferas amarillas representan las unidades de AMPc que se unen a las subunidades regulatorias. Al aumentar la

concentración de AMPc, este se unirá a las subunidades regulatorias generando un cambio conformacional liberando y activando a las subunidades catalíticas. Tomado y modificado de Chong y col., 2020).

Los componentes de la vía PKA en *S. cerevisiae* han sido estudiados a detalle. De manera general, la ruta es activada por nutrientes o estímulos del entorno, los cuales son captados en la superficie celular por receptores acoplados a proteínas G, GPCR (G-protein coupled receptors). La detección de la señal deriva en la activación de las proteínas G heterotriméricas, constituidas por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. A partir de una señal detectada por el receptor GPCR, este conduce la señal generando que la subunidad $G\alpha$ intercambie GDP por GTP, disociándose del dímero $G\beta$ - $G\gamma$. de esta manera, la subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta$ - $G\gamma$ se consideran unidades funcionales permitiendo la regulación positiva o negativa de diversas vías metabólicas. Posteriormente, la subunidad $G\alpha$ -GTP o, las proteínas G monoméricas del tipo Ras en su estado activado uniendo GTP (Ras-GTP), estimulan la actividad de la adenilato ciclasa (Cyr) para la síntesis de AMPc, incrementando así los niveles intracelulares de este nucleótido. Al elevarse los niveles intracelulares de AMPc se conduce a la activación de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc. Dos moléculas de AMPc se unen al homodímero con actividad regulatoria para regular de forma alostérica la disociación de la proteína PKA dejando libre al homodímero con actividad catalítica, 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) llevara a cabo la degradación del AMPc a AMP (Fig. 6) (Thevelein y De Winde, 1999; Choi y col., 2015).

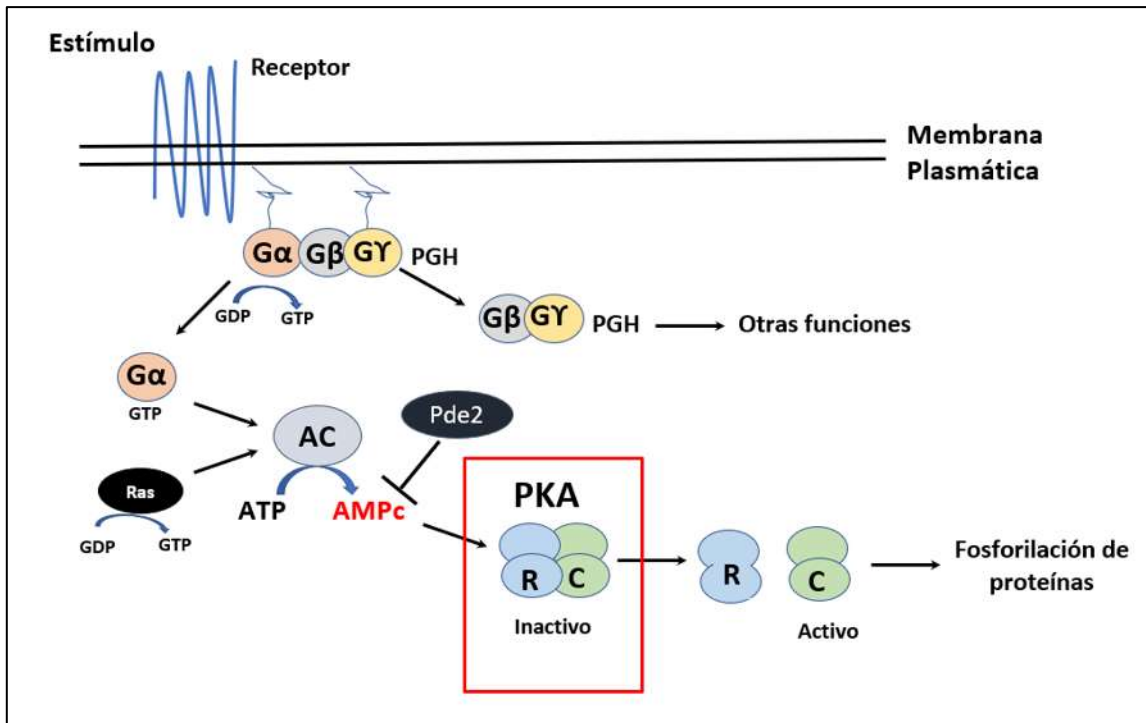


Figura 6. Descripción general de la vía de la PKA dependiente de AMPc. Los componentes de la vía son, un receptor ubicado en la membrana plasmática, un componente transductor como las proteínas G heterotriméricas (Gα: Subunidad alfa, Gβ: Subunidad beta y Gγ: Subunidad gama) o las proteínas Ras, la adenilato ciclasa (Cyr), la proteína PKA y una fosfodiesterasa (Pde2). Tomado y modificado de Patiño-Medina, 2022).

En el hongo *Cryptococcus neoformans* se ha asociado a la vía del AMPc-PKA con la virulencia. Se reportó que al existir un defecto en los elementos de la cascada tales como la proteína G (Gpa1), la adenilato ciclasa (Cac1) o la subunidad catalítica de la PKA (Pka1) resultan en una disminución de la virulencia. Por el contrario, cuando se generó una cepa mutante en el gen que codifica para la subunidad reguladora de la PKA, se generó una cepa hipervirulenta, sugiriendo que la vía AMPc-PKA actúa como un regulador negativo en la virulencia de *C. neoformans* (D'Souza y col., 2001).

Se ha reportado en *S. cerevisiae* a la vía de señalización AMPc-PKA en procesos tales como el crecimiento y diferenciación celular, este hongo posee tres subunidades catalíticas (Tpk1, Tpk2 y Tpk3) y una única subunidad regulatoria (Bcy1). Se observó que al aumentar la actividad de la PKA agregando AMPc exógeno o al mutar al gen *bcy1* favorece el crecimiento filamentoso (Pan y col., 2000).

En *Candida albicans* y *Candida tropicalis* se ha descrito que esta vía de señalización está implicada en el crecimiento, morfogénesis, filamentación y virulencia. Ambas especies de *Candida* poseen dos subunidades catalíticas (Tpk1 y Tpk2) y una subunidad regulatoria (Bcy1), el aumento en la concentración de AMPc regula positivamente la transición levadura-hifa y favorece la virulencia. Interesantemente, la subunidad catalítica Tpk2 en *C. albicans*, pero no en *C. tropicalis*, es necesaria para la virulencia en la infección sistémica de un modelo murino (Lin y Chen, 2018).

En *M. lusitanicus* la vía de señalización AMPc-PKA participa en el crecimiento, desarrollo y virulencia. Interesantemente, a diferencia de otros hongos como *S. cerevisiae* o *C. albicans*, *M. lusitanicus* posee cuatro subunidades regulatorias (PkaR1, PkaR2, PkaR3 y PkaR4) y diez subunidades catalíticas (PkaC1-PkaC10), lo cual indica que es un sistema más complejo en este mucoral (Ocampo y col., 2012; Fernández-Núñez y Col., 2016). Esta reportado que al mutar los genes *gpb1* o *pkaR1*, que codifica para la subunidad regulatoria PkaR1, se generó la disminución de la virulencia y un aumento en la producción de levaduras al crecer en condiciones de baja concentración de oxígeno (Valle-Maldonado y col., 2020). Por otro lado, se describió que la subunidad regulatoria PkaR1 regula de manera positiva la virulencia de *M. lusitanicus*; ya que al evaluar los sobrenadantes postgerminación libres de células obtenidos en condiciones aerobias de las cuatro mutantes en las subunidades regulatorias y de la cepa silvestre contra el modelo *C. elegans*, se observó que el sobrenadante proveniente de la mutante $\Delta pkaR1$ mostró una toxicidad significativamente disminuida con respecto a la cepa silvestre (Alejandre-Castañeda y col., 2022).

1.5 Factores de transcripción Tec1 y Tec2

Los factores de transcripción Tec pertenecen a una familia de proteínas que poseen un sitio de unión al ADN llamado TEA, el nombre proviene de los factores de transcripción descritos originalmente TEF-1 y AbaA, dicho sitio tiene una longitud de aproximadamente 66 a 68 aminoácidos (Hwang y col., 1993).

Se ha demostrado que los factores de transcripción Tec están involucrados en el desarrollo filamentoso y virulencia de diversos hongos, por ejemplo, en *S. cerevisiae* requiere de Tec1 para el desarrollo de pseudohifas (Chou y col., 2006). En *C. albicans* se ha reportado que CaTec1 es importante para el desarrollo y virulencia del hongo (Schwartz y col., 2000) y en *C. glabrata* se reportó que Tec1 es necesaria para la generación de biofilm y la tolerancia en condiciones de crecimiento a nivel bajos de pH (Purohit y Gajjar, 2022).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, se describió en *M. lusitanicus* la presencia de dos homólogos de Tec, Tec1 y Tec2. La sobreexpresión de los genes *tec1* y *tec2* conduce a un aumento en el crecimiento micelial, contenido mitocondrial, mayor toxicidad de sus SS contra el nematodo *C. elegans* y un aumento en la virulencia contra la larva *G. mellonella* (Alejandre-Castañeda y col., 2023).

Se había descrito previamente, un único reporte sobre la participación de los factores de transcripción Atf1 y Atf2 en *M. lusitanicus*, los cuales son importantes para la supervivencia de las esporas dentro de los macrófagos, ya que la mutación de ambos genes disminuyó la virulencia del hongo al probarse contra ratones diabéticos (Pérez-Arques y col., 2019).

1.6 Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias están asociadas a múltiples funciones como obtención de energía celular, diferenciación, desarrollo, respuesta inmune, homeostasis de lípidos y calcio y apoptosis. Son organelos altamente dinámicos que forman redes tubulares (Fig. 7), dicha red es fundamental para una adecuada función mitocondrial y celular, implicando procesos altamente conservados conocidos

como dinámica mitocondrial (Nunnari y col., 2012), en la cual participa la biogénesis, (Mao y Chen, 2019,), mantenimiento (fusión) y reciclamiento de mitocondrias (fisión y mitofagia) (Youle y Van-Der Bliek, 2012).

Se sabe que las mitocondrias son orgánulos que se caracterizan por tener una morfología cambiante, característica que está fuertemente asociada a la fisiología celular, pues esta descrito que la morfología fragmentada está asociada a la liberación apoptótica de citocromo C, a diferencia de la morfología de red tubular, la cual promueve la resistencia contra los estímulos apoptóticos (Karbowski y Youle, 2003).

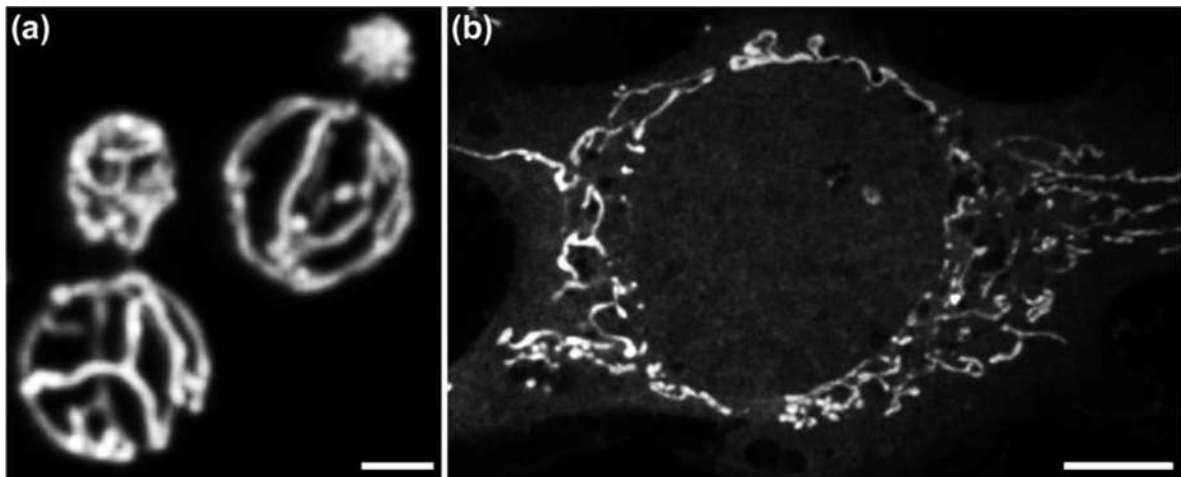


Figura 7. Red tubular mitocondrial. Estructura de red tubular mitocondrial en levadura distribuida de manera uniforme (a). Al igual que en células fúngicas, las mitocondrias forman redes tubulares, se observa la red mitocondrial de un fibroblasto proveniente de un embrión de ratón (b). Barra de escala igual a 2μm para a y b (Tomado y modificado de Nunnari y col., 2012).

En *S. cerevisiae* se ha reportado que ante una situación de escasas de nutrientes las mitocondrias se alargan y se interconectan formando la red tubular esta mediado por la regulación negativa de la proteína 1 relacionada con la dinamina (Dnm1) a través de la modulación de dos sitios de fosforilación en (S616 y S637), lo cual conduce a la fusión mitocondrial (Rambold y col., 2011).

1.6.1. Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es regulada por el complejo transcripcional Hap (Heme Activator Protein), que representa una familia de complejos transcripcionales heterotriméricos altamente conservados en eucariotas. Este complejo está formado por las proteínas Hap2, Hap3 y Hap5, dicho complejo se une a la secuencia consenso 5'-CCAAT-3' de los promotores de los genes blanco a través de la región C-terminal de Hap4. El complejo transcripcional Hap se requiere para la coordinación de elementos involucrados en la síntesis de los complejos respiratorios, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y homeostasis del hierro (Mao y Chen, 2019).

1.6.2. Fusión mitocondrial

La fusión está mediada por la proteína clave Fzo1 (Fuzzy Onion Protein) además de las proteínas Ugo1 (fusión en japones) y la proteína intermembranal Mgm1 (Mitochondrial Genome Maintenance), las cuales en conjunto forman el complejo de fusión. En humanos, se han descrito homólogos para estas tres proteínas los cuales son MFN1 para Fzo1, SLC25 para Ugo1 y OPA1 para Mgm1. El proceso de fusión mitocondrial es esencial cuando la demanda energética incrementa y también como mecanismo de rescate de mitocondrias dañadas por el estrés oxidativo. Se ha reportado que la mutación de alguno de los genes que codifican a alguna de las proteínas de este complejo es mutado, las mitocondrias son incapaces de llevar a cabo el proceso de fusión adecuadamente, lo cual lleva a un mayor número de mitocondrias fraccionadas (Youle y Van-Der Bliek, 2012; Fritz y col., 2003). De manera general el proceso de fusión en levadura es regulada de la siguiente forma: la fusión de la membrana externa está controlada por las proteínas Fzo1 y Mgm1. La proteína Fzo1 se inserta en la membrana externa a través de dos dominios transmembranales, mientras que el dominio GTPasa está ubicado hacia el citosol. Por otro lado, la proteína Mgm1 presenta dos formas: una forma posee un dominio transmembranal que se inserta en la membrana interna mitocondrial y la otra forma carece del dominio transmembranal y se encuentra en el espacio intermembranal. En conjunto, Fzo1 y Mgm1 forman un complejo

proteico que conecta las dos membranas; por lo tanto, Mgm1 también contribuye 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 con Fzo1 y Mgm1, con lo cual se forma el sitio de contacto de fusión entre las dos membranas (Fig. 8) (Song y col., 2009; Sesaki y Jensen, 2001; Hoppins y col., 2009).

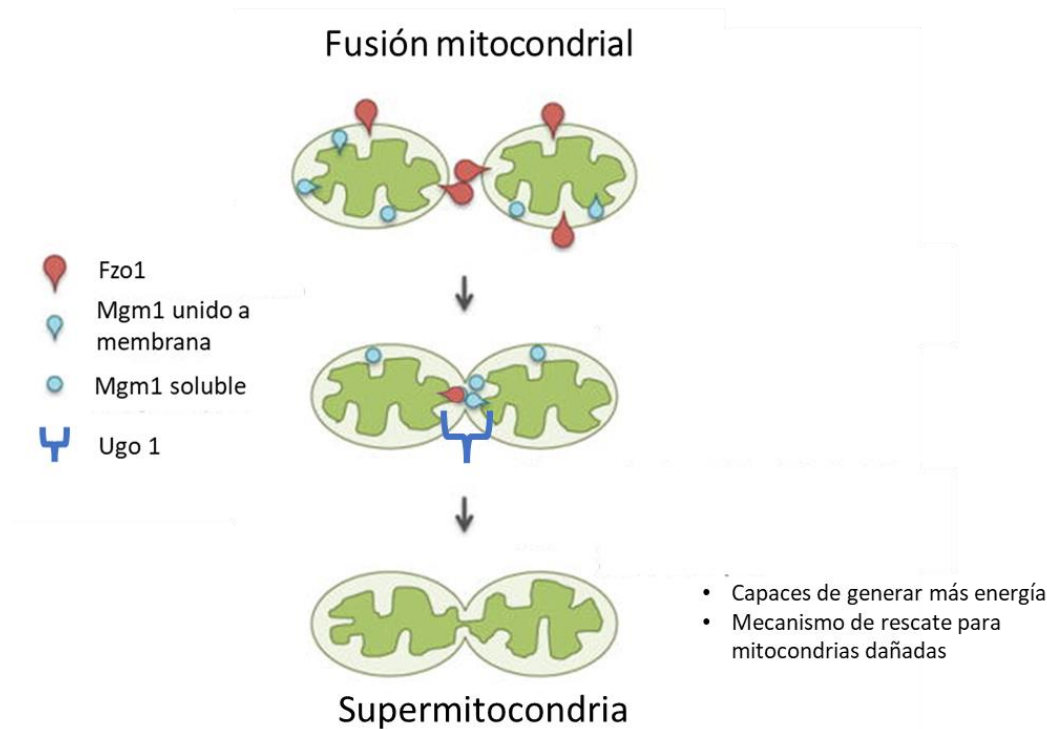


Figura 8. Descripción general de la fusión mitocondrial en *S. cerevisiae*. El proceso de fusión requiere la interacción entre las proteínas Fzo1, Mgm1 y Ugo1. Fzo1 hace contacto físico con Mgm1 la cual está unida a la membrana externa, esta interacción es mediada por Ugo1 conduciendo así a la fusión de las mitocondrias, generando una nueva estructura conocida como supermitocondria (Tomada y modificada de Zhang y col., 2014).

1.6.3. Fisión mitocondrial

Por otro lado, la fisión es mediada por la proteína Dnm1 (Dynamin Related) y por las proteínas Mdv1 (Mitochondrial division) y Fis1 (Mitochondrial fission) formando el complejo de fisión, el cual es esencial para mantener un número adecuado de mitocondrias durante el crecimiento o división celular, así como para su reciclamiento. En humanos se han encontrado homólogos correspondientes a estas proteínas, las cuales son DNM1L para Dnm1, y FIS1 para Fis1. Cuando se muta a algún gen que codifica a estas proteínas, se generan mitocondrias incapaces de fisionarse, conduciendo a una red mitocondrial fuertemente interconectada (Youle y Van-Der Bliek, 2012; Fritz y col., 2003). El proceso de fisión esta propuesto de la siguiente forma: Dnm1 es reclutado primero mediante interacción con Fis1, en la cara externa de la membrana mitocondrial; después, mediante un intercambio del nucleótido GDP por GTP en Dnm1, el cual es necesario para inducir la fisión mitocondrial. El ciclo de fisión culmina con la hidrólisis del GTP, el desensamblaje de Dnm1 y las proteínas asociadas de la superficie externa de las mitocondrias y el regreso de Dnm1 al citosol (Fig. 9) (Legesse y col., 2003).

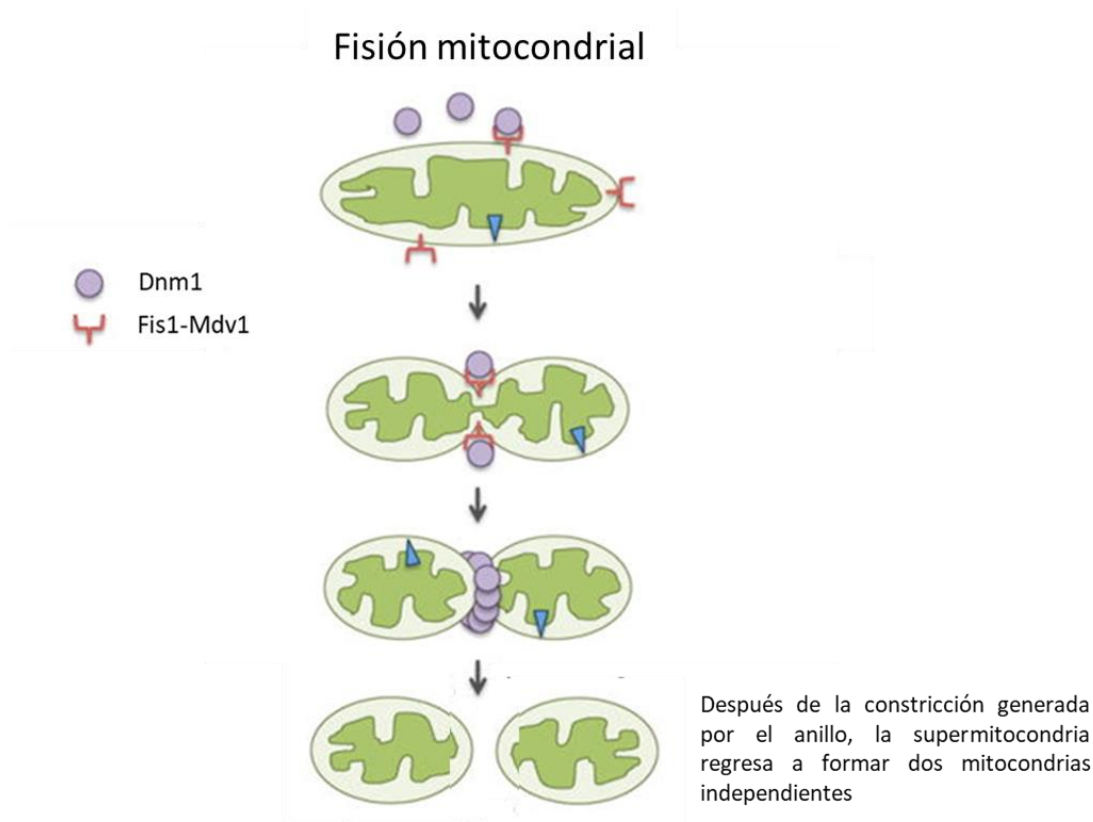


Figura 9. Descripción general de la fisión mitocondrial en *S. cerevisiae*. La proteína Dnm1 es un componente central en la maquinaria de la fisión mitocondrial, dicha proteína se ensambla con Fis1 y Mdv1 que se encuentran en la membrana externa de las mitocondrias y median en la constricción y escisión de las membranas mitocondriales (Tomada y modificada de Zhang y col., 2014).

1.6.4. Mitofagia

Finalmente, la mitofagia es el proceso mediante el cual se degradan las mitocondrias y dicho proceso esta conservado en todas las células eucariotas. La finalidad de este proceso es el de mantener un control en la cantidad y calidad de las mitocondrias dirigiendo a aquellas que se encuentran en un estado deteriorado hacia los lisosomas para su posterior degradación. En *S. cerevisiae* este proceso es regulado principalmente por la proteína Atg32, la cual es una proteína transmembranaL de un solo paso en la membrana mitocondrial externa (Okamoto

y col., 2009; Kanki y col., 2009). Además, otros miembros de las proteínas Atg (autophagy-related) tales como Atg8 y Atg11 presenta funciones similares en la inducción de este proceso (Kondo-Okamoto y col., 2012). De manera general, la mitofagia es inducida cuando las células alcanzan la fase estacionaria o cuando se encuentran en un ambiente de limitación de nitrógeno (Kanki y Klionsky, 2008; Okamoto y col., 2009). Bajo estas circunstancias, Atg32 se induce a nivel transcripcional por limitación de nitrógeno, la proteína se acumula en la membrana externa mitocondrial, formando un complejo con Atg8 y Atg11 en la superficie de las mitocondrias. La proteína Atg8 se encuentra en los autofagosomas y Atg11 funciona como un andamio para otras proteínas Atg y así promover la formación de autofagosomas (Aoki y col., 2011; Kondo-Okamoto y col., 2012; Onishi y col., 2021).

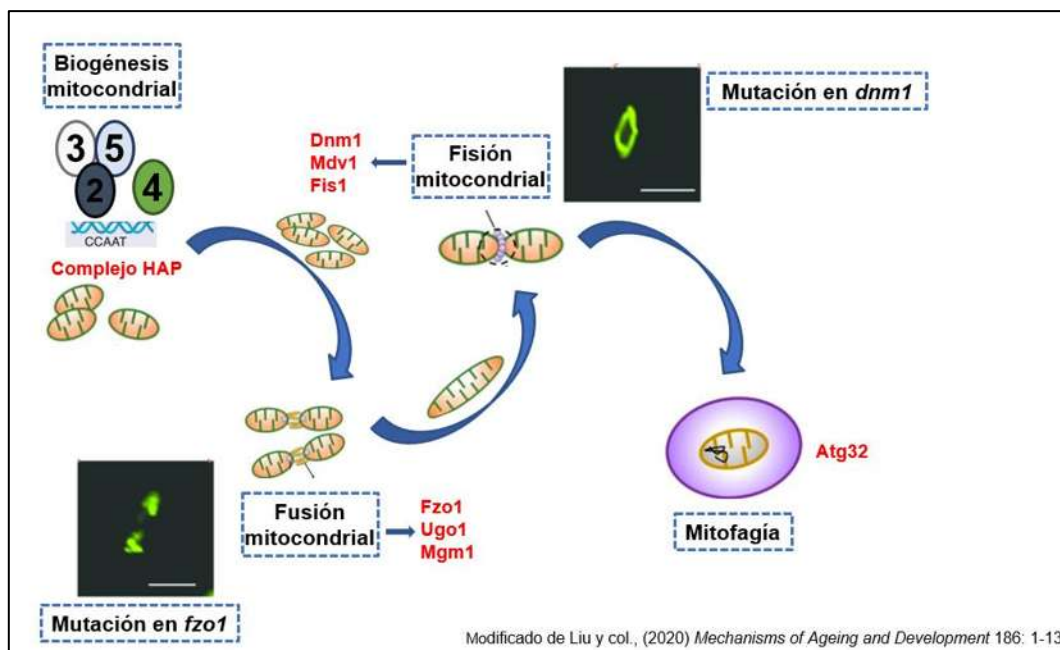


Figura 10. Esquema de la dinámica mitocondrial en la levadura de *S. cerevisiae*. La dinámica mitocondrial está conformada por cuatro eventos importantes: biogénesis mitocondrial donde se sintetizarán nuevas mitocondrias, mediada por el complejo HAP. Al aumentar el requerimiento energético se dará paso a fusión mitocondrial mediada por el complejo Fzo1, Ugo1 y Mgm1 donde se

generarán nuevas estructuras llamadas supermitocondrias y que también actúa como mecanismo de rescate de mitocondrias. Una vez que las mitocondrias sufren daño derivado del estrés oxidativo, o que la demanda energética ha sido cubierta estas deberán reciclarse a través del proceso de fisión mitocondrial, dicho proceso esta mediado por el complejo formado por las proteínas Dnm1, Mdv1 y Fis1. Finalmente, este reciclamiento de mitocondrias conduce al proceso de mitofagia la cual es mediada principalmente por Atg32, Atg8 y Atg11, proceso que es importante para mantener la calidad y cantidad de mitocondrias (Tomado y modificado de Liu y col., 2020).

Se ha reportado que la vía AMPc-PKA está asociada a diversos procesos que involucran la dinámica mitocondrial, por ejemplo, en *S. cerevisiae* existen tres subunidades catalíticas de la proteína cinasa A (Tpk1, Tpk2 y Tpk3). Se demostró que en ausencia de la subunidad Tpk3, se disminuye el contenido mitocondrial (disminución de los niveles de los citocromos aa3, b y cc1), lo cual correlaciona con una disminución drástica en el crecimiento del hongo (Chevtzoff y col., 2010).

En hongos patógenos, está demostrada la importancia de la homeostasis mitocondrial ya que la respiración está asociada a múltiples procesos tales como la resistencia a azoles, la homeostasis del hierro, además de participar en el crecimiento filamentoso invasivo, adaptación a hipoxia, transición de morfologías y biosíntesis de la pared celular (Song y col., 2020).

En *M. lusitanicus* se encontraron diferentes elementos de la dinámica mitocondrial tales como las proteínas Hap3, Hap5a, Fzo1 y Atg24a, los cuales presentaban posibles sitios de fosforilación por PKA (Fig. 11). Estos datos sugieren que, en este organismo, la dinámica mitocondrial podría ser regulada por la vía AMPc-PKA. Además, se demostró que durante el desarrollo levaduriforme la proteína Arf2 se encuentra bajo la regulación de la PKA y que esta es necesaria para llevar a cabo una adecuada fisión mitocondrial y mitofagia (Patiño-Medina, 2022).

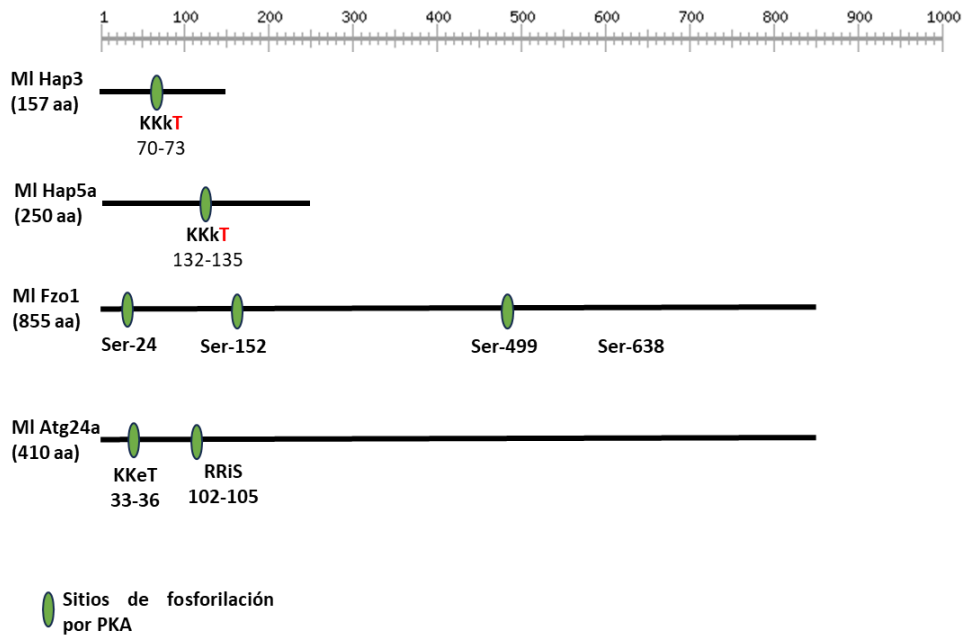


Figura 11. Sitios de fosforilación por PKA en elementos de la dinámica mitocondrial. En diversos elementos de la dinámica mitocondrial como Hap3, Hap5a, Fzo1 y Atg24a se encontraron posibles sitios de fosforilación por PKA, sugiriendo que la dinámica mitocondrial se encuentra bajo regulación de la vía AMPc-PKA.

En Mucorales el fenotipo virulento ha sido asociado al aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial, el cual tiene un papel muy importante para la producción de energía (Alejandre-Catañeda y col., 2022). Por lo que, la presencia de defectos en la mitocondria o defectos que conlleven a un metabolismo oxidativo deficiente se podrían asociar a una disminución de la virulencia.

II. Justificación

M. lusitanicus es un modelo biológico para entender la diferenciación celular y la virulencia ligada a la mucormicosis. El crecimiento micelial correlaciona con un metabolismo oxidativo y un fenotipo virulento, mientras que un crecimiento levaduriforme conlleva a un metabolismo fermentativo y un fenotipo poco virulento. El metabolismo mitocondrial está muy poco entendido en los mucorales y puede ser un elemento clave en la mucormicosis. Conocer el efecto de la fusión y fisión mitocondrial, así como analizar la vía de señalización PKA que pudiera regular a estos eventos, podría ser crucial para entender tanto la morfogénesis y virulencia en *M. lusitanicus*, además dicho conocimiento puede ser traducido a otros Mucorales.

III. Hipótesis

La activación de la vía de la AMPc-PKA regula negativamente la fusión mitocondrial conduciendo a una disminución del crecimiento micelial y virulencia a través de la represión del metabolismo oxidativo mitocondrial de *M. lusitanicus*.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

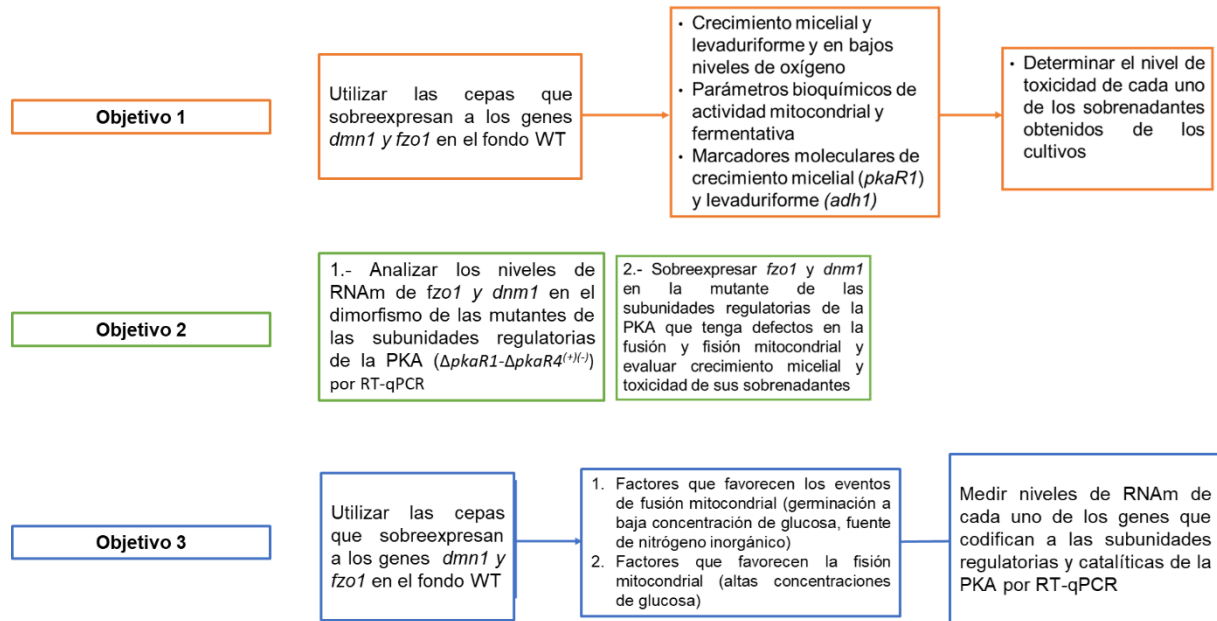
Demostrar si componentes de la vía AMPc-PKA controlan los procesos de fusión y fisión mitocondrial, lo cual podría conducir a una disfuncionalidad en el metabolismo fermentativo-oxidativo alterando el crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus*.

4.2. Objetivos específicos

1. Conocer la participación de la fisión y fusión mitocondrial en el crecimiento y virulencia.
2. Demostrar cuál de las subunidades PkaR está implicada en la regulación positiva o negativa de la fusión y la fisión mitocondrial.

3. Analizar la modulación transcripcional de los genes que codifican a las distintas subunidades regulatorias y catalíticas de PKA durante las condiciones de crecimiento que favorecen los eventos de fusión y fisión mitocondrial

4. V. Estrategia metodológica



VI. Materiales y métodos

6.1. Cepas a utilizar.

Tabla 1. Cepas empleadas en el proyecto

Cepa	Fenotipo	Referencia
MU636	Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y protótrofa a uracilo (<i>pyrG</i> ⁺); obtenida mediante recombinación homóloga restaurando el gen <i>pyrG</i> en el locus del gen <i>pyrG</i> . Derivada de la cepa MU402.	Navarro-Mendoza y col., 2019.
$\Delta pkaR1$	Derivada de MU402, mutante homocarionte en el gen <i>pkaR1</i> (<i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺)	Ocampo y col., 2008.
$\Delta pkaR2$	Derivada de MU402, mutante homocarionte en el gen <i>pkaR2</i> (<i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺)	Alejandro-Castañeda y col., 2022.
$\Delta pkaR3$	Derivada de MU402, mutante homocarionte en el gen <i>pkaR3</i> (<i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺)	Ocampo y col., 2012.
$\Delta pkaR4^{(+)(-)}$	Derivada de MU402, mutante heterocarionte en el gen <i>pkaR4</i> (<i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺)	Ocampo y col., 2012.
MU636 + <i>dnm1</i> ^{wt}	Derivada de MU636; sobreexpresando el gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	Patiño-Medina, 2022.
MU636 + <i>fzo1</i> ^{wt}	Derivada de MU636; sobreexpresando el gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	Patiño-Medina, 2022.
$\Delta pkaR1$ + <i>dnm1</i> ^{wt}	Derivada de $\Delta pkaR1$; sobreexpresando el gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	En este trabajo
$\Delta pkaR1$ + <i>fzo1</i> ^{wt}	Derivada de $\Delta pkaR1$; sobreexpresando el gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺)	Alejandro-Castañeda. Datos sin publicar

6.2. Obtención de *M. lusitanicus*

6.2.1. Condiciones generales de crecimiento

M. lusitanicus se cultivó por lo general a 28°C en los diferentes medios descritos a continuación:

Condición estándar de germinación en medio líquido

La condición estándar de germinación de *M. lusitanicus* fue a 28°C a 150 revoluciones por minuto (RPM)

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

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de glucosa (BD Bioxon), al cual se le denominó como YPG-2% y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH a 4.5 (Bartnicki-García, 1968).

YPG 6% (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 60 g de glucosa (BD bioxon), al cual se le denominó como YPG-6% y se ajustó el pH a 4.5. Este medio se utilizó para estimular el metabolismo fermentativo.

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 amonium sulfate (BD Difco), 20 g de glucosa (BD Bioxon), al cual se le denominó como YNB-2% y 20 g de agar (BD Bioxon) en caso de medio sólido. Para los experimentos fisiológicos se adicionó 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)

YNB 0.1% (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 amonium sulfate (BD Difco), 1 g de

glucosa (BD Bioxon), al cual se le denominó como YNB-0.1%. Este medio se utilizó para estimular el metabolismo oxidativo mitocondrial.

6.2.2. Obtención y conteo de esporas

En placas de Petri con medio YPG-2% sólido, se inocularon 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 fueron aspiradas y se depositaron en un tubo de 50 mL estéril. Las esporas se centrifugaron a 2,000 rpm (revoluciones por minuto), 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) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico BX-40 Olympus. 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 expresó las esporas por mL de muestra. Las esporas contadas y lavadas se conservaron a 4°C y se emplearon en un máximo de 30 días después de su obtención.

6.2.3 Crecimiento radial de *M. lusitanicus*

Placas de Petri con medio YPG o YNB sólido, 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 12 horas.

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

Para llevar a cabo el crecimiento aérobico 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 a 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 medio de cultivo, tapados con un tapón de

corcho, dichos tapones se atravesaron con una aguja para formar una atmosfera de CO₂; este es un sistema modificado a partir del sistema “auto-anaeróbico” descrito anteriormente (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993).

6.2.5 Determinación de la germinación de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5x10⁵ esporas por cada mL de medio de cultivo, se tomaron alícuotas de cada matraz cada dos horas hasta la hora ocho de incubación para el crecimiento aerobio y de igual forma hasta la hora doce de incubación para el crecimiento anaerobio. Inmediatamente se realizó el conteo de 100 células por muestra, identificando las células germinadas. El resultado determinó el porcentaje de esporas germinadas al tiempo evaluado.

6.2.6 Cuantificación del crecimiento (Peso seco)

El crecimiento celular se determinó midiendo la biomasa total generada en 10-20 mL medio líquido. La biomasa de las diferentes cepas (micelio o levaduras) se colectó en papel filtro previamente seco y pesado. Las células se lavaron dos veces con agua destilada y se secaron por 96 horas a 60°C. Después del secado y enfriado, los filtros con la biomasa se pesaron hasta que el peso se mantuvo constante.

6.2.7 Obtención de sobrenadantes post cultivos libres de células (SS)

Se colocaron 5x10⁵ esporas por cada mL de medio de cultivo de cada una de las cepas a evaluar en 10 mL de los medios de cultivo líquidos YNB-2%, YNB-0.1%, YPG-2% y YPG-6% de glucosa, se sometieron a agitación constante de 150 rpm a 28°C en condiciones aerobias por 48 horas. 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).

6.2.8 Ensayos de toxicidad de los SS frente a *Caenorhabditis elegans*

Se colocó 1 mL de los distintos sobrenadantes de crecimiento micelial de las mutantes en los genes *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3*, *pkaR4* de *M. lusitanicus*, a cada uno

de los pozos de placas de 24 pozos (Corning). Mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75) los nematodos (10-20) fueron transferidos con un “picker” a cada uno de los pozos utilizados. En todos los ensayos de virulencia los nematodos fueron observados cada 12 horas por un tiempo no mayor a 48 horas. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo fue cuando éste permaneció inmóvil a la estimulación física.

6.2.9 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 estreptomicina a 10 µg/mL.

6.2.10 Crecimiento de *C. elegans*

Para la preparación de la fuente de comida de *C. elegans*, se inoculó *E. coli* OP50 en medio LB líquido con estreptomicina (10 µg/mL), se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 48 horas. 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 (Nematode Growth Medium) a utilizar. Se incubaron a 37°C por 48 horas hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron pequeñas partes de agar con al menos un nematodo a cada caja Petri previamente crecidas con la cepa de *E. coli* OP50 y se dejó incubar por 3 días a 18°C hasta la fase adulta del nematodo.

6.2.11 Medio de cultivo NGM (Nematode Growth Medium) para crecimiento de *C. elegans*

El medio NGM es un medio de cultivo que se utiliza para el crecimiento y mantenimiento de nematodos como *C. elegans*. Se elaboró con 2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker), 4 g de peptona de caseína (Solbiosa), 3 g de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.05 g de fosfato de potasio dibásico (Meyer), 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) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker) y 0.5 mg de estreptomicina por cada litro de medio.

6.3 Cuantificación de rizoferrina

Se adicionaron 200 μ L de acetonitrilo a un volumen de 800 μ L 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 con y equilibrado con acetonitrilo al 20% (v/v). Los extractos se filtraron utilizando una membrana de PTFE de 0.22 μ m y se almacenaron a -20°C hasta el análisis cromatográfico.

El análisis de rizoferrina se realizó mediante UPLC-ESI-TOF-MS 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 $\times$ 2.1 mm y 1.6 μ m; Phenomenex) mantenida a 40°C. Se inyectaron cinco μ L 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 μ L/min usando el siguiente programa de gradiente: 0 min, 10% B y 0–5 min, 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 50–1000 m/z; tiempo de exploración 0.4 s; formato de datos centroide. La rizoferrina se controló a $m/z = 437.141 \pm 0.01$ Da.

6.4 Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

La respiración de las células se determinó a 28°C 3 y 4 horas 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.

6.5 Cuantificación de OH⁻

Esporas de cada una de las cepas se activaron en agitación constante con el medio requerido por 2 horas, seguido las células se recuperaron y lavaron en buffer HEPES 10 mM, pH 7 a 2,000 rpm por 5 min tres veces, después se adiciono 10 µM de 3'-p-aminofenill fluoresceína (APF) disuelto en 0.1 % de dimetilformamida en buffer HEPES con 110 mM de glucosa por 30 min 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 OH⁻. Se usó el equipo VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) con filtro de emisión a 520 nm y línea de excitación a 490 nm.

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR)

Para llevar a cabo la corroboración de la mutación de los genes *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4* en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$, $\Delta pkaR3$ y $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ se realizó la extracción de ARN de micelio de 15 horas de germinación de cada mutante con el método usado por **Valle-Maldonado y col., 2015**. Las muestras de ARN fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a $\lambda=260\text{nm}$ y $\lambda=280\text{nm}$, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (**Krebs y col., 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 y col., 1992; Wilfinger y col., 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 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 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 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 min), 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 como controles positivos y agua como control negativo.

Tabla 2. Oligonucleotidos utilizados para RT-qPCR.

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm(°C) / GC (%)
<i>pkaR1</i> (1403781)	GGCGATGTGGGTGATTTCTTC	64.43/52.38
	GCTACCACCTGCCTCATAGTTG	65.24/54.55
	ACGTCGTCGAGTCGGGTACTTTG	56.52/69.42
<i>pkaR2</i> (1371423)	CCGTGCTGCCACTGTGATTG	66.77/60.00
	AAATGCCTTCTTGCCAAGTGTA	63.35/40.91
	TCATGGCCGTCTCAAGTGTC	67.78/57.14
<i>pkaR3</i> (1025256)	GGGCGAGGATTTCTTCTTGATTG	64.60/47.83
	GCTGTGGCCATTCTCATC	63.39/57.89
	AGCGTGGCACGGCCCTCTTT	71.67/65.00

<i>pkaR4</i> (1424505)	CTGCCGCCAACTACAATCGAG	66.13/57.14
	GTGCGGGAGTCTTGGATAC	62.69/57.86
	CGACGTACCTCAGTCAGCGCAG	69.66/63.64
<i>dnm1</i> (1296413)	CGCTCGGTGGAGATGGTATC	64.96/60.00
	CGACTTGTTGCCGCACTTTAC	65.08/52.38
	TGTAGCAACTCGTCAAAGTTCTCCTCCT	69.98/46.43
<i>fzo1</i> (1299828)	TGTCGGCTTCTTGGTCTATGTC	64.88/50.00
	CAGCCTGCTTGAACCTTCTTGAC	64.47/50.00
	CAGCGACATGCGCAGTGCTGT	70.43/61.90

6.7 Procesamiento de imágenes

Para la captura de imágenes se empleó un microscopio marca Olympus modelo CKX41 acoplado a una cámara marca Q-Imaging modelo MicroPublisher 3.3 RTV, utilizando el software Q-capture PRO-7 con el cual se realizó también la captura de las imágenes y determinación de la longitud de las estructuras de interés.

6.8 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 Dunnett. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos: * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$. Y la prueba de supervivencia Mantel-Cox. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos: *** $p < 0.001$.

VII. Resultados

7.1 Papel de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial sobre el crecimiento de *M. lusitanicus* en diferentes fuentes de carbono

Para estudiar el papel de la fusión y fisión mitocondrial en el crecimiento de *M. lusitanicus* se utilizaron la cepa silvestre MU636 (WT) y dos cepas isogénicas a la WT, las cuales sobreexpresan a los genes *fzo1* y *dnm1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}), los productos de dichos genes están asociados a la fusión y fisión mitocondrial, respectivamente. Primeramente, se evaluó la germinación de las tres cepas a través de una cinética de crecimiento en dos condiciones diferentes, en la primera se utilizó el medio YNB-2% y en la segunda se utilizó el mismo medio base, pero con la adición de una fuente de carbono no fermentable YNG-2% (111 mM de glicerol, equimolar al 2% de glucosa). Para ello, se inocularon matraces con 5x10⁵ esporas por mL en los medios líquidos correspondientes, donde se evaluó el porcentaje de células germinadas durante 8 horas tomando una alícuota cada 2 horas. Se observó que en el medio adicionado con glucosa no existió una diferencia significativa en la germinación entre las cepas sobreexpresantes con respecto a la cepa WT. Sin embargo, al utilizar el medio adicionado con glicerol se observó que la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} presentó una mayor germinación con respecto a la cepa WT, lo cual sugiere que LA sobreexpresión en *fzo1* es capaz de utilizar más eficientemente al glicerol y posiblemente posea un metabolismo oxidativo mitocondrial más eficiente. Sin embargo, la cepa MU636-*dnm1*^{O/E} no presentó ninguna diferencia significativa al compararla con la cepa WT (Fig. 12).

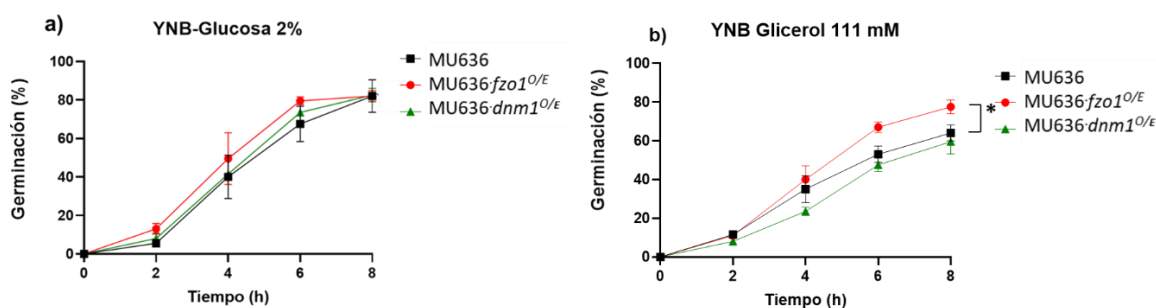


Figura 12. Porcentaje de germinación de las cepas sobrexpresantes EN LOS GENES FZO1 Y DMN1 (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}) en presencia de distintas fuentes de carbono. a) En medio YNB líquido adicionado con glucosa al 2% se inocularon 5x10⁵ por mL de medio de esporas de la cepa silvestre y de las cepas sobrexpresantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. **b)** En medio YNB líquido adicionado con glicerol 111 mM se inocularon 5x10⁵ por mL de medio de esporas de la cepa silvestre y de las cepas sobrexpresantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

Con el propósito de tener otro parámetro de si los procesos de fusión y fisión mitocondrial influían en el crecimiento de *M. lusitanicus* se analizó un parámetro indicativo, como la formación de biomasa en las mismas condiciones de cultivo usadas en el resultado anterior. Para lo cual, se inocularon 5x10⁵ esporas por mL de la cepa WT y de las cepas MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E} en los medios utilizados previamente en la figura 12, se evaluó el peso seco de la biomasa generada a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento. En el medio YNB adicionado con glucosa, no se observó una diferencia significativa de la biomasa generada entre las cepas sobrexpresantes respecto a la cepa WT en todos los tiempos analizados. Sin embargo, la biomasa generada posterior al crecimiento en el medio YNB suplementado con glicerol 111 mM, se observó una mayor generación de biomasa en la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} respecto a la cepa WT, contrario a la cepa MU636-*dnm1*^{O/E}, la cual no presentó una diferencia significativa en este parámetro respecto a la cepa WT. Este resultado sugiere nuevamente, que la sobreexpresión del elemento del gen *fzo1*, involucrado en la fusión mitocondrial estaría

favoreciendo el crecimiento a través del aumento del metabolismo oxidativo (Fig. 13).

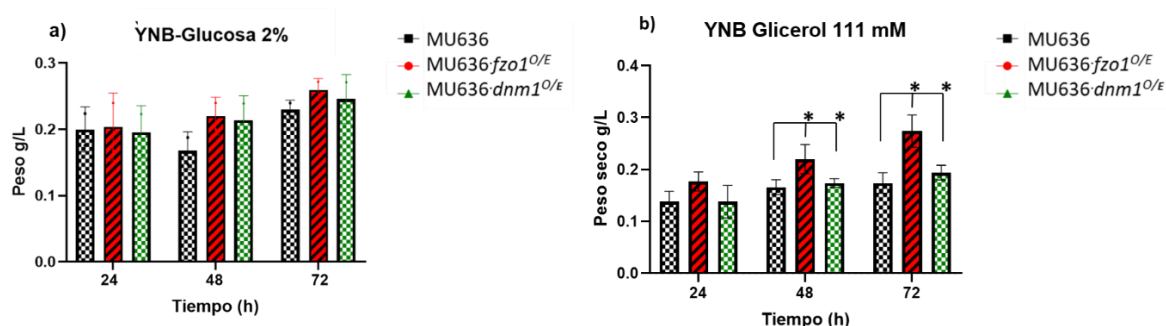


Figura 13. Generación de biomasa de las cepas sobrepresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}) en presencia de distintas fuentes de carbono. a) En medio YNB líquido adicionado con glucosa al 2% se inocularon 5×10^5 por mL de medio de esporas de la cepa silvestre y de las cepas sobrepresantes, se dejaron germinar durante 24, 48 y 72 horas en agitación a 150 rpm a 28°C. b) En medio YNB líquido adicionado con glicerol 111 mM se inocularon 5×10^5 por mL de medio de esporas de la cepa silvestre y de las cepas sobrepresantes, se dejaron germinar durante 24, 48 y 72 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.2 Implicación de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial de *M. lusitanicus* en la germinación a baja concentración de oxígeno.

Se ha observado que el crecimiento de *M. lusitanicus* en condiciones de niveles bajos de oxígeno (4.9-7.5% de O₂) puede desarrollar las morfologías de hifas y levaduras de forma simultánea (Valle-Maldonado y col., 2020; Patiño-Medina y Col., 2023). Por otra parte, se ha observado que las cepas que son poco virulentas tienden a generar un mayor porcentaje de levaduras, mientras que las cepas que

son más virulentas desarrollan un mayor porcentaje de hifas (Valle-Maldonado y col., 2020). Con el objetivo de evaluar el crecimiento a niveles bajos de oxígeno de las cepas que sobreexpresan a los genes *fzo1* y *dnm1*, se realizaron ensayos de germinación a dos distintas concentraciones de O₂. Para ello, se inocularon matraces con 5x10⁵ esporas por mL en medio YPG-2%, los cuales se incubaron en agitación a 40 rpm (4.9 ± 0.45% O₂) y 50 rpm (7.3 ± 0.56% de O₂). Durante la germinación a 4.9 ± 0.45% de O₂ (40 rpm) la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} generó un mayor porcentaje de hifas (75% de hifas y 25% de levaduras) con respecto a la cepa WT (40% hifas y 60% de levaduras), a diferencia de la cepa MU636-*dnm1*^{O/E} la cual produjo un porcentaje similar de hifas y levaduras similar a la cepa WT. Sin embargo, al evaluar la germinación a una concentración de 7.3 ± 0.56% de O₂ (50 rpm) no se observó una diferencia significativa entre las distintas cepas en su tipo de morfología generada (Fig. 14).

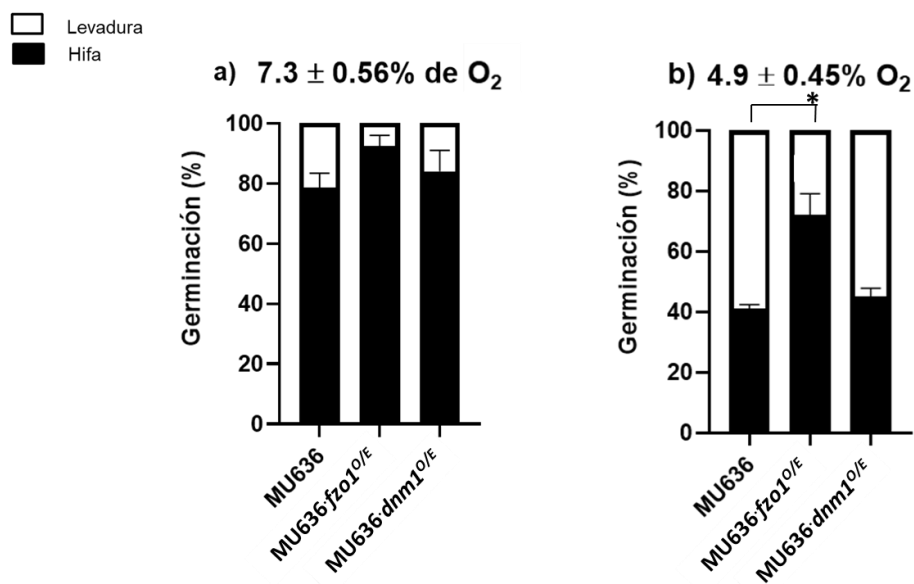


Figura 14. Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno las cepas sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dmn1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}). a) En medio YPG-2% se inocularon 5x10⁵ esporas por mL de medio de la cepa WT y de las cepas sobreexpresantes, se dejaron germinar durante 6 horas en agitación a 50 rpm a 28 °C. b) En medio YPG-2% de glucosa se inocularon 5x10⁵ por mililitro de medio de esporas de la cepa WT y de las

cepas sobreexpresantes, se dejaron germinar durante 6 horas en agitación a 40 rpm a 28 °C. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

A pesar de que estadísticamente no se mostró una diferencia significativa en el porcentaje de desarrollo de hifas y levaduras entre las cepas MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}, respecto a la cepa WT, cuando estas se germinaron a una concentración de $7.3 \pm 0.56\%$ de O₂ (50 rpm); se procedió a evaluar la longitud de las hifas generadas para determinar una posible diferencia en este parámetro. Para ello, se utilizó el programa Q-capture para realizar la toma de las fotografías correspondientes y se determinó la longitud de un total de 100 hifas de cada cepa. Se graficó la longitud y se seleccionaron fotos representativas de cada cepa. Se observó una longitud mayor, de hasta 3 veces, de las hifas de la cepa MU636-*fzo1*^{O/E}, respecto a aquellas de la cepa WT. En cambio, no se observó una diferencia significativa en la longitud de las hifas de la cepa MU636-*dnm1*^{O/E} con respecto a la cepa WT (Fig. 15). Fotografías representativas de la germinación a una concentración de $4.9 \pm 0.45\%$ de O₂, reveló que la sobreexpresión del gen *fzo1* favorecía la longitud de las hifas, siendo estas más largas con respecto a las hifas de la cepa WT (Fig.16).

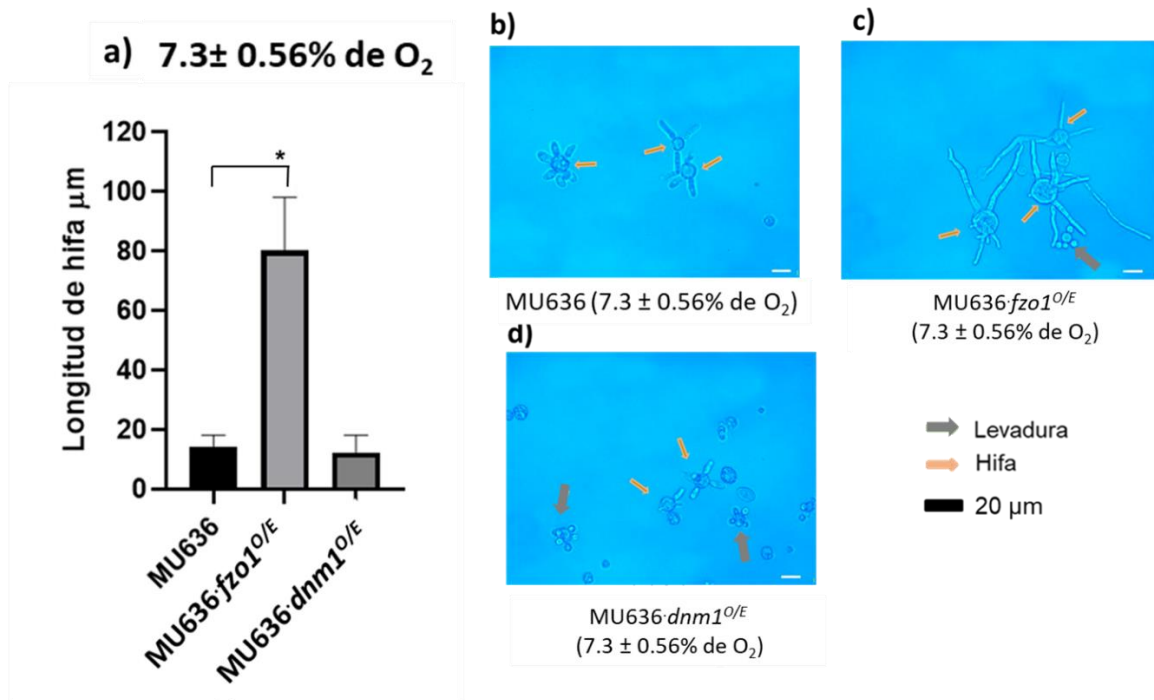


Figura 15. Evaluación de la longitud de las hifas de las cepas sobrexpresantes en los genes Fzo1 y Dnm1 (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}) germinadas a una concentración de $7.3 \pm 0.56\%$ de O_2 . a) Germinación en medio líquido YPG incubado a 28 °C a 50 rpm ($7.3 \pm 0.56\%$ de O_2). Foto representativas correspondientes a la cepa b) WT; c) de la cepa MU636-*fzo1*^{O/E}; y d) de la cepa sobrexpresante MU636-*dnm1*^{O/E}. Barra de referencia= 20 μm . Se muestran los valores promedios de la medición en 50 hifas. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, * $p < 0.05$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

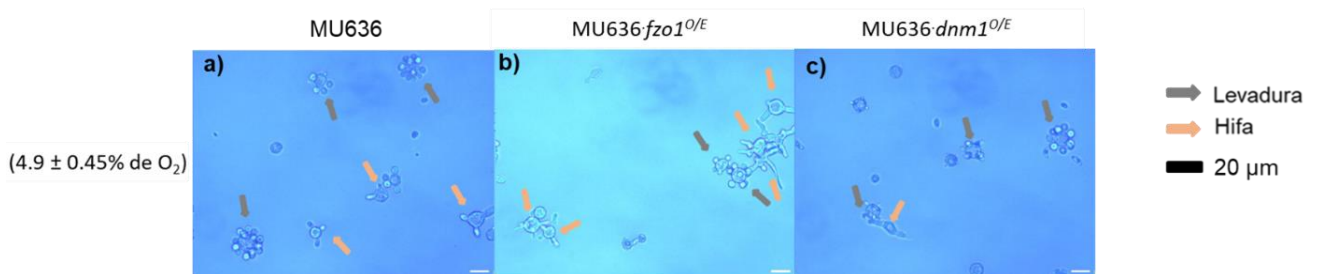


Figura 16. Morfología de las cepas sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dmn1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dmn1*^{O/E}) germinadas a una concentración de $4.9 \pm 0.45\%$ de O₂. Fotos representativas de la cepa a) WT; b) de la cepa MU636-*fzo1*^{O/E}; y c) de la cepa MU636-*dmn1*^{O/E}. Barra de referencia= 20 μ m.

Estos resultados sugieren que la proteína Fzo1 estaría posiblemente aumentando el metabolismo oxidativo mitocondrial, favoreciendo el desarrollo de hifas aun en concentraciones bajas de oxígeno.

7.3 Participación de los elementos de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en el consumo de oxígeno de *M. lusitanicus*

Con la finalidad de buscar la relación entre las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial con la tasa de consumo de O₂ de *M. lusitanicus*, se utilizaron las cepas MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dmn1*^{O/E}. Este parámetro fue evaluado posterior a la germinación de las cepas en los medios de YPG-2%, YPG-6% y YNB-0.1%. En todos los medios ensayados se observó que la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} mostró un consumo mayor de O₂ con respecto a la cepa WT. Por el contrario, la cepa MU636-*dmn1*^{O/E} mostró una tasa de consumo de O₂ disminuida respecto a la cepa WT (Fig.17). Estos resultados sugieren que podría existir un vínculo entre una mayor velocidad de germinación, aumento en capacidad de generar hifas a bajas concentraciones de O₂ y una mayor tasa de respiración cuando se sobreexpresa el gen de fusión mitocondrial, *fzo1*, posiblemente mediante el aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial. Por el contrario, al evaluar a la cepa que sobreexpresa al gen *dmn1*, cuyo producto está asociado a la fisión mitocondrial, se observó un crecimiento similar al de la cepa WT, es decir un aumento en el crecimiento levaduriforme en concentraciones bajas de O₂ y una tasa de respiración menor con respecto a la cepa WT, lo que sugiere que la sobreexpresión de *dmn1* estaría conduciendo a una menor actividad mitocondrial favoreciendo probablemente al metabolismo fermentativo.

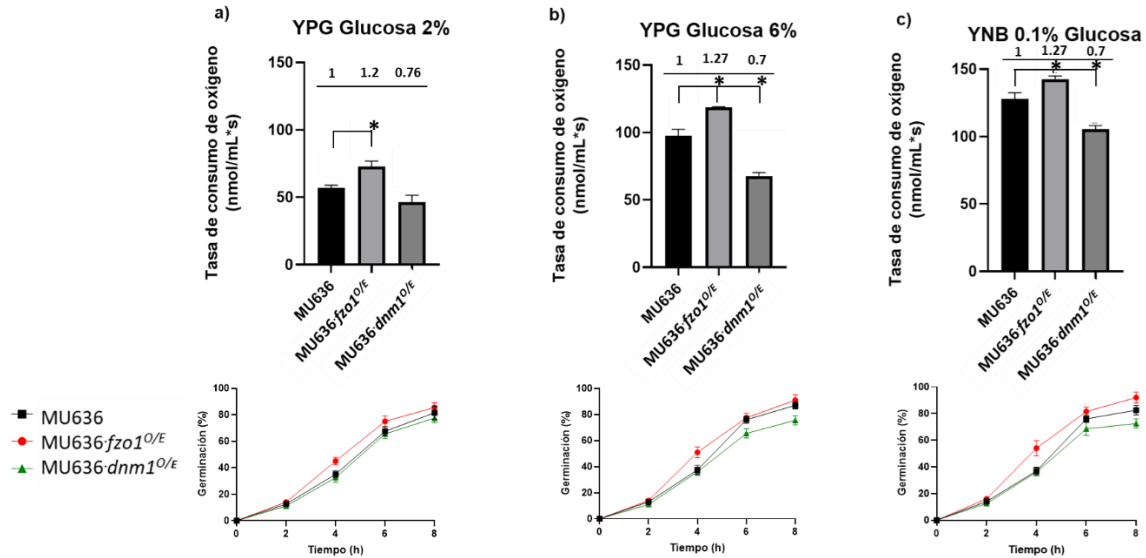


Figura 17. Tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobrepresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* (MU636-*fzo1*^{OE} y MU636-*dnm1*^{OE}). Las esporas de las distintas cepas se germinaron en aerobiosis en medio a) YPG-2% glucosa, b) YPG-6% y c) YNB-0.1% por 3 horas. A la cepa WT se le asignó un valor arbitrario de 1 en todos los casos. Las gráficas en líneas representan los porcentajes de germinaciones los distintos medios. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.4 Participación de las proteínas involucradas en la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en la producción del radical OH⁻ en *M. lusitanicus*.

Se midió la producción del radical OH⁻ utilizando el micelio de 3 horas generado en aerobiosis de las cepas WT, MU636-*fzo1*^{OE} y MU636-*dnm1*^{OE} en medio YNB-0.1%. Se observó que la cepa MU636-*fzo1*^{OE} tuvo una producción más alta de niveles de OH⁻ con respecto a la cepa WT. Por el contrario, la cepa MU636-*dnm1*^{OE} tuvo una menor generación del radical OH⁻. Lo que sugiere que la sobreexpresión de *fzo1* conduce a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) con respecto a la WT, lo que podría indicar una mayor actividad

mitocondrial, siendo todo lo contrario en la cepa que sobreexpresa a *dnm1* (Fig. 18).

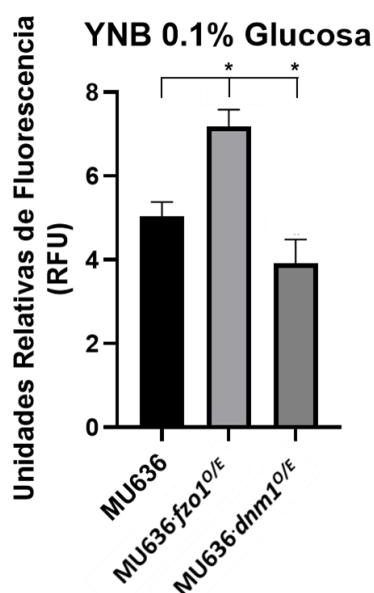


Figura 18. Tasa de generación de ROS en las cepas sobreexpresantes MU636-*fzo1*^{OE} y MU636-*dnm1*^{OE}. Las esporas de las cepas WT, MU636-*fzo1*^{OE} y MU636-*dnm1*^{OE} fueron germinadas en medio YNB-0.1% durante tres horas en agitación a 150 rpm a 28°C. Se muestra la tasa de generación de OH⁻ medido a través de unidades relativas de fluorescencia. n=4. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.5 Función de los elementos de la fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) sobre la toxicidad de los sobrenadantes de *M. lusitanicus*

Con la finalidad de evaluar si la sobreexpresión de los genes involucrados en la inducción de la fusión o fisión mitocondrial tendrían una implicación sobre la toxicidad del hongo, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células (SS) post-germinación de 48 horas de cada una de las cepas en dos condiciones diferentes. En la primer condición las cepas fueron crecidas en medio mínimo YNB-0.1%,

este medio favorece un metabolismo oxidativo mitocondrial; en la segunda condición las cepas fueron crecidas en YPG-6% (medio que favorece un metabolismo fermentativo). Una vez que se obtuvieron los SS tanto de la cepa WT y de las cepas sobreexpresantes MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E} en los dos medios descritos, se retaron contra nematodos de *C. elegans*. Los SS obtenidos a partir del medio YNB-0.1% de la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} y la cepa WT disminuyeron en un 60% el nivel de sobrevivencia de la población de los nematodos. Por otro lado, el SS de la cepa MU636-*dnm1*^{O/E} a pesar de ser obtenido de un medio que favorece el metabolismo oxidativo mitocondrial, disminuyó solamente entre el 5 y 10% de las sobrevivencia de los nematodos. Caso contrario al probar los SS provenientes del medio rico YPG 6% se observó que el SS proveniente de la CEPA WT perdió totalmente su toxicidad, de igual forma que la cepa MU636-*dnm1*^{O/E} ya que ambos SS mostraron 100% de supervivencia de la población de nematodos. Sin embargo, el SS de la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} disminuyó el 20% de la supervivencia de los nematodos, sugiriendo probablemente que el factor toxico estimulado por la sobreexpresión de *fzo1* es reprimido parcialmente por la presencia de altas concentraciones de glucosa, lo que sugiere la participación de la vía PKA en dicho proceso (Fig.19).

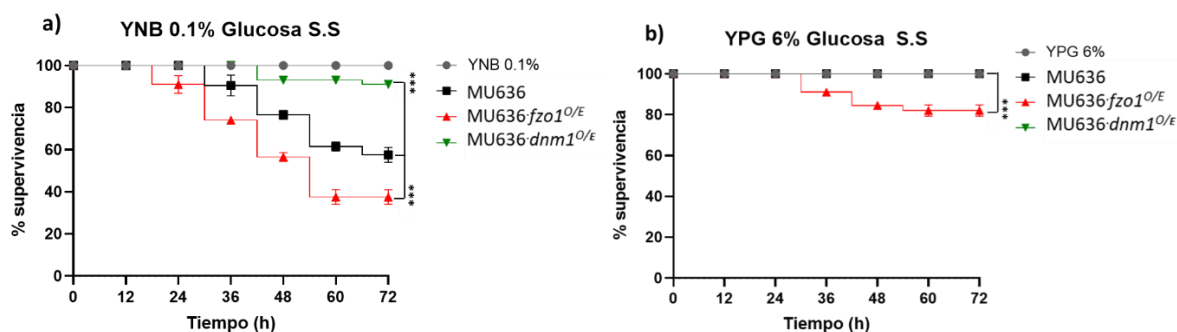


Figura 19. Toxicidad de los SS provenientes de las cepas sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}) generados en medios que favorecen el metabolismo oxidativo y fermentativo. Los SS fueron obtenidos en medio YNB-0.1% y YPG-6% en condiciones aeróbicas de las cepas WT y las cepas sobreexpresantes. a) SS obtenido en medio YNB-0.1%. b) SS

obtenido en medio YPG-6%. 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 *** <p0 .0001

Con el propósito de demostrar que el metabolismo oxidativo mitocondrial está implicado en la toxicidad de *M. lusitanicus*, se generaron los SS post germinación de 48 h de las cepas WT y las cepas MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E} provenientes de medio YNB-0.1% suplementado con cianuro de potasio (KCN) a una concentración subinhibitoria (0.5 mM), condición que permitió el crecimiento hifal, o con el agente quelante de especies reactivas del oxígeno, N-acetilcisteína (NAC), a una concentración de 10 mM y se ensayaron contra el nemátodo *C. elegans*. Se observó que al utilizar el SS obtenido en presencia de KCN, la toxicidad de los correspondientes SS de la cepa WT y la cepa MU636-*fzo1*^{O/E} se observó una disminución de hasta en un 30-40% con respecto a la toxicidad mostrada por el SS proveniente de medio YNB-0.1% (ver figura 18 inciso a). De la misma forma, al evaluar los SS obtenidos en presencia de N-acetilcisteína, se observó para el caso de la cepa WT y la cepa sobrepresante MU636-*fzo1*^{O/E} la toxicidad de sus SS disminuyó entre un 30-40% con respecto al ensayo probado con el SS proveniente del medio YNB 0.1% (ver figura 19 inciso a) (Fig. 20). Sugiriendo que el metabolismo oxidativo mediante la generación de ROS, a través del elemento de fusión mitocondrial, están implicados en la inducción de la toxicidad de los SS de *M. lusitanicus*.

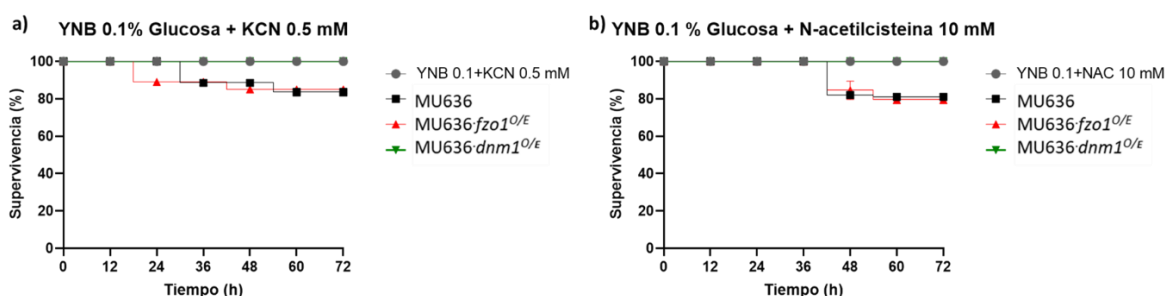


Figura 20. Toxicidad de los SS de las cepas sobrepresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* (MU636-*fzo1*^{O/E} y MU636-*dnm1*^{O/E}) tratados con cianuro de

potasio y N-acetilcisteína. Los SS fueron obtenidos en medio YNB-0.1% adicionados con cianuro de potasio (KCN) o N-acetilcisteína (NAC) en condiciones aerobias de las cepas WT y las cepas sobrepresantes. a) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio mínimo YNB 0.1% adicionado con KCN al 0.5 mM. b) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio mínimo YNB 0.1% adicionado con NAC al 10 mM. 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 *** <p0 .0001

7.6 Corroboración de las mutaciones en los genes *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4* en *M. lusitanicus* mediante RT-qPCR.

Con el objetivo de corroborar que no existe expresión de los genes *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3* y *pkaR4* en las mutantes sencillas $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$, $\Delta pkaR3$ y $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ se realizaron ensayos RT-qPCR. Para ello se utilizó el micelio de 15 horas, se hizo extracción de ARN total siguiendo el protocolo reportado por (Valle-Maldonado y col., 2015) de cada una de las mutantes, así como de la cepa WT, usaron las sondas específicas a cada uno de los genes en dichos ensayos.

Los resultados mostraron la no expresión de los genes *pkaR1*, *pkaR2*, *pkaR3* en las mutantes $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$, $\Delta pkaR3$. En cambio, para la mutante $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ se observó una disminución en la expresión del gen *pkaR4* de casi el 99%, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente debido a que la mutación en *pkaR4* es de tipo heterocarionte (Fig.21j).

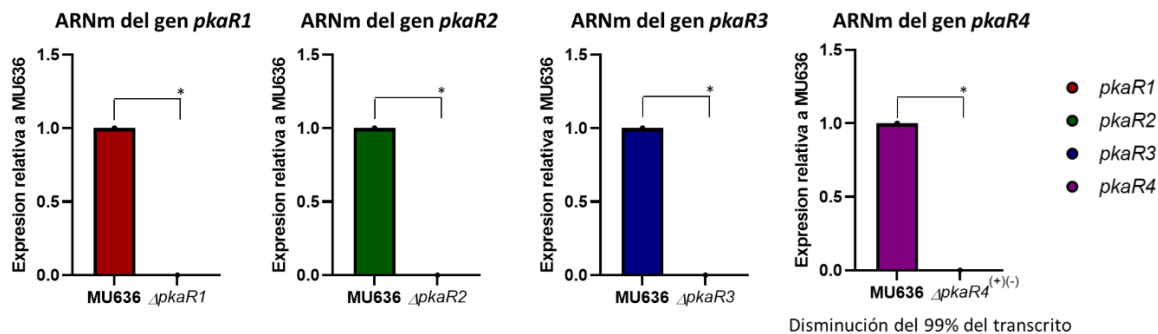


Figura 21. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *pkaR* en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$, $\Delta pkaR3$ y $\Delta pkaR4^{(+/-)}$ de *M. lusitanicus*. Para la cepa WT se observó expresión de los cuatro genes *pkaR* evaluados; Para el caso de la mutantes $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR2$ y $\Delta pkaR3$ no se observó expresión de los genes correspondientes. En el caso de la mutante $\Delta pkaR4^{(+/-)}$ se observó una disminución en la expresión del gen $pkaR4^{(+/-)}$ debido a que es una mutación heterocarionte. Se realizó análisis de tipo $\Delta\Delta ct$ para comparar los niveles de transcrito. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, $*p < 0.05$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.7 Efecto de la mutación de los genes que codifican a las subunidades regulatorias de la PKA ($\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4$) en el crecimiento de *M. lusitanicus* en fuentes de carbono no fermentables.

Con la finalidad de conocer el funcionamiento del metabolismo oxidativo mitocondrial en cada una de las mutantes $\Delta pkaR$, se procedió a evaluar la germinación en dos condiciones diferentes. En primer lugar, en medio mínimo YNB líquido adicionado con una fuente de carbono fermentable (2%, equivalente a 111 mM de glucosa) YNB-2% y en segundo lugar YNB adicionado con una fuente de carbono no fermentable (111 mM de glicerol) YNG. Se observó que la mutante

ΔpkaR1 presentó una germinación disminuida a las cuatro, seis y ocho horas con respecto a los valores de la cepa WT y el resto de las mutantes, lo que podría sugerir un metabolismo oxidativo mitocondrial disminuido debido a la menor capacidad de germinar en glicerol en *ΔpkaR1*. Por el contrario, la cepa *ΔpkaR3* mostró un mayor porcentaje de germinación a partir de las seis horas con respecto a la cepa WT en presencia de una fuente de carbono no fermentable, sugiriendo un aumento de su metabolismo oxidativo. Las cepas mutantes *ΔpkaR2* y *ΔpkaR4*⁽⁺⁾⁽⁻⁾ no mostraron diferencia con respecto a la cepa WT en ambas condiciones (Fig.22).

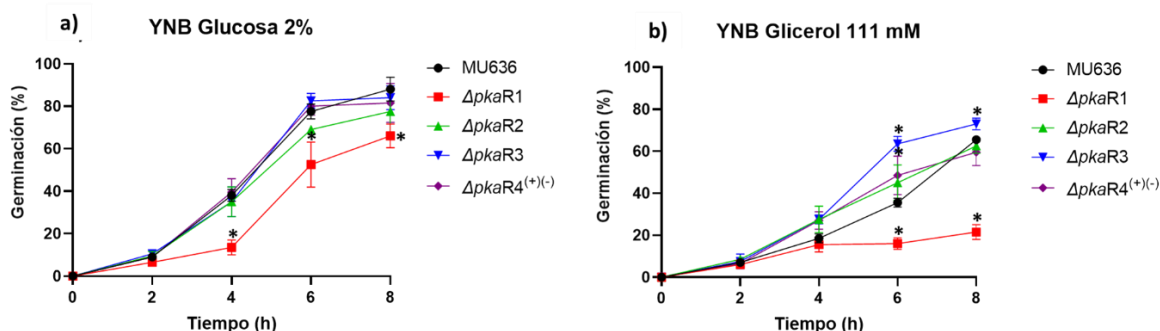


Figura 22. Porcentaje de germinación de las cepas mutantes en los genes *pkaR* en presencia de distintas fuentes de carbono. a) En medio YNB-2% se inocularon 5×10^5 de esporas por mL de la cepa WT y de las cepas mutantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. b) En medio YNB con glicerol 111 mM se inocularon 5×10^5 por mL de esporas de la cepa silvestre y de las cepas mutantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

Dado que los resultados de la germinación en YNB suplementado con glicerol 111 mM (YNG) mostraron una diferencia entre las mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ con respecto a la WT; se decidió evaluar la generación de biomasa de estas dos cepas mutantes. Para ello la cepa WT y las cepas $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ fueron crecidas en los medios YNB-2% y YNG. La cantidad de biomasa generada en YNB-2% no mostró una diferencia significativa entre las cepas mutantes y la cepa WT. Sin embargo, al evaluar la biomasa generada en el medio YNG, la cepa $\Delta pkaR1$ generó una menor generación de biomasa respecto a la cepa WT, sugiriendo que el metabolismo oxidativo mitocondrial podría estar disminuido en dicha cepa. Por otro lado, se observó que la cepa $\Delta pkaR3$ presentó una mayor generación de biomasa respecto a la cepa WT, sugiriendo que el metabolismo oxidativo mitocondrial en esta cepa se encuentra aumentado (Fig. 23).

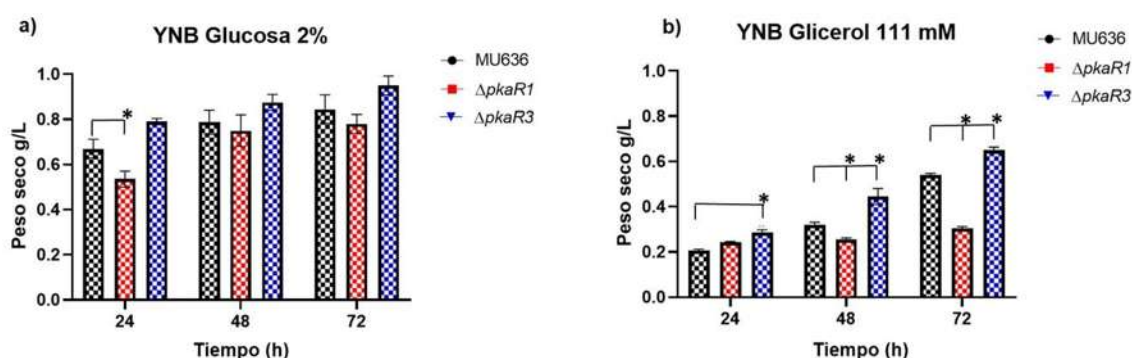


Figura 23. Generación de biomasa de las cepas mutantes en los genes *pkaR1* y *pkaR3* en presencia de distintas fuentes de carbono. A) Germinación en medio YNB líquido adicionado con glucosa al 2% (YNG-2%) con esporas de la cepa WT y de las cepas mutantes, durante 24, 48 y 72 horas. B) Germinación en medio YNB líquido adicionado con glicerol 111 mM con esporas de la cepa WT y de las cepas mutantes durante 24, 48 y 72 horas. N=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.8 Participación de las subunidades regulatorias 1 y 3 de la PKA de *M. lusitanicus* en la germinación a baja concentración de oxígeno

Con el objetivo de evaluar el crecimiento a bajos niveles de oxígeno de las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ se realizaron dos ensayos de germinación a dos distintas concentraciones de O_2 . Para ello, se inocularon esporas en medio YPG-2%, las cuales se incubaron en agitación a 40 rpm ($4.9 \pm 0.45\%$ O_2) y 50 rpm ($7.3 \pm 0.56\%$ de O_2) durante seis horas. Al evaluar la germinación a $4.9 \pm 0.45\%$ de O_2 , se observó que la cepa $\Delta pkaR1$ generó un ligero aumento del porcentaje de levaduras (70% de levaduras y 30% de hifas) con respecto a la WT (60% de levaduras y 40% hifas) mientras que la cepa $\Delta pkaR3$ produjo un porcentaje de 30% de levaduras Y 70% de hifas. Sin embargo, al evaluar la germinación a una concentración de $7.3 \pm 0.56\%$ de O_2 observamos que la cepa $\Delta pkaR1$ mostró nuevamente un crecimiento levaduriforme del 40% y 60% de hifas, mientras que la cepa WT genero 20% de levaduras y 80% de hifas, mientras que la cepa $\Delta pkaR3$ no mostró una diferencia significativa con respecto a la cepa WT (Fig. 24).

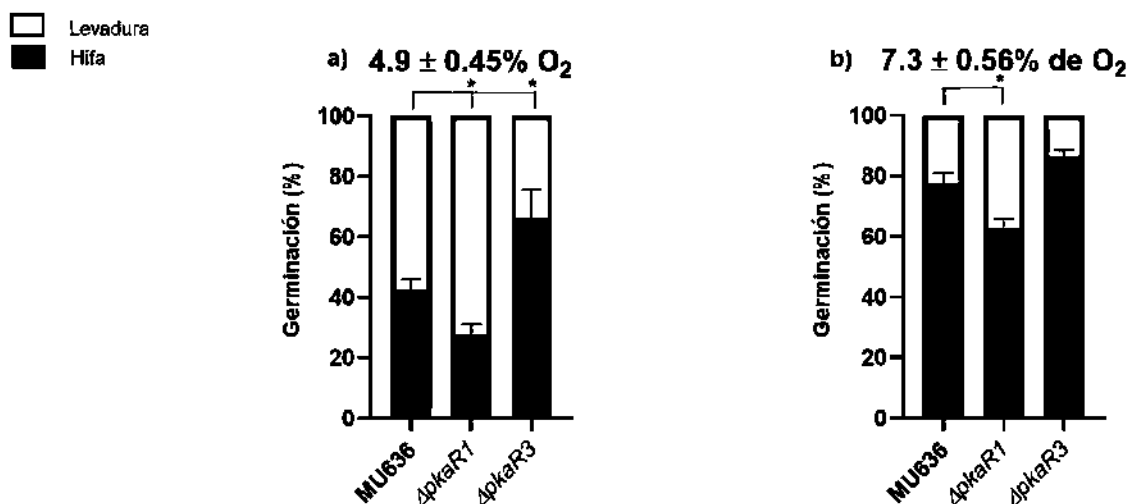


Figura 24. Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$. a) En medio YPG liquido al 2% de glucosa se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio de la cepa WT y de las cepas mutantes, se dejaron germinar durante 6 horas en agitación a 50 rpm ($7.3 \pm 0.56\%$ O_2) a $28^\circ C$ o b) en agitación a 40 rpm ($4.9 \pm 0.45\%$ de O_2) a $28^\circ C$. $n=3$. Se

muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, * $p < 0.05$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

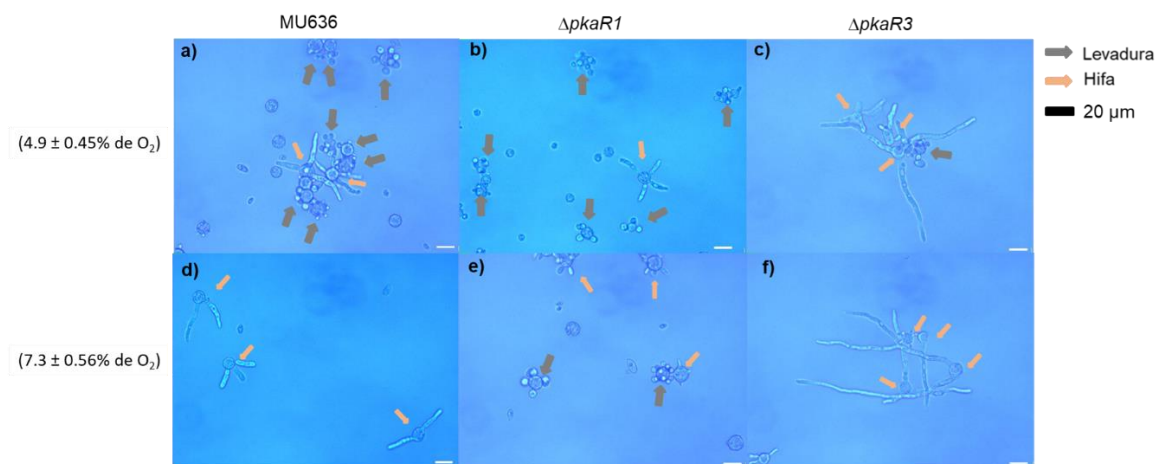


Figura 25. Fotografías representativas del crecimiento de las mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ a baja concentración de O_2 . Los paneles superiores corresponden a la germinación de $4.9 \pm 0.45\%$ de (inciso a, b y c corresponden a las cepas WT, $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ respectivamente). Los paneles inferiores corresponden a la germinación de 7.3% de O_2 (Inciso d, e y f corresponden a la cepa WT, $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ respectivamente). Barra de referencia= $20 \mu m$.

7.9 implicación de las subunidades regulatorias de la PKA en el consumo de oxígeno de *M. lusitanicus*

Con el propósito de conocer la participación de las subunidades regulatorias de la PKA en la tasa de consumo de O_2 , se utilizaron a las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ y a la WT. Se evaluó la tasa de consumo de O_2 en la germinación de las distintas cepas en el medio YPG-2%, YPG-6% y YNB-0.1%. Se observó que la cepa $\Delta pkaR1$ en los tres medios mostró una tasa de consumo de O_2 menor con respecto a la cepa WT, siendo 0.5 veces menor en YPG-2%, 0.4 veces menor en YPG-6% y 0.7 veces menos en YNB-0.1%. por el contrario, respecto a la cepa WT, la cepa $\Delta pkaR3$ mostró una tasa mayor de consumo de O_2 en todos los

medios ensayados, siendo 0.6 veces mayor en YPG-2%, 0.3% más en YPG-6% y 0.2 más en YNB 0.1% (Fig. 26). Estos resultados sugieren que la cepa $\Delta pkaR1$ muestra una correlación entre la disminución en la germinación y generación de biomasa en una fuente de carbono no fermentable, y una germinación levaduriforme a bajas concentraciones de O_2 con una tasa de respiración más baja. En el caso de la cepa $\Delta pkaR3$ se presenta un escenario totalmente opuesto.

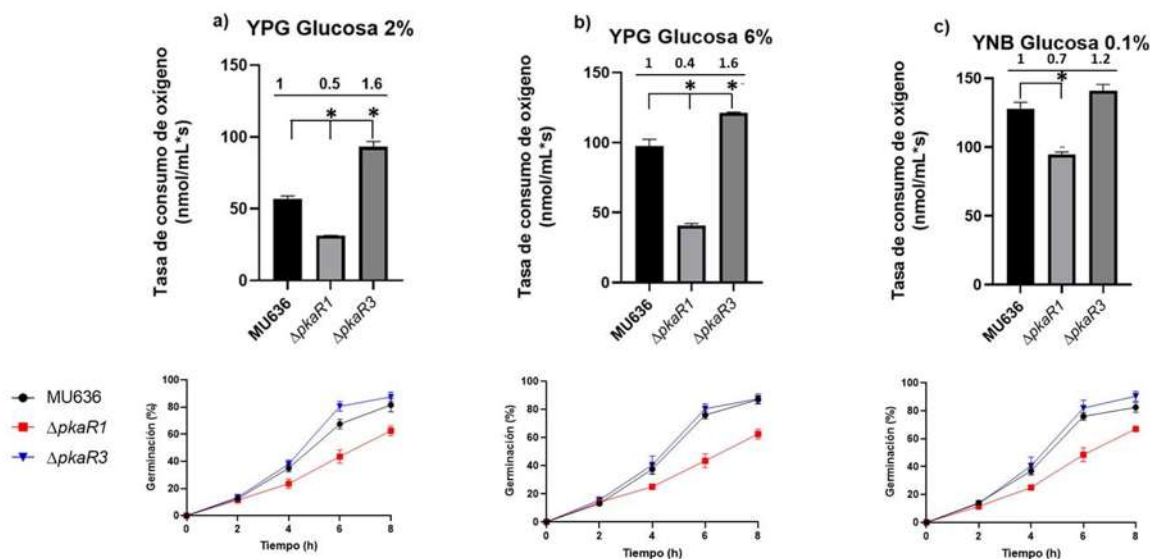


Figura 26. Tasa de consumo de oxígeno en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$. Se inocularon esporas de cada cepa en cada uno de los medios. Para los medios A) YPG-2% y B) YPG-6% la germinación duró 3 horas a 150 rpm y para el medio C) YNB 0.1% la germinación fue por un lapso de 4 horas a 150 rpm. Para la cepa WT se asignó un valor arbitrario de 1. Los gráficos en líneas en la parte inferior muestran la germinación de las distintas cepas en los medios respectivos. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.10 Participación de las subunidades regulatorias de la PKA en la producción del radical OH⁻

Se midió la producción del radical OH⁻ utilizando micelio de 3 horas generado en medio YNB-0.1% posterior a tres horas de crecimiento de las cepas WT, $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$. Se observó que la cepa $\Delta pkaR1$ tuvo una producción más baja de OH⁻ con respecto a la cepa WT. Por el contrario, observamos que la cepa $\Delta pkaR3$ tuvo una mayor generación del radical OH⁻. Lo que sugiere que la mutación en *pkaR1* genera una menor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) con respecto a la cepa WT lo que podría indicar una menor actividad mitocondrial. caso contrario en la cepa $\Delta pkaR3$, quien mostró una mayor cantidad de OH⁻ con respecto a la cepa WT, sugiriendo una mayor producción de producción de ROS y por lo tanto una mayor actividad mitocondrial (Fig. 27).

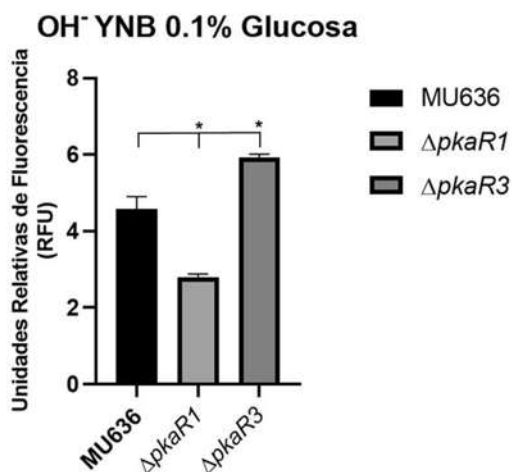


Figura 27. Tasa de generación de ROS en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$. Las esporas de las cepas WT, $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ fueron germinadas en medio YNB-0.1% durante tres horas en agitación a 150 rpm a 28°C. Se muestra la tasa de generación de OH⁻ medido a través de unidades relativas de fluorescencia. n=4. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.11 Papel de las subunidades regulatorias de la PKA en la toxicidad de los sobrenadantes de *M. lusitanicus*

Con el propósito de evaluar la función que desempeñan las subunidades regulatorias de la PKA en la toxicidad de los SS de *M. lusitanicus*, estos SS se generaron después de un crecimiento en aerobiosis de 48 horas de cada una de las cepas en dos medios de cultivos diferentes: YNB-0.1% para favorecer el metabolismo oxidativo mitocondrial y en YPG-6%, para promover al metabolismo fermentativo. Una vez que se obtuvieron los SS estos fueron retados contra nematodos de *C. elegans* para evaluar su supervivencia. Se demostró que los SS provenientes de YNB-0.1% de las cepas $\Delta pkaR3$ y WT generaron un porcentaje del 50-60% de supervivencia de la población de nematodos. Por otro lado, el SS de la cepa $\Delta pkaR1$ no mostró ser toxico para la población de nematodos con un porcentaje de supervivencia del 100% tal como ha sido reportado previamente. Por otro lado, al probar los SS provenientes del medio YPG-6% se observó que la cepa WT perdió totalmente su toxicidad tal como se observó en el resultado de toxicidad anterior, de igual forma que la cepa mutante $\Delta pkaR1$. Sin embargo, el SS de la cepa $\Delta pkaR3$ mostró una toxicidad disminuida generando un 70% de supervivencia del nematodo (Fig. 28).

Estos resultados sugieren que la mutación en la subunidad regulatoria PkaR1 disminuye la toxicidad de sus SS, ya que a pesar de obtener un SS proveniente de un medio que favorece al metabolismo oxidativo mitocondrial (YNB-0.1%) este no mostró ser letal contra los nematodos, además este fenotipo no toxico correlaciona con una tasa baja de respiración que se mostró anteriormente. Por el contrario, el SS de la cepa mutante $\Delta pkaR3$ proveniente de un medio que favorece al metabolismo fermentativo mostró una toxicidad parcial, generando la muerte solo del 30% (vs el 70% en condiciones de YNB-0.1%) de la población total de nematodos, lo que correlaciona con la tasa elevada de respiración con respecto a la WT.

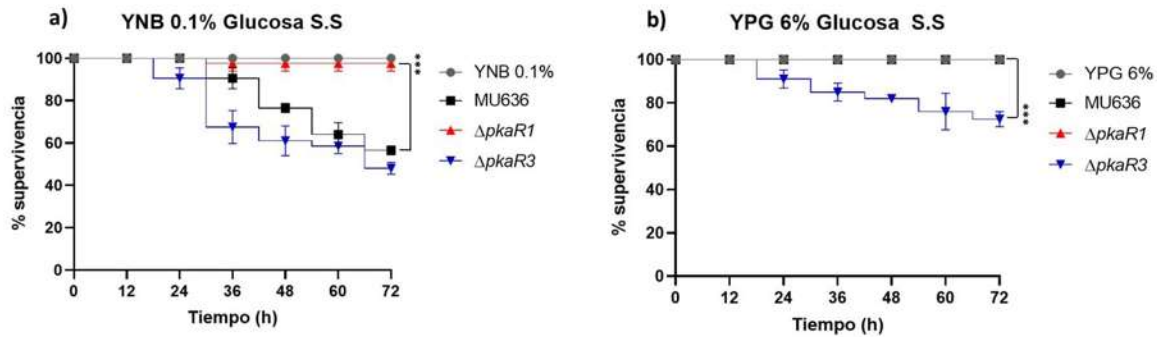


Figura 28. Papel de las subunidades regulatorias PkaR1 y PkaR3 en la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*. Los SS fueron obtenidos en medio YNB-0.1% y YPG-6% en condiciones aeróbicas de las cepas WT y de las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$. a) Ensayo de toxicidad del SS provenientes de medio mínimo YNB- 0.1% de glucosa. b) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio rico YPG-6% de glucosa. 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 *** <p0 .0001.

Con el objetivo de evaluar la implicación del metabolismo oxidativo en las subunidades regulatorias de las PKA y su participación en la toxicidad de *M. lusitanicus* se generaron los SS de las cepas WT, y las mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$ provenientes de medio YNB-0.1% adicionado con cianuro de potasio a una concentración subinhibitoria (0.5 mM) y también proveniente de medio YNB 0.1% adicionado con N-acetilcisteína 10 mM. Los SS de la cepa WT y de la cepa $\Delta pkaR3$ generados en presencia de KCN mostraron una disminución significativa en su toxicidad comparada contra la toxicidad mostrada en los SS provenientes de YNB-0.1% (ver Figura 28a). De la misma forma, al evaluar los SS provenientes del medio YNB-0.1% adicionado con N-acetilcisteína, se observó que los SS de las cepas WT y el de la cepa $\Delta pkaR3$ mostraron una disminución en su toxicidad de aproximadamente el 30-40% comparado contra los sobrenadantes provenientes del medio YNB 0.1% (ver Figura 27a), sugiriendo la importancia de PkaR1 Y

PkaR3 en el adecuado funcionamiento del metabolismo oxidativo mitocondrial y su correlación con la toxicidad de *M. lusitanicus* (Fig. 29).

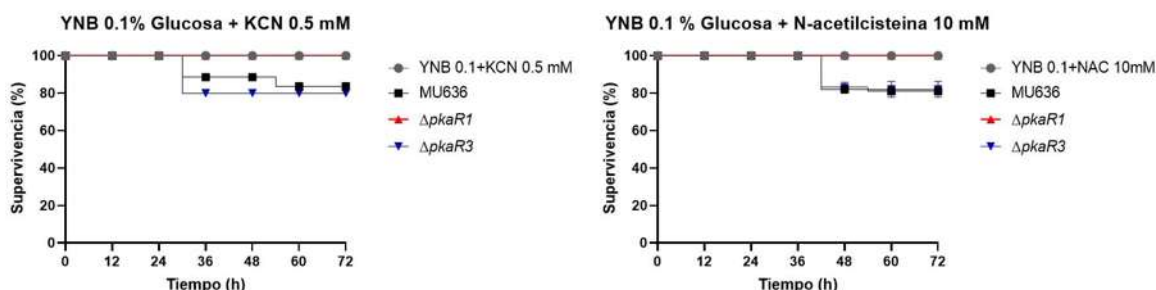


Figura 29. Papel del metabolismo oxidativo mitocondrial a través de las subunidades regulatorias PkaR1 y PkaR3 en la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*. Los SS fueron obtenidos en medio YNB-0.1% adicionados con cianuro de potasio (KCN) o N-acetilcisteína (NAC) en condiciones aerobias de las cepas WT y las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ y $\Delta pkaR3$, a) Ensayo de toxicidad del SS provenientes de medio YNB 0.1% adicionado con KCN 0.5 mM. b) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio YNB 0.1% adicionado con N-acetilcisteína 10 mM. 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 *** <p0 .0001.

7.12 Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en el crecimiento de *M. lusitanicus*

Con el propósito de evaluar la participación de la vía AMPc-PKA sobre los elementos de fusión y fisión mitocondrial y como está implicado en el crecimiento de *M. lusitanicus*, se realizó un ensayo de germinación de ocho horas utilizando medio YNB-2% y medio YNG. Se utilizaron a las cepas WT, $\Delta pkaR1$ y a las cepas $\Delta pkaR1$ sobreexpresando a *fzo1* y *dnm1* ($\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$). Como se había reportado anteriormente (Fig. 22), la cepa mutante $\Delta pkaR1$ mostró, en ambos medios, un porcentaje de germinación menor con respecto a la cepa WT a partir de la hora cuatro. Las cepas $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$

en YNB-2% también mostraron un porcentaje de germinación menor con respecto a la cepa WT (FIG. 30A). Interesantemente, al evaluar la germinación en el medio YNG, la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ mostró un porcentaje de germinación similar a la WT a la hora ocho, sugiriendo que la sobreexpresión de *fzo1* en la mutante $\Delta pkaR1$ estaría reestableciendo parcialmente el fenotipo silvestre lo que podría sugerir que Fzo1 podría estar bajo la regulación de la vía PKA a través de PkaR1 (Fig. 30B)

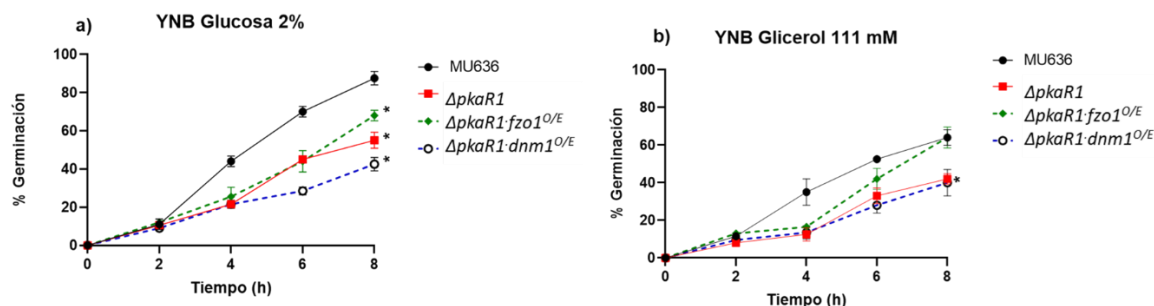


Figura 30. Porcentaje de germinación de las cepas sobreexpresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ en presencia de distintas fuentes de carbono. a) En medio YNB liquido adicionado con glucosa al 2% se inocularon 5×10^5 de esporas por mL de medio de la cepa WT y de las cepas mutantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. b) En medio YNB liquido adicionado con glicerol 111 mM se inocularon 5×10^5 por mL de medio de esporas de la cepa silvestre, la cepa mutante y de las cepas sobreexpresantes, se dejaron germinar durante 8 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se tomaron alícuotas cada 2 horas. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

Además, se analizó la generación de biomasa se utilizó en las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$. Se inocularon las esporas en medio YNB-2% y YNG agitándose a 150 rpm a 28°C durante 24, 48 y 72 horas. La biomasa generada en el medio YNB-2% no mostró diferencia significativa entre la cepa

mutante $\Delta pkaR1$ y las cepas $s\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ con respecto a la WT (FIG. 31A). Sin embargo, al evaluar las biomases provenientes del medio YNG se observó que la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ generó una cantidad similar de biomasa con respecto a la WT (FIG. 31B), sugiriendo que la sobreexpresión del elemento de fusión estaría restaurando parcialmente el fenotipo silvestre en este contexto y que, por lo tanto, Fzo1 estaría regulando por la vía AMPc-PKA a través de PkaR1. Por otro lado, la cepa sobrepresante $\Delta pkaR1 + dnm1^{wt}$ al igual que la cepa mutante sencilla $\Delta pkaR1$ mostraron una generación de biomasa similar, siendo significativamente menor con respecto a la WT.

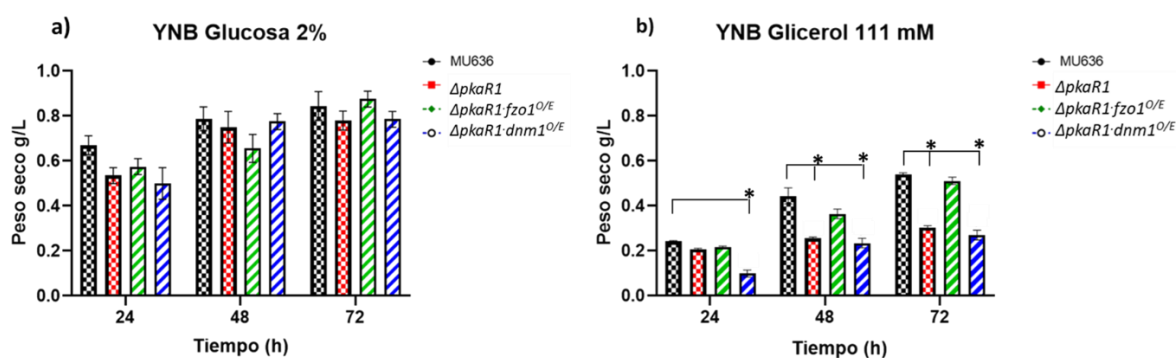


Figura 31. Generación de biomasa de las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ en presencia de distintas fuentes de carbono. Las esporas de la cepa WT y de las cepas sobrepresantes, se dejaron germinar en agitación a 150 rpm a 28°C durante 24, 48 y 72 horas a) En medio YNB líquido adicionado con glucosa al 2% (YNG-2%) o b) En medio YNB líquido adicionado con glicerol 111 mM. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.13 Implicación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial de *M. lusitanicus* en la germinación a baja concentración de oxígeno.

Con el objetivo de evaluar el crecimiento a bajos niveles de O₂ de las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ se realizaron los ensayos correspondientes. Para ello, se inocularon matraces con 5×10^5 esporas/mL en medio rico YPG-2%, los cuales se incubaron en agitación a 40 rpm ($4.9 \pm 0.45\%$ O₂) y 50 rpm ($7.3 \pm 0.56\%$ de O₂) durante seis horas. En ambas condiciones, la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ mostró una germinación aproximadamente del 55 al 60% (FIG. 32A) y 75 al 80% de hifas (FIG. 32B), similar a la WT. Por otro lado, la cepa $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ no mostró diferencia con la cepa mutante $\Delta pkaR1$ teniendo ambas, una mayor producción de levaduras de aproximadamente 20 a 25% (FIG. 32A) y 50 al 55% (FIG. 32B), respecto a la cepa WT. Esto sugiere nuevamente que la proteína Fzo1 podría estar bajo la regulación de PkaR1, ya que la sobreexpresión del gen *fzo1* en el fondo genético mutante $\Delta pkaR1$ restaura el fenotipo silvestre.

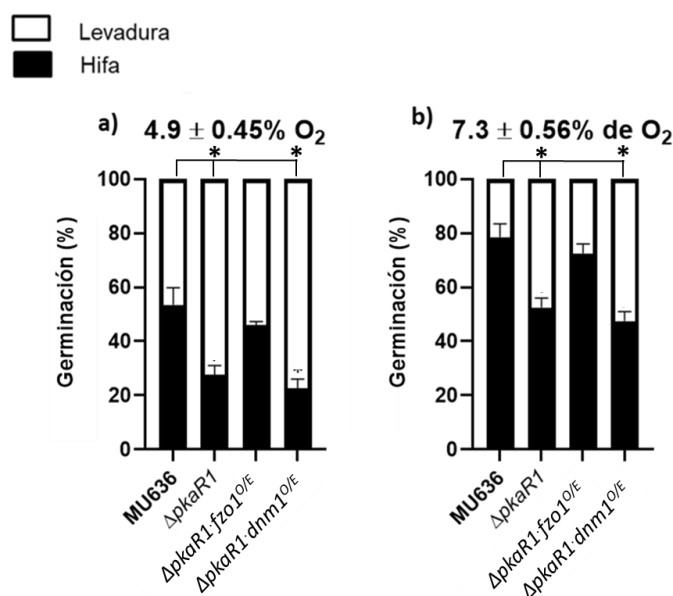


Figura 32. Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$. En medio YPG líquido al 2% de glucosa se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio de la cepa WT y de las

cepas sobrepresantes, se dejaron germinar durante 6 horas a) en agitación a 40 rpm ($4.9 \pm 0.45\%$ O₂) a 28°C. b) en agitación a 50 rpm ($7.3 \pm 0.56\%$ de O₂) a 28°C. n=3. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.14 Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en el consumo de Oxígeno

Con el propósito de evaluar el consumo de O₂ por la vía AMPc-PKA y las proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial. Se evaluó este parámetro en la cepa WT, la cepa $\Delta pkaR1$ y las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ en los medios YPG-2%, YPG-6% y YNB-0.1%. Se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio. La cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{OE}$ mostró una tasa de consumo de oxígeno similar a la cepa WT en los tres medios de cultivo. Caso contrario, la cepa $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{OE}$ mostró una tasa de consumo de O₂ similar a la de la mutante $\Delta pkaR1$, siendo para ambas, una tasa de entre 0.4 a 0.6 veces menor con respecto a la cepa WT (Fig. 33).

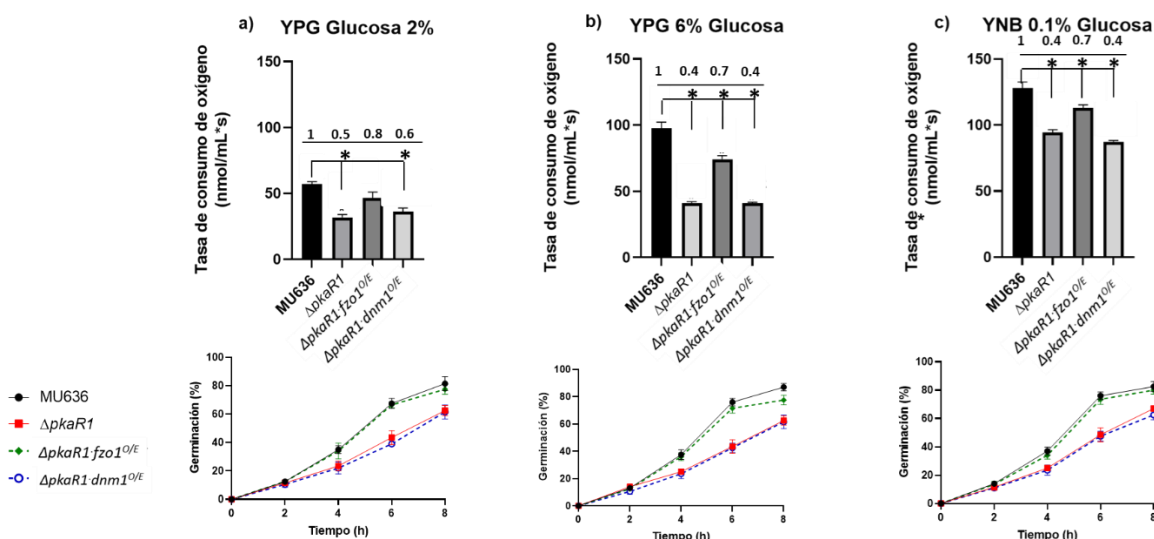


Figura 33. Tasa de consumo de oxígeno en las cepas $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$. Se inocularon las esporas de cada cepa en cada uno de los medios en los medios A) YPG 2% y B) YPG 6% la germinación duró 3 horas a 150 rpm y para el medio C) YNB 0.1% la germinación fue por un lapso de 4 horas a 150 rpm. Para la cepa WT se asignó un valor arbitrario de 1. n=3. Las gráficas en líneas en la parte inferior muestran la germinación correspondiente a cada cepa en cada medio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

7.15 Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en la producción del radical hidroxilo (OH·)

Con la finalidad de evaluar la subunidad regulatoria PkaR1 Y los elementos de la fusión y fisión mitocondrial en la generación del radical OH·, se cuantifico este radical utilizando micelio de 3 horas generado en medio YNB-0.1% de las cepas WT, $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$. La cepa $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ mostró una generación de radicales similar a la cepa WT, caso contrario, la cepa $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$ quien mostró una menor producción del radical c, sugiriendo nuevamente, que la sobreexpresión de *fzo1* en el fondo genético mutante en *pkaR1* estaría rescatando el fenotipo silvestre y que por lo tanto Fzo1 se encuentra bajo la regulación de la vía AMPc-PKA (Fig. 34).

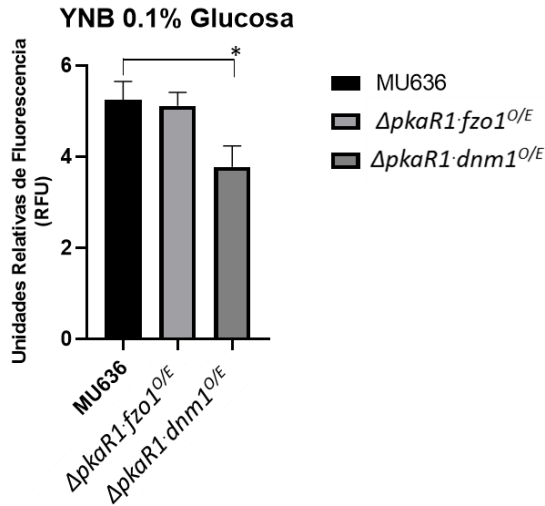


Figura 34. Tasa de generación de ROS en las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$. Las esporas de las cepas WT, $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ fueron germinadas en medio YNB-0.1% durante tres horas en agitación a 150 rpm a 28°C. Se muestra la tasa de generación de $OH\cdot$ medido a través de unidades relativas de fluorescencia. n=4. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, *p<0.05. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas

7.16 Participación de la subunidad reguladora PkaR1 en la fusión y fisión mitocondrial y su implicación en la toxicidad de *M. lusitanicus*

Al observar que la sobreexpresión del gen *fzo1* en $\Delta pkaR1$ restauraba parcialmente el fenotipo silvestre en el contexto de germinación, generación de biomasa y respiración, se probó si también lo haría en el contexto de toxicidad de su SS. Para ello, se obtuvieron los SS de la cepa WT, la cepa $\Delta pkaR1$ y las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ a partir del medio YNB-0.1% y del medio YPG-6%. Al evaluar los SS provenientes del medio YNB-0.1% se observó que la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ mostró una tasa de mortalidad similar a aquel proveniente de la cepa WT, matando aproximadamente al 45-50% de la población de nematodos.

Por otro lado, el SS de la cepa $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$ no mostró toxicidad para los nematodos, mostrando un comportamiento similar al SS de la cepa $\Delta pkaR1$. Interesantemente, los SS provenientes del medio YPG-6% observamos que al igual que la cepa WT, la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ tuvo pérdida de su toxicidad matando solo el 5-10% de la población de nematodos. Estos datos sugieren nuevamente que la sobreexpresión de *fzo1* en la cepa mutante $\Delta pkaR1$ estaría restaurando el fenotipo silvestre indicando que Fzo1 se encuentra bajo la regulación de la vía AMPc-PKA a través de PkaR1 (Fig. 35).

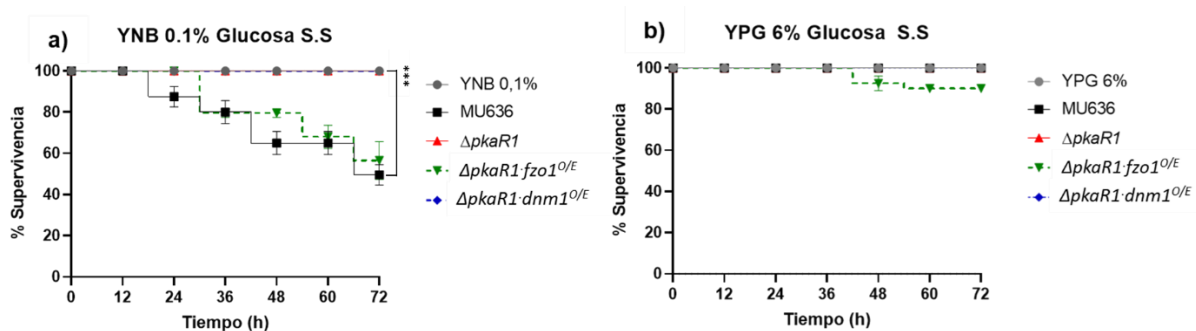


Figura 35. Toxicidad de las cepas $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$. Los SS fueron obtenidos en medio YNB-0.1% y YPG-6% en condiciones aeróbicas de las cepas WT, de la cepa mutante $\Delta pkaR1$ y de las cepas sobreexpresantes $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$. a) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio mínimo YNB-0.1%. b) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio rico YPG-6%. 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 *** <p0 .0001

Finalmente, para evaluar la participación del metabolismo oxidativo en la toxicidad de *M. lusitanicus* a través de la subunidad PkaR1 y el elemento de fusión mitocondrial Fzo1 se generaron los SS de 48 horas de crecimiento provenientes de medio YNB-0.1% adicionados con KCN al 0.5 mM y con N-acetilcisteína 10 mM respectivamente y se evaluaron contra el nematodo *C. elegans*. Los SS provenientes del medio YNB-0.1% obtenido en presencia de KCN 0.5 mM se observó que tanto el SS de la cepa WT y el de la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ mostraron

una pérdida de su toxicidad contra los nematodos en aproximadamente el 40%, comparada con la toxicidad observada en los SS provenientes del medio YNB-0.1% (ver figura 35a). Del mismo modo, al evaluar los SS provenientes del medio YNB-0.1% adicionado con N-acetilcisteína 10 mM se observó una disminución en de las toxicidad de la cepa WT y de la cepa $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ del 30%, aproximadamente (ver figura 35a). Estos datos muestran que la toxicidad generada por Fzo1 en la mutante $\Delta pkaR1$ de *M. lusitanicus* está asociada al metabolismo oxidativo mitocondrial (Fig. 36).

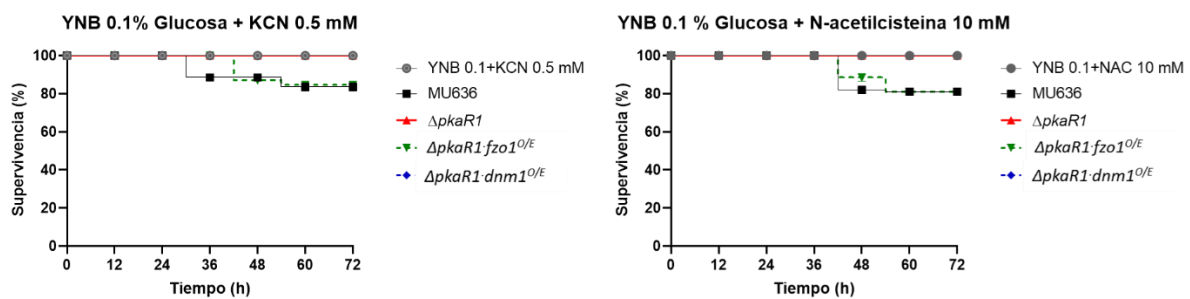


Figura 36. Papel del metabolismo oxidativo mitocondrial a través de subunidad PkaR1 y el elemento de fusión (Fzo1) y fisión (Dnm1) mitocondrial en la toxicidad del SS de *M. lusitanicus*. Se inocularon 5×10^5 por mL de medio de esporas de la cepa WT y de las cepas $\Delta pkaR1$, $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1 \cdot dnm1^{O/E}$, se crecieron durante 48 horas en agitación a 150 rpm a 28°C, se filtraron los sobrenadantes y se probaron contra nematodos *C. elegans*. a) Ensayo de toxicidad del SS provenientes de medio YNB-0.1% adicionado con KCN 0.5 mM. b) Ensayo de toxicidad de SS provenientes de medio YNB-0.1% adicionado con N-acetilcisteína 10 mM. 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 *** <p0 .0001

7.17 Modulación transcripcional de los genes que codifican a las subunidades regulatorias y catalíticas de la PKA

Se analizaron los niveles de transcrito de los genes que codifican a las subunidades regulatorias de la PKA en la cepa WT y en las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ en medio YPG-2%, YPG-6% y YNB-0.1%. En la cepa $\Delta pkaR1$ se observó que la acumulación del RNAm del gen *pkaR4* es mayor en YPG-2%. Sin embargo, al elevar la concentración de glucosa (YPG-6%) también aumento la expresión de los genes *pkaR2* y *pkaR3* al igual que *pkaR4* como se había observado en YPG-2%. En el caso de la mutante $\Delta pkaR2$ se observó un aumento en el transcrito del gen *pkaR1* en los medios de YNB-0.1% y YPG-6%, así como también aumento el RNAm del gen *pkaR3* en el medio YPG-6%, y el gen *pkaR4* aumentó en YPG2-% y en YPG-6%. La mutante $\Delta pkaR3$ acumuló un mayor nivel de RNAm de *pkaR1* en las tres condiciones evaluadas, en cuanto al gen *pkaR2* su transcrito fue mayor en los medios de YNB-0.1% y YPG-6%; mientras que el transcrito del gen *pkaR4* incrementó en YPG-2% y en YPG-6%. Finalmente, en la mutante $\Delta pkaR4^{(+)(-)}$ aumentaron los niveles de RNAm del gen *pkaR1* al igual que *pkaR3* en las tres condiciones evaluadas (Fig. 37). Estos datos sugieren que ante la ausencia de alguno de los genes que codifican para alguna de las subunidades regulatorias, los otros genes se sobreexpresan para compezar la ausencia de la subunidad regulatoria faltante,

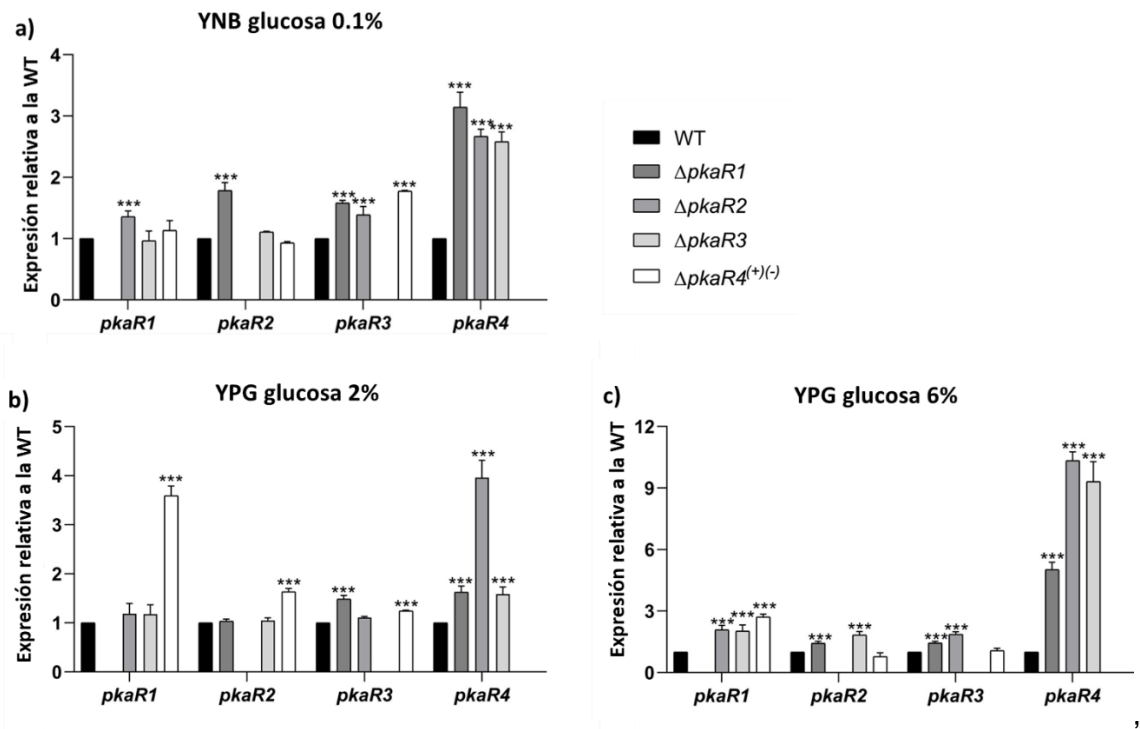


Figura 37. Análisis de expresión de los genes *pkaR* en las cepas WT y en las mutantes $\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$ durante el desarrollo micelial de 6 horas en diferentes condiciones de crecimiento. Se evaluó el nivel de transcrito de los genes *pkaR* mediante RT-qPCR en micelio de 6 horas para medio YPG y YPG 6% y micelio de 12 horas para medio YNB 01% se muestra un análisis de tipo $\Delta\Delta ct$ para las cepas WT y $\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$. N=3 Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, ***p<0.0001.

Posteriormente se evaluó la expresión de los genes que codifican a las diez subunidades catalíticas de la PKA: *pkaC1*-*pkaC10* en las cepas $\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$ con la finalidad de ubicar algún gen candidato que se desregule en las distintas mutantes $\Delta pkaR$. El RNAm de cada uno de los genes fue cuantificado en el micelio generado a partir del crecimiento en los medios YNB-0.1%, YPG-2% y YPG-6%. Se observó que en los tres medios de cultivo evaluados la cepa $\Delta pkaR1$ mostró una mayor acumulación del transcrito de *pkaC5* y *pkaC8*. En el caso de la

cepa $\Delta pkaR3$, está mostró una mayor cantidad de RNAm de $pkaC8$ en altas concentraciones de glucosa (Fig. 38). Este conjunto de resultados sugiere que posiblemente PkaR1 se está uniendo a las subunidades catalíticas PkaC8 y PkaC5. Por otro lado, al aumentar las concentraciones de glucosa, o al crecer en YNB-0.1%, la cepa $\Delta pkaR3$ mostró un aumento en el RNAm de $pkaC8$ (Fig. 38). Lo que sugiere que también la subunidad PkaR3 se une a PkaC8 indicando que tanto PkaR1 y PkaR3 están interactuando con $pkaC8$ y son importantes en la regulación del crecimiento micelial de *M. lusitanicus*.

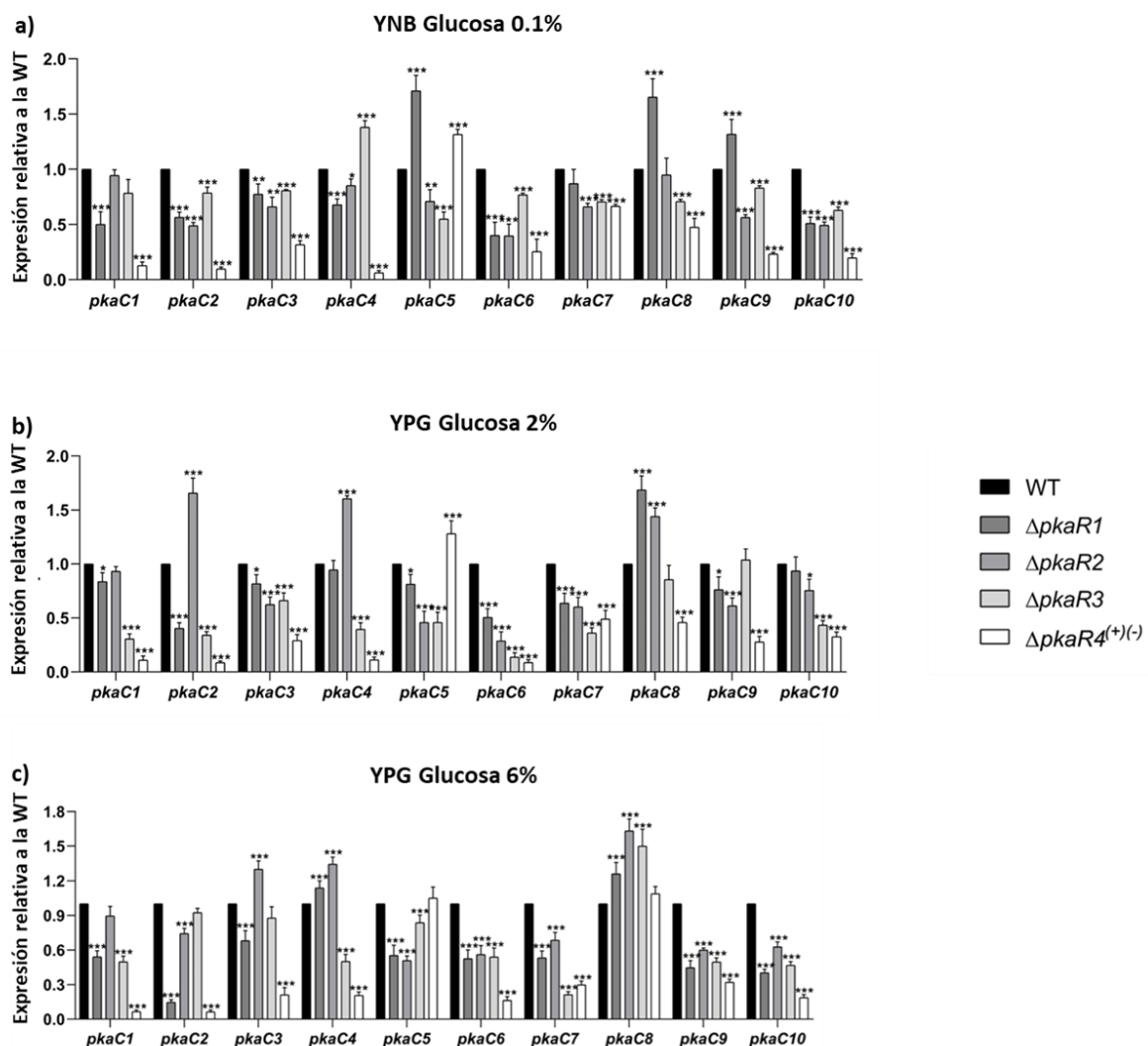


Figura 38. Análisis de expresión de los genes $pkaC1$ - $pkaC10$ en la cepa WT y las cepas mutantes $\Delta pkaR1$ - $\Delta pkaR4^{(+/-)}$ durante el desarrollo micelial de 6

horas en diferentes condiciones de crecimiento. Se evaluó el nivel de transcrito de los genes *pkaC* mediante RT-qPCR en micelio de 6 horas para medio YPG-2% y YPG-6% y micelio de 12 horas para medio YNB-0.1% se muestra un análisis de tipo $\Delta\Delta\text{ct}$ para las cepas WT y $\Delta pkaR1-\Delta pkaR4^{(+)(-)}$. n=3 Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, ***p<0.0001.

7.18 Análisis bioinformático para búsqueda de promotores, y factores de transcripción en los genes *pkaR1-pkaR4*.

Con el objetivo de encontrar si los componentes de la vía AMPc-PKA se encuentran bajo la regulación de algunos factores de transcripción ya descritos que participan en la inducción del metabolismo mitocondrial, como el complejo Hap o factores Tec. Se realizó la búsqueda para sitios consenso de dichos factores de transcripción en los promotores de las cuatro subunidades regulatorias de la PKA de *M. lusitanicus*. Se realizó la búsqueda en dichos promotores de los factores de transcripción. Se encontró que el factor de transcripción Hap1, el cual cumple un papel importante en la regulación de genes que codifican funciones necesarias para la respiración celular, respuesta a estrés oxidante, entre otras funciones (Mao y Chen 2019), está presente en el promotor de las cuatro subunidades regulatorias de la PKA. Por otro lado, encontramos que el factor de transcripción Tec1 el cual, esta descrito que participa en desarrollo micelial de diversos hongos, como es el caso de *S. cerevisiae* (Chou y Col., 2006) o *C. albicans* (Schwartz y Col., 2000) y que recientemente en el grupo de trabajo del laboratorio se ha descrito que participa en el desarrollo micelial y virulencia de *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda, y Col., 2023), está presente en el promotor de las subunidades PkaR1, PkaR3 y PkaR4, lo cual sugiere que, a nivel transcripcional, la PKA estaría siendo regulado transcripcionalmente por los factores transcripcionales Hap y Tec.

Tabla 3. Factores de transcripción encontrados en el promotor de las subunidades PkaR1-PkaR4.

Subunidad regulatoria	Factor de transcripción	Consenso	Posición	Hebra
PkaR1	Hap1p	CAGAAAT	-169	R
	Tec1p	CATTCT	-730	F
PkaR2	Hap1p	CGATAA	-130	F
PkaR3	Hap1p	ATCGATA	-307	F
	Tec1p	CATTCT	-93	R
PkaR4	Hap1p	GGGGATA	-28	R
	Tec1p	CATTCC	-936	F

Adicional a la búsqueda de factores de transcripción, se realizó la búsqueda de motivos de direccionalidad a la mitocondria con la finalidad de predecir si dichas proteínas pudieran ingresar a la mitocondria, para esto, se utilizó la herramienta MitoFates. Al realizar la búsqueda, se encontró que PkaR1, PkaR2 y PkaR4 no poseen motivos de direccionalidad, mientras que PkaR3 si posee un motivo de reconocimiento para TOM 20 la cual es una proteína de la membrana externa y que forma parte del complejo TIM/TOM las cuales son proteínas de traslocación de la membrana mitocondrial (Pfanner, N., y Col. 1997).

Tabla 4. Motivos de reconocimiento a TOM 20 encontrados en la secuencia aminoacídica de PkaR3

ID de la secuencia	Motivo (aa)	Secuencia
PkaR3	46-50	MPDSVHPFSTQPALSQDYQNLHDLSSQVKNANPEDVLQFCDFDF LDKLM QERSHNRSHLQQQQP HNTSHVGGIGPYSTEQESHAIPPHPTIHEEDEDED

*las letras en color rojo muestran el motivo de reconocimiento a TOM 20

Finalmente, se realizó una búsqueda de posibles sitios de fosforilación por PKA en los productos de los genes *Fzo1* y *Dnm1* con la finalidad de predecir si las proteínas que son codificadas por dichos genes, pueden ser regulados a nivel postraducciona a través de la PKA. Para ello, se utilizó la herramienta prosite-expasy la cual nos permitió buscar los dominios, motivos y sitios de fosforilación en la secuencia proteica de *fzo1* y *dnm1* de *S. cerevisiae* y *M. lusitanicus*. Para el caso de la proteína *Fzo1* tanto de *S. cerevisiae* como de *M. lusitanicus* encontramos que posee posibles sitios de fosforilación por PKA, sin embargo, para el caso de *Dnm1*, solo en *M. lusitanicus* no mostramos posibles sitios de fosforilación por PKA. Este conjunto de resultados nos sugiere que, al menos para el caso de *Fzo1*, podría encontrarse bajo la regulación de la vía PKA (Fig. 39).

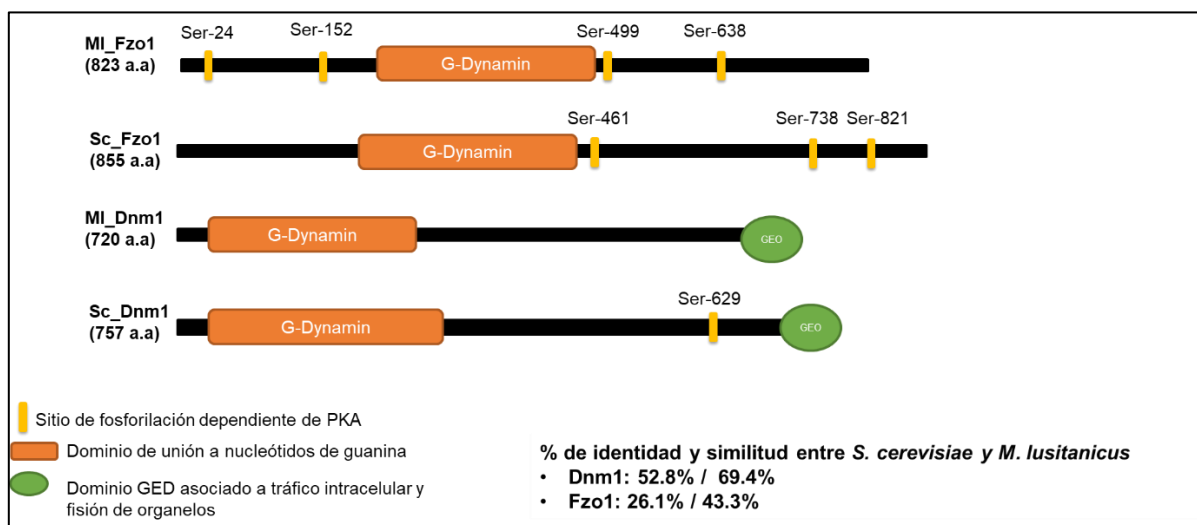


Figura 39. Búsqueda de posibles sitios de fosforilación por PKA en *Fzo1* y *Dnm1* de *S. cerevisiae* y *M. lusitanicus*. La búsqueda de los posibles sitios, dominios y motivos de fosforilación por PKA se realizaron con ayuda de la herramienta prosite-expasy. Además, se determinó el porcentaje de identidad y similitud de dichas proteínas entre ambos organismos.

VIII. Discusión.

La vía de la AMPc-PKA es una vía conservada en organismos eucariotas y específicamente en hongos, dicha vía está asociada a diversos procesos importantes como lo es la captación de nutrientes, la morfogénesis, la reproducción sexual, la homeostasis mitocondrial y la virulencia (Choi y col., 2015). En *M. lusitanicus*, como en todos los organismos, la PKA está conformada por un homodímero de alguna de las cuatro subunidades regulatorias (PkaR1-PkaR4) (Ocampo y col., 2009, Ocampo y col., 2012) y un homodímero de alguna de las diez subunidades catalíticas (PkaC1-PkaC10) (Fernandez-Nuñez y col., 2016). Este dato contrasta con lo reportado en otros hongos, como en *S. cerevisiae*, que posee una única subunidad regulatoria (Bcy1) (Toda y col., 1987a) y tres subunidades catalíticas (Tpk1-Tpk3) (Toda y col., 1987b) o como *C. albicans*, que posee una única subunidad regulatoria Bcy1 y dos subunidades catalíticas Tpk1 y Tpk2 (Zelada y col., 1998), esta información pone en perspectiva la complejidad del sistema en *M. lusitanicus*.

En *S. cerevisiae*, la vía AMPc-PKA participa en la regulación del crecimiento y en los eventos de diferenciación celular, por ejemplo, la subunidad catalítica Tpk2 actúa como regulador positivo en el desarrollo de pseudohifas, caso contrario, las subunidades Tpk1 y Tpk3 actúan como reguladores negativos en el desarrollo de las pseudohifas (Robertson y Fink, 1998). Esta reportado en *M. lusitanicus* que la cepa mutante en la subunidad regulatoria PkaR1 ($\Delta pkaR1$) conduce a un defecto en el crecimiento micelial durante la transición levadura-hifa (Ocampo y col., 2009). En este trabajo, al evaluar el crecimiento de la cepa $\Delta pkaR1$ en presencia de una fuente de carbono no fermentable (glicerol), se observó un menor crecimiento comparado con la cepa WT, sugiriendo que dicha mutante es incapaz de utilizar con la misma eficiencia al glicerol y posiblemente el metabolismo oxidativo mitocondrial podría estar afectado. En esta misma línea de evidencia, en *S. cerevisiae* al mutar el gen *tpk3*, el cual codifica para la subunidad catalítica Tpk3, condujo a la disminución significativa en su crecimiento en presencia de lactato como fuente de carbono no fermentable; además, dicha mutante presentó

una disminución en el contenido mitocondrial de los citocromos aa3, b y cc1 (Chevtzoff y col., 2010). Interesantemente, al evaluar el crecimiento en la cepa $\Delta pkaR3$ de *M. lusitanicus* en presencia de glicerol como fuente de carbono no fermentable, está mostró una mayor germinación y un aumento de generación de biomasa respecto a la cepa WT; este dato correlaciona con la propuesta descrita previamente de que PkaR3 es un regulador negativo del crecimiento micelial, es decir su ausencia aumentaría este parámetro (Ocampo y col., 2012). Estos datos en conjunto sugieren que la delección del gen *pkaR3* estaría conduciendo a un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial. Además, estos datos muestran que durante el crecimiento de *M. lusitanicus* las subunidades regulatorias PkaR1 y PkaR3 presentan funciones opuestas.

Está demostrado que el control del desarrollo hifal/micelial es necesario en la patogénesis en los mucorales, como el que se ha observado en *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda y col. 2022). La capacidad de crecer como hifas es considerado un factor de virulencia en múltiples hongos, como en *C. albicans*, ya que este tipo de crecimiento les confiere la capacidad de penetrar en el tejido del huésped (Sherwood y col., 1992). Además, la morfología filamentosa en *C. albicans* está regulada positivamente en el crecimiento a bajos niveles de oxígeno (Setiadi y col., 2006). Otro ejemplo de la disponibilidad de oxígeno en la estimulación del desarrollo de hifas es el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* (Jackson, 2012), incluso se ha descrito que la disponibilidad de oxígeno es un factor importante en la capacidad virulenta de los hongos; en el ser humano, la concentración de oxígeno varía dependiendo del tejido, como es el caso de la cavidad peritoneal y el tejido de los intestinos, los cuales rondan aproximadamente entre 5.3-7.6% de oxígeno (Carreau y col., 2011; Ortiz-Prado y col., 2019).

En el caso particular de *M. lusitanicus*, una concentración baja de oxígeno estimula de forma simultánea tanto el desarrollo de hifas y levaduras. En estas condiciones, la cepa $\Delta pkaR1$ genera una mayor proporción de levaduras, lo cual indica que esta subunidad es un regulador positivo del crecimiento micelial en

estas condiciones (Valle-Maldonado y col., 2020). Los resultados de este trabajo mostraron como ya se había reportado anteriormente, que la cepa $\Delta pkaR1$ generó un aumento del desarrollo levaduriforme ($7.3 \pm 0.56\%$ de O_2), dicho desarrollo fue aún mayor cuando se disminuyó aún más el oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$ de O_2). En cambio, al evaluar, la cepa $\Delta pkaR3$ mostró un crecimiento micelial favorecido en bajos niveles de oxígeno, lo que nos sugiere que PkaR3 podría ser un regulador positivo del crecimiento levaduriforme en estas condiciones, lo cual explicaría en parte porque la mutación de $pkaR3$ generara un fenotipo virulento. Se ha descrito que el suero sanguíneo juega un papel importante en el desarrollo de las diversas morfologías de algunas especies dimórficas de *Mucor* tales como *M. lusitanicus*, *M. racemosus* y *M. circinelloides* en las cuales se observó que generaron una mezcla de morfologías (hifas y levaduras) al crecerlas en condiciones de bajo oxígeno, y que en presencia de suero sanguíneo se vio mayormente estimulado el desarrollo de hifas incluso a temperaturas de $36^\circ C$ demostrando que durante la mucormicosis las moléculas del suero sanguíneo promueven el desarrollo micelial en los tejidos (Patiño-Medina y col., 2023).

La morfología está asociada a la virulencia de los hongos patógenos dimórficos; por ejemplo, en *C. albicans* la generación de pseudohifas e hifas está asociado a un fenotipo virulento (Lo y col., 1997; Mayer y col., 2013), en donde la subunidad catalítica TPK2 regula positivamente el desarrollo de las hifas, ya que la mutación del gen que codifica a dicha subunidad generó defectos en el desarrollo de hifas y disminuyó la virulencia (Sonneborn y col., 2000). Por otro lado, en el hongo patógeno del maíz, *Ustilago maydis*, se reportó que la mutación en el gen *adr1*, el cual codifica para la subunidad catalítica de la PKA generó una mutante que a pesar de crecer de forma hifal, fue incapaz de generar infección en la planta del maíz (Durrenberger y col., 1998). Además, se reportó que al mutar el gen *ubc1*, el cual codifica para la subunidad reguladora de la PKA, la cepa mutante fue incapaz de generar una adecuada filamentación y no generó daño en las raíces de la planta del maíz, indicando su papel esencial en la virulencia. La cepa mutante en el gen que codifica a la subunidad reguladora PkaR1 que mostró un crecimiento disminuido en condiciones que favorece el metabolismo oxidativo mitocondrial fue

incapaz de generar toxicidad frente al nematodo *C. elegans*. La subunidad PkaR1 es necesaria para el crecimiento micelial incluso en condiciones de baja concentración de oxígeno, así como para el adecuado crecimiento en una fuente de carbono no fermentable; demostrando así que la subunidad reguladora PkaR1 regula el crecimiento micelial y virulencia. Es importante señalar que la morfología mencionada aumenta la virulencia cuando el metabolismo oxidativo mitocondrial está aumentado. (Alejandre-Castañeda y col., 2022). Por el contrario, el SS proveniente de la cepa $\Delta pkaR3$ fue más toxico respecto a la cepa WT, incluso el SS mostró toxicidad, aunque parcialmente, a pesar de haber sido obtenido en una condición que favorece el metabolismo fermentativo. La cepa $\Delta pkaR3$ reveló que parte de la función de PkaR3 tiene que ver con la represión del metabolismo oxidativo, ya que su ausencia condujo a una mayor capacidad para utilizar una fuente de carbono no fermentable para su crecimiento y que además mostro un crecimiento micelial favorecido incluso en a concentraciones bajas de oxígeno, sugiriendo así, que la subunidad reguladora PkaR3 es un regulador negativo del crecimiento micelial y virulencia.

Los datos anteriores revelan que la vía AMPc-PKA estaría regulando positiva y negativamente a través de PkaR1 y PkaR3, respectivamente, al metabolismo oxidativo mitocondrial. Un factor importante que podría estar regulando el metabolismo oxidativo, es el de la dinámica mitocondrial. La fusión mitocondrial es un proceso regulado por el complejo Fzo1-Ugo1-Mgm1, el cual es esencial al momento de cubrir el alza en la demanda energética de las células y como un mecanismo de rescate de mitocondrias dañadas. Mientras que el proceso de fisión mitocondrial está regulado por el complejo Dnm1-Mdv1-Fis1, el cual es importante para mantener el numero adecuado de mitocondrias durante el crecimiento y división celular (Youle y Van-Der Bliet, 2012). Se ha descrito en diversos hongos el papel que ocupan estas proteínas, como es el caso de *Schizosaccharomyces pombe*, en la cual, al mutar al gen *fzo1*, presentó una disminución significativa en el crecimiento en glicerol; además mostró un alto contenido de mitocondrias fragmentadas, correlacionando con una disminución de la función respiratoria del hongo. Por el contrario, al mutar en el gen *dnm1* se generó una red mitocondrial

altamente interconectada y con una mayor capacidad de crecer en presencia de glicerol (Yang y col., 2021). Por otro lado, en *C. albicans* se reportó que al mutar al gen *mgm1*, el cual codifica para la proteína Mgm1 del complejo de fusión mitocondrial, provocó la fragmentación mitocondrial, así como defectos en el desarrollo de las hifas y una reducción considerable en la virulencia del hongo (Chao Liang y col. 2018). En este proyecto, la sobreexpresión del gen *fzo1* en la cepa WT, generó una mayor capacidad para crecer en presencia de glicerol, respecto a la cepa WT, sugiriendo un aumento en el metabolismo oxidativo derivado de una mayor actividad mitocondrial al aumentar el estímulo de fusión mitocondrial.

El metabolismo oxidativo mitocondrial tiene una función importante en el desarrollo hifal de *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda, 2022). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *dnm1* que codifica para la proteína Dnm1 asociada a la fisión mitocondrial favorece la producción de levaduras en anaerobiosis (Patiño-Medina, 2022). Como se ha reportado anteriormente, algunos hongos patógenos dimórficos tienen la capacidad de germinar como micelio, aun en condiciones de hipoxia. Por ejemplo, *C. albicans* aprovecha las condiciones generadas por las células polimorfonucleares (PMN), los cuales al activar el sistema del complemento, conduce a la agrupación de los PMN y ocluye los vasos intravasculares, mediante el leucotrieno B4 (LTB4). Esto genera como consecuencia la disminución en la concentración de oxígeno disponible en el tejido del huésped para incrementar su virulencia y capacidad invasiva evadiendo el sistema inmune y estableciendo una infección exitosa (Lee y col., 2018). Al evaluar la germinación en condiciones de concentración baja de oxígeno, la cepa sobreexpresante MU636-*fzo1*^{O/E} mostró un crecimiento micelial favorecido además de hifas de hasta 2 o 3 veces más largas y un menor porcentaje de levaduras generadas con respecto a la cepa WT. Dichos resultados correlacionan con la propuesta de que la fusión mitocondrial en *M. lusitanicus* regula positivamente el metabolismo oxidativo mitocondrial favoreciendo el crecimiento micelial en condiciones de niveles bajos de oxígeno, dicha morfología micelial está asociada a un incremento de la virulencia del hongo. En *C. albicans* y otras especies de

Candida que forman parte de la microbiota de la cavidad bucal y del intestino, se ha reportado que este hongo es capaz de modificar su entorno, a través de la formación de biofilm creando “micronichos” anaeróbicos o microaerobios disminuyendo la concentración de oxígeno disponible en el tejido o saliva a través de su consumo, favoreciendo además el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium difficile* que es una bacteria patógena oportunista gram positiva que se aloja en el intestino (van-Leeuwen y col. 2016; Lambooi y Col., 2017).

La sobreexpresión del gen *fzo1*, en *M. lusitanicus*, conduce a un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial y que, por el contrario, la sobreexpresión del gen *dnm1* conduce a una disminución en el metabolismo oxidativo mitocondrial, favoreciendo al metabolismo fermentativo. La determinación del consumo de oxígeno es un parámetro establecido para determinar la actividad mitocondrial (Li, Z. y Col., 2012). Los resultados en la germinación, cuando el gen *fzo1* fue sobreexpresado en la cepa WT, condujo a la regulación positiva de la generación de biomasa en presencia de glicerol y el crecimiento hifal a bajas concentraciones de oxígeno. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *dnm1* favoreció al desarrollo levaduriforme en concentraciones bajas de oxígeno y afectó negativamente el resto de los parámetros analizados. La determinación del consumo de oxígeno es un parámetro establecido para determinar la actividad mitocondrial (Li, Z. y Col., 2012). En el grupo de trabajo se ha observado que el suero sanguíneo aumenta la actividad mitocondrial de *M. lusitanicus*, ya que se observó que las esporas producidas en medio YPG mostraban una tasa de consumo de oxígeno de 19 a 29% más baja con respecto a las producidas en medio YPG adicionado con suero sanguíneo (Patiño-Medina y col., 2023). La sobreexpresión del gen *fzo1* generó un aumento en la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la cepa WT, contrario a lo que se observó en la cepa sobreexpresante en el gen *dnm1* que mostró una disminución respecto a la cepa WT. Estos datos indican que las proteínas Fzo1 y Dnm1, regulan positiva y negativamente la respiración, respectivamente. Algo similar se ha reportado en *S. cerevisiae* donde la mutación de cualquiera de los genes (*fzo1* o *dnm1*) disminuía

significativamente la tasa de consumo de oxígeno. Sin embargo, al generar la doble mutante *fzo1Δ/dnm1Δ* observaron que la respiración se restauraba a nivel de la WT ya que al mutar tanto un gen asociado a la fusión (*fzo1*) como un gen asociado a la fisión (*dnm1*) restauraba el equilibrio fusión/fisión (Dong y col., 2022).

Además, en mamíferos se ha reportado que, en miocitos ventriculares de ratones neonatales, la fusión y fisión mitocondrial tienen una función importante en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Al inhibir el proceso de fisión, disminuyó significativamente la producción de las ROS (Yu y col., 2008). De igual manera pero con otro enfoque, en este trabajo, la sobreexpresión de *fzo1* reveló un aumento la producción del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), mientras que la sobreexpresión de *dnm1* condujo a una disminución significativa en la generación del radical $\text{OH}\cdot$. Estos datos demuestran la participación de la dinámica mitocondrial en la producción de ROS en *M. lusitanicus*.

El crecimiento micelial en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánico y bajas concentraciones de glucosa (0.1%) está asociado al aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial e incremento de la toxicidad y virulencia de *M. lustratus* (Alejandre-Castañeda y Col., 2022.) En este sentido las cepas sobreexpresantes en los genes *fzo1* y *dnm1* en la cepa WT creciendo en condiciones que favorecían tanto el metabolismo oxidativo mitocondrial, como el metabolismo fermentativo, reveló que el SS de la cepa sobreexpresante de *fzo1* mostró una mayor mortalidad en los nematodos con respecto a la cepa WT, incluso aunque el SS fue generado en el medio que favorecía el metabolismo fermentativo. Por el contrario, se observó que los SS de la cepa sobreexpresante del gen *dnm1* no mostró toxicidad independientemente de las condiciones de cultivo. La toxicidad de los SS de *M. lusitanicus* necesita de que dichos SS sean obtenidos en condiciones que favorezcan un adecuado metabolismo oxidativo mitocondrial, ya que la adición de cianuro de potasio (KCN), durante el cultivo, anuló la toxicidad de los SS. De igual manera, la adición N-acetilcisteína generó un fenotipo similar que el KCN, lo cual indica que las ROS que se generan principalmente en la cadena de transporte de

electrones serían los responsables al modificar algunos elementos aun desconocidos que estarían regulado vías de señalización que conducen a un fenotipo virulento. En *C. albicans* las NADPH oxidasas (NOX) participan en la formación de ROS formando un gradiente de superóxido por fuera de la célula convirtiéndose en H₂O₂ por acción de la superóxido dismutasa (sod5) mejorando el desarrollo de las hifas y su patogenicidad (Rossi y col., 2017). Por otro lado, en *M. lusitanicus* se sabe hasta el momento que el suero sanguíneo aumenta la producción del radical OH[·] e incrementan la virulencia (Patiño-Medina y col., 2023).

La vía AMPc-PKA, podría estar influenciando los eventos de fusión y fisión mitocondrial, lo cual influiría en el crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus*. En *S. cerevisiae* la mutación del gen que codifica a la subunidad catalítica Tpk3 conduce a la disminución en el contenido mitocondrial, medido en cantidad de proteína de los citocromos aa3, b y cc1, esta disminución correlacionó con un defecto que disminuyó su metabolismo oxidativo, haciéndolo incapaz de utilizar eficientemente una fuente de carbono no fermentable (Lactato) para su crecimiento (Chevtzoff y col., 2010). Por otro lado, está demostrado que la vía AMPc-PKA fosforila a la proteína Mfn2 (homólogo de Fzo1) conduciendo a la detención del crecimiento de las células del musculo liso vascular de las ratas (Zhou y col., 2010). Este conjunto de reportes apoya la idea de que en *M. lusitanicus* la dinámica mitocondrial también se encuentra regulada por la vía AMPc-PKA, ya que la cepa $\Delta pkaR1$ muestra incapacidad de utilizar el glicerol de manera óptima, además de tener una baja tasa de respiración, y producción de OH[·]; Sin embargo, cuando $\Delta pkaR1$ sobreexpresa al gen *fzo1* mostró la restauración de todos estos parámetros similar a la cepa WT, indicando la restauración del fenotipo silvestre. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *dnm1* no mostro diferencia con respecto a la cepa $\Delta pkaR1$. Este conjunto de datos sugiere fuertemente que la proteína Fzo1 podría estar bajo la regulación de la vía AMPc-PKA a través de la subunidad regulatoria PkaR1.

La cepa sobreexpresante $\Delta pkaR1 \cdot fzo1^{O/E}$ mostró un porcentaje de generación de hifas y levaduras, niveles de consumo de oxígeno y producción de ROS similar a

la cepa WT, mientras que la cepa $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$ muestra un resultado similar a la cepa $\Delta pkaR1$. En *S. cerevisiae* está reportado que la vía de la AMPc-PKA participa en la producción de ROS, y que al mutar a la subunidad catalítica Tpk3 se generó un aumento en la producción de ROS, y que estos mismos a su vez, fungen como reguladores negativos del complejo HAP (Chevtzoff C. y Col., 2010). Todo el conjunto de resultados anteriores (germinación, generación de biomasa, baja concentración de O₂ y tasa de consumo de O₂) sugiere fuertemente la regulación de Fzo1 por la vía AMPc-PKA a través de la subunidad regulatoria PkaR1 en *M. lusitanicus*, además del hecho de que en *S. cerevisiae* y en mamíferos esta vía participa regulando la dinámica mitocondrial.

Además, los SS de las cepas WT, $\Delta pkaR1$ y de las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta pkaR1\cdot dnm1^{O/E}$ provenientes de los medios YPG-6% (medio que estimula el metabolismo fermentativo) y YNB-0.1% (medio que estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial), en ambas condiciones la sobreexpresión del gen *fzo1* en la cepa $\Delta pkaR1$ aumento la virulencia a niveles similares a la cepa WT, cuando los SS provenían del medio YNB-0.1%. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *dnm1* en $\Delta pkaR1$ no mostró ningún cambio en la toxicidad con respecto a la mutante sencilla $\Delta pkaR1$. Por el contrario, cuando se evaluaron los SS provenientes de medio YPG-6%, la cepa sobrepresante $\Delta pkaR1\cdot fzo1^{O/E}$ mostró una pérdida de la toxicidad al igual que la cepa WT. Estos datos sugieren que Fzo1 se encuentra bajo la regulación de la vía AMPc-PKA a través de la subunidad regulatoria PkaR1.

Hasta este punto, se demostró que la vía de la PKA participa en el crecimiento micelial y virulencia de *M. lusitanicus* regulando estos eventos de manera positiva a través de la subunidad regulatoria PkaR1 y de manera negativa a través de PkaR3. Por otro lado, se demostró también que la proteína Fzo1 probablemente está promoviendo la fusión mitocondrial, la cual correlaciona de manera positiva con el crecimiento y la virulencia de *M. lusitanicus* promoviendo el metabolismo oxidativo mitocondrial. Finalmente, mediante ensayos de sobreexpresión de los elementos de la dinámica mitocondrial (Fzo1 y Dnm1) en la cepa $\Delta pkaR1$ se

evidencio que la fusión mitocondrial está regulada por la vía AMPc-PKA, a través de la subunidad regulatoria PkaR1. Sin embargo, aún queda una última interrogante ¿A cuál de las 10 subunidades catalíticas de la PKA se está uniendo PkaR1 para regular el crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus*?

Para responder a la pregunta anterior, mediante un análisis de expresión de los 10 genes que codifican a las PkaC, se obtuvo el RNA total posterior al crecimiento micelial. los datos indicaron que en $\Delta pkaR1$ se acumula en mayor cantidad los transcritos de *pkaC5*, *pkaC8* y *pkaC9* en YPG-2% y en el medio YNB-0.1% y únicamente en *pkaC8* en el medio YPG-6% lo que sugiere fuertemente que PkaR1 se une a las subunidades catalíticas PkaC5, PkaC8 y PkaC9. Por otro lado, observamos que en la cepa $\Delta pkaR3$ se acumula principalmente el RNAm de *pkaC8* en medio YPG-6% lo que sugiere que PkaR3 se une a PkaC8.

Con la finalidad de conocer elementos transcripcionales que posiblemente regulen los genes que codifican a las diferentes subunidades la PKA, se realizó el análisis *in silico*, el cual revelo que los promotores de *pkaR1* y *pkaR3* presentan motivos consenso de reconocimiento por el factor de transcripción Hap, el cual participa en diversos procesos como la síntesis de los complejos respiratorios y la producción de ROS (Mao y Chen, 2019). Esto sugiere que a nivel transcripcional la vía AMPc-PKA podría estar participando en procesos necesarios para la respiración celular y respuesta a estrés oxidante. Por otra parte, también se encontraron secuencias consenso de reconocimiento por el factor de transcripción Tec1 en los promotores de los genes que codifican a las subunidades regulatorias PkaR1 a la PkaR4, dicho factor participa en el desarrollo de pseudohifas de *S. cerevisiae* (Chou y col., 2006) y en el crecimiento y virulencia de *C. albicans* (Schwartz y col., 2000) así como en el crecimiento micelial y virulencia en *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda y col., 2023). Además, recientemente en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto que existen dos niveles de regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial de *M. lusitanicus* donde participa Tec1/Tec2. A nivel transcripcional *gpb1* y *pkaR1* actúan regulando positivamente la transcripción de Tec1/Tec2 y por otro lado, a nivel postraducciona, al estar inactiva la vía de la PKA podría

evitar la fosforilación de Tec1/Tec2, el estado no fosforilado del complejo Tec aumenta en el contenido y actividad mitocondrial favoreciendo el metabolismo oxidativo mitocondrial y por lo tanto el crecimiento micelial y aumento en la virulencia de *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda y col., 2023).

Además, se realizó una búsqueda de posibles sitios de fosforilación por PKA en las proteínas Fzo1 y Dnm1 de *M. lusitanicus* y *S. Cerevisiae*, la proteína Fzo1 de ambos organismos mostraron posibles sitios de fosforilación por PKA, este *dato in silico* aunado a los resultados de los ensayos fisiológicos podrían estar sugiriendo que Fzo1 se encuentra bajo la regulación de la vía PKA a través de la subunidad regulatoria PkaR1. Además, posiblemente PkaR1 se encuentra asociada posiblemente a la subunidad catalítica PkaC5, PkaC8 y/o PkaC9, quizás estas interacciones son reguladas de forma diferencial en termino de espacio(morfología)-tiempo y una de las consecuencias de la activación de las mismas, sería la fosforilación de Fzo1. Sin embargo, aún queda pendiente realizar más experimentos que permitan saber que subunidad catalítica de las tres mencionadas anteriormente (o quizás otra), es la que se asocia con PkaR1. Por otro lado, aún faltan experimentos que permitan conocer más a fondo la regulación negativa de la subunidad regulatoria PkaR3, para lo cual se están generando las cepas $\Delta pkaR3$ sobreexpresando a los genes *fzo1* y *dnm1* en *M. lusitanicus*.

Con la información anterior, se sugiere el siguiente modelo (Fig. 40) que trata de explicar como la vía de la PKA actúa sobre los elementos de la dinámica mitocondrial conduciendo al desarrollo micelial y virulencia de *M. lusitanicus*.

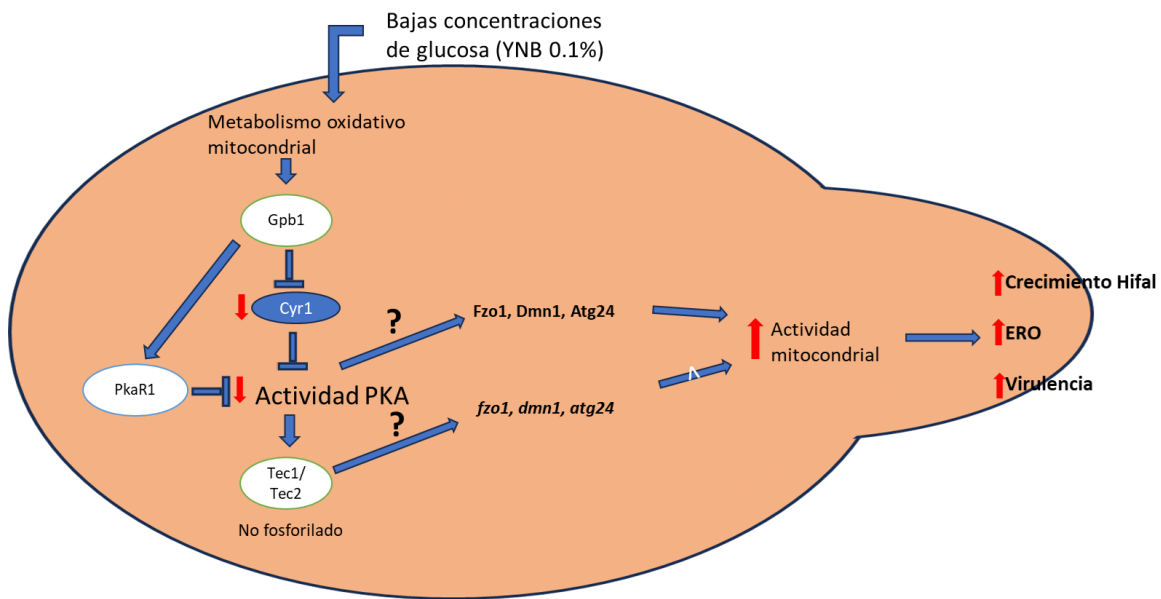


Figura 40. Modelo propuesto de la regulación de la fusión y fisión mitocondrial a través de la vía AMPc-PKA y su participación en el crecimiento y virulencia de *M. lusitanicus*. A bajas concentraciones de glucosa los niveles de AMP cíclico son bajos, por lo que la vía de la PKA permanecerá inactiva, como consecuencia la subunidad reguladora PkaR1 permanecerá unida a PkaC5, PkaC8 o PkaC9. Al mantenerse unida a alguna de estas subunidades catalíticas, PkaR1 estaría evitando la fosforilación de Tec1/Tec2 favoreciendo el crecimiento micelial y virulencia a través de Fzo1. Por otro lado, la regulación negativa de las subunidades catalíticas PkaC5, PkaC8 o PkaC9 por la asociación con la subunidad PkaR1 favorecerá a la no fosforilación de Fzo1, aumentado la actividad y contenido mitocondrial favoreciendo el crecimiento micelial y el aumento de la virulencia.

IX. Conclusión

La inducción de la fusión mitocondrial se encuentra bajo la regulación negativa de la vía AMPc-PKA, a través de la subunidad reguladora PkaR1. La posible fosforilación de Fzo1 por alguna PkaC conduciría a una disminución del crecimiento micelial y toxicidad a través de la represión del metabolismo oxidativo mitocondrial de *M. lusitanicus*.

X. Bibliografía

- 1 Alejandro-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>
- 2 Alejandro-Castañeda, V., Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., García, A., Ortiz-Alvarado, R., Ruíz-Herrera, L. F., Castro-Cerritos, K. V., Ramírez-Emiliano, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., Lee, S. C., & Meza-Carmen, V. (2023). Transcription Factors Tec1 and Tec2 Play Key Roles in the Hyphal Growth and Virulence of *Mucor lusitanicus* Through Increased Mitochondrial Oxidative Metabolism. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 61(12), 1043–1062. <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00096-8>
- 3 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>
- 4 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>
- 5 Bartnicki-Garcia S. (1968). Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of bacteriology*, 96(5), 1586–1594. <https://doi.org/10.1128/jb.96.5.1586-1594.1968>
- 6 Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>

- 7 Chao Liang., Bing Zhang., Lifang Cui., Jianrong Li., Qilin Yu., Mingchun Li. (2018). Mgm1 is required for maintenance of mitochondrial function and virulence in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 122: 1087-1845. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.09.006>.
- 8 Chou, S., Lane, S., & Liu, H. (2006). Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 26(13), 4794–4805. <https://doi.org/10.1128/MCB.02053-05>
- 9 Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>
- 10 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>
- 11 Chevtzoff, C., Yoboue, E. D., Galinier, A., Casteilla, L., Daignan-Fornier, B., Rigoulet, M., & Devin, A. (2010). Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 285(3), 1733–1742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019570>.
- 12 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>
- 13 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>
- 14 Dalton, G. D., & Dewey, W. L. (2006). Protein kinase inhibitor peptide (PKI): a family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-

- dependent protein kinase function. *Neuropeptides*, 40(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.10.002>
- 15 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>
 - 16 D'Souza, C. A., Alspaugh, J. A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular and cellular biology*, 21(9), 3179–3191. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.3179-3191.2001>
 - 17 Dong, F., Zhu, M., Zheng, F., & Fu, C. (2022). Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast. *The FEBS journal*, 289(1), 262–278. <https://doi.org/10.1111/febs.16138>
 - 18 Dürrenberger, F., Wong, K., & Kronstad, J. W. (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5684–5689. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5684>
 - 19 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>
 - 20 Fernández Núñez, L., Ocampo, J., Gottlieb, A. M., Rossi, S., & Moreno, S. (2016). Multiple isoforms for the catalytic subunit of PKA in the basal fungal lineage *Mucor circinelloides*. *Fungal biology*, 120(12), 1493–1508. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.013>
 - 21 Fritz, S., Weinbach, N., & Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast.

- Molecular biology of the cell, 14(6), 2303–2313.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0831>
- 22 Garcia, A., Vellanki, S., & Lee, S. C. (2018). Genetic tools for investigating Mucorales fungal pathogenesis. *Current clinical microbiology reports*, 5(3), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0097-7>
 - 23 Geneva: World Health Organization. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.
 - 24 Garre V. (2022). Recent Advances and Future Directions in the Understanding of Mucormycosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 850581. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.850581>
 - 25 Sherwood, J., Gow, N. A., Gooday, G. W., Gregory, D. W., & Marshall, D. (1992). Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 30(6), 461–469. <https://doi.org/10.1080/02681219280000621>
 - 26 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>
 - 27 Hwang JJ, Chambon P, Davidson I (1993) Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *J EMBO* 12(6):2334–2348. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05888.x>
 - 28 Jackson, M. A. (2012). Dissolved oxygen levels affect dimorphic growth by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Science and Technology*, 22(1), 67–79. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.64233>
 - 29 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>

- 30 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>
- 31 Kondo-Okamoto, N., Noda, N. N., Suzuki, S. W., Nakatogawa, H., Takahashi, I., Matsunami, M., Hashimoto, A., Inagaki, F., Ohsumi, Y., & Okamoto, K. (2012). Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *The Journal of biological chemistry*, 287(13), 10631–10638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299917>
- 32 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>
- 33 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>
- 34 Lambooi, J. M., Hoogenkamp, M. A., Brandt, B. W., Janus, M. M., & Krom, B. P. (2017). Fungal mitochondrial oxygen consumption induces the growth of strict anaerobic bacteria. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 109, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.001>
- 35 Lanternier, F., Dannaoui, E., Morizot, G., Elie, C., Garcia-Hermoso, D., Huerre, M., Bitar, D., Dromer, F., Lortholary, O., & French Mycosis Study Group (2012). A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54 Suppl 1, S35–S43. <https://doi.org/10.1093/cid/cir880>

- 36 Lasker, B. A., & Borgia, P. T. (1980). High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of bacteriology*, 141(2), 565–569. <https://doi.org/10.1128/jb.141.2.565-569.1980>
- 37 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>
- 38 Lax C, Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Cánovas-Márquez JT, Tahiri G, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Murcia-Flores L, Navarro E, Garre V, Nicolás FE (2020a) Genes, Pathways, and Mechanisms Involved in the Virulence of Mucorales. *Genes (Basel)*. 11(3), 317; <https://doi.org/10.3390/genes11030317>
- 39 Lax C, Tahiri G, Patiño-Medina JA, Cánovas-Márquez JT, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Navarro E, Calo S (2020b) The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom. *Int J Mol Sci*. 21(24):9348.
- 40 Lee, E. K. S., Gillrie, M. R., Li, L., Arnason, J. W., Kim, J. H., Babes, L., Lou, Y., Sanati-Nezhad, A., Kyei, S. K., Kelly, M. M., Mody, C. H., Ho, M., & Yipp, B. G. (2018). Leukotriene B4-Mediated Neutrophil Recruitment Causes Pulmonary Capillaritis during Lethal Fungal Sepsis. *Cell host & microbe*, 23(1), 121–133.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.009>
- 41 Lee SC, 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>
- 42 Legesse-Miller, A., Massol, R. H., & Kirchhausen, T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 14(5), 1953–1963. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0657>
- 43 Lewis, R. E., & Kontoyiannis, D. P. (2013). Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future microbiology*, 8(9), 1163–1175. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.78>

- 44 Lin, C. J., & 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>.
- 45 Li, Z., & Graham, B. H. (2012). Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 837, 63–72. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-504-6_5
- 46 Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939–949. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80358-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80358-x)
- 47 Mao, Y., & Chen, C. (2019). The Hap Complex in Yeasts: Structure, Assembly Mode, and Gene Regulation. *Frontiers in microbiology*, 10, 1645. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01645>
- 48 Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- 49 McIntyre, M., Breum, J., Arnau, J., & Nielsen, J. (2002). Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 495–502. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0916-1>
- 50 McNulty J. S. (1982). Rhinocerebral mucormycosis: predisposing factors. *The Laryngoscope*, 92(10 Pt 1), 1140–1143.
- 51 Memon A. R. (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochimica et biophysica acta*, 1664(1), 9–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.005>
- 52 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>

- 53 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>
- 54 Nie, Z., Hirsch, D. S., & Randazzo, P. A. (2003). Arf and its many interactors. *Current opinion in cell biology*, 15(4), 396–404. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00071-1](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00071-1)
- 55 Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- 56 Ocampo, J., Fernandez Nuñez, L., Silva, F., Pereyra, E., Moreno, S., Garre, V., & Rossi, S. (2009). A subunit of protein kinase a regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic cell*, 8(7), 933–944. <https://doi.org/10.1128/EC.00026-09>
- 57 Ocampo, J., McCormack, B., Navarro, E., Moreno, S., Garre, V., & Rossi, S. (2012). Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic cell*, 11(8), 989–1002. <https://doi.org/10.1128/EC.00017-12>
- 58 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>
- 59 Orłowski M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological reviews*, 55(2), 234–258. <https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991>
- 60 Ortiz-Prado, E., Dunn, J. F., Vasconez, J., Castillo, D., & Viscor, G. (2019). Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *American journal of blood research*, 9(1), 1–14.
- 61 Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental cell*, 17(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>

- 62 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)
- 63 Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alejandro-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>
- 64 Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alejandro-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>
- 65 Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Jácome-Galarza, I. E., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Araiza-Cervantes, C. A., Villagomez-Castro, J. C., Campos-García, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2019). Role of Arf-like proteins (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 129, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.011>
- 66 Patiño-Medina, J. A., Alejandro-Castañeda, V., Valle-Maldonado, M. I., Martínez-Pacheco, M. M., Ruiz-Herrera, L. F., Ramírez-Emiliano, J., Ramírez-Marroquín, O. A., Castro-Cerritos, K. V., Campos-García, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., Binder, U., & Meza-Carmen, V. (2023). Blood Serum Stimulates the Virulence Potential of *Mucorales* through Enhancement in Mitochondrial Oxidative Metabolism and Rhizoferrin Production. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1127. <https://doi.org/10.3390/jof9121127>

- 67 Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M. I., Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2019). *Mucor circinelloides* Thrives inside the Phagosome through an Atf-Mediated Germination Pathway. *mBio*, 10(1), e02765-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02765-18>
- 68 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>
- 69 Pfanner, N., Craig, E. A., & Hönlinger, A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. *Annual review of cell and developmental biology*, 13, 25–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.25>
- 70 Prakash, H. y Chakrabarti, A. (2019). Global Epidemiology of Mucormycosis. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 5(1), 26. <https://doi.org/10.3390/jof5010026>
- 71 Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10190–10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>
- 72 Repasky, G. A., Chenette, E. J., & Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?. *Trends in cell biology*, 14(11), 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.014>
- 73 Ridley A. J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in cell biology*, 11(12), 471–477. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02153-5](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02153-5)
- 74 Robertson, L. S., & Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 95(23), 13783–13787. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13783>
- 75 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>
 - 76 Rossi, D. C. P., Gleason, J. E., Sanchez, H., Schatzman, S. S., Culbertson, E. M., Johnson, C. J., McNees, C. A., Coelho, C., Nett, J. E., Andes, D. R., Cormack, B. P., & Culotta, V. C. (2017). *Candida albicans* FRE8 encodes a member of the NADPH oxidase family that produces a burst of ROS during fungal morphogenesis. *PLoS pathogens*, 13(12), e1006763. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006763>
 - 77 Salcedo-Hernández R, Ruiz-Herrera J (1993) Isolation and Characterization of a Mycelial Cytochrome aa3-Deficient Mutant and the Role of Mitochondria in Dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* 17(2): 142-154.
 - 78 Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., & Ernst, J. F. (2006). Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *Journal of molecular biology*, 361(3), 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.040>
 - 79 Sherwood, J., Gow, N. A., Sonneborn, A., Bockmühl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., & Ernst, J. F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 35(2), 386–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01705.x>
 - 80 Skiada, A. y Petrikos, G. (2013). Cutaneous mucormycosis. *Skinmed*, 11(3), 155–160.
 - 81 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>

- 82 Song, J., Zhou, J., Zhang, L., & Li, R. (2020). Mitochondria-Mediated Azole Drug Resistance and Fungal Pathogenicity: Opportunities for Therapeutic Development. *Microorganisms*, 8(10), 1574. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101574>
- 83 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>
- 84 Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Rölinghoff, M., & Schröppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 38(3), 435–445. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02132.x>
- 85 Thevelein, J. M., & de Winder, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 33(5), 904–918. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x>
- 86 Raut, A., & Huy, N. T. (2021). Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave?. *The Lancet. Respiratory medicine*, 9(8), e77. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00265-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00265-4)
- 87 Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G., & Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 7(4), 1371–1377. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.4.1371-1377.1987>
- 88 Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, 50(2), 277–287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)
- 89 Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Gutiérrez-Corona, F., Ramírez-Díaz, M. I., Campos-García, J., & Meza-Carmen, V. (2015).

- Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular biology reports*, 42(3), 705–711. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3818-x>.
- 90 Valle-Maldonado, MI, Patiño-Medina, JA, Pérez-Arques, C, et al. (2020). The heterotrimeric G-protein beta subunit Gpb1 controls hyphal growth under low oxygen conditions through the protein kinase A pathway and is essential for virulence in the fungus *Mucor circinelloides*. *Cellular Microbiology*. 2020; 22:e13236. <https://doi.org/10.1111/cmi.13236>
 - 91 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>.
 - 92 Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M. I., Garcia, A., Murcia, L., Perez-Arques, C., Garre, V., Nicolas, F. E., & Lee, S. C. (2018). *Mucor circinelloides*: Growth, Maintenance, and Genetic Manipulation. *Current protocols in microbiology*, 49(1), e53. <https://doi.org/10.1002/cpmc.53>
 - 93 Wagner, L., de Hoog, S., Alastruey-Izquierdo, A., Voigt, K., Kurzai, O., & Walther, G. (2019). A Revised Species Concept for Opportunistic *Mucor* Species Reveals Species-Specific Antifungal Susceptibility Profiles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(8), e00653-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00653-19>.
 - 94 Weis K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112(4), 441–451. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00082-5).
 - 95 Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>
 - 96 Wennerberg, K., & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science*, 117(Pt 8), 1301–1312. <https://doi.org/10.1242/jcs.01118>.
 - 97 Yamaguchi, M., Dieffenbach, C. W., Connolly, R., Cruess, D. F., Baur, W., & Sharefkin, J. B. (1992). Effect of different laboratory techniques for

- guanidinium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *PCR methods and applications*, 1(4), 286–290. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.286>
- 98 Yang, Y., Hu, Y., Wu, L., Zhang, P., & Shang, J. (2021). dnm1 deletion blocks mitochondrial fragmentation in Δ fzo1 cells. *Yeast* (Chichester, England), 38(3), 197–205. <https://doi.org/10.1002/yea.3524>
 - 99 Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* (New York, N.Y.), 337(6098), 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
 - 100 Yu, T., Sheu, S. S., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, 79(2), 341–351. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn104>
 - 101 Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(2), 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>
 - 102 Zelada, A., Passeron, S., Lopes Gomes, S., & Cantore, M. L. (1998). Isolation and characterisation of cAMP-dependent protein kinase from *Candida albicans*. Purification of the regulatory and catalytic subunits. *European journal of biochemistry*, 252(2), 245–252. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520245.x>
 - 103 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>
 - 104 Zhou, W., Chen, K. H., Cao, W., Zeng, J., Liao, H., Zhao, L., & Guo, X. (2010). Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis*, 211(1), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.012>

XI. Anexos

A.1 Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 y la vía de la calcineurina en el crecimiento de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de O₂

Con el objetivo de evaluar la posible interacción entre la vía AMPc-PKA y la vía de la calcineurina durante el crecimiento de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno, para ello, se utilizó a la cepa WT, la cepa mutante $\Delta pkaR1$, y las cepas mutantes en $\Delta pkaR1$ sobreexpresando a los genes *cnaB* y *cnaC* que codifican para las subunidades catalíticas CnaB y CnaC de la calcineurina ($\Delta pkaR1+cnaBwt$ y $\Delta pkaR1+cnaCwt$). Se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio rico YPG-2% y se llevaron a incubar a 28°C a 40 rpm para generar una atmosfera de 4.9% de oxígeno durante 6 horas. Se observó que la cepa sobreexpresante $\Delta pkaR1+cnaBwt$ mostró una mayor formación de hifas (60-70%) con respecto a la cepa WT y a la cepa mutante $\Delta pkaR1$, las cuales mostraron un porcentaje del 20 al 30% de hifas.

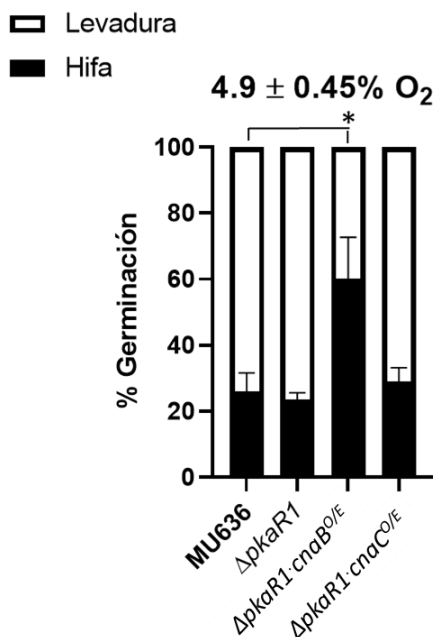


Figura A1 Evaluación de la germinación a bajas concentraciones de oxígeno en las cepas sobreexpresantes ($\Delta pkaR1+cnaBwt$ y $\Delta pkaR1+cnaCwt$). En medio YPG líquido al 2% de glucosa se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio de la cepa WT y de las cepas sobreexpresantes, se dejaron germinar durante 6 horas en agitación a 40 rpm a 28°C. $n=3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, $*p<0.05$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.

A.2 Participación de la subunidad regulatoria PkaR1 y la vía de la calcineurina en la tasa de consumo de O_2 de *M. lusitanicus*

Para seguir indagando la participación entre la vía de la AMPc-PKA y la vía de la calcineurina, se evaluó la tasa de consumo de la cepa WT, la cepa mutante $\Delta pkaR1$, y las cepas sobreexpresantes $\Delta pkaR1+cnaBwt$ y $\Delta pkaR1+cnaCwt$. Se inocularon 5×10^5 esporas por mL de medio. El consumo de O_2 se evaluó en los medios YPG-2% YPG-6% y YNB-0.1%. Para los tres casos, se observó que la cepa sobreexpresante $\Delta pkaR1+cnaB$ mostró una tasa de consumo similar a la cepa WT, caso contrario para la cepa mutante $\Delta pkaR1$ y la cepa sobreexpresante $\Delta pkaR1+cnaC$ que presentaron una tasa de consumo más bajo (hasta 0.1-0.2 veces menos) con respecto a la cepa WT (Fig. 33).

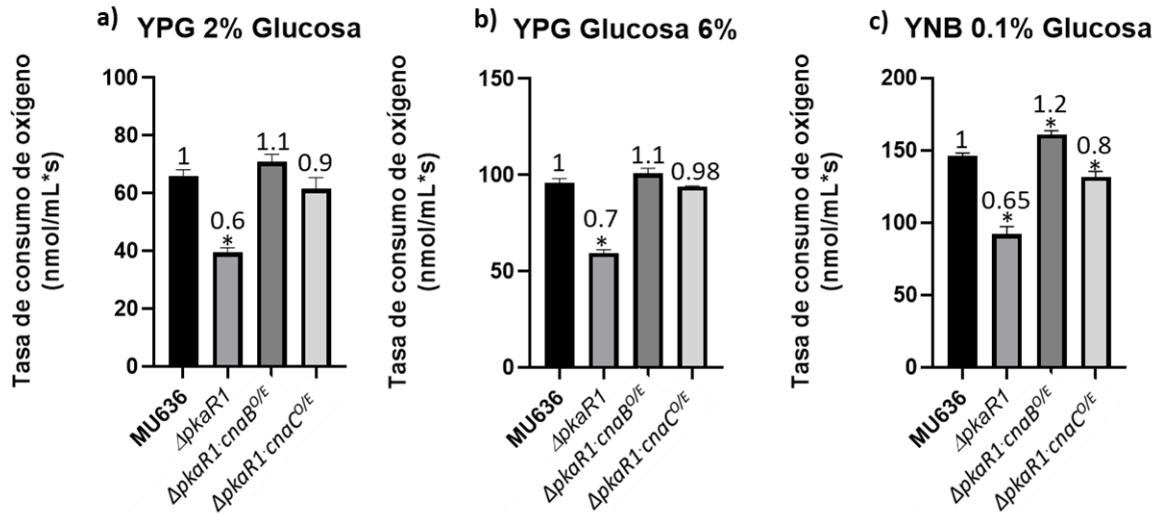


Figura A2. Tasa de consumo de oxígeno en las cepas sobrepresantes $\Delta pkaR1+cnaB^{wt}$ y $\Delta pkaR1+cnaC^{wt}$. Se inocularon 5 millones de esporas de cada cepa en 10 mL de cada uno de los medios. Para los medios YPG 2% y YPG 6% la germinación duró 3 horas a 150 rpm y para el medio YNB 0.1% la germinación fue por un lapso de 4 horas a 150 rpm. Para la cepa WT se asignó un valor arbitrario de 1. $n=3$. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnett, $*p<0.05$. Los asteriscos representan diferencia significativa entre las condiciones evaluadas.