



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO
BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tesis

**Papel de la vía de la calcineurina en la regulación del
metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de
*Mucor lusitanicus***

Q.F.B. Chantal Charlotte Rosales Ceja

**Para obtener el título de :
Maestra en Ciencias en Biología
Experimental**

Asesor: D.C. Víctor Meza Carmen

Morelia, Michoacán. Julio 2024

Contenido

Índice de figuras	6
Índice de tablas	8
Abreviaturas y símbolos	9
Prefijos	9
Resumen	10
Abstract	12
I. Introducción	14
1.1 El género <i>Mucor</i>	14
1.2 <i>M. lusitanicus</i>	15
1.2.1 Características generales	15
1.2.2 Ciclo de vida de <i>M. lusitanicus</i>	15
1.2.3 <i>M. lusitanicus</i> como modelo de estudio de la mucormicosis	17
1.3 Virulencia	20
1.3.1 Factores de virulencia en hongos	20
1.3.1.1 Toxinas	21
1.3.1.2 Biopelículas	22
1.3.1.3 Metabolismo oxidativo-fermentativo	22
1.3.1.4 Sideróforos	23
1.3.2 Factores de virulencia en <i>M. lusitanicus</i>	25
1.3.2.1 Alcohol deshidrogenasa (Adh1)	25
1.3.2.2 Adquisición de hierro	26
1.3.3 Proteínas G monoméricas	27

1.3.4 Proteínas G heterotriméricas	30
1.3.5 Vía de la Proteína Cinasa dependiente de AMPc en <i>M. lusitanicus</i>	33
1.4 Homeostasis mitocondrial.....	34
1.4.1 Biogénesis mitocondrial	35
1.4.2 Fusión mitocondrial.....	36
1.4.3 Fisión mitocondrial	37
1.4.4 Mitofagia	39
II. Antecedentes	40
2.1 Metabolismo mitocondrial y fermentativo involucrado en morfogénesis y virulencia de <i>M. lusitanicus</i>	40
2.2 Vía de señalización de la CN.....	42
2.2.1 Función de la CN en hongos	46
2.2.1.1 Papel de la CN en <i>N. crassa</i>	46
2.2.1.2 Papel de la CN en <i>C. neoformans</i>	47
2.2.1.3 Papel de la CN en <i>C. albicans</i>	47
2.2.1.4 Sistema de CN en <i>M. lusitanicus</i>	48
2.2.1.4.1 Descripción de las subunidades de CN en <i>M. lusitanicus</i>	48
2.2.1.4.2 Función de los genes que codifican para las subunidades de CN de <i>M. lusitanicus</i>	51
2.2.1.4.3 La CN regula la expresión de otros genes en <i>M. lusitanicus</i>	52
III. Justificación.....	53
IV. Hipótesis	53
IV. Objetivos	54
VI. Estrategia experimental general	55
VII. Materiales y métodos	56
7.1 Cepas utilizadas	56

7.2 Medios utilizados	57
7.3 Obtención y conteo de esporas de <i>M. lusitanicus</i>	58
7.4 Análisis de expresión de los genes de CN por RT-qPCR.....	58
7.5 Ensayo de germinación	59
7.6 Ensayo de generación de biomasa.....	60
7.7 Ensayos de respiración.....	60
7.8 Cuantificación de radical hidroxilo (OH ⁻)	60
7.9 Ensayos de susceptibilidad a paraquat en medio sólido.....	61
7.10 Ensayos de virulencia de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> en larvas de <i>Galleria mellonella</i>	61
7.11 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> (OP50)	61
7.12 Ensayos de toxicidad de los SS de <i>M. lusitaicus</i> en <i>C. elegans</i>	62
7.13 Análisis estadístico	63
7.14 Análisis bioinformático	63
VIII. Resultados	64
8.1 Determinación del genotipo de CN en las cepas de <i>M. lusitanicus</i>	64
8.2 Participación de las subunidades catalíticas de la CN en el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable.....	66
8.3 Función de las subunidades de la CN en el consumo de oxígeno	68
8.4 Cuantificación del radical OH ⁻ producido por las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN.....	70
8.5 Participación de las subunidades de la CN en el estrés oxidativo en <i>M.</i> <i>lusitanicus</i>	71
8.6 Participación de las subunidades de la CN en el efecto tóxico de los SS libres de células de <i>M. lusitanicus</i>	73

8.7 Participación de las subunidades de la CN en la virulencia en <i>G. mellonella</i>	75
8.8 Efecto en la morfología de las cepas mutantes en los genes que codifican a la CN en condiciones bajas de oxígeno.....	76
8.9 Componentes de la vía de la CN en la regulación de Dnm1 y Fzo1 durante el crecimiento micelial de <i>M. lusitanicus</i>	78
8.10 Función en la respiración de las proteínas Dnm1 y Fzo1 con la vía de la CN	79
8.11 Cuantificación del radical OH ⁻ de las cepas sobreexpresantes <i>dnm1</i> y <i>fzo1</i> en las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN..	81
8.12 Toxicidad de los SS generados por las cepas mutantes en las subunidades catalíticas de la CN sobreexpresando los genes <i>dnm1</i> y <i>fzo1</i>	83
8.13 Motivos de direccionalidad mitocondrial de la CN de <i>M. lusitanicus</i>	84
8.14 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaA$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN.....	86
8.15 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaC$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN.....	89
8.16 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaC$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN.....	92
8.17 Motivos de fosforilación para PKA en las subunidades de la CN, así como para factores de transcripción TEC y HAP en los promotores de los genes de las subunidades de la CN	96
IX. Discusión	97
X. Conclusión	112
XI. Bibliografía	113

Índice de figuras

Figura 1. Las especies de <i>Mucor</i> presentan dos ciclos de vida.	16
Figura 2. Fenómeno Crabtree en <i>M. lusitanicus</i>	17
Figura 3. La síntesis de rizoferina depende de un metabolismo mitocondrial.	27
Figura 4. Las proteínas G heterotriméricas intervienen en la activación de la PKA	32
Figura 6. Fusión mitocondrial	37
Figura 7. Propuesta del proceso de fisión mitocondrial en <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 8. Proceso de mitofagia en <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 9. Vía de señalización de la CN en <i>S. cerevisiae</i>	46
Figura 10. La mutante $\Delta cnbR$ creció exclusivamente como levadura en condiciones aeróbicas.....	49
Figura 11. Análisis de acumulación de RNAm de los genes CN de <i>M. lusitanicus</i>	66
Figura 12. Efecto de las distintas subunidades de la CN en la germinación aeróbica en distintas fuentes de carbono.	67
Figura 13. Efecto de las subunidades de la CN en la generación de biomasa en presencia de una fuente de carbono no fermentable	68
Figura 14. Efecto de las distintas subunidades de la CN en el consumo de oxígeno	69
Figura 16. Cuantificación del radical $OH^{\cdot}$ producido por las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN.....	71
Figura 17. Efecto de estrés oxidativo en las cepas mutantes de CN de <i>M. lusitanicus</i>	72
Figura 18. Efecto de las subunidades de la CN en la toxicidad de los SS obtenidos del crecimiento micelial y su relación con metabolismo oxidativo mitocondrial.	74
Figura 19. Participación de la cadena de transporte de electrones y las ROS en la toxicidad de los SS obtenidos a partir del crecimiento micelial de las subunidades de la CN.....	75
Figura 20. Efecto de las subunidades de la CN de <i>M. lusitanicus</i> en la sobrevivencia de <i>G. mellonella</i>	76

Figura 21. Efecto de las mutantes de los genes que codifican a la CN de <i>M. lusitanicus</i> en condiciones bajas de oxígeno.	77
Figura 22. Análisis de expresión de genes <i>dnm1</i> y <i>fzo1</i> en las subunidades de la CN de <i>M. lusitanicus</i>	79
Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de los genes <i>dnm1</i> y <i>fzo1</i> en la respiración celular de cepas mutantes en los genes que codifican a subunidades catalíticas de la CN	81
Figura 24. Producción del radical OH ⁻ por efecto de las cepas sobreexpresantes <i>dnm1</i> y <i>fzo1</i> en el fondo genético de las cepas mutantes de CN.....	82
Figura 25. Efecto en la toxicidad en <i>C. elegans</i> de los SS producidos por las cepas mutantes en los genes que codifican a subunidades catalíticas de la CN sobreexpresando los genes <i>dnm1</i> ^{O/E} y <i>fzo1</i> ^{O/E}	84
Figura 26. Identificación de sitios de direccionalidad mitocondrial en las subunidades de la CN.	85
Figura 27. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaA$ de <i>M. lusitanicus</i>	88
Figura 28. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaB$ de <i>M. lusitanicus</i>	91
Figura 29. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaC$ de <i>M. lusitanicus</i>	94
Figura 30. Análisis de factores de transcripción en las subunidades de la CN.	97
Figura 31. Modelo propuesto para las funciones de las subunidades de la CN en <i>M. lusitanicus</i>	110

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de la mucormicosis según el sitio anatómico de infección.	20
Tabla 2. Valores de pKa relacionados al grupo funcional más importante del sideróforo.	24
Tabla 3. Sideróforos producidos por las distintas especies de hongos.	25
Tabla 4. Clasificación y función de proteínas G monoméricas.	29
Tabla 5. Principales proteínas Arf que contribuyen al desarrollo micelial o levaduriforme descritas en <i>M. lusitanicus</i>	30
Tabla 6. Desfosforilación de algunas proteínas por la CN en células de humano.	43
Tabla 7. Tamaño y peso molecular de las subunidades de la CN de <i>M. lusitanicus</i>	50
Tabla 8. Identidad (%) de las subunidades de CN de <i>M. lusitanicus</i>	50
Tabla 9. Cepas utilizadas.	56
Tabla 10. cambios fenotípicos producidos por las distintas sobreexpresiones de los genes que codifican a las subunidades de las CN.....	95

Abreviaturas y símbolos

AC: Adenilato ciclasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina

CaM: Calmodulina

CN: Calcineurina

GDP: Guanosina trifosfato

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GPCR G: Receptores acoplados a proteína G

GTP: Guanosina Trifosfato

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótida

NADPH: Nicotiamida Adenina Dinucleótido fosfato

Phe-tRNA: gen de RNA de transferencia de Fenilalanina

PKA: Proteína Cinasa A

ROS: Especies reactivas de oxígeno

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

SS: Sobrenadantes

db-cAMP: dibutiril-cAMP

Prefijos

μ: micro : 1×10^{-6}

n: nano: 1×10^{-9}

Resumen

Mucor lusitanicus es un hongo dimórfico y modelo de estudio para entender la infección llamada mucormicosis. Se ha descrito la correlación del aumento del metabolismo oxidativo con la virulencia en algunos hongos patógenos. Las esporas de *M. lusitanicus* creciendo en condiciones aeróbicas y en concentraciones bajas de glucosa (0.1%), produce un micelio asociado a un metabolismo oxidativo mitocondrial incrementado y de fenotipo virulento. En cambio, en condiciones anaeróbicas crecen como levaduras, de fenotipo avirulento y asociadas a un metabolismo fermentativo. Por otra parte, la vía de la calcineurina (CN) (serina-fosfatasa dependiente de Ca^{2+}) participa en la morfogénesis y virulencia de *M. lusitanicus*. La CN es un heterodímero compuesto por una subunidad regulatoria (*M. lusitanicus* posee solo a CnbR) y una subunidad catalítica (son tres en *M. lusitanicus*: CnaA, CnaB y CnaC). El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de la vía de la CN en la regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia en *M. lusitanicus*. Para esto se usaron cepa silvestre (WT) y mutantes en las distintas subunidades de la CN (ΔcnaA , ΔcnaB y ΔcnaC), sobreexpresando o no a los genes silvestres *fzo1* y *dnm1*, cuyos productos participan en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, respectivamente. Por otra parte, debido a la presencia de múltiples subunidades catalíticas de la CN en *M. lusitanicus* y para conocer la posible redundancia funcional de las mismas, se sobreexpresaron cada uno de los genes que codifican a dichas subunidades en cada una de las cepas ΔcnaA , ΔcnaB y ΔcnaC . En general, se evaluaron diversos parámetros como el análisis de transcritos, la capacidad de crecimiento en glicerol, la respiración celular, la determinación de radical $\text{OH}^\cdot$ y la virulencia usando el modelo de *Caenorhabditis elegans* y de *Galleria mellonella*. Las cepas mutantes ΔcnaA y ΔcnaC mostraron un mayor crecimiento en glicerol, así como también mostraron los niveles más altos de respiración, la generación del radical $\text{OH}^\cdot$ y la mayor virulencia. En cambio, las mutantes ΔcnbR y ΔcnaB mostraron niveles bajos de respiración y menor virulencia respecto a la cepa silvestre (WT). La sobreexpresión de *fzo1* en las mutantes ΔcnaA y ΔcnaC aumentaron discretamente en un 10 y 30%, respectivamente, la virulencia respecto a las mutantes sencillas.

Mientras que la sobreexpresión de *dnm1* disminuyó la virulencia, restaurándola a niveles similares de la cepa WT. En conclusión, este trabajo sugiere fuertemente que algunas subunidades de la CN, como la subunidad CnaB regulan de manera positiva y otras como la CnaA y CnaC controlan negativamente la virulencia, a través de los procesos de fusión y fisión afectando la actividad del metabolismo oxidativo mitocondrial.

Además, se sugiere que la subunidad catalítica CnaB es un regulador positivo de la generación del crecimiento micelial, así como del metabolismo oxidativo mitocondrial. Por otra parte, CnaC es un regulador positivo de la generación de levaduras y es un regulador negativo del metabolismo oxidativo mitocondrial, aunque aún quedan muchos detalles por aclarar. La ausencia de CnbR ejerce una represión en la transcripción de todos los genes que codifican a las subunidades catalíticas. Sugiriendo que la mutación en *cnbR* genera una disfunción mitocondrial, lo cual explicaría, en parte, su crecimiento levaduriforme.

Palabras clave: dimorfismo, calcio, respiración, mucormicosis, proteína.

Abstract

Mucor lusitanicus is a dimorphic fungus and a study model to understand the infection called mucormycosis. The correlation of increased oxidative metabolism with virulence has been described in some pathogenic fungi. *M. lusitanicus* spores growing under aerobic conditions and in low glucose concentrations (0.1%) produce a mycelium associated with an increased mitochondrial oxidative metabolism and virulent phenotype. On the other hand, under anaerobic conditions it grows as yeast, with an avirulent phenotype and associated with a fermentative metabolism. On the other hand, it has been described that the calcineurin pathway (Ca^{2+} -dependent serine phosphatase) participates in the morphogenesis and virulence of the fungus *M. lusitanicus*. Calcineurin (CN) is a heterodimer composed of a regulatory subunit (*M. lusitanicus* has only CnbR) and a catalytic subunit (there are three in *M. lusitanicus*: CnaA, CnaB and CnaC). The objective of this work was to determine the participation of the CN pathway in the regulation of mitochondrial oxidative metabolism and virulence in *M. lusitanicus*. For this, WT strains and mutants were used in the different subunits of the CN (ΔcnaA , ΔcnaB and ΔcnaC), overexpressing or not the wild genes *fzo1* and *dnm1*, whose products participate in the processes of fusion and mitochondrial fission, respectively. On the other hand, due to the multiple catalytic subunits of CN in *M. lusitanicus*, and to know their possible functional redundancy, each of the genes that encode these subunits were overexpressed in each of the ΔcnaA , ΔcnaB strains and ΔcnaC . In general, various parameters such as transcript analysis, growth capacity in glycerol, cellular respiration, $\text{OH}^\cdot$ radical determination and virulence were evaluated using the *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* model. The ΔcnaA and ΔcnaC mutant strains showed increased growth on glycerol, as well as the highest levels of respiration, $\text{OH}^\cdot$ radical generation, and the greatest virulence. On the other hand, the ΔcnbR and ΔcnaB mutants showed low levels of respiration and lower virulence compared to the wild strain (WT). The overexpression of *fzo1* in the ΔcnaA and ΔcnaC mutants slightly increased the virulence by 10 and 30%, respectively, compared to the single mutant, while the overexpression of *dnm1* decreased the virulence, restoring it to similar levels of the WT strain. In conclusion, this work

strongly suggests that some subunits of CN, such as the CnaB subunit, positively regulate and others such as CnaA and CnaC negatively control virulence, through fusion and fission processes affecting the activity of mitochondrial oxidative metabolism.

Furthermore, the catalytic subunit CnaB is suggested to be a positive regulator of the generation of mycelial growth, in addition to mitochondrial oxidative metabolism. On the other hand, CnaC is a positive regulator of yeast generation and is a negative regulator of mitochondrial oxidative metabolism, although many details remain to be clarified. The absence of CnbR exerts repression on the transcription of all the genes that encode the catalytic subunits. Suggesting that the mutation in *cnbR* generates mitochondrial dysfunction, which would explain, in part, its yeast-like growth.

Keywords: dimorphism, calcium, respiration, mucormycosis, protein.

I. Introducción

1.1 El género *Mucor*

Los hongos pertenecientes al género *Mucor* se encuentran clasificados en la familia *Mucoraceae*, orden Mucorales y los cuales se consideraban como pertenecientes al *Phylum Zygomycota*, son organismos saprófitos, que habitan comúnmente en el suelo y el estiércol **(Cepero y col., 2012)**. La mayoría de los Mucorales tienen hifas cenocíticas (no septadas) **(Ni y col., 2011)** y las especies del género presentan dos ciclos de vida, asexual y sexual o heterotálico, es decir con dos tipos sexuales, '+' y '-' **(Li y col., 2011)**.

Hongos del género *Mucor* tienen aplicaciones en distintos campos de estudio. Por ejemplo, la producción de ciertas enzimas de interés biotecnológico, como la glucosa oxidasa (producida principalmente por *M. circinelloides*), está es utilizada en alimentos para mejorar el sabor y el color de los mismos, o en la industria farmacéutica donde se ha utilizado en kits para determinación de glucosa **(Bredenkamp y col., 2010; Morin-Sardin y col., 2017)**. También se han llegado a purificar ciertos ácidos grasos insaturados a los que se les atribuye una actividad inhibitoria para bacterias Gram positivas **(Pedraza y Campuzano, 2018)**, otra función de los ácidos grasos obtenidos de *M. lusitanicus* ha sido para la producción de biocombustibles **(Xia y col., 2011)**.

Por otra parte, en *M. lusitanicus* la luz tiene un papel importante para la biosíntesis de carotenos, los cuales son importantes para distintos sectores productivos. Estos se han descrito como antioxidantes **(El-Agamey y col., 2004)** y como pigmentos en la industria farmacéutica y cosmética **(Pedraza y Campuzano, 2018)**.

En el área de alimentos se ha destacado a *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. racemosus* y *Rhizopus microsporus* var. *microsporo* en la elaboración de distintos alimentos fermentados de la soja asiática **(Han y col., 2004; Hong y col., 2012)**. Otro, producto biotecnológico es la enzima renina, utilizada en la producción de queso, ácido fusídico y alfa-amilasa que son obtenidos a partir de distintas cepas de *Mucor* spp. **(Hermet y col., 2012)**.

1.2 *M. lusitanicus*

1.2.1 Características generales

M. lusitanicus anteriormente llamado *Mucor circinelloides f. lusitanicus*, pertenecía al grupo de los zigomicetos, sin embargo, su nombre cambió debido a un reordenamiento filogenético basado en la morfología, fisiología y comportamiento de apareamiento **(Wagner y col., 2020)**. Es un modelo de estudio en el proceso de regulación de la diferenciación celular. Contiene un genoma de 36.6 millones de pares de bases (*Mucor* CBS277.49; <http://genome.jgips.org/Mucci2/Mucci2home.html>) y 11,719 genes que se encuentran en 9 cromosomas (*Mucor* CBS277.49; <http://genome.jgips.org/Mucci2/Mucci2home.html>). Además, *M. lusitanicus* tiene un extenso repertorio molecular para el análisis de la función génica, como es el caso del silenciamiento génico **(Nicolás y col., 2003)** o la recombinación homóloga donde a través de reemplazamiento génico se obtienen mutantes por delección **(Navarro y col., 2001)**. Los conocimientos génicos y fisiológicos sobre este microorganismo pueden llegar a ser extrapolables a otros Mucorales de interés clínico.

1.2.2 Ciclo de vida de *M. lusitanicus*

El ciclo sexual de *M. lusitanicus* **(fig. 1)** se presenta cuando dos hifas de diferente tipo sexual interactúan físicamente, los núcleos sexuales ('+' y '-') de los zigóforos generados del ciclo sexual se fusionan generando progametangios, posterior a un periodo de latencia generan las zigosporas. Las zigosporas son una estructura de pared gruesa que contiene núcleos diploides. La zigospora permanece en estado de latencia y cuando hay condiciones favorables produce esporangios con esporangiosporas que se liberan y germinan.

En el caso del ciclo asexual (también llamado ciclo vegetativo), se caracteriza por la formación de esporangios que contienen esporas haploides en sus esporangióforos, posteriormente los esporangios se almacenan y maduran dando

lugar a las esporangioesporas, estas al estar en ciertas condiciones ambientales y nutricionales van a activar su metabolismo y posteriormente crecerán como micelio o como levaduras, dicho proceso se denomina dimorfismo.

Las esporangiosporas en condiciones aeróbicas y en presencia de una fuente de carbono no fermentable, como el glicerol, o en concentraciones bajas de glucosa (0.1%) y aunado a la presencia de una fuente de nitrógeno inorgánica, como el sulfato de amonio, crecen como hifas. El conjunto de hifas genera el crecimiento micelial, a este micelio se le relaciona con un aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial y de fenotipo virulento (Díaz-Pérez y col., 2020).

Por otra parte, en condiciones anaeróbicas y en presencia de una fuente de carbono fermentable y una fuente de nitrógeno orgánica las esporangioesporas crecen en forma de levadura, las cuales correlacionan con un metabolismo fermentativo y un fenotipo poco virulento (McIntyre y col., 2002; Patiño-Medina y col., 2018).

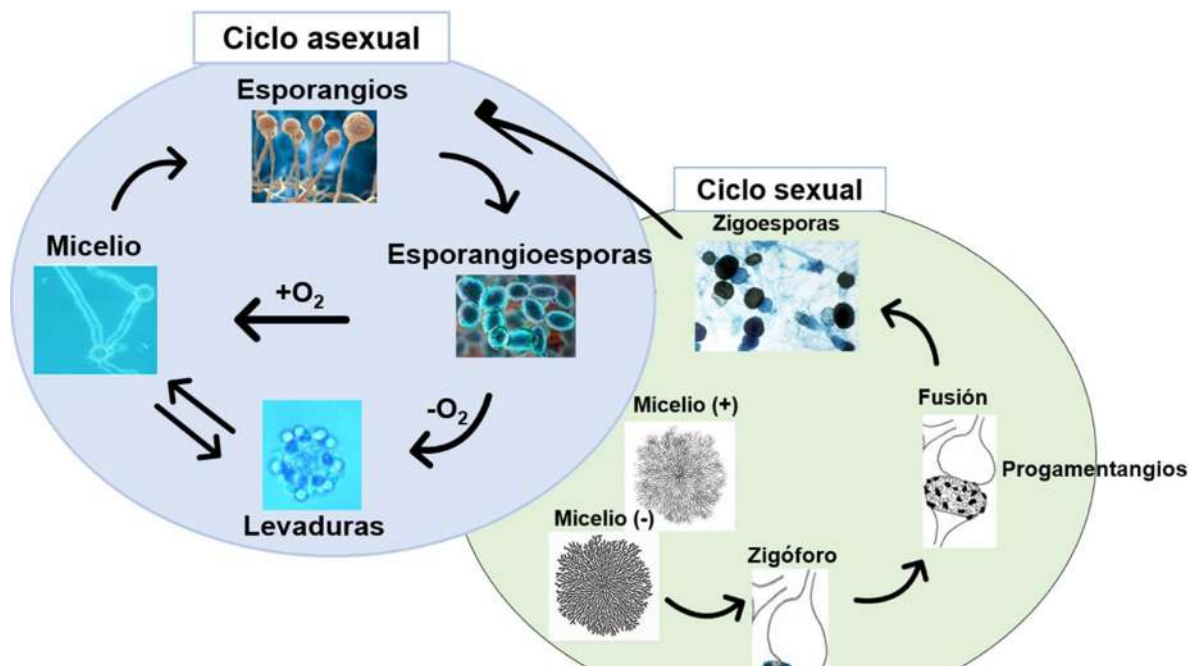


Figura 1. Las especies de *Mucor* presentan dos ciclos de vida. El ciclo de vida sexual se caracteriza por la formación de zigoesporas las cuales se forman por la fusión de zigóforos con núcleos sexuales ('+' y '-') y que a su vez está dado por la unión de dos hifas de diferente tipo sexual. Por otro lado, el ciclo asexual induce la formación de esporangioesporas, estas cuando crecen en presencia de aire crecen como micelio donde

un tubo germinativo que es llamado hifa va a crecer por el ápice formando en conjunto el micelio, por otra parte, si las esporangiosporas crecen en condiciones anaeróbicas crecen con morfología de levadura. Modificado de **López-García, 2015**.

M. lusitanicus también es considerado un organismo Crabtree positivo (**fig. 2**) en donde las esporangiosporas creciendo en condiciones aeróbicas y en presencia de altas concentraciones de glucosa ($\geq 2\%$ de glucosa) son capaces de crecer en forma de micelio. Sin embargo, este micelio está asociado con un aumento del metabolismo fermentativo y un fenotipo avirulento (**Lübbehüsen y col., 2003**).

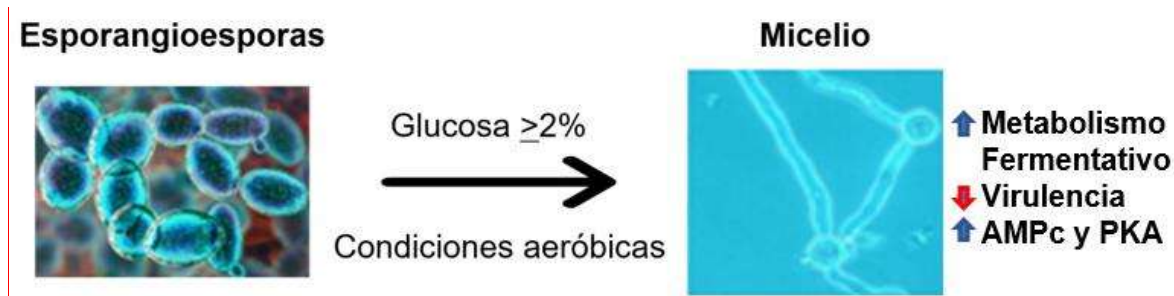


Figura 2. Fenómeno Crabtree en *M. lusitanicus*. La esporangiosporas en condiciones aeróbicas y a concentraciones de glucosa igual o mayores del 2% crecen en morfología micelial, morfología que se ha descrito por tener un aumento en el metabolismo fermentativo, aumento en las concentraciones de AMPc y aumento de la actividad de la Proteína Cinasa dependiente de AMPc (PKA), además de una disminución en su virulencia. Modificado de **Lübbehüsen y col., 2003**.

1.2.3 *M. lusitanicus* como modelo de estudio de la mucormicosis

La Organización Mundial de la Salud, con la finalidad de abordar la amenaza de los hongos causantes de enfermedades fúngicas invasivas, publicó una lista de patógenos fúngicos prioritarios, en la cual mencionan a los Mucorales como grupo de alta prioridad. La clasificación se basó en la incidencia o prevalencia de la enfermedad, área de distribución geográfica, mortalidad, complicaciones tras el tratamiento, disponibilidad de diagnóstico y tratamiento, transmisibilidad, el

potencial de brote, la preocupación por la resistencia a los antifúngicos, entre otros factores **(World Health Organization; 2022)**.

La mucormicosis es una infección de origen fúngica de carácter invasivo, sus síntomas y manifestaciones clínicas pueden ser diversos. Esta infección ha ido en aumento hasta en un 70% en los últimos años (1940-1999) **(Roden y col., 2005)**. En la India se registró un incremento en los casos de mucormicosis en pacientes graves de COVID-19, siendo conocida como la infección por el hongo negro (del inglés, “Black fungus infection”) **(Hussain y col., 2021)**. También se ha descrito que el uso de glucocorticoides (como dexametasona, prednisona o hidrocortisona) usados para aumentar la función pulmonar en pacientes graves de COVID-19, contribuyó al aumento en los casos de la mucormicosis **(Singh y col., 2021)**. Se estima que la media de prevalencia a nivel mundial es de 0.2 casos de cada 100 mil habitantes, ocurriendo el 71% de los casos en la India **(Prakash y Chakrabarti, 2019)**.

Rhizopus arrhizus se destaca por ser el principal mucoral causante de mucormicosis, en segundo lugar, se describe a *M. circinelloides* **(Reid y col., 2020)**. Otros Mucorales que producen la infección son *Rhizomucor spp.* y *Lichtheimia spp.* Las manifestaciones clínicas se han asociado a la vía de entrada del patógeno, así como a los factores de riesgo. Las manifestaciones clínicas más comunes son la rino-órbito-cerebral, cutánea y pulmonar **(Jeong y col., 2019)**. La clasificación clínica de la mucormicosis depende del sitio anatómico de la infección **(tabla 1)**. La prevalencia de la enfermedad depende del sitio anatómico; por ejemplo, la infección en los senos paranasales es del 39%, la infección pulmonar del 24%, la cutánea del 19% y en la diseminada del 23% **(Roden y col., 2005)**. En general, la mortalidad también depende de la localización anatómica de la infección, la tasa de muerte va del 40 al 70% incluso usando terapia antimicótica específica **(Roden y col., 2005)**. En el caso de la infección diseminada puede generar una tasa de mortalidad mayor al 90% **(Soliman y col., 2021)**.

Entre los factores de riesgo que propician la susceptibilidad de la mucormicosis, se encuentran: el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, utilización de catéteres en pacientes canalizados **(Hospenthal y Carswell, 2015)**,

inmunosupresión, diabetes mal controlada, traumatismos graves **(Binder y col., 2014)**.

La resistencia intrínseca a antifúngicos y un diagnóstico impreciso son los principales factores que se asocian a una alta mortalidad de los pacientes con mucormicosis **(Alastruey-Izquierdo y col., 2009; Alastruey-Izquierdo y col., 2010)**. El tratamiento antifúngico recomendado está basado en el fármaco polienico, anfotericina B liposoluble, además de su combinación con tiazoles (principalmente posaconazol) o candinas **(Martín y col., 2021)**. En México, fue reportado recientemente un caso clínico con mucormicosis con manifestaciones clínicas rino-orbito-cerebral, quien fue un paciente masculino de 52 años con antecedente de diabetes mellitus, además de neumonía secundaria por COVID-19 y previamente tratado con altas dosis de dexametasona y antibióticos. El paciente fue tratado con anfotericina B intravenosa, clindamicina y levofloxacino, además de intervención quirúrgica. El paciente presentó evolución satisfactoria después de 2 semanas de la intervención quirúrgica **(Gálvez-Romero y col., 2023)**.

Tabla 1. Clasificación de la mucormicosis según el sitio anatómico de infección.

Sitio de infección	Mecanismo de ingreso	Síntomas	Porcentaje de muerte
Rino-orbito-cerebral	Tras la inhalación de esporas y su ingreso por nariz o boca, la infección se origina en los senos paranasales y se extiende a los ojos y al cerebro	Dolor nasal, congestión nasal, fiebre, inflamación de los tejidos blandos y cefalea. También puede ocurrir ulceración nasal. Después de su progresión puede producir necrosis, progresión al sistema nervioso central	76%
Pulmonar	Tras la inhalación de esporas y su ingreso por nariz, la infección va a invadir la vía pulmonar	Fiebre, tos (productiva), dolor torácico pleurítico y disnea. Después de su progresión puede producir hemoptisis masiva y diseminación sistémica	
Cutánea/Subcutánea	Las esporas invaden en heridas o quemaduras traumáticas	Inflamación aguda de la piel, formación de abscesos, necrosis. Su progresión puede músculos, tendones y huesos. También puede haber diseminación sistémica	44%
Gastro-intestinal	Tras administración enteral de medicamentos homeopáticos y herbarios contaminados, en el caso de alimentos o bebidas contaminadas suele ser muy baja la incidencia de vía de ingreso de las esporas	Dolor abdominal, náuseas y vómitos Puede ocurrir diseminación sistémica	85%
Diseminada	Puede originarse en cualquier sitio primario de infección	Puede variar lesión cutánea metastásica	96%

Modificado de **Roden y col., 2005.**

1.3 Virulencia

1.3.1 Factores de virulencia en hongos

Se requieren de distintos procesos para que el hongo cause una enfermedad, en primer lugar, su ingreso al huésped para su multiplicación en los tejidos; para lo

cual, el patógeno debe resistir los mecanismos de defensa del huésped. A continuación, se describen algunos factores de virulencia en hongos.

1.3.1.1 Toxinas

Las toxinas producidas por hongos son denominadas “micotoxinas”, se ha descrito que la cantidad y el tipo de toxinas producidas dependen de varios factores, como la especie, la cepa, el sustrato, las condiciones ambientales y el estado fisiológico del hongo. Se les llama micotoxinas a aquellas toxinas producidas por diversos hongos, mientras que los nombres de las toxinas son específicos de ciertos géneros o especie **(World Health Organization, 2018)**.

Por ejemplo, las aflatoxinas, las cuales son compuestos químicos orgánicos no proteicos, poseen un bajo peso molecular, el esqueleto consta de un anillo de furano unido al núcleo de una cumarina. Estas toxinas son producidas por algunas especies de hongos *Aspergillus*, como *A. flavus* y *A. parasiticus*, se ha descrito que estos hongos además son capaces de producir lipasas, proteasas y glicoproteínas que contribuyen al daño tisular en el hospedero siendo principalmente plantas y animales **(Urrego y col., 2006; Brunke y col., 2016)**. También se han mencionado las ocratoxinas (derivados de una isocumarina unida a una fenilalanina por un enlace amida) producidas principalmente por *Penicillium verrucosum* **(Araguás y col., 2005)**. La ocratoxina A (OTA) es la más estudiada y dañina en humanos **(Il'ichev y col., 2002)**, debido a que se puede acumular excesivamente produciendo daño celular, ya que inhibe la síntesis de proteínas; además, se ha descrito puede ocasionar peroxidación lipídica **(Leitner y col., 2002)**. Los principales órganos descritos que acumulan principalmente la toxina son los riñones, hígado, músculo esquelético, adipocitos y el cerebro **(Pfohl-Leskowicz y Manderville, 2007)**.

Otra micotoxina descrita ha sido zeralenona o F-2 (metabolito no esteroideo de naturaleza estrogénico), producida principalmente por el hongo filamentoso *Fusarium graminearum*, su mecanismo de acción, es por la competencia con los estrógenos del huésped, el ingreso de F-2 activa a los receptores de estrógeno. En caso de la ingestión de grandes cantidades provoca infertilidad en humanos, otras

patologías asociadas en humanos han sido el cáncer de esófago, también se han descrito efectos nefrotóxicos y hepatotóxicos en modelos biológicos (**Awuchi y col., 2022**).

1.2.1.2 Biopelículas

Las biopelículas en hongos son comunidades multicelulares de hongos adheridas a una superficie y rodeadas de una matriz extracelular, donde la matriz extracelular está compuesta principalmente de exopolisacáridos, proteínas, DNA y otros componentes. Las biopelículas protegen al hongo de los agentes antifúngicos, de la respuesta inmunológica del huésped y el estrés ambiental (**López-Martínez, 1993**). Por ejemplo, las biopelículas en el hongo dimórfico *Candida albicans* (**Nieminen y col., 2014**) favorecen la resistencia de antifúngicos (**Taff y col., 2013**). Cerca del 65% de las infecciones por algún organismo patógeno en humanos están relacionadas con su capacidad de formar biopelículas (**Costerton y col., 1999**).

1.3.1.3 Metabolismo oxidativo-fermentativo

El piruvato se obtiene a partir de la glucosa por medio de la glucólisis o en el catabolismo de algunos aminoácidos. En algunos microorganismos, incluidos los hongos, el piruvato se convierte a acetaldehído gracias a la acción de la enzima piruvato descarboxilasa, posteriormente el acetaldehído es transformado por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh) produciendo etanol. La enzima Adh es esencial en el proceso de fermentación de los hidratos de carbono (**Nieminen y col., 2014**). Se ha descrito la función de la Adh en diversos organismos, tal es el caso del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, en donde la mutación del gen *alcC* produjo un aumento de la respuesta inflamatoria en los pulmones de ratones inmunosuprimidos (**Grahl y col., 2011**).

En el caso del hongo dimórfico *C. albicans*, la Adh1 tiene una función en la restricción de formación de biopelículas debido a que la mutante del gen *adh1*

produjo un aumento en la formación de biopelículas, daño tisular y de tejido comparado con la cepa silvestre (WT) **(Mukherjee y col., 2006)**.

1.3.1.4 Sideróforos

Los hongos que infectan a humanos necesitan hierro para un crecimiento exitoso, adquieren el hierro del grupo hemo de la hemoglobina de la sangre o de otras fuentes, lo cual favorece la virulencia del hongo. Este secuestro lo realiza por diferentes mecanismos, tal es el caso de la absorción reductora de alta afinidad o el uso de sideróforos **(Bairwa y col., 2017)**.

Los sideróforos son descritos como compuestos que poseen bajo peso molecular (500 a 1500 Daltons), estos se producen en hongos, plantas (fitosideróforos) **(Hider y Kong., 2010)** y en bacterias **(Khasheii y col., 2021)**.

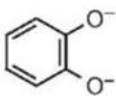
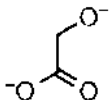
El proceso de captación de hierro de los sideróforos implica la afinidad al hierro férrico (Fe^{3+}) extracelular disponible, donde los sideróforos poseen una alta afinidad ($k_f > 10^{30}$). Sin embargo, dependiendo de los grupos funcionales presentes en los sideróforos, como los catecolatos, hidroxamatos, ácidos α -hidroxicarboxílicos entre otros, varía su afinidad por el (Fe^{3+}) **(Hider y Kong, 2010)**.

Se mencionan los valores de pKa que se han relacionado con la afinidad de los diferentes grupos funcionales en algunos sideróforos **(tabla 2)**. En el caso de los sideróforos de tipo catecolato, gracias a su grupo funcional orto-fenolato posee una alta afinidad por el Fe^{3+} , debido a su alta densidad de carga, como lo indica los valores pKa que se describe en la **tabla 2 (Hider y Kong, 2010)**.

En el caso de los sideróforos hidroxamatos, utilizan un grupo hidroxamato para unir el hierro como las ferroxaminas, fusarinas, etc.

Los sideróforos ácidos α -hidroxicarboxílicos poseen un grupo similar al de un hidroxamato, en el que se sustituye uno de los radicales por un doble enlace con oxígeno y un nitrógeno del esqueleto por un carbono **(Narrillos-Rodríguez, 2014)**.

Tabla 2. Valores de pKa relacionados al grupo funcional más importante del sideróforo.

Nombre del sideróforo	Estructura	Valor pKa
Catecolato		9.2-13.0
Hidroxamatos		9.0
α -hidroxicarboxilato		3.0-14

Modificada de Hider y Kong, 2010.

Los complejos sideroforos- Fe^{3+} son transportados al interior de la célula a través de un sistema de transportadores dependientes de ATP (**Hider y Kong., 2010**), una vez que se encuentra el hierro en el citoplasma se reducirá de Fe^{3+} a Fe^{2+} (**Neilands, 1995**) a través de la enzima ferri-sideróforo reductasa. Esta enzima utiliza NADPH o NADH como donadores de electrones y libera el hierro del complejo sideróforo, el cual puede ser usado o almacenado por la célula (**Emery, 1982**).

Se han aislado sideróforos de muchas clases de hongos, incluidos basidiomicetos, ascomicetos, zigomicetos y deuteromicetos, siendo los hidroxamatos (familias de ferricromo, coprogénico, triacerrilfusarinina) los más prevalentes (**Hider y Kong, 2010**). Por ejemplo, el hongo ascomiceto micelial *A. nidulans* que tiene la capacidad de capturar a sideróforos producidos por otros hongos, tal es el caso del sideróforo perteneciente a los hidroxamatos llamado ferrirubina que es sintetizado por *Aspergillus ochraceus* (**tabla 3**) (**Haas, 2003**).

Tabla 3. Sideróforos producidos por las distintas especies de hongos.

Especie (hongo)	Sideróforos relacionados
<i>A. nidulans</i>	Fusarinina C
	Triacetilfusaririna C
	Ferricrocina
<i>Neurospora crassa</i>	Coprogeno
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	Ácido rodotorulico
<i>Ustilago maydis</i>	Ferricromo
	Ferricromo A
	Ferricromo

Tomado de **Haas, 2003**.

1.3.2 Factores de virulencia en *M. lusitanicus*

1.3.2.1 Alcohol deshidrogenasa (Adh1)

La enzima Adh1 produce etanol por medio de la reducción de acetaldehído. En *M. lusitanicus* la expresión del gen *adh1* es mayor en levaduras en comparación con el micelio (**Rangel-Porras y col., 2019**), sugiriendo que la Adh1 es necesaria para el crecimiento levaduriforme, lo cual fue confirmado por la mutación del gen correspondiente (**Rangel-Porras y col., 2019**).

La mutación del gen *adh1* (cepa M5) produjo un fenotipo incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas, mostró una baja producción de etanol en cultivos aeróbicos en presencia de glucosa, tuvo una baja actividad de alcohol deshidrogenasa (dependiente de NADH) (**Rangel-Porras y col., 2019**) y produjo un fenotipo con mayor virulencia en un modelo de ratón, comparado con la cepa WT (R7B). Además, en ensayos de toxicidad del sobrenadante de cultivo libre de células (SS) de la cepa M5 mostró un mayor efecto tóxico en nematodos comparado con aquel de la cepa WT, por lo que se sugiere que probablemente la hiperproducción de acetaldehído en la cepa M5 condujo al fenotipo virulento (**Díaz-Pérez y col., 2020**).

1.3.2.2 Adquisición de hierro

Los Mucorales requieren de hierro del medio ambiente o del huésped para poder crecer y causar la infección, lo adquieren mediante la absorción reductora de hierro, que a su vez implica la reducción del ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}) soluble por medio de reductasas férricas y la reoxidación a su forma Fe^{3+} por ferroxidasas. En *M. lusitanicus* se han descrito a las ferroxidasas Fet3a, Fet3b y Fet3c; se ha sugerido que *fet3c* juega un papel importante en la virulencia mientras que se ha propuesto que *fet3a* y *fet3b* complementan la función de *fet3c* (**Navarro-Mendoza y col., 2018**).

Otra forma en que los hongos obtienen el hierro es por medio de los sideróforos, los cuales son secretados y unen el hierro. Los Mucorales secretan rizoferina (**Bairwa y col., 2017**) sin embargo, aún queda por dilucidar el mecanismo por el cual actúa en el contexto de virulencia.

El sideróforo rizoferina pertenece a la familia de los policaboxilatos (**fig. 3**) y es sintetizado por la péptido sintetasa no ribosomal de tipo NIS, codificada por la enzima Rfs, la cual usa citrato y diaminobutano como sustratos, donde el citrato proviene del metabolismo mitocondrial (**Carroll y col., 2017**) y el diaminobutano (sustancia orgánica diamina que se produce a partir de la ornitina que a su vez es derivada de la arginina).

Además, se ha descrito que el glutamato que se forma a partir del intermediario α -cetoglutarato del ciclo de Krebs, puede participar en la síntesis de putrescina por acción de ornitina descarboxilasa (**Tabor y Tabor, 1972**). De esta manera se explica, en parte, la dependencia del metabolismo oxidativo mitocondrial para la producción de rizoferina. Por otra parte, se ha descrito que la mutante en el gen *rfs*, produjo un fenotipo de menor virulencia en un modelo de ratón diabético, mientras que los SS libres de células obtenidos a partir de la cepa Δrfs generaron una menor toxicidad en *C. elegans* (**Alejandro-Castañeda y col., 2022**).

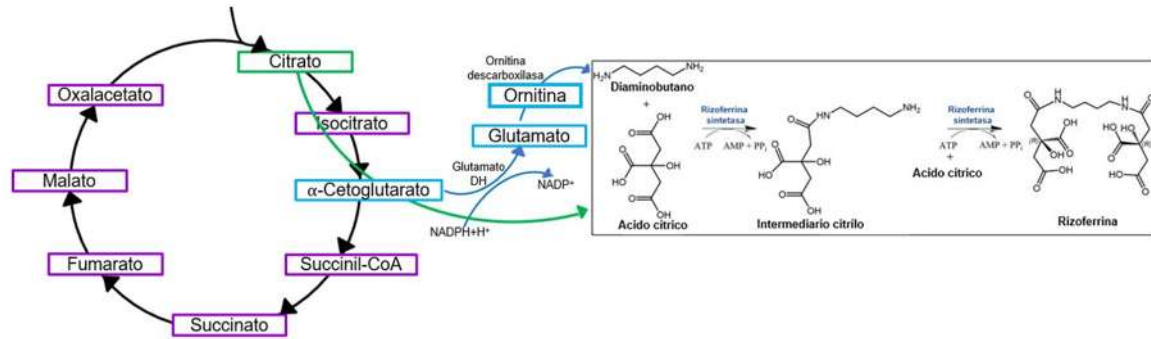


Figura 3. La síntesis de rizoferina depende del metabolismo mitocondrial. La rizoferina consta de una molécula de diaminobutano unida a dos moléculas de ácido cítrico con configuración R,R alrededor de un centro quiral. Ambas moléculas provienen del ciclo de Krebs, el citrato proviene directo del metabolismo mitocondrial, mientras que el diaminobutano de manera indirecta. Modificado de **Carroll y col., 2017**.

1.3.3 Proteínas G monoméricas

Las proteínas G monoméricas se dividen en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (**Li y col., 2022**). Estas proteínas desempeñan diversas funciones en la célula, todas ellas importantes (**tabla 4**).

Los miembros de la familia Arf pertenecen a la superfamilia Ras, que incluye también proteínas similares a Arf (Arl) y Sar (asociadas a la secreción y relacionadas con Ras) (**Kahn y col., 2006**).

La familia Arf está conformada por 3 grupos en los cuales se encuentran las proteínas Arf (ADP ribosylation factor), las proteínas Arl (Arf-like) y las proteínas Sar (Secretion-Associated and Ras-related protein). En *M. lusitanicus* han sido descritas Arf1 a Arf4, Arl1 y Arl2 (**tabla 5**).

En *S. cerevisiae* se sabe que algunas proteínas Arf, como Arl1 (proteína similar a Arf1), contribuyen a la función y morfología mitocondrial (**Ackema y col., 2014; Ackema y col., 2016**). Mientras que algunas proteínas Arf controlan el sitio de contacto entre el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias (**Ackema y col., 2016**).

Anteriormente, se reportaron dos proteínas Arl en *M. circinelloides*, Arl1 y Arl2 quienes comparten entre ellas alrededor del 55% y 81% de identidad y similitud,

respectivamente, y comparten el 72.63% y el 52.46% de identidad con ARL1 de *S. cerevisiae*, respectivamente (siendo Arl1 de *M. circinelloides* el ortólogo de ARL1 de *S. cerevisiae*). El ARNm de *arl1* se acumula principalmente durante el crecimiento micelial, mientras que los niveles de ARNm de *arl2* son mucho más bajos que los de *arl1* y mostraron una expresión constitutiva durante el dimorfismo **(Patiño-Medina y col., 2019)**.

Tabla 4. Clasificación y función de proteínas G monoméricas.

Familia	Descripción
Ras	Oncoproteínas Ras sarcoma, tienen actividad GTPasas cuya función radica en ser interruptores moleculares regulados por GDP/GTP regulando redes de señalización en el control de la expresión génica, diferenciación, supervivencia entre otros.
Rho	Proteínas Ras homólogas (Rho) regulan la organización del citoesqueleto de actina, contribuyen en el ciclo celular y expresión génica.
Rab	Proteínas similares a R en el cerebro (Rab). Encargadas de regular el transporte vesicular y en el tráfico de proteínas entre diferentes orgánulos que conforman la vía endocítica y la secretora, también actúan como facilitadores en la formación de vesículas que contribuyen en la gemación, fusión y liberación en el compartimento aceptor.
Ran	Proteína nuclear similar a R (Ran). Se caracteriza por ser la GTPasa de menor tamaño y de mayor abundancia en la célula. Contribuye en el transporte nucleocitoplasmático de ARN y proteínas.
Arf	Proteínas de la familia del factor de ribosilación ADP (Arf). Son encargadas de regular el transporte vesicular actuando en múltiples pasos. Como: Arf1 que interviene en la formación de vesículas recubiertas con proteína de cubierta I (COPI) estas están relacionadas con el transporte retrógrado entre el Golgi y el RE.

Modificada de **Li y col., 2022.**

Tabla 5. Principales proteínas Arf que contribuyen al desarrollo micelial o levaduriforme descritas en *M. lusitanicus*.

Proteína	Descripción	Referencia
Arf2	Necesaria para el desarrollo levaduriforme	Patiño-Medina y col., 2018
Arf1, Arf3, Arf4	Necesarias para el desarrollo micelial, el número, longitud y polaridad de las hifas y con ello aumento de virulencia	Patiño-Medina y col., 2018
Arl1 y Arl2	Esencial y necesaria para el desarrollo micelial como aumento en su longitud y virulencia, También contribuye a la función y morfología mitocondrial	Patiño-Medina y col., 2019

1.3.4 Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas (PGH) ejercen funciones indispensables en la regulación de diversas funciones de células eucariotas, como el reconocimiento de señales externas (nutrientes, factores de crecimiento hormonal, neurotransmisores) para dar respuestas celulares (**Wootten y col., 2018**). En los hongos, las proteínas G heterotriméricas desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento, esporulación y producción de metabolitos secundarios (**fig. 4**) (**Li y col., 2007**). Las PGH se componen por un trímero conformado por: las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ Y $G\gamma$, cuando estas subunidades se encuentran unidas están en su estado inactivo. Este trímero es activado, a través de la interacción de un ligando (señal) con un receptor acoplado a PGH en la membrana plasmática (denominados por sus siglas en inglés como GPCR, G protein-coupled receptors).

El receptor GPCR puede actuar como un intercambiador de nucleótidos de guanina (por las siglas del inglés GEF, Guanine nucleotide exchange factor) en la subunidad $G\alpha$ permitiendo que esta subunidad intercambie el GDP por GTP. La unión del GTP en la subunidad $G\alpha$, produce un cambio en su conformación resultando en la disminución de la afinidad por el dímero $G\beta$ - $G\gamma$, ocurriendo una disociación del

trímero. La subunidad activada $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta$ - $G\gamma$ de manera independiente regulan distintas vías de señalización. Finalmente, la subunidad $G\alpha$ hidroliza el GTP a GDP mediante la interacción con una proteína activadora de actividad de GTPasa (por las siglas del inglés guanosina trifosfatasa), generando $G\alpha$ -GDP, y en este estado inactivo se vuelve a formar una asociación del trímero inactivo **(Ghosh y col., 2017)**.

La subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta$ - $G\gamma$ interactúan y alteran la actividad de diversas proteínas efectoras, como el adenilato ciclasa (AC), quien sintetiza el AMPc a partir del ATP. El AMPc se une a la Proteína Cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual es una enzima conformada por dos subunidades idénticas con función regulatoria, PkaR y dos subunidades idénticas con actividad catalítica, PkaC. Al unirse el AMPc a las subunidades PkaR se genera un cambio en la conformación de dichas subunidades, disminuyendo su afinidad por las subunidades PkaC, conduciendo a la liberación de las PkaC quienes fosforilan a otras proteínas y alteran sus funciones, generando diversas respuestas fisiológicas **(Sassone, 2012)**.

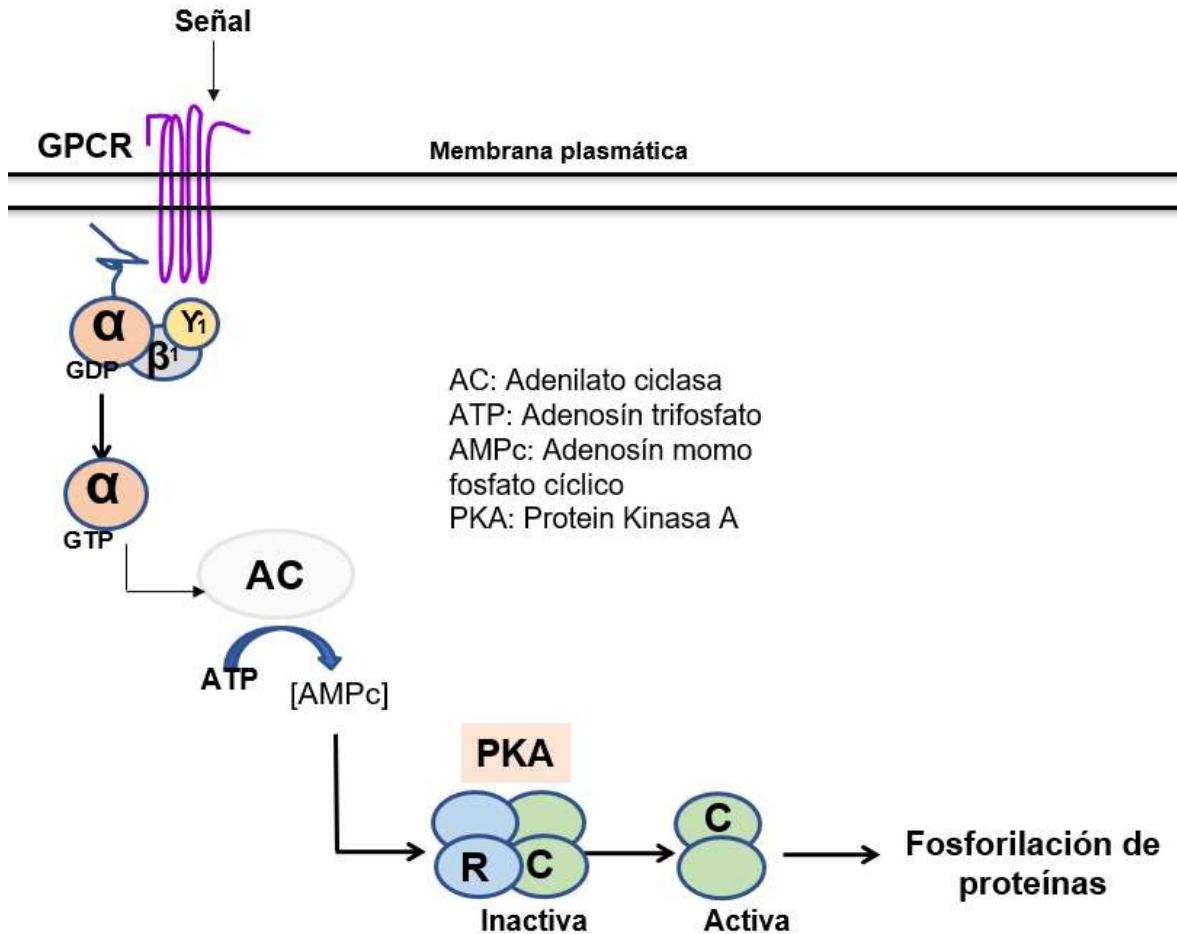


Figura 4. Las proteínas G heterotriméricas intervienen en la activación de la PKA. Se muestran la vía de señalización de la PKA la cual requiere de las proteínas G heterotriméricas. Modificado de **Ocampo y col., 2009**.

Se reportó que el genoma de *M. lusitanicus* posee el mayor repertorio de genes que codifican a subunidades de proteínas G heterotriméricas en hongos, siendo 12 G α : Gpa1-Gpa12; 3 G β : Gpb1-Gpb3 y 3 G γ : Gpg1-Gpg3. En comparación con otros hongos como el ascomiceto levaduriforme *Saccharomyces cerevisiae* que posee 2 G α : (Gpa1 y Gpa2); 1 G β : (Ste4p) y 1 G γ : (Ste18p) (**Valle-Maldonado y col., 2015**). La acumulación de ARNm de *gpb1* fue mayor en el crecimiento micelial comparado con las otras subunidades G β , sugiriendo que Gpb1 tiene un papel relevante en el crecimiento micelial, estadio morfológico relacionado con el aumento en la virulencia. Además, al realizar ensayos con la cepa $\Delta gpb1$ en condiciones donde se disminuyó la concentración de oxígeno (7.3% de O₂), dicha mutante produjo una

mayor generación de levaduras en comparación con la cepa WT, relevando de esta manera la importancia de Gpb1 en el crecimiento de las hifas en dichas condiciones. Gpb1 es un regulador negativo de la virulencia debido a que al realizar ensayos de virulencia con la cepa $\Delta gpb1$ en ratones diabéticos (inducidos con estreptozotocina) produjo una menor mortalidad en los ratones, comparado con los que fueron inoculados con las esporas de la cepa WT **(Valle-Maldonado y col., 2020)**.

1.3.5 Vía de la Proteína Cinasa dependiente de AMPc en *M. lusitanicus*

M. lusitanicus posee 4 subunidades regulatorias: PkaR1-PkaR4 **(Ocampo y col., 2009; Ocampo y col., 2012)** y 10 subunidades catalíticas: PkaC1-PkaC10 **(Fernández y col., 2016)**. Se tienen todas las cepas mutantes en los genes *pkaR* **(Ocampo y col., 2009; Ocampo y col., 2012)**, lo cual ha permitido conocer que la subunidad PkaR1 es crucial para el crecimiento micelial **(Ocampo y col., 2009)**, aunado a que el RNAm de *pkaR1* se acumula principalmente la fase micelial **(Valle-Maldonado y col., 2015)**.

Se reportó que la inoculación intraperitoneal de esporas de las cepas WT y $\Delta pkaR1$ de ratones diabéticos (inducidos con estreptozotocina), condujo a un mayor porcentaje de supervivencia de los ratones infectados con la cepa $\Delta pkaR1$ comparado con aquellos infectados con la cepa WT. Por otra parte, cuando fue evaluada la toxicidad de los SS libre de células obtenidos a partir del crecimiento micelial de las cepas WT y $\Delta pkaR1$ frente a *Caenorhabditis elegans*, se observó que los SS de la cepa $\Delta pkaR1$ tuvieron una menor toxicidad, comparado con los de la cepa WT. Sugiriendo que, al igual que Gpb1, PkaR1 regula positivamente la virulencia en *M. lusitanicus* **(Valle-Maldonado y col., 2020)**. También se ha descrito que la mutación del gen *pkaR1* correlacionó negativamente con la regulación de *rfs* y disminución de la producción de rizoferrina en *M. lusitanicus*, indicando la relevancia de la regulación de la vía PKA en la producción de rizoferrina **(Alejandre-Castañeda y col., 2022)**. Aún se desconoce el mecanismo molecular por el cual PkaR1 regula este proceso.

Se ha sugerido que el metabolismo oxidativo tiene una función importante en el aumento de la virulencia en *M. lusitanicus*. Por lo que es de interés el indagar sobre algunos procesos involucrados en la dinámica mitocondrial.

1.4 Homeostasis mitocondrial

Las mitocondrias tienen diversos procesos bioquímicos que involucran la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos y biosíntesis del grupo hemo **(Mishra y Chan, 2016)**.

Cumplir con la demanda energética requiere de la capacidad para obtener la energía de los nutrientes, donde a su vez los estados metabólicos de las mitocondrias dictan su tamaño, forma, función y posición en el citoplasma **(Yu y Pekkurnaz, 2018)**. Por lo que, con la finalidad de cumplir con las necesidades energéticas celulares, las mitocondrias adaptan su morfología y función por medio de estímulos fisiológicos, que involucran la regulación de diversos procesos que en conjunto se conocen como dinámica mitocondrial (comprende diversos procesos como biogénesis, fusión, fisión y mitofagia) **(Ugarte-Urbe y col., 2014) (fig. 5)**.

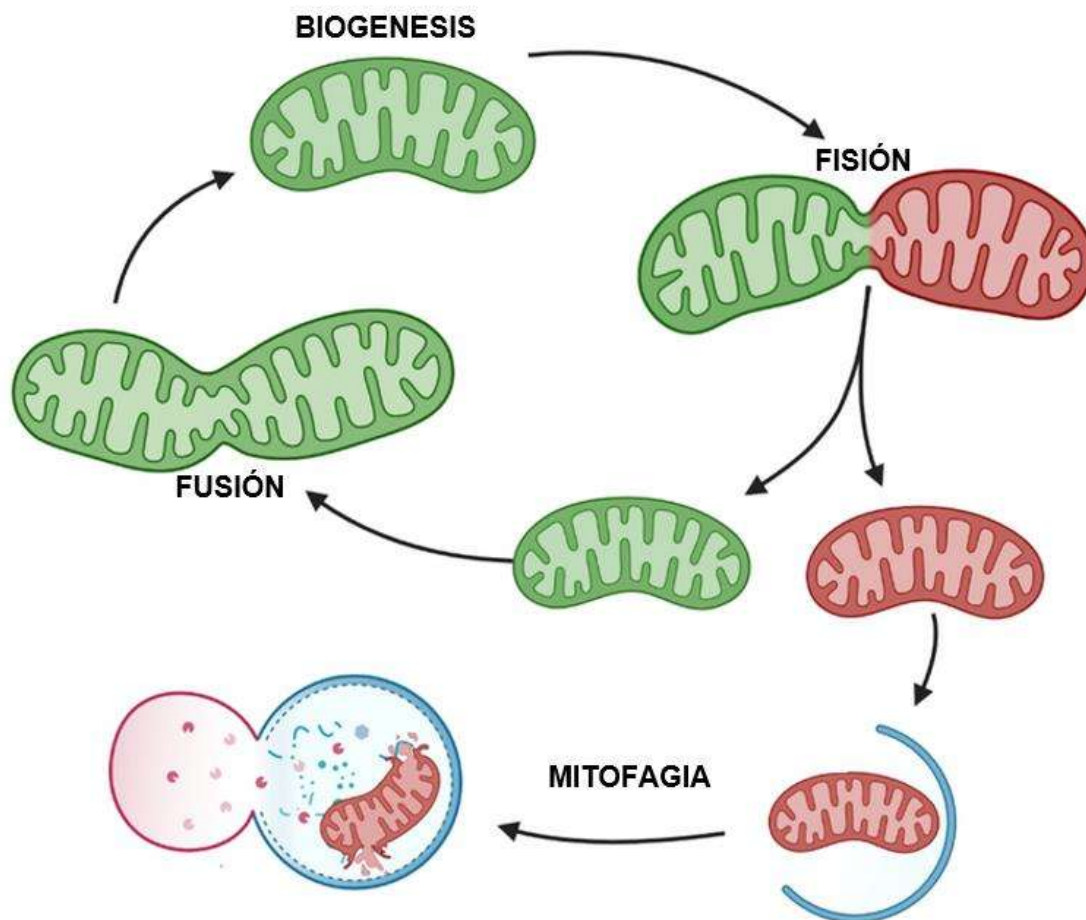


Figura 5. Descripción general de la dinámica mitocondrial. Los distintos procesos conocidos como dinámica mitocondrial dependen, en parte, de los requerimientos energéticos de la célula. En la biogénesis mitocondrial son obtenidas nuevas mitocondrias. El proceso de fisión ocurre cuando el estrés o el daño en la mitocondria causa la despolarización de la membrana mitocondrial, las mitocondrias disfuncionales (rojo) se fisionan con las mitocondrias sanas (verde) serán enviadas a la degradación mediante mitofagia. Para que se mantenga el conjunto de mitocondrias saludables se fusionan. Obtenido de **Fisher y col., 2022**.

1.4.1 Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial, como su nombre lo dice, se refiere a la generación de nuevas mitocondrias. Se ha descrito que la regulación negativa de la biogénesis mitocondrial es considerada como un control de calidad, este proceso puede estar

mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS); por ejemplo, en *S. cerevisiae* un aumento de las ROS en la mitocondria disminuye la biogénesis mitocondrial **(Yoboue y col., 2014)**.

El proceso de biogénesis mitocondrial es uno de los más complejos de la dinámica mitocondrial y está bajo la regulación del complejo Hap. En la levadura *S. cerevisiae* los complejos de transcripción heterotriméricos, están conformados por Hap2, Hap3 y Hap4 los cuales están altamente conservados en células eucariotas, este complejo se une al ADN reconociendo a la caja consenso Hap. En *S. cerevisiae* se ha descrito la secuencia consenso 5'-CCAAT-3' la cual se encuentra 75-80 pares de bases río arriba respecto del sitio de inicio de la transcripción **(Mao y Chen 2019)**. Además, en *S. cerevisiae* el complejo Hap es un mecanismo de ajuste redox que se adapta al estrés oxidativo manteniendo así el equilibrio redox para sobrevivir en el entorno del huésped **(Marinho y col., 2014)**. En *C. albicans* se ha mencionado que, en altas concentraciones de hierro, el complejo Hap (Hap2, Hap31/32 y Hap5) interviene en la regulación positiva de la expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo como *CAT1* (codifica para una catalasa), *SOD4* (codifica para la superóxido dismutasa), *GRX5* (codifica para la glutaredoxina 5) y *Trx1* (codifica para la tioredoxina 1) **(Chakravarti y col., 2017)**.

1.4.2 Fusión mitocondrial

En el proceso de fusión mitocondrial, las mitocondrias se van a unir para formar una red de mitocondrias las cuales son llamadas supermitocondrias **(fig. 6)**, en este proceso la síntesis de ATP está favorecida y a su vez se genera una mayor actividad mitocondrial **(Müller y col., 2015)**. Se requiere de ciertas proteínas para promover la fusión de membranas mitocondriales, tal es el caso de la GTPasa similar a la dinamina Mfn1 y Mfn2 (Homologo Fzo1 en hongos), la cual se localiza en las membranas mitocondriales externas y las mitofusinas Opa1 (Homologo Mgm1/Msp1 en hongos) localizada en las membranas mitocondriales internas. La proteína Fzo1 es la encargada de regular la fusión mitocondrial mientras que las

mitofusinas Mgm1/Msp1 mediante la dimerización intervienen en la unión a las mitocondrias (**Koshiba y col., 2004**).

En *S. cerevisiae* la ausencia de Fzo1 generó mitocondrias fragmentadas y produjo un menor crecimiento en una fuente de carbono no fermentable, sugiriendo que la función mitocondrial (determinada por la tasa de respiración principalmente) estaría afectada en ausencia de la proteína Fzo1 (**Dong y col, 2021**).

En *Cryptococcus neoformans* el proceso de fusión mitocondrial está relacionado con una mayor capacidad de eliminación de las ROS, disminuyendo el daño oxidativo (**Chang y Doering, 2018**).

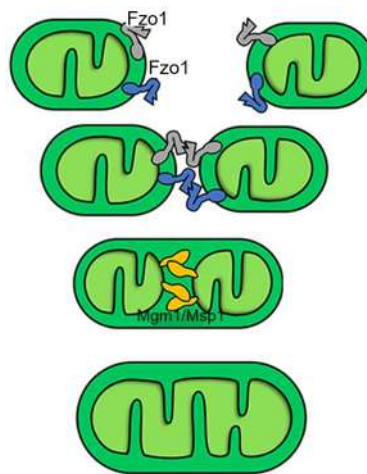


Figura 6. Fusión mitocondrial. En este proceso la región C-terminal de Fzo1 contribuye como mediador de la unión de 2 mitocondrias, que por otra parte las proteínas de membrana interna (Mgm1/Msp1) participan en la unión y fisi3n en la membrana interna mitocondrial lo que dar3 origin a una red mitocondrial. Normalmente en este proceso esta red mitocondrial se encuentra en c3lulas con una respiraci3n activa, por lo que est3 favorecida la s3ntesis de ATP. Modificado de **Chiong y col., 2014**.

1.4.3 Fisi3n mitocondrial

La fisi3n mitocondrial permite la formaci3n de mitocondrias metab3licamente diferentes a las producidas por la fus3n mitocondrial; la s3ntesis de ATP disminuye en las mitocondrias en fisi3n, lo cual generar3 una menor actividad mitocondrial y una menor respiraci3n (**Twig y col., 2008**). Adem3s, se ha reportado en mam3feros

que la fisión mitocondrial está regulada positivamente por el aumento de la generación de las ROS y en consecuencia contribuye a eliminar las mitocondrias dañadas por medio de la mitofagia **(Matus y col., 2021)**. En los hongos, las principales proteínas que intervienen en el proceso de fisión son Dnm1, Mdv1 y Fis1. La proteína citosólica Dnm1 con actividad de GTPasa, está relacionada estructuralmente con la dinamina, y es considerada la proteína principal de la fisión mitocondrial **(Mozdy y col., 2000)**.

La mutación del gen *dnm1* en *C. albicans* produjo cambios en las proteínas relacionadas a las estructuras mitocondriales, así como alteración en la pared celular y en la membrana plasmática en comparación con la cepa WT. Pruebas de susceptibilidad contra los antifúngicos SM21, anfotericina B, caspofungina y voriconazol, revelaron una mayor susceptibilidad de la cepa $\Delta dnm1$ respecto a la cepa WT. Sugiriendo un vínculo entre el proceso de fisión mitocondrial y la formación de la pared celular en *C. albicans*. Además, la cepa $\Delta dnm1$ redujo su capacidad antioxidante y aumentó la peroxidación lipídica **(Truong y col., 2019)**.

La proteína Dnm1 tiene un papel importante en los hongos patógenos *C. neoformans*, *A. fumigatus* y *Magnaporthe oryzae*, la mutación en el gen *dnm1* produjo un fenotipo con defectos en la morfología mitocondrial y una fisión reducida comparado con la cepa WT **(Koch y Traven, 2019)**.

En *Hansenula polymorpha* se ha descrito que la delección de *mdv1* condujo a un defecto en la fisión mitocondrial, observándose un colapso de las mitocondrias **(Nagotu y col., 2008)**.

En el proceso de fisión mitocondrial **(fig. 7)**, la proteína Dnm1 es reclutada en las mitocondrias por las proteínas de membrana externa mitocondrial, Fis1 y Mdv1. La proteína Mdv1 se encarga de unir a Fis1 y a Dnm1 para que juntas intervengan en la fisión de las mitocondrias. La proteína Dnm1 se oligomeriza formando un anillo, el cual contrae a la membrana mitocondrial por medio de la hidrólisis de GTP **(Koch y Traven, 2019)**.

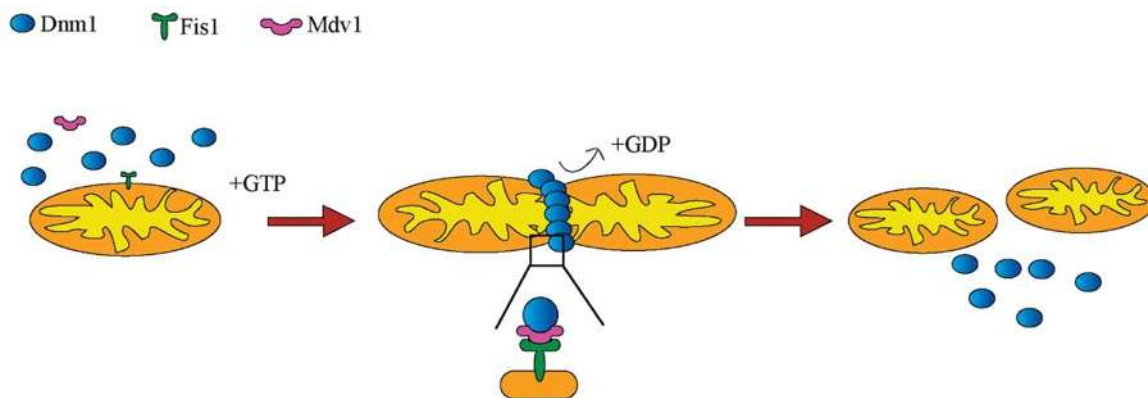


Figura 7. Propuesta del proceso de fisión mitocondrial en *S. cerevisiae*. Esquema representativo de la maquinaria de fisión mitocondrial basado en la levadura *S. cerevisiae* en el cual intervienen las proteínas Dnm1 Fis1 y Mdv1, Dnm1 es una proteína citosólica mientras Fis1 y Mdv1 son proteínas mitocondriales. Obtenido de **Koch y Traven, 2019**.

1.4.4 Mitofagia

La mitofagia es un tipo de autofagia específica, pero esta es exclusiva en el recambio de las mitocondrias. Este proceso es necesario para la eliminación de mitocondrias dañadas lo que permite mantener una cantidad adecuada de mitocondrias funcionales. En levaduras el proceso de mitofagia requiere de la proteína Atg32 localizada en la membrana mitocondrial externa, esta proteína sirve como receptora de las proteínas Atg11 y Atg8 las cuales son reclutadas y contribuyen a la mitofagia (**Schuster y Okamoto, 2022**).

Se ha descrito en *S. cerevisiae* (**fig. 8**) a la proteína caseína quinasa 2 (CK2), la cual fosforila a la proteína Atg32, induciendo el proceso de mitofagia, posteriormente la proteína Atg11 (proteína adaptadora que está involucrada en la autofagia selectiva) interactúan con Atg32 para que se pueda inducir el proceso de mitofagia, donde las mitocondrias se dirigen a la vacuola para su degradación. Se ha descrito que en la mitofagia pueden participar otras proteínas como la fosfatasa Ppg1, la cual es similar a la fosfatasa 2A (PP2A) y tiene un papel importante en la desfosforilación de Atg32 en la región aminoacídica 151-200 para inducir la mitofagia. Al eliminar esta región de aminoácidos de Atg32 causó el mismo fenotipo como inductor de mitofagia (**Furukawa y col., 2018**).

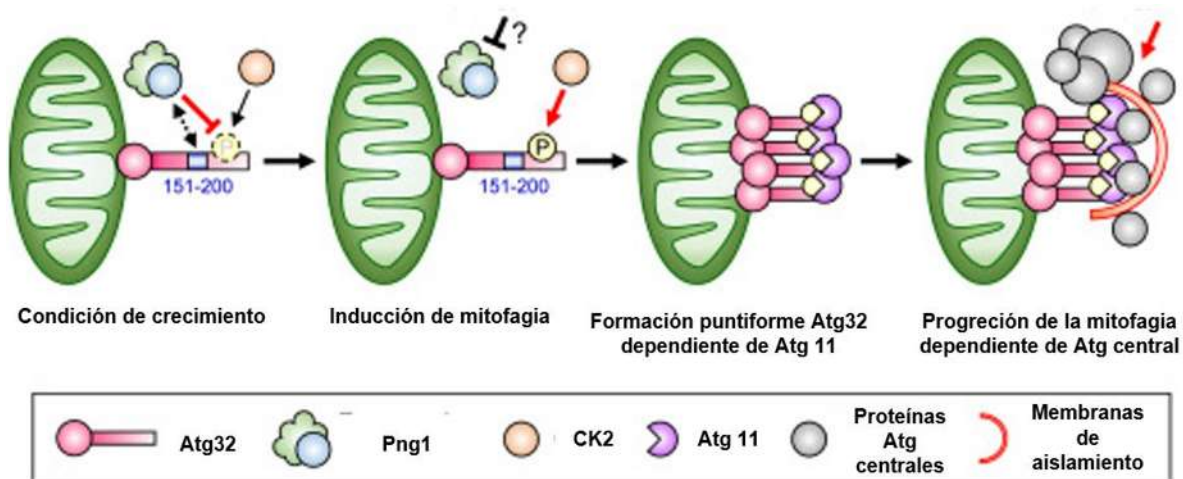


Figura 8. Proceso de mitofagia en *S. cerevisiae*. El proceso de mitofagia está conformado por varias etapas en la cual intervienen diversas proteínas entre ellas las Atg juega un papel importante, la cinasa CK2 interviene en la fosforilación y la fosfatasa Png1 en la desfosforilación. Modificado de **Furukawa y col., 2018**.

II. Antecedentes

2.1 Metabolismo mitocondrial y fermentativo involucrado en morfogénesis y virulencia de *M. lusitanicus*

Se ha sugerido que el metabolismo oxidativo tiene una función importante en el aumento de la virulencia en *M. lusitanicus*. Por ejemplo, la anulación del metabolismo fermentativo por mutación del gen *adh1*, el cual codifica a la alcohol deshidrogenasa 1, generó una mutante monomórfica micelial (**Rangel-Porras y col., 2019**), e hipervirulenta (**Díaz-Pérez y col., 2020**).

Por otra parte, se ha descrito en diversos Mucorales la presencia del gen *rfs* quien codifica a una sintetasa peptídica no ribosomal, involucrada en la síntesis del sideróforo, rizoferrina (**Carroll y col., 2017**). En *M. lusitanicus* se ha encontrado que los niveles de RNAm de *rfs* aumentan en niveles bajos de Fe^{2+} , durante el estrés oxidativo y en la infección del ratón. La mutación del gen *rfs* condujo a la disminución de la virulencia (**Alejandro-Castañeda y col., 2022**). La enzima Rfs usa citrato y diaminobutano como sustratos (**Carroll y col., 2017**), lo que indica la dependencia

del metabolismo oxidativo mitocondrial para sintetizar rizoferrina. Se conoce que la mutación del gen *pkaR1* o la adición de AMPc condujo a una disminución de los niveles de rizoferrina en *M. lusitanicus*, indicando la regulación positiva de la vía PKA en la producción de rizoferrina **(Alejandre-Castañeda y col., 2022)**. Por otra parte, la proteína Arl1 (por sus siglas en inglés Arf-like) es necesaria para el desarrollo adecuado del micelio, y para el aumento de la virulencia, se ha asociado a la función y morfología mitocondrial influyendo en el aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial **(Patiño-Medina y col., 2019)**.

Además, los homólogos de Tec (Tec1 y Tec2), quienes son factores de transcripción, en *M. lusitanicus* regulan el crecimiento micelial, la virulencia, el aumento de la acumulación de la rizoferrina y el aumento del metabolismo mitocondrial en condiciones de niveles bajos de glucosa, probablemente por represión de la PKA. Por lo que siguieren dos niveles de regulación, a través de las proteínas Tec, siendo uno a nivel transcripcional (mayor expresión de Tec correlaciona con el aumento del ARNm de *gpb1* y *pkaR1*) y a nivel postraduccional (la PKA inactiva inhibe la fosforilación de Tec1 y Tec2) **(Alejandre-Castañeda y col., 2023)**.

En *M. lusitanicus* las esporas derivadas de YPG suplementado con el suero sanguíneo nativo aumentaron la toxicidad de los SS frente a nematodos, produjeron el aumento en la interleucina (IL)-6, IL-1 β , proteína inhibidora de macrófagos 2 y del factor de necrosis tumoral α (en tejidos hepáticos y pulmonares de ratones diabéticos infectados) comparado con los de tejidos de animales infectados con esporas derivadas de YPG solo o suplementado con suero sanguíneo desnaturalizado. Además, a partir de los cultivos que fueron suplementados con suero sanguíneo nativo mostraron mayores tasas de germinación e hifas más largas en comparación con cultivos no suplementados con suero sanguíneo nativo. Por otra parte, ellos mencionan que los niveles de ARNm de *cnaA* no disminuyeron en las esporas formadas en presencia de suero, lo que sugiere que el suero y la *cnaA* están regulados por un mecanismo diferente **(Patiño-Medina y col., 2023)**.

2.2 Vía de señalización de la CN

La CN es un heterodímero conformado por una subunidad A catalítica (CNA) y una subunidad B regulatoria (CNB), se destaca a la CN, por poseer actividad fosfatasa (serina/treonina), la CN está presente únicamente en eucariotas y se requiere del complejo calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) para su activación. En humanos, algunas vías de transducción, como la fisión y apoptosis a nivel mitocondrial, requieren de la activación de la vía de la CN **(tabla 6) (Creamer, 2020)**. En *S. cerevisiae* es muy importante el mantenimiento de una concentración adecuada de Ca^{2+} citoplasmático para el mantenimiento de la homeostasis celular; las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en reposo en *S. cerevisiae* van de 50-200 nM, considerando que en el entorno externo se encuentra entre 1 μM a 100 mM **(Bonilla y Cunningham, 2002; Muller y col., 2003)**. Algunos organelos celulares como las vacuolas y los peroxisomas funcionan como almacenes de calcio, lo obtienen por medio de transportadores de calcio como son: los anti portadores de Ca^{2+} / H^{+} , las bombas de calcio dependientes de ATP y los canales iónicos permeables al calcio en la membrana citoplasmática **(Martín, 2022)**.

La vacuola participa en la homeostasis de calcio citosólico, en presencia de altas concentraciones de calcio extracelular se introduce el calcio citoplasmático a la vacuola donde la proteína Vcx1, la cual se encuentra en la membrana vacuolar, participa como transportador introduciendo el calcio a la vacuola **(Förster y Kane, 2000)**. Mediante un análisis *in silico* se ha descrito que los hongos *S. cerevisiae*, *Ashbya gossypii*, *C. albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, podrían poseer solo un transportador de tipo Vcx1 mientras que el Mucoral *Rhizopus oryzae* se encontraron 4 posibles Vcx1 **(Risipail y col. 2009)**. Sin embargo, aún no ha sido descrito su presencia en *M. lusitanicus*.

Tabla 6. Desfosforilación de algunas proteínas por la CN en células de humano.

En relación a:	Blancos de desfosforilación para CN	Función
Transcripción	NFAT (factores nucleares de células T activadas)	Estos factores de transcripción se expresan en la mayoría de las células del sistema inmunológico por lo que están involucrados en la respuesta inmunitaria y en el desarrollo de sistemas nerviosos, cardíaco y muscular
Receptores	AMPA (receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico)	Es un receptor transmembrana ionotrópico para glutamato, es encargado de mantener la transmisión sináptica en el sistema nervioso central
Mitocondrias	DRP1 (proteína 1 relacionada con la dinamina)	DRP1 es una proteína citosólica altamente conservada que interviene en la fisión mitocondrial
	MALO (antagonista de Bcl-2/Bcl-XL, que causa la muerte celular)	Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que se encuentra en la membrana mitocondrial externa y que inhibe la apoptosis. Por lo que MALO se une a Bcl-2/Bcl-XL y libera a las proteínas proapoptóticas, lo que lleva a la apoptosis

Obtenido de **Creamer, 2020**.

Diversas condiciones de estrés contribuyen a la entrada intracelular del Ca^{2+} en células animales, dicha entrada es estimulada por cambios en la tonicidad (**Batiza y col., 1996**), estrés salino, por cambios en la temperatura, por feromonas (**Matsumoto y col., 2002**) y en *H. polymorpha* se ha descrito que la fuente de nitrógeno controla el contenido de calcio y con ello la activación de la CN que a su vez contribuye en la regulación de genes encargados de la asimilación del nitrógeno (**Rodríguez y col., 2013**).

Además, existen algunos factores que evitan la entrada de calcio como la inhibición de LTP (Potenciación a largo plazo), lo cual es una fuerza de sinapsis que sigue a una estimulación de elevada frecuencia dependiente de VGCC (canal dependiente

de voltaje) (por sus siglas del inglés VGCC, Voltage-Gated Calcium Channel) **(Onuma y col., 1998)**.

En células animales se han descrito a los canales de calcio dependientes de voltaje VGCC, en el ingreso de Ca^{2+} extracelular al citoplasma. Los canales VGCC (conformado por las proteínas Cch1p-Mid1p) bajo condiciones de estrés, van a ser activados por la señal por Ca^{2+} , donde van a despolarizar la membrana generando un cambio de potencial permitiendo la apertura de los canales y el ingreso del ion **(Catterall, 2000)**. Por medio de un análisis de comparación de secuencias genómicas han mencionado que *S. cerevisiae*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *S. pombe*, *A. fumigatus*, *F. graminearum*, *M. grisea*, *N. crassa*, *U. maydis* poseen una única proteína CCH1 y una única MID1. *R. oryzae* pose 2 CCH1 y una única MID1 **(Rispaill y col., 2009)**. Sin embargo, en *M. lusitanicus* aún se desconoce la presencia de dichas subunidades.

En *S. cerevisiae* **(fig. 9)**, cuando las concentraciones del Ca^{2+} en el citoplasma superan los 200 nM, la proteína calmodulina (CaM) por sus siglas en ingles calcium modulated protein, unirá Ca^{2+} a través de su dominio estructural de mano EF, la proteína CaM está altamente conservada en eucariotas y existe en dos formas conformacionales, en forma libre (cuando no está el calcio unido) es llamada apocalmodulina y cuando está formando el complejo Ca^{2+} -CaM es llamada CaM, este complejo Ca^{2+} -CaM, activará a la proteína CN **(Geli y col., 1998; Grötsch y col., 2010; Chin y col., 2000)**.

La proteína CN activa también participa en diversas funciones en los hongos, en *S. cerevisiae* participa en la activación de diversos factores de transcripción como en el Crz1p (dedo de zinc 1 sensible a la CN), cuando la CN está activa defosforila a Crz1p y una vez activo interviene en la expresión de diversos genes **(Cyert, 2003)**, como el que codifica al transportador de hexosas (*hxt1*) y el que codifica permeasa de aminoácidos (*agp1*), además de la expresión la proteína aciltransferasa Akr1 (HIP14/AKRL1 en mamíferos) y Erg3 la cual es una esterol desaturasa C-5, los productos de estos genes podrían realizar funciones que ayuden a *S. cerevisiae* a sobrevivir en altas concentraciones de calcio. Y a su vez estos intervienen en diversos procesos como el mantenimiento de los niveles normales de las ROS, ya

que al sobreexpresar HXT1 y ATGP1 en presencia de calcio se observó que fueron inhibidos los niveles intracelulares de las ROS a rangos normales **(Li y col., 2021)**. En *S. cerevisiae* también se ha mencionado que el Mn^{2+} puede activar a la CN pero, con una eficacia menor **(Del-Aguila y col., 2003)**.

En *S. cerevisiae* la CN está formada por un heterodímero (una subunidad regulatoria y una catalítica), su genoma codifica para una única subunidad catalítica y una única subunidad regulatoria. La subunidad regulatoria posee 4 sitios de unión a Ca^{2+} y la subunidad catalítica un sitio de unión a CAM **(Klee y col., 1998)**.

En mamíferos, la activación de la CN defosforila al residuo de serina 637 de la proteína GTPasa Drp1 (Dnm1 en levadura), esta modificación postraducciona promueve la fisión mitocondria. Se ha descrito que la fosforilación en este mismo residuo se da a través de la PKA, conduciendo a inhibición de la actividad de GTPasa y de esta manera se promueve la fusión de mitocondrias **(Ko y col., 2021)**. También ha sido descrito el proceso de fusión mitocondria **(Fig. 6)**, en este proceso participa la proteína GTPasa Fzo1 localizada en la membrana mitocondria, la cual está encargada de regular la fusión, en donde las mitocondrias se unen para formar una red, conocida como supermitocondrias y a su vez generar: mayor actividad mitocondria **(Müller y col., 2015)**.

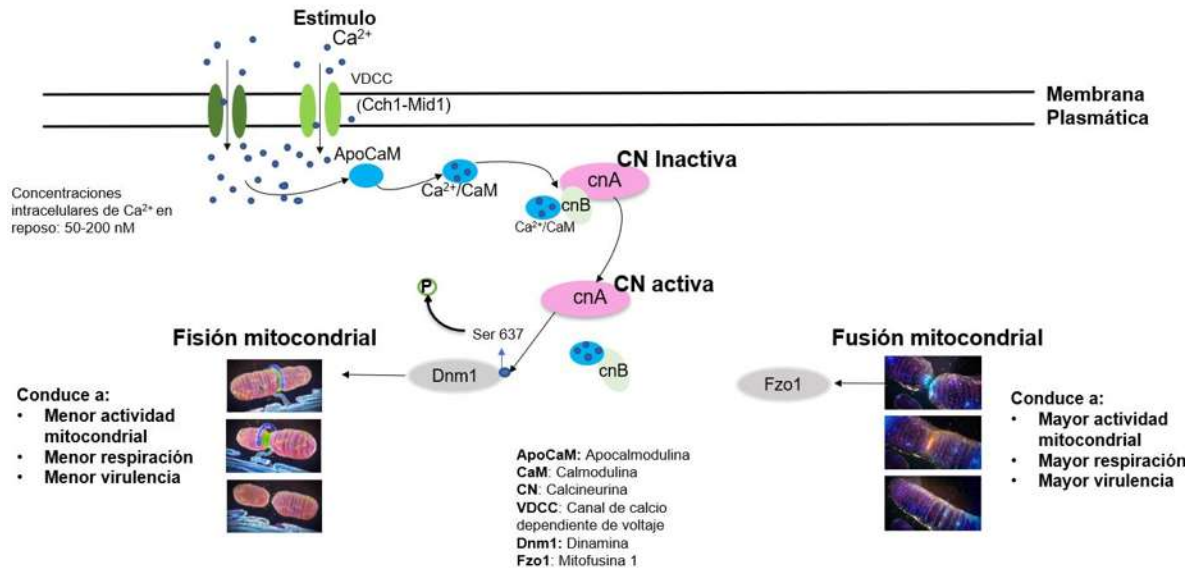


Figura 9. Vía de señalización de la CN en *S. cerevisiae*. Por un estímulo externo, el calcio extracelular ingresa a través del canal de calcio dependiente de voltaje. Este canal de Ca^{2+} está conformado por las proteínas Cch1-Mid1. Una vez ingresado el calcio y al superar las concentraciones de 50-200 nM, se une a la CaM. En *S. cerevisiae*, la CaM posee 3 dominios de unión a calcio. Posteriormente, se formará el complejo Ca^{2+} -CaM y se une al dominio de unión de la subunidad reguladora de la CN inactiva y conduciendo a su activación. El residuo Ser 637 de Dnm1 interactuará con receptores específicos de la membrana mitocondrial, de esta manera se oligomeriza formando un anillo y produciendo un proceso denominado fisión mitocondrial. La proteína Dnm1 se recluta y ancla en la membrana externa mitocondrial a través de varias proteínas transmembranales como la proteína de fisión 1 (Fis1). Dnm1 contiene un dominio GTPasa (dominio G) y forma un polímero helicoidal para contraer los túbulos de la membrana al unirse e hidrolizar GTP. Modificado de Liu y col., 2015.

2.2.1 Función de la CN en hongos

2.2.1.1 Papel de la CN en *N. crassa*

La vía de la CN se ha descrito en diversos hongos. Por ejemplo, en el hongo ascomiceto micelial *N. crassa*, la CN consta de un heterodímero compuesto por dos subunidades, una catalítica A y una reguladora B, ambas codificadas por los genes *cna-1* y *cnb -1* (Davis y Perkins, 2002). Las cepas mutantes *Cna-1*^{RIP 3}

A, 122 A, 24 a y 28 A, produjeron un fenotipo con crecimiento lento con hifas cortas de color mate y además también presentaron crecimiento reducido, tuvieron mayor acumulación de carotenos, sensibilidad al estrés osmótico; mientras que los mutantes *Cnb-1*^{RIP} presentaron sensibilidad al calcio **(Kumar y col., 2020)**. La vía de la CN también está implicada en el crecimiento de las hifas y es necesaria en la reproducción sexual del hongo. Para demostrar la implicación de dicha vía en la fase sexual, se fertilizaron dos núcleos (+,-) de sexos opuestos en una condición de estrés (disponibilidad limitada de nitrógeno). En el desarrollo sexual normal de *N. crassa* se desarrollan protoperitecios que dan lugar a los peritecios; sin embargo, los peritecios estaban vacíos cuando se mutó la subunidad catalítica de la CN. Sugiriendo que esta proteína es importante en algún paso de la meiosis o durante el desarrollo de las ascosporas **(Tamuli y col., 2016)**.

2.2.1.2 Papel de la CN en *C. neoformans*

El hongo dimórfico basidiomiceto patógeno oportunista *C. neoformans* posee una única subunidad catalítica (Cna-1) y una única subunidad regulatoria (Cnb-1). La subunidad Cnb-1 desempeña una función importante en la acción de los antifúngicos (debido a que la mutante en *cnb1* tuvo resistencia al fármaco FK506) y en la virulencia, ya que la cepa mutante en *cnb1* mostro una menor capacidad de crecer a 37°C y al evaluar la virulencia en ratones inmunocompetentes BALB/c, que expresaban el componente C5 del complemento, se observó un 100% de supervivencia de los ratones infectados con la mutante *cnb1* hasta el día 100, por lo que la subunidad Cnb-1 de la CN regula positivamente tanto la termotolerancia a 37°C, al igual que la virulencia en un modelo murino **(Fox y col., 2001)**.

2.2.1.3 Papel de la CN en *C. albicans*

En el hongo dimórfico *C. albicans*, la CN tiene un papel importante en la supervivencia en presencia del suero sanguíneo. La supervivencia de las cepas

mutantes de la subunidad regulatoria de la CN (mutantes *cnb1/cnb1*) en presencia de suero sanguíneo por 6 h disminuyó entre 6 a 8 veces la población de las cepas *cnb1/cnb1* comparado con la cepa WT; mientras que para las 24 h disminuyó 14 veces la población. Por lo que concluyen que la CN es esencial para la supervivencia en suero (**Blankenship y col., 2003**). En cuanto a la importancia de la CN para la supervivencia en condiciones de estrés de la membrana plasmática, se observó que mutantes *cnb1/cnb1* de la CN mostraron ser hipersensibles a la presencia de los azoles (fluconazol) ciclosporina A (CsA), tricolimus (FK506), y redujeron el ergosterol de la membrana. En *C. albicans* CsA y FK506 estuvieron relacionadas a la inhibición de la CN y no a las bombas *mdr* como en otros hongos (**Cruz y col., 2002**).

2.2.1.4 Sistema de CN en *M. lusitanicus*

2.2.1.4.1 Descripción de las subunidades de CN en *M. lusitanicus*

La vía de la CN está implicada en la diferenciación y la virulencia de *M. lusitanicus*. La CN es un heterodímero compuesto por una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica. El genoma de *M. lusitanicus* codifica para una única subunidad regulatoria (CnbR) y tres subunidades catalíticas (CnaA, CnaB y CnaC) (**Lee y col., 2013**) (**tabla 7**). Al comparar el sistema de CN de *M. lusitanicus* con otros hongos como *N. crassa* y *C. neoformans*, los cuales poseen una única subunidad catalítica y una única subunidad regulatoria, indican que este mucoral es un organismo más complejo en términos de la CN. Esto puede ser en parte explicado por el hallazgo de que los hongos pertenecientes al suphylum *Mucormycotina* poseen una duplicación del genoma completo (**Ma y col., 2009; Corrochano y col., 2016**).

Se ha descrito que, al comparar las subunidades catalíticas de la CN, el producto del gen *cnaA* de las especies de Mucorales (*R. delamar*, *P. blakesleeanus* y del mismo *M. lusitanicus*) con otros hongos (*S. cerevisiae*, *C. neoformans* y *A. nidulans*) e incluso del *Homo sapiens* se observó que la subunidad CnaA está conservada a

diferencia de las subunidades CnaB y CnaC, lo que sugiere que CnaA puede ser el ancestro en común (Lee y col., 2013).

Se ha descrito que la mutante en la subunidad reguladora, $\Delta cnbR$ (Figura 10), carece de toda actividad de CN; dicha mutante creció exclusivamente como levadura en condiciones aeróbicas (Lee y col., 2013).

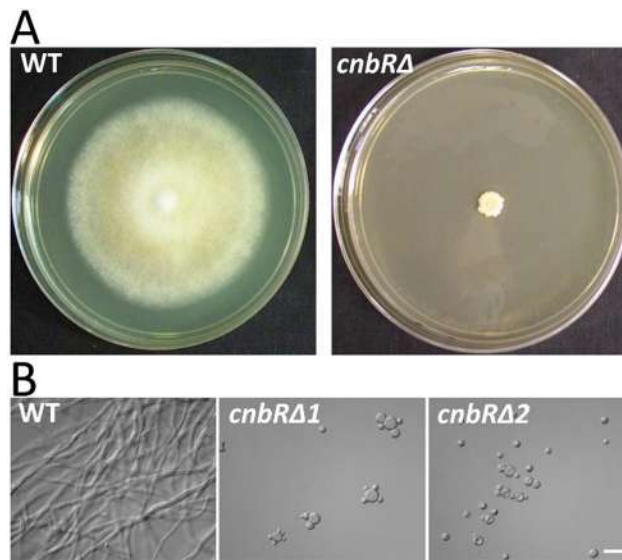


Figura 10. La mutante $\Delta cnbR$ creció exclusivamente como levadura en condiciones aeróbicas. (A) Medio sólido YPD crecimiento de la cepa mutante $\Delta cnbR$ en condiciones aeróbicas comparado con la cepa WT; (B) Medio YPD líquido con agitación vigorosa crecimiento de la cepa mutante $\Delta cnbR$ en condiciones aeróbicas comparado con la cepa WT (Lee y col., 2013).

Tabla 7. Tamaño y peso molecular de las subunidades de la CN de *M. lusitanicus*

Subunidad	Tamaño de la proteína (aa)	Peso molecular (Da)
CnaA	534	61667.28
CnaB	538	61701.98
CnaC	527	60219.51
CnbR	173	19537.05

aa: aminoácidos; Da: daltons.

(https://genome.jgi.doe.gov/Muccir1_3/Muccir1_3.home.html).

De las 3 subunidades catalíticas que posee *M. lusitanicus*, CnaA y CnaB tienen la mayor identidad con un 73.8%. Mientras que las subunidades CnaB y CnbR tienen el menor porcentaje de identidad siendo de 7.2% (**tabla 8**).

Tabla 8. Identidad y similitud (%) de las subunidades de CN de *M. lusitanicus*.

	CnaA	CnaB	CnaC	CnbR
CnaA	100	74/87	64/65	10/17
CnaB		100	62/75	11/19
CnaC			100	12/18
CnbR				100

Modificado de **Lee y col., 2013**

2.2.1.4.2 Función de los genes que codifican para las subunidades de CN de *M. lusitanicus*

2.2.1.4.2.1 Subunidad catalítica

En comparación con la cepa WT, la cepa $\Delta cnaA$ presentó un fenotipo con mayor sensibilidad a tacrolimus (FK506) y ciclosporina A (CsA). La cepa $\Delta cnaA$ generó una mayor producción de levaduras (en YPD líquido con aireación vigorosa), mayor sensibilidad al detergente SDS, produjo esporas más grandes, las esporas produjeron mayor virulencia en *Galleria mellonella*. Las hifas presentaron una polaridad hifal anormal donde los tubos germinales presentaron división de las puntas y una ramificación anormal y los tubos germinales se alargaron en una sola dirección sin presentar división en las puntas. Por lo que concluyen que la proteína CnaA participa en la integridad de la pared celular en el tamaño de las esporas, la regulación negativa de la virulencia y el mantenimiento de la polaridad de las hifas **(Lee y col., 2013)**.

La cepa $\Delta cnaB$ mostró una mayor sensibilidad a CsA creciendo únicamente como levaduras, mostró una mayor hipersensibilidad a CsA que la cepa $\Delta cnaA$, no produjo hipersensibilidad a FK506 al igual que la cepa WT. Por otra parte, comparado con el fenotipo de la cepa $\Delta cnaA$, la cepa $\Delta cnaB$ si presentó un fenotipo hipersensible a FK506, no produjo esporas grandes y no generó hifas dicotómicas como la mutante $\Delta cnaA$ y la virulencia en el modelo de *G. mellonella* fue muy similar al de la cepa WT. Por lo que concluyen que CnaB es funcionalmente diferente a la subunidad CnaA **(Lee y col., 2015)**.

La expresión del gen *cnaC* fue mayor en el crecimiento levaduriforme comparado con el crecimiento de las hifas. La cepa $\Delta cnaB$ forma septos comparado con la cepa WT cuyas hifas son aseptadas. Por lo que concluyen que CnaC podría desempeñar una función específica durante la fase levaduriforme, por lo que podría ser menos sensible a la inhibición por FK506; además, la proteína CnaC puede estar asociada con la formación del septo **(Lee y col., 2013)**. Es importante mencionar que aún no se ha descrito la función en la virulencia de CnaC.

2.2.1.4.2.1 Subunidad regulatoria

La cepa $\Delta cnbR$ presentó un fenotipo monomórfico levaduriforme, aun en condiciones aeróbicas y presentó un fenotipo avirulento en comparación con la cepa WT. Por lo que concluyeron que CnbR es esencial para el crecimiento micelial y para la regulación positiva de la virulencia **(Lee y col., 2013)**.

Sin embargo, aún falta por entender la implicación del metabolismo oxidativo mitocondrial en relación a las subunidades de la CN.

2.2.1.4.3 La CN regula la expresión de otros genes en *M. lusitanicus*.

M. lusitanicus posee tres genes *fks* (*fksA*, *fksB*, *fksC*) que codifican a la proteína equinocandina β -(1,3)-d-glucano sintasa (la cual contribuye en mantener la estructura e integridad de la pared celular del hongo debido a que convierte UDP-Glucosa en β -(1,3)-d – glucano), la vía de la CN podría influir en la regulación de la expresión de *fksA* y *fksB*, debido a que la eliminación de la CN disminuye la expresión de los mismos en *M. lusitanicus* **(García y col., 2023)**.

Por otra parte, la ausencia de las subunidades G alfas de proteínas G heterotriméricas Gpa11 y Gpa12, generaron una disminución del RNAm de *cnaA*, además del aumento en el tamaño de la espora **(Patiño-Medina y col., 2019)**. Dicho fenotipo es similar a la mutación en la subunidad catalítica CnaA de la CN **(Ocampo y col., 2009)**. Esto parece sugerir una interconexión de la vía PKA y CN regulada por las proteínas G heterotriméricas, Gpa11 y Gpa12 **(Patiño-Medina y col., 2019)**.

III. Justificación

M. lusitanicus es un hongo dimórfico y modelo de estudio para entender la enfermedad mucormicosis. Se ha descrito la correlación del aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial con la virulencia en algunos hongos patógenos. Además, los procesos de fusión y fisión mitocondrial en términos generales, participan aumentando o disminuyendo la eficiencia de la actividad mitocondrial, respectivamente. En el caso de *M. lusitanicus* las esporas creciendo en condiciones aeróbicas y en concentraciones bajas de glucosa (0.1%) produce micelio, el cual está asociado a un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial y de fenotipo virulento. En cambio, el crecimiento en condiciones anaeróbicas genera levaduras de metabolismo fermentativo y avirulentas. Por otra parte, la vía de la CN (serina treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+}) participa en la morfogénesis y virulencia del hongo *M. lusitanicus*. Se ha mencionado que la anulación de la subunidad regulatoria (CnbR) de la CN produce un fenotipo con crecimiento exclusivo de levaduras aún en condiciones aeróbicas. Por lo que conocer el papel de la vía de la CN en el metabolismo oxidativo mitocondrial es de suma relevancia para conocer su función en la mucormicosis.

IV. Hipótesis

La activación de la vía de la CN regula negativamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia en *M. lusitanicus*

IV. Objetivos

Objetivo general

Conocer la implicación de la vía de la CN en el metabolismo oxidativo mitocondrial, así como su correlación con el aumento de la virulencia en *M. lusitanicus*.

Objetivos específicos

1. Demostrar la función de las subunidades de la CN en el metabolismo oxidativo mitocondrial.
2. Demostrar la función de las subunidades de la CN y su posible vínculo con el metabolismo oxidativo mitocondrial en la virulencia.
3. Demostrar la función de la proteína Dnm1 en la vía de la CN y su correlación con el metabolismo oxidativo mitocondrial en la virulencia.

VI. Estrategia experimental general

Objetivo 1:

Medir marcadores del metabolismo oxidativo mitocondrial de las subunidades de la calcineurina

- Evaluar el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable
- Medir consumo de O_2
- Evaluar el potencial de membrana mitocondrial
- Cuantificación del gen *atp9*
- Evaluar estrés oxidativo
- Efecto del inhibidor de la cadena respiratoria (KCN) y antioxidante (N-acetilcisteína)
- Cuantificación de OH^-

Objetivo 2:

Analizar en las mutantes de las subunidades de la calcineurina, los niveles de virulencia de medio de cultivo post crecimiento aeróbico en concentraciones altas y bajas de glucosa

- Evaluar toxicidad de SS frente a *C. elegans*
- Evaluar toxicidad de SS adicionando un inhibidor de la cadena respiratoria (KCN) y antioxidante (N-acetilcisteína)
- Ensayos de virulencia en *G. mellonella*
- Cuantificación de rizoferina
- Evaluar virulencia de esporas en el modelo *G. mellonella*

Objetivo 3:

Evaluar la participación de la vía de la calcineurina en el proceso de fisión mitocondrial

- Medir consumo de O_2 en las cepas sobreexpresantes Dnm1 en las mutantes de calcineurina
- Cuantificación de OH^- en las cepas sobreexpresantes Dnm1 en las mutantes de calcineurina
- Evaluar toxicidad de SS frente a *C. elegans* en las cepas sobreexpresantes Dnm1 en las mutantes de calcineurina

VII. Materiales y métodos

7.1 Cepas utilizadas

Tabla 9. Cepas utilizadas.

Cepa	Descripción
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)
MU402	Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y uracilo (<i>pyrG</i> ⁻); obtenida mediante mutagénesis química. Derivada de la cepa R7B (Nicolás y col., 2007)
$\Delta cnbR$	Derivada de MU402, mutante homocariote en el gen <i>cnbR</i> (<i>pyrG</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻) (Lee y col., 2013)
$\Delta cnaA$	Derivada de MU402, mutante homocariote en el gen <i>cnaA</i> (<i>pyrG</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻) (Lee y col., 2013)
$\Delta cnaB$	Derivada de MU402, mutante homocariote en el gen <i>cnaB</i> (<i>pyrG</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻) (Lee y col., 2013)
$\Delta cnaC$	Derivada de MU402, mutante homocariote en el gen <i>cnaC</i> (<i>pyrG</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻) (Lee y col., 2013)
$\Delta cnaA+fzo1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaA$; complementada con el ORF del gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaB+fzo1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaB$; complementada con el ORF del gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaC+fzo1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaC$; complementada con el ORF del gen <i>fzo1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaA+dnm1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaA$; complementada con el ORF del gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4, (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaB+dnm1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaB$; complementada con el ORF del gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4, (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaC+dnm1^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaC$; complementada con el ORF del gen <i>dnm1</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4, (<i>leuA</i> ⁺ , <i>pyrG</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaA+cnaA^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaA$; complementada con el ORF del gen <i>cnaA</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaA+cnaB^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaA$; complementada con el ORF del gen <i>cnaB</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)

$\Delta cnaA + cnaC^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaA$; complementada con el ORF del gen <i>cnaC</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaB + cnaA^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaB$; complementada con el ORF del gen <i>cnaA</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaB + cnaB^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaB$; complementada con el ORF del gen <i>cnaB</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaB + cnaC^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaB$; complementada con el ORF del gen <i>cnaC</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaC + cnaA^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaC$; complementada con el ORF del gen <i>cnaA</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaC + cnaB^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaC$; complementada con el ORF del gen <i>cnaB</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
$\Delta cnaC + cnaC^{O/E}$	Derivada de la mutante $\Delta cnaC$; complementada con el ORF del gen <i>cnaC</i> silvestre, clonado en el vector pEUKA4 (<i>pyrG</i> ⁺ , <i>leuA</i> ⁺) (Patiño-Medina, datos sin publicar)
<i>Escherichia coli</i> OP50	Cepa resistente a estreptomycin, auxótrofa a uracilo, usada como alimento de nematodos
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol (Brenner, 1974) . Cepa estándar utilizada para investigación

7.2 Medios utilizados

YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura). Cada litro contiene 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de glucosa (BD Bioxon), a este medio se le denominó YPG-2%; cuando fue usado 60 g de glucosa por litro de medio se le denominó YPG-6%. Se adicionó 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH a 4.5 **(Bartnicki-García, 1968)**.

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 nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio (BD Difco), 20 g de glucosa (BD Bioxon), a este medio se le denominó YNB-2%, cuando se le adiciona 1 g de glucosa por litro, se le nombro YNB-0.1%. Se adicionaron 20 g de agar (BD Bioxon) en caso de medio sólido.

Cuando fue necesario se suplemento con leucina (10 µg/mL). Se mantuvo un pH de 4.5 para el crecimiento micelial estándar. El medio YNB también fue suplementado al 111 mM de glicerol (nombrado como YNG) como fuente de carbono no fermentable (esta concentración de glicerol es equimolar al 2% de glucosa).

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

Obtención:

Se prepararon placas de Petri con medio YPG-2% sólido, posteriormente 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 se aspiraron y se depositaron en un tubo de 50 mL estéril. Las esporas se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min 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.

Determinación del número de esporas:

El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2,000 (Leika). Se depositaron 20 µL en la parte superior y 20 µL en la inferior de la cámara de Neubauer. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Las esporas cuantificadas se multiplicaron por el factor de dilución 2.5×10^4 . El resultado expresa las esporas/mL de muestra.

Conservación de las esporas:

Las esporas contadas y lavadas se conservaron a 4°C y se emplearon en un máximo de 15 días después de su obtención.

7.4 Análisis de expresión de los genes de CN por RT-qPCR

Se realizó la extracción del ARN total a partir de esporas, micelio de 3 y 6 h, o de levaduras obtenidas posterior a 4 y 12 h de crecimiento de las distintas cepas de *M.*

lusitanicus con el método usado previamente (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 $A260/A280$, en donde una relación $A260/A280 \geq 1.90 - 2.0$, indica una calidad óptima del ácido nucleico (Yamaguchi y col., 1992; Wilfinger y col., 1997). Las muestras de ARN total cuyo valor de relación $A260/A280$ 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.

7.5 Ensayo de germinación

Crecimiento en aerobiosis de *M. lusitanicus*

Para llevar a cabo el crecimiento aérobico se inocularon con 5×10^5 esporas/mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento aerobio los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 150 rpm, usando 10 mL de medio en matraces de 125 mL.

Crecimiento de *M. lusitanicus* en condiciones de bajo oxígeno

Para llevar a cabo el crecimiento en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$ O₂) se inocularon con 5×10^5 esporas/mL de medio YPG-2% liquido. En el caso de crecimiento aerobio los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 40 rpm por 6 h, usando 10 mL de medio en matraces de 125 mL.

7.6 Ensayo de generación de biomasa

Los matraces de 125 mL de capacidad conteniendo 10 mL de medio de cultivo fueron inoculados con 5×10^5 esporas/mL y se incubaron a 28°C con agitación constante de 150 rpm. Se realizó cinética de crecimiento a las 12, 24, 48 y 72 h. Al final de cada uno de los respectivos tiempos de crecimiento, se prosiguió a filtrar la biomasa en papel filtro Whatman que previamente fue secado y pesado. La biomasa obtenida se incubo por al menos 3 días a 37°C hasta peso constante.

7.7 Ensayos de respiración

Se realizó crecimiento aérobico por 3 h, donde fueron inoculadas 5×10^5 esporas/mL de distintos medios de cultivo. Posteriormente, las germínulas obtenidas se lavaron 2 veces con agua destilada estéril mediante centrifugación, descartando en cada ocasión la fase acuosa. Al final, las células se suspendieron en tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,4) que contenía glucosa 20 mM y se prosiguió a evaluar el consumo de oxígeno con un oxímetro de marca Oxytherm (a 28°C).

7.8 Cuantificación de radical hidroxilo (OH[•])

Esporas de las cepas mutantes de los genes que codifican a la CN se cultivaron en anaerobiosis en medio YNB 0.1% de glucosa por 3 h, posteriormente las células se

recuperaron y lavaron tres veces en buffer HEPES (10 mM, pH 7) a 2,000 rpm durante 5 min después se adiciono 10 μ M 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) con filtro de emisión a 520 nm y línea de excitación a 490 nm.

7.9 Ensayos de susceptibilidad a paraquat en medio sólido

Se prepararon placas de Petri conteniendo medio YNB suplementadas con 0.1% de glucosa, además, se adicionó diferentes concentraciones de paraquat (1.5 mM y 2 mM). Posteriormente, se prosiguió a inocular 1,000 esporas de cada cepa por crecimiento radial. Se mantuvieron las placas en condiciones aeróbicas a 28°C, y se determinó el crecimiento radial durante 5 días de crecimiento.

7.10 Ensayos de virulencia de las esporas de *M. lusitanicus* en larvas de *Galleria mellonella*

Se inocularon 10,000 esporas suspendidas en 20 μ L de solución salina en cada una de las larvas de *G. mellonella* de la cepa WT (MU636), así como de las cepas mutantes de los genes que codifican a las distintas subunidades de la CN, posteriormente se verificó su porcentaje de supervivencia cada 24 h por ocho días el criterio de muerte fue considerado cuando la *G. mellonella* ya no tenía movilidad.

7.11 Cultivo de *Escherichia coli* (OP50)

Medio NGM (Nematode Growth Medium) para el crecimiento de *Caenorhabditis elegans*.

Se utilizaron 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 dibásico de potasio (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 min. 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.

Cada litro de LB (Luria-Bertani).

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 el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL o el antibiótico estreptomicina a una concentración final de 10 µg/mL. Posteriormente se inoculó el medio LB con la cepa *E. coli* OP50 como alimento para *C. elegans*.

7.12 Ensayos de toxicidad de los SS de *M. lusitanicus* en *C. elegans*

Obtención de SS libres de células de *M. lusitanicus*

Esporas de las distintas cepas de *M. lusitanicus* fueron inoculadas 5x10⁵ esporas/mL. Las esporas fueron inoculadas en medio YPG-2% o YNB- 0.1%, cuando fue necesario se adicionó KCN 0.5 mM y N-acetil cisteína 10 mM. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 150 rpm a 28°C durante 48 h, posteriormente se filtraron para separar las biomasas de los SS.

Se colocó 1 mL de los distintos (SS) previamente filtrados provenientes del crecimiento micelial de las distintas cepas de *M. lusitanicus* en cada uno de los pozos de placas de 24 pozos (Corning). Los nematodos (10-20 en total) fueron transferidos con un "picker" a cada uno de los pozos mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75). En todos los ensayos de toxicidad los nematodos fueron observados cada 12 h hasta las 72 h. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo fue cuando este permaneció inmóvil a la estimulación física.

7.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron mediante el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA). Se usó el software PRISM, se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

7.14 Análisis bioinformático

Identificación de motivos de direccionalidad mitocondrial

Se obtuvieron las secuencias de los genes de CN de *M. lusitanicus* con los números de acceso *cnaA* (KC460402), *cnaB* (KC460402), *cnaC* (KC460403) en GenBank. Se obtuvieron las secuencias de las proteínas de las distintas subunidades de la CN y se realizó un análisis bioinformático utilizando el software MitoFates (<https://mitf.cbrc.pj.aist.go.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>).

Identificación de motivos consenso de los factores de transcripción Tec y Hap

A partir de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las subunidades de la CN se obtuvieron los promotores, posteriormente fue utilizado el programa YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com/>), donde fueron identificadas los posibles motivos consenso de los factores de transcripción Tec1p, Hap2p, Hap3p, Hap5p de *S. cerevisiae*. Posteriormente se identificó el motivo en secuencia nucleotídica de los promotores de las subunidades de la CN.

VIII. Resultados

8.1 Determinación del genotipo de CN en las cepas de *M. lusitanicus*

Con la finalidad de comprobar el genotipo de cada cepa mutante en los genes de la CN, se procedió a realizar un análisis de cuantificación de los transcritos mediante RT-qPCR con sondas de hidrólisis específicas para cada uno de los genes de CN (**tabla 9**).

El RNA total fue aislado a partir de las esporas de las distintas cepas (**fig. 11A**) y micelio de 6 h postcultivo de medio YPG al 2% de glucosa (YPG-2%) (**fig. 11B**); micelio de 12 h postcultivo proveniente del medio YNB al 0.1% de glucosa (YNB-0.1%) (**fig.11C**) y 6 h postcultivo del medio YPG al 6% de glucosa (YPG-6%) (**fig.11D**), con lo cual se llevó a cabo el ensayo de RT-qPCR. Contrario a la cepa WT, la cepa mutante $\Delta cnbR$ mostró la nula acumulación del RNAm de *cnbR*. Lo mismo sucedió para las cepas $\Delta cnaA$, $\Delta cnaB$ y $\Delta cnaC$ (**fig. 11**). Este resultado indica que las mutantes en los genes de la CN presentaron el genotipo correcto.

El análisis de expresión de los genes de la CN en el estadio de esporas de las cepas mutantes de la CN en *M. lusitanicus* mostró que la eliminación de *cnaA* produjo una disminución de aproximadamente el 10% de los niveles de ARNm de *cnaB*, mientras que para *cnaC* un 40%, respecto a la cepa WT. La eliminación de *cnaB* produjo una disminución del 80 y 40%, respectivamente, en los niveles de ARNm de *cnaC* y *cnbR* comparado con la cepa WT. La anulación de *cnaC* produjo disminución en los niveles del ARNm de *cnaA* y *cnbR* en un 95 y 5%, respectivamente respecto a la cepa WT. En el caso de la mutante *cnbR* produjo disminución de ARNm de 20, 50 y 40% aproximadamente en *cnaA*, *cnaB* y *cnaC*, respectivamente comparado con la cepa WT (**fig. 11A**).

El análisis de expresión de los genes de la CN durante el crecimiento micelial de 6 h producido de medio YPG-2%, mostró que la eliminación de *cnaA* produjo la disminución del ARNm de *cnaC* y *cnbR* aproximadamente en un 20 y 40%, respectivamente, y un aumento de ARNm de *cnaB* aproximadamente del 5% respecto a la cepa WT. Mientras que la eliminación de *cnaB* mostró un aumento del

20% en la expresión de *cnaA* y para el caso de *cnaC* y *cnbR* se generó un aumento en los niveles de ARNm del 11% aproximadamente. En el caso de la eliminación de *cnaC* produjo un aumento del ARNm de *cnaA*, *cnaB* y *cnbR* aproximadamente del 20%. La eliminación de *cnbR* mostró disminución del ARNm de todas las subunidades catalíticas de la CN en aproximadamente un 50% (**fig. 11B**).

En el caso del análisis de expresión de los genes de la CN a partir de micelio de 12 h producido de medio YNB al 0.1% de glucosa (YNB-0.1%) mostró que la eliminación de *cnaA* produjo un aumento del 20 y 40%, respectivamente, en los niveles de ARNm de *cnaB* y *cnaC*; mientras que disminuyeron los niveles de ARNm en aproximadamente un 30% para *cnbR* comparado con la cepa WT. Mientras que la eliminación de *cnaB* mostró un aumento aproximado del 25 y 20% del nivel del transcrito de *cnaA* y *cnaC*, respectivamente, comparado con la cepa WT, por otra parte, *cnbR* tuvo el mismo nivel de ARNm que la cepa WT. En el caso de la eliminación de *cnaC* produjo un aumento aproximado del 25% de *cnaA*, y *cnaB*, además un 10% de *cnbR*. La eliminación de *cnbR* mostró una disminución del ARNm de todos los genes que codifican a las subunidades catalíticas de la CN aproximadamente en un 50% comparado con WT (**fig. 11C**).

El análisis de expresión de los genes de la CN del micelio de 6 h producido de medio YPG- 6% mostró que la eliminación de *cnaA* produjo un aumento en los niveles del ARNm en un 10 y 30% aproximadamente para *cnaB* y *cnaC*, respectivamente; mientras que los niveles del ARNm de *cnbR* disminuyeron en aproximadamente 50% comparado con la cepa WT. La eliminación de *cnaB* mostró un aumento aproximado del 70 y 80% en los niveles de transcrito de *cnaA* y *cnaC*, respectivamente. Además, los niveles de ARNm de *cnbR* disminuyeron en aproximadamente un 25% comparado con la cepa WT. En el caso de la eliminación de *cnaC* produjo un aumento aproximado del RNAm del 10 y 30% de *cnaA*, y *cnbR*, respectivamente; mientras que los niveles de RNAm de *cnaB* fueron similares al que presento la cepa WT. La eliminación de *cnbR* mostró la disminución en aproximadamente un 50% del ARNm de los genes que codifican a las distintas subunidades catalíticas de la CN comparado con la cepa WT (**fig. 11D**).

Estos datos sugieren que *cnbR* podría ser un regulador transcripcional de las subunidades catalíticas de la CN en *M. lusitanicus*. Y cualquier ausencia de uno de los genes que codifican las distintas subunidades catalíticas conduce a un cambio en los distintos genes de la CN.

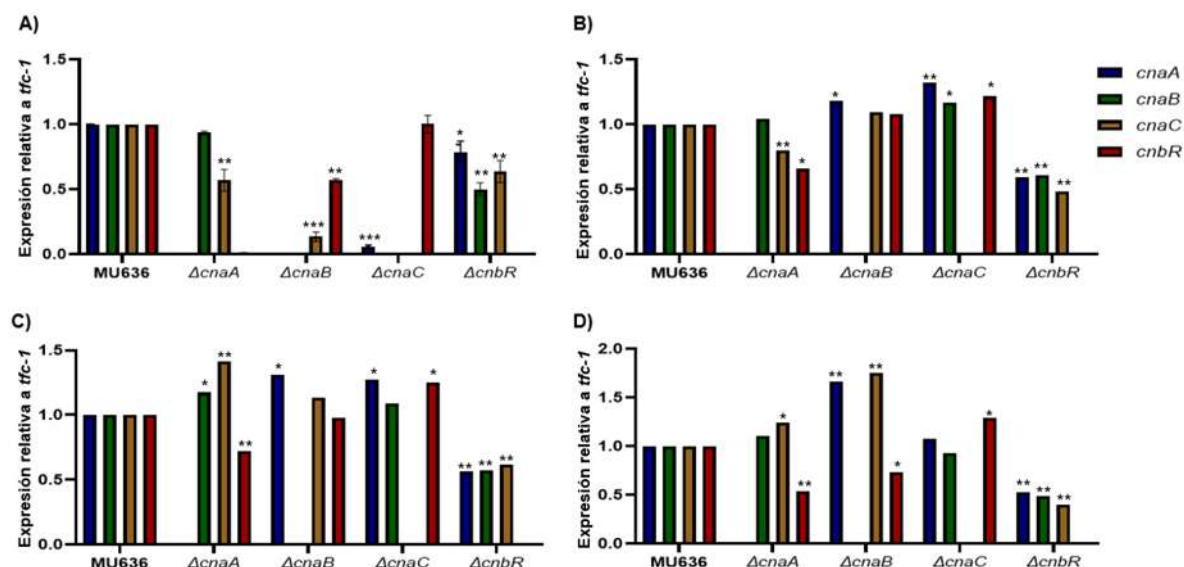


Figura 11. Análisis de acumulación de RNAm de los genes de la CN de *M. lusitanicus*.

El ARN total fue aislado de **A)** espora; micelio postcultivo de 6 h en medio **B)** YPG-2%; micelio postcultivo de 12 h en medio **C)** YNB-0.1% y micelio postcultivo de 6 h en medio **D)** YPG-6%, de las cepas mutantes $\Delta cnbR$, $\Delta cnaA$, $\Delta cnaB$, y $\Delta cnaC$. Posteriormente, el ARN total fue usado para evaluar el nivel de transcrito de cada uno de los genes *cnbR*, *cnaA*, *cnaB*, y *cnaC* mediante RT-qPCR. Se muestra un análisis tipo $\Delta\Delta Ct$ para la comparación de los niveles de RNAm entre las distintas cepas. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

8.2 Participación de las subunidades catalíticas de la CN en el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable

Se realizaron cinéticas de crecimiento en aerobiosis para analizar la velocidad de germinación en una fuente de carbono no fermentable. Se utilizaron los medios de YNB con 2% de glucosa (YNB-2%) y YNB con 111 mM de glicerol (YNG)

(concentración de glicerol equimolar a la concentración 2% de glucosa) como fuente de carbono no fermentable. En el medio YNB-2% no se observaron diferencias en la velocidad de germinación en las distintas cepas mutantes respecto a la cepa WT (**fig. 12A**). En cambio, cuando se utilizó el medio YNG (**fig. 12B**) aumentó significativamente el porcentaje de germinación de la cepa $\Delta cnaA$ comparado con la cepa WT. Sugiriendo que CnaA regula negativamente la germinación en glicerol en medio líquido y posiblemente está regulando negativamente el metabolismo oxidativo.

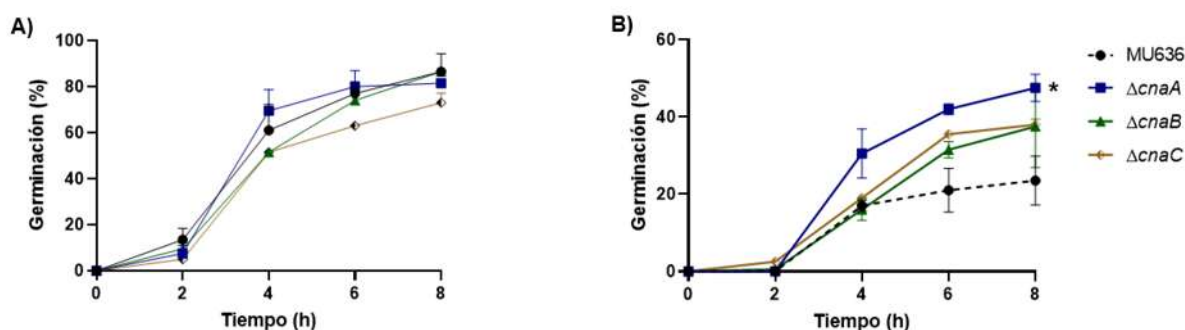


Figura 12. Efecto de las distintas subunidades de la CN en la germinación aeróbica en distintas fuentes de carbono. Esporas de las distintas cepas mutantes de las subunidades de la CN así como de la cepa WT fueron cultivadas en condiciones aeróbicas por 8 h analizando cada 2 h los porcentajes de germinación. Se determinó la germinación en los medios **A**) YNB-2%; **B**) YNG (concentración de glicerol equimolar a la concentración 2% de glucosa). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden a el error estándar, se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$.

Además, se determinó la generación de biomasa de todas las cepas, se utilizaron los medios YNB-2% y YNG. La biomasa generada de todas las cepas mutantes fue muy similar a la que generó la cepa WT posterior al crecimiento en YNB-2% (**fig. 13A**). Por otra parte, el crecimiento en medio YNG reveló una menor cantidad de biomasa por la cepa $\Delta cnaB$ comparado con las otras cepas, incluyendo la cepa WT (**fig. 13B**). Debido a que la cepa $\Delta cnaB$ generó una menor biomasa en una fuente de carbono no fermentable, lo que sugiere que CnaB regula la generación de

biomasa en glicerol y posiblemente esta igualmente regulando el metabolismo oxidativo.

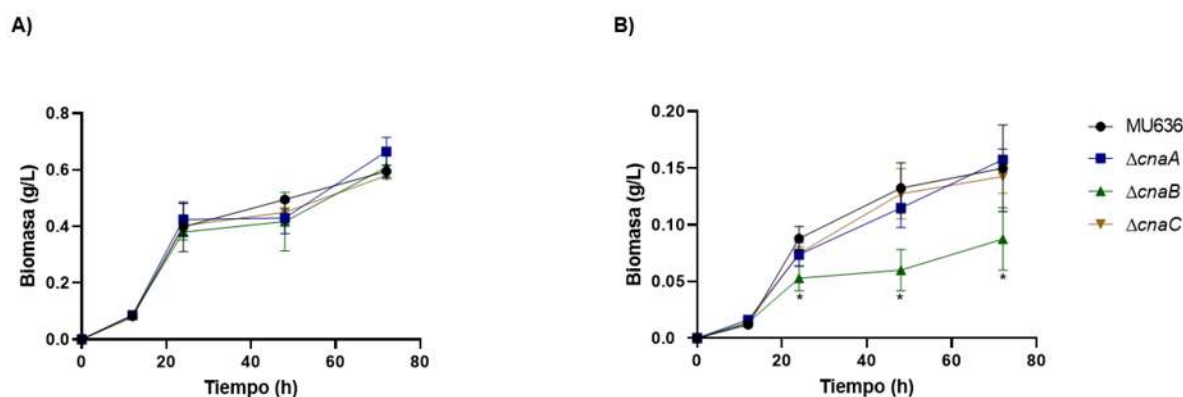


Figura 13. Efecto de las subunidades de la CN en la generación de biomasa en presencia de una fuente de carbono no fermentable. Esporas de las distintas cepas mutantes de las subunidades de la CN así como de la cepa WT fueron cultivadas en condiciones aeróbicas a diferentes tiempos 12, 24, 48 y 72 h en medio **A)** YNB-2%; **B)** YNG, posteriormente al crecimiento cuantificó la biomasa generada a los tiempos indicados. Los datos representan el promedio $\pm$ error estándar (SE) de tres experimentos independientes (n=3). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's, $*p < 0.05$.

8.3 Función de las subunidades de la CN en el consumo de oxígeno

Para demostrar la función de las subunidades de la CN y conocer cómo influye en el consumo de oxígeno debido a que representa parte del metabolismo oxidativo mitocondrial, se determinó el consumo de oxígeno en las cepas mutantes en los genes de dichas subunidades. Las cepas $\Delta cnaC$ y $\Delta cnaA$ consumieron significativamente más oxígeno en el medio YPG comparado con la cepa WT. Mientras que el consumo de oxígeno de la cepa $\Delta cnaB$ fue similar a la cepa WT, en cambio la cepa $\Delta cnaB$ mostró la menor tasa de consumo de oxígeno respecto a todas las cepas (**fig. 14A**). Posterior a la germinación en YNB-0.1% la cepa $\Delta cnaA$ y la cepa $\Delta cnaC$ consumieron más rápido el oxígeno respecto a la cepa WT. En cambio, las mutantes $\Delta cnaB$ y $\Delta cnaB$ mostraron una menor tasa de consumo de oxígeno respecto a la cepa WT (**fig. 14B**). Por otra parte, la germinación en medio

YPG-6% (medio que estimula el metabolismo fermentativo), la cepa $\Delta cnaA$ mostró un aumento en la tasa de consumo de oxígeno respecto a la cepa WT. En cambio, las otras cepas mutantes tuvieron una menor tasa de consumo de oxígeno en comparación con la cepa WT (**fig. 14C**).

Estos datos sugieren que en las subunidades CnaA y CnaC podrían estar regulando negativamente la respiración; además, posiblemente la vía PKA está reprimiendo la respiración en las mutantes que respiraban más ($\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$) debido que cuando se usó el medio que estimula el metabolismo fermentativo (YPG-6%) reprimió la respiración en comparación al medio YNB-0.1%.

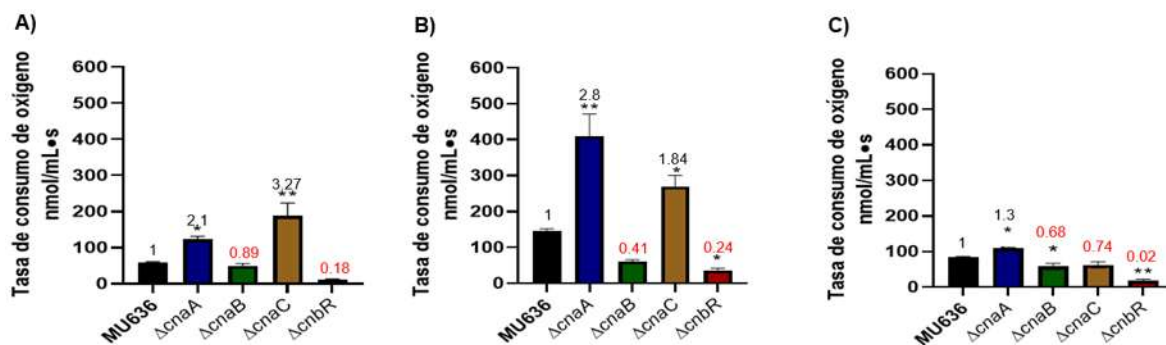


Figura 14. Efecto de las distintas subunidades de la CN en el consumo de oxígeno.

Esporas de las diferentes cepas se les cuantificó el consumo de oxígeno posterior a la germinación por 3 y 4 h en los medios de cultivo de **A) YPG**; **B) YNB-0.1%** y **C) YPG-6%**. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes ($n=3$). Se le asignó a la cepa WT un valor arbitrario de 1 que está indicado arriba de las barras, las cepas mutantes muestran las veces que tuvieron una tasa aumentada (color negro) o disminuida (color rojo) de oxígeno respecto a la cepa WT. Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. $*p < 0.05$; $**p < 0.001$.

Para confirmar la participación de las subunidades de la CN en el aumento de la respiración, el medio de cultivo fue adicionado 0.5 mM del inhibidor de la cadena respiratoria KCN (concentración subletal para la cepa WT). Se observó que la presencia de KCN disminuyó la tasa de consumo de oxígeno en todas las mutantes, así como en la cepa WT (**fig. 15A y B**). Por lo que se sugiere que existe una asociación entre las subunidades de la CN con la función de la cadena de transporte de electrones.

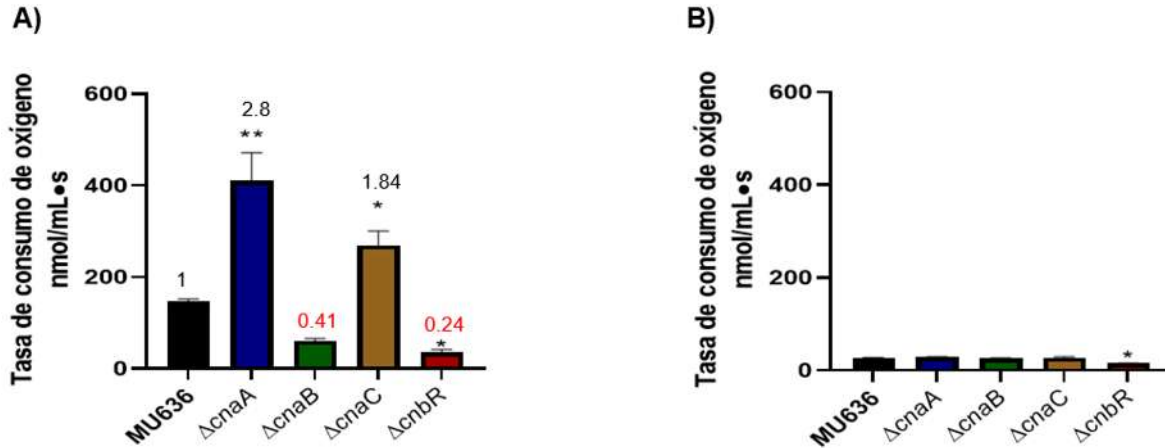


Figura 15. Efecto del inhibidor de la cadena de electrones (KCN) en el consumo de oxígeno de las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN. Esporas de las diferentes cepas se les cuantifico el consumo de oxígeno posterior a la germinación por 4 h en los medios de cultivo. **A)** YNB-0.1%; **B)** YNB-0.1% complementado con KCN 0.5 mM. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Se le asigno a la cepa WT un valor arbitrario de 1 que está indicado arriba de las barras, las cepas mutantes muestran las veces que tuvieron una tasa aumentada (color negro) o disminuida (color rojo) de oxígeno respecto a la cepa WT. Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

8.4 Cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$ producido por las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN

Debido a que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ consumen una mayor cantidad de oxígeno (**fig. 14A**), se sugiere que dichas cepas podrían tener una mayor actividad en la cadena de transporte de electrones o inducir el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, lo cual podría estar generando un aumento en la producción de las ROS. Por lo que se cuantificó los niveles del radical $\text{OH}^\cdot$ producido por las distintas cepas mutantes en los genes de la CN.

La germinación en YNB-0.1%, reveló que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ produjeron una mayor cantidad del radical $\text{OH}^\cdot$ (debido a que la cuantificación de la fluorescencia se basa en la detección del radical $\text{OH}^\cdot$) comparado con la cepa WT. Mientras que en el caso de la cepa $\Delta cnaB$ generó aproximadamente la misma cantidad del radical

OH⁻ que la cepa WT (**fig. 16**). Lo que sugiere que CnaA y CnaC regulan negativamente los niveles de radical OH⁻ posiblemente por el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones en *M. lusitanicus*.

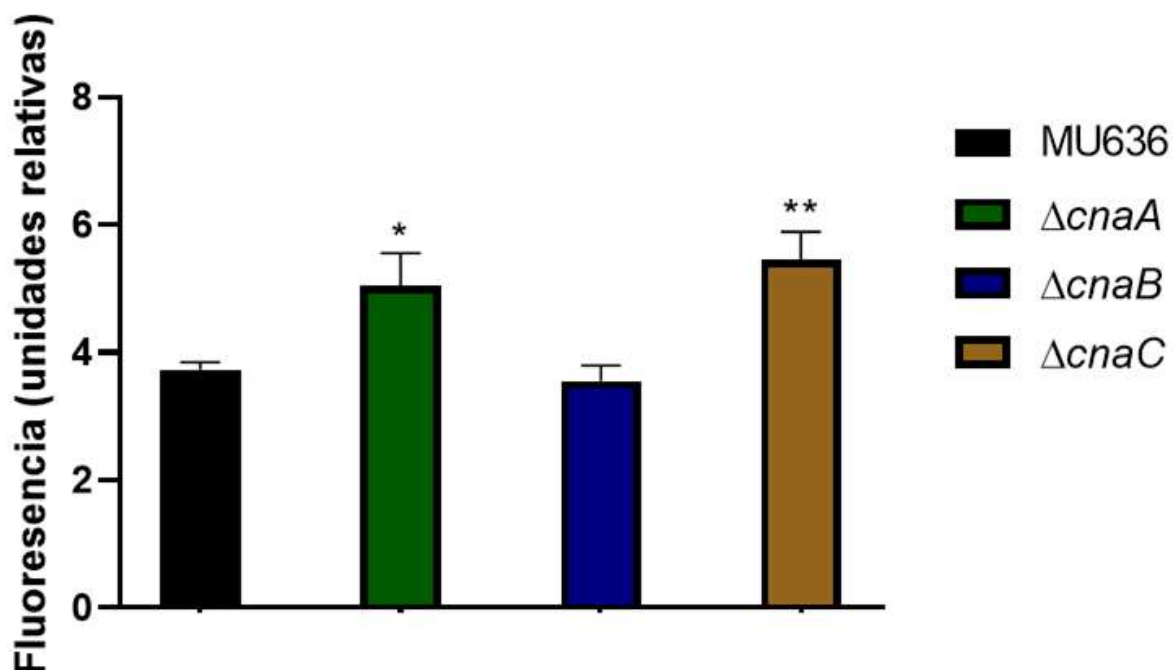


Figura 16. Cuantificación del radical OH⁻ producido por las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN. Esporas de las diferentes cepas fueron germinadas en aerobiosis en YNB-0.1% por 4 h. Se midió la producción de OH⁻. n=3, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

8.5 Participación de las subunidades de la CN en el estrés oxidativo en *M. lusitanicus*

Debido a que las cepas ΔcnaA y ΔcnaC consumieron más rápido el oxígeno y generaron una mayor cantidad del radical OH⁻, se evaluó la resistencia al estrés oxidante generado por el paraquat (generador del ion superóxido, O²⁻). El crecimiento de la cepa ΔcnaA en el medio YNB-0.1% adicionado con paraquat al 1.5 mM generó un mayor crecimiento radial (16 ± 1.5 mm) comparado con la cepa

WT (11 ± 1 mm) y al igual que la cepa $\Delta cnaC$ (11 ± 1 mm) (**fig. 17B y E**). Por otra parte, se observó una disminución del crecimiento en la cepa $\Delta cnaB$ (4 ± 1 mm), mientras que la cepa $\Delta cnbR$ no creció en estas condiciones de crecimiento (**fig. 17B y E**). Al aumentar la concentración de paraquat a 2 mM, únicamente crecieron las cepas $\Delta cnaA$ (11 ± 1 mm de diámetro) y la WT (10.5 ± 1 mm de diámetro) (**fig. 17C y F**). Estos datos indican que la mutante $\Delta cnaA$ muestra el mismo nivel de resistencia al paraquat que la cepa WT, contrario a las otras cepas, posiblemente las cepas $\Delta cnbR$, $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ tienen una menor eficiencia de sus sistemas antioxidantes, lo cual explicaría la mayor susceptibilidad al efecto nocivo del paraquat.

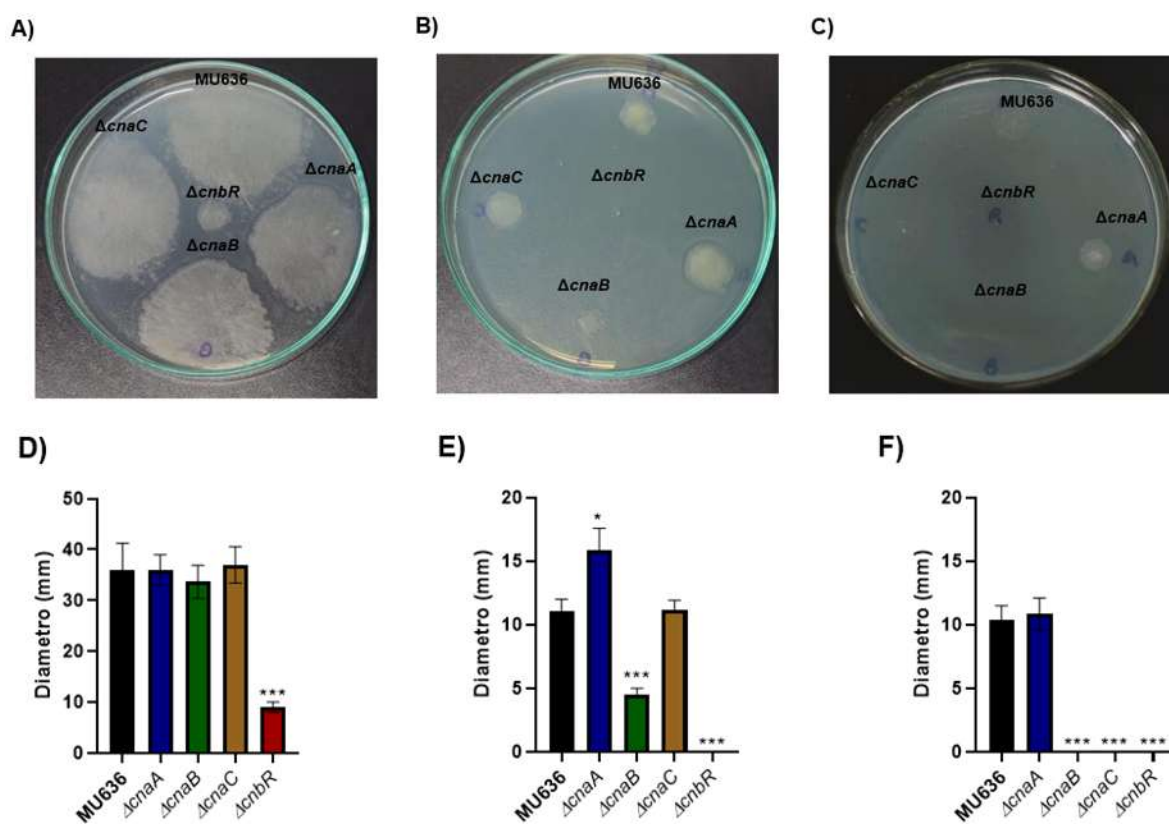


Figura 17. Efecto de estrés oxidativo en las cepas mutantes de la CN de *M. lusitanicus*. Fotos representativas posterior a 72 h de crecimiento. Se inocularon 1,000 esporas de cada cepa mutante de CN en: **A)** YNB-0.1%; **B)** YNB-0.1% suplementado con paraquat al 1.5 mM; **C)** YNB-0.1% suplementado con paraquat al 2 mM; **D)** YNB-0.1%; **E)** YNB-0.1% suplementado con paraquat al 1.5 mM; **F)** YNB-0.1% suplementado con

paraquat al 2 mM. Se muestra una representación de tres experimentos independientes (n=3). * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

8.6 Participación de las subunidades de la CN en el efecto tóxico de los SS libres de células de *M. lusitanicus*

Debido a que se ha relacionado al metabolismo oxidativo mitocondrial con el aumento de la virulencia en *M. lusitanicus* (Alejandre-Castañeda y col., 2020; Alejandre-Castañeda y col., 2023; Patiño-Medina, 2023), se evaluó la toxicidad de los SS obtenidos a partir del crecimiento aeróbico frente a *C. elegans*. Se observó un aumento en la toxicidad de los SS obtenidos en YPG-2% a partir de las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, respecto a la cepa WT; los SS de las otras cepas, $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$, tuvieron una nula toxicidad (fig. 18A). Cuando se evaluaron los SS obtenidos a partir del crecimiento aeróbico en medio YNB-0.1% de las distintas cepas frente a *C. elegans*, se observó un aumento en la toxicidad de los SS de las cepas $\Delta cnaC$ y $\Delta cnaA$, respecto a la cepa WT; fue más evidente el efecto toxico de los SS en este medio de cultivo, ya que estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial. Los SS de las otras cepas mutantes $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$ tuvieron una nula toxicidad (fig. 18B). Los SS obtenidos en medio YPG-6% mostraron nula toxicidad frente a los nematodos en las distintas cepas (fig. 18C).

El crecimiento de todas las cepas mutantes y la cepa WT crecidas en presencia de medio YNB-0.1% y suplementado con KCN 0.5 mM disminuyó la toxicidad de los SS frente a los nematodos (fig. 19B). Por otra parte, cuando fue suplementado el medio YNB-0.1% con el antioxidante N-acetilcisteína, se observó la disminución de la toxicidad de los SS de todas las cepas (fig. 19C). Estos resultados sugieren que la toxicidad de los SS es regulada negativamente por CnaA y CnaC, y dicha toxicidad es reprimida por la inhibición del transporte de electrones en la cadena respiratoria, así como por la disminución de los niveles de las ROS. Mientras que CnaB y CnbR podrían estar regulando positivamente la secreción de un factor toxico.

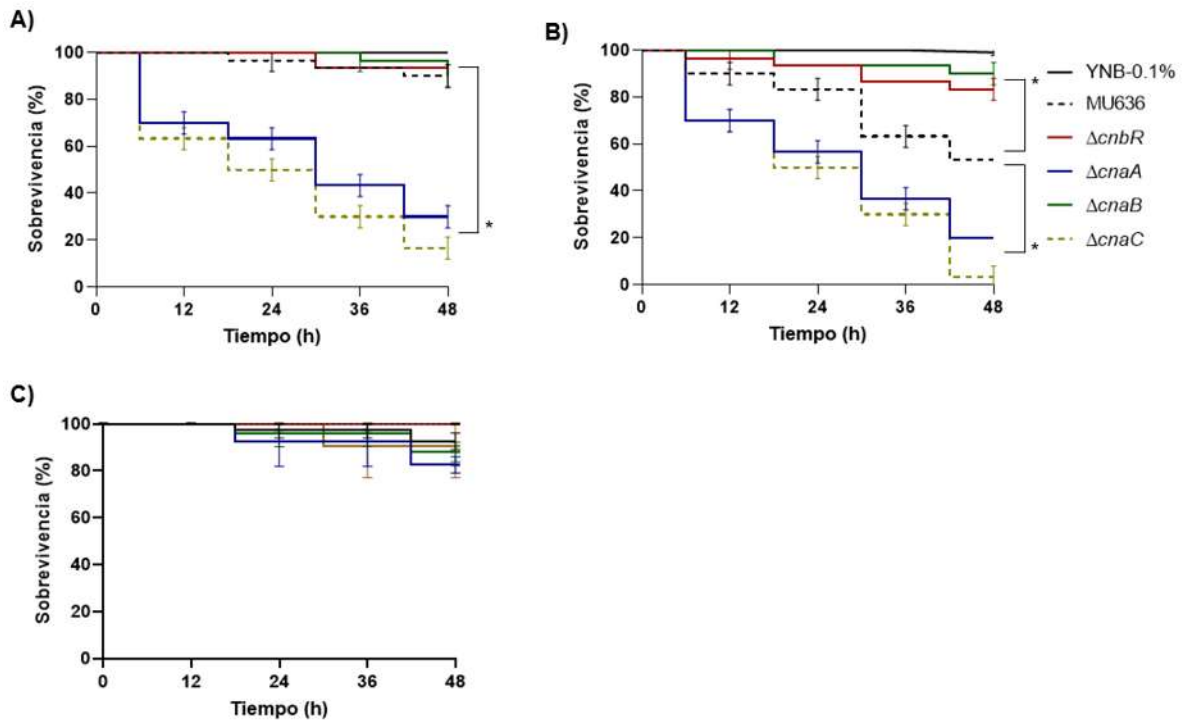


Figura 18. Efecto de las subunidades de la CN en la toxicidad de los SS obtenidos del crecimiento micelial y su relación con metabolismo oxidativo mitocondrial. Los SS de las diferentes cepas obtenidos a partir del crecimiento aeróbico en medio **A)** YPG; **B)** YNB-0.1% y **C)** YPG-6% incubados por 48 h se pusieron en contacto con *C. elegans*. n=15 nematodos, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$.

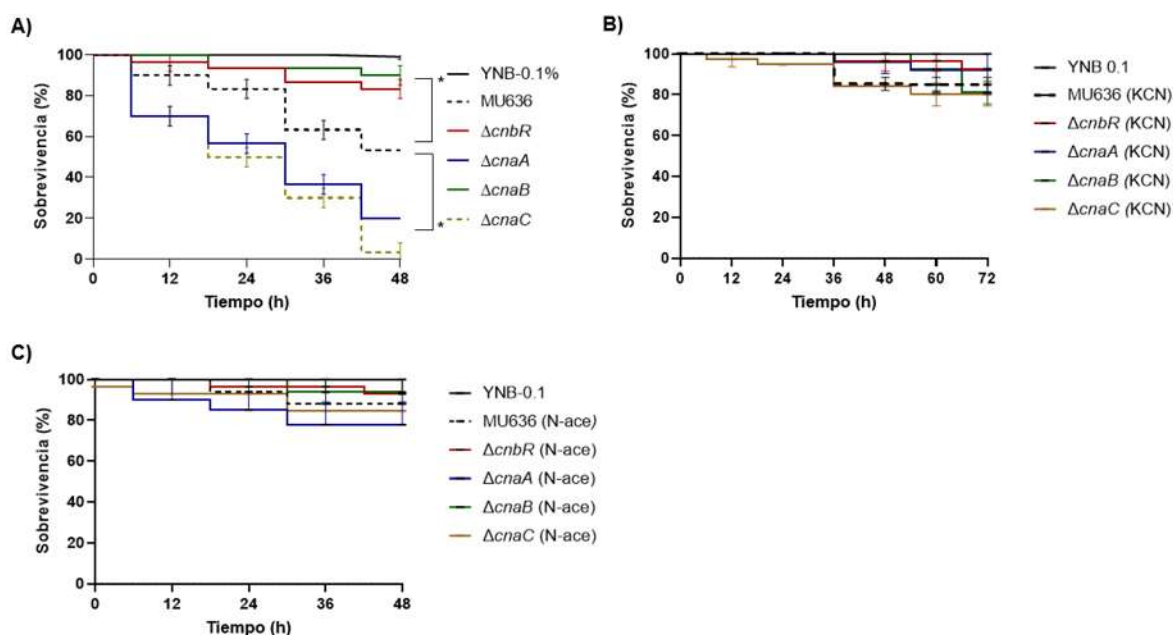


Figura 19. Participación de la cadena de transporte de electrones y las ROS en la toxicidad de los SS de las cepas mutantes en las subunidades de la CN. Los SS libre de célula de las diferentes cepas obtenidos a partir del crecimiento aeróbico en los medios **A)** YNB-0.1%; **B)** YNB-0.1% suplementado con KCN 0.5 mM; **C)** YNB-0.1% suplementado con N-acetilcisteína 10 mM, los cuales fueron incubados por 48 h se pusieron en contacto con *C. elegans*. n=15 nematodos, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$.

8.7 Participación de las subunidades de la CN en la virulencia en *G. mellonella*

Con la finalidad de evaluar la virulencia de las esporas de cada una de las cepas mutantes en las distintas subunidades de la CN, se realizaron los ensayos de virulencia en larvas del insecto de *G. mellonella*, donde se inyectaron las esporas de las distintas cepas mutantes de las subunidades catalíticas de CN así como de la cepa WT. Se observó que a partir de día 5 post-inyección, las esporas de las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ produjeron menor supervivencia en las larvas comparado con las inoculadas con la cepa WT, mientras las larvas inoculadas con las esporas

de las cepas $\Delta cnaB$ tuvieron un porcentaje de supervivencia muy parecido al porcentaje de supervivencia de las larvas inoculadas con la cepa WT (**fig. 20**). Estos datos indican que CnaA y CnaC podría estar regulando negativamente la virulencia en larvas, mientras que CnaB se comporta muy parecido a la cepa WT.

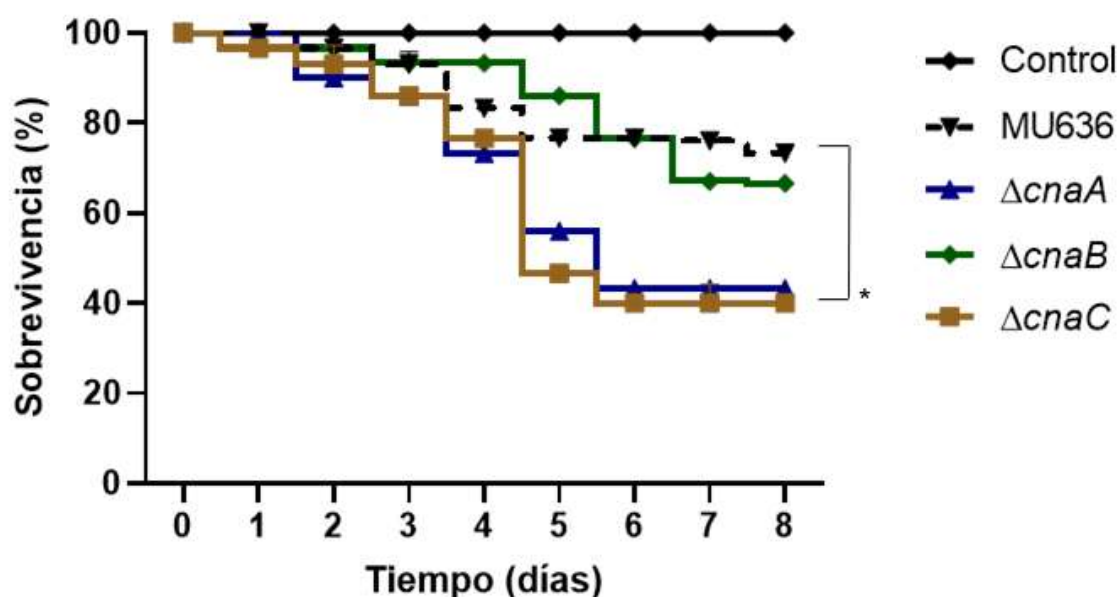


Figura 20. Efecto de las subunidades de la CN de *M. lusitanicus* en la supervivencia de *G. mellonella*. Se inyectaron 10,000 esporas en 20 μ L de PBS de cada una de las cepas mutantes y WT en larvas de *G. mellonella*. Se utilizaron 15 *G. mellonella* por ensayo de infección, las cuales fueron inoculadas con 10,000 esporas en 20 μ L en cada *G. mellonella*, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio. Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$.

8.8 Efecto en la morfología de las cepas mutantes en los genes que codifican a la CN en condiciones bajas de oxígeno

La morfología de *M. lusitanicus* depende de la concentración de oxígeno presente en el medio de cultivo, por ejemplo, niveles de ($4.9 \pm 0.45\%$ de oxígeno) generan una mezcla de levaduras y micelio (**Patiño-Medina y col., 2023**). Por lo que con la finalidad de determinar el efecto de las subunidades de la CN en las morfologías

(hifa/levadura) generadas en bajos niveles de O₂, se crecieron las esporas en agitación a 40 rpm (4.9 ± 0.45% O₂) durante 6 h en medio YPG. La cepa $\Delta cnaA$ tuvo un aproximado de 55% de hifas y 45% de levaduras, por lo que fueron muy parecidos a los producidos a los observados en la cepa WT.

La cepa $\Delta cnaB$ produjo aproximadamente 30% de hifas y 70% de levaduras. La cepa $\Delta cnaC$ tuvo un aproximado de 75% de hifas y 25% de levaduras, por lo que produjo mayor cantidad de hifas comparado con la cepa WT. La cepa $\Delta cnbR$ produjo 100% de levaduras (**fig. 21**). Estos datos sugieren que la cepa *CnaB* y *CnbR* serían reguladores positivos de la generación de hifas (morfología relacionada con la virulencia), mientras *CnaC* sería un regulador positivo de la formación de levaduras (morfología relacionada con la avirulencia) en condiciones bajas de oxígeno (4.9 ± 0.45% O₂).

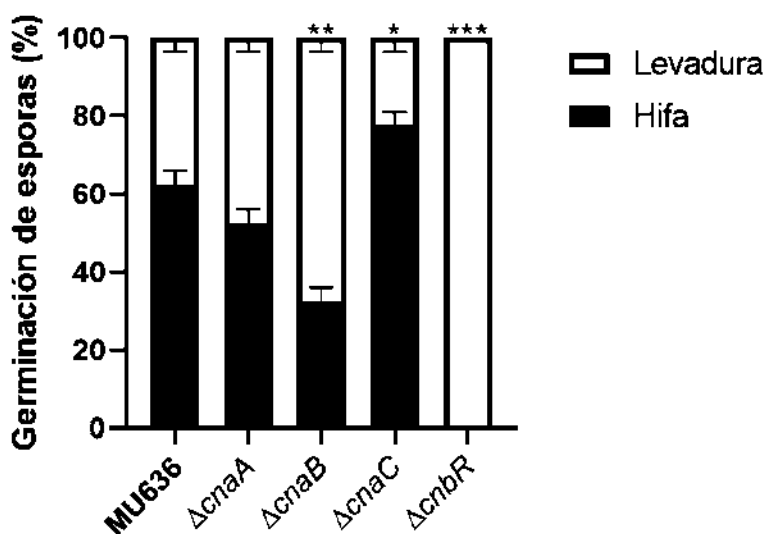


Figura 21. Efecto en la morfología generada por las mutantes de los genes que codifican a la CN de *M. lusitanicus* en condiciones bajas de oxígeno. Germinación en condiciones bajas de oxígeno (4.9 ± 0.45% O₂) en YPG-2% líquido después de 6 h de incubación. n=3, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Barra de escala = 20 μm. Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. **p* < 0.05; ** *p* < 0.001; ****p* < 0.0001.

8.9 Componentes de la vía de la CN en la regulación de Dnm1 y Fzo1 durante el crecimiento micelial de *M. lusitanicus*

Se ha descrito que la proteína Dnm1 es esencial para el proceso de fisión mitocondrial, mientras la proteína Fzo1 está involucrado en el proceso de fusión mitocondrial. Por lo que fue de interés continuar con el estudio de los componentes de la vía de la CN en el contexto de la señalización que regula a las proteínas Dnm1 y Fzo1. Para evaluar si la CN es un componente río arriba de Dnm1 y Fzo1, se cuantifico la acumulación de transcrito de los distintos genes que codifican a las subunidades de la CN. Para lo cual el transcrito de dichos genes se cuantificó en la cepa WT y en las cepas WT sobreexpresando a *dnm1* y *fzo1* en medio YPG-2% (**fig. 22A**), YNB-0.1% (**fig. 22B**) y YPG-6% (**fig. 22C**).

Cuando fue utilizado el medio YPG-2% se observó que la sobreexpresión de gen *dnm1* en la cepa WT, disminuyó los niveles de ARNm de los genes que codifican a cada una de las subunidades de la CN (*cnaA*, *cnaB*, *cnaC* y *cnbR*) (**fig. 22B**). De la misma manera cuando fue usado el medio que estimula el metabolismo fermentativo (YPG-6%), los niveles de ARNm de *cnaB* y *cnbR* disminuyeron en la cepa sobreexpresante de *dnm1* en el fondo genético WT comparado con la cepa WT, mientras que los niveles de RNAm de *cnaA* y *cnaC* fueron parecidos a los de la cepa WT. La cepa sobreexpresante de *dnm1* en el fondo genético WT crecida en medio YNB-0.1% generó la disminución de los niveles de ARNm de *cnbR* comparado con la cepa WT. Mientras que los niveles de ARNm de *cnaA*, *cnaB* y *cnaC* fueron parecidos a los de la cepa WT.

Por otra parte, cuando fue sobreexpresado *fzo1* en el fondo genético WT se observó que independientemente del medio de cultivo usado, YPG-2% (**fig. 22B**), YPG 6% (**fig. 22C**) y YNB-0.1% (**fig. 22A**), todas las subunidades de la CN aumentan los niveles de ARNm, comparado con la cepa WT, siendo más evidente en los medios YPG-2% y YNB-0.1% para el gen *cnaA* (**fig. 22A y B**).

Por lo que se concluye que, en lo general, *dnm1* regula la disminución de la expresión en la vía de la CN, mientras que *fzo1* regula el aumento de expresión.

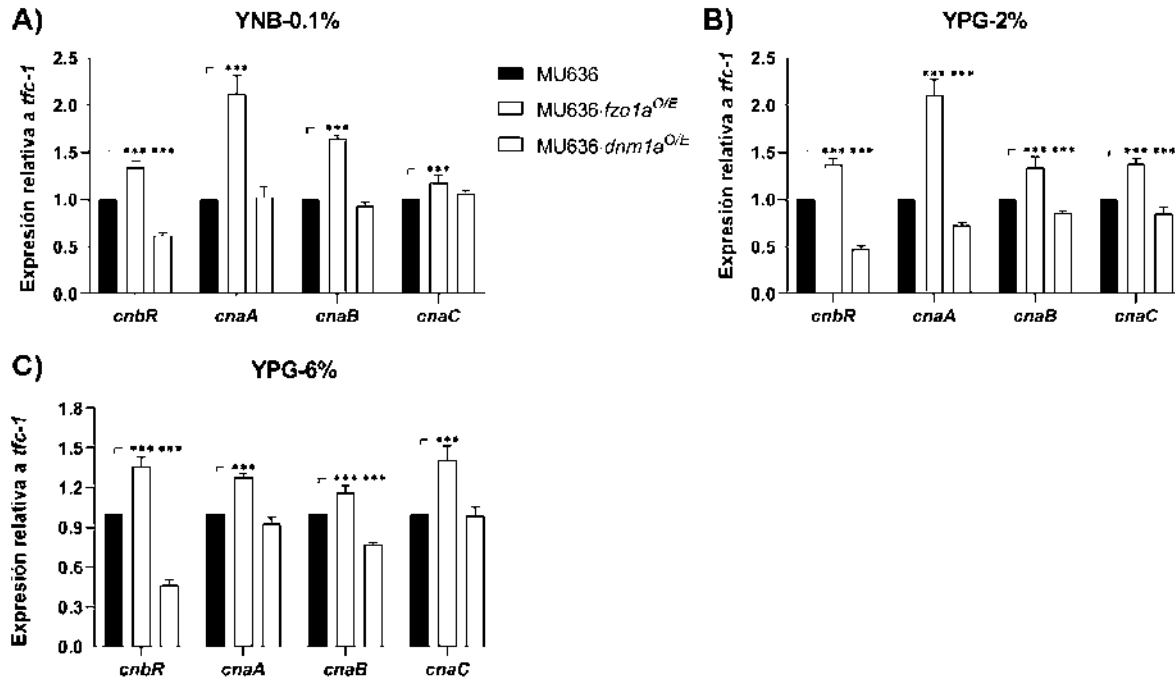


Figura 22. Análisis de expresión de genes que codifican a las subunidades de la CN de *M. lusitanicus* sobreexpresando a *fzo1* y *dnm1*. Se evaluó los niveles de ARNm de los genes que codifican a las distintas subunidades de la CN, mediante RT-qPCR en micelio de distintas h de crecimiento de la cepa WT y de la cepa WT sobreexpresando los genes *dnm1* y *fzo1*. La cuantificación del transcrito fue llevada a cabo postcultivo de micelio de 12 h en medio **A)** YNB-0.1%; postcultivo de micelio de 6 h en los medios medio **B)** YPG-2% y **C)** YPG-6%. Se muestra un análisis tipo $\Delta\Delta Ct$ para la comparación de la cepa WT entre las distintas cepas. n=3, se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

8.10 Función en la respiración de las proteínas Dnm1 y Fzo1 con la vía de la CN

Debido a que se observó que *dnm1* regula la disminución de expresión en la vía de la CN de *M. lusitanicus*, mientras que *fzo1* reguló el aumento de expresión (**fig. 22**) y a su vez se ha relacionado a Dnm1 con el proceso de fisión mitocondrial, mientras Fzo1 con el proceso de fusión mitocondrial, se evaluó a estas proteínas con las distintas subunidades de la CN en el contexto del consumo de oxígeno.

Datos anteriores indican que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ tienen una tasa más rápida de consumo de oxígeno comparado con la cepa WT, mientras que las cepas $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$ muestra una tasa de consumo de oxígeno disminuida (**fig. 14B**).

La germinación en medio YPG-2% de las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ sobreexpresando al gen *dmn1* ($\Delta cnaA \cdot dnm1^{O/E}$ y $\Delta cnaC \cdot dnm1^{O/E}$) mostraron una disminución en el consumo de oxígeno comparado con los niveles de las mutantes sencillas ($\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, respectivamente), pero la sobreexpresión de *dmn1* generó un nivel similar de consumo al de la cepa WT. En cambio, cuando se sobreexpresó *fzo1* en las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, estas mostraron la misma tasa de consumo de oxígeno que las mutantes sencillas. Por otra parte, $\Delta cnaB$ aumentó la tasa de consumo de oxígeno cuando se sobreexpresaron ambos genes *dmn1*^{O/E} y *fzo1*^{O/E} (**fig. 23A**). La tasa de consumo de oxígeno posterior a la germinación en medio YNB-0.1% fue similar al observado en el medio YPG-2% (**fig. 13B**). Cuando se sobreexpresó *fzo1*^{O/E} en las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, estas mostraron una mayor tasa de consumo de oxígeno que las mutantes sencillas posterior a la germinación en el medio YPG-6%. En cambio, cuando se sobreexpresó *dmn1* en las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, la tasa de consumo de oxígeno fue similar que las mutantes sencillas y al de la cepa WT posterior a la germinación en el medio YPG-6%. Por otra parte, $\Delta cnaB$ posterior a la germinación en el medio YPG-6%, aumentó la tasa de consumo de oxígeno cuando se sobreexpresaron ambos genes *dmn1*^{O/E} y *fzo1*^{O/E} (**fig. 23C**).

Por lo que se puede sugerir que la vía de la CN, a través de las subunidades CnaA y CnaC, participa regulando negativamente en la respiración mediante la inducción de la función de la proteína Dnm1; mientras que Fzo1 aumenta la respiración respecto a la cepa WT (esto en la ausencia de CnaA y CnaC). Además, se sugiere que la activación de la vía PKA reprime la respiración mediada por ausencia de CnaA y CnaC, debido que cuando se usó el medio que estimula el metabolismo fermentativo (YPG-6%) reprimió la respiración en las cepas $\Delta cnaA$ o $\Delta cnaC$, esta represión también fue observada en las cepas $\Delta cnaA$ o $\Delta cnaC$ sobreexpresantes del gen y *fzo1*.

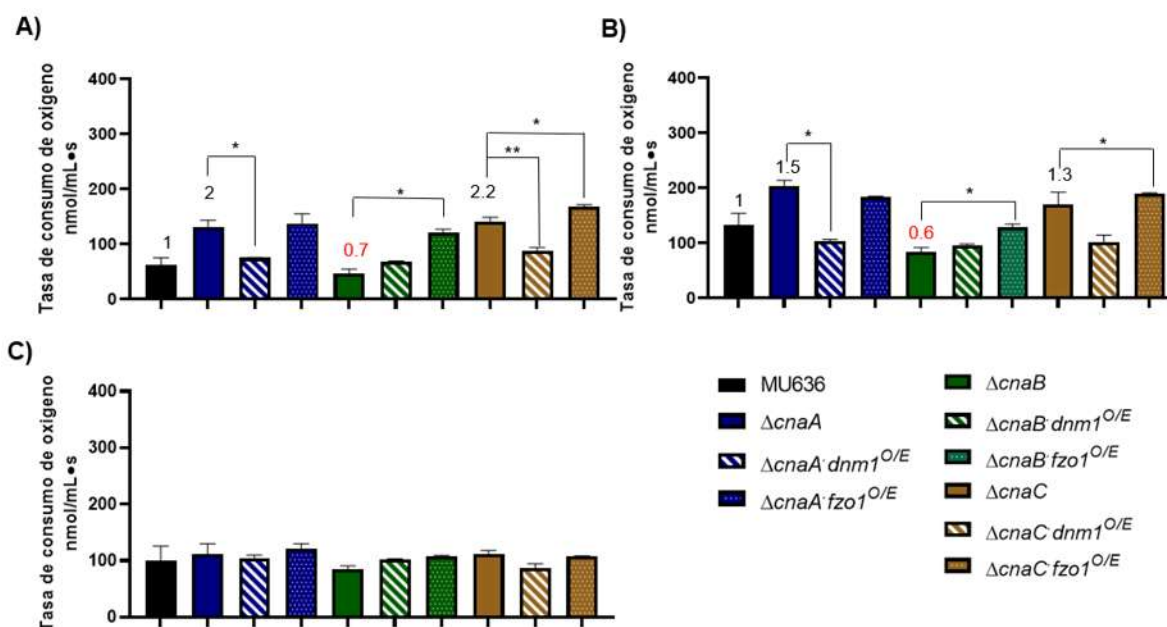


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de los genes *dnm1* y *fzo1* en la respiración celular de cepas mutantes en los genes que codifican a subunidades catalíticas de la CN. Esporas de las diferentes cepas mutantes en las subunidades de la CN sobreexpresando o no los genes *dnm1* y *fzo1*, las cuales fueron usadas para cuantificar el consumo de oxígeno posterior a su germinación por 3 y 4 h en los medios **A)** YPG; **B)** YNB-0.1% y **C)** YPG-6%. Se le asigno a la cepa WT un valor arbitrario de 1 que está indicado arriba de las barras, además se muestran las veces que aumentaron (negro) o disminuyeron (rojo) en el consumo de oxígeno respecto a la cepa WT. n=3, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

8.11 Cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$ de las cepas sobreexpresantes *dnm1* y *fzo1* en las cepas mutantes en los genes que codifican las subunidades de la CN

Debido a que la sobreexpresión del gen *dnm1* en las cepas ΔcnaA y ΔcnaC , reprimió la tasa de consumo de oxígeno (**fig. 23A y 23C**), sugiriendo que la ausencia de CnaA y CnaC regula positivamente el proceso de fisión mitocondrial; debido a

esto, se realizó una cuantificación del radical $\text{OH}^\cdot$ en dichas cepas. Las cepas $\Delta\text{cnaA}:\text{dnm1}^{\text{O/E}}$ y $\Delta\text{cnaC}:\text{dnm1}^{\text{O/E}}$ produjeron una menor cantidad del radical $\text{OH}^\cdot$ respecto a las cepas ΔcnaA y ΔcnaC , indicando que en la sobreexpresión de *dnm1* existe una menor actividad en la cadena de transporte de electrones o posiblemente un mayor acoplamiento de la cadena de transporte de electrones y que consecuentemente generan una menor cantidad de ROS. En cambio, las cepas sobreexpresando al gen *fzo1* estarían generando una mayor actividad en la cadena de transporte de electrones o mayor desacoplamiento y con ello mayor cantidad de ROS (**fig. 24**).

Mientras que las sobreexpresiones de *dnm1*^{O/E} y *fzo1*^{O/E} en la cepa ΔcnaB , presentaron mayor cantidad de radical $\text{OH}^\cdot$ que la mutante sencilla (**fig. 24**), estos datos no generan una explicación racional de la participación de Fzo1 y Dnm1 en la ausencia de CnaA y CnaC.

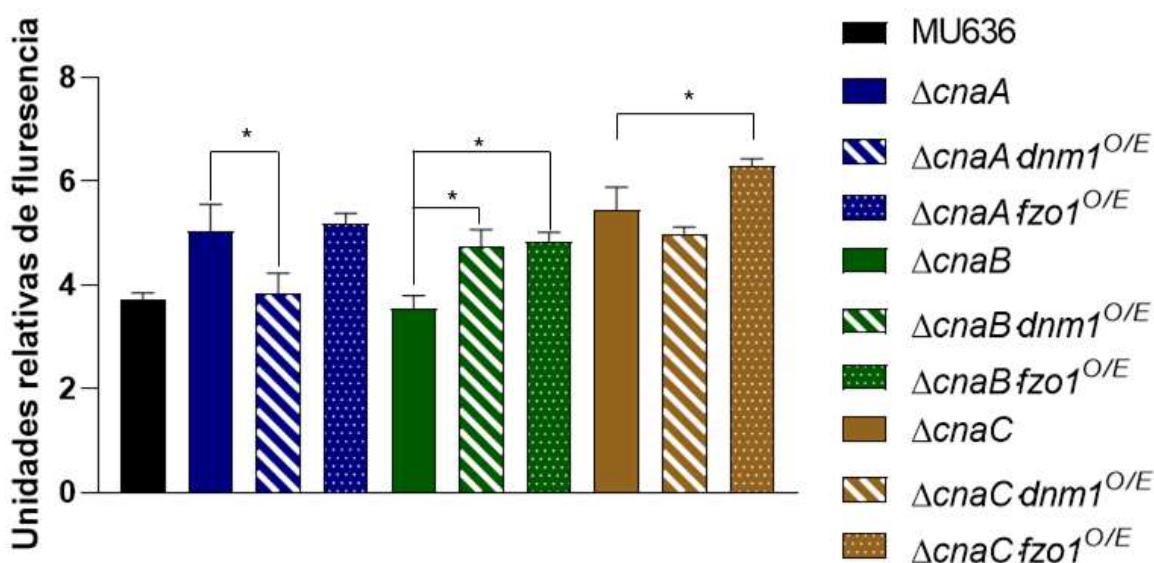


Figura 24. Producción del radical $\text{OH}^\cdot$ en las cepas mutantes en los genes de la CN sobreexpresando a *dnm1* y *fzo1*. Esporas de las diferentes cepas fueron germinadas en aerobiosis en YNB-0.1% por 4 h. Se midió la producción de radical $\text{OH}^\cdot$. n=3, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$

8.12 Toxicidad de los SS generados por las cepas mutantes en las subunidades catalíticas de la CN sobreexpresando los genes *dnm1* y *fzo1*

Los datos obtenidos mostraron que las cepas $\Delta cnaA \cdot dnm1^{O/E}$ y $\Delta cnaC \cdot dnm1^{O/E}$ disminuyeron la tasa de consumo de oxígeno, mientras que las cepas $\Delta cnaA \cdot fzo1^{O/E}$ y $\Delta cnaC \cdot fzo1^{O/E}$ aumentaron su tasa de consumo de oxígeno, respecto a sus respectivas mutantes sencillas (**fig. 24A y 24C**). Además, se ha descrito que Dnm1 contribuye positivamente al proceso de fisión mitocondrial, conduciendo a una menor actividad mitocondrial y con ello una menor virulencia en *Magnaporthe oryza* (**Zhong y col., 2016**), contrario a lo observado con Fzo1 en *C. neoformans* (**Chang y Doering, 2018**). Por lo tanto, se evaluó la toxicidad de los SS obtenidos en condiciones aeróbicas en medio YNB-0.1% a partir de las cepas sobreexpresando al gen *dnm1*^{O/E} en las distintas cepas mutantes en los genes de la CN.

Los SS obtenidos a partir de la cepa $\Delta cnaA$ sobreexpresando a *dnm1* aumentaron la supervivencia de los nematodos respecto a la cepa $\Delta cnaA$; en cambio, los SS de la cepa $\Delta cnaA$ sobreexpresando a *fzo1* mantuvieron un porcentaje de supervivencia similar que la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 25A**). Algo similar ocurrió con las cepas $\Delta cnaC$ sobreexpresando a *dnm1* o sobreexpresando a *fzo1* respecto a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 25C**).

Los SS obtenidos a partir de las cepas $\Delta cnaB$ sobreexpresando a *dnm1*^{O/E} o *fzo1*^{O/E} mantuvieron un porcentaje similar de supervivencia de los nematodos que la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 25B**). Estos datos sugieren que Dnm1 y Fzo1, logran reprimir o inducir, respectivamente la toxicidad del SS, cuando están ausentes las subunidades de la vía de la CN. Nuestros datos no lograron explicar cómo los productos de *fzo1* y *dnm1* pueden estar actuando en la ausencia de CnaB.

Estos datos sugieren que la regulación negativa de la toxicidad (SS) es controlada por la vía de la CN (subunidades CnaA y CnaC) a través de la proteína Dnm1 mientras que Fzo1 genera un efecto contrario.

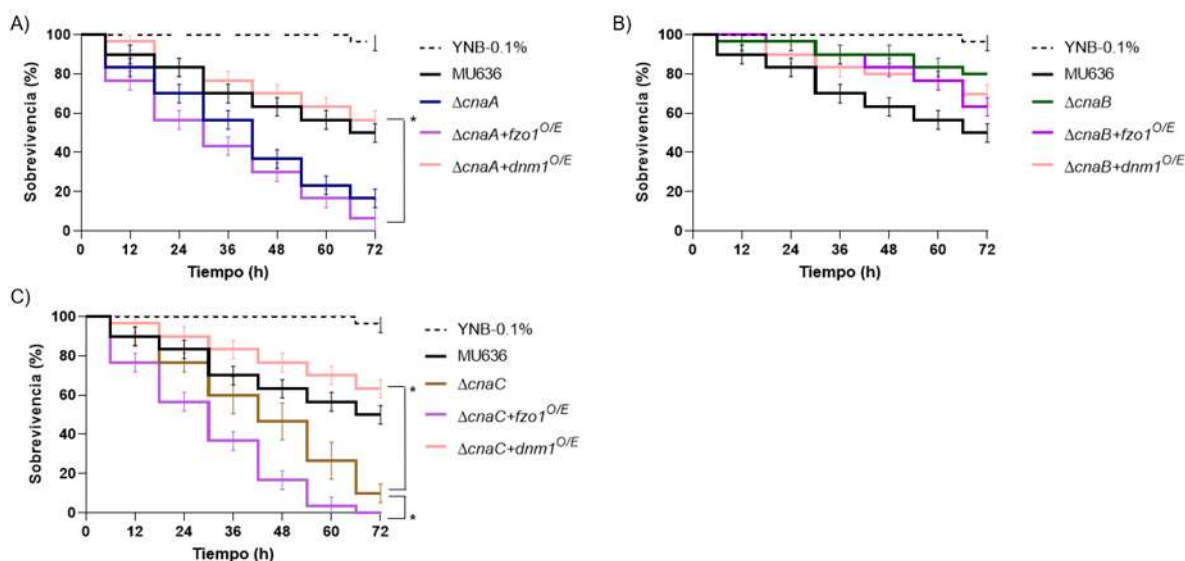


Figura 25. Efecto en la toxicidad en *C. elegans* de los SS producidos por las cepas mutantes en los genes que codifican a las subunidades de la CN sobreexpresando a los genes *dnm1*^{O/E} y *fzo1*^{O/E}. Los SS libres de células obtenidos del crecimiento aeróbico posterior a 48 h de crecimiento en los medios de **A)** YNB-0.1%; **B)** YNB-0.1%; **C)** YNB-0.1%. de las diferentes cepas mutantes de CN se pusieron en contacto con *C. elegans*. n=15 nematodos, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. **p* < 0.05.

8.13 Motivos de direccionalidad mitocondrial de la CN de *M. lusitanicus*

Los motivos de direccionalidad mitocondrial, dan señales de la orientación de las mitocondrias ya que reconocen presecuencias presentes en los primeros 10 a 90 aminoácidos N-terminales que contiene gran cantidad de arginina y poca presencia de residuos de aminoácidos con carga negativa y por medio de complejos de translocación se insertan en la membrana mitocondrial determinando el direccionamiento mitocondrial (**Schneider y col., 1998**).

Debido a que se ha relacionado a la vía de la CN con el proceso de fisión y fusión mitocondrial, fue de interés identificar si las subunidades de la CN poseían motivos de direccionalidad mitocondrial, así como posibles sitios de escisión por la peptidasa de procesamiento mitocondrial heterodímerica (MPP). La proteína Tom20 es una

proteína necesaria para la importación de las proteínas a la mitocondria, la cual reconoce motivos/señales que dirigen a las proteínas hasta la matriz mitocondrial (**Backes y col., 2018**), por lo que se realizó un análisis bioinformático en busca de estos motivos de direccionalidad en las distintas subunidades de la CN utilizado el software MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/>) (**fig. 26**).

Se identificó un posible sitio de escisión (MPP) en cada una de las subunidades de la CN en CnaA [posición 78 aa (aminoácidos) G], CnaB (posición 7 aa E), CnaC (posición 9 aa I), CnbR (posición 18 aa G) (**fig. 26**). Además, fue identificado en los primeros 100 aa del N terminal un motivo de reconocimiento por Tom20 en CnaA (posición 53-57 aa), CnaB (posición 52-56 aa) y dos motivos de reconocimiento Tom20 para CnaC (posiciones 26-30 y 63-67 aa), así como para CnbR (posiciones 27-31 y 47-51 aa). Este dato sugiere que las distintas subunidades de la CN se pueden dirigir a la matriz mitocondrial, aunque se desconoce la regulación espacio temporal que explique este proceso.



Figura 26. Identificación de sitios de direccionalidad mitocondrial en las subunidades de la CN. Se realizó un análisis bioinformático utilizado el software MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/>). Se representan las secuencias proteicas de las subunidades de la calcineurina (CnaA, CnaB, CnaC y CnbR) en *M. lusitanicus* (MI), la barra horizontal azul representa los aminoácidos (aa) presentes de cada subunidad. Se identificaron los posibles sitios de escisión por MPP (barra vertical azul) y los motivos de reconocimiento por el sistema Tom20 (barra vertical roja).

8.14 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaA$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN

Debido a la multiplicidad de subunidades catalíticas de la CN en *M. lusitanicus* se procedió a conocer si cada una de dichas subunidades cumplen funciones redundantes o específicas en el contexto del metabolismo oxidativo y virulencia.

Para lo cual se procedió a evaluar la tasa de consumo de oxígeno, producción de radical $OH^\cdot$, toxicidad de los SS y su efecto en condiciones bajas de oxígeno.

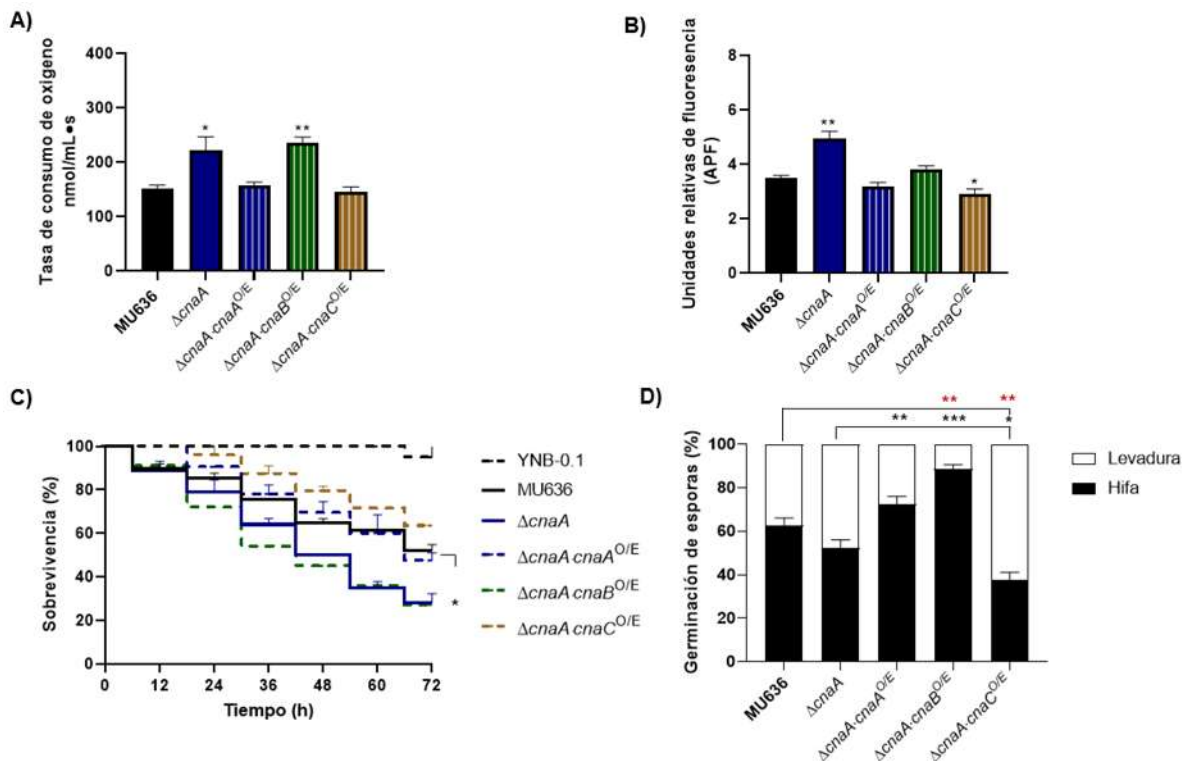
La germinación, la producción de radical $OH^\cdot$, así como los niveles de toxicidad en de los SS de la cepa $\Delta cnaA \cdot cnaA^{OE}$ mostró niveles parecidos a la cepa WT en todos estos parámetros (**fig. 27A-C**), pero en comparación con la cepa $\Delta cnaA$ dichos parámetros estaban disminuidos. La morfología generada por la cepa $\Delta cnaA \cdot cnaA^{OE}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2%, resultó en una proporción de hifas y levaduras similar a las cepas WT y $\Delta cnaA$ (**fig. 27D**). La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaA^{OE}$ produjo hifas más largas que la cepa WT, pero menos ramificadas que la cepa $\Delta cnaA$ (**fig. 27E-G**).

Por otra parte, la cepa $\Delta cnaA \cdot cnaB^{OE}$ presentó un aumento en los niveles de consumo de oxígeno respecto a la cepa WT (**fig. 27A**) y respecto a la cepa $\Delta cnaA$ no hubo diferencia significativa. La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaB^{OE}$ no presentó diferencias significativas en la producción del radical $OH^\cdot$ respecto a la cepa WT (**fig. 27B**), pero generó niveles de dicho radical disminuidos respecto a la cepa $\Delta cnaA$. Los SS obtenidos de la cepa $\Delta cnaA \cdot cnaB^{OE}$ fueron más tóxicos respecto a aquellos de la cepa WT, pero no fueron distintos respecto a la cepa $\Delta cnaA$ (**fig. 27C**).

La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaB^{OE}$ produjo 90% de hifas y 10% de levaduras en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) (**fig. 27D**) comparado con la cepa WT que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras; y respecto a $\Delta cnaA$ que produjo 50% levaduras y 50% hifas. La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaB^{OE}$ (**fig. 27H**) generó hifas más largas y ramificadas comparadas con la producidas por la cepa WT (**fig. 27E**) y con las de la cepa $\Delta cnaA$ (**fig. 27F**).

La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaC^{OE}$ no presentó diferencias significativas en los niveles de consumo de oxígeno con los de la cepa WT, pero dichos niveles fueron menores respecto a los de la cepa $\Delta cnaA$ (**fig. 27A**). La cepa $\Delta cnaA \cdot cnaC^{OE}$ presentó una

disminución en la producción del radical $\text{OH}^\cdot$ comparado con los de las cepas WT y ΔcnaA (**fig. 27B**). Los SS de la cepa $\Delta\text{cnaA}:\text{cnaC}^{\text{O/E}}$ no produjo cambios significativos en la toxicidad frente al nematodo respecto a los producidos por la cepa WT, pero fueron menos tóxicos respecto a los de la cepa ΔcnaA (**fig. 27C**). La cepa $\Delta\text{cnaA}:\text{cnaC}^{\text{O/E}}$ en condiciones de concentraciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% \text{ O}_2$) en medio YPG-2%, generó 35% de hifas y 65% de levaduras (**fig. 27D**), siendo distintas las proporciones en comparación con la cepa WT, la cual generó aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras; también distintas comparadas con la cepa ΔcnaA que generó 50% hifas y 50% levaduras; cabe mencionar que la cepa $\Delta\text{cnaA}:\text{cnaC}^{\text{O/E}}$ (**fig. 27I**) generó hifas más cortas comparadas con la producidas por las cepas WT (**fig. 27E**), y ΔcnaA (**fig. 27F**). En general la sobreexpresión de *cnaC* generó una represión del fenotipo de ΔcnaA . Por lo que se sugiere que la sobreexpresión de *cnaB* en la cepa ΔcnaA actúa como un regulador positivo de la generación de hifas y del aumento de la longitud de las mismas, además está involucrado en la regulación positiva de la respiración y la virulencia.



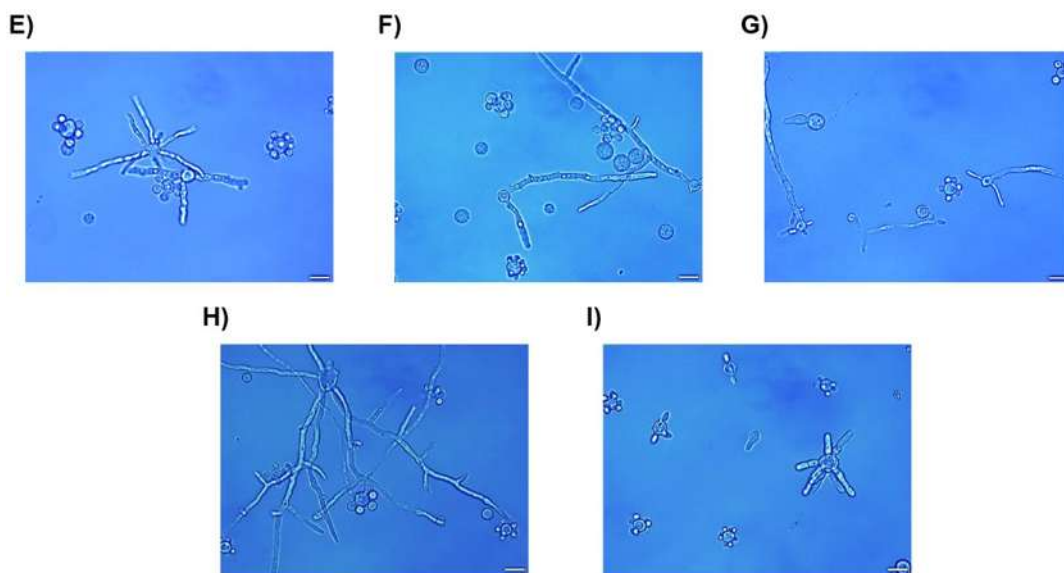


Figura 27. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaA$ de *M. lusitanicus*. Se utilizaron las diferentes cepas sobreexpresando los genes que codifican a las subunidades de la CN en la cepa $\Delta cnaA$, así como la cepa $\Delta cnaA$ complementada con *cnaA*. Las esporas fueron usadas para evaluar: **A)** el consumo de oxígeno posterior a la germinación en aerobiosis por 3 h en el medio YNB-0.1%. **B)** La producción del radical $OH^\cdot$ posterior a la germinación en aerobiosis por 4 h en YNB-0.1%. **C)** Los SS fueron obtenidos posterior al crecimiento aeróbico en medio YNB-0.1% por 48 h de crecimiento, los cuales se pusieron en contacto con *C. elegans* y se evaluó la sobrevivencia de los nematodos. **D)** Se determinó la germinación en bajos niveles de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2% líquido después de 6 h de crecimiento. Imágenes representativas de las esporas germinando en el panel **E)** MU636; **F)** $\Delta cnaA$; **G)** $\Delta cnaA \cdot cnaA^{O/E}$; **H)** $\Delta cnaA \cdot cnaB^{O/E}$; **I)** $\Delta cnaA \cdot cnaC^{O/E}$. $n=3$, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Barra de escala = 20 μm . Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. $*p < 0.05$; $**p < 0.001$; $***p < 0.0001$.

8.15 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaC$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN

El crecimiento en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaA^{OE}$ mostró un aumento en los niveles de consumo de oxígeno, la producción de radical $OH^\cdot$, así como la toxicidad frente a los nematodos de los SS respecto a las cepas WT, y $\Delta cnaB$ (**fig. 28A-C**).

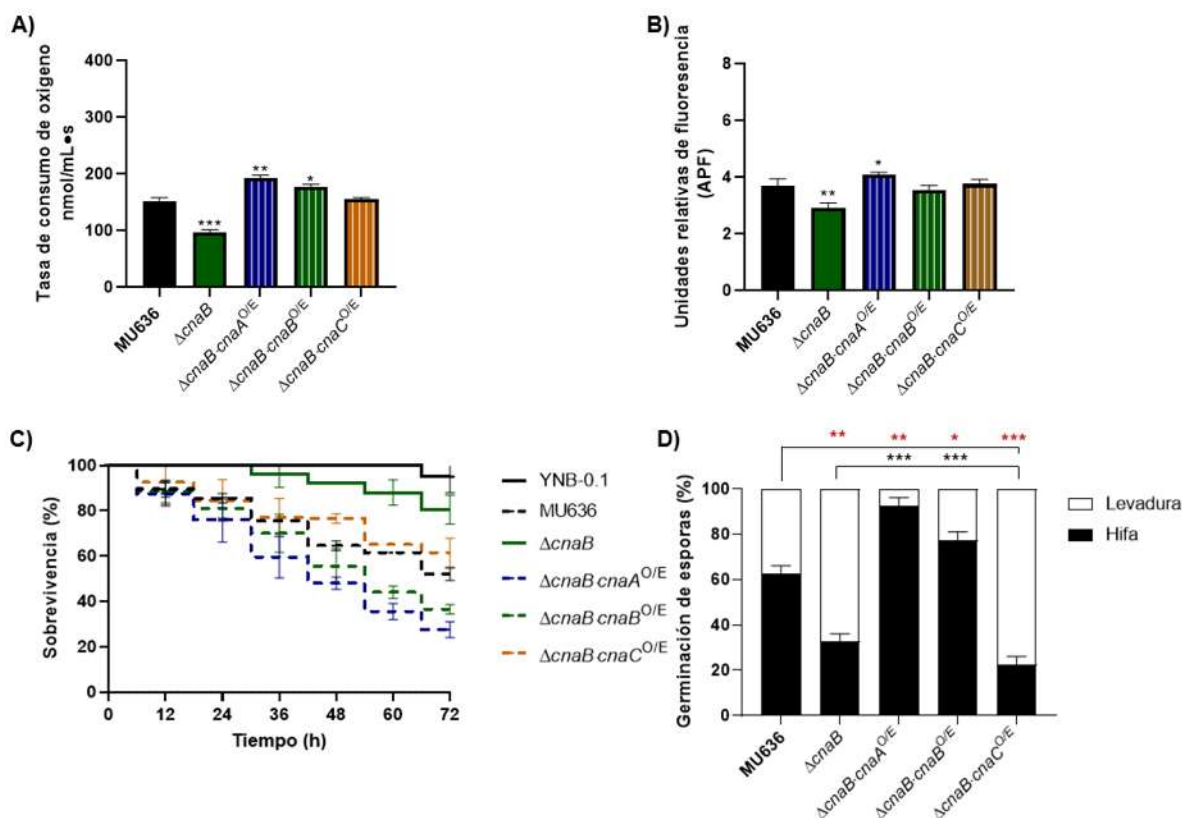
Cuando se evaluó la morfogénesis en medio YPG-2% generada por la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaA^{OE}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$), está produciendo 95% hifas y 5% levaduras, comparado con la cepa WT que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras; mientras que la cepa $\Delta cnaB$ produjo 35% hifas y 65% levaduras (**fig. 28D**), cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaA^{OE}$ (**fig. 28G**) generó hifas más largas y ramificadas comparadas con la producidas por la cepa WT (**fig. 28E**) y respecto a la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28F**).

La germinación en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaB^{OE}$ presentó niveles de consumo de oxígeno aumentados respecto a la cepa WT y respecto a la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28A**). La producción de radical $OH^\cdot$ de la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaB^{OE}$ germinando en medio YNB-0.1% no presentó diferencias significativas con los de la cepa WT, pero fueron mayores respecto a la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28B**). Los SS obtenidos de la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaB^{OE}$ generó niveles de toxicidad aumentados respecto a los producidos por las cepas WT y aquellos de la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28C**). La cepa $\Delta cnaB \cdot cnaB^{OE}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$), produjo 75% de hifas y 25% de levaduras (**fig. 28D**) comparado con la cepa WT que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras y respecto a $\Delta cnaB$ que produjo 35% hifas y 65% levaduras. Cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaB^{OE}$ (**fig. 28H**) generó hifas más largas y ramificadas comparadas con la producidas por las cepas WT (**fig. 28E**) y con las producidas por la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28F**).

La germinación en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaC^{OE}$ no presentó diferencias significativas en los niveles de consumo de oxígeno, en la producción del radical $OH^\cdot$ o la toxicidad de los SS respecto a los de la cepa WT (**fig. 28A-C**), pero estos valores fueron mayores respecto a los de la cepa $\Delta cnaB$. Es decir, CnaC complementa el fenotipo WT en $\Delta cnaB$.

La cepa $\Delta cnaB \cdot cnaC^{O/E}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\%$ O₂) generó 20% de hifas y 80% de levaduras, comparado con la cepa WT que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras y respecto a $\Delta cnaB$ que produjo 35% hifas y 65% levaduras (**fig. 28D**). Cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaB \cdot cnaC^{O/E}$ (**fig. 28I**) generó hifas más cortas comparadas con la producidas por la cepa WT (**fig. 28E**), y las producidas por la cepa $\Delta cnaB$ (**fig. 28F**).

Por lo que se sugiere que CnaA y CnaB son reguladores positivos de la generación de hifas, aumento de la longitud y ramificación de las mismas, aunado a estar involucrado en la regulación positiva de la respiración y la virulencia. Además, CnaA influye en el aumento de radical OH[•]. Mientras que CnaC es un regulador positivo de la formación de levaduras. Se sugiere además que CnaB podría estar regulado a CnaA y CnaC.



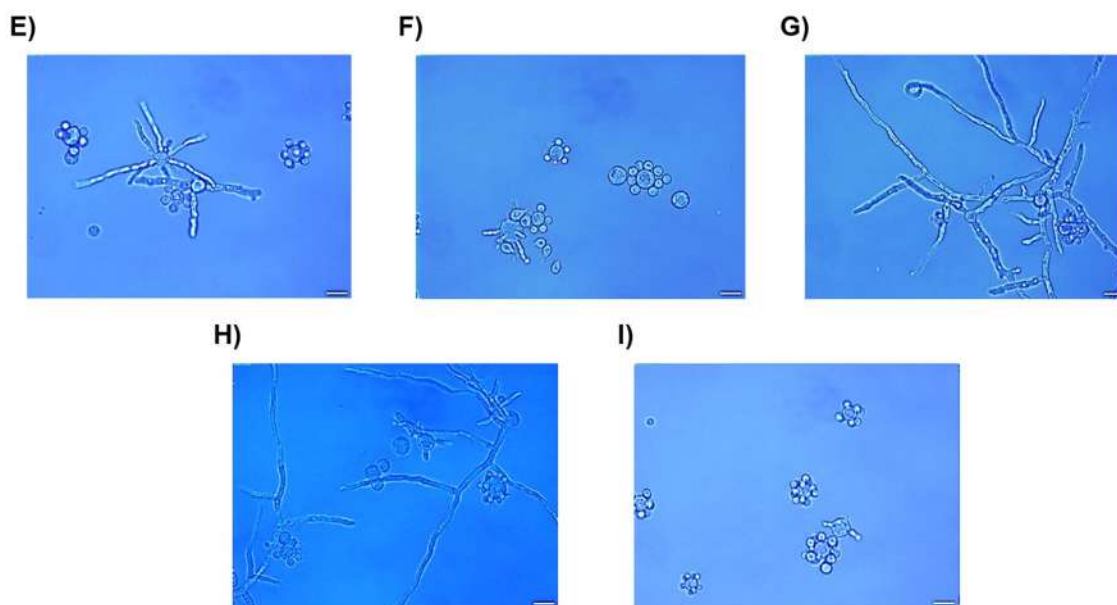


Figura 28. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaB$ de *M. lusitanicus*. Se utilizaron las diferentes cepas sobreexpresando los genes que codifican a las subunidades de la CN en la cepa $\Delta cnaB$, así como la cepa $\Delta cnaB$ complementada con *cnaB*. Dichas esporas fueron usadas para evaluar **A)** consumo de oxígeno posterior a la germinación en aerobiosis por 4 h en el medio YNB-0.1%. **B)** La producción de radical $OH^\cdot$ posterior a la germinación en aerobiosis por 4 h en YNB-0.1%. **C)** Los SS fueron obtenidos posterior al crecimiento aeróbico en medio YNB-0.1% por 48 h de crecimiento, los cuales se pusieron en contacto con *C. elegans* y se evaluó la sobrevivencia de los nematodos cada 12 h. **D)** Se determinó la germinación en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2% líquido después de 6 h de crecimiento. Imágenes representativas de las esporas germinando en el panel **E)** MU636; **F)** $\Delta cnaB$; **G)** $\Delta cnaB:cnaA^{OE}$; **H)** $\Delta cnaB:cnaB^{OE}$; **I)** $\Delta cnaB:cnaC^{OE}$. $n=3$, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Barra de escala = 20 μm . Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. $*p < 0.05$; $**p < 0.001$; $***p < 0.0001$.

8.16 Efecto en el crecimiento y metabolismo oxidativo de la cepa $\Delta cnaC$ sobreexpresando los distintos genes catalíticos de la CN

La germinación en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaC::cnaA^{OE}$ no mostró diferencia significativa en los niveles de consumo de oxígeno, la producción de radical $OH^\cdot$, así como en la toxicidad los SS obtenidos respecto a los de la cepa WT, pero todos estos valores disminuyeron respecto a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29A-C**).

La cepa $\Delta cnaC::cnaA^{OE}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) no produjo diferencias significativas en la producción de hifas y levaduras (**fig. 29D**), comparado con la cepa WT; pero si comparado con la cepa $\Delta cnaC$ que produjo 75% hifas y 25% levaduras. Cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaC::cnaA^{OE}$ (**fig. 29G**) generó hifas más gruesas comparadas con la producidas por la cepa WT (**fig. 29E**) y respecto a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29F**).

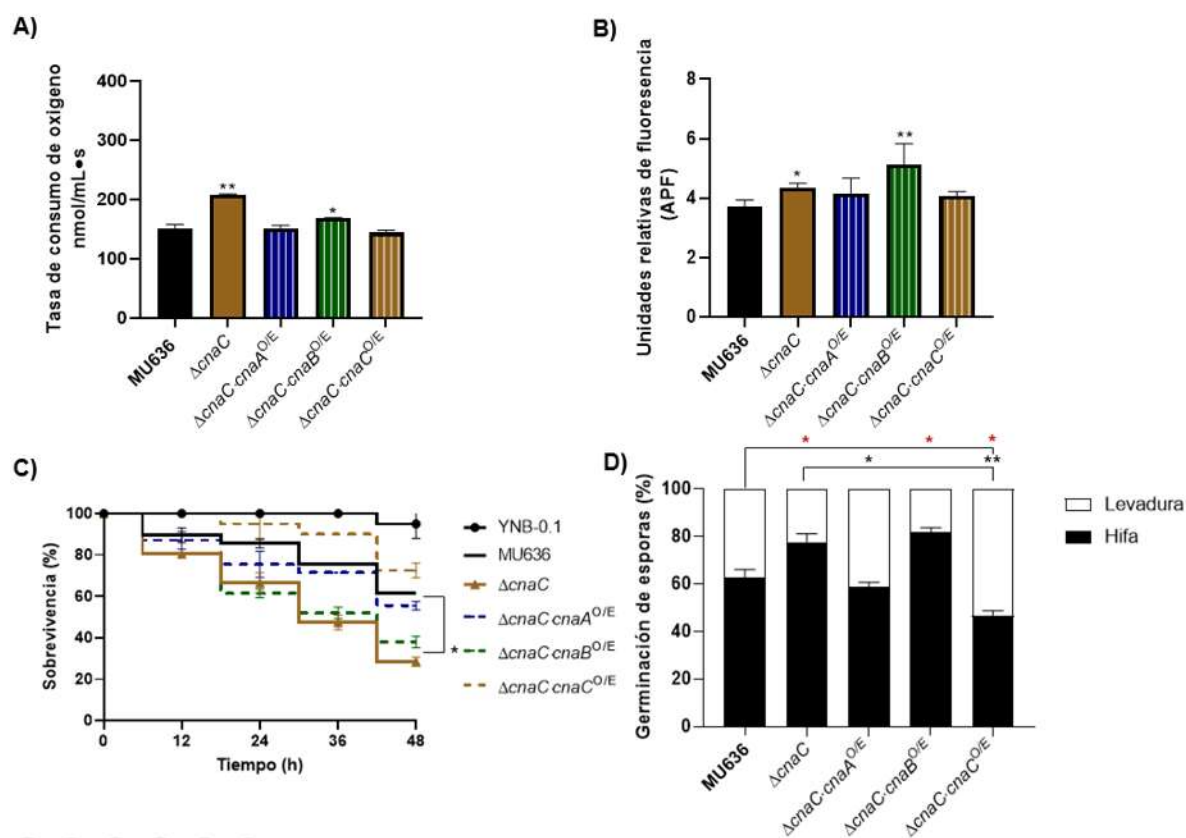
La germinación en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaC::cnaB^{OE}$ presentó niveles de consumo de oxígeno aumentados comparado con la cepa WT y disminuidos respecto a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29A**). Comparado con las cepas WT y $\Delta cnaC$, la producción de radical $OH^\cdot$ de la cepa $\Delta cnaC::cnaB^{OE}$ fueron mayores (**fig. 29B**). Mientras que los SS de la cepa $\Delta cnaC::cnaB^{OE}$ produjeron mayores niveles de toxicidad respecto a los producidos por la cepa WT, pero no hubo diferencias a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29C**).

La cepa $\Delta cnaC::cnaB^{OE}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2%, produjo 80% de hifas y 20% de levaduras comparado con la cepa WT, que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras y con la cepa $\Delta cnaC$ que produjo 75% hifas y 25% levaduras (**fig. 29D**). Cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaC::cnaB^{OE}$ (**fig. 29H**) generó hifas más largas y ramificadas comparadas con la producidas por la cepa WT (**fig. 29E**) y fueron parecidas a las producidas por la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29F**).

La germinación en YNB-0.1% de la cepa $\Delta cnaC::cnaC^{OE}$ no presentó diferencias significativas de los niveles de consumo de oxígeno, en la producción del radical $OH^\cdot$, así como los niveles de toxicidad de los SS, en relación a los observados en la cepa WT, pero presentó niveles disminuidos, en todos estos parámetros, respecto a la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29A-C**).

La cepa $\Delta cnaC::cnaC^{O/E}$ en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2%, reveló la generación de 45% de hifas y 55% de levaduras comparado con la cepa WT que produjo aproximadamente 60% hifas y 40% levaduras y con la cepa $\Delta cnaC$ que produjo 75% hifas y 25% levaduras (**fig. 29D**). Cabe mencionar que la cepa $\Delta cnaC::cnaC^{O/E}$ (**fig. 29I**) no generó diferencias en la morfología comparado con la cepa WT (**fig. 29E**), pero si disminuyó la longitud comparada con las producidas por la cepa $\Delta cnaC$ (**fig. 29F**).

Todos estos cambios fenotípicos producidos por las distintas sobreexpresiones de los genes que codifican a las subunidades de las CN en las cepas $\Delta cnaA$, $\Delta cnaB$ y $\Delta cnaC$ se pueden ver resumidas en la **tabla 10**.



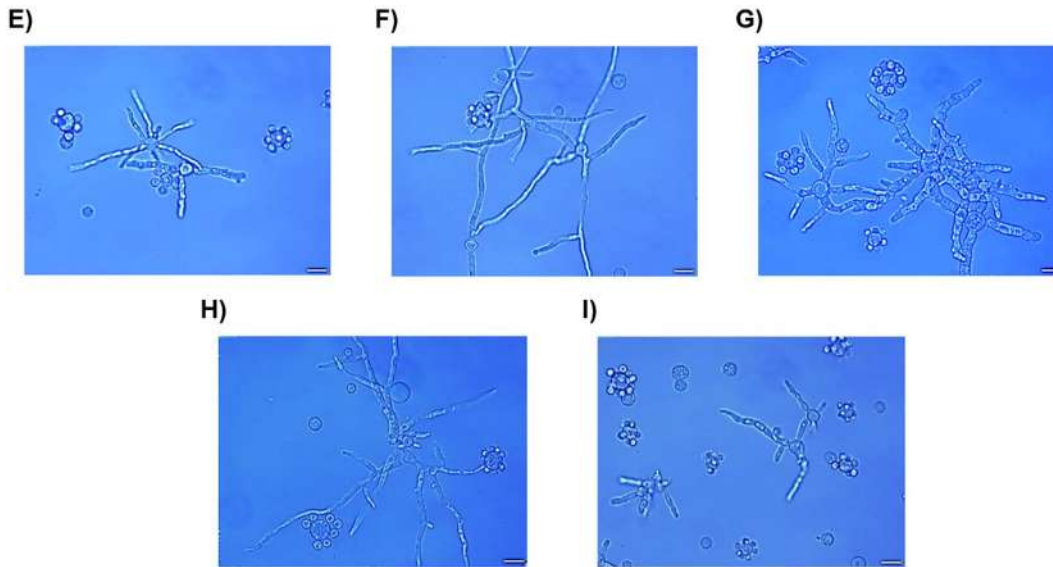


Figura 29. Participación en el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de las cepas sobreexpresantes de los genes que codifican la subunidad catalítica de la CN en el fondo genético de la cepa $\Delta cnaC$ de *M. lusitanicus*. Se utilizaron las diferentes cepas sobreexpresando los genes que codifican a las subunidades de la CN en la cepa $\Delta cnaC$, así como la cepa $\Delta cnaA$ complementada con *cnaC*. Dichas esporas fueron usadas para evaluar: **A)** consumo de oxígeno posterior a la germinación en aerobiosis por 4 h en el medio YNB-0.1%. **B)** La producción de radical $OH^\cdot$ posterior a la germinación en aerobiosis por 4 h en YNB-0.1%. **C)** Los SS fueron obtenidos posterior al crecimiento aeróbico en medio YNB-0.1% por 48 h de crecimiento, los cuales se pusieron en contacto con *C. elegans* y se evaluó la sobrevivencia de los nematodos cada 12 h. **D)** Se determinó la germinación en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) en medio YPG-2% líquido después de 6 h de crecimiento. Imágenes representativas de las esporas germinando en el panel **E)** MU636; **F)** $\Delta cnaC$; **G)** $\Delta cnaC \cdot cnaA^{O/E}$; **H)** $\Delta cnaC \cdot cnaB^{O/E}$; **I)** $\Delta cnaC \cdot cnaC^{O/E}$. $n=3$, se realizaron tres experimentos independientes y se muestra el promedio; las barras corresponden al error estándar (SE). Barra de escala = 20 μm . Se realizó la prueba de comparación múltiple Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Tabla 10. Fenotipos generados en las cepas mutantes en los genes de la CN sobreexpresando los genes que codifican a las subunidades de las CN

Cepas	Tasa de consumo de oxígeno nmol/mL·s	Niveles de OH ⁻	Toxi-cidad (SS)	Germinación en condiciones bajas de oxígeno (respecto a la producción de hifas)	Morfología
$\Delta cnaA::cnaA^{O/E}$	= <	= <	= <	= =	Hifas similares a las de la cepa WT y menos ramificadas que la cepa $\Delta cnaA$
$\Delta cnaA::cnaB^{O/E}$	> =	= <	> =	> >	Hifas más largas y ramificadas comparado con las cepas WT y $\Delta cnaA$
$\Delta cnaA::cnaC^{O/E}$	= <	< <	< <	< <	Hifas más cortas comparado con las cepas WT y $\Delta cnaA$
$\Delta cnaB::cnaA^{O/E}$	> >	> >	> >	> >	Hifas más largas y ramificadas comparado con las cepas WT y $\Delta cnaB$
$\Delta cnaB::cnaB^{O/E}$	> >	= >	> >	> >	Hifas más largas y ramificadas comparado con las cepas WT y $\Delta cnaB$
$\Delta cnaB::cnaC^{O/E}$	= >	= >	= >	< <	Hifas más cortas comparado con las cepas WT y $\Delta cnaB$
$\Delta cnaC::cnaA^{O/E}$	= <	= <	= <	= <	Hifas más gruesas que las producidas por las cepas WT y $\Delta cnaC$
$\Delta cnaC::cnaB^{O/E}$	> <	> >	> =	> =	Hifas más largas y ramificadas comparado con la cepa WT y parecidas a las de la cepa $\Delta cnaC$
$\Delta cnaC::cnaC^{O/E}$	= <	= <	< <	< <	Hifas similares a las de la cepa WT y disminuyó su longitud comparada con $\Delta cnaC$

> Mayor que la cepa WT
 < Menor que la cepa WT
 = Similar a la cepa WT

> Mayor que la cepa mutante sencilla
 < Menor que la cepa mutante sencilla
 = Similar a la cepa mutante sencilla

8.17 Motivos de fosforilación para PKA en las subunidades de la CN, así como para factores de transcripción TEC y HAP en los promotores de los genes de las subunidades de la CN

En algunos hongos se ha descrito que el factor de transcripción Tec1 es necesario para la inducción de la virulencia y el desarrollo de las hifas, tal es el caso de *S. cerevisiae* que requiere al factor Tec1 para el desarrollo de las hifas (**Chou y col., 2006**).

Además, en nuestro grupo de trabajo se han descrito a los homólogos de Tec (Tec1 y Tec2) de *M. lusitanicus*, los cuales participan regulando positivamente el crecimiento micelial, la virulencia, la acumulación de rizoferrina y el metabolismo oxidativo mitocondria (**Alejandro-Castañeda, 2023**). Por otra parte, la biogénesis mitocondrial está bajo la regulación del complejo Hap (familia de complejos de transcripción heterotriméricos que están altamente conservados en células eucariotas), el cual se unen al ADN reconociendo la caja consenso Hap el cual en *S. cerevisiae* se ha descrito que posee la secuencia 5'-CCAAT-3' (**Mao y Chen 2019**).

Con la finalidad de identificar si podrían existir sitios conservados de reconocimiento por dichos factores de transcripción en los promotores de los genes que codifican a la CN se prosiguió a utilizar el programa YEASTRACT.

Los análisis mostraron que únicamente *cnaB* posee un motivo consenso canónico (CATTCT) para el factor de transcripción TEC1, mientras que la subunidad *cnbR* posee un motivo consenso canónico (GCTGG) para el factor de transcripción HAP1p. Lo que hace sugiere que el factor de transcripción TEC1p podría estar controlando la transcripción del gen *cnaB*. Mientras que el factor de transcripción HAP1p podría estar regulando la transcripción del gen *cnbR*. No fueron encontrados sitios de fosforilación por PKA en las distintas subunidades de la CN.

A) *cnaB* Promotor (-204 pb)

CTTTACATTCTCAGTCCCAAGTAGCACCAAAGCAAACATTATTGCATAGTTTAAATTTGGGTTGCCTTT
CTTTCCCTCCCTACTTTTTTCCCCCTTTTCTTCTTTTATATCTTTCATATTGCCATGACAACATC
TTCTAAATCACCAGATGCACACTCAAGTAATAAATCCATACCCAAGATTGATTTTAGCCTCTACACCACA
GATGATGGCACAGTTG

B) *cnbR* Promotor (-199 pb)

TCACCTTGTGCTCAACATGATGATGAAGAAACGAGAACTCACGCGGCTATAAAATTTATTTTTCGCTCT
GCACCTTTTTCTTTTGCTTTTTTCTTCTTTTATACTCGCACTTGGCTTCAACGACATCTTATCAATATGG
GTCAATCTGGTTCGCAACTCGAGGATGTCAACTCGTCCAACGTATGTGATTTTTCGGTCTTCAATGGT
AACAAATCTAACGACAGAATTCTAGTATGCTCTGCAGAAGAAATTCAGCGTCTTTACAAGCGCTTCATG
AAGCTGGATAAGGACAATTCTGGCTCTATCGACAAGGATGAGTTTCTCTCTATCCG

Figura 30. Análisis *in silico* de los factores de transcripción en las subunidades de la CN. Secuencia parcial que muestra los sitios consenso canónicos para factores de transcripción TEC1p y HAP1 de *S. cerevisiae*. A) región promotora de *cnaB* motivo consenso canónico (CATTCT) para el factor de transcripción TEC1p; B) región promotora de *cnbR* motivo consenso canónico (TTGGCT) para el factor de transcripción HAP1p (Teixeira y col., 2022) (-) región río arriba del ATG (color verde subrayado). Los nucleótidos más conservados se muestran en color morado. El sitio de unión ribosómico en color verde.

IX. Discusión

Desde la antigüedad (1908) las transiciones morfogénicas (levadura-hifa) han sido de gran interés (San-Blas, 1985). En algunos hongos patógenos la morfología está relacionada con su virulencia, los cuales son capaces de cambiar su morfología en respuesta a su entorno (Wang y Lin, 2012).

Diversas especies de *Mucor* han sido descritas como dimórficas (Orlowski, 1991). En *M. lusitanicus* las morfologías de levadura o hifa definen el fenotipo virulento y se ha descrito que la vía de la CN tiene una función importante en el destino dimórfico de este hongo (Lee y col., 2013).

En *M. lusitanicus*, la CN está conformada por dos heterodímeros; uno de ellos constituido por dos proteínas idénticas que constituyen la subunidad reguladora de la CN (CnbR) y el otro constituido por un homodímero constituido por alguno de los tres homólogos de las subunidades catalíticas (CnaA, CnaB y CnaC) (Lee y col., 2013). Existe un vínculo en la función de la vía de la CN o de alguno de sus interactores, con el crecimiento de las hifas de algunos hongos, tal es el caso de los

hongos ascomicetos como *S. pombe* (Sugiura y col., 1998), *A. fumigatus* (Li y col., 2020), *Alternaria alternata* (Tsai y Chung, 2014); al igual que el fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* (Liu y col., 2022).

Hay reportes que indican que el metabolismo oxidativo mitocondrial es importante en el crecimiento y virulencia de los hongos (Terenzi y col., 1969; Orlowski, 1991). En los Mucorales se ha vinculado el metabolismo oxidativo mitocondria con el crecimiento filamentoso, algunos de los inhibidores del metabolismo oxidativo mitocondrial usados han sido el cianuro de potasio (KCN, el cual es un inhibidor de la cadena de transporte de electrones), la antimicina A (la cual bloquea el transporte de electrones), la oligomicina y el alcohol fenético (los cuales inhiben la fosforilación oxidativa), generan la inducción del crecimiento levaduriforme en *Mucor spp.*, incluso en condiciones aeróbicas (Friedenthal y col., 1974). En *Mucor rouxii*, la actividad mitocondrial es necesaria para la morfogénesis, debido a que al utilizar el alcohol fenético (estimula el metabolismo fermentativo e inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial) se indujo la formación de levaduras, sugiriendo la participación mitocondrial en el proceso de generación de hifas (Terenzi y col., 1969; Orlowski, 1991). Sin embargo, la relevancia del metabolismo oxidativo mitocondrial y la virulencia nunca se había analizado en los Mucorales. Al parecer en *M. lusitanicus*, así como en Mucorales de interés clínico (*R. arrhizus*), este metabolismo tiene una función en la inducción de la virulencia (Alejandre-Castañeda y col., 2022; Alejandre-Castañeda y col., 2023; Patiño-Medina y col., 2023); no obstante, los detalles del mecanismo molecular por el cual es regulado aún se desconocen.

En otros hongos, como en *C. neoformans*, se ha demostrado que la función mitocondrial interactúa en varias vías metabólicas; las cuales influyen en el crecimiento y en la virulencia. Por ejemplo, los productos de los genes involucrados en la β -oxidación, *MFE2*, *HAD1* y *HAD2*, que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo mitocondrial, tuvieron mayor expresión durante el proceso de infección en ratón (Kretschmer y col., 2012).

Aún no se ha descrito la relación biológica de la CN en el crecimiento micelial de los Mucorales, y aún menos su función bajo condiciones que favorecen la actividad

mitocondrial. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que en relación a la cepa WT, en las mutantes $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ de *M. lusitanicus* se aumenta el crecimiento en presencia de una fuente de carbono no fermentable, sugiriendo que la subunidad CnaA es un regulador negativo del metabolismo oxidativo mitocondrial. Nuestros datos se relacionan con lo descrito por **Lee y col., 2013**, quien reportó que la cepa mutante $\Delta cnaA$ generó esporas más grandes con menor tiempo de germinación dentro de macrófagos que las esporas provenientes de la cepa WT; sin embargo, no se evaluó la relación con el metabolismo oxidativo mitocondrial en este estudio. Por otra parte; la cepa $\Delta cnaB$ mostró un menor crecimiento (generación de biomasa) en una fuente de carbono no fermentable en relación a WT, sugiriendo que CnaB podría ser un regulador positivo del metabolismo oxidativo mitocondrial. Además, la sobreexpresión de *cnaB* en $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ complementa los diversos fenotipos, sugiriendo que la ausencia de *cnaA* y *cnaC* es complementada por *cnaB*. Por lo que la vía de la CN regula el crecimiento micelial y virulencia de *M. lusitanicus* a través de la regulación del metabolismo mitocondrial.

En *M. oryzae* la vía de la CN funciona en la regulación positiva de la virulencia. Por ejemplo, la subunidad reguladora de la CN (MoRCN1) es necesaria para el adecuado crecimiento de las hifas, la esporulación y en la inducción de la virulencia, ya que la cepa $\Delta Morcn1$ condujo a una menor formación de apresorio, menor penetración y crecimiento invasivo, además la cepa $\Delta Morcn1$ mostró sensibilidad a diferentes agentes que producen estrés celular como lo son el calcoflour (produce ruptura de la pared celular), NaCl (ocasiona estrés osmótico) y H_2O_2 (causante de estrés oxidativo). La cepa $\Delta Morcn1$, también mostró un inusual aumento en la producción de ROS durante la infección del huésped, dichas ROS pudieran estar induciendo los defectos en la cepa mutante (**Liu y col., 2022**).

En *Aspergillus nidulans* el aumento en la concentración de calcio intracelular activa a CnaA (subunidad A de la CN) (**Colabardini y col., 2014**). El calcio controla diversas funciones celulares como procesos de la fertilización, la diferenciación y la proliferación celular; además, de la activación de factores de transcripción, entre otras. Por lo que la concentración de calcio intracelular es importante para este hongo (**Berridge y col., 2000**).

La regulación de la vía de la CN en el crecimiento micelial de *M. lusitanicus* en fuentes de carbono no fermentable, sugiere el involucramiento del metabolismo oxidativo mitocondrial. Por ejemplo las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, además de aumentar la respiración y producción del radical OH^- , en comparación con la cepa WT, también aumentaron sus niveles de virulencia. Ya que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ aumentaron la toxicidad de los SS respecto a la cepa WT, mientras que los de las cepas $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$ presentaron un fenotipo contrario. Estos datos sugieren que las subunidades CnaA y CnaC regulan negativamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y la secreción de al menos una molécula toxica en los SS; caso contrario a las subunidades CnaB y CnbR. De manera similar en la ameba *Dictyostelium discoideum* se vincula a la vía de la CN con la regulación del metabolismo oxidativo y virulencia. Ya que la CN tiene una función a nivel mitocondrial, debido a que las cepas mutantes de la CN mostraron alteraciones en la morfología de las mitocondrias, así como en la expresión de genes regulados por calcio, (*cupC*, *patA*) y aquellos codificados por genes mitocondriaes implicados en la cadena respiratoria (*DidioMP27*, *rnlA*, *atp5b*, *atp6*, *cytB*, *nad4*, *ndufs8*). Además, presentaron un aumento de la expresión de los genes involucrados con el estrés oxidativo (genes que codifican la superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc *sodB* y *sodC*) (**Kobel-Höller y col., 2018**).

Es de mi conocimiento que a la fecha de realización de este trabajo, no se ha descrito una relación biológica de la vía de la CN con la regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial y su posible influencia en la regulación de la virulencia en especies de Mucorales. Este trabajo aportó información de estos vínculos en *M. lusitanicus*. El uso de KCN 0.5 mM afectó negativamente tanto la respiración y virulencia en las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, lo que reafirma que las subunidades CnaA y CnaC regulan negativamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia. En conclusión, la generación de la morfología de hifas depende de una adecuada función mitocondrial en diversos hongos, incluyendo nuestro modelo de estudio *M. lusitanicus*.

Por otra parte, en la respiración mitocondrial se produce una parte considerable de las ROS (**Brookes y col., 2004**). En *S. cerevisiae* se ha descrito que el calcio

(activador de la CN) inhibe el aumento de los niveles de las ROS intracelulares **(Li y col, 2021)**, sugiriendo que la activación de la vía de la CN inhibe la producción de las ROS. Las ROS producidas por hongos patógenos incluyen principalmente el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) **(Heller y Tudzynski, 2011)**. Nuestros datos sugieren la asociación entre las subunidades CnaA y CnaC de la CN con la regulación negativa de la actividad mitocondrial debido a que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ produjeron un aumento de los niveles del radical $OH^{\cdot}$ en *M. lusitanicus*; sin embargo, se desconoce si otras ROS podrían estar involucradas en este proceso.

Diversos organismos asocian a la vía de la CN con la producción de las ROS. En *Arabidopsis thaliana* la sobreexpresión de calcio-camodulina (Ca^{2+} -CaM1) (Componentes rio arriba de CN), produjo una mayor resistencia a la infección por *Pseudomonas syringae* y *Hyaloperonospora parasitica*, ya que dicha sobreexpresión generó una mayor producción de las ROS que la cepa WT, sugiriendo que la función del complejo Ca^{2+} -CaM1 (Posiblemente a través de la CN) interviene en la generación de ROS, dicha producción de las ROS es esencial para la muerte celular y las respuestas de defensa en las plantas **(Choi y col., 2009)**. Estos datos son similares a los que se observaron en las cepas mutantes $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, ya que las mismas producen mas cantidad de ROS (solo se evaluó el radical $OH^{\cdot}$) respecto a la cepa WT. Por otra parte, cuando se adicionó N-acetil cisteína 10 mM se redujo la toxicidad del SS en las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, lo que sugiere que las subunidades CnaA y CnaC de la CN contribuyen a la regulación negativa de los niveles de las ROS (radical $OH^{\cdot}$), las cuales por efecto de N-acetil cisteína correlacionan con la disminución de la virulencia a través de mecanismos aún desconocidos en *M. lusitanicus*. Además, resultados de este trabajo indican que las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ son más resistentes al estrés oxidativo mitocondrial respecto a las cepas $\Delta cnaB$ y $\Delta cnaR$. Esto sugiere que las subunidades CnaA y CnaC conducen a una mayor sensibilidad al estrés oxidativo mitocondrial, contrario a las subunidades CnaB y CnaR, probablemente estas últimas subunidades podrían tener más eficientes las actividades de sus sistemas antioxidantes; sin embargo, aún falta por dilucidar a que nivel molecular esta dicha regulación. En este sentido,

se ha descrito a la vía de la CN por ser más sensible al estrés mitocondrial, debido a que al tratar células de macrófagos (Raw 264.7) humanas con inductores de la producción de las ROS mitocondriales como Mito-Paraquat (MitoPQ) y Mito-Metformina (MitoMet) aumentó el nivel de la CN comparado con las células no tratadas. Por lo que la vía de la CN se activa en presencia de ROS mitocondriales incluso a bajas concentraciones **(Chowdhury y col., 2020)**. Este reporte coincide con los resultados mostrados por las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$ ya que son más resistentes al estrés oxidativo generado por paraquat (1.5 mM). Mientras que dicho reporte es contrario a los datos obtenidos por las cepas $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$, ya que son más sensibles al estrés oxidativo por paraquat (1.5 mM). Por otra parte, la biodisponibilidad de oxígeno en los tejidos durante la virulencia es relevante, por lo que las concentraciones de oxígeno en estudios *in vitro* son un área de investigación importante **(Gan y Ooi, 2020)**. En la región peritoneal de los humanos los niveles de oxígeno alcanzan el 5.3% **(Renvall y Niinikoski, 1980)**, incluso se ha reportado concentraciones de oxígeno menor al 1% en heridas y tumores, mientras que en tejidos sanos del cuerpo humano los niveles de oxígeno alcanzan el 9% **(Grahl y col., 2012)**. En algunos hongos dimórficos como en *C. albicans* han reportado que las condiciones de oxígeno regulan la morfogénesis hifa o levadura y en condiciones bajas de oxígeno genera hifas **(Setiadi y col., 2006)**. Además, en *C. albicans* la formación de hifas es un factor involucrado en la invasión del huésped **(Gow y col., 1994)**. De igual manera en *M. lusitanicus* se ha relacionado al aumento de la generación de hifas con una mayor virulencia **(Díaz-Pérez y col., 2020)**. Reportes demuestran que el aumento de la germinación inhibe la fagocitosis por los macrófagos **(Lee y col., 2013)**. En este trabajo se observó que las cepas $\Delta cnaB$ y $\Delta cnbR$ aumentaron la producción de levaduras comparado con la cepa WT en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$), coincidiendo con la anulación de la toxicidad frente a los nematodos de los SS obtenidos de dichas mutantes. Por otra parte, la cepa $\Delta cnaA$ produjo en condiciones bajas de oxígeno ($4.9 \pm 0.45\% O_2$) 50% de hifas, porcentaje parecido al producido por la cepa WT, pero las hifas de dicha mutante fueron de mayor longitud y más ramificadas respecto a la cepa WT. Relacionando así el aumento de la toxicidad de los SS obtenidos a partir de la cepa

$\Delta cnaA$. Por lo que se sugiere que la subunidad CnaA está involucrada en la regulación negativa de la virulencia. La cepa $\Delta cnaC$ produjo una mayor cantidad de hifas en condiciones bajas de oxígeno, aunado con el incremento del fenotipo virulento; por otra parte, con la finalidad de reafirmar el vínculo de la CN con la regulación de la virulencia, fue de interés evaluar el efecto de las esporas de las cepas mutantes que codifican a las subunidades catalíticas de la CN utilizando el modelo experimental de *G. mellonella*. Nuestros resultados muestran el mismo fenómeno de virulencia donde la cepa $\Delta cnaA$ presentó mayor toxicidad y la cepa $\Delta cnaB$ que produjo mortalidad en las larvas similar a la de la cepa WT, coincide además con lo reportado por **Lee y col., 2013**. Es importante mencionar que hasta la fecha de realización de este trabajo se desconocía el papel de CnaC en la virulencia. Se sugiere que la subunidad CnaB puede tener un mecanismo de virulencia distinto a las otras subunidades de la CN el cual aún se desconoce.

En otros hongos la vía de señalización de la CN está relacionada con la vía del AMPc-PKA, como se ha descrito en el hongo levaduriforme *S. cerevisiae* (**Edgan y col., 2009**), en el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* (**Chen y col 2021**) y en *Aspergillus niger* (**Bencina y Read, 2005**).

En *M. lusitanicus* la cepa $\Delta gpb1$ condujo a un aumento en los niveles intracelulares de AMPc y de la activación de PKA, promoviendo el desarrollo de levaduras y disminución del crecimiento de las hifas (**Valle-Maldonado y col., 2020**). En *M. lusitanicus* al aumentar los niveles de glucosa o la adición de dibutilil-cAMP (db-cAMP) exógeno aumenta la actividad de PKA (**Valle-Maldonado y col., 2020**).

Nuestros resultados demuestran que cuando se usó el medio que estimula el metabolismo fermentativo (YPG-6%) y que además estimula la vía del AMPc-PKA (**Valle-Maldonado y col., 2020**), reprimió la respiración y redujo la toxicidad de los SS de las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$, por lo que se sugiere que cuando la vía del AMPc-PKA aumenta (estimulada por el medio YPG-6%) disminuye la actividad de la vía de la CN (ya que reprimió la respiración y disminuyó la toxicidad de los SS de las cepas $\Delta cnaA$ y $\Delta cnaC$).

Existen reportes de que la CN y la PKA desempeñan funciones antagónicas, debido a que a partir de la cepa $\Delta cnbR$ la actividad de la PKA fue mayor que en la cepa

WT (**Lee y col., 2013**), aunque se desconoce los detalles a nivel molecular de los puntos de conexión entre ambas vías.

Por otra parte, la dinámica mitocondrial desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial, donde Dnm1 y Fzo1 regulan la dinámica mitocondrial (**Ugarte-Urbe y col., 2014**). En *C. neoformans* la dinámica mitocondrial influye en la virulencia del hongo, debido a que la eliminación de los genes involucrados en la fusión mitocondrial (DRP) mostró menor capacidad de eliminar moléculas dañadas y reguló negativamente la virulencia **Chang y Doering, 2018**). Para evaluar si la vía de la CN controla a Dnm1 y Fzo1, se midió la expresión de los genes de la CN en condiciones de cultivo, de MU636-*dnm1*^{O/E} y MU636-*fzo1*^{O/E} que probablemente estimulan la fisión y fusión mitocondrial (respectivamente). Los datos indican que la sobreexpresión de Dnm1 regula negativamente a nivel transcripcional a *cnaA* y *cnbR*, ya que la sobreexpresión de *dnm1* en la cepa WT produjo una menor cantidad de ARNm de *cnaA* y *cnbR*. Sugiriendo a la vía de la CN como un componente río arriba de Dnm1.

Aún no se ha descrito la conexión a nivel transcripcional de *dnm1* y la vía de la CN; sin embargo, en células de mamífero, la CN regula mediante la desfosforilación en el residuo 637 del motivo de Drp1(homólogo de Dnm1), activando de esa manera el proceso de fisión mitocondrial. Se ha asociado a la fosforilación por CN en la regulación de la localización intracelular donde la CN interviene controlando la translocación de NFaT al núcleo y del miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 Bad a las mitocondrias (**Cereghetti y col., 2008**). La distribución intracelular de la CN está determinada por la unión a sustratos de señalización entre los que se encuentran los AKAP (miembros de la familia de proteínas de anclaje de quinasa A) (**Sheftic y col., 2016**). En este sentido, en las neuronas, el complejo de señalización PKA/AKAP1 (coordina un conjunto de señales localizadas en las mitocondrias) inhibe el proceso de fisión mitocondrial, mediante la fosforilación de Dnm1 induciendo a el desarrollo de dendritas y además de tener funciones en el desarrollo y supervivencia neuronal (**Merrill y Strack, 2014**).

La sobreexpresión de *dnm1* en las cepas mutantes de los genes que codifican a las subunidades catalítica CnaA y CnaC de la CN produjo la disminución de la tasa de

consumo de oxígeno, así como la disminución de la virulencia y la producción de radical $\text{OH}^\cdot$, respecto a las mutantes sencillas. Lo que sugiere que Dnm1 regula negativamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia a través de la vía de la CN.

Nuestros resultados indican que en *M. lusitanicus*, Fzo1 participa en la regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican a las subunidades de la CN, ya que la sobreexpresión de *fzo1* en la cepa WT produjo una mayor cantidad de ARNm en los genes que codifican a las subunidades de la CN, lo que correlacionó con el aumento de la tasa de consumo de oxígeno, la producción de radical $\text{OH}^\cdot$ y el aumento de la virulencia. Estos resultados mostraron un fenotipo contrario al de la sobreexpresión de *dnm1*. En *S. cerevisiae* la ausencia de Fzo1 generó mitocondrias fragmentadas y produjo menor crecimiento en una fuente de carbono no fermentable (glicerol al 3%); además, de la disminución de la tasa de respiración, indicando que la función mitocondrial estaría afectada en ausencia de la proteína Fzo1 **(Dong y col, 2021)**.

Nuestros datos mostraron que la sobreexpresión de *fzo1* condujo a un efecto contrario a la mutación de *fzo1* en *S. cerevisiae* debido a que la presencia de Fzo1 en *M. lusitanicus* está estimulando el aumento de la actividad mitocondrial, sin embargo, ambos enfoques de pérdida y ganancia de función establecen la función en ambos hongos de Fzo1.

Resultados similares fueron reportados con *C. neoformans*, ya que la cepa mutante *fzo1* (Fzo1 media la fusión mitocondrial) produjo un fenotipo que resultó más susceptible al estrés oxidativo, probablemente debido a la incapacidad de producir melanina (pigmento oscuro cuya síntesis no depende del metabolismo mitocondrial pero aumenta la resistencia a ROS y otros factores ambientales), sugiriendo que el proceso de fusión mitocondrial está involucrado generando una mayor eliminación de las ROS, lo cual conduce a una disminución del daño oxidativo y disminuyendo la capacidad de virulencia en un modelo murino **(Chang y Doering, 2018)**.

Aún se desconoce cómo se regula transcripcionalmente Fzo1 a través de la vía de la CN. Nuestro grupo de trabajo identificó cuatro sitios de fosforilación por PKA en la proteína Fzo1 **(Torres-Cortes, tesis de maestría en proceso)**. Sugiriendo que

Fzo1 es un sustrato de la actividad de la PKA, lo cual podría generar cambios en la actividad de Fzo1 y con ello cambios en el metabolismo mitocondrial, además de que CN podría utilizar a Fzo1 fosforilado como sustrato alterando la actividad de dicha proteína. Por lo tanto, es posible que *fzo1* sea un sustrato tanto de la vía de la CN y de la AMPc-PKA en *M. lusitanicus*.

Otros grupos han reportado que el proceso de fusión y fisión determinan la interconectividad de las mitocondrias; la fosforilación de Ser 656 (en células PC12 de feocromocitoma de rata) de la GTPasa Drp1 (Dnm1 es análogo en hongos) de manera *in vitro* está mediada por PKA, esto ocurre por la respuesta a la actividad simpática *in vivo*. Por otra parte, el calcio conduce a la de fosforilación de Ser 656, la mutación Ser 656 por Ala (permanentemente desfosforilada) activa a Drp1 y sensibiliza a las células a ataques apoptóticos mientras que la fosforilación tiene efecto opuesto **(Cribbs y Strack, 2007)**.

En *S. Pombe*, al igual que en *M. lusitanicus*, en donde las condiciones de crecimiento al parecer son críticas para la modulación de las proteínas involucradas en la fisión y/o fusión mitocondria, la glucosa estimula el proceso de fisión mitocondrial por Dnm1, debido a que el crecimiento de la cepa $\Delta dnm1$ en medio EMM con glucosa 111 mM mostraron una estructura interconectada debido al descontrol de fisión mitocondrial. Por otra parte, la falta de glucosa en la cepa $\Delta dnm1$ dio como resultado mitocondrias no fragmentadas; además, las mitocondrias mostraron resistencia a la fragmentación en las células $\Delta cgs1$ (alta actividad de PKA1), sin embargo, mostraron sensibilidad a la fragmentación en células $\Delta cyr1$ (alta actividad de PKA1) **(Zheng y col., 2019)**.

En *A. nidulans* la proteína quinasa C activada (PkcA) y la subunidad A de la CN regulan positivamente la función mitocondrial; ya que la cepa $\Delta cnaA$ consumió menos oxígeno que la cepa WT. Además, la sobreexpresión *pkcA* en la cepa $\Delta cnaA$ restableció los niveles de consumo de oxígeno como la cepa WT **(Colabardini y col., 2014)**. Lo cual habla de la función antagonica de una cinasa (PKC) con la CN en la regulacion del metabolismo oxidativo mitocondrial.

Sin embargo, en relación a *M. lusitanicus* aún se desconoce la regulación antagonica de la vía de la CN y de la vía AMPc-PKA, respecto a Fzo1 y Dnm1.

La función mitocondrial, depende de otros factores además de la dinámica mitocondrial, como son las proteínas que están en asociación con la mitocondria cumpliendo diversas funciones, como aquellas involucradas en el control de calidad (por ejemplo las proteasas AAA eliminan proteínas mal plegadas) y quinasas (regulan la importación de proteínas en respuesta a la señalización celular). Un factor importante que participa en el reconocimiento de las proteínas que son importadas a la mitocondria es el complejo TOM **(Den-Brave y col., 2021)**.

En este sentido, casi todas las proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear, estas proteínas después de su síntesis en los ribosomas citoplasmáticos se importan a las mitocondrias. Las proteínas precursoras se transportan a las mitocondrias, donde uno de los complejos de gran relevancia es el complejo TOM (Translocase of the Outer Membrane, por sus siglas en inglés) **(Tucker y Park, 2019)**. Dicho complejo contiene tres receptores Tom70, Tom20 y Tom22, siendo la proteína Tom20 la que reconoce motivos de localización ubicados en el extremo N-terminal de las proteínas que contienen señales internas similares a MTS (Imts-L), dichos motivos son esenciales para dirigir a las proteínas hasta la matriz mitocondrial **(Backes y col., 2018)**.

Las proteínas de las distintas subunidades de la CN, presentan los motivos putativos de reconocimiento por Tom20, sugiriendo que las distintas subunidades de la CN se pueden dirigir a la mitocondria, además se sugiere que contienen el motivo Imts-L, implicado en la direccionalidad mitocondrial. Estos datos sugieren que en algún momento ocurre la dirección a las mitocondrias de las distintas subunidades, aunque son necesarios otros estudios para dilucidar esta regulación espacio-temporal.

La multiplicidad de las subunidades catalíticas de la CN cuyos valores de identidad y similitud están en un rango del 62 y 87%, respectivamente, harían suponer funciones redundantes entre ellas. La complementación de las cepas mutantes $\Delta cnaA$, $\Delta cnaB$, y $\Delta cnaC$ con los genes silvestres respectivos, como era de esperar, restauraron las diversas alteraciones en el fenotipo. Por otra parte, la sobreexpresión del gen *cnaB* en $\Delta cnaA$, no complementó el fenotipo a niveles de la cepa WT, ya que condujo a un aumento de la respiración, aumento de la toxicidad

de los SS y aumento de la producción de hifas largas en condiciones bajas de oxígeno. Por otra parte, la sobreexpresión del gen *cnaC* en la cepa $\Delta cnaA$ complementó los niveles de la tasa de consumo de oxígeno, así como los niveles de la toxicidad de los SS respecto a los niveles de cepa WT. Sugiriendo que CnaB podría estar regulando de manera positiva el metabolismo oxidativo mitocondrial y la virulencia, mientras que CnaC podría estar estimulando en menor grado la represión del metabolismo oxidativo en $\Delta cnaA$.

Mientras que, los datos analizados mostraron que la sobreexpresión del gen *cnaA* en la cepa $\Delta cnaB$, no complementó los niveles de respiración, producción de radical OH^- y los niveles de toxicidad de los SS, ya que estos fueron mayores respecto a los niveles generados por la cepa WT, sugiriendo que CnaA no complementa la ausencia de CnaB. Mientras que la sobreexpresión de *cnaC* en la cepa $\Delta cnaB$ complemento el fenotipo WT. Los datos sugieren que CnaC podría estaría actuando como un mecanismo de compensación en ausencia de CnaB.

El análisis de la transcripción sugiere, que CnaB podría estar generando el fenotipo virulento en la ausencia de CnaC y CnaA, ya que se observó un aumentó en el nivel de transcrito *cnaB* en dichas mutantes. Sin embargo, aún quedan experimentos por realizar para determinar cómo estaría funcionado este proceso.

Cuando fue sobreexpesado el gen *cnaA* en la cepa $\Delta cnaC$, se complementó el fenotipo WT, los datos sugieren que CnaA y CnaC actúan en la misma vía ya que ambos son complementarios. Por otra parte, cuando fue sobreexpesado el gen *cnaB* en la cepa $\Delta cnaC$, no se complementó el fenotipo WT, indicando nuevamente la esencialidad de CnaB en el metabolismo oxidativo y virulencia de *M. lusitanicus*. Posiblemente existen algunos factores transcripcionales que regulan la expresión génica de los diversos genes que codifican a las subunidades de la CN. En algunos hongos se ha descrito que el factor de transcripción Tec1 es necesario para la filamentación en *S. cerevisiae*, mientras que el complejo Tec1/Ste12/Dig1 es necesario para la filamentación del hongo, Tec1 (se une al extremo N de Ste12), Dig1 (se une indirectamente a través de Ste12) y promueve su transcripción (**Chou y col., 2006**). Recientemente se reportó que en *M. lusitanicus* la vía AMPc-PKA y los factores de transcripción Tec1 y Tec2 regulan tanto a nivel transcripcional y

postraducciona la activación de la vía en presencia de altas concentraciones de glucosa (2 al 6%) de forma negativa. Por otra parte, la inactivación la PKA, debido a la represión de la vía por el aumento del ARNm de *gpb1* y *pkaR1*, correlacionó con los niveles de ARNm de TEC1/2. Además, simultáneamente puede llevarse a cabo la regulación a nivel postraducciona en donde la PKA inactiva no conduce a la fosforilación de Tec1 y Tec2 y posiblemente el estado no fosforilado conduzca a una activación de la vía de la CN, ya que se ha reportado que la mutación puntual (Tec1³²⁹KRKS³³²) conduce a un estado permanentemente defosforilado **(Alejandre-Castañeda y col., 2023)**.

Otro factor de transcripción, anteriormente descrito, que tiene relevancia en la función mitocondria es Hap **(Yoboue y col., 2014)**. En *S. cerevisiae* el aumento de los niveles de RNAm del complejo HAP(*HAP2/3/4/5*) está influenciado por una disminución de los niveles de las ROS **(Cheytzoff y col., 2010)**. El proceso de biogénesis mitocondria está bajo la regulación del complejo Hap (familia de complejos de transcripción heterotriméricos que están altamente conservados en células eucariotas). Hap es un activador transcripcional y regulador global de la expresión de genes que codifican a CIT2 (codifica a la enzima citrato sintetasa peroximal), CIT1(codifica a la enzima citrato sintetasa mitocondria), ACO1 (codifica a la enzima aconitasa), MDH2 (codifica a la enzima malato deshidrogenasa), MLS1 (codifica a la enzima malato sintasa), entre otros. La secuencia consenso para el ensamblaje del complejo como para la unión al ADN es 5´-CCAAT-3´ **(Buschlen y col., 2003)**. En *C. albicans*, en respuesta a altas concentraciones de hierro el complejo Hap (Hap2, Hap31/32 y Hap5) interviene en la regulación positiva de la expresión de genes involucrados en el estrés oxidativo como lo es CAT1 (codifica a la enzima catalasa), SOD4 (codifica a la enzima superóxido dismutasa), GRX5 (codifica a la enzima glutaredoxina 5) y TRX1 (codifica a la enzima tiorredoxina 1) **(Chakravarti y col., 2017)**.

El análisis *in silico* de los promotores de los genes que codifican a las subunidades de la CN para el posible reconocimiento por los factores de transcripción TEC1 y HAP1p, reveló que únicamente CnaB posee un motivo consenso canónico (CATTCT) para el factor de transcripción TEC1, mientras que la subunidad CnbR

posee un motivo consenso canónico (GCTGG) para el factor de transcripción HAP1p. Lo que sugiere que existen sitios de reconocimiento en CnaB y CnbR de estos factores de transcripción que a su vez podrían estar regulando funciones mitocondriales influyendo en ciertos procesos como la virulencia.

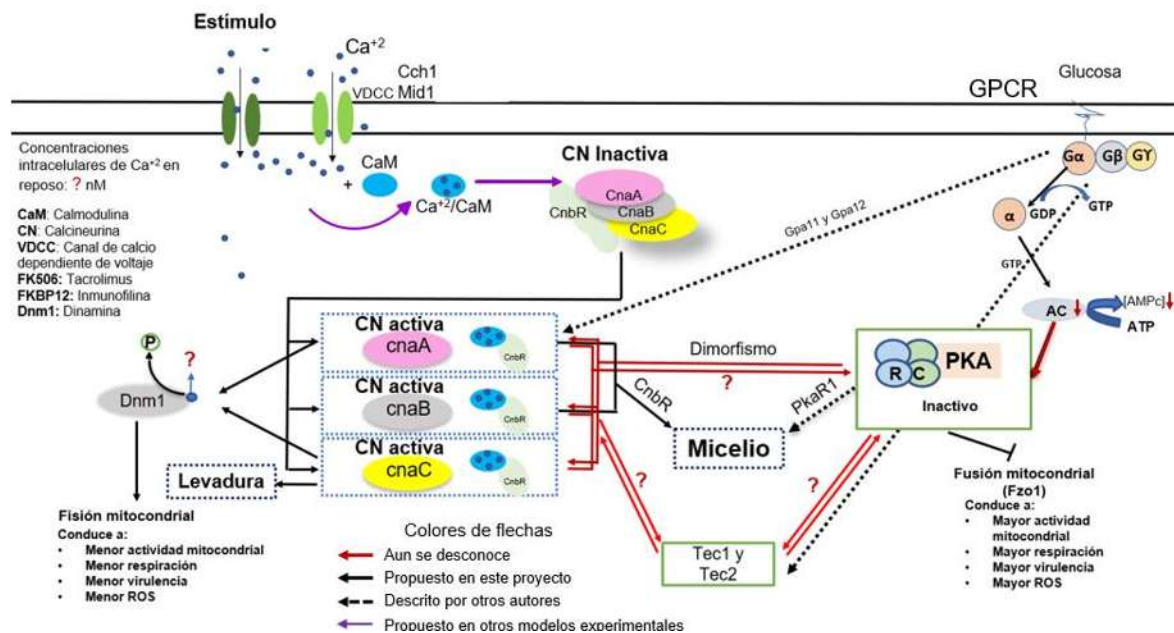


Figura 31. Modelo propuesto para las funciones de las subunidades de la CN en *M. lusitanicus*. Por un estímulo externo (bajas concentraciones de glucosa $\leq 0.1\%$) el calcio extracelular va a ingresar a través del canal de calcio dependiente de voltaje. Este canal de calcio está conformado por las proteínas Cch1 y Mid1. El complejo Ca^{2+} -CaM activa a las subunidades catalíticas de la CN (CnaA y CnaC) ejerciendo su función fosfatasa activando a la proteína citosólica Dnm1 que interactuará con motivos específicos de la membrana mitocondrial conduciendo a la fisión mitocondrial lo que conlleva a la disminución de la actividad mitocondrial (menor respiración, menor producción de ROS) y menor virulencia.

También ya han sugerido una posible interconexión entre las vías AMPc-PKA y la vía de la CN, las cuales son reguladas por proteínas G heterotriméricas Gpa11 y Gpa12, ya que su anulación produjo una disminución del RNAm de cnaA, además del aumentó en el tamaño de la espora y dicho fenotipo es similar a la mutación en la subunidad catalítica CnaA de la CN. Se sugiere una interconexión de la vía AMPc-PKA y la vía de la CN regulada por proteínas G heterotriméricas Gpa11 y Gpa12.

Además, se sugiere que Fzo1 es un sustrato de la actividad de la PKA, lo cual podría generar cambios en la actividad de Fzo1 y con ello cambios en el metabolismo mitocondrial. Además, la CN podría utilizar a Fzo1 fosforilado como sustrato alterando la actividad de dicha proteína, por lo tanto, es posible que Fzo1 sea un sustrato tanto de la vía de la CN y de la AMPc-PKA en *M. lusitanicus*. CnaA regula negativamente la morfología hifal, mientras que CnaB es un regulador positivo de la producción de hifas, además, podría estar regulando a CnaA y CnaC y defosforilando algo aún desconocido. Por otra parte, CnaC es un regulador positivo para el desarrollo de levaduras en anaerobiosis, CnbR es un regulador transcripcional de las subunidades catalíticas de la CN. Un análisis *in silico* reveló que los promotores de los genes que codifican a las subunidades de la CN sean un posible sitio de unión de los factores de transcripción Tec1 y Hap1, lo que sugiere que existen sitios de reconocimiento en CnaB para el factor Tec1 y CnbR para el factor Hap1 y a su vez podrían estar regulando funciones mitocondriales influyendo en ciertos procesos como la virulencia.

X. Conclusión

En *M. lusitanicus* las subunidades catalíticas de la CN (CnaA y CnaC) regulan negativamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia a través de Dnm1, y regulan positivamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia a través de Fzo1. Además, CnaC regula positivamente la generación de levaduras en aerobiosis, CnaA regula positivamente la ramificación, longitud y grosor de las hifas, mientras que CnaB es un regulador positivo de la producción de hifas y regula positivamente el metabolismo oxidativo mitocondrial y posiblemente a las subunidades catalíticas CnaA y CnaC.

Por otro lado, la subunidad regulatoria (CnbR) mostró ser un regulador positivo del metabolismo mitocondrial y regulador transcripcional de las subunidades catalíticas de la CN.

Prespectivas

A partir de los resultados de esta tesis, el trabajo futuro se centrará en identificar las proteínas secretadas por las cepas mutantes que codifican a las subunidades de CN durante el crecimiento micelial de *M. lusitanicus* que incrementan la virulencia. Además, queda por dilucidar una posible regulación entre la vía de la CN y la vía de la PKA, así como su relación con Fzo1 y la interacción con otras posibles vías de señalización. La función de la CN para la activación de Dnm1 y la participación de los factores de transcripción TEC1 y HAP1p en la vía de la CN.

XI. Bibliografía

1. Ackema, K. B., Hench, J., Böckler, S., Wang, S. C., Sauder, U., Mergentaler, H., Westermann, B., Bard, F., Frank, S., & Spang, A. (2014). The Small GTPase Arf1 Modulates Mitochondrial Morphology and Function. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 33(22), 2659–2675. <https://doi.org/10.15252/emboj.201489039>
2. Ackema, K. B., Prescianotto-Baschong, C., Hench, J., Wang, S. C., Chia, Z. H., Mergentaler, H., Bard, F., Frank, S., & Spang, A. (2016). Sar1, a Novel Regulator of ER-Mitochondrial Contact Sites. *PloS One*, 11(4), 154280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154280>.
3. Alastruey-Izquierdo, A., Castelli, M. V., Cuesta, I., Zaragoza, O., Monzón, A., Mellado, E., & Rodríguez-Tudela, J. L. (2009). *In vitro* Activity of Antifungals Against Zygomycetes. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(5), 71–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02984.x>.
4. Alastruey-Izquierdo, A., Hoffmann, K., de Hoog, G. S., Rodríguez-Tudela, J. L., Voigt, K., Bibashi, E., & Walther, G. (2010). Species Recognition and Clinical Relevance of the Zygomycetous Genus *Lichtheimia* (Syn. *Absidia* Pro Parte, *Mycoclados*). *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2154–2170. <https://doi.org/10.1128/JCM.01744-09>
5. Alejandre-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*, 61(12), 1043–1062. <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00096-8>
6. Alejandre-Castañeda, V., Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., Nuñez-Anita, R. E., Santoyo, G., Castro-Cerritos, K. V., Ortiz-Alvarado,

- R., Corrales-Escobosa, A. R., Ramírez-Díaz, M. I., Gutiérrez-Corona, J. F., López-Torres, A., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2022). Secretion of the Siderophore Rhizoferrin is Regulated by the cAMP-PKA Pathway and is Involved in the Virulence of *Mucor lusitanicus*. *Scientific Reports*, 12(1), 10649. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14515-0>
7. Araguás, C., González-Peñas, E., & De Cerain, AL. (2005). Study on Ochratoxin A in Cereal-derived Products From Spain. *Food Chemistry*, 92 (3), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.012>
 8. Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Nwozo, S., Odongo, G. A., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Adeleye, A. O., & Okpala, C. O. R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins*, 14(3), 167. <https://doi.org/10.3390/toxins14030167>
 9. Backes, S., Hess, S., Boos, F., Woellhaf, M. W., Gödel, S., Jung, M., Mühlhaus, T., & Herrmann, J. M. (2018). Tom70 Enhances Mitochondrial Preprotein Import Efficiency by Binding to Internal Targeting Sequences. *The Journal of Cell Biology*, 217(4), 1369–1382. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708044>
 10. Bairwa, G., Hee Jung, W., & Kronstad, J. W. (2017). Iron Acquisition in Fungal Pathogens of Humans. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 9(3), 215–227. <https://doi.org/10.1039/c6mt00301j>
 11. 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>
 12. Batiza, A. F., Schulz, T., & Masson, P. H. (1996). Yeast Respond to Hypotonic Shock With a Calcium Pulse. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23357–23362. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23357>
 13. Bencina, M., Legisa, M., & Read, N. D. (2005). Cross-talk Between cAMP and Calcium Signalling in *Aspergillus niger*. *Molecular*

- Microbiology, 56(1), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04541.x>
14. Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature Reviews. Molecular cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
 15. Binder, U., Maurer, E., & Lass-Flörl, C. (2014). Mucormycosis From the Pathogens to the Disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (6), 60–66. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12566>
 16. Blankenship, J. R., Wormley, F. L., Boyce, M. K., Schell, W. A., Filler, S. G., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2003). Calcineurin is Essential for *Candida albicans* Survival in Serum and Virulence. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 422–430. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.422-430.2003>
 17. Bonilla, M., & Cunningham, K. W. (2002). Calcium Release and Influx in yeast: TRPC and VGCC Rule Another Kingdom. *Science's: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(127), 17. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.127.pe17>
 18. Bredenkamp, A., Velankar, H., van Zyl, W. H., & Görgens, J. F. (2010). Effect of Dimorphic Regulation on Heterologous Glucose Oxidase Production by *Mucor circinelloides*. *Yeast*, 27(10), 849–860. <https://doi.org/10.1002/yea.1793>
 19. Brenner S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
 20. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a Mitochondrial Love-hate Triangle. *American Journal of Physiology*, 287(4), 817–833. <https://doi.org/10.1152/ajpccell.00139.2004>
 21. Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>

22. Brunke S, Mogavero S, Kasper L & Hube B. (2016). Virulence Factors in Fungal Pathogens of Man. *Current Opinion Microbiology* 32, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
23. Buschlen, S., Amillet, J. M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., & Bolotin-Fukuhara, M. (2003). The *S. Cerevisiae* HAP Complex, a Key Regulator of Mitochondrial Function, Coordinates Nuclear and Mitochondrial Gene Expression. *Comparative and Functional Genomics*, 4(1), 37–46. <https://doi.org/10.1002/cfg.254>
24. Carroll, C. S., Grieve, C. L., Murugathasan, I., Bennet, A. J., Czekster, C. M., Liu, H., Naismith, J., & Moore, M. M. (2017). The Rhizoferrin Biosynthetic Gene in the Fungal Pathogen *Rhizopus delemar* is a Novel Member of the NIS Gene Family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 89, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.005>
25. Catterall W. A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-gated Ca^{2+} Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>
26. Cepero de Garcia, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., & Vargas Estupiñan, N. (2012). *Biología de Hongos*. (1a ed.). Universidad de los Andes. <https://books.google.com.mx/books?id=pS2RDwAAQBAJ&lpg=PR1&hl=es&pg=PR20#v=onepage&q&f=false>
27. Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P., & Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by Calcineurin Regulates Translocation of Drp1 to Mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 15803–15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
28. Chakravarti, A., Camp, K., McNabb, D. S., & Pinto, I. (2017). The Iron-Dependent Regulation of the *Candida albicans* Oxidative Stress Response by the CCAAT-Binding Factor. *PloS One*, 12(1), 170649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170649>

29. Chang, A. L., & Doering, T. L. (2018). Maintenance of Mitochondrial Morphology in *Cryptococcus neoformans* Is Critical for Stress Resistance and Virulence. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 9(6), 1375-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01375-18>
30. Chen, Y., Fan, X., Zhao, X., Shen, Y., Xu, X., Wei, L., Wang, W., & Wei, D. (2021). cAMP Activates Calcium Signalling Via Phospholipase C to Regulate Cellulase Production in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01914-0>
31. 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 1733–1742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019570>
32. Chin, D. A., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a Prototypical Calcium Sensor. *Trends in Cell Biology*, 10(8), 322-328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)
33. Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P. E., García-Miguel, M., & Mellado, R. (2014). Mitochondrial Metabolism and the Control of Vascular Smooth Muscle cell Proliferation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00072>
34. Choi, H. W., Lee, D. H., & Hwang, B. K. (2009). The Pepper Calmodulin Gene CaCaM1 is Involved in Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Generation Required for Cell Death and the Defense Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(11), 1389–1400. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1389>
35. 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, 4794–4805

36. Chowdhury, A. R., Zielonka, J., Kalyanaraman, B., Hartley, R. C., Murphy, M. P., & Avadhani, N. G. (2020). Mitochondria-targeted Paraquat and Metformin Mediate ROS Production to Induce Multiple Pathways of Retrograde Signaling: A Dose-dependent Phenomenon. *Redox Biology*, 36, 101606. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101606>
37. Chua, S. K., Wang, B. W., Lien, L. M., Lo, H. M., Chiu, C. Z., & Shyu, K. G. (2016). Mechanical Stretch Inhibits MicroRNA499 Via p53 to Regulate Calcineurin-A Expression in Rat Cardiomyocytes. *PloS One*, 11(2), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148683>
38. Colabardini, A. C., Ries, L. N., Brown, N. A., Savoldi, M., Dinamarco, T. M., von Zeska Kress, M. R., Goldman, M. H., & Goldman, G. H. (2014). Protein kinase C Overexpression Suppresses Calcineurin-Associated Defects in *Aspergillus nidulans* and is Involved in Mitochondrial Function. *PloS One*, 9(8), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104792>
39. Corrochano, L. M., Kuo, A., Marcet-Houben, M., Polaino, S., Salamov, A., Villalobos-Escobedo, J. M., Grimwood, J., Álvarez, M. I., Avalos, J., Bauer, D., Benito, E. P., Benoit, I., Burger, G., Camino, L. P., Cánovas, D., Cerdá-Olmedo, E., Cheng, J. F., Domínguez, A., Eliáš, M., Eslava, A. P., & Grigoriev, I. V. (2016). Expansion of Signal Transduction Pathways in Fungi by Extensive Genome Duplication. *Current biology: CB*, 26(12), 1577–1584. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.038>
40. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: a Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
41. Creamer, T. (2020). Calcineurin. *Cell Communication and Signaling*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00636-4>
42. Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007). Reversible Phosphorylation of Drp1 by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase and Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Cell Death. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 8(10), 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>

43. Cruz, M. D., Goldstein, A. L., Blankenship, J. R., Del Poeta, M., Davis, D. A., Cárdenas, M. E., Perfect, J. R., McCusker, J. H., & Heitman, J. (2002). Calcineurin is Essential for Survival During Membrane Stress in *candida albicans*. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 21(4), 546-559. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.546>
44. Cyert M. S. (2003). Calcineurin Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: Wow Yeast Go Crazy in Response to Stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1143–1150. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01552-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01552-3)
45. Cyert, M. S., & Thorner, J. (1992). Regulatory Subunit (CNB1 Gene Product) of Yeast Ca^{2+} /calmodulin-Dependent Phosphoprotein Phosphatases is Required for Adaptation to Pheromone. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), 3460–3469. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.8.3460-3469.1992>
46. Davis, R. H., & Perkins, D. D. (2002). Timeline: Neurospora: a Model of Model Microbes. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 397–403. <https://doi.org/10.1038/nrg797>
47. Del Aguila, E. M., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. (2003). Expression of the Yeast Calcineurin Subunits CNA1 and CNA2 During Growth and Hyper-Osmotic Stress. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00181-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00181-2)
48. Den Brave, F., Gupta, A., & Becker, T. (2021). Protein Quality Control at the Mitochondrial Surface. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.795685>
49. 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>

50. Dong, F., Zhu, M., Zheng, F., & Fu, C. (2021). 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>
51. Dröse, S., & Brandt, U. (2012). Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 748, 145–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_6
52. Egan, J. D., García-Pedrajas, M. D., Andrews, D. L., & Gold, S. E. (2009). Calcineurin is an Antagonist to PKA Protein Phosphorylation Required for Postmating Filamentation and Virulence, While PP2A is Required for Viability in *Ustilago Maydis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(10), 1293–1301. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-10-1293>
53. El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., & Young, A. J. (2004). Carotenoid Radical Chemistry and Antioxidant/Pro-Oxidant Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.007>
54. Emery, T. 1982. Iron Metabolism in Human and Plants. *Am. Sci.* 70:626-632.
55. 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>
56. Fisher, C. R., Shaaeli, A. A., Ebeling, M. C., Montezuma, S. R., & Ferrington, D. A. (2022). Investigating Mitochondrial Fission, Fusion, and Autophagy in Retinal Pigment Epithelium From Donors With Age-Related Macular Degeneration. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26012-5>
57. Forster, C., & Kane, P. M. (2000). Cytosolic Ca^{2+} Homeostasis is a Constitutive Function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *The*

- Journal of Biological Chemistry, 275(49), 38245–38253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006650200>.
58. Fox, D. T., Cruz, M. D., Sia, R. A. L., Ke, H., Cox, G. M., Cárdenas, M. E., & Heitman, J. (2001). Calcineurin Regulatory Subunit is Essential for Virulence and Mediates Interactions With FKBP12–FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(4), 835-849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02295.x>
 59. Friedenthal, M., Epstein, A., & Passeron, S. (1974). Effect of Potassium Cyanide, Glucose and Anaerobiosis on Morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Microbiology*, 82(1), 15-24.
 60. Furukawa, K., Fukuda, T., Yamashita, S. I., Saigusa, T., Kurihara, Y., Yoshida, Y., Kirisako, H., Nakatogawa, H., & Kanki, T. (2018). The PP2A-like Protein Phosphatase Ppg1 and the Far Complex Cooperatively Counteract CK2-Mediated Phosphorylation of Atg32 to Inhibit Mitophagy. *Cell Reports*, 23(12), 3579–3590. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.064>
 61. Gálvez-Romero, J. L., Perea-Peña, A., Huerta-Jurado, P., Parra-Salazar, M. A., Tepalcingo-Aguilar, L. M., Ramírez-Sandoval, M. P., Gijón-Mitre, R., Navarro-Alvarado, R., Hernández-Moreno, L. L., Barradas-Arroyo, D., Coronado-Cervantes, B., Rodríguez-Serrano, J. A., & Baños-Lara, M. D. R. (2023). Rhino-orbital Mucormycosis in a Mexican Patient With COVID-19: Case Report. *Mucormycosis Rino-Orbitaria en un Paciente Mexicano con COVID-19: Reporte de un Caso. Revista Alergia México*, 69(2), 93–97. <https://doi.org/10.29262/ram.v69i2.1185>
 62. Gan, E. S., & Ooi, E. E. (2020). Oxygen: Viral Friend or Foe?. *Virology Journal*, 17(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01374-2>
 63. Garcia, A., Huh, E. Y., & Lee, S. C. (2023). Serine/Threonine Phosphatase Calcineurin Orchestrates the Intrinsic Resistance to Micafungin in the Human-Pathogenic Fungus *Mucor circinelloides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(2), e0068622. <https://doi.org/10.1128/aac.00686-22>

64. Geli, M. I., Wesp, A., & Riezman, H. (1998). Distinct Functions of Calmodulin are Required for the Uptake Step of Receptor-Mediated Endocytosis in Yeast: The Type I Myosin Myo5p is One of the Calmodulin Targets. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 17(3), 635–647. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.3.635>
65. Ghosh, P., Rangamani, P., & Kufareva, I. (2017). The GAPs, GEFs, GDIs and...Now, GEMs: New Kids on the Heterotrimeric G Protein Signaling Block. *Cell Cycle*, 16(7), 607–612. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1282584>
66. Gooday, G.W. (1973). Differentiation in the Mucorales. *Symposium of the Society of General Microbiology*, 23, 269-293.
67. Gooday, G. W., Fawcett, P., Green, D., & Shaw, G. (1973). The Formation of Fungal Sporopollenin in the Zygosporangium Wall of *Mucor mucedo*: a Role for the Sexual Carotenogenesis in the Mucorales. *Journal Of General Microbiology*, 74(2), 233-239. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-2-233>
68. Gow, N. A., Perera, T. H., Sherwood-Higham, J., Gooday, G. W., Gregory, D. W., & Marshall, D. (1994). Investigation of Touch-Sensitive Responses by Hyphae of the Human Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Scanning Microscopy*, 8(3), 705–710.
69. Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, & col., (2011) *In vivo* Hypoxia and a Fungal Alcohol Dehydrogenase Influence the Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002145. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002145>
70. Grahl, N., Shepardson, K. M., Chung, D., & Cramer, R. A. (2012). Hypoxia and Fungal Pathogenesis: to Air or Not to Air?. *Eukaryotic Cell*, 11(5), 560–570. <https://doi.org/10.1128/EC.00031-12>
71. Grötsch, H., Giblin, J. P., Idrissi, F. Z., Fernández-Golbano, I. M., Collette, J. R., Newpher, T. M., Robles, V., Lemmon, S. K., & Geli, M. I. (2010). Calmodulin Dissociation Regulates Myo5 Recruitment and Function at Endocytic Sites. *Journal of the European Molecular Biology*

- Organization, 29(17), 2899–2914.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.159>
72. Haas, H. (2003). Molecular Genetics of Fungal Siderophore Biosynthesis and Uptake: The Role of Siderophores in Iron Uptake and Storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4), 316–330.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1335-2>
73. Han, B. Z., Kuijpers, A. F., Thanh, N. V., & Nout, M. J. (2004). Mucoraceous Moulds Involved in the Commercial Fermentation of Sufu Pehtze. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(3), 253–257.
<https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020157.72415.b9>
74. Heller, J. & Tudzynski, P. (2011). Especies Reactivas de Oxígeno en Hongos Fitopatógenos: Señalización, Desarrollo y Enfermedad. *Revista Anual de Fitopatología*, 49, 369–390.
75. Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J. L. (2012). Molecular Systematics in the Genus *Mucor* With Special Regards to Species Encountered in Cheese. *Fungal Biology*, 116(6), 692–705.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>
76. Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and Biology of Siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637–657.
<https://doi.org/10.1039/b906679a>
77. Hong, SB., Kim, DH., Lee, M. & col., (2012). Zygomycota Associated With Traditional Meju, a Fermented Soybean Starting Material for Soy Sauce and Soybean Paste. *J Microbiol.* 50, 386–393.
<https://doi.org/10.1007/s12275-012-1437-6>
78. Hospenthal, M. A. C., y Carswell, A. P. (2015). Diagnostic Radiology. In *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections* (pp. 65–76). Springer International Publishing.
79. Howley, P. M., Knipe, D. M., Whelan, S., Freed, E. O., & Cohen, J. L. (2023). *Fields. Virología. Volumen III. Virus de ARN*. España: Lippincott Williams & Wilkins.

80. Hussain, S., Baxi, H., Riad, A., Klugarová, J., Pokorná, A., Slezáková, S., Líčeník, R., Najmi, A. K., & Klugar, M. (2021). COVID-19-Associated Mucormycosis (CAM): An Updated Evidence Mapping. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10340. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910340>
81. Il'ichev, YV, Perry, JL & Simon, JD (2002). Interacción de la Ocratoxina A con la Albúmina Sérica Humana. Unión Preferencial del Dianión y Efectos del pH. *La Revista de Química Física B*, 106 (2), 452-459.
82. 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>
83. Jiang, L. Q., Garcia-Roves, P. M., de Castro Barbosa, T., & Zierath, J. R. (2010). Constitutively Active Calcineurin in Skeletal Muscle Increases Endurance Performance and Mitochondrial Respiratory Capacity. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298(1), 8–16. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00403.2009>
84. Kahn, R. A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R. C., Munro, S., & Schurmann, A. (2006). Nomenclature for the Human Arf Family of GTP-Binding Proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of cell biology*, 172(5), 645–650. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512057>
85. Khasheii, B., Mahmoodi, P., & Mohammadzadeh, A. (2021). Siderophores: Importance in Bacterial Pathogenesis and Applications in Medicine and Industry. *Microbiological Research*, 250, 126790. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126790>
86. Klee, C. B., Ren, H., & Wang, X. (1998). Regulación de la Proteína Fosfatasa Estimulada por Calmodulina, Calcineurina. *Revista de Química Biológica*, 273(22), 13367-13370.

87. Ko, H. J., Tsai, C. Y., Chiou, S. J., Lai, Y. L., Wang, C. H., Cheng, J. T., Chuang, T. H., Huang, C. F., Kwan, A. L., Loh, J. K., & Hong, Y. R. (2021). The Phosphorylation Status of Drp1-Ser637 by PKA in Mitochondrial Fission Modulates Mitophagy via PINK1/Parkin to Exert Multipolar Spindles Assembly during Mitosis. *Biomolecules*, 11(3), 424. <https://doi.org/10.3390/biom11030424>
88. Kobel-Höller, K., Gley, K., Jochinke, J., Heider, K., Fritsch, V. N., Nguyen, H. V. D., Lischke, T., Radek, R., Baumgrass, R., Mutzel, R., & Thewes, S. (2018). Calcineurin Silencing in *Dictyostelium discoideum* Leads to Cellular Alterations Affecting Mitochondria, Gene Expression, and Oxidative Stress Response. *Protist*, 169(4), 584–602. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.04.004>
89. Koch, B., & Traven, A. (2019). Mdivi-1 and Mitochondrial Fission: Recent Insights From Fungal Pathogens. *Current Genetics*, 65(4), 837–845. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00942-6>
90. Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science*, 305 (5685), 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>
91. Kretschmer, M., Wang, J., & Kronstad, J. W. (2012). Peroxisomal and Mitochondrial β -oxidation Pathways Influence the Virulence of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 11(8), 1042–1054. <https://doi.org/10.1128/EC.00128-12>
92. Kumar, A., Roy, A., Deshmukh, M. V., & Tamuli, R. (2020). Dominant Mutants of the Calcineurin Catalytic Subunit (CNA-1) Showed Developmental Defects, Increased Sensitivity to Stress Conditions, and CNA-1 Interacts With CaM and CRZ-1 in *Neurospora crassa*. *Archives of Microbiology*, 202(4), 921–934. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01768-z>
93. Lee, S. C., Li, A., Calo, S., Inoue, M., Tonthat, N. K., Bain, J. M., Louw, J., Shinohara, M. L., Erwig, L. P., Schumacher, M. A., Ko, D. C., & Heitman, J. (2019). Calcineurin Regulates Mitochondrial Fission and Mitophagy in *Neurospora crassa*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jeu.12555>

- J. (2015). Calcineurin Orchestrates Dimorphic Transitions, Antifungal Drug Responses and Host-Pathogen Interactions of the Pathogenic Mucoralean Fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 97(5), 844–865. <https://doi.org/10.1111/mmi.13071>
94. Lee, S. C., Li, A., Calo, S., & Heitman, J. (2013). Calcineurin Plays Key Roles in the Dimorphic Transition and Virulence of the Human Pathogenic Zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003625. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>.
95. Leitner, A., Zöllner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., & Lindner, W. (2002). Comparación de Métodos para la Determinación de Ocratoxina A en vino. *Analytica Chimica Acta*, 453 (1), 33-41
96. Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., Heitman, J., & Lee, S. C. (2011). Sporangiospore Size Dimorphism is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002086. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002086>
97. Li, T., & Guo, Y. (2022). ADP-Ribosylation Factor Family of Small GTP-Binding Proteins: Their Membrane Recruitment, Activation, Crosstalk and Functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 813353. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.813353>
98. Li, G., Fu, W., Deng, Y., & Zhao, Y. (2021). Role of Calcium/Calcineurin Signalling in Regulating Intracellular Reactive Oxygen Species Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 12(9), 1311. <https://doi.org/10.3390/genes12091311>
99. Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G., & Borkovich, K. A. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 61, 423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093432>
100. Li, Y., Zhang, Y., Zhang, C., Wang, H., Wei, X., Chen, P., & Lu, L. (2020). Mitochondrial Dysfunctions Trigger the Calcium Signaling-

- Dependent Fungal Multidrug Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(3), 1711–1721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911560116>
101. Liu, C., Liu, T., Lv, Z., Qin, M., Qu, Z., Zhang, Z., Li, F., Chen, D., Zhang, X., Chen, X. L., & Shen, M. (2022). A Calcineurin Regulator MoRCN1 Is Important for Asexual Development, Stress Response, and Plant Infection of *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in plant science*, 13, 925645. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.925645>
 102. Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., & Sun, S. (2015). Components of the Calcium-Calcineurin Signaling Pathway in Fungal Cells and Their Potential as Antifungal Targets. *Eukaryotic Cell*, 14(4), 324–334. <https://doi.org/10.1128/EC.00271-14>
 103. López-Martínez, R. (1993). Los Mecanismos Patogénicos y de Protección en las Micosis. *Gac Méd Méx*, 132(1), 47–61. http://anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/1996-132-1-47-61.pdf
 104. Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J., & McIntyre, M. (2003). Characterization of the *Mucor circinelloides* Life Cycle by On-Line Image Analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1152–1160. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02098.x>
 105. Ma, L. J., Ibrahim, A. S., Skory, C., Grabherr, M. G., Burger, G., Butler, M., Elias, M., Idnurm, A., Lang, B. F., Sone, T., Abe, A., Calvo, S. E., Corrochano, L. M., Engels, R., Fu, J., Hansberg, W., Kim, J. M., Kodira, C. D., Koehrsen, M. J., Liu, B., & Wickes, B. L. (2009). Genomic Analysis of the Basal Lineage Fungus *Rhizopus oryzae* Reveals a Whole-Genome Duplication. *PLoS Genetics*, 5(7), e1000549. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000549>
 106. 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>

107. Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen Peroxide Sensing, Signaling and Regulation of Transcription Factors. *Redox Biology*, 2, 535-562.
108. Martín Gómez, M. T., & Salavert Lletí, M. (2021). Mucormycosis: Perspectiva de Manejo Actual y de Futuro (Mucormycosis: Current and Future Management Perspective). *Revista Iberoamericana de Micología*, 38(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.003>
109. Martín, J. F. (2022). Vacuolar and Peroxisomal Calcium Ion Transporters in Yeasts and Fungi: Key Role in the Translocation of Intermediates in the Biosynthesis of Fungal Metabolites. *Genes*, 13(8), 1450. <https://doi.org/10.3390/genes13081450>
110. Matsumoto, T. K., Ellsmore, A. J., Cessna, S. G., Low, P. S., Pardo, J. M., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2002). An Osmotically Induced Cytosolic Ca²⁺ Transient Activates Calcineurin Signaling to Mediate Ion Homeostasis and Salt Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33075-33080.
111. Matus OG, Pardo JP, & Guerra SG. (2021). Un Vistazo a la Morfología y Dinámica de la Mitocondria y a los Sitios de Producción de las Especies Reactivas de Oxígeno. *Rev Educación Bioquímica*. 40(3):111-127. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=102080>
112. Merrill, R. A., & Strack, S. (2014). Mitochondria: a Kinase Anchoring Protein 1, a Signaling Platform for Mitochondrial Form and Function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 48, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.12.012>
113. Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic Regulation of Mitochondrial Dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), 379-387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
114. Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J. L. (2017). Mucor: A Janus-Faced Fungal Genus With Human Health Impact and Industrial

- Applications. Fungal Biology Reviews, 31(1), 12–32.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.002>
115. Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., & Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-Mediated Mitochondrial Fission is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. The Journal of Cell Biology, 151(2), 367–380. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.2.367>
 116. Mukherjee PK, Mohamed S, Chandra J, Kuhn D, Liu S, Antar OS, Munyon R, Mitchell AP, Andes D, Chance MR, Rouabhia M, & Ghannoum MA. (2006). Alcohol Dehydrogenase Restricts the Ability of the Pathogen *Candida albicans* to Form a Biofilm on Catheter Surfaces Through an Ethanolbased Mechanism. Infect Immun, 74:3804 –3816.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00161-06>
 117. Muller, E. M., Mackin, N. A., Erdman, S. E., & Cunningham, K. W. (2003). Fig1p Facilitates Ca²⁺ Influx and Cell Fusion During Mating of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 278(40), 38461–38469. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304089200>
 118. Müller, M., Lu, K., & Reichert, A. S. (2015). Mitophagy and Mitochondrial Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, 1853(10), 2766–2774.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.024>
 119. Nagotu, S., Krikken, A. M., Otzen, M., Kiel, J. A., Veenhuis, M., & Van Der Klei, I. J. (2008). Peroxisome Fission in *Hansenula polymorpha* Requires MDV1 and FIS1, Two Proteins Also Involved in Mitochondrial Fission. Traffic, 9(9), 1471-1484. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00772.x>
 120. Narrillos Rodríguez, E. (2014). Estudio de Sideróforos Procedentes de Bacterias Patógenas de Peces de Acuicultura. Tesis de licenciatura en Química. Universidad de da Coruña. 76 pp.
 121. Nash, A., Samoylova, M., Leuthner, T., Zhu, M., Lin, L., Meyer, J. N., & Brennan, T. V. (2020). Effects of Immunosuppressive Medications on

- Mitochondrial Function. The Journal of Surgical Research, 249, 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.12.010>
122. Navarro, E., Lorca-Pascual, J. M., Quiles-Rosillo, M. D., Nicolás, F. E., Garre, V., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2001). A Negative Regulator of Light-Inducible Carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. Molecular Genetics and Genomics, 266(3), 463–470.
<https://doi.org/10.1007/s004380100558>
123. Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Panchal S, Nicolás FE, Mondo SJ, Ganguly P, Pangilinan J, Grigoriev IV, Heitman J, Sanyal K, & Garre V (2019) Early Diverging Fungus *Mucor circinelloides* Lacks Centromeric Histone CENPA and Displays a Mosaic of Point and Regional Centromeres. Curr Biol. 29(22):3791-3802.e6.
124. Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2018). Components of a New Gene Family of Ferroxidases Involved in Virulence are Functionally Specialized in Fungal Dimorphism. Scientific Reports, 8(1), 7660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26051-x>.
125. Neilands J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. The Journal of biological chemistry, 270(45), 26723–26726.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
126. Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. (2011). Sex in Fungi. Annual Review of Genetics, 45, 405–430.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132536>
127. Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Mutants Defective in a *Mucor circinelloides* Dicer-Like Gene are not Compromised in siRNA Silencing but Display Developmental Defects. Fungal Genetics and Biology, 44(6), 504–516.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.003>
128. Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2003). Two Classes of Small Antisense RNAs in Fungal RNA Silencing Triggered by

- Non-Integrative Transgenes. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 22(15), 3983–3991. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg384>
129. Nieminen, M. T., Novak-Frazer, L., Rautemaa, V., Rajendran, R., Sorsa, T., Ramage, G., Bowyer, P., & Rautemaa, R. (2014). A Novel Antifungal is Active Against *Candida albicans* Biofilms and Inhibits Mutagenic Acetaldehyde Production *In vitro*. *PloS One*, 9(5), e97864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097864>
 130. 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>
 131. 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>
 132. Olson A, & Stenlid, J. (2001). Plant pathogens. Mitochondrial Control of Fungal Hybrid Virulence. *Nature*, 411(6836), 438. <https://doi.org/10.1038/35078147>
 133. Onuma, H., Lu, Y. F., Tomizawa, K., Moriwaki, A., Tokuda, M., Hatase, O., & Matsui, H. (1998). A Calcineurin Inhibitor, FK506, Blocks Voltage-Gated Calcium Channel-Dependent LTP in the Hippocampus. *Neuroscience Research*, 30(4), 313–319. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00012-1](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00012-1)
 134. Orlowski M. (1991). *Mucor* Dimorphism. *Microbiological Reviews*, 55(2), 234–258. <https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991>
 135. Patiño-Medina, J. A., Alejandre-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*, 9(12), 1127. <https://doi.org/10.3390/jof9121127>
136. Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alejandre-Castañeda, V., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Campos-García, J., Ortiz-Alvarado, R., Jácome-Galarza, I. E., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2018). Control of Morphology and Virulence by ADP-ribosylation Factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current Genetics*, 64(4), 853–869. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0798-0>
 137. 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>
 138. Pedraza, APC & Campuzano, FSE (2018). Aislamiento, Identificación y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Metabolitos Producidos por *Mucor circinelloides* (Cepa Nativa SPG 321). *Nova*. 16. 63-70. <https://doi.org/10.22490/24629448.2690>
 139. Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, RA (2007). Ocratoxina A: una Descripción General de la Toxicidad y Carcinogenicidad en Animales y Humanos. *Nutrición Molecular e Investigación Alimentaria*, 51 (1), 61-99.
 140. Prakash, H., & Chakrabarti, A. (2019). Global Epidemiology of Mucormycosis. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 5(1), 26. <https://doi.org/10.3390/jof5010026>
 141. Rangel-Porras, R. A., Díaz-Pérez, S. P., Mendoza-Hernández, J. M., Romo-Rodríguez, P., Alejandre-Castañeda, V., Valle-Maldonado, M. I., Torres-Guzmán, J. C., González-Hernández, G. A., Campos-García, J., Arnau, J., Meza-Carmen, V., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2019). Alcohol

- Dehydrogenase 1 Participates in the Crabtree Effect and Connects Fermentative and Oxidative Metabolism in the Zygomycete *Mucor circinelloides*. *Journal of microbiology*, 57(7), 606–617. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8680-z>
142. Reid, G., Lynch III, J. P., Fishbein, M. C., & Clark, N. M. (2020). Mucormycosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(1), 99–114.
 143. Renvall, S., & Niinikoski, J. (1980). Kinetics of Oxygen in Peritoneal Cavity. Effects of Chemical Peritonitis and Intraperitoneally Administered Colloids in Rats. *The Journal of Surgical Research*, 28(2), 132–139. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90156-0](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90156-0)
 144. Risipail, N., Soanes, D. M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., Yang, M., Beffa, R., Brakhage, A. A., Gow, N. A., Kahmann, R., Lebrun, M. H., Lenasi, H., Perez-Martin, J., Talbot, N. J., Wendland, J., & Di Pietro, A. (2009). Comparative Genomics of MAP Kinase and Calcium-Calcieneurin Signalling Components in Plant and Human Pathogenic Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.01.002>
 145. Roden, MM, Zaoutis, TE, Buchanan, WL, Knudsen, TA, Sarkisova, TA, Schaufele, RL, & Walsh, TJ (2005). Epidemiología y Resultado de la Zigomicosis: una Revisión de 929 Casos Reportados. *Enfermedades Infecciosas Clínicas*, 41 (5), 634-653.
 146. Rodríguez, C., Galindo, L. R., & Siverio, J. M. (2013). Nitrogen-Dependent Calcineurin Activation in the Yeast *Hansenula Polymorpha*. *Fungal Genetics and Biology*, 53, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.01.007>
 147. San-Blas G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*: Cell Wall Glucans, Pathogenicity, and Dimorphism. *Current Topics in Medical Mycology*, 1, 235–257. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_9

148. San-Blas, G., & San-Blas, F. (1984). Molecular Aspects of Fungal Dimorphism. Critical Reviews in Microbiology, 11(2), 101–127. <https://doi.org/10.3109/10408418409105474>
149. Sassone-Corsi P. (2012). The cyclic AMP pathway. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(12), a011148. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011148>
150. Schneider, G., Sjöling, S., Wallin, E., Wrede, P., Glaser, E., & von Heijne, G. (1998). Feature-Extraction From Endopeptidase Cleavage Sites in Mitochondrial Targeting Peptides. Proteins, 30(1), 49–60.
151. Schuster, R., & Okamoto, K. (2022). An Overview of the Molecular Mechanisms of Mitophagy in Yeast. Biochimica et Biophysica Acta. General subjects, 1866(11), 130203. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130203>
152. 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>
153. Sheftic, S. R., Page, R., & Peti, W. (2016). Investigating the Human Calcineurin Interaction Network Using the $\pi\phi$ LxVP SLiM. Scientific Reports, 6, 38920. <https://doi.org/10.1038/srep38920>
154. Singh, A. K., Singh, R., Joshi, S. R., & Misra, A. (2021). Mucormycosis in COVID-19: A Systematic Review of Cases Reported Worldwide and in India. Diabetes & Metabolic Syndrome, 15(4), 102146. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.05.019>
155. Skiada, A., Pavleas, I., & Drogari-Apiranthitou, M. (2020). Epidemiology and Diagnosis of Mucormycosis: An Update. Journal of Fungi, 6(4), 265. <https://doi.org/10.3390/jof6040265>
156. Soliman, S. S. M., Baldin, C., Gu, Y., Singh, S., Gebremariam, T., Swidergall, M., Alqarihi, A., Youssef, E. G., Alkhazraji, S., Pikoulas, A., Perske, C., Venkataramani, V., Rich, A., Bruno, V. M., Hotopp, J. D., Mantis, N. J., Edwards, J. E., Jr, Filler, S. G., Chamilos, G., Vitetta, E. S.,

- Ibrahim, A. S. (2021). Mucoricin is a Ricin-Like Toxin That is Critical for the Pathogenesis of Mucormycosis. *Nature Microbiology*, 6(3), 313–326. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00837-0>
157. Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., & Kuno, T. (1998). Pmp1+, a Suppressor of Calcineurin Deficiency, Encodes a Novel MAP Kinase Phosphatase in Fission Yeast. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 17(1), 140–148. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.140>
 158. Tabor, H., & Tabor, C. W. (1972). Biosynthesis and Metabolism of 1,4-diaminobutane, Spermidine, Spermine, and Related Amines. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 36, 203–268. <https://doi.org/10.1002/9780470122815.ch7>
 159. Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm Drug Resistance. *Future Microbiology*, 8(10), 1325–1337. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.101>
 160. Tamuli, R., Deka, R., & Borkovich, K. A. (2016). Calcineurin Subunits A and B Interact to Regulate Growth and Asexual and Sexual Development in *Neurospora crassa*. *PloS One*, 11(3), e0151867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151867>
 161. Teixeira, M. C., Viana, R., Palma, M., Oliveira, J., Galocha, M., Mota, M. N., Couceiro, D., Pereira, M. G., Antunes, M., Costa, I. V., Pais, P., Parada, C., Chaouiya, C., Sá-Correia, I., & Monteiro, P. T. (2023). YEASTRACT+: a Portal for the Exploitation of Global Transcription Regulation and Metabolic Model Data in Yeast Biotechnology and Pathogenesis. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D785–D791. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1041>
 162. Terenzi, H. F., & Storck, R. (1969). Stimulation of Fermentation and Yeast-like Morphogenesis in *Mucor rouxii* by Phenethyl Alcohol. *Journal of Bacteriology*, 97(3), 1248–1261. <https://doi.org/10.1128/jb.97.3.1248-1261.1969>

163. Truong, T., Zeng, G., Lim, T. K., Cao, T., Pang, L. M., Lee, Y. M., Lin, Q., Wang, Y., & Seneviratne, C. J. (2019). Proteomics Analysis of *Candida albicans* DNM1 Haploid Mutant Unraveled the Association Between Mitochondrial Fission and Antifungal Susceptibility. *Proteomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1002/pmic.201900240>
164. Tsai, H. C., & Chung, K. R. (2014). Calcineurin Phosphatase and Phospholipase C are Required for Developmental and Pathological Functions in the Citrus Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *Microbiology*, 160(7), 1453–1465. <https://doi.org/10.1099/mic.0.077818-0>
165. Tucker, K., & Park, E. (2019). Cryo-EM Structure of the Mitochondrial Protein-Import Channel TOM Complex at Near-Atomic Resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(12), 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0339-2>
166. Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy. *Journal of the European Molecular Biology Organization*, 27(2), 433–446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
167. Ugarte-Urbe, B., Müller, H. M., Otsuki, M., Nickel, W., & García-Sáez, A. J. (2014). Dynamin-related Protein 1 (Drp1) Promotes Structural Intermediates of Membrane Division. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(44), 30645–30656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.575779>
168. Urrego Novoa, José R, & Díaz, Gonzalo J. (2006). Aflatoxinas: Mecanismos de Toxicidad en la Etiología de Cáncer Hepático Celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54 (2), 108-116. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200006&lng=en&tlng=es.
169. 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>
170. Valle-Maldonado, M. I., Patiño-Medina, J. A., Pérez-Arques, C., Reyes-Mares, N. Y., Jácome-Galarza, I. E., Ortiz-Alvarado, R., Vellanki, S., Ramírez-Díaz, M. I., Lee, S. C., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (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*, 22(10), e13236. <https://doi.org/10.1111/cmi.13236>
 171. Valle-Maldonado, M.I., Jácome-Galarza, I.E., Gutiérrez-Corona, F. & col., (2015). Selection of Reference Genes for Quantitative Real Time RT-PCR During Dimorphism in the Zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Biol Rep*, 42, 705–711. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3818-x>
 172. Wagner, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartz, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2020). A New Species Concept for the Clinically Relevant *Mucor circinelloides* Complex. *Persoonia*, 44, 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
 173. Wang, L., & Lin, X. (2012). Morphogenesis in Fungal Pathogenicity: Shape, Size, and Surface. *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003027. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003027>
 174. Wang, X., Che, M. Z., Khalil, H. B., McCallum, B. D., Bakkeren, G., Rampitsch, C., & Saville, B. J. (2020). The Role of Reactive Oxygen Species in the Virulence of Wheat Leaf Rust Fungus *Puccinia triticina*. *Environmental Microbiology*, 22(7), 2956–2967. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15063>
 175. WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action. Geneva: World Health Organization; 2022.
 176. 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>
177. Wootten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Babu, M. M., & Sexton, P. M. (2018). Mechanisms of Signalling and Biased Agonism in G Protein-Coupled Receptors. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 19(10), 638–653. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0049-3>
 178. World Health Organization: WHO. (2018). Micotoxinas. www.who.int.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
 179. Xia, C., Zhang, J., Zhang, W., & Hu, B. (2011). A New Cultivation Method for Microbial Oil Production: Cell Pelletization and Lipid Accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 15.
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-15>
 180. 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>
 181. Yoboue, E. D., Mougeolle, A., Kaiser, L., Avéret, N., Rigoulet, M., & Devin, A. (2014). The Role of Mitochondrial Biogenesis and ROS in the Control of Energy Supply in Proliferating Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(7), 1093-1098. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.02.023>
 182. Yu, S. B., & Pekkurnaz, G. (2018). Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 3922-3941. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.027>
 183. Zheng, F., Jia, B., Dong, F., Liu, L., Rasul, F., He, J., & Fu, C. (2019). Glucose Starvation Induces Mitochondrial Fragmentation Depending on the Dynamin GTPase Dnm1/Drp1 in Fission Yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(47), 17725–17734.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010185>

184. Zhong, K., Li, X., Le, X., Kong, X., Zhang, H., Zheng, X., Wang, P., & Zhang, Z. (2016). MoDnm1 Dynamin Mediating Peroxisomal and Mitochondrial Fission in Complex with MoFis1 and MoMdv1 Is Important for Development of Functional Appressorium in *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathogens, 12(8), e1005823. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005823>