



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS**

Título de la Tesis:

**Elucidación del mecanismo de virulencia del
producto del gen *adh1* en *Mucor circinelloides***

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Química Farmacobióloga Sharel Pamela Díaz Pérez

Asesor:

Doctor en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza Carmen

Co Asesor:

Doctor en Ciencias en Genética J. Félix Gutiérrez Corona

Morelia Michoacán, Diciembre 2016.



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a Dios por todas las bendiciones recibidas, y a San Judas Tadeo porque cada plegaria que le ofrecí nunca me defraudo, y me ayudo en tan arduo camino.

A mis padres, Miguel y Santa, así como a mi hermana Michelle, por su apoyo, ayuda, confianza, porque a pesar de todo siempre estuvieron ahí para fortalecerme en los momentos que más los necesité, además de soportar para cada una de mis ausencias en casa.

A René por cada una de sus palabras, apoyo, tiempo, paciencia, desvelos y por soportar todos mis estados de ánimo, te amo.

A mis amores, Lolis y Santiago, que sin duda alguna fueron mi motivación y mi alegría al llegar a casa.

A mis angelitos, Sandy y Gissel, que siempre están conmigo en mis triunfos y fracasos a pesar del tiempo.

A mis tíos, primos y abuelitos, por los días de alegría y su amor incondicional.

A mis amigas de la vida, Martha y Atza, por su amistad incondicional.

Al D.C. Víctor Meza permitirme entrar a su equipo de trabajo, así como su apoyo y guía para el proyecto y para mi formación académica.

Al D.C. Félix por su apoyo en mi estancia en Guanajuato, así como sus consejos en todo momento a nivel profesional y personal.

Al D.C. Rafael Ortiz, por las aportaciones al proyecto, así como por el apoyo incondicional desde la licenciatura y por alentarme cada día a crecer profesional y personalmente.

Al D.C. Jesús Campos por su valiosa asesoría para cada uno de los objetivos del proyecto.

A la D. C. Martha Isela Ramírez por las contribuciones a la mejoría del proyecto.

A la D.C. Pamela Romo por el apoyo académico y asesoría técnica para este trabajo.

Gracias por el recibimiento en Guanajuato y por la amistad.

Al D. C. Adolfo López por su asesoría técnica y recibimiento en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad de Papaloapan, Campus Tuxtepec.

A la Q.F.B. Verónica Gómez Ruíz por la ayuda técnica para los cortes histológicos, además de sus enseñanzas

A la Dra. Adriana Nhoemí López Ramírez, R3 de anatomía patológica del Hospital General “Dr. Miguel Silva” de Morelia, Michoacán, por la asesoría técnica en la lectura de cortes histológicos.

Al M.C. Marco I. Valle por su apoyo en los experimentos de análisis de expresión de los genes, contribuciones y mejoras al proyecto.

A mis compañeros de generación, Rocío, Laura, Said, Gus, Christian, Marco, Sara, Marysol, Vicente, Dulce, Rox, Laura N., Alondra, por cada momento vivido a lo largo de este camino, gracias por los buenos momentos de estudio, apoyo y sobretodo amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Nan, David, Encanto, Xoch, Mau, Wichowsky, Ale, Albert, Lore, Alma, por los momentos de las experiencias vividas en el laboratorio que hicieron que el trabajo fuera ameno, así como a mi Minimi Ale, por su invaluable colaboración y cariño.

A mis compañeros en el laboratorio de Guanajuato, gracias por las experiencias vividas y por recibirme con tanto cariño.

A la beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada para realizar este trabajo de tesis; a los espacios del laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; el Laboratorio Estatal de Salud Pública; al Departamento de Patología del Hospital General “Dr. Miguel Silva”; al Departamento de Química Aplicada de la Universidad de Papaloapan, Campus Tuxtepec; y al Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

A. ÍNDICE

A. ÍNDICE	3
B. INDICE DE FIGURAS	6
C. INDICE DE TABLAS	8
D. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	9
E. PREFIJOS	10
F. RESUMEN	11
G. ABSTRACT	13
I. INTRODUCCION	15
1.1. Micosis	15
1.1.1. Factores de virulencia en hongos	16
1.1.2. Mucormicosis	23
1.2. Género <i>Mucor</i>	25
1.2.1. <i>Mucor circinelloides</i>	28
1.3. Alcohol Deshidrogenasas	30
1.4. Participación de la ADH en la virulencia de hongos	34
1.5. Toxicidad del acetaldehído	36
II. JUSTIFICACION	38
III. HIPOTESIS	38
IV. OBJETIVO GENERAL	38
4.1. Objetivos particulares	38
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1. Material Biológico	40
6.2. Medios de Cultivo	41
6.2.1. Medio YPG	41

6.2.2. Medio Lee	41
6.2.3. Medio LB.....	41
6.2.4. Medio NGM (Nematode Growth Medium)	41
6.3. Métodos	42
6.3.1. Condiciones de crecimiento de <i>M. circinelloides</i>	42
6.3.2. Obtención y conteo de esporas.....	42
6.3.3. Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	42
6.3.4. Determinación de producción de etanol y consumo de glucosa.	44
6.3.5. Determinación de producción de ácido acético	48
6.3.6. Crecimiento y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
6.3.7. Ensayos de virulencia con <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
6.3.8. Ensayos de virulencia con <i>Mus musculus</i>	49
6.3.9. Manipulación de ácidos nucleicos	50
6.3.10. Análisis Histopatológico	55
6.3.11. Efecto del disulfiram en la infección a ratones con la mutante <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i>	57
6.3.12. Análisis estadístico.....	57
VII. RESULTADOS.....	58
7.1. Caracterización fenotípica de las cepas	58
7.2. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en la germinación en aerobiosis.....	59
7.3. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> en el crecimiento en aerobiosis.	62
7.4. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en el crecimiento en anaerobiosis.....	62
7.5. Efecto de la mutación <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en la producción de etanol. 65	
7.6. Efecto de la mutación <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en la virulencia en <i>Mus musculus</i>	67
7.7. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en el tamaño de la espora.	69
7.8. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	70

7.9. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en el grado de invasividad a <i>Mus musculus</i>	72
7.9.1. Determinación de la invasividad de <i>M. circinelloides</i> en <i>Mus musculus</i> mediante qPCR.	72
7.9.2. Análisis histológico de la presencia de <i>M. circinelloides</i> en tejidos de <i>Mus musculus</i>	77
7.10. Respuesta inflamatoria en tejidos de <i>Mus musculus</i> post-infección con <i>M. circinelloides</i>	78
7.10.1. Determinación por histopatología de la respuesta inflamatoria en tejidos de <i>Mus musculus</i>	78
7.10.2. Niveles de los marcadores de inflamación (IL1- β , IL-6 Y MIP-2) en tejidos de <i>Mus musculus</i> posterior a la infección con <i>M. circinelloides</i>	82
7.11. Efecto del sobrenadante de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>C. elegans</i>	85
7.12. Análisis del efecto de proteasas o temperatura en la toxicidad del sobrenadante de <i>M. circinelloides</i>	87
7.13. Efecto de la ausencia del gen <i>adh1</i> en la producción de acetaldehído.	91
7.14. Efecto del acetaldehído en la germinación aerobia en la mutante <i>adh1⁻</i> de <i>M. circinelloides</i>	91
7.15. Efecto del acetaldehído en la supervivencia de <i>C. elegans</i>	95
7.16. Efecto del gen <i>adh1</i> en la producción de ácido acético.	96
7.17. Efecto de la ausencia del gen <i>adh1</i> en la expresión de la enzima <i>ald2</i> de <i>M. circinelloides</i>	98
7.18. Efecto del disulfiram en la infección por la mutante <i>adh1⁻</i> en <i>Mus musculus</i>	100
VIII. Discusión	102
IX. Conclusión.	107
X. Bibliografía.	108

B. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Enzimas cruciales para la patogénesis fúngica.....	21
Figura 2. Microscopia electrónica de barrido de una zigospora de <i>Mucor</i> <i>circinelloides</i>	27
Figura 3. Metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono.....	43
Figura 5. Curva de calibración en CG-FID.....	47
Figura 6. Caracterización fenotípica de las cepas silvestre (R7B), mutante (M5) y complementada (M5/pEUKA- <i>adh1</i> ⁺) de <i>M. circinelloides</i>	60
Figura 7. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> en la germinación aerobia de <i>M.</i> <i>circinelloides</i>	61
Figura 8. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en el crecimiento en aerobiosis de <i>M.</i> <i>circinelloides</i>	63
Figura 9. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en la germinación anaerobia de <i>M.</i> <i>circinelloides</i>	64
Figura 10. Efecto de la mutación <i>adh1</i> en la producción de etanol de <i>M.</i> <i>circinelloides</i>	66
Figura 11. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Mus musculus</i>	68
Figura 12. Determinación del tamaño de la espora de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA- <i>adh1</i> ⁺ de <i>M. circinelloides</i>	69
Figura 13. Efecto de la mutación del gen <i>adh1</i> de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	71
Figura 14. Control de carga del material genético de <i>Mus musculus</i> cuantificando el gen β - actina en los distintos tejidos..	74

Figura 15. Determinación mediante qPCR de la invasividad de las distintas cepas de <i>M. circinelloides</i> a tejidos de <i>Mus musculus</i> .	75
Figura 16. Comparación de DNA de <i>tfc-1</i> de cepas con el gen <i>adh1</i> en tejidos de <i>Mus musculus</i> infectados con <i>M. circinelloides</i> .	76
Figura 17. Representación histológica del grado de invasividad de <i>M. circinelloides</i> en tejidos de <i>Mus musculus</i> .	80
Figura 18. Análisis histológico en diversos tejidos de <i>Mus musculus</i> posterior a la infección de <i>M. circinelloides</i> .	81
Figura 19. Análisis histológico en diversos tejidos de <i>Mus musculus</i> posterior a la infección de <i>M. circinelloides</i> .	84
Figura 20. Efecto del sobrenadante de <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>C. elegans</i> .	86
Figura 21. Efecto del tratamiento con pronasa E sobre el efecto de toxicidad del sobrenadante de <i>M. circinelloides</i> en <i>C. elegans</i> .	88
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre el sobrenadante de <i>M. circinelloides</i> en la toxicidad hacia <i>C. elegans</i> .	90
Figura 23. Efecto gen <i>adh1</i> en la producción de acetaldehído.	93
Figura 24. Efecto del acetaldehído en la germinación aerobia en las cepas R7B, M5 y complementada M5/pEUKA- <i>adh1</i> ⁺ de <i>M. circinelloides</i> .	94
Figura 25. Efecto del acetaldehído en la supervivencia de <i>C. elegans</i> .	95
Figura 26. Efecto gen <i>adh1</i> en la producción de ácido acético.	97
Figura 27. Efecto gen <i>adh1</i> en la expresión del gen <i>ald2</i> de <i>M. circinelloides</i> .	99
Figura 28. Efecto del disulfiram con <i>M. circinelloides</i> en la supervivencia de <i>Mus musculus</i> .	101

C. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas relacionadas con la virulencia en hongos.	20
Tabla 2. Organismos utilizados.	40
Tabla 3. Programa de inicio para el HPLC.	44
Tabla 4. Programa de terminación para el HPLC.	45
Tabla 5. Programa de temperatura de horno.....	46
Tabla 6. Programa de temperatura de horno.....	47
Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos y sondas utilizados.	51
Tabla 8. Grupo de ratones utilizados.	57

D. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

λ : Longitud de onda

ADH: Alcohol deshidrogenasa

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosin trifosfato

Cq: Ciclos de amplificación

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

GMS: Metenamina de plata de Grocott

H&E: Hematoxilina - Eosina

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (High-performance liquid chromatography)

IL-1 β : Interleucina 1 - β

IL-6: Interleucina 6

LB: Luria-Bertani medio

MIP-2: Proteína inflamatoria de macrófagos -2 (Macrophage Inflammatory Protein 2)

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

pH: Potencial de hidrógeno

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Rpm: Revoluciones por minuto

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

TNF- α : Factor de necrosis tumoral.

E. PREFIJOS

m: mili (1×10^{-3})

μ : micro (1×10^{-6})

n: nano (1×10^{-9})

F. RESUMEN

Mucor circinelloides es un hongo dimórfico, considerado como patógeno oportunista, cuyo metabolismo y patrón morfológico son influenciados por la tensión de oxígeno y la fuente de carbono en el medio de cultivo. En *M. circinelloides* se ha descrito el gen *adh1*, el cual codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh1), involucrada tanto en la última etapa de la síntesis de etanol (fermentación alcohólica), como con el crecimiento en anaerobiosis. En el principal hongo patógeno dimórfico de humanos *Candida albicans* los cambios morfológicos y la formación de biopelículas son factores importantes para su patogenicidad, los cuales son modulados en parte por la actividad de la ADH1. En base a lo anteriormente mencionado, en el presente proyecto fue de interés determinar si la ausencia del producto del gen *adh1* de *M. circinelloides* contribuye a la virulencia del hongo. Por lo que se propuso comparar el nivel de virulencia de la cepa mutante en el gen *adh1*⁻ (M5), con la cepa silvestre (R7B), y la cepa M5 complementada con el gen silvestre *adh1*⁺ (M5/pEUKA-*adh1*⁺), usando como modelo de estudio ratones *Mus musculus* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Ratones infectados con la misma cantidad de esporas de las distintas cepas mostraron una mayor letalidad al ser inoculados con la cepa mutante M5, generando el 60% de mortalidad a los dos días post-infección, mientras que las cepas R7B y M5/pEUKA-*adh1*⁺ fueron totalmente avirulentas en el tiempo ensayado (10 días); se obtuvo un resultado similar de las distintas cepas de *M. circinelloides* contra *C. elegans*. Como experimentos complementarios, se realizaron incubaciones de *C. elegans* en el sobrenadante obtenido de la germinación aerobia, de las distintas cepas de *M. circinelloides*, observándose que los sobrenadantes de la cepa mutante generaron una mayor toxicidad en el nematodo, en tanto que con el sobrenadante de las cepas silvestre y complementada mostraron una menor toxicidad respecto a la cepa mutante (M5). Esta observación indica que la cepa carente de actividad enzimática Adh1 de *M. circinelloides* produce algún compuesto excretable que es tóxico para *C. elegans*.

La determinación del contenido de acetaldehído excretado por la cepa mutante fue de casi 50 veces más respecto a la cepa silvestre, generando incluso una concentración tóxica para el nematodo (45.19 mM). Lo cual sugiere que parte de la explicación de virulencia de la cepa mutante *adh1* de *M. circinelloides* es a través de una sobreproducción de acetaldehído. Además, esta cepa mutante es capaz de germinar más rápido que la cepa silvestre a dichas concentraciones de acetaldehído (35.7 mM), los niveles de mRNA del gen *ald2* (gen que codifica a la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Ald2), la cual transforma acetaldehído a acetato) en la cepa mutante es aproximadamente 40 veces más respecto a la cepa silvestre, aunado a este hallazgo la cepa mutante generó 8 veces más acetato respecto a la cepa silvestre.

El análisis de invasividad de los tejidos de ratón mostró una mayor capacidad de invasión de la cepa mutante respecto a la cepa silvestre, y de igual manera que en la cepa silvestre la cepa mutante generó micelio como morfología responsable de la invasividad en los distintos tejidos. Asimismo los tejidos mostraron una reacción inflamatoria observada en cortes histológicos, la cual fue confirmada por una mayor transcripción de los genes IL-1 β , IL-6 y MIP2, los cuales fueron más elevados en los tejidos de los animales infectados con la cepa mutante respecto a la cepa silvestre, lo cual pudo haber sido provocado por la excesiva producción de acetaldehído de la cepa mutante, ratones tratados con disulfiram (inhibidor de la Ald2) e infectados con la cepa mutante perecieron en la mitad del tiempo respecto a aquellos infectados únicamente con la cepa mutante, sugiriendo fuertemente que es el acetaldehído el causante del efecto tóxico en *Mus musculus*.

Estas observaciones indican que la alteración del metabolismo del etanol en *M. circinelloides* contribuye al fenómeno de la virulencia del hongo, los datos en conjunto sugieren que la ausencia del gen *adh1* de *M. circinelloides* induce un estado de respuesta inflamatoria en el ratón y quizás muy probablemente es el acetaldehído el responsable de dicha respuesta.

Palabras Clave: (*Mucor circinelloides*, alcohol deshidrogenasa, etanol, virulencia, acetaldehído)

G. ABSTRACT

Mucor circinelloides is a dimorphic fungus capable of being an opportunistic pathogen, its metabolism and morphological patterns depend on oxygen availability and carbon source within the culture medium. The *adh1* gene product in *M. circinelloides* is a alcohol dehydrogenase (Adh1) that is involved in both ethanol biosynthesis (alcoholic fermentation) and anaerobic growth. The most notorious human pathogen among the dimorphic fungi is *Candida albicans*, whose morphological transitions and biofilm production are important factors for pathogenicity, both of these phenomena are partially regulated by ADH1. Thus, this Project was aimed to determine whether the absence of the product of the *adh1* gene contributes to the virulence in this organism. It was proposed to compare the level of virulence between the *adh1*⁻ (M5), the *adh1*⁺ (M5/pEUKA-*adh1*⁺) mutant strains and the wild type strain (R7B) employing mammal (*Mus musculus*) and nematode (*Caenorhabditis elegans*) models of study. Mice were infected with spores from both mutants and wild type strains, the results showed that spores from the M5 strain caused a larger lethality (60% mortality after a two period of infection) compared to the M5/pEUKA-*adh1*⁺ and the R7B strains that had totally avirulent effects after 10 days of infection, similar results were obtained when the nematode model was used. As complementary essays, *C. elegans* was incubated in the supernatant obtained from germination of spores of the three *M. circinelloides* strains employed in this study. Our results indicated that the the M5 supernatant led to increased toxic effects on nematodes compared to the other two strains. This observation suggests that the the strain that lacks the ADH1 enzymatic activity produces some excretable compound which is toxic for *C. elegans*.

Acetaldehyde content in the excreted by the M5 mutant strain was almost 50-fold higher compared to the wild type strain, generating even a toxic concentration (45.19mM) for the nematode. The overproduction of acetaldehyde could be a partial explanation to the increased virulence of the mutant lacking the *adh1* gene. In addition, the M5 strain is capable of geminate at a faster rate compared to the wild

type strain at high acetaldehyde concentration (35.7mM); in the M5 strain the mRNA levels of the *ald2* gene (which encodes the aldehyde dehydrogenase enzyme (Ald2), which converts acetaldehyde to acetate) is approximately 40-fold higher compared to the wild type strain, accordingly to this observation, the mutant strain generated 8-fold higher acetate levels in comparison to the wild type strain.

The invasivity analysis in mice tissues showed a higher ability for the M5 mutant strain to invade compared to the wild type, and both strains developed hyphal growth to colonise distinct tissues. Moreover, tissues showed an inflammatory response observed by histological sections, this was confirmed by analysing the transcript levels of the IL-1 β , IL-6 and MIP2 genes, that showed higher mRNA levels in the M5-infected tissues in comparison to the wild type strain. This could have been the result of the excessive production of acetaldehyde; M5-infected and disulfiram-treated mice (inhibitor of the Ald2 enzyme) had a half life expectancy compared to the M5 strain, this strongly suggests that acetaldehyde is the responsible of the toxic effect on *Mus musculus*.

These observations show that the alteration of ethanol metabolism in *M. circinelloides* could contribute to the virulence in this fungus, these data suggest that the absence of the *adh1* gene in *M. circinelloides* induces an inflammatory response in mice and its possibly due to acetaldehyde overproduction.

Key Words: (*Mucor circinelloides*, alcohol dehydrogenase, ethanol, virulence, acetaldehyde).

I. INTRODUCCION

1.1. Micosis

Las infecciones fúngicas, denominadas micosis, han incrementado su incidencia, en parte debido al uso excesivo de terapias inmunosupresoras, el uso indiscriminado de antibióticos de alto espectro, además del aumento de la utilización de catéteres en pacientes canalizados; los mencionados, son factores favorables para que los hongos invadan y se desarrollen exitosamente en el huésped (**Hospenthal, y Carswell, 2015**). Dependiendo de su ingreso al huésped, existen 4 tipos de micosis: sistémicas, subcutáneas y cutáneas (**Tortora y col., 2007**).

- **Las micosis sistémicas:** se dan por la inhalación de esporas, generalmente estas infecciones afectan varios órganos a la vez, además de ser producidas generalmente por hongos que habitan en el suelo; las más conocidas son las histoplasmosis y la coccidioidomicosis (**Forbes, 2009**).
- **Las micosis subcutáneas:** se desarrollan por una herida en la piel por donde ingresa el hongo, son causadas por hongos habitantes del suelo, de las cuales la esporotricosis es un ejemplo de este tipo de micosis (**Tortora y col., 2007**).
- **Las micosis denominadas superficiales o cutáneas:** son transmitidas entre humanos o de un animal a un humano por contacto directo, por lo regular se transmite por dermatofitos que segregan queratinasa, una enzima que degrada la queratina la cual es una proteína que se encuentra en pelos, piel y uñas. Algunos hongos productores de este tipo de micosis son *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (productoras de candidiasis superficiales) (**Forbes, 2009; Prats, 2006**).

La mayoría de los hongos patógenos producen infecciones de tipo oportunista, es decir se necesita que el huésped posea un sistema inmunosuprimido, son principalmente causadas por hongos del grupo taxonómico Ascomycetos, que

incluye especies de *Aspergillus* y *Candida*, Zygomycetos, que incluye especies de *Mucor*, y Basidiomicetos, entre los que se encuentra *Cryptococcus*. Estos organismos no se consideran causantes de infecciones fúngicas en seres humanos; sin embargo, las infecciones que producen afectan principalmente a pacientes con algún tipo de deficiencia en su sistema inmune, como ser recientemente transplantado, alguna enfermedad subyacente como una diabetes mellitus o estar bajo terapia inmunosupresora (**Forbes, 2009; Tortora y col., 2007**).

1.1.1. Factores de virulencia en hongos

La patogenicidad es definida como la capacidad de un microorganismo de causar daño en un huésped, mientras que la virulencia es el grado de patogenicidad causado por un organismo. Asimismo, un determinante de patogenicidad es un factor de virulencia, el cual está definido como un componente microbiano que causa daño al huésped (**Casadevall y Pirofski, 1999**).

Existen diversos hongos causantes de enfermedades en humanos, sin embargo, se conocen pocos factores de virulencia que intervienen en la patogénesis de hongos. Algunos de los factores descritos son:

- **Termotolerancia:** es la capacidad que tienen ciertos hongos patógenos de vivir y replicarse a 37°C, por ejemplo, mutantes de *Cryptococcus neoformans* incapaces de crecer a 37°C muestra una menor virulencia respecto a la cepa silvestre termotolerante (**Kwong-Chung y col., 1982; de Gontijo y col., 2014**), además se ha demostrado en cepas de origen clínico de *Sporothrix schenckii* aisladas de lesiones cutáneas, estas no son capaces de crecer eficientemente a 37°C, dichas cepas son incapaces de invadir órganos internos de ratones; mientras que cepas aisladas de nódulos linfáticos crecen muy bien a 37°C y son capaces de invadir de forma sistémica órganos internos de ratones (**Kwon-Chung, 1979; Hogan y col., 1996**); *Aspergillus fumigatus* es otro ejemplo de termotolerancia en donde incluso se han descrito a nivel molecular

ciertas chaperonas que regulan dicho proceso (**Bhabhra y Askew, 2005**). Cabe destacar que no todos los hongos pueden vivir a estas temperaturas.

- **Dimorfismo:** es la capacidad de algunos hongos de presentar dualidad fenotípica, el cual es un proceso de diferenciación celular, que es debido a los cambios ambientales como humedad, pH, temperatura, nutrientes, disponibilidad de oxígeno, entre otros factores; con este proceso se modifica tanto su fisiología y morfología para adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento. En el caso de patógenos de humano este proceso permite evadir la respuesta inmunológica del huésped. Por ejemplo, *Candida albicans* tiene la capacidad de desarrollarse como levadura en las mucosas de humano; sin embargo, al formar micelio, se infiltra en tejidos internos, causando infección invasiva altamente mortal (**Yamada-Okabe y col., 1999**); asimismo, los filamentos de este hongo facilitan la adhesión a las células del huésped, la penetración tisular a la vez que dificultan la fagocitosis, las hifas son más difíciles de fagocitar que las levaduras y permiten el escape del interior de la célula fagocítica al romper la membrana citoplasmática del fagocito (**Casadevall, 2007**), cabe hacer mención que mutantes de *C. albicans* incapaces de hacer esta transición de levadura a micelio son menos virulentas. La conversión a levadura en el caso del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, es necesaria para causar daño a neutrófilos, monocitos y macrófagos, así como para crecer y colonizar pulmones de ratones, esto debido a que las infecciones fúngicas dependen de la anulación de los mecanismos del sistema inmune del huésped que detectan componentes conservados de la pared celular de la levadura, como los β -glucanos, los cuales son reconocidos por los receptores dectina-1 sobre huéspedes sin fagocitar. Esta dectina-1 es intermediario de la respuesta inflamatoria hacia el hongo y facilita la virulencia (**Klein y Tebbets, 2007**).

- **Producción de enzimas:** algunas enzimas, están implicadas en el proceso intrínseco de alimentación del propio hongo (múltiples hidrolasas), facilitando la multiplicación del microorganismo en el huésped. Estas hidrolasas favorecen la diseminación por los tejidos del huésped; dentro de estas enzimas se encuentran las fosfolipasas, como es el caso de *C. albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* y *Cryptococcus neoformans* (Ghannoum, 2000). Asimismo, en *C. neoformans* existe un gran número de enzimas relacionadas con la virulencia (Tabla 1), las cuales son importantes para el diseño de fármacos específicos como blanco molecular (Almeida y col., 2015). Además de que estas enzimas son requeridas para muchos procesos biológicos incluyendo el propio crecimiento del hongo e infección. La importancia en la patogénesis de diversos hongos son las enzimas secretadas o contenidas en el cuerpo de la célula de las diferentes cepas que influyen en la virulencia. Por ejemplo, la producción de enzimas lacasas en la síntesis de melanina, que es conocida como el escudo de los hongos por su capacidad de proteger al microorganismo contra un amplio rango de agentes tóxicos, tanto ambientales como producto de la respuesta inmune del huésped durante la infección; considerándose como factor de virulencia en múltiples microorganismos, es decir, mutantes en la síntesis de melanina son menos virulentas respecto a aquellas que sí sintetizan esta molécula (Polak, 1990). Asimismo, la mayoría de hongos patógenos de humanos son organismos ambientales y pueden incluir hongos que poseen pigmentos melánicos en su pared celular que incrementan su importancia clínica. Los hongos productores de melanina inhiben la fagocitosis de los macrófagos e incluso interfieren con la producción de citoquinas. Ejemplo de esto son hongos patógenos como *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus spp.*, *Paracoccidioides brasiliensis*,

Blastomyces dermatitidis, *Candida albicans*, entre otros (**Casadevall y col., 2000**).

Los hongos pueden sintetizar la melanina de dos maneras diferentes. Unos utilizan un sustrato endógeno como la acetil-CoA y que usan el 1,8-dihidronaftaleno como intermediario, como *Aspergillus* o *Penicillium*, al parecer los gránulos se biosintetizan en unas vesículas intracelulares análogas a los melanosomas de los mamíferos y de ahí son transportados a la pared celular (**Gómez y Nosanchuk, 2003**). Una vez en el exterior, los gránulos de melanina se localizan en la pared celular, donde se entrecruzan covalentemente con los polisacáridos de dicha envoltura; otros gránulos son dependientes de una fuente exógena de tirosina o de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa), refiriéndose de este modo a la síntesis extracelular. La levadura de *Cryptococcus neoformans* produce unas vesículas conteniendo la enzima lacasa que es secretada en la pared celular (**Fig. 1**), donde la enzima utiliza la L-dopa como sustrato para producir melanina (**Almeida y col., 2015**).

Tabla 1. Enzimas relacionadas con la virulencia en hongos.

Enzima	Descripción	Referencia
Fosfatasa ácida	Involucrada en la adhesión celular fúngica hacia tejidos del huésped, localizada en lisosomas y relacionadas a la virulencia de <i>Galleria mellonella</i> .	Lev y col., 2014.
Dnasa	Actúa en la degradación de DNA del huésped y relacionada a la virulencia de modelos en ratón y <i>Galleria mellonella</i> .	Cazin y col., 1969.
Glucosilceramida sintasa	Involucrada en la síntesis de glucosilceramida, localizada en la pared celular y relacionada en la virulencia en modelos murinos.	Del Poeta y col., 2014; Rittershaus y col., 2006.
Lacasa	Polifenol oxidasa y enzima oxidasa de cobre, localizada en la pared celular. Cepas deficientes mostraron disminución en estudios de supervivencia con ratones y conejos.	Salas y col., 1996.
Manosiltransferasa	Participa en la O-manosilación de proteínas, involucrada en la integridad de la pared celular y morfogénesis. Requerida para la infección de ratones.	Olson y col., 2007.
Metaloproteasa	Cataliza reacciones por mecanismos que involucran un metal. Cepas deficientes de esta enzima son incapaces de cruzar el endotelio en modelo de barrera <i>in vitro</i> de sangre-cerebro humano y es requerido para la invasión del sistema nervioso central por lo que es importante para la virulencia.	Vu y col., 2014.
Fosfolipasa B	Degrada a componentes de la membrana celular, además de ser requerida para la adhesión del hongo al huésped, localizada en la pared celular. Requerida en invasión de tejidos del huésped y diseminación en modelos murinos.	Santangelo y col., 2004.
Fosfolipasa C	Degrada componentes de la membrana celular, requerida para adhesión del hongo en la célula huésped. Además de ser importante para varios fenotipos de virulencia.	Chayakulkeeree y col., 2008; Lev y col., 2013.
Ureasa	Cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amonio; relacionada con virulencia porque cepas deficientes de esta enzima pierden virulencia comparada con la cepa tipo silvestre, en infecciones de ratón. También, está involucrada en el escape del pulmón para cruzar la barrera hemato-encefálica.	Olszewski y col., 2004.
Xilosilfosfotransferasa	Participa en la O-glicosilación, así como está relacionada con la virulencia, ya que cepas deficientes manifiestan crecimiento reducido en tejidos de pulmón en el ratón como modelo de infección.	Klutts y Doering, 2008.

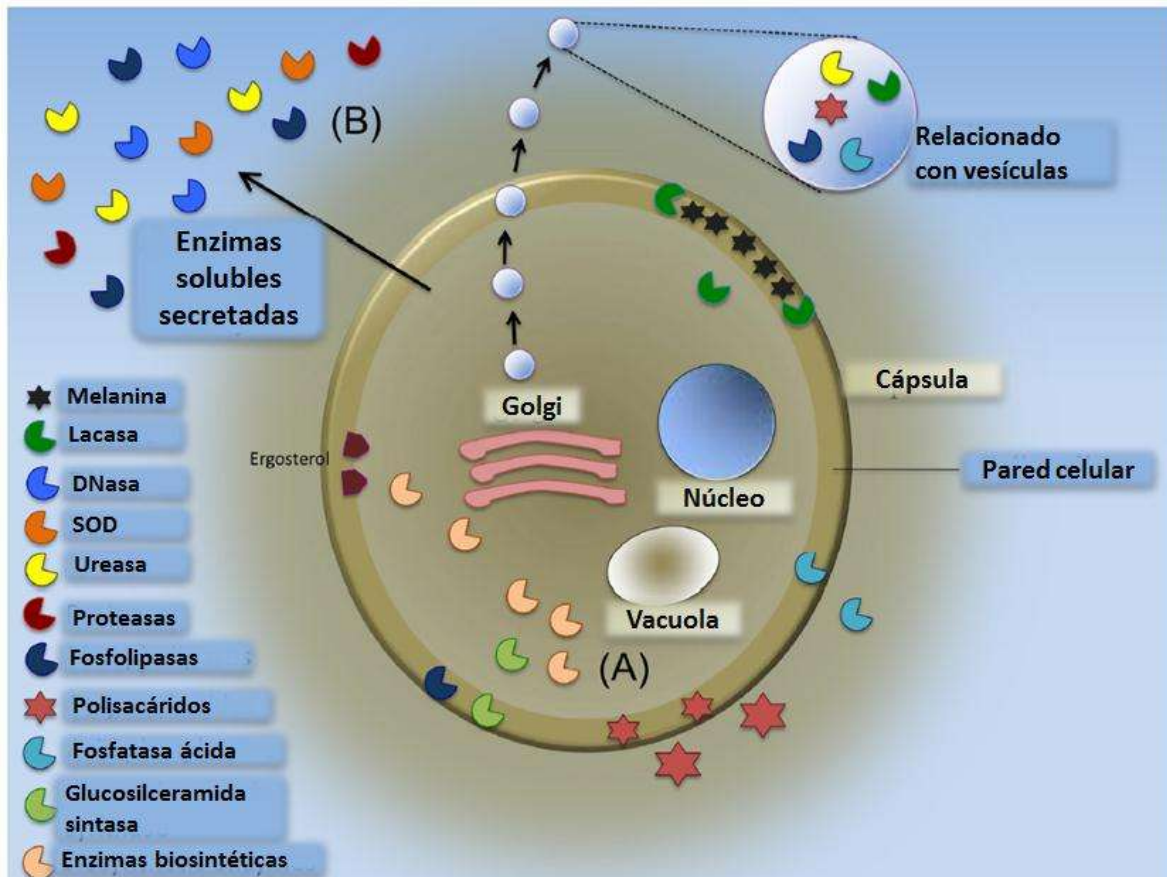


Figura 1. Enzimas cruciales para la patogénesis fúngica. (A) Algunas enzimas relacionadas a la patogénesis pueden estar activas dentro del cuerpo celular y otras pueden ser secretadas, otras como la lacasa, pueden estar en ambos sitios. **(B)** Algunas enzimas pueden ser secretadas por sistemas tradicionales de secreción, mientras que otras se secretan por vesículas. **(Tomada de Almeida y col., 2015).**

- **Producción de toxinas:** las aflatoxinas, ocratoxina A, fumagilina, restrictocina y gliotoxina son producidas por el género *Aspergillus spp.*. Las aflatoxinas son micotoxinas que están involucradas en la generación de cáncer de hígado a través de alimentos contaminados, los cuales al ser consumidos pasan por el tracto gastrointestinal donde las aflatoxinas son absorbidas por su alta liposolubilidad, transformadas en el hígado por enzimas microsomales del tipo citocromo P450 formando una aflatoxina AFB1-8,9-epóxida, la cual forma un compuesto estable con el N7 de residuos de guanina del DNA causando mutaciones del gen p53 supresor de tumores (**Ramana y col., 2013**); en cambio, las gliotoxinas de *Aspergillus* están involucradas en evadir la defensa del huésped, tal como la inhibición de la activación del fagocito, que es clave para el huésped, así como la inhibición de fagocitosis por macrófagos, además de la supresión funcional de la respuesta de las células T. Aislados de *A. fumigatus* producen una mayor cantidad de gliotoxinas comparados con otras especies. La aspergilosis invasiva causa destrucción al tejido por invasión vascular y como consecuencia resulta en necrosis; asimismo, esta gliotoxina tiene la función *in vivo* de inducir apoptosis a la célula huésped (**Dagenais y Keller, 2009**). Finalmente, *Aspergillus* produce una ribonucleotoxina que inhibe la síntesis proteica de la célula del huésped degradando RNAm, denominada restrictocina, la cual produce muerte celular del huésped suprimiendo neutrófilos (**Ikegami y col., 1998**).
- **Adhesión:** la adherencia de los microorganismos al tejido huésped es un prerequisite para la invasión a los tejidos y la correspondiente infección. Las adhesinas en la pared celular de los hongos involucradas en la adherencia hacia el tejido del

huésped o en dispositivos médicos son críticos para la colonización para la invasión y daño de tejido al huésped **(de Groot, y col., 2013)**. Existen diversos tipos de familias de proteínas denominadas adhesinas. Por ejemplo, la familia Als, que codifican glucoproteínas grandes de la superficie celular, se unen con receptores como fibrinógeno, o la fibrina del huésped, además permite colonizar catéteres por interacciones fisicoquímicas (interacciones hidrofóbicas o por fuerzas de Van der Waals). Estas adhesinas están presentes en *C. albicans*, las cuales son capaces de formar biopelículas, y han sido descritas como un factor de adherencia microbiana para superficies bióticas o abióticas formando matrices de polímeros, que sirven como sustrato para que el microorganismo crezca y evitan la fagocitosis generando una mayor virulencia en el huésped **(Hogan y col., 1996)**. Asimismo, existen las proteínas de la familia Epa en *C. glabrata* de las cuales las más estudiadas han sido Epa1, Epa6 y Epa7. Estas tres proteínas son intermediarios en la adherencia hacia las células epiteliales y endoteliales humanas **(De Groot y col., 2013)**.

Además, los factores de virulencia son de gran interés para la patogénesis microbiana porque estos son, a menudo, el blanco farmacológico para interferir con su función biológica o incluso poder generar una respuesta inmune del huésped contra dichos factores mediante la generación de vacunas, lo que muy frecuentemente puede neutralizar la acción de estos factores de virulencia.

1.1.2. Mucormicosis

Durante los últimos 20 años, la incidencia de micosis oportunistas han incrementado con rangos de mortalidad elevados en ausencia de terapia antifúngica (>90%) **(Petrikos y col., 2012)**. Dentro de las micosis oportunistas, la mucormicosis es una infección fúngica, muy poco común, que es causada por

hongos pertenecientes al subphylum Mucormycotina del orden Mucorales (**Hibbett y col., 2007**), los géneros principalmente asociados a este tipo de infecciones son *Rhizopus*, *Lichtheimia* y *Mucor* (**Petrikkos y col., 2012**). La mucormicosis ocupa el segundo lugar en frecuencia de infección en pacientes transplantados, además de que su tasa de mortalidad sin administración de un tratamiento adecuado es del 90%, aun suministrando una terapia antifúngica y asistencia médica esta tasa de mortalidad alcanza hasta un 60% (**Chayakulkeeree y col., 2006**). La mucormicosis se adquiere principalmente por inhalación de esporas, las que colonizan los senos paranasales y la nasofaringe; además, se puede adquirir ocasionalmente por ingestión inadvertida o inoculación cutánea de esporas, aún no se ha documentado la transmisión de persona a persona (**Kwon-Chung, 2012**).

Las manifestaciones clínicas de la mucormicosis dependen del sitio de infección: pulmonar, rinocerebral, cutánea, gastrointestinal, y la muy poco frecuente, diseminada.

- **Pulmonar:** se produce por inhalación de esporas del medio ambiente, donde el hongo llega a colonizar inicialmente las cavidades paranasales en forma silenciosa, y luego desciende hacia el tracto respiratorio inferior, dañando las paredes bronquiales, provocando trombosis e infarto pulmonar, culminando en necrosis e invasión del tejido cardiovascular (**Ibrahim y col., 2012**).
- **Rinocerebral:** esta puede ocurrir en conjunto a la mucormicosis pulmonar, sin embargo, la infección rinocerebral se caracteriza por afectar intensamente una parte de la cara, los mucorales se adhieren e invaden los vasos sanguíneos del rostro, generalmente, necrosando el tejido adyacente (**Petrikkos y col., 2012**).
- **Cutánea:** los agentes causantes de la mucormicosis son incapaces de penetrar la piel sana (**Spellberg y col., 2005**), sin embargo, cuando ya existe una lesión subcutánea el hongo puede crecer en forma de micelio provocando una respuesta inflamatoria aguda con pus, formar abscesos e incluso necrosar el tejido (**Ribes y col., 2000**).

- **Gastrointestinal:** el hongo suele invadir el tubo del tracto digestivo, y a partir de ahí se puede diseminar a otros órganos de la cavidad abdominal, ocasionando septicemia, provocando de esta manera la muerte, aunque es un tipo de infección muy rara, está asociada mayormente a pacientes inmunocomprometidos (**Spellberg y col., 2005**).
- **Diseminada:** la cual, a partir de cualquier sitio primario de infección, es decir, la diseminación puede surgir por ejemplo, a partir del tracto gastrointestinal, en lesiones cutáneas, en los senos paranasales, entre otras, esta diseminación generará lesiones metastásicas las cuales también se pueden encontrar en el bazo, corazón, la piel y otros órganos internos (**Spellberg y col., 2005**), se ha encontrado que el sitio más común de diseminación es el cerebro (**Antachopoulos y col., 2015**).

La presencia de especies de Mucorales en muestras clínicas es cada vez más frecuente, de hecho, el género más comúnmente asociado con estas infecciones fúngicas, es *Rhizopus*; sin embargo, existen otros géneros, no menos importantes asociados como *Lichtemia* y *Mucor*. Este último género, ha incrementado su incidencia en los últimos años, ya que se conocía muy poco como un agente etiológico de Mucormicosis (**Ibrahim y col., 2012**).

1.2. Género *Mucor*

El género *Mucor* pertenece a la familia Mucoraceae, del orden de los Mucorales, además de encontrarse en el Phylum Zygomycota donde ha sido considerado como un linaje basal (inicial) del reino Fungi, debido a la carencia de estructuras fructíferas complejas y la mayoría de sus representantes tienen hifas cenocíticas (no septadas) durante todo su ciclo de vida (**White y col., 2006**). Aunque se ha propuesto eliminar Zygomycota y ser distribuidos en un subphylum Mucormycotina, entre el phylum Glomeromycota y 4 subphylum más (**Kwon-Chung, 2012**). Esto debido a que se ha demostrado que los subphylum Mucormycotina y Entomophthomycotina que formaban parte del phylum Zygomycotas son polifileticos, mientras que Mucormycotina y Entomophthomycotina son claramente separados en dos clados. Kwon-Chung propone de acuerdo a

diversos estudios filogenéticos una nueva clasificación taxonómica de Zygomycota, sin embargo, aún no está completamente aceptada esta clasificación **(Kwon-Chung, 2012)**

La mayoría de las especies del Phylum Zygomycota, son saprófitos, aunque algunas especies son patógenos facultativos en plantas, animales (incluyendo los seres humanos) o incluso en otros hongos **(White y col., 2006)**. El Phylum Zygomycota está dividido en dos clases: Zygomycetes y Trichomycetes; y a su vez existen nueve órdenes en este Phylum: Asellariales, Dimargariales, Endogonales, Entomophthorales, Harperalles, Kickxellales, Mortieralles, Mucorales y Zoopagales **(White y col., 2006)**.

Anteriormente, el término zygomycetes fue nombrado en función de las esporas sexuales, que son producidas, denominadas zigosporas, las cuales tienen dos tipos de sexos, generando hifas compatibles que al juntarse forman un cigoto **(Ni y col., 2011)**. Asimismo, las zigosporas tienen un período de latencia (meses a años) antes de germinar para producir meiosporas. Las zigosporas en un medio sólido germinan para formar hifas aéreas con un esporangio en el ápice **(Fig. 2)**, que es morfológicamente similar a los esporangios asexuales, donde se albergan las meiosporas, las cuales son las esporas haploides producidas en la meiosis. Las meiosporas o esporas, tienen capacidad de resistencia que les permite sobrevivir en condiciones adversas, como ciclos de luz u oscuridad, altas temperaturas, o incluso condiciones de escasez de nutrientes **(Lee y Heitman, 2014)**.

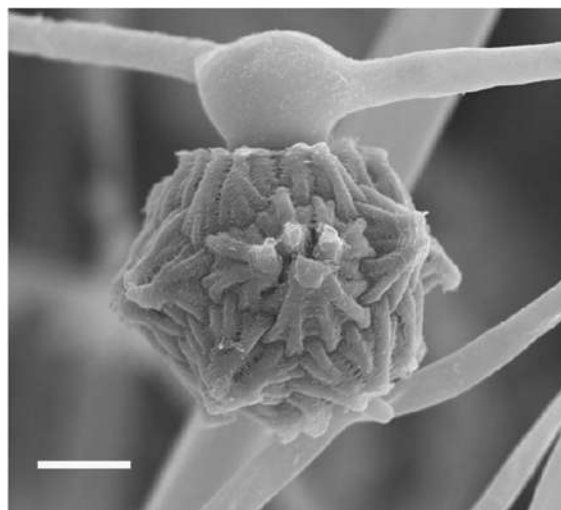


Figura 2. Microscopia electrónica de barrido de una zigospora de *Mucor circinelloides*. Esta zigospora fue formada cuando se co-inocularon en YPD dos cepas con diferentes sexos, NRRL 3631(+) y CBS 277.49 (-), por 2 semanas en oscuridad. Barra de escala= 10 μ m. **(Tomado de Lee y Heitman, 2014).**

Asimismo, algunas especies del género *Mucor* llevan a cabo un proceso diferenciativo conocido como dimorfismo, en el cual dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales, las esporas germinan para producir células esféricas gemantes (fase de levadura) o hifas alargadas que se ramifican **(Bartinicki-García y Nickerson, 1962b; Orlowski, 1991)**. La presencia de hexosas y la atmósfera de cultivo son principales factores nutricionales y ambientales que afectan el dimorfismo en *Mucor*. En general, la incubación en condiciones anaeróbicas en presencia de hexosas fermentables causa un crecimiento levaduriforme, mientras que la presencia de oxígeno provoca el desarrollo de micelio, tanto en fuentes de carbono fermentables, como no fermentables. En una atmósfera de N₂, la morfología levaduriforme es influenciada por la concentración de glucosa; es decir, a baja concentración de glucosa el hongo crece en forma micelial mientras que en alta concentración de glucosa lo hace como levadura **(Bartnicki-García y Nickerson, 1962a)**. También, existen factores que favorecen el crecimiento levaduriforme aun en presencia de oxígeno, como es la presencia en el medio de cultivo de 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPC), alcohol fenético y algunos aminoácidos, siempre y cuando una hexosa fermentable está presente **(Orlowsky, 1991)**.

1.2.1. *Mucor circinelloides*

El hongo *Mucor circinelloides* es un mucoral dimórfico que crece como levadura en condiciones anaeróbicas y como hongo filamentoso en condiciones aeróbicas **(Lübbehüsen y col., 2003)**. Es un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos **(Brown, 2005; Chayakulleerey y col., 2006)**, y se le ha asociado también a la contaminación de frutos como el noni **(Nishijima y col., 2011)**; además recientemente se le considera como una posible fuente de ácidos grasos para la obtención de fuentes de energía renovables como el biodiesel **(Xia y col., 2011)**. Su metabolismo fermentativo ha sido investigado para la producción de etanol, evaluando el rendimiento de esta producción modificando condiciones de crecimiento **(Wikandari y col., 2012)**. Además, *M. circinelloides* ha sido estudiado como huésped heterólogo para la producción de enzimas de interés

industrial, se ha estudiado el efecto del dimorfismo en el proceso de producción y actividad enzimática, como es el caso de la glucosa oxidasa. Por ejemplo, se ha reportado una mayor producción de glucosa oxidasa durante la morfología levaduriforme, este concepto de la manipulación de la morfología de *M. circinelloides* podría tener implicaciones en aspectos biotecnológicos **(Bredenkamp y col., 2010)**.

Además, es un hongo heterotálico que se propaga a través de ciclos de vida asexual y sexual. En el ciclo de vida asexual, las esporas (esporangiosporas) en condiciones aeróbicas germinan sobre un sustrato sólido, crecen en forma de hifas, formando micelio, que a su vez, generan hifas aéreas en cuyos ápices se forman los esporangios, en dichos esporangios se almacenan las esporas asexuales (esporangiosporas).

En el ciclo de vida sexual, las hifas de dos tipos sexuales se reconocen mutuamente para fusionarse y formar zigosporas, las cuales se producen por meiosis. Estas zigosporas más tarde, envían una hifa para producir un esporangio que contiene meiosporas en el ápice. El desarrollo sexual está mediado por la feromona, denominada ácido trispórico, que es un compuesto C-18 terpenoide que se activa a través de la síntesis del β -caroteno, y como consecuencia, el ácido trisporico fomenta la comunicación y la diferenciación sexual entre los Zygomycetes **(Heitman y col., 2007; Wetzel y col., 2012)**.

Adicionalmente, *M. circinelloides* presenta otros eventos diferenciativos, como la síntesis de carotenos, inducida por la presencia de luz **(Nicolás y col., 2008)**, donde se generan colonias con tonalidad amarillenta, sin embargo las colonias crecidas en obscuridad son albinas. Además, el desarrollo de las estructuras reproductivas y la esporulación, se ven también acelerados por la presencia de luz.

En resumen, un metabolismo de tipo oxidativo favorece un desarrollo micelial, mientras que uno fermentativo induce un desarrollo levaduriforme, por lo que elementos clave que regulen este metabolismo son de interés en este hongo.

1.3. Alcohol Deshidrogenasas.

Las ADHs son oxidoreductasas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes hacia aldehídos o cetonas, con la concomitante reducción de NAD^+ o NADP^+ ; estas participan en la fase fermentativa de la glucólisis (**Fig. 3**). Las ADHs son un grupo grande de enzimas en base a que se subdividen dentro de tres distintas familias de enzimas de acuerdo a su estructura y activación: el grupo I de cadena mediana, grupo II de cadena corta reductasa/deshidrogenasas y el grupo III activadas por hierro (**Reid y Fewson, 1994; Oppermann y col., 2003**). La superfamilia de cadena mediana es dividida en diferentes familias dependiendo del aceptor de electrones que utilicen para el catabolismo de las mismas (**Kallberg y col., 2002**). Muchas de estas enzimas de cadena mediana (350 a.a., aproximadamente), contienen dos dominios en cada subunidad, una catalítica y una responsable de la unión con el nucleótido NAD^+ o NADP^+ . Además, algunas de estas enzimas contienen zinc en su sitio activo (**Persson y col., 1993**).

El grupo I de las ADHs se encuentra representado por la alcohol deshidrogenasa de caballo (HLADH) y la alcohol deshidrogenasa I de *Saccharomyces cerevisiae* (SADHI). En este grupo, las ADHs pueden oxidar un amplio rango de alcoholes primarios, pero el incremento del tamaño del sustrato disminuye su actividad. El mecanismo de oxidación del etanol comienza con la unión de NAD^+ seguido por la oxidación de etanol a acetaldehído y después el NADH es liberado; la unión del NAD^+ al sustrato se encuentra directamente relacionada con el pH en un rango óptimo entre 6 y 10. El motivo de unión al sustrato en la ADH ha sido descrito como GXGXXG y se encuentra ampliamente conservado en otras ADHs pertenecientes a este subgrupo. La presencia del átomo de zinc en esta reacción es esencial para la estabilización y orientación del alcohol durante la oxidación. El motivo de unión a zinc se encuentra conservado en las ADHs de este grupo y se ha descrito como GHEXXGXXXXXGXXV (**Reid y Fewson, 1994**).

El grupo II de las ADHs se encuentra representado por la alcohol deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*; sin embargo no todas las enzimas de este grupo han sido identificadas como alcohol deshidrogenasas, ya que

incluye una gran variedad de miembros como acetil-CoA deshidrogenasa, ceto-acetil reductasas y poliol azúcar reductasas. Sin embargo a pesar de su variabilidad estas enzimas presentan regiones conservadas con las ADHs del grupo I, como el sitio de unión a NAD^+ . En este grupo, la oxidación del alcohol requiere primeramente la unión del cofactor y la unión del sustrato requiere la ionización del complejo enzima-coenzima, paso esencial requerido para la formación del complejo ternario alcohol-enzima- NAD^+ y así finalizar la reacción (Reid y Fewson, 1994).

El grupo III de las ADHs se encuentran representados por la alcohol deshidrogenasa II de la bacteria *Zymomonas mobilis* (ZMADHII). En este grupo las enzimas presentan una gran variedad de especificidad hacia el sustrato, como etanol, propanol y glicerol. Requieren de hierro para poder estar activas. En base a la comparación de secuencias, se han identificado otros genes homólogos al gen *ADHII* de *Z. mobilis* en otras especies, incluyendo *S. cerevisiae*, éste contiene un gen codificante *ADH4*, para una ADH homóloga a la ZMADHII de *Z. mobilis* (Drewke y Ciriacy, 1988).

El conocimiento del metabolismo de los carbohidratos de las células eucariotas se deriva principalmente de los estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae*, el cual es el modelo de estudio para comprender el metabolismo de hongos. *S. cerevisiae* se ha usado ampliamente para fines industriales debido a su capacidad fermentativa. Un tema universal en el metabolismo de hidratos de carbono de la levadura es la conversión de los azúcares de 5 ó 6 carbonos ya sea a glucosa - 6 - fosfato (G-6-P) o fructosa – 6 - fosfato (F-6-P), que luego es convertido en piruvato en la glucólisis (Barnett, 2003; Flores y col., 2000). El destino del piruvato varía dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y el tipo de levadura.

Las células eucariotas normalmente prefieren la respiración para producir energía cuando el oxígeno está presente (normoxia). En la respiración, la acetil-CoA producida a partir de piruvato es utilizada por el ciclo TCA, donde se oxida a dióxido de carbono (CO_2). Tanto el NADH y el FADH_2 se forman durante el

proceso reductor y la energía se produce en forma de trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidativa, donde los dos transportadores de electrones (NADH y FADH₂) se vuelven a oxidar. En una baja tensión de oxígeno (hipoxia), las células eucariotas producen energía a través de la fermentación. En levaduras, el piruvato se transforma en etanol en el proceso reductor a lo largo de la vía fermentativa. La respiración es preferida, ya que por cada molécula de glucosa se produce más NAD⁺ y ATP durante la fosforilación oxidativa que en la fermentación **(Nieminen y col., 2014)**.

S. cerevisiae es una levadura que prefiere la fermentación para la producción de energía y reprime la respiración cuando están disponibles concentraciones relativamente altas de hidratos de carbono aun en presencia de oxígeno, provocando el proceso biológico denominado fermentación alcohólica. Por el contrario, *C. albicans* y otras levaduras no convencionales, oxidan piruvato a CO₂ para producir energía en condiciones aeróbicas a través del ciclo de Krebs, y la fermentación sólo se utiliza en condiciones de hipoxia. Para subrayar aún más estas diferencias, existen mecanismos post-transcripcionales muy distintos con respecto a la asimilación de carbono en *C. albicans* y *S. cerevisiae* **(Sandai y col., 2012)**.

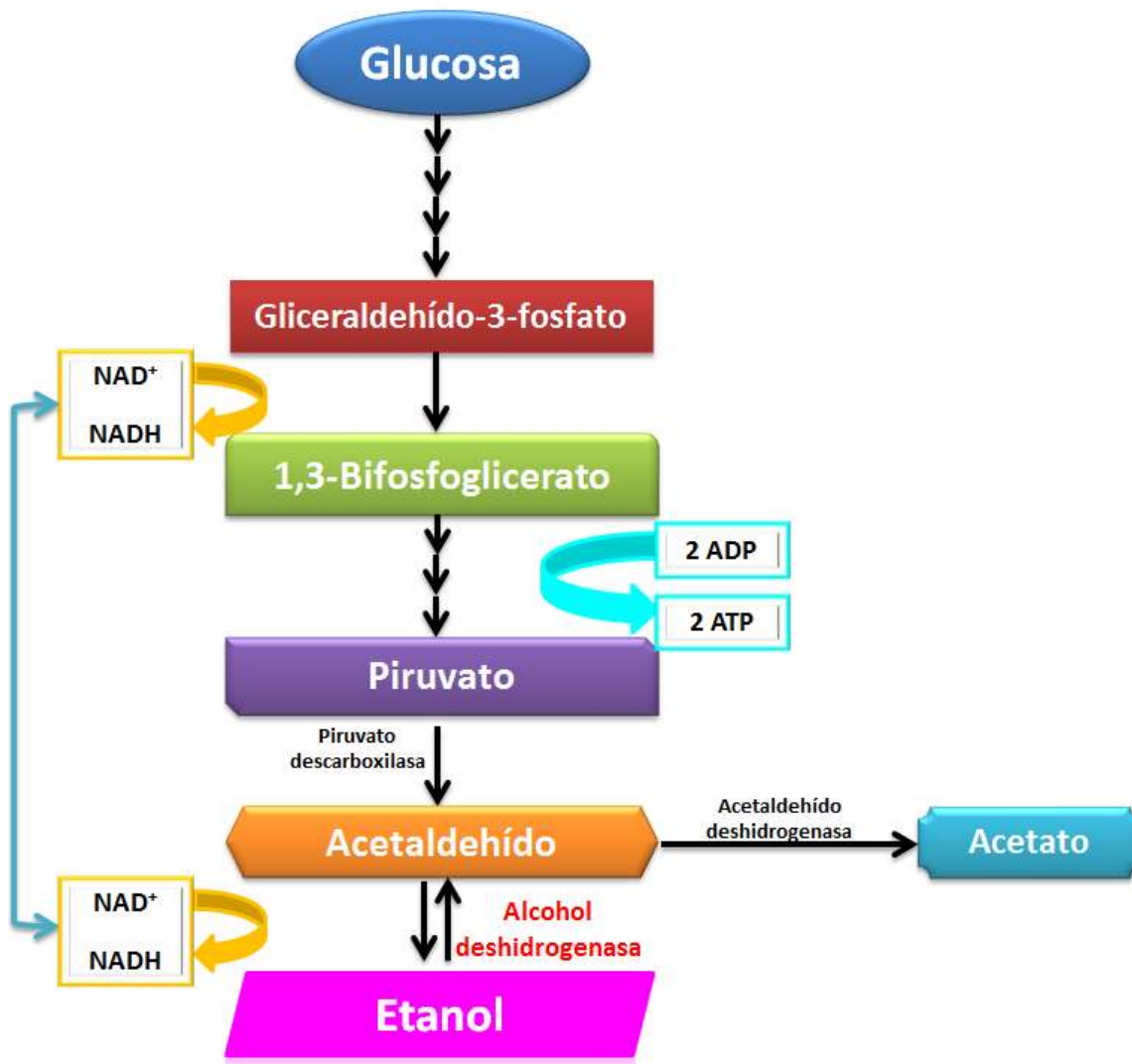


Figura 3. Metabolismo fermentativo de los hidratos de carbono. En la fermentación por levaduras y bacterias anaerobias catalizada por la ADH, se da una reacción reductiva, produciendo etanol y oxidando el NAD^+ . Asimismo, se da una regeneración del NAD^+ , esencial para la producción de energía, y así el ciclo metabólico continúa, produciendo de este modo aldehídos o cetonas para la oxidación de alcoholes por medio de la ADH reduciendo el cofactor NADH . Cuando se lleva a cabo la reacción oxidativa de la ADH, esta enzima se ve involucrada en la utilización de alcoholes como fuente de carbono y energía para su crecimiento. **Tomada de Reid y Fewson, 1994.**

1.4. Participación de la ADH en la virulencia de hongos.

En diversos hongos se ha demostrado que la actividad de la *adh1* está involucrada tanto en patogénesis de plantas, insectos y mamíferos. Ejemplo de esto lo constituye *Fusarium oxysporum*, el cual es un patógeno del suelo que causa pérdidas significativas en la agricultura y ha sido reportado como un patógeno oportunista en humanos (Ortoneda y col., 2004; Nucci y Anaissie, 2007). Además, este hongo tiene la capacidad de producir etanol por dos vías simultáneamente: sacarificación (hidrólisis enzimática) y fermentación (SSF) de celulosa (Takaya, 2009), asimismo puede incrementar la producción de etanol en condiciones anaeróbicas (Panagiotou y col., 2005). Este metabolismo de hidratos de carbono es la estrategia de *F. oxysporum* para colonizar la planta de tomate (Jonkers y col., 2009), en donde parte de su regulación es dada por la enzima alcohol deshidrogenasa. Se ha demostrado que la enzima Adh1 de *F. oxysporum* tiene una función dual en este fitopatógeno, es decir, puede actuar como enzima oxidativa en presencia de etanol donde asimila el etanol por la ruta del glioxilato; o fermentativa en medio de cultivo con glucosa e hipoxia formando etanol (Corrales-Escobosa y col., 2011). De este organismo se obtuvieron mutantes espontáneas deficientes de función *adh1*, se realizaron ensayos de virulencia en raíces de plantas de tomate, determinándose que aunque el producto del gen *adh1* no es factor esencial para la patogénesis, este sí contribuye a la virulencia completa de *F. oxysporum* en plantas de tomate (Corrales-Escobosa y col., 2011).

Otro ejemplo lo constituye el hongo entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae*, el cual ha sido utilizado como control biológico para la regulación de poblaciones de plagas de insectos y malezas (Huffaker, 1976). *M. anisopliae* invade directamente la superficie del insecto donde germina en condiciones aeróbicas usando metabolismo oxidativo. Durante el proceso de infección, se generan condiciones de concentraciones bajas de oxígeno, conduciendo a un metabolismo fermentativo por la producción del acetaldehído, y del NADH⁺, el cual actúa como agente reductor, produciendo finalmente etanol y CO₂ vía alcohol deshidrogenasa.

Durante la producción de energía y el crecimiento del microorganismo en condiciones anaeróbicas, hay regeneración de NAD^+ por la ADH (**Zeeman y col., 2000**). Para entender la participación del producto del gen *adh1* durante los procesos de invasión de *M. anisopliae*, se realizaron ensayos de infección en larvas de *Plutella xylostella*, demostrando que cuando el hongo crece en condiciones fermentativas hay un aumento en la expresión de su transcrito y durante el proceso de invasión. Por lo tanto, la regulación del gen *Adh1* de *M. anisopliae* depende del tipo de incubación (metabolismo fermentativo u oxidativo) a nivel transcripcional, además de expresarse en eventos tempranos de la infección e invasión, siendo un gen importante para la invasión de *M. anisopliae* en su huésped (**Callejas-Negrete y col., 2014**).

Por otra parte, *A. fumigatus* constituye un ejemplo de una estrategia distinta; este organismo es responsable del mayor porcentaje de casos clínicos en pacientes inmunocomprometidos e inmunosuprimidos, ocasionando aspergilosis pulmonar invasiva (IPA, por sus siglas en inglés) (**Latge, 1999; Baddley y col., 2010**). *A. fumigatus* es un hongo saprófito, que tiene la habilidad de adaptarse a niveles distintos de oxígeno, ya que puede tolerar niveles de hipoxia (0.1% de oxígeno) (**Park y col., 2012; Hall y Denning, 1994**). Asimismo, la enzima alcohol deshidrogenasa, *AlcC* de *A. fumigatus* es requerida para producir etanol durante condiciones fermentativas, la cual tiene influencia en la modulación de la patogénesis durante la IPA. Sin embargo, el transcrito del gen *alcC* incrementa significativamente en tejidos de ratones con ambientes de hipoxia. Determinando de esta manera, que en microambientes de hipoxia que ocurren durante la IPA, la ausencia de la alcohol deshidrogenasa *AlcC* influencia de manera positiva la patogénesis fúngica en el pulmón (**Grahl y col., 2011**).

Se ha demostrado que el producto del gen *ADH1* es un factor de virulencia en *C. albicans*, además de que participa en la ruta fermentativa de los hidratos de carbono, en donde, es primero convertido a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y este acetaldehído es metabolizado a etanol por la *ADH1*, la cual es una enzima reversible en *C. albicans*, es decir, puede convertir etanol a partir

de acetaldehído y viceversa dependiendo de las necesidades metabólicas (Nieminen y col., 2014).

Se ha demostrado que la eliminación del gen *ADH1* en *C. albicans* resultó en un aumento en la formación de biopelículas, en general estas estructuras aumentan la virulencia de los organismos ya que aumentan la resistencia a la fagocitosis, y también a los antifúngicos. Además generó una disminución en la producción de etanol y un aumento en las biopelículas formadas en los tejidos del huésped y en los niveles de acetaldehído (CH_3CHO) *in vitro* (Mukherjee y col., 2006).

En el hongo dimórfico, *Mucor circinelloides*, la mutante carente de actividad de la enzima oxidorreductasa alcohol deshidrogenasa mostró un aumento en los niveles de virulencia comparándolo con la cepa silvestre en ensayos con ratones sanos no inmunodeprimidos. Los resultados demostraron que cuando las esporas son inoculadas por vía intraperitoneal a cada ratón, la mutante generó un 100% de letalidad después de 24 horas post-inoculación, mientras que la sobrevivencia de los ratones con la cepa silvestre fue del 100% en el mismo lapso de tiempo (Guzmán-Hernández, 2016). Por lo que, al igual que en *C. albicans* la ausencia del producto de este gen está implicado en la virulencia, quizás el mecanismo sea muy similar, ya sea por una acumulación de acetaldehído, la cual podría generar dicha toxicidad, lo cual no ha sido demostrado aún en *M. circinelloides*.

1.5. Toxicidad del acetaldehído

El acetaldehído es un compuesto altamente volátil, citotóxico y mutagénico (Dellarco, 1988). Existen diversos efectos y daños que causa el acetaldehído a los tejidos, como son la carcinogénesis, arterosclerosis, cardiomiopatías, macrocitosis eritrocitaria, anemia, daños en la coagulación sanguínea, cirrosis, fibrogenesis, disfunción proteica y enzimática, así como estrés oxidativo. La toxicidad del acetaldehído se debe principalmente a su capacidad de formar aductos con diversas moléculas, mayormente con proteínas, estos aductos pueden contribuir directamente a dañar al hígado, donde el cuerpo reconoce estos aductos, resultando en la activación de la respuesta inmune produciendo

anticuerpos e inactivando diversas moléculas con actividad biológica, además de inhibir la reparación del DNA; puede afectar síntesis y secreción de proteínas, así como promover muerte celular y la peroxidación lipídica a través de su unión con glutatión reducido (**Klyosov y col., 1996**), además de incrementar efectos tóxicos por radicales libres (**Lieber, 2004**). El estrés oxidativo promueve inflamación, la cual activa a las células de Kupffer, que son macrófagos que se encuentran en el hígado y eliminan sustancias extrañas además de regular la respuesta inflamatoria e inmunitaria que se encuentran en el hígado produciendo mediadores biológicamente activos como especies reactivas de oxígeno, especies reactivas del nitrógeno, eicosanoides, citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , TGF- β , MIP-1, MCP-1, entre otros), así como otros compuestos (**Clária y Titos, 2003; Setshedi y col., 2010**). Estas moléculas producen la respuesta inflamatoria que puede ser beneficiosa si se producen en la cantidad adecuada o mortal si se producen en exceso.

II. JUSTIFICACION

Mucor circinelloides, es uno de los agentes etiológicos de la mucormicosis, la cual es una infección con una tasa de mortalidad sin tratamiento hasta del 90% en población inmunosuprimida. Antecedentes directos de nuestro trabajo indican que el producto del gen *adh1* podría participar en la virulencia, por lo que es importante contribuir en conocer el mecanismo molecular mediante el cual este gen participa en el proceso de virulencia de este Mucoral.

III. HIPOTESIS

La ausencia del producto del gen *adh1* aumenta la virulencia de *Mucor circinelloides* a través de la acumulación de acetaldehído.

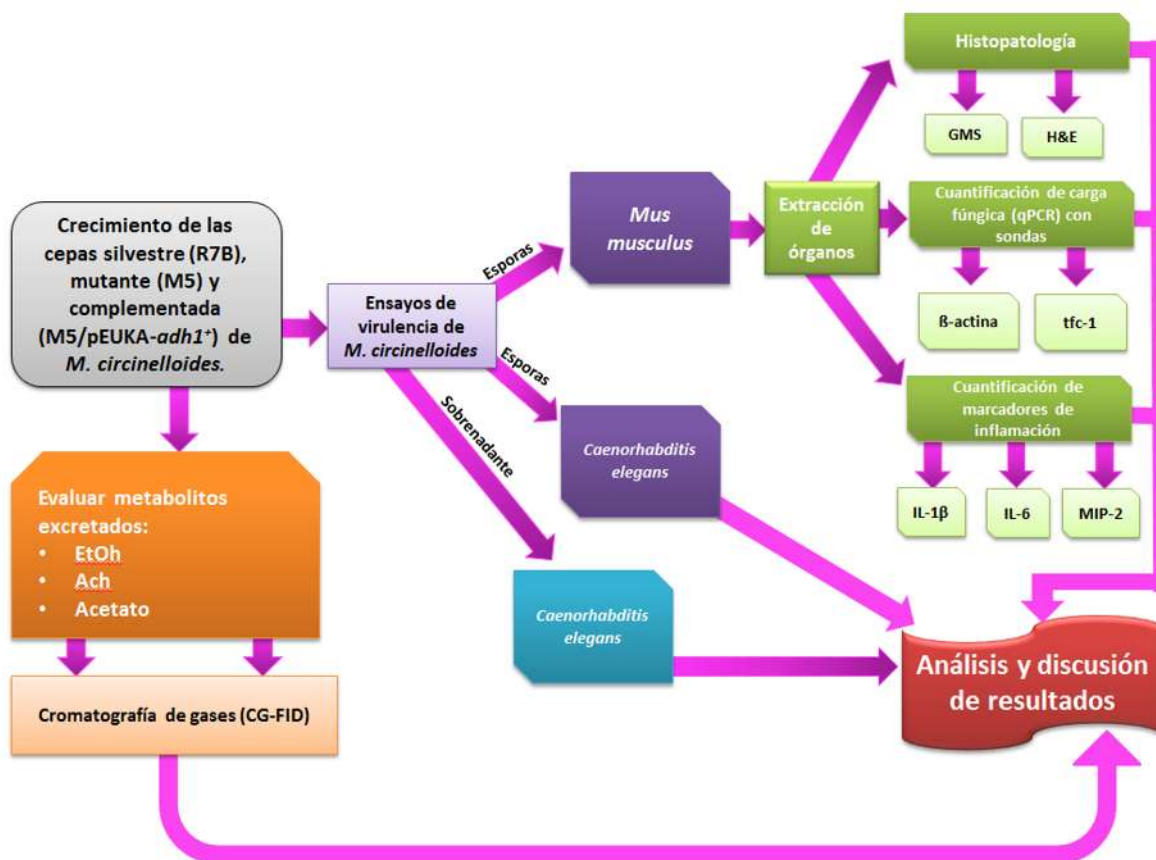
IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el mecanismo molecular involucrado en el incremento en la virulencia de la mutante *adh1*⁻ (M5) de *M. circinelloides*.

4.1. Objetivos particulares

1. Evaluar la pérdida de función del gen *adh1* en la virulencia de *M. circinelloides*.
2. Analizar la ausencia del producto del gen *adh1* en la invasividad de *M. circinelloides* en *M. musculus*.
3. Evaluar la toxicidad de los compuestos excretados en la mutante *adh1*⁻ de *M. circinelloides*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico

Tabla 2. Organismos utilizados.

Organismos	Cepas	Genotipo
<i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i>	R7B (ATCC 90680)	Derivada de la cepa ATCC 1216b, auxótrofa a leucina (Roncero y col., 1984), <i>adh1</i> ⁺
	M5	Derivada de la cepa R7B como resistente a alcohol alílico (fenotipo Aly ^r) de origen espontáneo; la cepa posee una delección de 10 pares de bases dentro del marco de lectura abierto del gen <i>adh1</i> (Rangel Porras, 2003)
	M5/pEUKA <i>adh1</i> ⁺	Cepa M5 protótrofa a leucina, transformada con el plásmido de replicación autónoma pEUKA7-kan conteniendo el alelo silvestre <i>adh1</i> ⁺ (Rangel Porras, 2003)
<i>Escherichia coli</i>	OP50	Cepa resistente a estreptomycin, auxótrofa a uracilo, usada como comida de nematodos.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol (Brenner, 1974). Cepa estándar utilizada para investigación de <i>C. elegans</i> .
<i>Mus musculus</i>	BALB/c	Albinos, uso general, investigación inmunológica (producción de anticuerpos monoclonales, así como, hibridomas), defectos en desarrollo neuronal.

6.2. Medios de Cultivo

6.2.1. Medio YPG

Este medio fue utilizado para la obtención de esporas y levaduras de dos de las cepas utilizadas de *M. circinelloides* (R7B y M5), se preparó adicionando 1% de peptona de gelatina (BD Bioxon), 0.3% de extracto de levadura (BD Bioxon), 2% de dextrosa (BD Bioxon), y en caso del medio sólido se adicionó 2% de agar (BD Bioxon), además se ajustó el pH a 4.5. Se esterilizó a 15 lb de presión a 121 °C por 20 minutos y se vertieron 25 mL de medio (sólido) en cajas Petri (**Bartnicki-García y Nickerson, 1962a**).

6.2.2. Medio Lee

Medio selectivo utilizado para crecimiento de la cepa complementada M5:*adh1*⁺, el cual se preparó con 0.25% de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.20% de sulfato de magnesio (USB), 0.5% de sulfato de amonio (Meyer), 0.5% de cloruro de sodio (J.T. Baker), 2% de dextrosa (BD Bioxon) y 2% de agar (BD Bioxon). Asimismo, este medio líquido fue utilizado para realizar curvas de germinación y crecimiento. Se ajustó el pH del medio a 5.3. Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Para las cepas auxótrofas a leucina se adicionó 0.005% de este aminoácido (Sigma- Aldrich).

6.2.3. Medio LB

Medio utilizado para crecer *E. coli* OP50, se prepara con 1% de peptona de caseína (Solbiosa), 0.5% de extracto de levadura (BD Bioxon), y 1% de cloruro de sodio (J.T. Baker). Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. A dicho medio se le agregó 10 µg/mL de estreptomicina.

6.2.4. Medio NGM (Nematode Growth Medium)

Medio utilizado para la obtención de *Caenorhabditis elegans*. Se preparó con 0.2% de cloruro de sodio (J.T. Baker), 0.4% de peptona de caseína (Solbiosa), 0.3% de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.05% de fosfato de potasio dibásico (Meyer), y 2% de agar (BD Bioxon). Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente se adicionó 1 mL de una solución de

colesterol (5 mg/mL)(Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker), además se añadió 0.5 mg de estreptomicina por cada litro de medio.

6.3. Métodos

6.3.1. Condiciones de crecimiento de *M. circinelloides*

Se inoculó en medio YPG sólido, las cepas R7B (silvestre) y M5 (mutante), se incubó a 28°C (**Bartnicki-García y Nickerson, 1962a**). En cambio, la cepa M5/pEUKA-*adh1*⁺ se inoculó en medio mínimo Lee sólido a 28°C.

6.3.2. Obtención y conteo de esporas

Se inocularon 100 esporas de *M. circinelloides* en placas Petri, se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas se colectaron agregando 7 mL de H₂O destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas fueron aspiradas y depositadas en un tubo Corning de 50 mL. Se concentraron mediante centrifugación a 5,900 rpm por 10 minutos a 26°C, se lavaron con agua destilada estéril y se volvieron a centrifugar de la misma manera. Las esporas fueron resuspendidas en 20 mL de agua destilada estéril.

El conteo de las esporas se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X del microscopio óptico ATC 2000 (Leika), se colocaron 15 µL en cada una de las cámaras del hematocitómetro (superior e inferior). Se contaron las cuadrículas de los extremos y del centro para ambas celdas de la cámara. La cantidad total de esporas se obtuvo mediante la multiplicación por el factor de 2.5×10^3 , el cual proviene de las características de la cámara, el resultado obtenido expresa las esporas por mililitro de la muestra. Las esporas fueron conservadas a 4°C y empleadas en un máximo de 15 días después de su obtención.

6.3.3. Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de *M. circinelloides*

Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentoso se adicionaron 20 mL de medio Lee en matraces Erlenmeyer de 125 mL con o sin leucina, se incubaron a 28°C, con agitación

constante a 200 rpm. Para el crecimiento levaduriforme, los matraces Erlenmeyer de 125 mL de graduación, los cuales fueron llenados en su totalidad, sobrepasando aún más la última marca de graduación (aproximadamente con 135 mL) con medio de cultivo YPG, con un tapón de corcho, dichos tapones estuvieron atravesados con una aguja para la salida del CO₂, dentro del matraz se colocó una barra magnética, el matraz se colocó sobre un agitador magnético permitiendo una agitación constante. Todo este sistema se le conoce como sistema “auto-anaeróbico” (**Fig. 4**) (**Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993**).



Figura 4. Sistema de auto-anaerobiosis. Consta de una parrilla de agitación con barra magnética un tapón de corcho y una aguja con salida de CO₂.

6.3.4. Determinación de producción de etanol y consumo de glucosa.

Se obtuvo el sobrenadante proveniente de cultivos crecidos en condiciones de aerobiosis por 24 horas. La biomasa del sobrenadante fue obtenida mediante filtración en papel filtro estéril, se obtuvieron 1 g de cada una de las cepas analizadas por litro de medio, dicha biomasa fue transferida nuevamente en medio Lee al 2% de glucosa en condiciones de aerobiosis, posteriormente se tomó 1 mL de cada muestra a las 12, 24 y 48 horas para las determinaciones de producción de etanol y consumo de glucosa. Para eliminar cualquier resto celular el sobrenadante se pasó a través de filtros de 0.22 μm , las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su análisis

6.3.4.1. Análisis por HPLC

Se determinó la cantidad producida de etanol por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en el equipo Varian Star 800, con un detector refractométrico (Perkin-Elmer); se utilizó para separar las muestras una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H. Durante la operación del equipo se utilizó como fase móvil agua desionizada, la cual fue filtrada con filtros de 0.02 μm (Millipore) y desgasificada al vacío. La temperatura de columna se usó a 80°C .

Para el procesamiento de las muestras, se precalentó la columna a la temperatura a utilizar; se inició el programa de corrida de inicio descrito en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Programa de inicio para el HPLC.

mL/ min	Tiempo (min)
0.2	2
0.3	5
0.4	10
0.5	15
0.6	20
0.7	25
0.7	120
0.7	Estabilizar por 15

Posteriormente, se analizó cada una de las muestras con el método de corrida (0.7 mL/min) por 20 minutos. Finalmente, se apagó el horno sin parar la bomba, para correr el programa de terminación.

Tabla 4. Programa de terminación para el HPLC.

mL/ min	Tiempo (min)
0.7	Inicio
0.6	2
0.4	5
0.3	10
0.2	15
0.15	20
0.1	25
0	60

Asimismo, se realizaron curvas de calibración de glucosa y etanol relacionando los tiempos de retención con cada dilución de glucosa o etanol utilizada. Se prepararon soluciones con concentraciones de glucosa y etanol desde 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% y 2% (%p/v). Se calculó el coeficiente de correlación lineal (R^2) por medio de una gráfica de regresión lineal. Para posteriormente calcular la cantidad de glucosa consumida respecto al área bajo la curva, así como la determinación de producción de etanol.

6.3.4.2. Análisis por CG – FID

6.3.4.2.1. Producción de etanol

Se determinó la cantidad producida de etanol por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID), se detectó con una columna Agilent J&W HP-Innowax 19091N-136 (60 m de longitud x 250 μ m x 0.25 μ m) en el equipo Agilent Technologies 7890B, se utilizó como fase móvil nitrógeno a un flujo de 1 mL/min, se inyectaron 0.5 μ L de cada una de las muestras con un auto-muestreador. La temperatura establecida para el inyector fue de 240°C, en cambio para el detector de ionización de flama fue de 260°C. Se utilizó el siguiente programa de temperatura de horno.

Tabla 5. Programa de temperatura de horno.

Nombre de cada Rampa	Gradiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
Inicial	-	40	2
Rampa 1	12	120	8.6667
Rampa 2	80	250	13.292

Posteriormente, para la cuantificación de etanol, se correlacionó con la curva de calibración elaborada previamente.

6.3.4.2.2. Producción de acetaldehído y acetato.

Se determinó la cantidad producida de acetaldehído y acetato por CG-FID del sobrenadante en aerobiosis de las diferentes cepas de *M. circinelloides*, se utilizó una columna WAX, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno con 0.25 μ m de grosor de película (Phenomenex), en el equipo Agilent 7890A, se utilizó como gas acarreador nitrógeno en un flujo de 0.7 mL/min, se inyectaron 1 μ L de cada muestra con un auto-muestreador. Se utilizó el inyector tipo Split 20 a una temperatura de 200°C. Además, el detector tipo FID, mantuvo un flujo de H₂/aire de 45/450 mL, a una temperatura de 250°C. En la **Tabla 6** se muestra el programa utilizado en la temperatura del horno.

Tabla 6. Programa de temperatura de horno.

Nombre de cada Rampa	Gradiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
Inicial	-	40	2
Rampa 1	5	60	0
Rampa 2	40	200	0.5

Posteriormente, se cuantifica la cantidad producida de acetaldehído y acetato, respecto a la curva de calibración en el equipo.

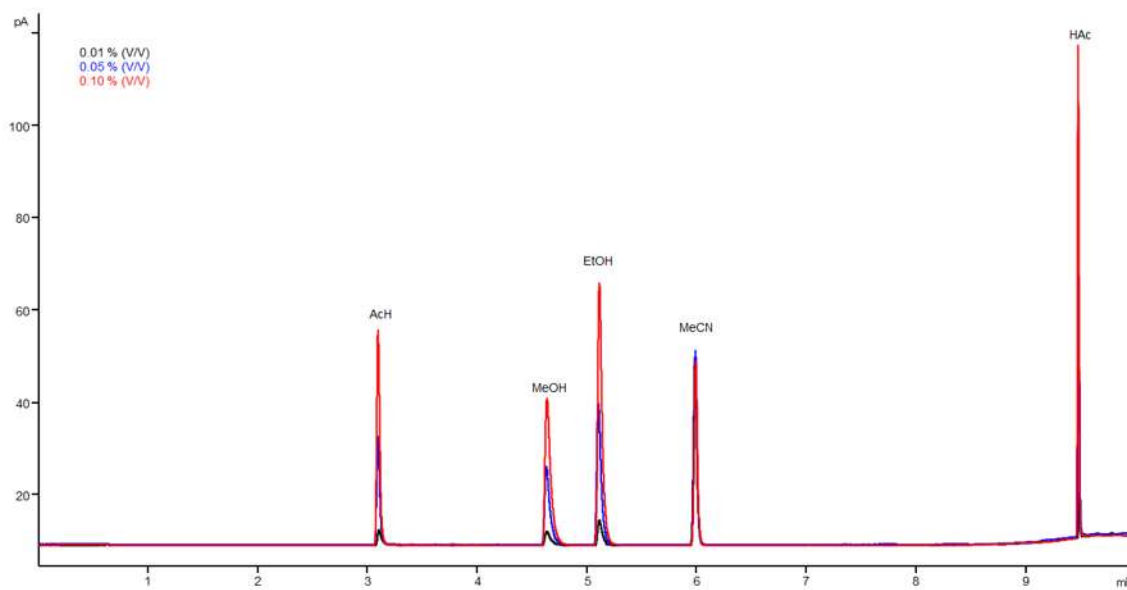


Figura 5. Curva de calibración en CG-FID. Cada señal analítica mostrada indican: AcH (Acetaldehído), MeOH (Metanol), EtOH (Etanol), MeCN (Acetonitrilo) y HAc (Ácido acético). Además los diferentes colores muestran concentraciones ascendentes para cada compuesto, en negro 0.01% v/v, en línea azul 0.05% v/v, y en línea roja 0.10% v/v.

6.3.5. Determinación de producción de ácido acético

Se cuantificó la cantidad de ácido acético producido, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-V-015-NORMEX-2014, la cual establece métodos de prueba en bebidas alcohólicas así como, materias prima para su preparación para determinar acidez total, acidez fija y acidez volátil; basándose principalmente en reacciones de neutralización por volumetría. Primeramente, se preparó hidróxido de sodio (NaOH) al 0.05N con agua fría previamente puesta en ebullición por 3 minutos con el fin de eliminar el CO₂ disuelto, la cual se normalizó dicha solución con una solución de HCl al 0.01N. Para la preparación de cada muestra a analizar, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL: se colocó 100 mL de agua destilada previamente hervida y ajustada a un pH de 8.2 con una solución de NaOH al 0.05N usando un potenciómetro Sartorius Professional Meter PP-15, además se adicionó 5 mL del sobrenadante a analizar. Una vez que la solución se normalizó, esta se colocó en la bureta hasta llenarla, para posteriormente titular la muestra hasta tener un pH de 8.2. Se determinaron los mL gastados para cada muestra determinando de esta forma la acidez total de ácido acético, calculados con la siguiente fórmula:

$$AT = \frac{V \times N \times eq}{Vm}$$

Donde:

AT: Acidez Total,

V: Volumen de la solución de NaOH usada en la titulación,

N: Normalidad real de la solución de NaOH usada en la titulación,

eq: Equivalente químico del ácido acético (60.05),

Vm: Volumen de la muestra.

De esta manera se obtuvo la cantidad producida por *M. circinelloides* de ácido acético en g/L.

6.3.6. Crecimiento y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*.

Para la preparación de la fuente de comida de *C. elegans*, se inoculó 1 mL de *E. coli* OP50 por mililitro de medio LB líquido, se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 24 horas. Posteriormente se tomaron 500 µL del precultivo de *E. coli*, el cual fue esparcido cada caja Petri de 100x15 mm con medio NGM a utilizar; mientras que en cajas Petri de 60x15 mm se adicionaron 250 µL del precultivo bacteriano antes descrito. Se incubaron a 30°C por 48 horas hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron pequeñas parte de agar con al menos un nematodo a cada caja Petri, previamente crecidas con la cepa de *E. coli*, se dejó incubar por 3 días a 20°C hasta la fase adulta del nematodo.

6.3.7. Ensayos de virulencia con *Caenorhabditis elegans*

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

6.3.8. Ensayos de virulencia con *Mus musculus*

Se utilizaron ratones machos Balb/c sanos de aproximadamente 10-12 semanas, a los cuales se inocularon con 300 µL de solución salina vía intraperitoneal conteniendo 5×10^6 esporas con una jeringa de insulina 27G X ½ in., de 1 mL marca BD. Los animales se mantuvieron en observación por aproximadamente 15 días post-inoculación. Se realizó cada ensayo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-

1999, tanto en su cuidado como en su manejo. Se reportó el peso de los animales así como su fallecimiento cada 24 horas durante todo el transcurso del experimento.

6.3.9. Manipulación de ácidos nucleicos

6.3.9.1. Determinación de la invasividad de *M. circinelloides* en tejidos de ratón mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Para aislar el DNA de los diversos órganos obtenidos post-inoculación de *Mus musculus*, se realizó la remoción de cada uno de los tejidos (cerebro, pulmones, bazo, hígado, e intestino), se realizó la lisis del tejido (30 mg aproximadamente de cada uno) usando perlas (MagNA Lyser Green Breads-Roche), a las cuales les fue adicionado 700 μ L de buffer de elución. Los tubos fueron colocados en MagNA Lyser Instrument (Roche) y procesados por 40 segundos a 6,500 rpm, a fin de lograr la lisis celular. Las muestras fueron centrifugadas por 1 min a $20,000 \times g$ en una centrifuga modelo 5417 (Eppendorf), y el sobrenadante fue usado para aislamiento de DNA siguiendo el protocolo del Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). Las muestras fueron cuantificadas usando un NanoPhotometer Pearl spectrophotometer (IMPLEN).

Se utilizaron sondas de genes para la identificación específica del ratón y del hongo:

- 1) El gen de β -actina de *Mus musculus*, el cual fue usado para medir los niveles de DNA de los distintos tejidos del ratón.
- 2) El gen *tfc-1* de *Mucor circinelloides*, fue usado para cuantificar la carga fúngica, dicho gen fue validado previamente como gen normalizador para ensayos de RT-qPCR en el dimorfismo de este hongo (**Valle-Maldonado y col., 2015**).

La qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), empleando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 μ L de volumen de reacción contenía 5 μ L de DNA templado (100 ng/ μ L), 0.5 μ L de mezcla de enzimas, 12.5 μ L de mezcla de reacción 2X, 0.5 μ L de oligonucleótido directo 10 μ M, 0.5 μ L de oligonucleótido

reverso 10 μ M, 0.5 μ L de sonda 5 μ M, y 5.5 μ L de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

La qPCR se inició con la desnaturalización inicial (95°C, 10 min), seguida 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 colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm (ya que el componente fluoróforo de la sonda es FAM). En cada experimento fueron incluidos controles tanto positivo (DNA genómico de *M. circinelloides*), y agua como control negativo. A continuación se muestran las secuencias de oligonucleótidos y sondas empleadas en este ensayo

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos y sondas utilizados.

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3')	Tm (°C) / GC (%)
	Oligonucleótido reverso (5'-3')	
	Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	
Mctfc-1 - 106349	ATGGCGGTGACGAGGGTTT	67.21 / 57.9
	GGGCATCTGTGGCAATCTTTC	66.32 / 52.4
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	68.48 / 52.6
McAld2 - 114708	CACCGTCTCCAAGTTCAAGGAT	65.3 / 50
	GGCAGCAAGACCGTATTCAG	65.8 / 55
	TCGATGATGTCCTCAAGATGGCCCT	69.8 / 52
Mmβ-actina - 930945786	TGACAGGATGCAGAAGGAGAT	65.48 / 47.62
	GCGCTCAGGAGGAGCAAT	66.96 / 61.11
	ACTGCTCTGGCTCCTAGCACCAT	70.37 / 56.62
Mmmip2	GCGCTGTCAATGCCTGAAG	66.8 / 57.89
	CGTCACACTCAAGCTCTGGAT	65.4 / 52.38
	CCCTGCCAAGGGTTGACTTCAAGA	69.9 / 54.17
Mmil-1β	TGGCAGCTACCTGTGTCTTTC	66.1 / 52.3
	GGATGGGCTCTTCTTCAAAGATG	64.2 / 47.83
	CCGTGGACCTTCCAGGATGAGGA	70.9 / 60.87
Mmil-6	GCGCTGTCAATGCCTGAAG	66.8 / 57.89
	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGTA	66.3 / 52.3
	CCCTGCCAAGGGTTGACTTCAAGA	69.9 / 54.2
Mm: <i>Mus musculus</i>		
Mc: <i>Mucor circinelloides</i>		

6.3.9.2. Determinación de los niveles de expresión del gen *ald2* en *M. circinelloides*.

La extracción de RNA se realizó de muestras de crecimiento micelial de 24 horas en medio mínimo Lee de *M. circinelloides* que fueron filtradas a través de papel filtro Whatmann, las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento el cual se realizó posterior a la filtración de las células.

La lisis celular se realizó mediante rompimiento con nitrógeno líquido, empleando un mortero con pistilo. Para realizar la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante (SV RNA total Isolation kit, PROMEGA), empleando una micro centrífuga 5417R (Eppendorf).

Todas las manipulaciones de muestras de RNA, como extracción, diluciones y tratamiento con DNasa fueron realizadas en el gabinete de bioseguridad clase II Tipo A2 (Thermo Scientific). Para lo cual se utilizó el siguiente tratamiento: A 1 µg de RNA total se le agregó 1 µL (1U) de DNasa I (DNasa I, Invitrogen), 1 µL de buffer de reacción de DNasa (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl, Invitrogen). La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La DNasa se inactivó al agregar 1 µL de EDTA 25 mM (Invitrogen) a la muestra de RNA y posterior incubación a 65°C durante 10 minutos, para ello se empleó un incubador para microtubos de 2 mL (Eppendorf Thermomixer).

Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a λ=260nm y λ=280nm, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (**Krebs y col. 2009**).

De manera que se evaluó la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$, una relación $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.90 - 2.0$ indica una calidad óptima de extracción (**Yamaguchi y col. 1992; Wilfinger y col.1997**). Las muestras de RNA total cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de qRT-PCR.

La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas (**Tabla 7**) con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la

herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La qRT-PCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 μ L de volumen de reacción contenía 5 μ L de RNA templado (100 μ g), 0.5 μ L de mezcla de enzimas, 12.5 μ L de mezcla de reacción 2X, 0.5 μ L de oligonucleótido directo 10 μ M, 0.5 μ L de oligonucleótido reverso 10 μ M, 0.5 μ L de sonda 5 μ M, y 5.5 μ L de agua libre de nucleasas, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

La qRT-PCR 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 colectadas 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 (*tfc-1*, 18S) y agua como control negativo.

6.3.9.3 Determinación de los niveles de expresión de los genes IL-1 β , IL-6, MIP2 de *Mus musculus* post -infección con *Mucor circinelloides*.

Para aislar el RNA total de los diversos órganos del ratón obtenidos post-inoculación de *Mus musculus* con *M. circinelloides*, se realizó la remoción de cada uno de los tejidos, (cerebro, pulmones, riñones, bazo, hígado, intestino), se realizó la lisis del tejido (30 mg aproximadamente de cada uno) usando perlas (MagNA Lyser Green Breads-Roche), a las cuales les fue adicionado 700 μ L de buffer de elución. Los tubos fueron colocados en MagNA Lyser Instrument (Roche) y procesados por 40 segundos a 6,500 rpm, a fin de lograr la lisis celular. Las muestras fueron centrifugadas por 1 min a 20,000 $\times g$ en una centrifuga modelo 5417 (Eppendorf), y el sobrenadante fue usado para aislamiento de RNA siguiendo el protocolo del Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). Las muestras fueron cuantificadas usando un NanoPhotometer Pearl spectrophotometer (IMPLEN). Las sondas de hidrólisis correspondiente a los genes IL-1 β , IL-6 y MIP-2 de *M. musculus* (**Tabla 7**) fueron usadas en los ensayos

de expresión relativa al gen β -actina, siguiendo los cálculos de expresión descritos en el apartado 6.3.9.5.2.

6.3.9.4. Determinación de las eficiencias de amplificación de las sondas usadas en los ensayos de qPCR y RT-PCR.

Las eficiencias de amplificación para cada gen, fueron determinadas mediante los valores de Cq (Cq es el valor donde la curva de amplificación de la reacción pierde linealidad y adopta una tendencia exponencial) correspondientes a la amplificación para cada uno de los genes usando las siguientes concentraciones de DNA por reacción: 500 μ g, 50 μ g, 5 μ g, 0.5 μ g, 0.05 μ g. Estos datos se utilizaron para generar una curva estándar de concentración, en donde se graficaron los $\log_{10}$ de concentración con sus Cq correspondientes. Se trazó una recta que une estos puntos. Y se determinó la pendiente de dicha recta.

La eficiencia de amplificación se calculó de la siguiente manera:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}} \right)} - 1 \right) \times 100$$

6.3.9.5. Análisis matemático

6.3.9.5.1. Niveles de relativos de DNA en los ensayos de qPCR de las distintas cepas de *M. circinelloides* en los tejidos de *Mus musculus*.

El comparación matemática empleado para los análisis de datos fue la conocida como Delta-Ct (**Livak y Schmittgen, 2001**), en la que se incluye corrección de eficiencias de amplificación (**Pfaffl, 2001**).

La fórmula empleada es la siguiente:

$$\text{Niveles de DNA relativos} = \frac{2^{(E_{\text{efc}} - 1)(Cq_{M5})}}{2^{(E_{\text{efc}} - 1)(Cq_{R7B})}}$$

Donde E significa eficiencia de amplificación y los Cq del gen de interés y del gen normalizador corresponden al mismo estadio morfológico. Un valor igual a 1 significa mismo nivel de contenido de DNA de ambas cepas y por lo tanto mismo

nivel de invasividad. Un valor menor a 1 significa mayor contenido de DNA de la cepa R7B (silvestre) y por lo tanto una mayor invasividad de la cepa silvestre. Un valor mayor a 1 significa un mayor contenido de DNA de la cepa M5 y por lo tanto una mayor invasividad de la cepa mutante respecto a la cepa silvestre.

6.3.9.5.2. Niveles de expresión relativa de RNA en los ensayos de qRT-PCR

El modelo matemático empleado para los análisis de datos fue el Delta-Ct (**Livak y Schmittgen, 2001**), con corrección de eficiencias de amplificación (**Pfaffl, 2001**). Mediante esta fórmula se puede saber el número de transcrito del gen de interés de manera relativa al gen normalizador en cierta condición.

La fórmula empleada es la siguiente:

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{2^{(E_{\text{gen interés}})(Cq_{\text{gen interés}})}}{2^{(E_{\text{gen normalizador}})(Cq_{\text{gen normalizador}})}}$$

6.3.10. Análisis Histopatológico

Los ratones fueron inoculados con las cepas de *M. circinelloides* como ha sido descrito en el apartado 6.3.8., y sacrificado a las 24 y 48 horas post-infección. Posteriormente, se removieron los órganos (cerebro, pulmones, bazo, hígado, e intestino); estos tejidos fueron fijados con paraformaldehído al 3%. Se embebieron en parafina, se seccionaron con micrótopo los tejidos a un espesor de 5-10 micras, y después se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y con metenamina de plata de Grocott (GMS). Se observaron y se tomaron imágenes representativas en un microscopio Leica Modelo DM750 a 100x, utilizando una cámara Leica Mod. DFC295, con el software Leica Application Suite (Versión 3.8.5.). Se utilizaron 4 ratones para cada cepa.

6.3.10.1. Tinción Hematoxilina – Eosina

Primero, se desparafinó las muestras en una estufa a 70°C por 15-20 min, se colocó en Xilol por 5 min, nuevamente con Xilol por 5 min; posteriormente se pasó a la fase de hidratación con lavados de alcohol etílico absoluto, se colocan 5 min en alcohol etílico a 96°, y se enjuagó con agua corriente. Ya que se desparafinó e

hidrató el tejido se tiñó, y se colocó 5 min en hematoxilina, pasados los 5 min se enjuagó con suficiente agua del grifo; para fines prácticos, y para eliminar tinción excedente con hematoxilina de Harris, se colocó en alcohol ácido (HCL) al 1% entre 1 o 2 veces muy rápidamente, se lavó con agua destilada y se neutralizó en buffer de carbonato de litio al 0.5%. Subsecuentemente se colocó en eosina por 5 min, y se lavó con agua corriente. Después, se deshidrató el tejido con concentraciones ascendentes de alcohol etílico dejando el tejido para cada uno 5 min (80°, 96° y absoluto). Posteriormente, se aclaró en xilol dos cambios por 5 min. Finalmente, se montó con resina y cubreobjetos, y se observó en el microscopio a 100X.

6.3.10.2. Tinción Metenamina de plata de Grocott

Se desparafinó las muestras en una estufa a 70°C por 15-20 min, se colocó en xilol por 5 min (dos veces); posteriormente se pasó a la fase de hidratación con lavados con alcohol etílico absoluto, se colocó 5 min en alcohol etílico a 96°, y se enjuagó con agua corriente. Posteriormente, se oxidó con ácido crómico al 4% por 1 hora, esto con la finalidad de que la pared celular del hongo se debilite convirtiendo los polisacáridos a aldehídos, estos grupos reducen los iones plata con la solución de metenamina de plata con la que posteriormente se impregnaron; se lavó con agua destilada; se colocó en bisulfito de sodio al 1% por 1 min, y se lavó con agua destilada. Se colocó en la solución trabajo de metenamina de plata a 58°C por 1 hora o bien, hasta observar color café tabaco, puesto que el tejido estaba listo para ser teñido. Se lavó con agua destilada 6 veces. Se colocó en cloruro de oro al 0.2% de 2-5 min, se enjuagó con suficiente agua destilada. Se colocó en tiosulfato de sodio al 2% de 1-2 min, y se lavó con suficiente agua corriente. A continuación, se contrastó con Fast Green o solución verde luz, al 1% por 30 segundos. En seguida, se deshidrató colocando los tejidos en alcohol etílico 80° por 30 segundos, alcohol etílico 96° por 30 segundos, y en alcohol absoluto por 30 segundos. Posteriormente, se aclaró colocando en xilol, dos veces. Finalmente, se montó con resina y cubreobjetos, y se observó en el microscopio a 100X.

6.3.11. Efecto del disulfiram en la infección a ratones con la mutante *adh1* de *M. circinelloides*.

Se usaron y manipularon ratones (8 animales por cada grupo) como se describió en el apartado 6.3.8. Los ratones fueron separados en los siguientes grupos:

Tabla 8. Grupo de ratones utilizados.

Ratones sin disulfiram	Ratones con disulfiram
Ratones no infectados	Ratones no infectados
Ratones con etanol al 10% (<i>ad libitum</i>)	Ratones con etanol al 10% (<i>ad libitum</i>)
Ratones infectados con R7B	Ratones infectados con R7B
Ratones infectados con M5	Ratones infectados con M5
Ratones infectados con M5/pEUKA- <i>adh1</i> ⁺	Ratones infectados con M5/pEUKA- <i>adh1</i> ⁺

Los ratones con disulfiram se inocularon 300 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, 48 horas previo al ensayo de infección y cada 48 horas durante el tiempo que duró el ensayo de infección.

6.3.12. Análisis estadístico

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

VII. RESULTADOS

7.1. Caracterización fenotípica de las cepas

Se realizó la caracterización fenotípica de las distintas cepas usadas en este proyecto para confirmar el genotipo de cada una de ellas. Se inocularon 50 esporas en distintos medios de cultivo sólidos, medio mínimo (Lee), y medio rico (YPG) (**Fig. 6A**) suplementados o no con alcohol alílico al 0.5%. El alcohol alílico es metabolizado por una ADH funcional y es transformado a un compuesto tóxico denominado acroleína, el cual provoca que la cepa no pueda crecer por la toxicidad de esta acroleína (es un aldehído altamente tóxico, este efecto se refleja al formar aductos con proteínas y DNA), por lo que una mutación en la actividad de este gen *adh* produce resistencia a la presencia de este alcohol debido a que no lo puede metabolizar (**Kaminskas, y col., 2004**).

La cepa denominada silvestre R7B no crece en presencia de alcohol alílico debido a su capacidad de metabolizar dicho alcohol por la presencia de su Adh1 funcional, mientras que la cepa mutante (M5) mostró capacidad de crecer en presencia de alcohol alílico por ser deficiente en la actividad de Adh debido a la mutación presente dentro del marco de lectura del gen (**Rangel Porras, 2003**). La cepa mutante M5 complementada con el gen silvestre (M5/pEUKA-*adh1*⁺) posee el alelo silvestre *adh1*⁺ de *M. circinelloides* en el plásmido autoreplicativo pEUKA7-kan, un plásmido no integrado al genoma; esta cepa puede perder el plásmido con el gen *adh1*⁺ dependiendo de las condiciones de cultivo y por lo tanto se comporta en términos genéticos como una cepa heterocarionte comportándose como una silvestre o mutante dependiendo del medio de selección, dicha cepa complementada en presencia de alcohol alílico fue capaz de crecer debido a la pérdida del plásmido que porta el gen silvestre, lo cual le permite comportarse en dicho medio selectivo (alcohol alílico) como una cepa mutante (**Fig. 6C**).

Por otra parte, las distintas cepas se inocularon en medio mínimo Lee suplementado o no con leucina. La cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺) porta el plásmido con un marcador de selección (LeuA), el cual restaura la auxotrofía a leucina; la presencia del plásmido permite el crecimiento de dicha cepa

complementada en este medio selectivo (medio mínimo sin leucina) (**Fig. 6D**), mientras que las cepas R7B y M5 son auxótrofas a este aminoácido y no fueron capaces de crecer en dichas condiciones. Todas las cepas crecen adecuadamente en un medio rico (**Fig. 6A**) o un medio mínimo suplementado con leucina (**Fig. 6B**). De esta manera las distintas cepas que se utilizaron en este estudio mostraron el fenotipo esperado en cada uno de los medios de selección.

7.2. Efecto de la mutación *adh1* en la germinación en aerobiosis.

Con la finalidad de determinar si la mutación en la actividad de alcohol deshidrogenasa generó diferencias en la germinación en aerobiosis, se realizó una curva de germinación. Se inocularon 5×10^5 esporas/mL de las cepas R7B y M5 en medio Lee líquido suplementado con leucina. En cambio, para seleccionar a la cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺) con el gen *adh1* silvestre, no se adicionó dicho aminoácido. Se cuantificaron las esporas germinadas a las 6, 12, 24 y 48 horas de crecimiento, respectivamente. No se observaron diferencias en la morfología de las hifas en ninguna de las cepas analizadas (**Fig. 7A**). Sin embargo, las esporas de la cepa R7B germinaron más rápido, en comparación con la cepa mutante M5 (**Fig. 7B**), esta última disminuyó en un 50% el porcentaje de germinación en el mismo lapso de tiempo respecto a la cepa R7B; mientras que la cepa complementada, solamente germinó un 40% del total de sus esporas a un tiempo de 48 horas, este porcentaje de germinación de la cepa complementada es de un nivel intermedio entre la cepa silvestre y mutante, quizás debido a la inestabilidad mitótica del plásmido similar comportándose de forma similar en términos genéticos a un heterocarionte. Así, se concluye que la ausencia del gen *adh1* influye de manera positiva en la germinación aeróbica de *M. circinelloides*.

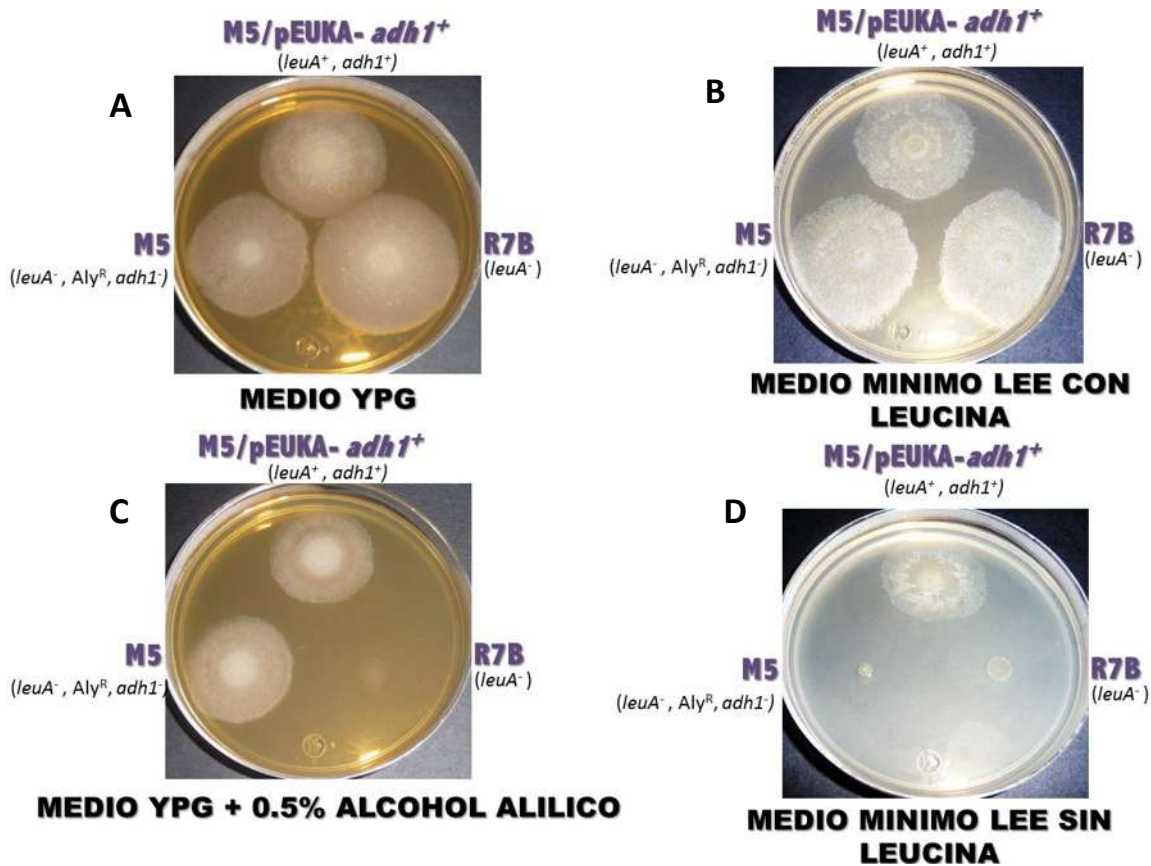


Figura 6. Caracterización fenotípica de las cepas silvestre (R7B), mutante (M5) y complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺) de *M. circinelloides*. Se inocularon 50 esporas para cada placa, de los diferentes medios de cultivo sólidos. Se incubaron por 72 horas a 28°C. **(A)** Se observan las tres cepas en medio rico YPG. **(B)** Se observan las cepas silvestre, mutante y complementada inoculadas en medio mínimo con leucina. **(C)**, Se muestra que las únicas cepas que crecen a 0.5% de alcohol alílico son las cepas complementada y mutante, en cambio la cepa R7B es incapaz de crecer en dicho alcohol. **(D)** Se inocularon en medio mínimo Lee sin leucina, el cual es el medio de selección para la cepa complementada.

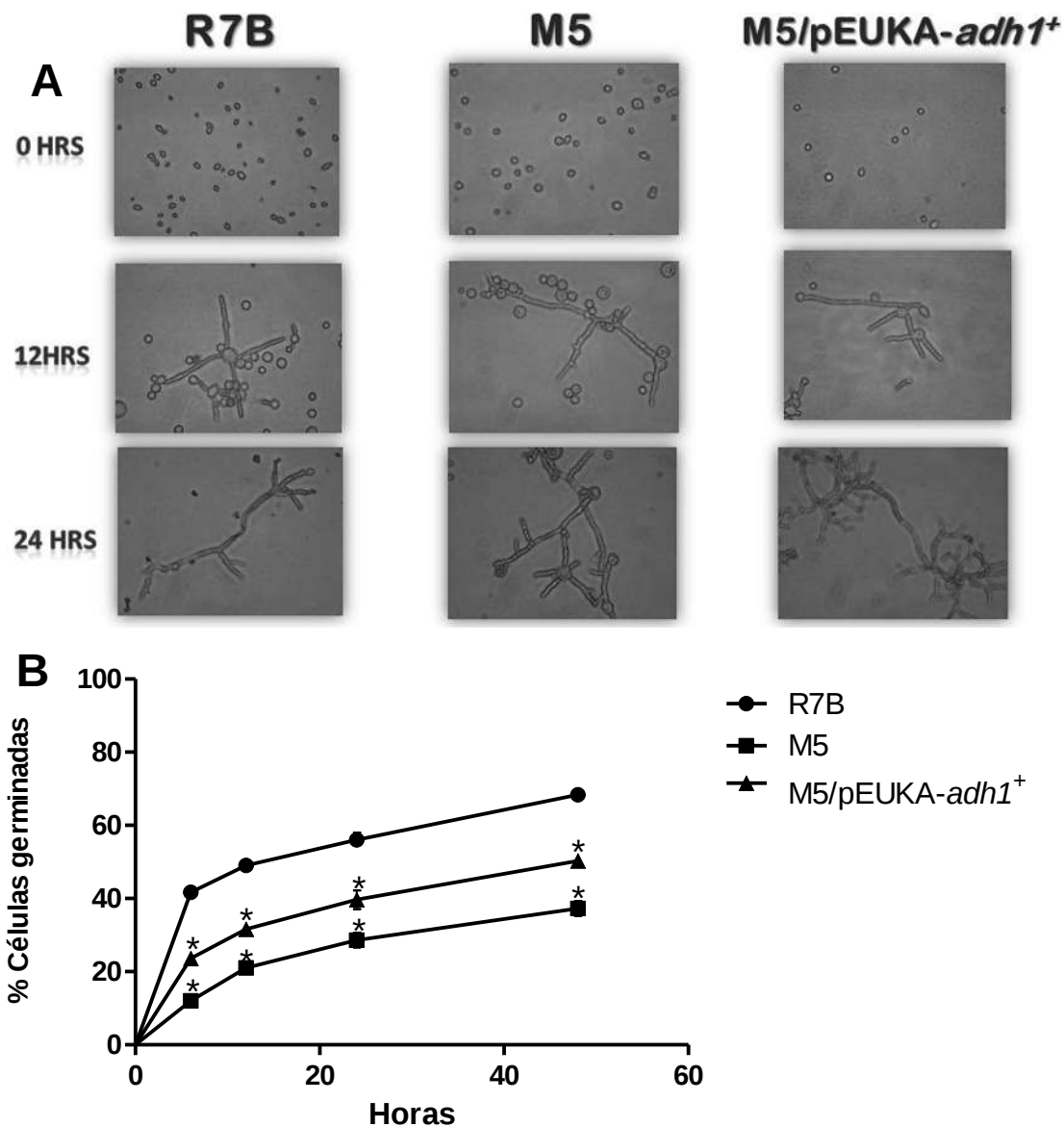


Figura 7. Efecto de la mutación del gen *adh1* en la germinación aerobia de *M. circinelloides*. Se inocularon las distintas cepas (5×10^5 esporas por ml), en medio Lee suplementado con leucina. Se cuantificó la emisión del tubo germinativo. A las 6, 12, 24 y 48 horas post-inoculación. **(A)** Se observan las esporas a los distintos tiempos en medio Lee, las células fueron observadas en un microscopio óptico convencional con el objetivo 40X. **(B)** Muestra la cuantificación de las células germinadas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺. N=5, análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

7.3. Efecto de la mutación del gen *adh1* en el crecimiento en aerobiosis.

Para determinar si la mutación en el gen *adh1* tiene un efecto en el crecimiento en aerobiosis se cuantificó la biomasa producida. Para esto, se realizó una curva de crecimiento en medio Lee líquido, inoculando 5×10^5 esporas por mL y a las 24 horas de incubación se recuperó la biomasa y se cuantificó su peso seco. Como se muestra en la **Fig. 8**, la cepa silvestre produjo una mayor cantidad de biomasa que la cepa mutante (M5), existiendo una correlación con los datos obtenidos en el porcentaje de germinación; por otra parte, se observó que la cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺) presentó una tendencia en su crecimiento similar a la cepa silvestre, es decir, su crecimiento fue significativamente mayor al de la cepa mutante M5. Esto indica que la mutación en el gen *adh1* tiene un efecto negativo en el crecimiento en aerobiosis.

7.4. Efecto de la mutación *adh1* en el crecimiento en anaerobiosis.

Se determinó el crecimiento en anaerobiosis de las diferentes cepas cultivadas en medio YPG líquido. Como se muestra en la **Fig. 9**, la cepa mutante (M5) no germinó, es decir sus esporas solo se hincharon sin poder generar levaduras. Sin embargo, la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ pudo crecer como levadura, al igual que la cepa silvestre. Por lo tanto, esta observación indica que en *M. circinelloides* se requiere una Adh1 funcional para la generación de levaduras en condiciones anaeróbicas.

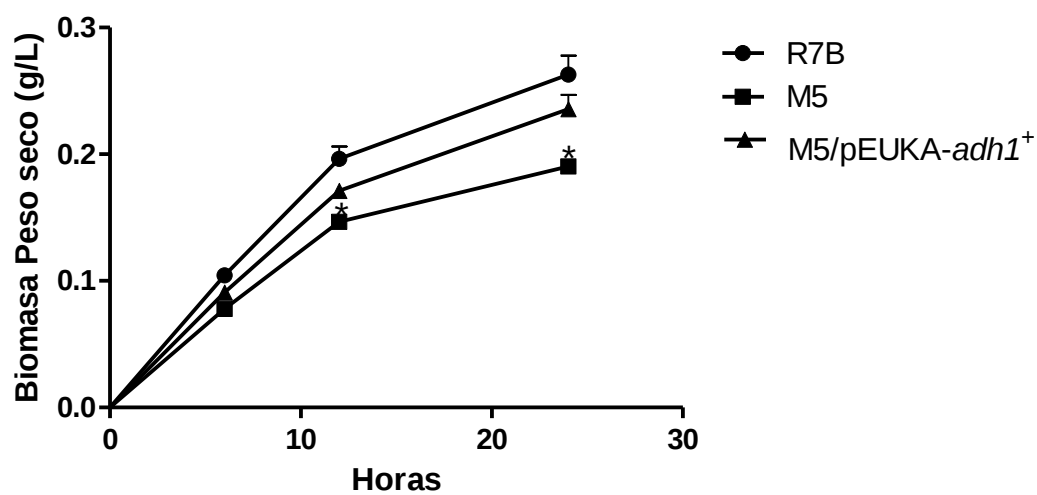


Figura 8. Efecto de la mutación *adh1* en el crecimiento en aerobiosis de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mL de las diferentes cepas (R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺) en medio Lee suplementado con leucina. Se cuantificó la biomasa generada a las 6, 12, y 24 horas post-inoculación la cual fue filtrada y pesada. N=5, análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

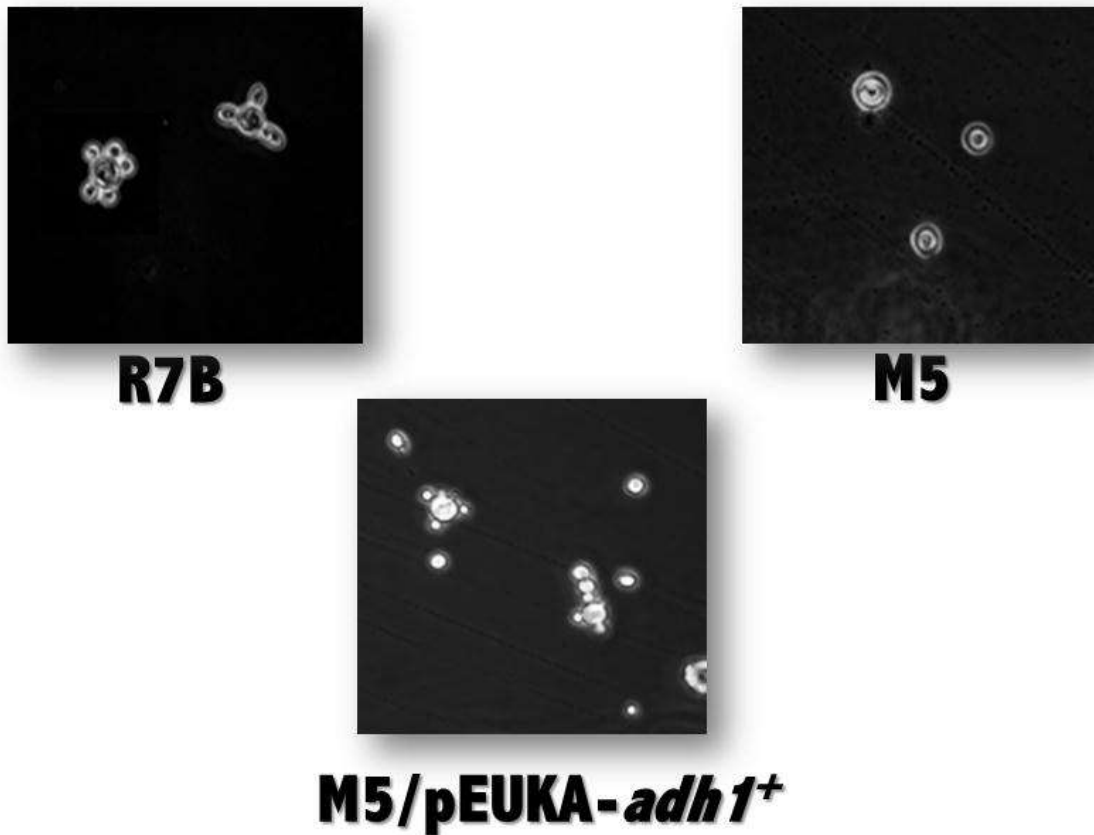


Figura 9. Efecto de la mutación *adh1* en la germinación anaerobia de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por mL, en anaerobiosis con agitación constante, en medio YPG líquido. A las 24 horas se observó que la cepa R7B produce levaduras, al igual que la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺, en cambio, la cepa M5 es incapaz de producir levaduras y sus células permanecen como esporas hinchadas. Las fotos fueron tomadas en microscopio invertido convencional, con objetivo 40X para todas las imágenes.

7.5. Efecto de la mutación *adh1* de *M. circinelloides* en la producción de etanol.

Para determinar la producción de etanol de cada una de las cepas, se inocularon 5×10^5 esporas por mL en medio Lee en aerobiosis por 24 horas, posteriormente se filtró el sobrenadante de los cultivos y con la finalidad de usar la misma cantidad de biomasa producida para cada cepa se tomó 1 g de cada una de ellas por litro de medio para volver a inocular otros matraces con medio Lee recién preparado. Los sobrenadantes de los cultivos se dejaron incubar en condiciones aeróbicas (12, 24 y 48 horas), para finalmente obtener los sobrenadantes del cultivo libres de células y continuar con la determinación de la producción de etanol, así como el consumo de glucosa. Se observó que la cepa R7B produjo la mayor cantidad de etanol, con aproximadamente 5 g/L (**Fig. 10A**), por lo que como se ha reportado previamente en *M. circinelloides* (**Bartnicki-García y Nickerson, 1962a**), tiene un metabolismo fermentativo en presencia de oxígeno en medio suplementado con una hexosa. Sin embargo, la cepa mutante M5, al cabo de 48 horas produjo menos de 1 g/L de etanol, es decir, 5 veces menos respecto a la cepa silvestre; mientras que la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺, produjo 3 g/L, siendo 3 veces más su producción que la cepa mutante. De esta manera se comprueba que el producto del gen *adh1* es indispensable para la producción de etanol en *M. circinelloides*. Asimismo, el consumo de glucosa es contrario a la producción de etanol para cada cepa, debido a que la cepa R7B consumió aproximadamente 20 g/L, es decir, metabolizo esta cantidad de glucosa para crecer y producir etanol; sin embargo, la cepa mutante M5 consumió únicamente 4 g/L debido a que no puede metabolizar con la misma rapidez la glucosa y por ende generó una menor cantidad de etanol, mientras que la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ consumió únicamente 10 g/L, siendo de este modo significativamente diferente la cantidad de glucosa consumida relacionada con la producción de etanol, respecto a la cepa mutante y silvestre (**Fig. 10B**). Además, debido a la uniformización de la cantidad inicial de biomasa, se descarta que la diferente cantidad de etanol producida por las cepas se deba a diferencias marcadas en el crecimiento en las condiciones usadas (**Fig. 10C**).

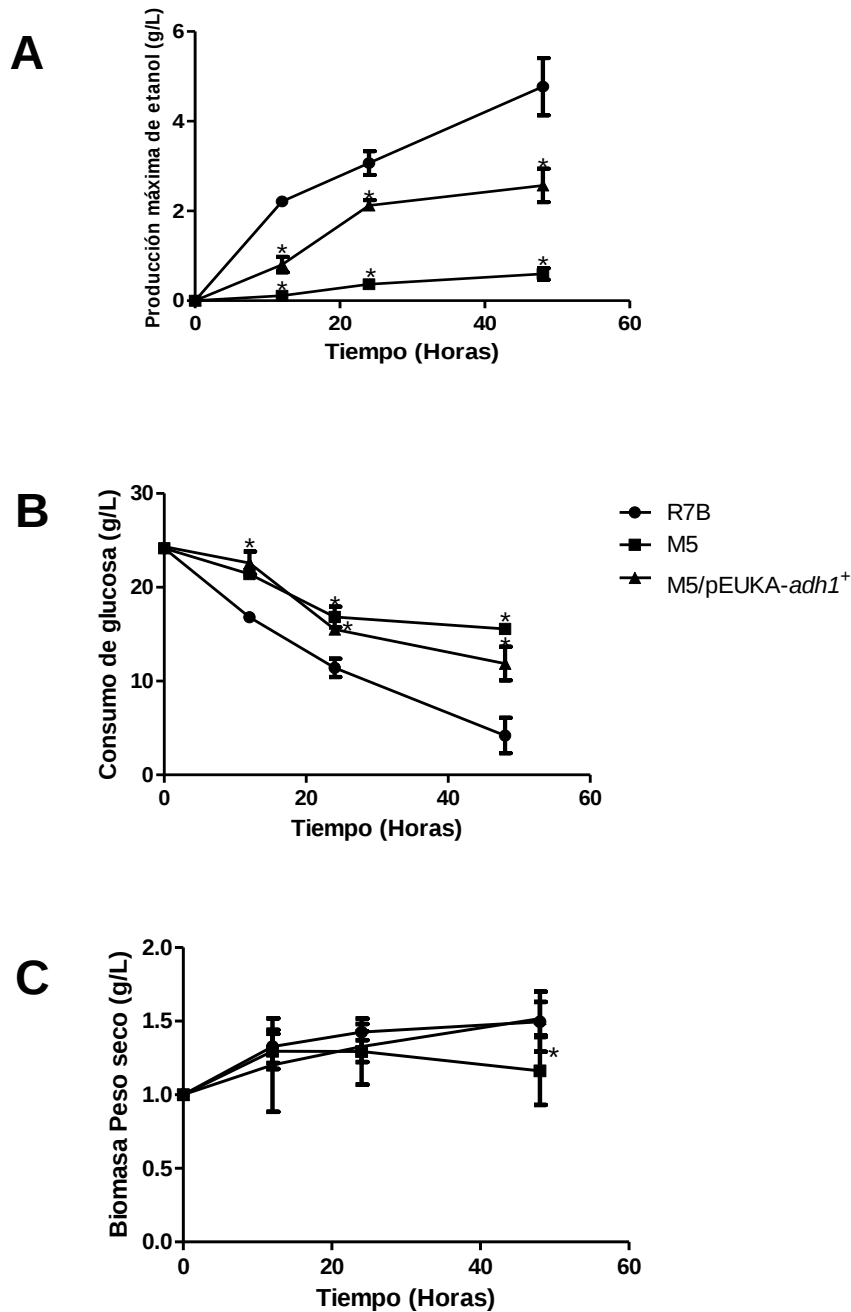


Figura 10. Efecto de la mutación *adh1* en la producción de etanol de *M. circinelloides*. Se realizó la determinación de etanol por CG **(A)** y el consumo de glucosa por HPLC **(B)** a diferentes tiempos de incubación (12, 24 y 48 horas). Además, se determinó la biomasa producida a los diferentes tiempos de cultivo **(C)**. Todos los inoculos iniciales comenzaron con la misma cantidad (0.2 g) de biomasa de las cepas en medio Lee suplementado con leucina. N=8, análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, $p < 0.05$.

7.6. Efecto de la mutación *adh1* de *M. circinelloides* en la virulencia en *Mus musculus*.

Para determinar si la mutación del gen *adh1* tenía una participación en la virulencia de *M. circinelloides*, fueron inoculadas un total de 5×10^6 esporas de cada una de las distintas cepas (R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺), por cada ratón macho Balb/c sano por vía intraperitoneal.

Estos ensayos fueron realizados de acuerdo a los procedimientos de la NOM-062-ZOO-1999, tanto en su manejo como en su cuidado. Se obtuvo la curva de porcentaje de supervivencia versus días post-infección, observándose que la cepa silvestre R7B y la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺, mostraron un 100% de supervivencia a los 10 días post-infección que duro el ensayo. En cambio, al primer día después de la infección con la cepa mutante, sólo sobrevivió el 60% de los ratones, mientras que a los 2 días únicamente sobrevivió el 20% de la población de ratones inoculada con esta cepa (**Fig. 11**).

Estas observaciones indican que la ausencia de actividad de la alcohol deshidrogenasa 1 (Adh1) y/o los consecuentes productos acumulados causa un aumento en la virulencia de *M. circinelloides* en este modelo murino empleado y la reintroducción del gen silvestre *adh1* en dicha mutante restauró el comportamiento avirulento, el mismo observado en la cepa silvestre.

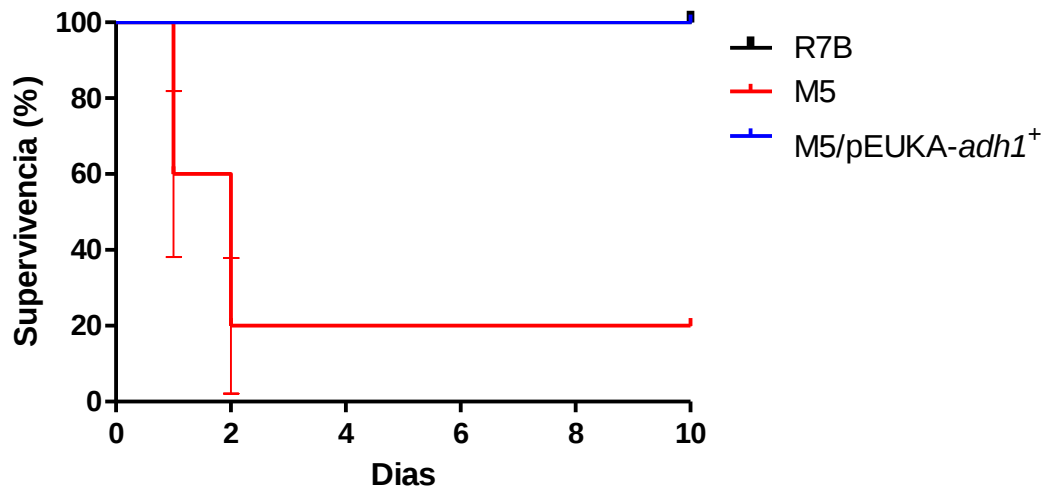


Figura 11. Efecto de la mutación del gen *adh1* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Mus musculus*. Se inocularon por vía intraperitoneal 5×10^6 esporas de las cepas R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺ en cada ratón macho Balb/c de 10-12 semanas de edad. N=6 para cada grupo, se repitió el experimento 8 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$

7.7. Efecto de la mutación *adh1* en el tamaño de la espora.

Debido a que se ha reportado que el tamaño de la espora (esporangiospora) en *M. circinelloides* es un factor importante para la virulencia (Li y col., 2011), se procedió a analizar su tamaño mediante citometría de flujo, donde se obtuvo un gráfico representativo de cada ensayo, observando de esta manera que no hay diferencia en el tamaño de la espora entre las distintas cepas, ya que en promedio la población de esporas de las distintas cepas están entre un 88 al 90% en el mismo tamaño (Fig. 12); esto indica que la diferencia en virulencia de las cepas no se debe a diferencias en el tamaño de la espora.

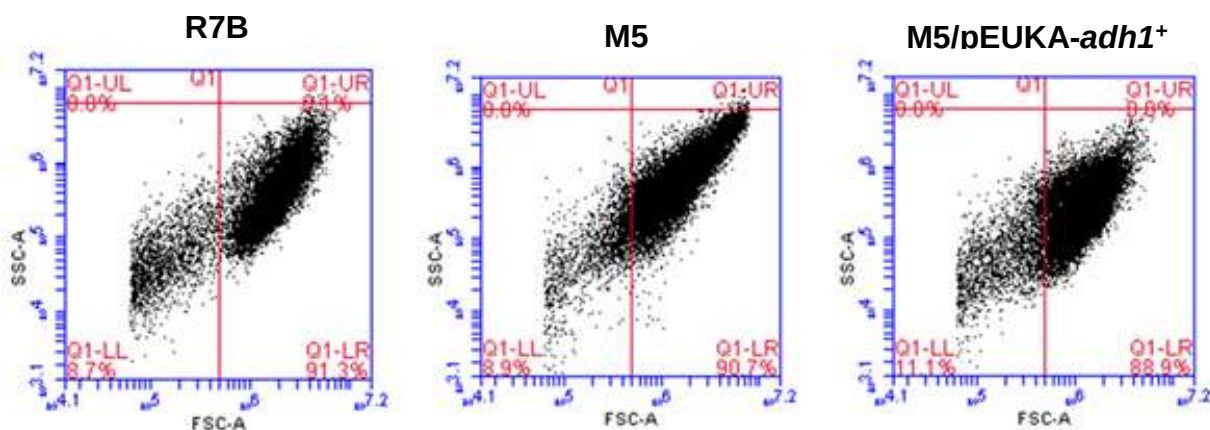


Figura 12. Determinación del tamaño de la espora de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺ de *M. circinelloides*. Determinación del tamaño de la población de esporas producidas por las distintas cepas mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron 2×10^5 esporas en cada lectura. N=5, se repitió el experimento 4 veces de forma independiente.

7.8. Efecto de la mutación del gen *adh1* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.

Para corroborar que la ausencia de la actividad de Adh1 en *M. circinelloides* está relacionada con la virulencia, se realizaron ensayos en el modelo de estudio *C. elegans* utilizando diferentes concentraciones de esporas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺ (**Fig. 13A**), y cada ensayo se realizó con 15 nematodos aproximadamente, en medio Lee suplementado con leucina. La **Fig. 13A** muestra que los nematodos incubados con 10,000 esporas con la cepa silvestre (R7B), a las 24 horas presentan aproximadamente un 75% de supervivencia y que los nematodos incubados con la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ muestran una tendencia similar; en cambio, los nematodos incubados con la cepa mutante *adh1*⁻ (M5) mostraron únicamente un 40% de supervivencia, es decir, la mutación en el gen *adh1* conduce a un aumento en la virulencia en el mismo lapso de tiempo. Asimismo, se realizó este mismo ensayo, aumentando la dosis de esporas para cada pozo a 100,000 esporas (**Fig. 13B**), observándose resultados muy similares al caso anterior, en donde con las cepas silvestre y complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ se observa, aproximadamente, un 75% de supervivencia de los nematodos; en cambio, con la cepa mutante *adh1*⁻ (M5), se observó solamente el 35% de nematodos vivos, a las 24 horas post inoculación. De este modo, se concluye que en *M. circinelloides* la ausencia de actividad de Adh1 también generó un aumento de la virulencia hacia el nematodo *C. elegans*.

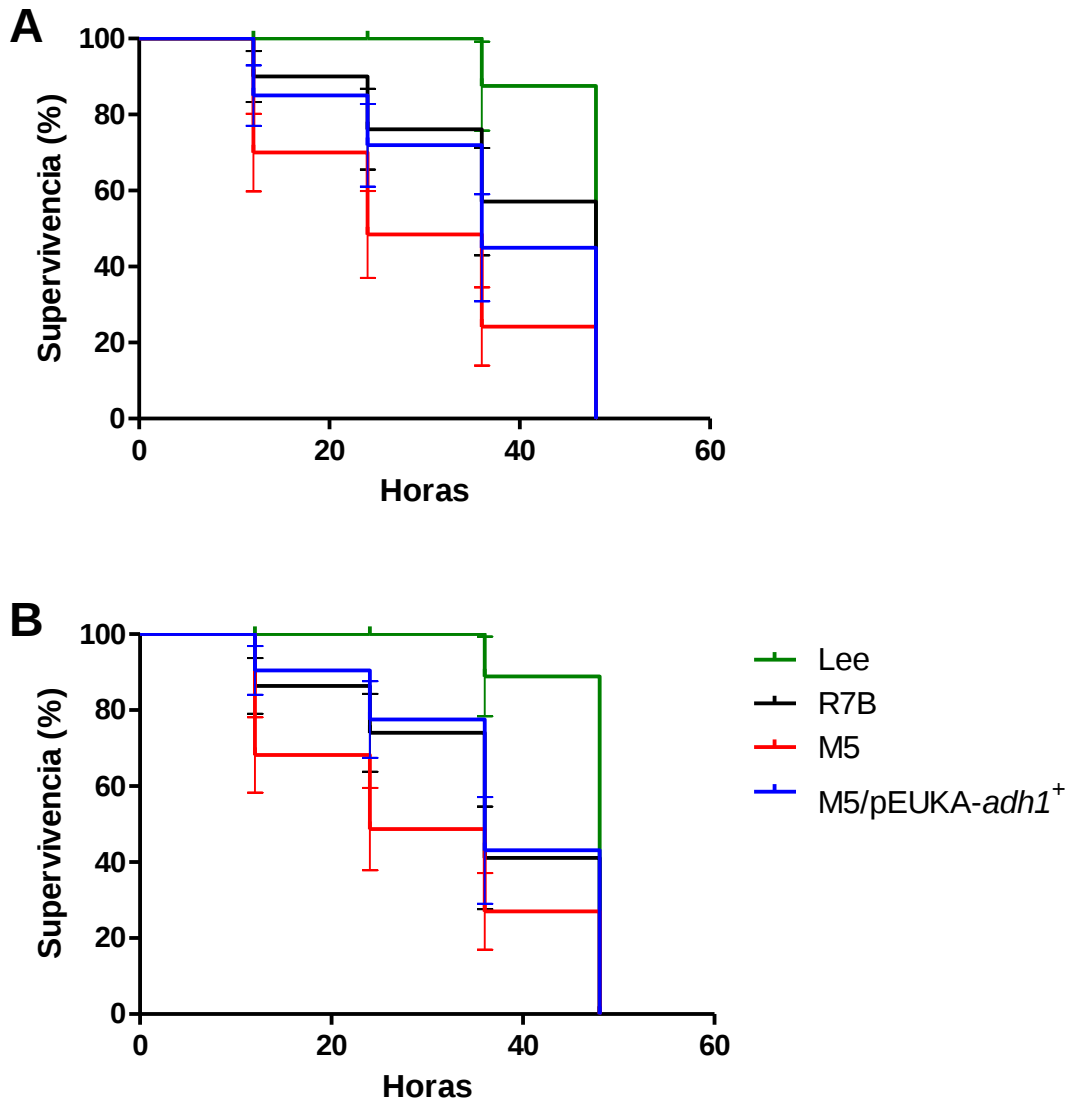


Figura 13. Efecto de la mutación del gen *adh1* de *M. circinelloides* en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*. Se inocularon 10,000 esporas (A) y 100,000 esporas (B) de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺ por pozo en medio Lee suplementado con leucina, se observaron cada 6, 12, 24, 36 y 48 horas. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 6 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$

7.9. Efecto de la mutación del gen *adh1* de *M. circinelloides* en el grado de invasividad a *Mus musculus*.

7.9.1. Determinación de la invasividad de *M. circinelloides* en *Mus musculus* mediante qPCR.

Con la finalidad de determinar el nivel de invasividad de *M. circinelloides* en el ratón, se cuantificó la carga fúngica en cada tejido de ratón infectados con las distintas cepas de *M. circinelloides*, para lo cual se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Primeramente, se determinaron los niveles del contenido de β -actina de los diversos órganos en el ratón, con lo que se corroboró que se usó la misma cantidad de material genético en los tejidos analizados, dichas muestras fueron posteriormente usadas en la detección del gen *tfc-1* del hongo. Se determinó el ciclo de amplificación de cada muestra de tejido, lo que representa los niveles de DNA presentes (Cq), observando que no hay diferencias significativas (**Fig. 14**) entre los diversos tejidos infectados con las distintas cepas de *M. circinelloides*, obteniendo de este modo la carga uniforme del material genético de los distintos tejidos del ratón bajo las distintas condiciones ensayadas.

Además, se cuantificó la carga fúngica en cada tejido para determinar el grado de invasividad de *M. circinelloides* en el ratón, esto fue evaluado con la sonda correspondiente al gen *tfc-1*, el cual es un gen normalizador de expresión constitutiva de *M. circinelloides*. Se realizó la cuantificación por PCR en tiempo real en tejidos de ratón. La cuantificación de los niveles de *tfc-1* demostraron que la cepa mutante infectó más en comparación con la cepa silvestre en todos los órganos del ratón (**Fig. 15A**). En los cerebros de ratones infectados con la cepa mutante (M5) mostró una mayor infección (5 veces más) que la cepa silvestre (R7B); mientras que en los pulmones se observó 50 veces más material genético de la cepa mutante respecto a la cepa silvestre. En cambio aunque en el bazo en términos generales los niveles del gen *tfc1* son bajos en ambas cepas, se detectó más material genético de la cepa mutante (3 veces más). Por lo tanto, 24 horas post-infección, la cepa mutante (M5) de *M. circinelloides* llegó a invadir más los tejidos de ratón principalmente los pulmones y el hígado.

Asimismo, a las 48 horas post-infección de *Mus musculus*, la tendencia fue similar, en el sentido de que la cepa mutante invadió más los tejidos del ratón que la cepa silvestre, sin embargo, los niveles de DNA aumentaron 50 veces más en hígado, en comparación a las 24 horas post-infección. Por lo tanto, la ausencia del gen *adh1* en *M. circinelloides* produjo un aumento en la invasividad a todos los órganos analizados de *M. musculus*, principalmente en hígado.

Para confirmar que dicho aumento en la invasividad era debido únicamente a la ausencia del gen *adh1*, se compararon la carga fúngica de la cepa silvestre (R7B) y la cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺); en la **Fig. 16** se observó que tanto en cerebro en el cual los niveles detectados de material genético del hongo son relativamente bajos, y así como en el hígado, en donde se observaron los niveles más altos de infección por la cepa mutante respecto a la cepa silvestre, interesantemente no se observó una diferencia significativa entre las dos cepas con actividad funcional de *adh1*. Por lo que, con este dato sugiere fuertemente que la ausencia del gen *adh1* participa aumentando la invasión a tejidos internos del ratón.

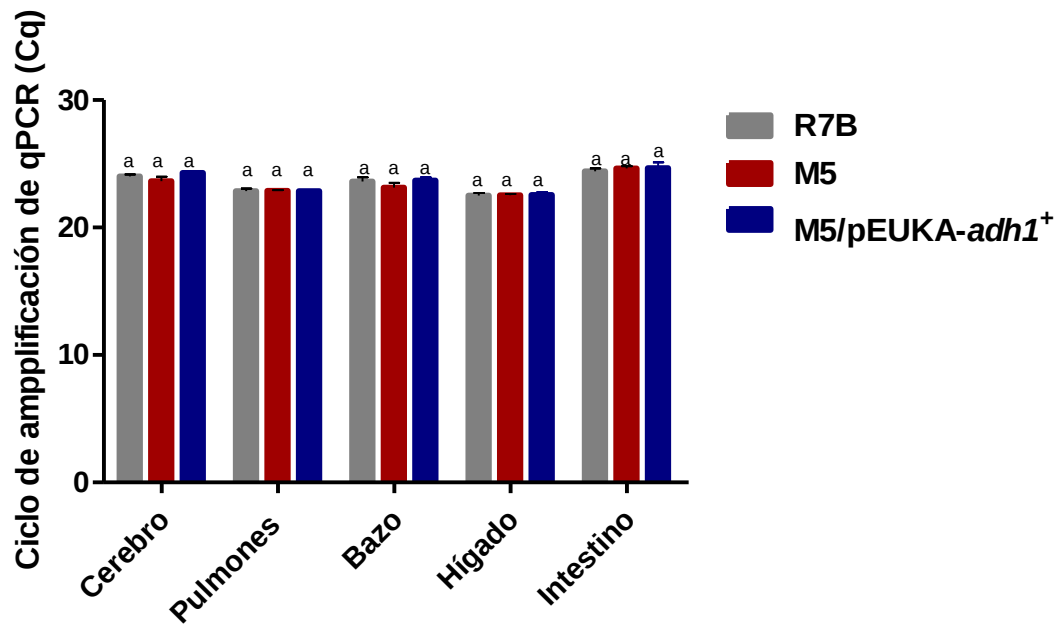


Figura 14. Control de carga del material genético de *Mus musculus* cuantificando el gen β - actina en los distintos tejidos. Se colocaron 500 ng de tejido (cerebro, pulmones, bazo, hígado e intestino), extraídos post-infección de *Mus musculus* de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-adh1⁺. Se cuantificaron por PCR en tiempo real con la sonda de β -actina. N=5 ratones para cada ensayo, se repitió 3 veces. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, *p<0.05.

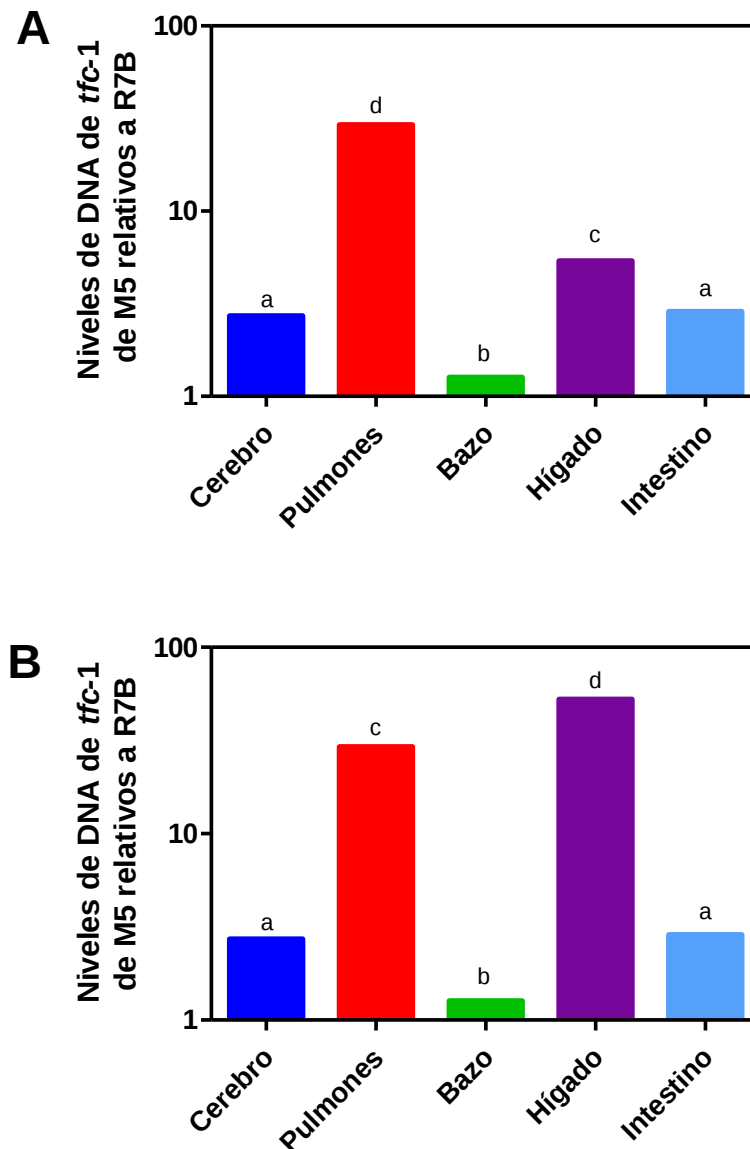


Figura 15. Determinación mediante qPCR de la invasividad de las distintas cepas de *M. circinelloides* a tejidos de *Mus musculus*. Se colocaron 500 ng de tejido (cerebro, pulmones, bazo, hígado e intestino), extraídos a 24 horas **(A)** y 48 horas **(B)** post-infección de *Mus musculus* de las cepas R7B y M5. Se cuantificaron los niveles del gen usando *tfc-1* de *M. circinelloides* por PCR en tiempo real en los diversos tejidos de *M. musculus* (curva carga de DNA fue previamente analizada y uniformizada). Se graficaron los niveles relativos de DNA de la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre de *M. circinelloides* en cada uno de los tejidos. N=5 ratones para cada ensayo, se repitió 3 veces. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

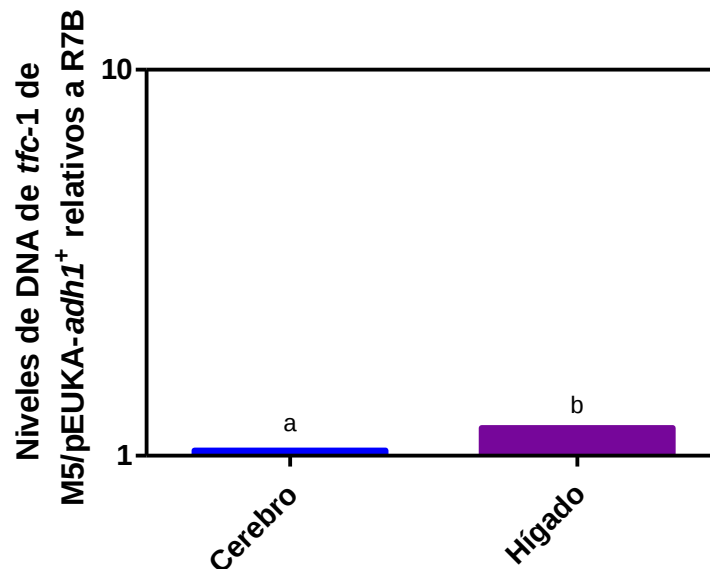


Figura 16. Comparación de DNA de *tfc-1* de cepas con el gen *adh1* en tejidos de *Mus musculus* infectados con *M. circinelloides*. Se colocaron 500 ng de tejido (cerebro, e hígado), extraídos a 120 horas post-infección de *Mus musculus* de las cepas R7B y M5/pEUKA-*adh1*⁺. Se cuantificaron los niveles del gen usando *tfc-1* de *M. circinelloides* por PCR en tiempo real en los diversos tejidos de *M. musculus* (curva carga de DNA fue previamente analizada y uniformizada). Se graficaron los niveles relativos de DNA de la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre de *M. circinelloides* en cada uno de los tejidos. N=5 ratones para cada ensayo, se repitió 3 veces. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, *p<0.05.

7.9.2. Análisis histológico de la presencia de *M. circinelloides* en tejidos de *Mus musculus*.

Con el propósito de identificar la morfología con la cual *M. circinelloides* infecta a los distintos órganos del ratón, se realizaron cortes histológicos, y se tiñeron con metenamina de plata de Grocott (GMS), la cual es una tinción diferencial que tiñe la pared celular de los hongos debido a que son ricas en polisacáridos, los cuales son convertidos a aldehídos por oxidación del ácido crómico, provocando la reducción de plata en la pared celular, de esta forma tiñe todo el hongo a una coloración de café a negra (**Grocott, 1955**).

Se observaron únicamente hifas en todos los órganos infectados con las distintas cepas de *M. circinelloides* (R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺) (**Fig. 17**). El cerebro y el bazo proveniente de los ratones infectados con las distintas cepas, mostraron una menor presencia del hongo, lo cual concuerda con los datos obtenidos a nivel molecular, en donde se detectó una menor cantidad de material genético del hongo, aunque fue la cepa mutante (M5) la que más invadió en todos los casos analizados (**Fig. 15**). Sin embargo, al comparar los tejidos pulmonares de los ratones infectados con las distintas cepas, se distingue una mayor cantidad de hifas en la cepa tipo mutante (M5), en comparación con las demás cepas; asimismo, es mayor la cantidad de hifas en hígados de ratones infectados con la cepa mutante M5, en relación a la cepas que tienen activa la enzima *Adh1* (R7B y M5/pEUKA-*adh1*⁺). Por lo que estos datos, concuerdan con los datos obtenidos a nivel molecular, confirmando que la carencia de actividad enzimática *adh1* contribuye en la patogénesis, invadiendo en forma de micelio a todos los órganos analizados, siendo considerablemente mayor la infección en el hígado y los pulmones de ratón.

7.10. Respuesta inflamatoria en tejidos de *Mus musculus* post-infección con *M. circinelloides*.

7.10.1. Determinación por histopatología de la respuesta inflamatoria en tejidos de *Mus musculus*.

Asimismo, para determinar la generación de una posible respuesta inflamatoria durante el proceso infeccioso en el ratón con las distintas cepas de *M. circinelloides* de ratón, se realizaron cortes histológicos de cerebro, pulmón, bazo e hígado de ratones infectados (48 horas) con las cepas R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺, las cuales fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) (**Fig. 18**).

Se observaron la presencia de las células gliales pequeñas sin inflamación en los tejidos de cerebro provenientes de ratones infectados con las cepas con actividad de *Adh1* (R7B y M5/pEUKA-*adh1*⁺), en cambio cortes de tejido cerebral provenientes de ratones infectados con la cepa carente de actividad de *Adh1* (M5) se observó una gliosis reactiva, es decir, las células gliales que son las células que dan soporte a las neuronas además de ayudar a las neuronas en el procesamiento cerebral, por lo que estas células gliales se observaron modificadas y pudiendo generar lesiones severas en el SNC. Por otra parte, en tejido pulmonar de ratones infectados con las cepas silvestre y complementada, se observó una morfología normal de los alveolos, es decir estos presentan la forma característica de rombos, apreciándose pocos eritrocitos infiltrados en el tejido pulmonar; mientras que los pulmones de ratones infectados con la cepa mutante, se observó el tejido más inflamado respecto a las cepas con actividad de *Adh1*, así como también se observó una congestión vascular asociada a elementos micóticos de características morfológicas correspondientes a hifas de *M. circinelloides*, además de una ruptura de los septos alveolares sin retracción, lo cual pudo generar una disfunción en la capacidad respiratoria de estos ratones (posible paro bronco respiratorio).

Asimismo, en el caso del tejido proveniente del bazo se observó un tejido sano en los ratones infectados con las cepas con actividad de *Adh1* funcional, debido a que los núcleos de las células teñidas con color morado no muestran ninguna

diferencia del parénquima del bazo, esta parte del bazo se divide en dos una pulpa blanca que actúa como sistema inmunológico de defensa como fuente de linfocitos y anticuerpos, además de una pulpa roja donde se encuentran principalmente las células sanguíneas actuando como filtro para limpiar la sangre de glóbulos rojos dañados así como para eliminar antígenos. Sin embargo, el bazo proveniente de ratones infectados con la cepa M5 mostró un aumento de la pulpa blanca lo que refleja un proceso indicando una inflamación aguda. Por último, en el tejido hepático proveniente de ratones infectados con las cepas silvestre y complementada se apreciaron hepatocitos de mayor tamaño ocasionando una inflamación muy ligera, sin embargo no muestran alguna diferencia en su morfología respecto a ratones no infectados. Mientras que aquellos ratones infectados con la cepa M5, los hepatocitos mostraron cambios como es la presencia de binucleosomas y aumento de tamaño, con presencia de linfocitos, además se observó una congestión vascular produciendo una inflamación del tejido. De esta forma, podemos concluir que la infección del ratón con la cepa mutante carente de actividad de Adh1 condujo a un proceso inflamatorio en todos los tejidos analizados.

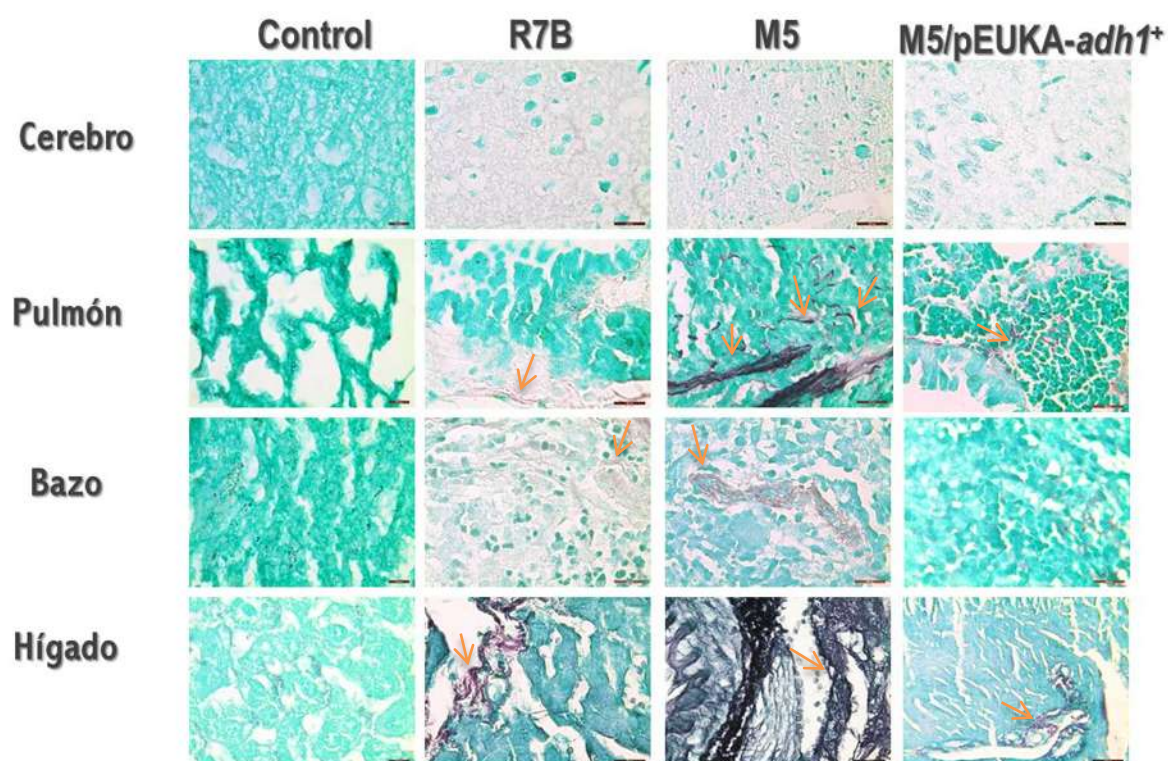


Figura 17. Representación histológica del grado de invasividad de *M. circinelloides* en tejidos de *Mus musculus*. Se realizaron cortes histológicos, a órganos como cerebro, pulmón, bazo e hígado extraídos a 48 horas post-infección de *Mus musculus* de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺. Se fijaron y se tiñeron con GMS. Imágenes representativas tomadas con un microscopio binocular a 100x. Las flechas muestran la morfología hifal de *M. circinelloides*. Barra= 200µm.

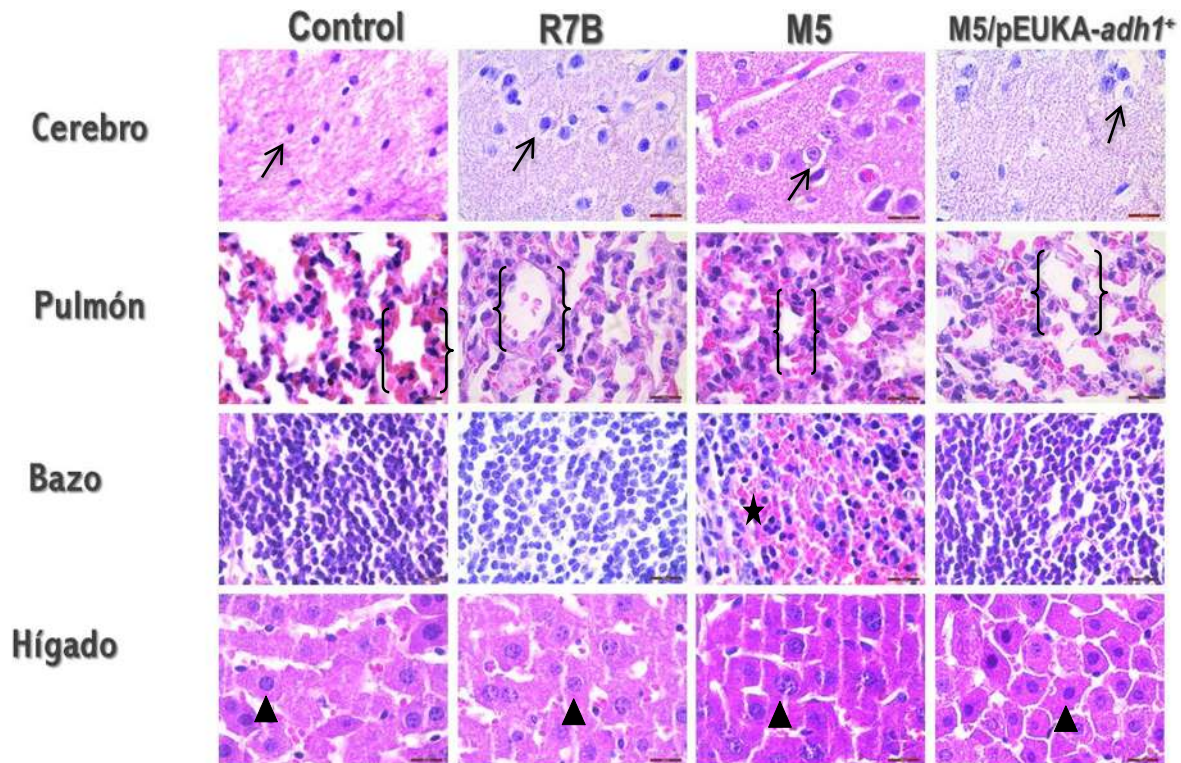
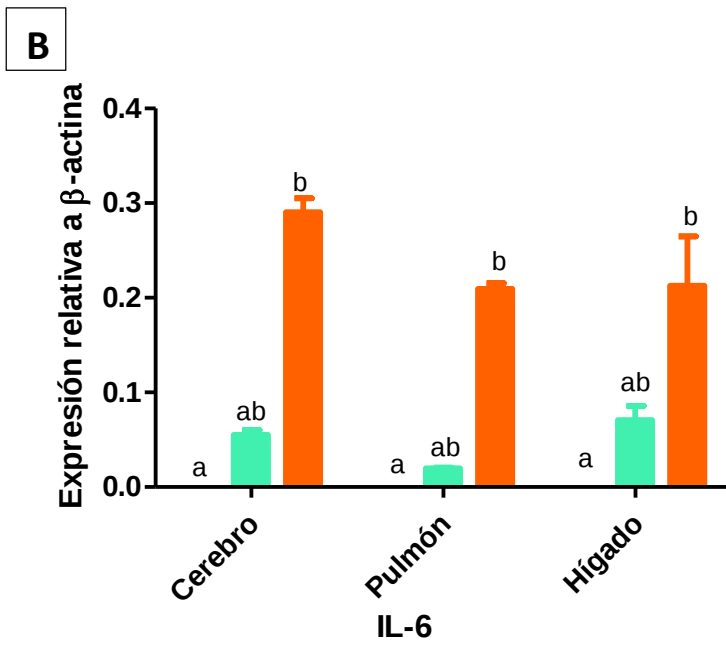
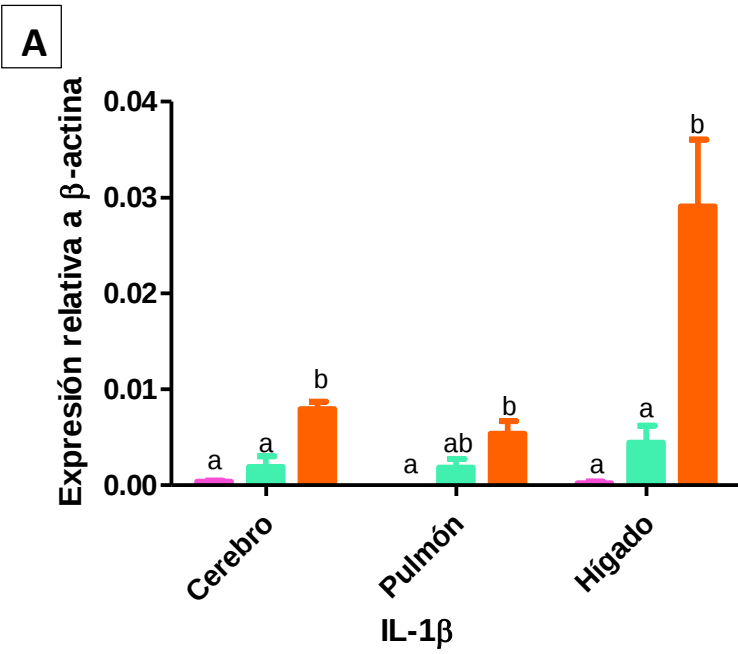


Figura 18. Análisis histológico en diversos tejidos de *Mus musculus* posterior a la infección de *M. circinelloides*. Se realizaron cortes histológicos de órganos de *Mus musculus* (cerebro, pulmón, bazo e hígado) extraídos a 48 horas post-infección de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺. Se fijaron y se tiñeron con H&E. Las flechas muestran las células gliales en cerebro, entre corchetes se muestran la forma alveolar romboide de pulmones, las estrellas muestran los eritrocitos invadiendo el bazo, y el triángulo muestra los hepatocitos del hígado. Imágenes representativas tomadas con un microscopio binocular a 100x. Barra= 200µm.

7.10.2. Niveles de los marcadores de inflamación (IL1- β , IL-6 Y MIP-2) en tejidos de *Mus musculus* posterior a la infección con *M. circinelloides*.

Debido a que en el análisis histológico se observó un aumento aparentemente en el proceso inflamatorio a consecuencia de la infección con la cepa ausente de actividad *adh1*, por lo que se cuantificó la expresión de los principales marcadores de inflamación en los tejidos del ratón (cerebro, pulmón e hígado), infectados con la cepa silvestre (R7B) y la cepa ausente con actividad alcohol deshidrogenasa (M5), después de 48 horas post-inoculación. Se aisló el RNA y se procesó por qRT-PCR con la sonda perteneciente a la citocinas mediadoras de la respuesta inflamatoria IL-1 β (interleucina-1 isoforma β), IL-6 (interleucina 6) y MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófagos tipo 2, homólogo de la IL-8 en humanos) de ratón. Se obtuvo que los niveles de RNAm de la citocina IL-1 β fue 5 veces más para M5 que para la cepa R7B para el caso de cerebro, mientras que en pulmón solamente fue 3 veces más cantidad de esta citocina en la cepa mutante que en la cepa silvestre, y en cambio en el hígado se presentó 20 veces más la citocina IL-1 β (**Fig. 19A**) en ratones infectados con la cepa carente de actividad alcohol deshidrogenasa (M5) respecto a la cepa silvestre (R7B). Asimismo, al medir la respuesta inflamatoria con la sonda IL-6 (**Fig. 19B**) hay mayor expresión en cerebro (6 veces) y pulmón (4 veces) de la cepa mutante (M5) en comparación con la cepa silvestre (R7B), en cambio en el hígado se observó una menor diferencia de expresión siendo solo 2 veces mayor la cantidad que expresó la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre. Además se cuantificó los niveles de expresión del gen MIP-2 (**Fig. 19C**) en los tejidos infectados con las diferentes cepas donde se expresó tanto en cerebro, pulmón e hígado sólo menos del 50% en tejidos infectados con la cepa silvestre (R7B) respecto a la cepa mutante (M5); cabe hacer mencion que los animales sin infectar se detectaron niveles muy bajos de RNAm de estos genes. Determinando de este modo que la ausencia del gen *adh1* en *M. circinelloides* incrementa la invasividad así como la inflamación de órganos de *Mus musculus*.



C

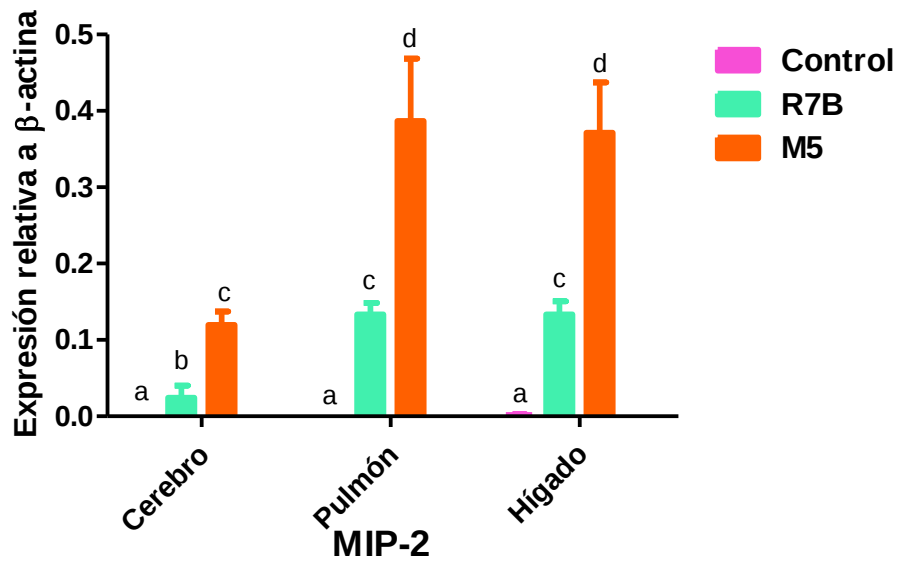


Figura 19. Análisis de expresión de marcadores de inflamación de los tejidos infectados con las cepas de *M. circinelloides*. Se cuantificaron los niveles de expresión usando IL-1 β (A), IL-6 (B) y MIP-2 (C) de *M. circinelloides* por PCR en tiempo real en los diversos tejidos de *M. musculus* (curva carga de DNA fue previamente analizada y uniformizada). Se graficaron los niveles de expresión del gen β -actina comparados con las diferentes cepas de *M. circinelloides* en cada uno de los tejidos. N=5 ratones para cada ensayo, se repitió 3 veces. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

7.11. Efecto del sobrenadante de *M. circinelloides* en la supervivencia de *C. elegans*.

Con el fin de determinar si la mutación en el gen *adh1* en *M. circinelloides* está produciendo algún compuesto excretable, el cual pudiera estar vinculado con el aumento de la virulencia, se realizaron ensayos en *C. elegans* con los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos crecidos en condiciones aerobias en medio Lee (12 y 24 horas) de las distintas cepas de *M. circinelloides* (R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺). Se colocó 1 ml del sobrenadante en cada uno de los pozos, posteriormente se colocaron 15 nematodos por pozo; como control negativo se utilizó solamente medio de cultivo Lee estéril donde el 100% de los nematodos se mantuvieron vivos durante todo el ensayo. Se observó que el sobrenadante de la cepa R7B a las 12 horas (**Fig. 20A**), mostró el 75% de nematodos vivos, así como el sobrenadante de la cepa M5/pEUKA-*adh1*⁺ que siguió la misma tendencia; en cambio, el sobrenadante de la cepa M5 mostró un 30% de supervivencia (niveles similares de supervivencia observados en los ensayos con esporas frente al nematodo, tanto para las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺). Asimismo, se realizó un ensayo utilizando el sobrenadante de 24 horas (**Fig. 20B**), observando la misma tendencia que ocurrió con el sobrenadante de 12 horas. Estas observaciones sugieren que *M. circinelloides* produce compuestos excretables asociados con la virulencia, los cuales se incrementan cuando los niveles de actividad de Adh1 están ausentes.

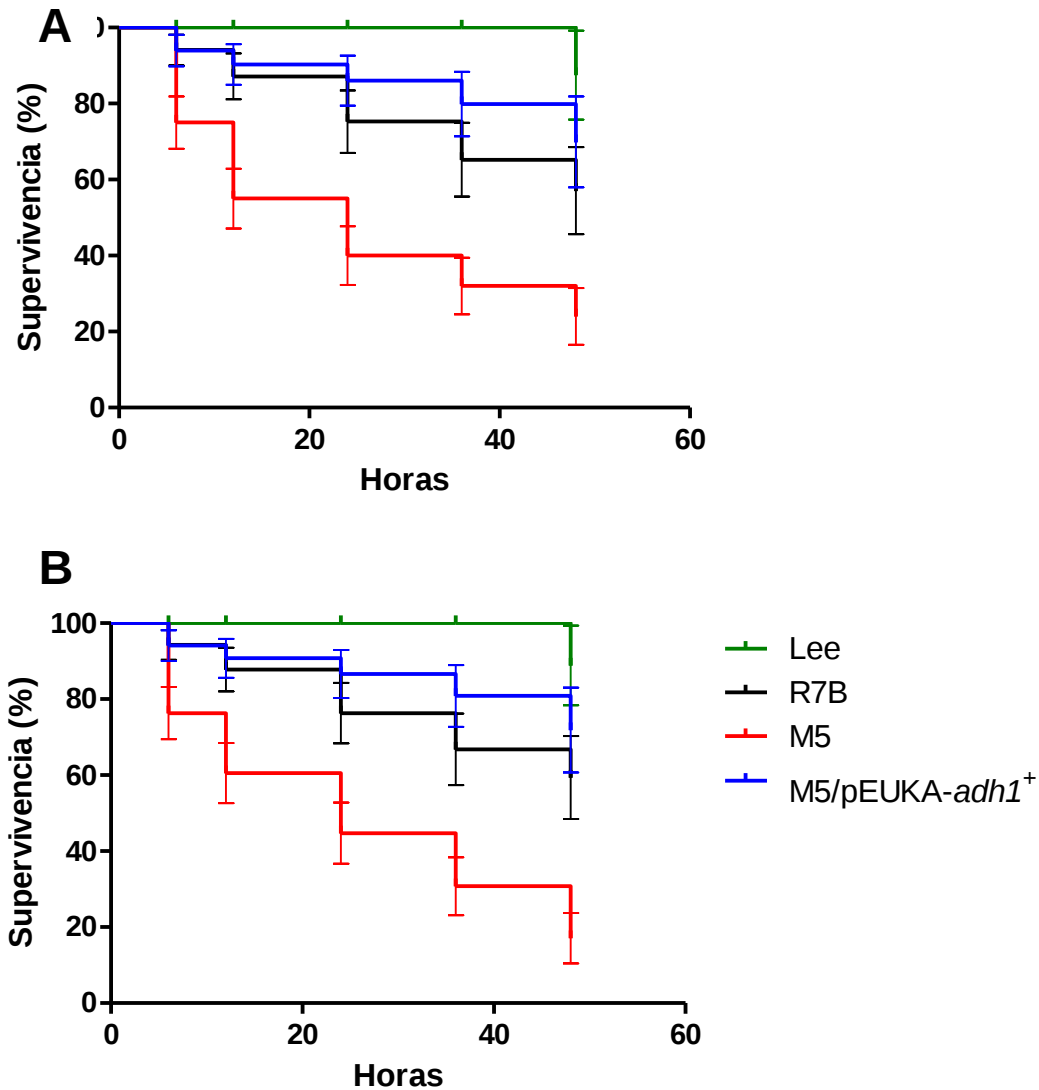


Figura 20. Efecto del sobrenadante de *M. circinelloides* en la supervivencia de *C. elegans*. Se usaron sobrenadantes de cultivos previamente crecidos en medio Lee suplementado con leucina de las distintas cepas de *M. circinelloides* (R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺) las cuales fueron crecidas en condiciones aerobias, tanto por 12 horas **(A)** y por 24 horas **(B)**. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 6 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.

7.12. Análisis del efecto de proteasas o temperatura en la toxicidad del sobrenadante de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de determinar si existía un componente proteico excretable, responsable del efecto de toxicidad del sobrenadante, se procedió a colocar en el medio estéril Lee (control), así como en el sobrenadante (1 mL) de cada una de las cepas de *M. circinelloides* una concentración de 20 mg de pronasa E, los cuales fueron incubados por 2 horas a 37°C. El sobrenadante de la cepa M5 mostró la mismos niveles (80% de sobrevivencia) de toxicidad que la cepa R7B (**Fig. 21A**), mientras que el sobrenadante de la cepa complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ mostró un nivel ligeramente menos tóxico, presentando un 80% de supervivencia a las 48 horas. La misma tendencia fue observada con los sobrenadantes tomados a las 24 horas de germinación aerobia (**Fig.21B**). Por lo tanto, de esta manera se observó un efecto de inhibición de la toxicidad del sobrenadante de la cepa mutante en presencia de la proteasa e incubada a 37°C, sin embargo para descartar que el efecto de inhibición no fuera debido a la temperatura, se procedieron a realizar ensayos complementarios en donde se incubó el sobrenadante de cultivo a distintas temperaturas en ausencia de la proteasa.

Con la finalidad de determinar si las moléculas presentes en el sobrenadante proveniente de la germinación aerobia de la mutante en el gen *adh1* (M5) son compuestos termosensibles, los sobrenadantes de 12 horas (**Fig. 22A y Fig. 22C**) y de 24 horas (**Fig. 22B y Fig. 22D**), fueron incubados a 37°C y 25°C por 2 horas. Se observó que en ambas temperaturas, el efecto en el aumento de la virulencia del sobrenadante proveniente de la cepa mutante *adh1*⁻ (M5) se ve anulado, es decir, tanto la cepa silvestre (R7B) y la mutante (M5) muestran un comportamiento similar en términos de virulencia, generando aproximadamente un 70% de sobrevivencia de los nematodos a las 48 horas; incluso, la cepa complementada M5/pEUKA--*adh1*⁺ disminuyó más aún la virulencia (aproximadamente un 90% de sobrevivencia) respecto a la cepa silvestre al mismo tiempo ensayado. Estas observaciones indican que la ausencia de actividad alcohol deshidrogenasa (Adh1) generó moléculas termolábiles en el sobrenadante de cultivo y no es la

presencia de la proteasa la que genero el efecto de inhibición de la toxicidad del sobrenadante de la mutante.

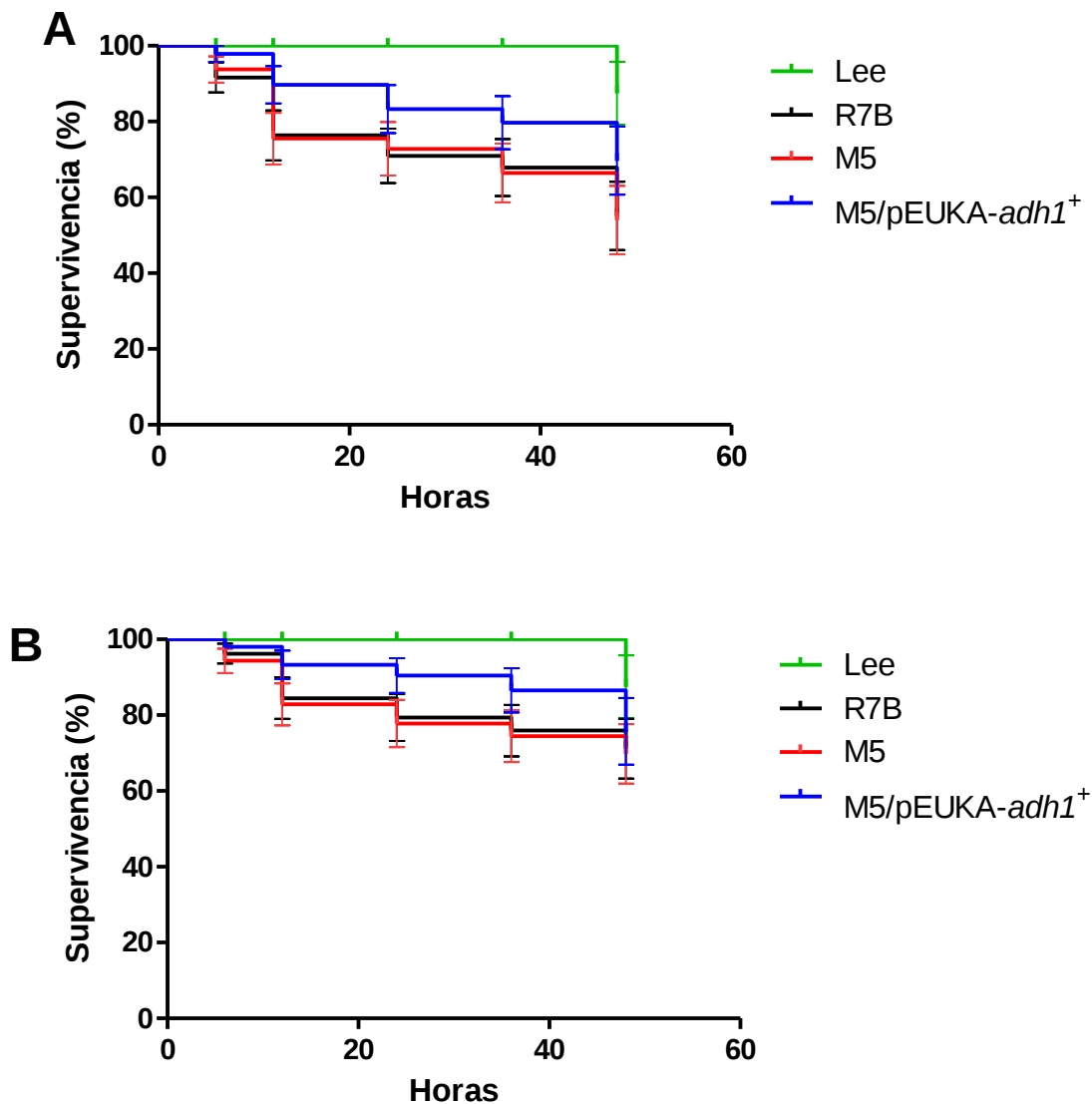
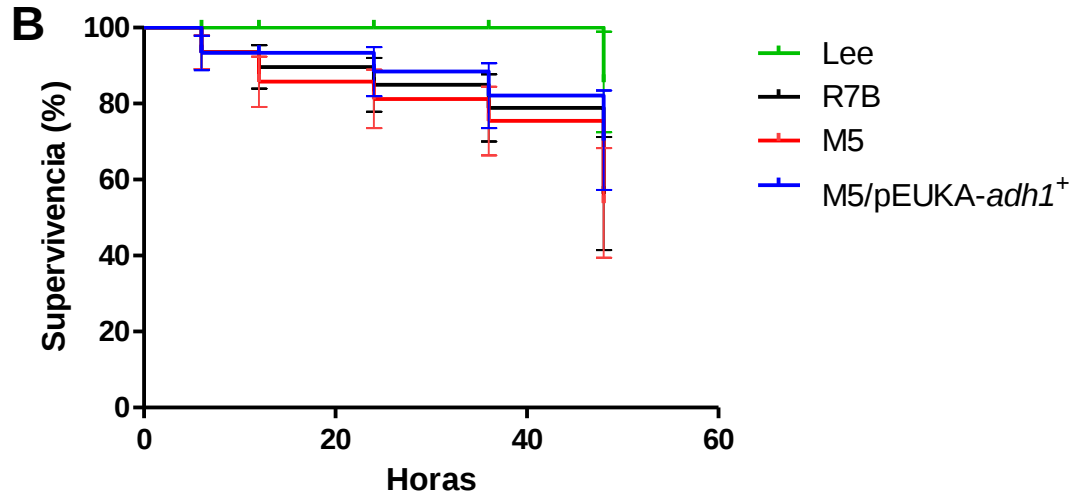
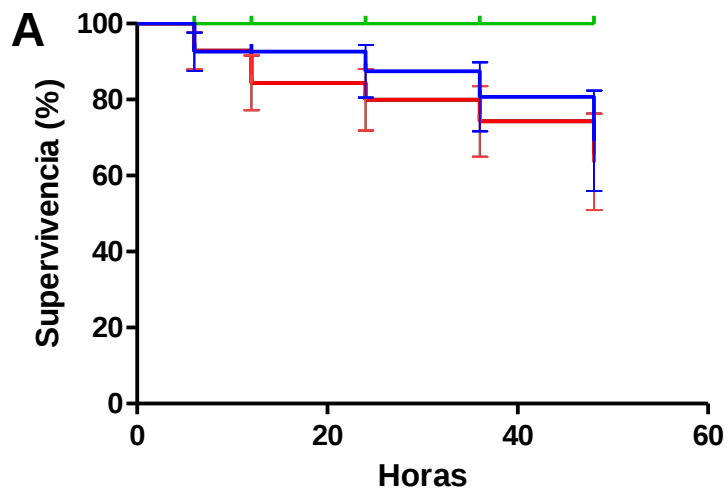


Figura 21. Efecto del tratamiento con pronasa E sobre el efecto de toxicidad del sobrenadante de *M. circinelloides* en *C. elegans*. Se colocó una concentración de 20 mg de pronasa en el sobrenadante de 12 horas (A) y de 24 horas (B). Posteriormente, se evaluó la supervivencia de *C. elegans* cada 6, 12, 24, 36, y 48 horas. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 6 veces de forma independiente Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.



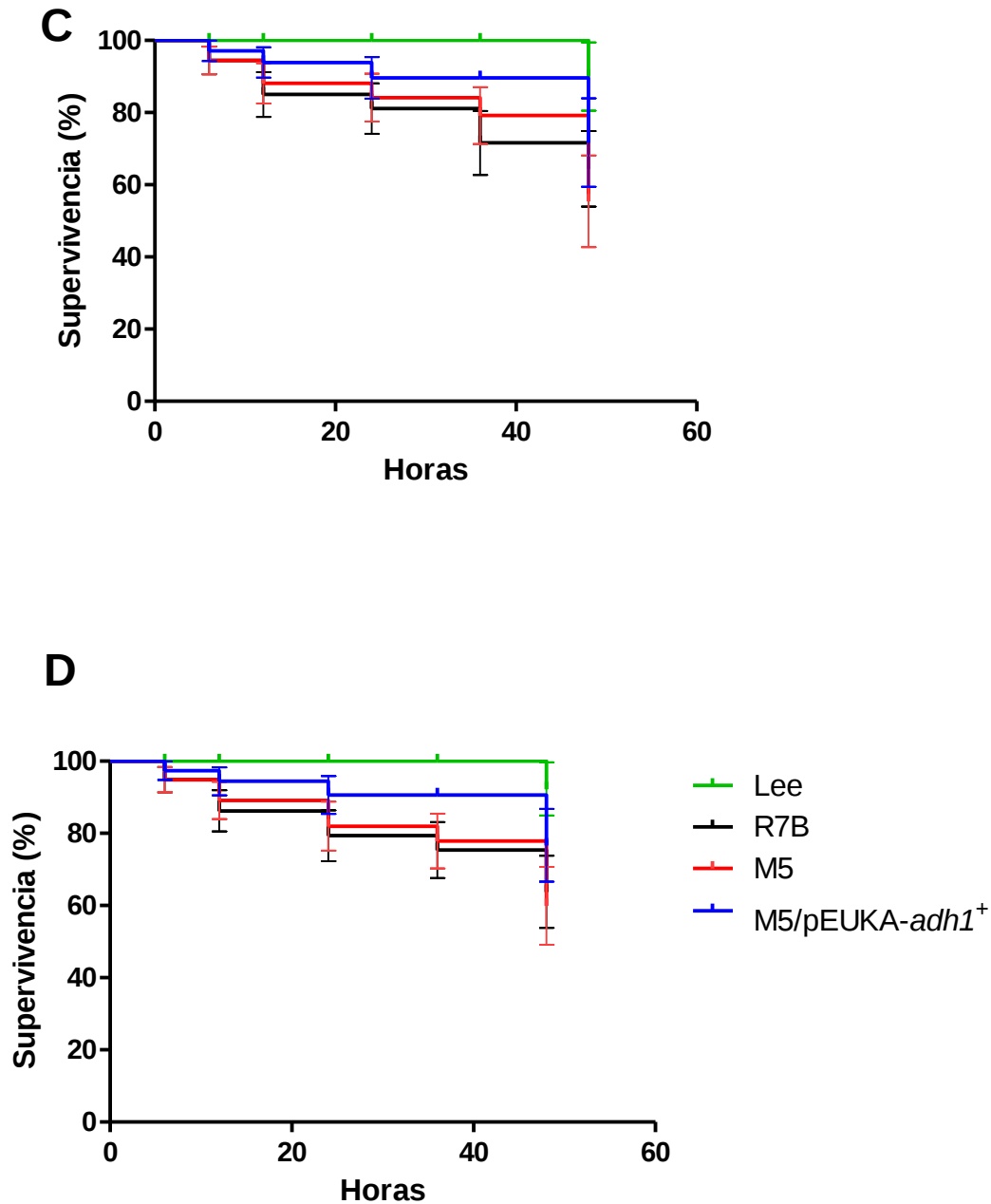


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre el sobrenadante de *M. circumeloides* en la toxicidad hacia *C. elegans*. Se colocó el sobrenadante de 12 horas a 25°C **(A)** y a 37°C **(B)**, así como, el sobrenadante de 24 horas a 25°C **(C)** y a 37°C **(D)** por espacio de 3 horas. Posteriormente, se evaluó la supervivencia de *C. elegans* cada 6, 12, 24, 36, y 48 horas. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 6 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.

7.13. Efecto de la ausencia del gen *adh1* en la producción de acetaldehído.

Debido a que la cepa mutante produce muy poca cantidad de etanol por la carencia de la actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa (**Fig. 10A**), lo cual puede generar a una acumulación de acetaldehído al no efectuarse la conversión de acetaldehído a etanol (**Fig. 3**). Por lo tanto, se procedió a conocer si la mutante *adh1⁻* de *M. circinelloides* es capaz de producir una mayor cantidad de acetaldehído respecto a las cepas silvestre y complementada, por lo que se cuantificó el acetaldehído del sobrenadante en aerobiosis del gen *adh1* por CG-FID. Se observó que la cepa silvestre (R7B) no produce acetaldehído, en comparación con la cepa carente de actividad alcohol deshidrogenasa (M5), sin embargo, la cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1⁺*) produjo menos del 30% del acetaldehído producido por la mutante, debido a que esta cepa el plásmido que complementa la mutación *adh1* es mitóticamente inestable comportándose como una cepa heterocarionte (**Fig. 23**); con estos resultados se concluye que la ausencia de actividad enzimática de alcohol deshidrogenasa conlleva a un aumento en la producción de acetaldehído.

7.14. Efecto del acetaldehído en la germinación aerobia en la mutante *adh1⁻* de *M. circinelloides*.

Debido a que el sobrenadante de la cepa mutante M5 posee un mayor nivel de toxicidad respecto a la cepa silvestre, además de que dicho efecto es debido a un compuesto termolábil a 25°C y que la mutación presente en la cepa afecta la actividad de una Adh fermentativa (**Rangel Porras, 2003**) y generó una mayor acumulación de acetaldehído, se determinó el efecto tóxico del acetaldehído en la germinación de las distintas cepas de *M. circinelloides*. Para esto, se preparó medio YPG con distintas concentraciones de acetaldehído (17.8 mM, 35.7 mM y 71.5 mM) (Sigma-Aldrich) y se inoculó con esporas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1⁺*; posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células germinadas de cada una de las cepas, a las 4 y 6 horas. Como se muestra en la **Fig. 24A**, a las 4 horas de crecimiento aeróbico se observó que las cepas R7B y

M5/pEUKA-*adh1*⁺ mostraron una disminución del 20% y 15 %, respectivamente, en la germinación en medio con acetaldehído 18.7 mM, respecto al medio control sin acetaldehído. Por otra parte, la cepa mutante (M5) mostró una mínima disminución en la germinación (1%) en presencia de acetaldehído a la concentración de 18.7 mM, respecto al control sin acetaldehído al mismo tiempo ensayado. Además, este efecto también fue observado a las 6 horas de incubación, con una concentración de 17.8mM. Asimismo, al aumentar la concentración de acetaldehído a 35.7mM se observó que la cepa mutante mostró mayor porcentaje de germinación de hasta un 90%, y en cambio, las cepas con actividad de alcohol deshidrogenasa disminuyó el porcentaje de germinación; en cambio al aumentar la concentración de 71.5mM disminuyó la germinación en cada cepa, siendo tóxica para *M. circinelloides* (**Fig. 24B**). Una mayor germinación de la cepa mutante M5 en presencia de acetaldehído respecto a la cepa silvestre, sugiere que dicha mutante cuenta con un mecanismo de detoxificación de acetaldehído más eficiente que la cepa silvestre, siendo quizás la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Ald) la responsable de convertir acetaldehído a acetato; es posible que la acumulación de acetaldehído en la cepa mutante, por efecto de la mutación *adh1*, cause la inducción de los niveles de la Ald, siendo así más eficiente en convertir el mencionado compuesto a acetato.

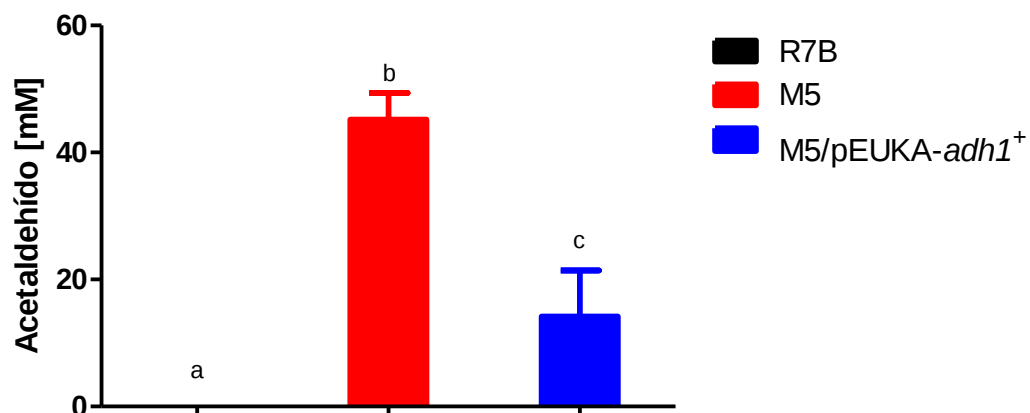


Figura 23. Efecto gen *adh1* en la producción de acetaldehído. Se utilizó el sobrenadante en aerobiosis en medio Lee con 5×10^5 esporas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺, posterior a 24 horas por CG-FID. N=5 para cada ensayo, se repitió 3 veces de forma independiente. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

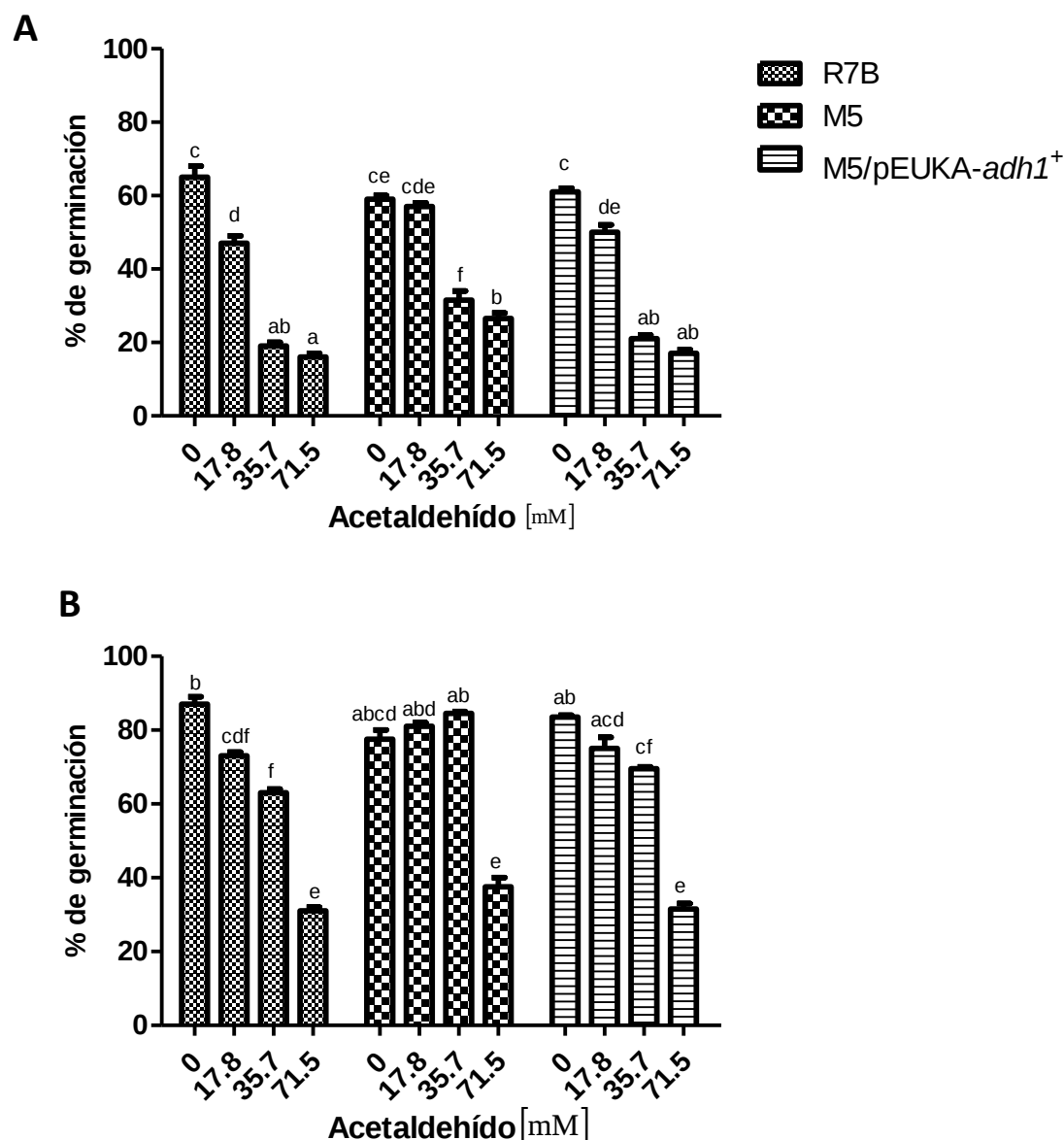


Figura 24. Efecto del acetaldehído en la germinación aerobia en las cepas R7B, M5 y complementada M5/pEUKA-*adh1*⁺ de *M. circinelloides*. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de acetaldehído en la germinación aerobia de las cepas indicadas; el efecto se cuantificó a las 4 horas **(A)** y las 6 horas **(B)** post-inoculación. N=5 para cada ensayo, se repitió 6 veces de forma independiente. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

7.15. Efecto del acetaldehído en la supervivencia de *C. elegans*.

Para determinar si el acetaldehído inhibía la supervivencia de *C. elegans*, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de acetaldehído (17.8 mM, 35.7 mM y 71.5 mM) en medio Lee. Se obtuvo el porcentaje de supervivencia para cada concentración de acetaldehído. Como se observa, en la **Fig.25**, en medio sin acetaldehído los nematodos se mantuvieron vivos hasta las 36 horas, mientras que el medio con 17.8 mM de acetaldehído muestra un 70% aproximadamente de supervivencia; sin embargo, el medio con 35.7 mM de acetaldehído únicamente tiene un 65% de supervivencia y el que contiene 71.5 mM de acetaldehído dio una tendencia de supervivencia de un 55%. Cabe hacer mención que aunque no se pudo cuantificar el movimiento de los nematodos, este fue más lento y errático respecto a la cepa sin acetaldehído y además este efecto aumento de forma dependiente a la concentración del acetaldehído. Esto indica que el acetaldehído es tóxico en estas concentraciones ensayadas para *C. elegans*.

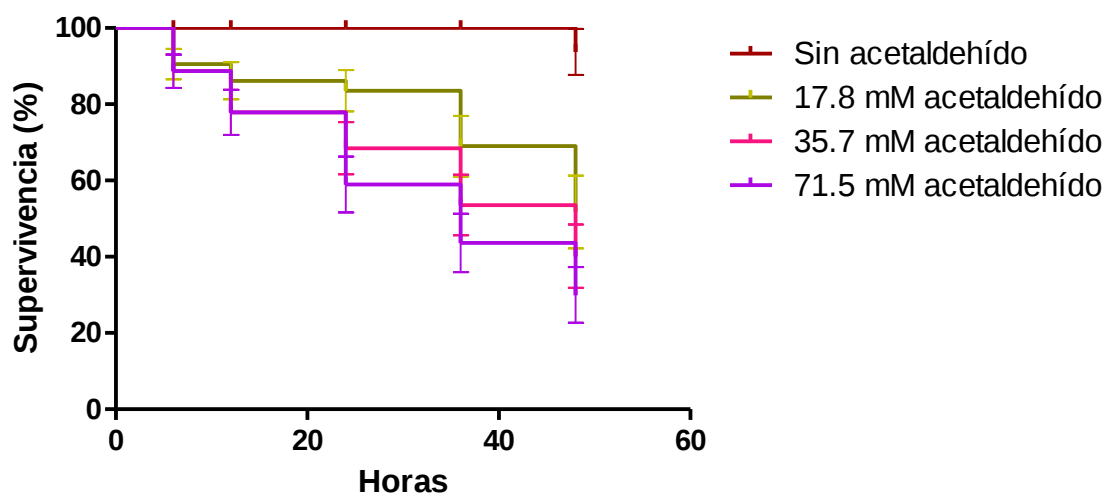


Figura 25. Efecto del acetaldehído en la supervivencia de *C. elegans*. Se colocó el medio Lee sin acetaldehído, y con diferentes concentraciones de acetaldehído (17.8mM, 35.7mM, y 71.5 mM). Posteriormente, se evaluó la supervivencia de *C. elegans* cada 6, 12, 24, 36, y 48 horas. N=15 nematodos para cada ensayo, se repitió el experimento 3 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.

7.16. Efecto del gen *adh1* en la producción de ácido acético.

Debido a que la cepa mutante (M5) de *M. circinelloides* generó una mayor cantidad de acetaldehído en el sobrenadante, se quiso conocer si dicha mutante contaba con algún mecanismo de detoxificación del acetaldehído, ya que este es una molécula altamente oxidante. Por lo tanto, se procedió a cuantificar el acetato en el sobrenadante de las distintas cepas, el acetato puede generarse a partir del acetaldehído por medio de la enzima acetaldehído deshidrogenasa. Se procedió evaluar la cantidad de ácido acético producido por las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺ en germinación aerobia por CG-FID (**Fig. 26A**) y por el método de acuerdo a la NMX-V-015-NORMEX-2014 (**Fig. 26B**). De acuerdo a lo observado por CG-FID, la cepa silvestre y la cepa complementada con el gen *adh1* producen 2 veces menos acetato que la cepa mutante a las 24 horas post-incubación. Asimismo, se realizó una curva de producción de ácido acético tomando el sobrenadante aerobio a las 6, 12, 18, y 24 horas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺, por el método de la norma NMX-V-015-NORMEX-2014, donde se obtuvo una menor cantidad producida por la cepa silvestre (R7B) y la cepa complementada (M5/pEUKA-*adh1*⁺) aproximadamente 0.3 g/L, pero la cepa mutante carente de actividad alcohol deshidrogenasa produjo hasta 1g/L de ácido acético al aumentar el tiempo de incubación a 24 horas. Por lo que, la ausencia de actividad alcohol deshidrogenasa aumentó la producción de ácido acético, este puede ser el mecanismo por el cual la cepa mutante detoxifica la acumulación de acetaldehído para evadir su toxicidad y como consecuencia poder germinar más rápido respecto a la cepa silvestre.

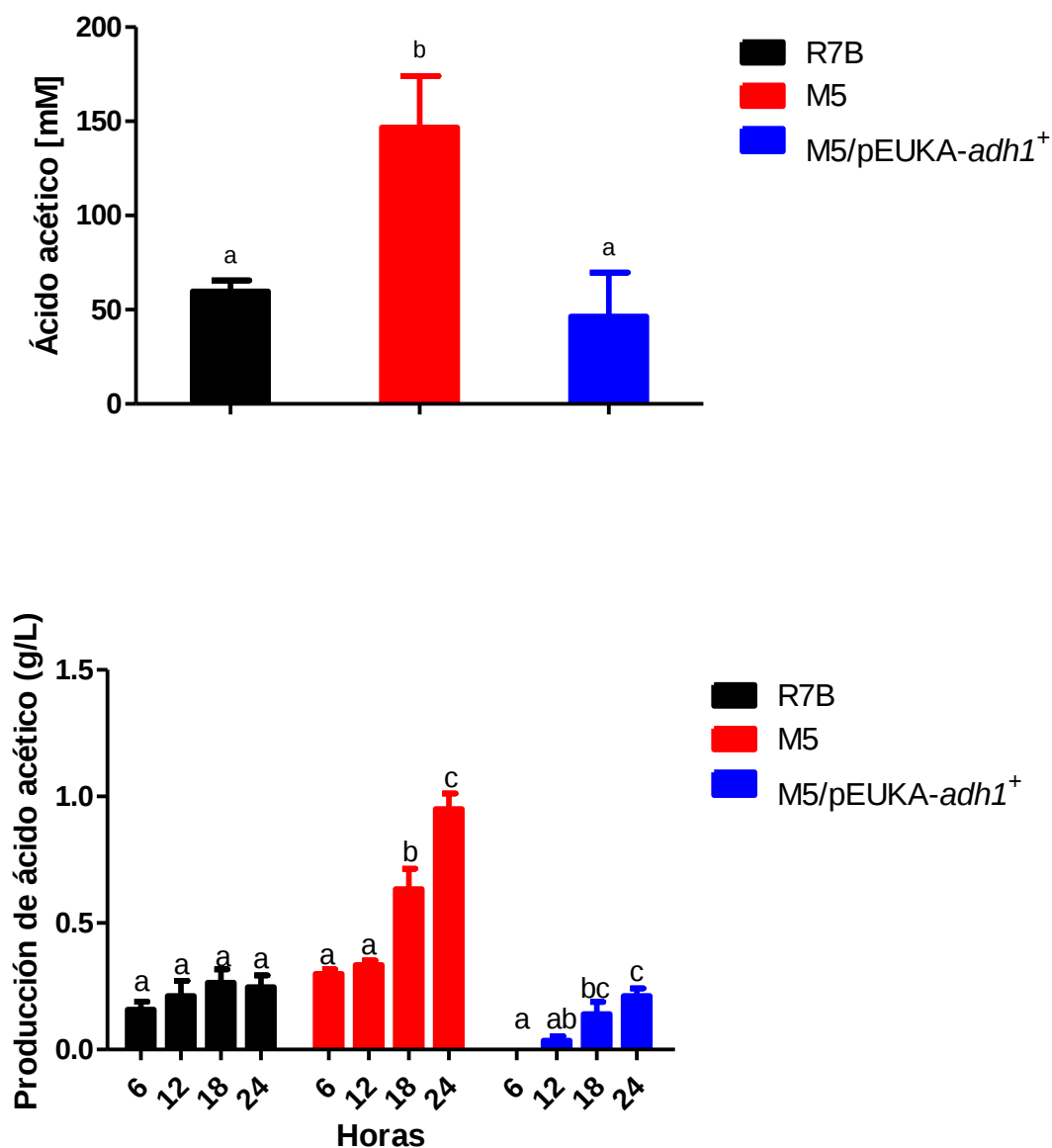


Figura 26. Efecto gen *adh1* en la producción de ácido acético. Se utilizó el sobrenadante en aerobiosis en medio Lee con 5×10^5 esporas de las cepas R7B, M5 y M5/pEUKA-*adh1*⁺, posterior a 24 horas por CG-FID **(A)**. Además se evaluó por la técnica de la norma NMX-V-015-NORMEX se evaluaron a diferentes horas 6, 12, 36 y 24 horas **(B)**. N=5 para cada ensayo, se repitió 3 veces de forma independiente. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

7.17. Efecto de la ausencia del gen *adh1* en la expresión de la enzima *ald2* de *M. circinelloides*

Con la finalidad de demostrar si la enzima aldehído deshidrogenasa estaba involucrada en la detoxificación del acetaldehído, se procedió a examinar sus niveles de transcrito en las distintas cepas de *M. circinelloides*. Para lo cual, se obtuvo el micelio de 24 horas en medio mínimo Lee, se procesó para posteriormente realizar una RT-PCR cuantitativa usando como sonda el gen *ald2* de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo producto está involucrado en la transformación de acetaldehído a acetato, con lo cual se observó que los niveles de mRNA correspondientes al gen *ald2* de la cepa mutante fueron mayores (13 veces) respecto a la cepa silvestre (R7B) (**Fig. 27**). De esta forma, se demostró que existe un mayor nivel de transcrito del gen *ald2* en la cepa mutante, por lo que quizás se genere una mayor cantidad de enzima en la cepa mutante, lo que correlaciona con los datos de concentración mas elevados de ácido acético en dicha cepa mutante.

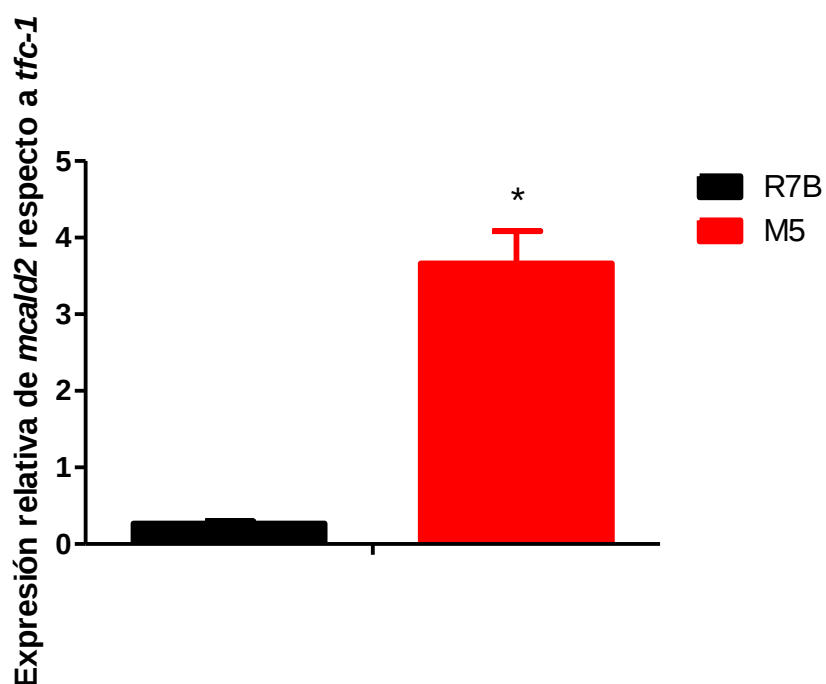


Figura 27. Efecto gen *adh1* en la expresión del gen *ald2* de *M. circinelloides*.

Se utilizó el micelio producido por el sobrenadante en aerobiosis a partir de la inoculación de medio Lee con 5×10^5 esporas de las cepas R7B y M5, obteniendo la expresión del gen por qRT-PCR. Los niveles de transcrito están en relación al gen normalizador *tfc-1*. N=5. Análisis ANOVA 1 way, post-hoc Bonferroni, * $p < 0.05$.

7.18. Efecto del disulfiram en la infección por la mutante *adh1⁻* en *Mus musculus*.

El disulfiram (disulfuro de tetraetiltiuram) es un inhibidor competitivo de la enzima aldehído deshidrogenasa (**Sadavana, y col., 2009**), el cual se ha usado en el tratamiento de pacientes con alcoholismo severo, debido a la intoxicación y por consecuencia efectos desagradables que genera el acetaldehído acumulado posterior a la ingestión de bebidas alcohólicas (**Goodman y Gilman, 2007**). Sin embargo, debido a la posibilidad de generar mortalidad en los pacientes, este medicamento ha venido en desuso en los últimos años (**Johnson, 2015**). Los ratones fueron tratados con y sin disulfiram antes (48 horas antes de la infección) y durante el proceso de infección con las distintas cepas y los correspondientes controles. En la **Fig. 28A** se observa que los ratones tratados sin disulfiram, se comportaron según lo esperado, todos los ratones infectados con la cepa mutante fallecieron en el tiempo esperado 2-3 días posteriores a la inoculación. Sin embargo, en la **Fig. 28B** se muestra que los ratones tratados con disulfiram e infectados con la cepa mutante sólo sobrevivieron el 20% a las 12 horas posterior a la inoculación y el resto murió a las 24 horas, además los ratones tratados con disulfiram e infectados con la cepa silvestre se observó un aumento de la virulencia ya que el 20% de los ratones infectados murieron a los 5 días post-infección contrastando a la nula virulencia es este lapso de tiempo por la cepa silvestre en todos los ensayos realizados en este trabajo y datos generados anteriormente (Guzmán-Hernandez 2016), una explicación es que la cepa silvestre genera etanol, el cual se convierte a acetaldehído por la actividad de ADH y este no puede ser convertido a acetato por la inhibición de la aldehído deshidrogenasa (ALD) en el ratón; en cambio, el 100% de los ratones infectados con la cepa complementada pasados los 10 días de infección sobrevivieron; como control positivo del experimento los ratones tratados con disulfiram y en presencia de etanol al 10% como única bebida disponible, fallecieron el 100% en 5 días. Estos datos sugieren fuertemente que es el acetaldehído producido por la cepa mutante el agente responsable del efecto tóxico en los ratones.

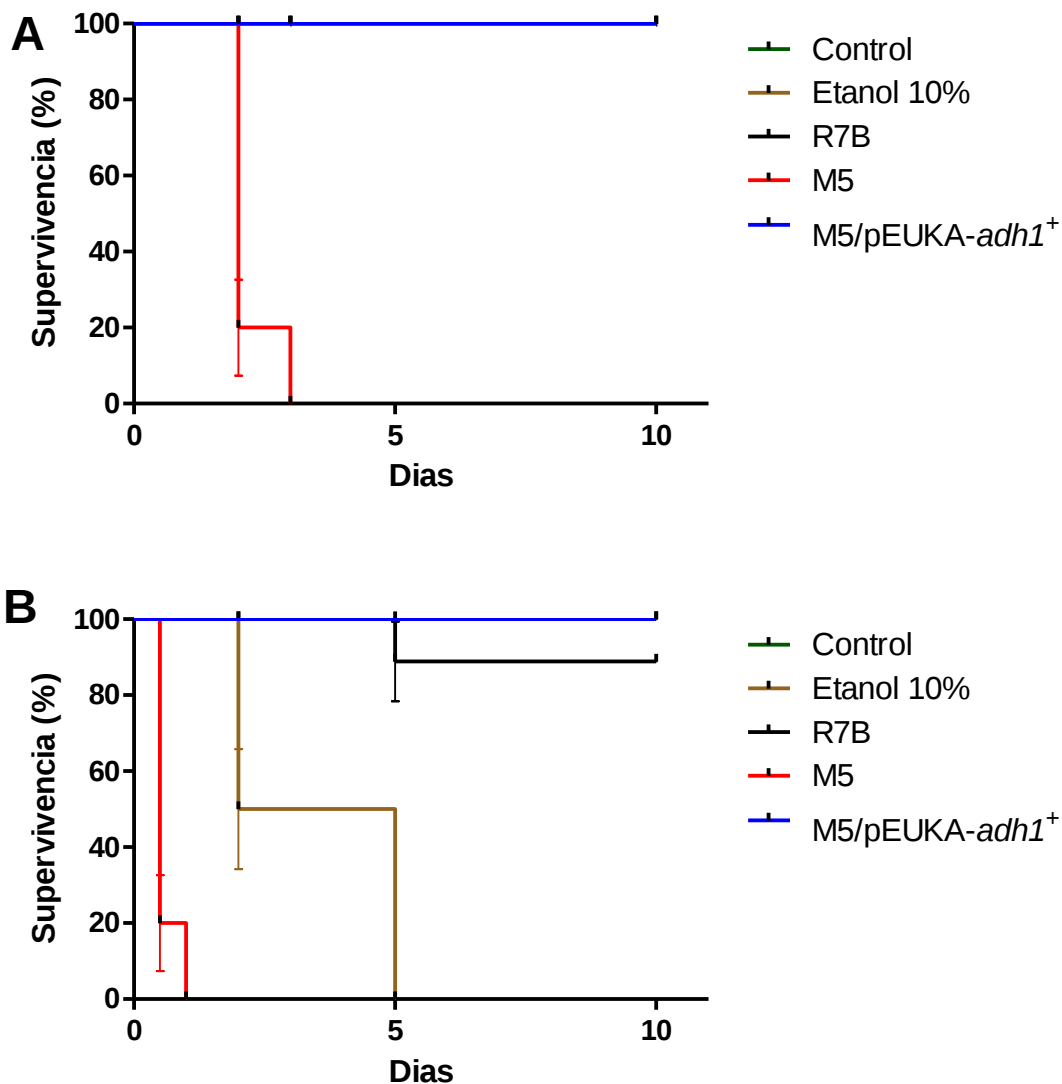


Figura 28. Efecto del disulfiram con *M. circinelloides* en la supervivencia de *Mus musculus*. Se inocularon por vía intraperitoneal 5×10^6 esporas de las cepas R7B, M5, y M5/pEUKA-*adh1*⁺ en cada ratón macho Balb/c de 10-12 semanas de edad, sin tratamiento previo con disulfiram (A) y con tratamiento 48 horas previo al ensayo de infección y cada 48 horas durante el tiempo que duró el ensayo de infección inoculando 300 mg/kg de peso por vía intraperitoneal (B). N=6 para cada grupo, se repitió el experimento 8 veces de forma independiente. Prueba estadística Kaplan-Meier. SE. $p < 0.005$.

VIII. Discusión

M. circinelloides posee un único gen *adh1* cuyo producto está involucrado en funciones fermentativas, la mutante de este gen es incapaz de reoxidar el NAD⁺ en condiciones anaerobias por lo que es incapaz de crecer en dichas condiciones. Además, produce una menor cantidad de etanol respecto a la cepa silvestre indicando la participación en la fermentación de dicha enzima en este hongo. Organismos con mutaciones en esta enzima son incapaces de crecer en anerobiosis o fermentar, como es el caso de *S. cerevisiae* en donde mutantes en el gen *adh1* no se desarrollan en ausencia de oxígeno y disminuyen su producción de etanol e incluso reciclar el NADH generado en la ruta glucolítica (**Williamson y col., 1980**).

En *M. circinelloides* la mutación en el gen *adh1* generó una menor germinación (35% menos) respecto a la cepa silvestre y crecimiento (33% menos) respecto a la cepa silvestre en condiciones aeróbicas en medio mínimo, si bien es cierto que la atmósfera de aerobiosis promueve que el piruvato sea ingresado al ciclo de Krebs y por ende a la fosforilación oxidativa. *M. circinelloides* es un organismo Crab-tree positivo indicando que puede fermentar aun en presencia de oxígeno y con hexosas fermentables (**Rangel-Porras y col., 2005**). Por lo que la mutación en el gen *adh1* puede conducir a una menor generación de energía respecto a la cepa silvestre en condiciones aeróbicas lo que se vio reflejado en la menor germinación y crecimiento en dicha cepa mutante.

Algunas enzimas ADH se han visto involucradas en la patogénesis fúngica, como es el caso de *Aspergillus fumigatus*, la ausencia del gen *alcC*, el cual codifica para una alcohol deshidrogenasa fermentativa e inducible por hipoxia, aumentó la virulencia de la aspergilosis invasiva pulmonar en modelo murino (**Grahl, y col., 2011**); por otra parte, en el hongo dimórfico *Candida albicans* cuya mutante en el gen *ADH1* generó un aumento en los niveles de acetaldehído además de producir mayor cantidad de biopelículas provocando un aumento en la virulencia en ratones inmunodeprimidos (**Nieminen, y col., 2014**). De igual manera las esporas de la cepa mutante en el gen *adh1* de *M. circinelloides* generaron un aumento en la virulencia en dos modelos biológicos: ratones no inmunosuprimidos y nematodos.

Más aun, el sobrenadante de la mutante *adh1* de *M. circinelloides* generó por si solo un aumento en la pérdida de viabilidad del nematodo respecto a la cepa silvestre, es decir, en dicho sobrenadante existen moléculas capaces de matar al nematodo. La *adh1* está involucrada en la interconversión *in vitro* de acetaldehído a etanol, sin embargo *in vivo* hay una preferencia por el uso de acetaldehído hacia etanol en este Mucoral (**Rangel- Porras, y col., 2005**), y dado a que en nuestras condiciones ensayadas las cepas de *M. circinelloides* fueron crecidas en presencia de glucosa, es posible que el acetaldehído se estuviese acumulando y excretando al medio de cultivo, siendo esta molécula la que ejerza un efecto deletéreo en el nematodo.

El acetaldehído es evaporado a una temperatura de 20.1°C (**Smoke & Smoking, 2004**), y la incubación a 25°C por 2 horas de los sobrenadantes de la mutante *adh1* de *M. circinelloides* generó un comportamiento similar al del sobrenadante de la cepa silvestre, es decir se anuló el efecto inhibitorio sobre la virulencia del sobrenadante de la cepa mutante. Además, el acetaldehído se acumuló en el sobrenadante de la cepa mutante a un nivel de 45 mM mientras que en la silvestre de 0.5 mM, es decir se produce 90 veces más acetaldehído en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre. Interesantemente, la concentración de acetaldehído producido por la cepa mutante es capaz de generar la muerte del 60% de los nematodos, la adición exógena de acetaldehído al medio de cultivo a una concentración de 37.5 mM generó un 50% de mortalidad en los nematodos; sugiriendo que es el acetaldehído el responsable del efecto tóxico producido por la cepa mutante de *M. circinelloides*. Por otra parte, los organismos que producen acetaldehído tratan de resistir a sus efectos tóxicos convirtiéndolo en acetato, el cual es 9 veces menos tóxico que el acetaldehído. El acetaldehído produce aductos con proteínas generando anticuerpos autor reactivos, además que inactiva a moléculas con actividad biológica inhibiendo la reparación de DNA (**Setshedi, y col., 2010**). Los organismos que aumentan la conversión de acetato a partir del acetaldehído, muestran una mayor actividad de acetaldehído deshidrogenasa (ALD), (**Koppaka, y col., 2012**). La mutante en el gen *adh1* de *M. circinelloides* aumento 13 veces la expresión del gen *ald2* (el cual codifica al

homólogo de la aldehído deshidrogenasa de *S. cerevisiae* ALD2) respecto a la cepa silvestre, lo que pudiera explicar la resistencia de dicha cepa mutante e incluso la capacidad de germinar mejor respecto a la cepa silvestre a una en presencia de acetaldehído. Además, esta cepa mutante generó hasta 4 veces más cantidad de acetato respecto a la cepa silvestre, indicando que el mecanismo de detoxificación de acetaldehído en la cepa mutante es más eficaz respecto a la cepa silvestre.

La mutación en el gen *adh1* de *M. circinelloides* aumentó la capacidad de invasión a tejidos del ratón, lo cual quizás en parte es debido a la acción del acetaldehído producido extracelularmente por dicha cepa. El acetaldehído es un inhibidor de la fagocitosis, aún a bajas concentraciones de 0.02% (4.5 mM) inhibe la quimiotaxis y fagocitosis de células especializadas, como polimorfonucleares y monocitos **(Schopf, y col., 1985)**, lo cual podría explicar la mayor invasividad observada por parte de la cepa mutante de *M. circinelloides*, la cual acumula hasta 45 mM (0.2%), ya que podría estar inhibiendo a los macrófagos entre otras células fagocíticas que representan la primer línea de defensa del sistema inmunitario en mamíferos, aunque aún faltan experimentos que demuestren que esto ocurre por dicha cepa mutante. Además de generar una inhibición de la fagocitosis, el acetaldehído genera un proceso inflamatorio, por ejemplo en los fumadores el acetaldehído de los cigarrillos (1 mg de acetaldehído por cigarrillo) conduce a una inflamación de los alvéolos de dichas personas, de presentarse de manera crónica, ésta inflamación puede proceder a una neoplasia del tejido **(Schopf, y col., 1985)**. Por otra parte, en pacientes asmáticos el consumo de etanol genera un aumento de acetaldehído e histamina en el suero sanguíneo, generando en estos pacientes una broncoconstricción, este efecto es más severo en individuos asmáticos deficientes en la actividad de la aldehído deshidrogenasa (ALD), además estudios *in vitro* indican que el acetaldehído induce la desgranulación de células mastocíticas, dicha desgranulación genera un aumento en los niveles de histamina en sangre, lo cual induce una respuesta de hipersensibilidad, e incluso puede conducir a la muerte por un choque de tipo anafiláctico **(Matsuse, y col., 2007)**.

Nuestros resultados indican claramente que la mutación induce un proceso inflamatorio generalizado, e incluso en el tejido cerebral, sugiriendo que esta mutante genera muy probablemente un proceso de desgranulación y liberación de histamina al torrente sanguíneo, el marcador molecular que codifica a la proteína inflamatoria de macrófago 2 (MIP-2) murino, el cual es el homólogo a IL-8 en humano, estos factores se han descrito que son elementos cuya expresión es aumentada por la presencia de histamina, la cual pertenece a la familia de las quimioquinas quimiotácticas, son indispensables para la respuesta inmune frente a inflamación o infección, activando granulocitos conduciendo a una inflamación neutrofílica aguda, además inducen síntesis y liberación de otras citoquinas proinflamatorias (Wople y col., 1989). Por otra parte, la interleucina 1 β (IL-1 β), esta citocina es un importante mediador de la respuesta inflamatoria involucrada en la actividad celular como proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Henao-Mejia, y col., 2012). Asimismo, una importante citocina, la interleucina 6 (IL-6), secretada por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células T, es inducida por la IL-1 y aumenta sus niveles por respuesta de TNF- α .

Los genes que codifican tanto para MIP-2 como para IL-1 β e IL-6 mostraron una mayor cantidad de expresión en diversos tejidos de los ratones infectados con la cepa carente de actividad de *adh1*, indicando una respuesta inflamatoria más elevada respecto a la cepa silvestre. De igual forma, la mutante en el gen *alcC* de *Aspergillus fumigatus* aumentó los niveles de MIP-2 al igual que de IL-6 y TNF- α en pulmones de ratones infectados con dicha cepa (Grahl, y col., 2011).

En general, los datos generados en este trabajo conducen a la idea de que el acetaldehído es el responsable de la toxicidad por parte de la cepa mutante *adh1*⁻ de *M. circinelloides*. Esta idea fue confirmada mediante el uso del disulfiram, el cual es un inhibidor competitivo de la enzima *ald2* (acetaldehído deshidrogenasa), ratones que fueron inhibidos en esta enzima e infectados con la cepa mutante *adh1*⁻ mostraron un menor tiempo de supervivencia, es decir disminuyó en un 50% el lapso de tiempo en presentarse la muerte de los ratones tratados con disulfiram respecto a aquellos que sólo fueron infectados con la cepa mutante *adh1*⁻ de *M. circinelloides*.

En términos generales los resultados descritos en este trabajo vinculan a la generación de un metabolito (acetaldehído), el cual es producido durante un proceso altamente conservado en organismos patógenos de mamíferos tales como bacterias (enterobacterias), hongos (principalmente ascomicetos), protozoarios (entamoebas), entre otros; la mayoría de estos microorganismos emplean en gran medida un metabolismo anaeróbico en su crecimiento durante su proceso de infección **(Müller, y col., 2012)**.

M. circinelloides es un organismo fúngico que exhibe una plasticidad en cuanto a sus requerimientos de nutrientes y oxígeno, que si bien es cierto los resultados de este trabajo, sugieren una ventaja en términos de invasividad y virulencia, dicha mutación pone en desventaja ecológica a este mucoral, ya que es incapaz de crecer en medios anaeróbicos, los cuales seguramente se presentan en los nichos ecológicos en los cuales habita (materia orgánica en descomposición). Sin embargo, es interesante el poder describir en un futuro la relación existente entre diversas cepas de origen clínico tanto de zigomicetos como *M. circinelloides* o incluso especies de otros hongos como *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, entre otros, para determinar la relevancia en sus capacidades fermentativas y su posible correlación con el proceso infeccioso, más aun la relevancia de un desbalance fermentativo que conduce a un aumento en la excreción de acetaldehído de forma crónica con lo que se pudiera generar procesos de neoplasia.

IX. Conclusión.

La mutación del gen *adh1* en *M. circinelloides* condujo a un aumento de la virulencia a través de una mayor invasividad en tejidos; el cual se correlaciona con el aumento de acetaldehído excretado por la mutante generando mayor letalidad a través de un aumento en la respuesta inflamatoria.

X. Bibliografía

- Almeida, F., Wolf, J. M., & Casadevall, A. (2015). Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 14(12), 1173-1185.
- Antachopoulos, C., Petraitiene, R., Roilides, E., & Walsh, T. J. (2015). Mucormycosis (Zygomycosis). In *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*(pp. 159-168). Springer International Publishing.
- Baddley, J. W., Andes, D. R., Marr, K. A., Kontoyiannis, D. P., Alexander, B. D., Kauffman, C. A., ... & Wingard, J. R. (2010). Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12), 1559-1567.
- Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 6: the main respiratory pathway. *Yeast*, 20(12), 1015-1044.(a)
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962). Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica acta*, 58(1), 102-119.(b)
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962). Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal of Bacteriology*, 84(4), 841-858.
- Bhabhra, R., & Askew, D. S. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical mycology*, 43(sup1), 87-93.
- 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.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
- Brown, J. (2005). Zygomycosis: An emerging fungal infection. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 62(24).
- Callejas-Negrete, O. A., Torres-Guzmán, J. C., Padilla-Guerrero, I. E., Esquivel-Naranjo, U., Padilla-Ballesteros, M. F., García-Tapia, A., & González-Hernández, G. A. (2015). The *Adh1* gene of the fungus

Metarhizium anisopliae is expressed during insect colonization and required for full virulence. *Microbiological research*, 172, 57-67.

- Casadevall, A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal biology reviews*, 21(4), 130-132.
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*, 67(8), 3703-3713.
- Casadevall, A., Rosas, A. L., & Nosanchuk, J. D. (2000). Melanin and virulence in Cryptococcus neoformans. *Current opinion in microbiology*, 3(4), 354-358.
- Cazin, J., Kozel, T. R., Lupan, D. M., & Burt, W. R. (1969). Extracellular deoxyribonuclease production by yeasts. *Journal of bacteriology*, 100(2), 760-762.
- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M. A., & Perfect, J. R. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(4), 215-229.
- Chayakulkeeree, M., Sorrell, T. C., Siafakas, A. R., Wilson, C. F., Pantarat, N., Gerik, K. J., Boadle R. & Djordjevic, J. T. (2008). Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of Cryptococcus neoformans. *Molecular microbiology*, 69(4), 809-826.
- Claria, J., & Titos, E. (2003). Metabolismo del ácido araquidónico en células hepáticas. *Médicas UIS*, 27, 115.
- Cox, G. M., Harrison, T. S., McDade, H. C., Taborda, C. P., Heinrich, G., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2003). Superoxide dismutase influences the virulence of Cryptococcus neoformans by affecting growth within macrophages. *Infection and Immunity*, 71(1), 173-180.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in invasive aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 447-465.

- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 447-465.
- de Gontijo, F. A., Pascon, R. C., Fernandes, L., Machado, J., Alspaugh, J. A., & Vallim, M. A. (2014). The role of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 70, 12-23.
- de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M., & Chauhan, N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*, 12(4), 470-481.
- Del Poeta, M., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., & Luberto, C. (2014). Synthesis and biological properties of fungal glucosylceramide. *PLoS pathogens*, 10(1).
- Dellarco, V. L. (1988). A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(1), 1-20.
- Drewke, C., & Ciriacy, M. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 950(1), 54-60.
- Escobosa, A. R. C., Porras, R. A. R., Carmen, V. M., Hernandez, G. A. G., Guzman, J. C. T., Wrobel, K., & Corona, J. F. G. (2011). *Fusarium oxysporum* Adh1 has dual fermentative and oxidative functions and is involved in fungal virulence in tomato plants. *Fungal Genetics and Biology*, 48(9), 886-895.
- Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 507-529.
- Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.

- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 122-143.
- Gómez, B. L., & Nosanchuk, J. D. (2003). Melanin and fungi. *Current opinion in infectious diseases*, 16(2), 91-96.
- Goodman, L. S., & Gilman, A. (2007). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición.
- Grahl, N., Puttikamonkul, S., Macdonald, J. M., Gamcsik, M. P., Ngo, L. Y., Hohl, T. M., & Cramer, R. A. (2011). In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog*, 7(7), e1002145.
- Grocott, R.G. . (1955). A stain for fungi in tissue sections and smears. *American Journal of Clinical Pathology*, V25, p975
- Guzmán- Hernández Alejandra. (2016). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Hall, L. A., & Denning, D. W. (1994). Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *Journal of medical microbiology*, 41(5), 311-315.
- Heitman, J., Kronstad, J. W., Taylor, J. W., & Casselton, L. A. (2007). *Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications*. ASM Press.
- Henao-Mejia, J., Elinav, E., Strowig, T., & Flavell, R. A. (2012). Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nature immunology*, 13(4), 321-324.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux,

- C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., & Zhang, N., (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., & Reeb, V. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.
 - Hogan, L. H., Klein, B. S., & Levitz, S. M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical microbiology reviews*, 9(4), 469-488.
 - Hospenthal, M. A. C., & Carswell, A. P. (2015). Diagnostic Radiology. In *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections* (pp. 65-76). Springer International Publishing.
 - Huffaker, C. B. (1976). An overview of biological control, with particular commentary on biological weed control. In *Proc. IVth Int. Symp. Biological Control of Weeds (TE Freeman, ed.)*, Center for Environm. Progr., University of Florida at Gainesville (pp. 3-12).
 - Ibrahim, A. S., Spellberg, B., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D. P. (2012). Pathogenesis of mucormycosis. *Clinical infectious diseases*, 54(suppl 1), S16-S22.
 - Ikegami, Y., Amitani, R., Murayama, T., Nawada, R., Lee, W. J., Kawanami, R., & Kuze, F. (1998). Effects of alkaline protease or restrictocin deficient mutants of *Aspergillus fumigatus* on human polymorphonuclear leukocytes. *European Respiratory Journal*, 12(3), 607-611.
 - Ikegami, Y., Amitani, R., Murayama, T., Nawada, R., Lee, W. J., Kawanami, R., & Kuze, F. (1998). Effects of alkaline protease or restrictocin deficient mutants of *Aspergillus fumigatus* on human polymorphonuclear leukocytes. *European Respiratory Journal*, 12(3), 607-611.
 - Johnson, B. A. (2015). Disulfiram. *Encyclopedia of Psychopharmacology*, 531-534.

- Jonkers, W., Rodrigues, C. D. A., & Rep, M. (2009). Impaired colonization and infection of tomato roots by the Δ frp1 mutant of *Fusarium oxysporum* correlates with reduced CWDE gene expression. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(5), 507-518.
- Jörnvall, H., Shafqat, J., & Persson, B. (2001). Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes: Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chemico-biological interactions*, 130, 491-498.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., & Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European Journal of Biochemistry*, 269(18), 4409-4417.
- Kaminskas, L. M., Pyke, S. M., & Burcham, P. C. (2004). Strong protein adduct trapping accompanies abolition of acrolein-mediated hepatotoxicity by hydralazine in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 1003-1010.
- Klein, B. S., & Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology*, 10(4), 314-319.
- Klutts, J. S., & Doering, T. L. (2008). Cryptococcal xylosyltransferase 1 (Cxt1p) from *Cryptococcus neoformans* plays a direct role in the synthesis of capsule polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14327-14334.
- Klyosov, A. A., Rashkovetsky, L. G., Tahir, M. K., & Keung, W. M. (1996). Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*, 35(14), 4445-4456.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., & Vasiliou, V. (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacological reviews*, 64(3), 520-539.
- Krebs, S., Fischaleck, M., & Blum, H. (2009). A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples. *Analytical biochemistry*, 387(1), 136-138.

- Kwon-Chung, K. J. (1979). Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *Journal of Infectious Diseases*, 139(4), 424-431.
- Kwon-Chung, K. J. (2012). Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clinical infectious diseases*, 54(suppl 1), S8-S15.
- Kwon-Chung, K. J., Polacheck, I. T. Z. H. A. C. K., & Bennett, J. E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 535-537.
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310-350.
- Lee, S. C., & Heitman, J. (2014). Sex in the Mucoralean Fungi. *Mycoses*, 57(s3), 18-24.
- Lev, S., Desmarini, D., Li, C., Chayakulkeeree, M., Traven, A., Sorrell, T. C., & Djordjevic, J. T. (2013). Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. *Infection and immunity*, 81(4), 1245-1255.
- Lev, S., Desmarini, D., Li, C., Chayakulkeeree, M., Traven, A., Sorrell, T. C., & Djordjevic, J. T. (2013). Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. *Infection and immunity*, 81(4), 1245-1255.
- Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., ... & Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog*, 7(6), e1002086.
- Lieber, C. S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, 34(1), 9-19.

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- 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.
- Matsuse, H., Fukushima, C., Shimoda, T., Asai, S., & Kohno, S. (2007, April). Effects of acetaldehyde on human airway constriction and inflammation. In *Novartis Foundation Symposium* (Vol. 285, p. 97). Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Mukherjee, P. K., Mohamed, S., Chandra, J., Kuhn, D., Liu, S., Antar, O. S., ... & Rouabhia, M. (2006). Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infection and immunity*, 74(7), 3804-3816.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444-495.
- Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. (2011). Sex in fungi. *Annual review of genetics*, 45, 405.
- Nicolás, F. E., Calo, S., Murcia-Flores, L., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M., & Torres-Martínez, S. (2008). A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS microbiology letters*, 280(1), 81-88.
- Nieminen, M. T., Novak-Frazer, L., Rautemaa, V., Rajendran, R., Sorsa, T., Ramage, G., & Rautemaa, R. (2014). A novel antifungal is active against *Candida albicans* biofilms and inhibits mutagenic acetaldehyde production in vitro. *PloS one*, 9(5), e97864.
- Nishijima, K. A., Wall, M. M., Chang, L. C., Wei, Y., & Wong, D. K. W. (2011). First report of association of *Mucor circinelloides* on noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. *Plant Disease*, 95(3), 360-360.

- NMX-V-015-NORMEX-2014. Bebidas alcohólicas-determinación de acidez total, acidez fija y acidez volátil-métodos de prueba (CANCELA A LA NMX-V-015-NORMEX-2006).
- NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Nucci, M., & Anaissie, E. (2007). Fusarium infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 695-704.
- Olson, G. M., Fox, D. S., Wang, P., Alspaugh, J. A., & Buchanan, K. L. (2007). Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 6(2), 222-234.
- Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G. H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Huffnagle, G. B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*, 164(5), 1761-1771.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., ... & Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143, 247-253.
- Orłowski, M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological reviews*, 55(2), 234-258.
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., & Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity*, 72(3), 1760-1766.
- Panagiotou, G., Villas-Bôas, S. G., Christakopoulos, P., Nielsen, J., & Olsson, L. (2005). Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. *Journal of biotechnology*, 115(4), 425-434.
- Park, H. S., Bayram, Ö., Braus, G. H., Kim, S. C., & Yu, J. H. (2012). Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, 86(4), 937-953.

- Persson, B., Hallborn, J., Walfridsson, M., Hahn-Hägerdal, B., Keränen, S., Penttilä, M., & Jörnvall, H. (1993). Dual relationships of xylitol and alcohol dehydrogenases in families of two protein types. *FEBS letters*, 324(1), 9-14.
- Petrikos, G., Skiada, A., Lortholary, O., Roilides, E., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D. P. (2012). Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl 1), S23-S34.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Polak, A. (1990). Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses*, 33(5), 215-224.
- Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Ramana, K. V., Kandi, S., Bharatkumar, V., Sharada, C. V., Rao, R., Mani, R., & Rao, S. D. (2013). Invasive fungal infections: a comprehensive review. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, 1(4), 64-69.
- Rangel- Porras Rosa Angélica. (2003). Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato.
- Rangel-Porras, R. A., Meza-Carmen, V., Martinez-Cadena, G., Torres-Guzmán, J. C., González-Hernández, G. A., Arnau, J., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2005). Molecular analysis of an NAD-dependent alcohol dehydrogenase from the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 274(4), 354-363.
- Reid, M. F., & Fewson, C. A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical reviews in microbiology*, 20(1), 13-56.
- Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., & Baker, D. J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 236-301.
- Rittershaus, P. C., Kechichian, T. B., Allegood, J. C., Merrill, A. H., Hennig, M., Luberto, C., & Del Poeta, M. (2006). Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of clinical investigation*, 116(6), 1651-1659.

- Roncero, M. I. G., Jepsen, L. P., Strøman, P., & van Heeswijck, R. (1989). Characterization of a leuA gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84(2), 335-343.
- Roncero, M. I. G., Jepsen, L. P., Strøman, P., & van Heeswijck, R. (1989). Characterization of a leuA gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84(2), 335-343.
- Sadavana D., Heller G., Orians G., Purves W., & Hillis D. (2009). Vida: La ciencia de la biología. 8ª. Edición. 131-133 página. Editorial médica panamericana. ISBN 9789500682695
- Salas, S. D., Bennett, J. E., Kwon-Chung, K. J., Perfect, J. R., & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), 377-386.
- Salcedo-Hernandez, R., & Ruiz-Herrera, J. (1993). Isolation and characterization of a mycelial cytochrome aa 3-deficient mutant and the role of mitochondria in dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental mycology*, 17(2), 142-154.
- Sandai, D., Yin, Z., Selway, L., Stead, D., Walker, J., Leach, M. D., ... & Brown, A. J. (2012). The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *MBio*, 3(6), e00495-12.
- Santangelo, R., Zoellner, H., Sorrell, T., Wilson, C., Donald, C., Djordjevic, J., Shounan Y & Wright, L. (2004). Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection and immunity*, 72(4), 2229-2239
- Schopf, R. E., Trompeter, M., Bork, K., & Morsches, B. (1985). Effects of ethanol and acetaldehyde on phagocytic functions. *Archives of dermatological research*, 277(2), 131-137.
- Setshedi, M., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2010). Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(3), 178-185.

- Smoke, T., & Smoking, I. (2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC, Lyon*, 1-1452.
- Spellberg, B., Edwards, J., & Ibrahim, A. (2005). Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 556-569.
- Takaya, N. (2009). Response to hypoxia, reduction of electron acceptors, and subsequent survival by filamentous fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(1), 1-8.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Vandekerckhove, J., & Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of molecular biology*, 126(4), 783-802.
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Pombejra, S. N., Jamklang, M., Bautos J.M. & Gelli, A. (2014). Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*, 5(3), e01101-14.
- Wetzel, J., Burmester, A., Kolbe, M., & Wöstemeyer, J. (2012). The mating-related loci sexM and sexP of the zygomycetous fungus *Mucor mucedo* and their transcriptional regulation by trisporoid pheromones. *Microbiology*, 158(4), 1016-1023.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., & Sugiyama, J. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98(6), 872-884.
- Wikandari, R., Millati, R., Lennartsson, P. R., Harmayani, E., & Taherzadeh, M. J. (2012). Isolation and characterization of zygomycetes fungi from tempe for ethanol production and biomass applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(6), 1501-1512.

- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). PCR-based method for isolation of full-length clones and splice variants from cDNA libraries. *BioTechniques*, 22, 481-486.
- Williamson, V. M., Young, E. T., & Ciriacy, M. (1981). Transposable elements associated with constitutive expression of yeast alcohol dehydrogenase II. *Cell*, 23(2), 605-614.
- Wolpe, S. D., & Cerami, A. N. T. H. O. N. Y. (1989). Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *The FASEB Journal*, 3(14), 2565-2573.
- 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*. *Biotechnol Biofuels*, 4(1), 15.
- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., & Yamada-Okabe, H. (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181(23), 7243-7247.
- Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., Sharefkin J.B. (1992). Effect of different laboratory techniques for guanidium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *Genome Research* 1: 286-290.
- Zeeman, A. M., Kuyper, M., Pronk, J. T., van Dijken, J. P., & Steensma, H. Y. (2000). Regulation of pyruvate metabolism in chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast*, 16(7), 611-620.