



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

T E S I S

“IDENTIFICACIÓN DE LO(S) FACTOR(ES) CON CAPACIDAD VIRULENTA SECRETADO(S) POR CEPAS MUTANTES EN GENES *arf* DE *Mucor circinelloides*”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

QFB. Viridiana Alejandre Castañeda.

Asesor: D.C. Víctor Meza Carmen
Co Asesor: D.C. Alma Rosa Corrales Escobosa

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, en primer lugar quiero agradecer al D.C Víctor director de esta tesis y quien ha sido mi mentor desde hace ya siete años, quien aunque “no siempre me deje enseñar” me ha apoyado durante todo el proceso de mi formación profesional y personal.

A la Dra. Alma Corrales, coasesora en este trabajo quien me apoyó durante estos dos años y contribuyó a mi desempeño durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme siempre que necesité de su ayuda, Alberto quién siempre compartió conmigo sus conocimientos, su tiempo y su apoyo, un amigo que en el último tirón de mi posgrado tuve la oportunidad de conocer y de admirar. A Marco por su contribución constante a este trabajo y por compartir conmigo experiencias de vida, a David, Paty, Karen, Víctor mis compañeros y amigos. A Cesarín NH, con quien siempre compartí momentos llenos de risa, ¡bienvenido al equipo de trabajo!.

Al maestro Juan Bosco, con quién siempre conté dentro y fuera del laboratorio, ¡gracias primo!

Al Dr. Victoriano Garre, de la Universidad de Murcia, España, quien me hizo un espacio en su laboratorio y contribuyó a la culminación de este proyecto. A mis compañeros de la Universidad de Murcia, Tahiri, Jose, Lax, Macario, por tantas risas compartidas.

A Conacyt por la beca otorgada; a la UMSNH por las instalaciones brindadas.

A. ÍNDICE

A.	Índice	4
B.	Índice de figuras.....	9
C.	Índice de tablas.....	10
D.	ABREVIATURAS.....	11
E.	PREFIJOS.....	12
F.	RESUMEN.....	13
G.	ABSTRACT.....	14
I.	Introducción.....	15
1.1	Generalidades de Tráfico vesicular.....	15
1.2	Participación de las proteínas ARF en hongos.....	17
1.3	Generalidades del género <i>Mucor</i>	19
1.4	Generalidades de <i>Mucor circinelloides</i>	20
1.5	Factores de virulencia.....	21
1.6	Mucormicosis.....	24
1.7	Factores de virulencia de Mucorales.....	26
1.8	Proteínas Arf en la morfogénesis y virulencia de <i>M. circinelloides</i>	31
II.	Justificación.....	34
III.	Hipótesis.....	34
IV.	Objetivo general.....	34
4.1	Objetivos específicos.....	35
V.	Materiales y métodos.....	35
5.1	Material biológico.....	35
5.2	Medios de cultivo.....	35
5.2.1	Medio YPG.....	35
5.2.2	Medio YNB.....	36
5.2.3	Medio LB.....	37
5.2.4	Medio NGM.....	37
5.2.5	Medio CAS-Agar.....	37

5.3	Condiciones de crecimiento de <i>Mucor circinelloides</i>	38
5.3.1	Obtención y conteo de esporas de <i>Mucor circinelloides</i>	38
5.3.2	Crecimiento en aerobiosis y obtención del sobrenadante de las cepas MU402, $\Delta arf1$, $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de <i>M. circinelloides</i>	38
5.3.3	Concentración de proteínas mediante diálisis inversa utilizando membrana de diálisis de 2 kDa y polietilenglicol (PEG-5000)	39
5.3.4	Precipitación protéica con acetona al 80 % de los SS de las cepas WT y mutantes de <i>M. circinelloides</i> previamente liofilizados.....	39
5.3.5	Cuantificación de proteínas mediante método de Bradford....	40
5.3.6	Crecimiento en medio rico YPG por 12 horas y cambio a medio mínimo YNB por 48 horas.....	40
5.3.7	Determinación de glucosa en los SS de la cepa silvestre y las cepas mutantes.....	41
5.3.8	Aislamiento de ADN genómico de <i>M. circinelloides</i>	41
5.3.9	Amplificación de ADN por PCR.....	42
5.4	Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos.....	42
5.4.1	Transformación de <i>E.coli</i>	42
5.4.2	Amplificación del fragmento recombinante rfsRP y rfsRL mediante PCR en fusión.....	43
5.4.3	Aislamiento de ADN plasmídico.....	45
5.4.4	Complementación de cepa Δrfs mutante de <i>M. circinelloides</i>	46
5.4.5	Secuenciación de fragmentos de ADN.....	46
5.4.6	Corroboración de las mutantes de <i>M. circinelloides</i> mediante PCR.....	46
5.4.7	Análisis RT-qPCR.....	48
5.4.8	Generación de mutaciones por deleción en <i>M. circinelloides</i>	49

5.4.9	Delección génica mediante recombinación homóloga en <i>M. circinelloides</i>	49
5.5	Transformación de <i>Mucor circinelloides</i>	49
5.5.1	Selección fenotípica de las transformates de <i>M. circinelloides</i>	50
5.5.2	Ensayos de infección en <i>Mus musculus</i>	52
5.5.3	Análisis estadístico	52
VI.	RESULTADOS	53
6.1	Efecto de los sobrendantes de cultivo producidos en medio YNB en la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	53
6.1.1	Efecto de la desnaturalización por proteasa del sobrenadante en la virulencia de la cepa mutante <i>arf3</i>	53
6.1.2	Concentración de proteínas mediante diálisis inversa utilizando membrana de diálisis de (2 kDa) y polietilenglicol (PEG-5000).....	56
6.1.3	Crecimiento en medio rico YPG por 12 horas y cambio a medio mínimo YNB por 48 horas.....	56
6.1.4	Precipitación proteica con acetona al 80% de los sobrenadantes de las cepas WT y $\Deltaarf3$ de <i>M. circinelloides</i> ..	57
6.1.5	Consumo de glucosa en medio mínimo YNB posterior a las 48 horas de crecimiento.	59
6.1.6	Efecto de la reducción de la concentración de la glucosa en el medio de cultivo YNB en la capacidad de virulencia de los sobrenadantes de <i>M. circinelloides</i>	60
6.1.7	Separación de proteínas por exclusión molecular utilizando membrana de Amicón (10 kDa).....	62
6.1.8	Separación de proteínas por exclusión molecular utilizando membrana de Amicón (3 kDa).....	64
6.1.9	Análisis mediante MALDI de la fracción de SS menor de 3 kDa de la cepa WT y la cepa mutante $\Deltaarf3$ de	66

	<i>M. circinelloides</i> .	
6.2	Determinación del daño celular en <i>C.elegans</i> ocasionado por la fracción V ₀ de 3 kDa de la cepa mutante <i>arf3</i> de <i>M. circinelloides</i>	67
6.2.1	Determinación de la naturaleza química y termotolerancia del factor de virulencia presente en la fracción V ₀ de 3 kDa de la cepa mutante <i>arf3</i> de <i>M. circinelloides</i>	69
6.2.2	Identificación del homólogo <i>rfs</i> de <i>R. Deleamar</i> en <i>M. circinelloides</i>	71
6.2.3	Determinación de la presencia de la producción de sideróforo en las cepas de <i>M. circinelloides</i>	72
6.2.4	Niveles de ARNm de <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i> en cultivo líquido.....	73
6.2.5	Niveles de <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i> en hígado de ratón.....	75
6.2.6	Niveles de ARNm de IL-6 en hígado de ratón inoculado con el sobrenadante o la fracción V ₀ de <i>M.circinelloides</i>	76
6.2.7	Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> en el crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables	76
6.2.8	Efecto de las mutaciones en los genes <i>arf3</i> y <i>arf4</i> en el contenido de ADN mitocondrial	79
6.2.9	Construcción del fragmento de recombinación del gen que codifica a la proteína <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i>	80
6.3.	Transformación de <i>M. circinelloides</i> con los fragmentos recombinantes <i>rfsR</i>	82
6.3.1	Confirmación molecular de la mutante sencilla en el gen <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i>	83
6.3.2	Construcción del fragmento de recombinación para interrumpir el gen que codifica a la proteína <i>Rfs</i> en la mutante $\Delta arl1$	84
6.3.3	Confirmación molecular de la doble mutante en el gen <i>rfs</i> de la cepa $\Delta arl1$ de <i>M.circinelloides</i>	85

6.3.4	Función de Rfs en la virulencia de la cepa $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de <i>M. circinelloides</i>	85
6.3.5	Construcción del fragmento de recombinación para interrumpir el gen que codifica a la proteína Rfs en la mutante $\Delta arf3$ de <i>M. Circinelloides</i>	87
6.3.6	Confirmación molecular de la doble mutante en el gen rfs de la cepa $\Delta arl1$ de <i>M.circinelloides</i> mediante PCR	88
VII	DICUSIÓN	89
VIII	CONCLUSIÓN	95
IX	BIBLIOGRAFÍA	95

A. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de activacion y desactivacion de estas proteinas ARF	16
Figura 2.	Estructura química de sideróforos.....	28
Figura 3.	Propuesta de la vía biosintética para la rizoferrina fúngica.....	29
Figura 4.	Genes <i>arl1</i> y <i>arl2</i> regulan el tráfico de vesículas y el contenido de quitina en la pared celular en <i>M. circinelloides</i>	33
Figura 5.	Estrategia de PCR en fusión para generar el fragmento recombinante rfs	47
Figura 6.	Evento de doble recombinación homóloga.....	51
Figura 7.	Virulencia de los SS producidos por las cepas silvestre y mutante a diferentes horas de crecimiento aerobio...	54
Figura 8.	Efecto de la desnaturalización por proteasa del SS en la virulencia de $\Deltaarf3$ de <i>M.circinelloides</i> ...	55
Figura 9.	Efecto del crecimiento en medio rico y cambio a medio mínimo en la capacidad de virulencia de los SS de $\Deltaarf3$ de <i>M.circinelloides</i> ...	58
Figura 10	Efecto de la reducción de a glucosa en el medio de cultivo sobre la virulencia del SS de <i>M.circinelloides</i>	61
Figura 11.	Separación de los proteinas por exclusión molecular con membrana de Amicon (10 kDa)	63
Figura 12.	Separación de los proteinas por exclusión molecular con membrana de Amicon (3 kDa).....	65
Figura 13.	Análisis mediante MALDI de la fracción de SS menor de 3 kDa de la cepa WT y la cepa mutante $\Deltaarf3$ de <i>M. circinelloides</i>	67
Figura 14.	Determinación del daño celular en <i>C.elegans</i> ocasionado por la fracción V_0 de 3 kDa de $\Deltaarf3$ de <i>M.circinelloides</i> ...	68
Figura 15.	Determinación de la naturaleza química y termotolerancia del factor de virulencia secretado $\Deltaarf3$ de <i>M.circinelloides</i> ...	70
Figura 16.	Identificación del homólogo Rfs de <i>R. Delemar</i> en <i>M. circinelloides</i>	72

Figura 17.	Análisis cualitativo de actividad de secreción de sideróforos por parte de las cepas de <i>M.circinelloides</i>	73
Figura 18.	Niveles de RNAm de <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i> en cultivos líquidos con y sin Fe ⁺²	74
Figura 19.	Niveles de RNAm de <i>rfs</i> de <i>M.circinelloides</i> en hígado de ratón	75
Figura 20.	Niveles de RNAm de <i>IL-6</i> en hígado de ratones infectados con <i>M.circinelloides</i> ...	77
Figura 21.	Efecto de las mutaciones en $\Deltaarf3$ y $\Deltaarf4$ en el crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables ...	78
Figura 22.	Germinación en ácido oléico de las cepas $\Deltaarf3$ y $\Deltaarf4$ de <i>M.circinelloides</i>	79
Figura 23.	Efecto de las mutaciones en $\Deltaarf3$ y $\Deltaarf4$ en el contenido de ADN mitocondrial.....	80
Figura 24.	Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR convencional para la construcción del fragmento recombinante para la delección del gen <i>rfs</i> de <i>M. circinelloides</i>	81
Figura 25.	Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR en fusión para la delección del gen <i>rfs</i> de <i>M. circinelloides</i>	82
Figura 26.	Confirmación molecular mediante PCR de la cepa mutante en <i>rfs</i> de <i>M. circinelloides</i>	84
Figura 27.	Confirmación molecular de la doble mutante en el gen <i>rfs</i> de la cepa mutante $\Deltaarl1^{(+/-)}$ de <i>M. circinelloides</i>	86
Figura 28.	Función de Rfs en la virulencia de la cepa $arl1^{(+/-)}$ de <i>M. circinelloides</i>	87
Figura 29.	Confirmación molecular de la doble mutante en el gen <i>rfs</i> de la cepa mutante $\Deltaarf3$ de <i>M. circinelloides</i>	88

B. INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Proteínas G monoméricas y su función.....	16
Tabla 1.	Factores que determinan el dimorfismo en ciertos hongos.....	23
Tabla 2.	Cepas utilizadas.....	36
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados en experimentos de PCR.....	45

Tabla 5. Determinación del consumo de glucosa en medio YNB con 2% de glucosa de aposterior a 48 horas de crecimiento.....	59
Tabla 6. Determinación del consumo de glucosa en medio YNB con 0.5% de glucosa posterior a las 48 horas de crecimiento	60

C. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

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

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

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

kDa: kilo Daltons

PGH: Proteínas G heterotriméricas

PM: Peso molecular

ARN: Ácido ribonucleico

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

TAE: Tris-Acetato- EDTA

Ma: millones de años

Ga: Mil millones de años

E. PREFIJOS

M: mega (1 x 10⁶)

K: kilo (1 x 10³) μ : micro (1 x 10⁻⁶) n: nano (1 x 10⁻⁹)

Palabras clave: *mucormicosis* , *virulencia*, *vesículas secretables*, *sideróforo*,
rizoferrina,

RESUMEN

Las proteínas Arf pertenecen a la familia de proteínas G monoméricas, las cuales tienen como función principal la formación de vesículas en las células eucarióticas. Las vesículas participan en el tráfico vesicular, este tráfico permite el movimiento intra y extracelular de moléculas con diversos fines. Nuestro grupo realizó previamente la mutación de los 4 genes *arf* y 2 genes *arl* en *M. circinelloides*. El sobrenadante de cultivo (medio rico YPG) de todas las mutantes *arf* y el de la mutante *arl1*^(+/-) generó una mayor virulencia respecto a la cepa silvestre, siendo el sobrenadante de la mutante $\Delta arf3$ el que generó el mayor nivel de virulencia. En parte se logró explicar que esta relacionada a una naturaleza protéica la(s) molécula(s) secretada(s) por parte de las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1$ ^(+/-).

En este trabajo se usó el medio de cultivo YNB, el cual posee como única fuente de nitrógeno sulfato de amonio, que a diferencia del YPG, no interfiere con la presencia de péptidos derivados de la peptona de gelatina. El sobrenadante producido en medio YNB mantuvo la actividad virulenta, además de encontrar que el(los) factor(es) virulento(s) son susceptibles a la acción de proteasas, además de ser acumulado(s) respecto al crecimiento de *M. circinelloides*.

La separación de los componentes secretados al medio de cultivo mediante el uso de membranas de exclusión molecular demostró que el peso molecular de dicho factor de virulencia es menor de 3 kDa. Por otra parte, la capacidad de virulencia de dicho(s) factor(es) se mantiene incluso después de ser sometida a 97°C durante 30 minutos. Se observó una mayor actividad de sideróforo en las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1$ ^(+/-). La cuantificación del RNAm del gen *rfs*, que codifica a la enzima sintetasa crucial en la biosíntesis del sideróforo rizoferrina, reveló una mayor acumulación en la cepa $\Delta arf3$ y $\Delta arl1$ ^(+/-) respecto a la cepa silvestre. El grado de daño del SS y la fracción menor a 3 kDa provenientes de las cepas $\Delta arf3$ y $\Delta arl1$ ^(+/-) fue mayor tanto en tejidos de ratón como el nemátodo respecto a la cepa WT. La interrupción del gen *rfs* en la cepa $\Delta arl1$ ^(+/-) reveló una menor virulencia, respecto a su cepa parental, sugiriendo fuertemente que la síntesis del sideróforo rizoferrina es un factor de virulencia secretado por la cepa $\Delta arl1$ ^(+/-).

ABSTRACT

Arf proteins belong to the family of monomeric G proteins, which have as their main function the formation of vesicles in eukaryotic cells. Vesicles participate in vesicular traffic process, this traffic allows intra and extracellular movement of molecules for various purposes. Our group previously performed the mutation of the 4 *arf* genes and 2 *arl* genes in *M. circinelloides*. The cell-free culture supernatant (SS), produced in YPG rich medium, of all the *arf* mutants and that of the $\Delta arl1^{(+)(-)}$ mutant generated a greater virulence rate with respect to the wild-type strain, with the $\Delta arf3$ mutant SS being the one that generated the highest level of virulence. In part, it was possible to explain that the molecule (s) secreted by the mutants $\Delta arf3$ and $\Delta arl1^{(+)(-)}$ is related to a protein nature.

In this work, the YNB culture medium was used, which has as its only nitrogen source ammonium sulfate, which, unlike YPG, does not interfere with the presence of peptone derived from gelatin peptone. The SS produced in YNB medium from mutant $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ strains maintained the virulent activity, in addition to finding that the virulent factor (s) are susceptible to the action of proteases, moreover to being accumulated (s) with respect to the growth of *M. circinelloides*.

The separation of the components secreted to the culture medium by the use of molecular exclusion membranes showed that the molecular weight of the virulence factor is less than 3 kDa. On the other hand, the virulence capacity of the virulent factor (s) is maintained even after being subjected to 97 ° C for 30 minutes. Increased siderophore presence was observed in the $\Delta arf3$ and $\Delta arl1^{(+)(-)}$ mutant strains. Quantification of the mRNA of the *rfs* gene, which encodes a crucial synthetase enzyme in the biosynthesis of the siderophore rhizoferrin, revealed a higher mRNA accumulation in the strain $\Delta arf3$ and $\Delta arl1^{(+)(-)}$ with respect to the wild-type strain. The degree of damage of the SS and the fraction less than 3 kDa from the $\Delta arf3$ and $\Delta arl1^{(+)(-)}$ strains was higher in both mouse tissues and the nematode with respect to the WT strain. The interruption of the *rfs* gene in strain $\Delta arl1^{(+)(-)}$ revealed a lower virulence rate, compared to its parental strain, strongly suggesting that the synthesis of rhizoferrin siderophore is a virulence factor secreted by strain $\Delta arl1^{(+)(-)}$.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Tráfico vesicular

La función de las proteínas en células eucariotas está ligada a su localización intracelular, como es el caso de los receptores de la membrana plasmática (**Carpenter y Cohen, 1976; Carpentier y col., 1986**); receptores nucleares (**Mimoto y col., 2007**) o proteínas cuya actividad enzimática depende de la localización en ciertos organelos (**Van Meel y col., 2014**).

Los factores que determinan la localización de las proteínas en los distintos compartimentos celulares se basan en secuencias específicas dentro de la proteína (**Johnson y Kornfeld 1992; Groux-Degroote y col., 2018**), modificaciones postraduccionales (**Hicke y Riezman, 1996; Meza-Carmen y col., 2011**) y/o procesos de transporte mediados por tráfico vesicular (**Rothman y Wieland, 1996; Chen y col., 2019**). El tráfico vesicular es un evento mediante el cual ciertas proteínas son transportadas en vesículas con la finalidad de ser importadas del exterior celular (endocitosis), transportadas a ciertos compartimentos intracelulares o secretadas al exterior (exocitosis). El tráfico vesicular es uno de los mecanismos más importantes que controlan el destino de las proteínas dentro de una célula eucariótica (**Rothman y Wieland, 1996**).

La respuesta a estímulos externos, como en el caso de la presencia de factores de crecimiento o variaciones en el medio extra e intracelular (especies reactivas de oxígeno, pH, entre otras), son mediadas en gran parte por el tráfico vesicular, produciendo finalmente las alteraciones apropiadas en el metabolismo, crecimiento o movimiento celular (**Eden y col., 2009**). La formación de vesículas es un proceso complejo que involucra múltiples etapas, desde el ensamblaje de las proteínas de cubierta de la vesícula y la selección de la proteína cargo; seguida por la deformación de la membrana y gemación de la vesícula. Una vez que la vesícula interacciona con su destino final ocurre una desestabilización de la membrana receptora, el anclaje y fusión de la vesícula para translocar su contenido (**Spang, 2009**). En la biogénesis vesicular actúan diversas proteínas, como las proteínas que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Las proteínas

G se han descrito como interruptores moleculares para iniciar y finalizar diversos procesos celulares (**Bonifacino y Glick, 2004; Pfeffer, 2009**).

Las proteínas G monoméricas están constituidas por diversas familias, una de las cuales comprende a los factores de ADP-ribosilación (ARF, por sus siglas en inglés ADP-Ribosylation Factor), las cuales tienen un peso molecular alrededor de 20 kDa, las proteínas ARFs han sido descritas en todas las células eucarióticas desde levaduras hasta humanos (**Tabla 1**). Estos factores fueron inicialmente nombrados y caracterizados bioquímicamente debido por su capacidad de estimular la actividad de ADP-ribosiltransferasa de la subunidad A de la toxina de cólera (**Moss y Vaughan., 1995**). Posteriormente, a estas proteínas ARFs se les asoció con una función crucial en el metabolismo de las vesículas, incluyendo el reclutamiento de las proteínas que constituyen la cubierta de las vesículas para iniciar la formación y gemación de las mismas (**Figura 2**) (**Moss y Vaughan., 1995**).

Tabla 1. Proteínas G monoméricas y su función.

Familia		Función
Ras		Reguladores clave de procesos celulares incluidos: diferenciación y proliferación celular. (Reiner y Lundquist., 2018)
Rho		Regulan la dinámica del citoesqueleto.
Ran		Regular el ciclo de importación y exportación nuclear. (Clarke y Zhang., 2008)
Arf	Arf (<u>A</u> D <u>P</u> - <u>R</u> ibosylation <u>F</u> actor)	Involucradas en la biogénesis y reciclaje de vesículas, el tráfico intracelular y la regulación del citoesqueleto. (Reiner y Lundquist., 2018)
	Arl (Arf-like)	Regulan el tráfico de membrana y la estructura de los orgánulos (Donaldson y Jackson., 2011)
	Sar (<u>S</u> ecretion <u>A</u> sociated and <u>R</u> as- related protein)	Proteínas conservadas en todos los eucariotas. Participan en secreción de vesículas aunque su función no está descrita completamente. (Donaldson y Jackson., 2011)
Rab		Encargadas de direccionar las vesículas generadas por las proteínas Arf (Zhe Yi Zheng y col., 2014)

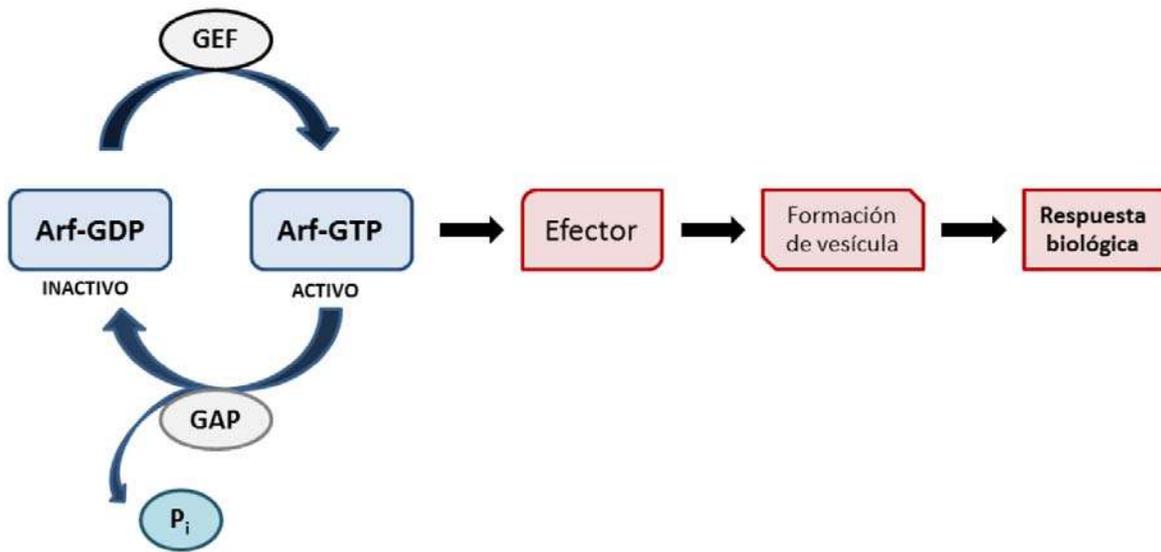


Figura 1. Esquema de activación y desactivación de estas proteínas Arf. Las proteínas arf oscilan de un estado inactivo a uno activo mediante el uso de GTP que actúa como segundo mensajero activando a la proteína G al unirse a ésta. Cuando la célula requiere cambiar el estado de activación de esa proteína, entra en acción una proteína GTPasa, que convierte el GTP del complejo GTP-proteína G, a GDP, liberando un sustrato GDP-proteína G inactivo. Tomada y modificada de (East y col., 2011).

1.2 Participación de las proteínas ARF en hongos

Saccharomyces cerevisiae

Se conocen en *S. cerevisiae* tres genes que codifican a proteínas ARF (*ARF1-ARF3*), las proteínas de los genes *ARF1* y *ARF2* participan en el tráfico vesicular específicamente en la ruta exocítica y son 96% idénticas entre sí (Stearns et al., 1990; Lee, 1994). La interrupción del gen *ARF1* causa un crecimiento lento y sensibilidad al frío. La interrupción del gen *ARF2* no causa ningún fenotipo detectable, por lo contrario la interrupción de ambos genes es letal, por lo que las proteínas de *ARF1* y *ARF2*, tienen funciones parcialmente redundantes y en conjunto son esenciales para el crecimiento (Stearns, 1990). Mientras que la

proteína de *ARF3* muestra hasta un 56% de identidad con las proteínas de *ARF1* y *ARF2* y tiene una función importante en el crecimiento polarizado, en la emergencia de la gema (**Huang y col., 2003**).

Candida albicans

El gen *AGE3* codifica para una proteína ARF-GAP, mutantes en *AGE3* mostraron sensibilidad a esteroides e inhibidores de pared celular, como fluconazol y caspofungina, respectivamente. Estudios de infección *in vivo* llevados a cabo en ratón demostraron que mutantes en *AGE3* son avirulentas en ratones normales y, con un efecto atenuado en ratones inmunocomprometidos. Estos datos indican que el metabolismo de las proteínas ARF está involucrado en procesos de virulencia en hongos (**Epp y col., 2010**). Por otra parte, mutaciones en los genes *ARF2* y *ARL1* generaron un menor nivel en la virulencia de este hongo resultados indican que de estas proteínas, *ARF2* es necesario para la viabilidad y la sensibilidad a los medicamentos antimicóticos. Cuando se reprime la expresión de *ARF2* se producen defectos en el crecimiento filamentoso, la integridad de la pared celular y la virulencia, probablemente debido a la alteración del Golgi. Mientras que el producto del gen *ARL1* es necesario para el crecimiento filamentoso invasivo y, al interrumpir *ARL1* las hifas son sustancialmente más cortas que las de tipo silvestre, debido a la incapacidad de este mutante para mantener el crecimiento de hifas en un solo sitio (**Labbaoui y col., 2017**).

Aspergillus nidulans

Aspergillus nidulans codifica seis proteínas de la familia Arf. Se ha descrito que la interrupción del gen *arfB* origina crecimiento isotrópico extendido de conidios en germinación seguido de lisis celular o emergencia múltiple de tubos germinales aleatorios, consistente con una falla en el establecimiento de la polaridad. Los tubos germinativos y las hifas que se forman inicialmente serpentean anormalmente fuera del eje de polaridad y con frecuencia muestran una ramificación dicotómica en los ápices celulares, lo que concuerda con un defecto en el mantenimiento de la polaridad. Otra característica de la mutación es una

reducción y retraso en la endocitosis (**Lee y col., 2008**). Mientras que la eliminación del gen *arfA* resultó ser letal (**Fiedler y col., 2017**).

Magnaporthe oryzae

Magnaporthe oryzae es un hongo patógeno de arroz que produce la enfermedad denominada piriculariosis. Este hongo posee la proteína MoGlo3 la cual es una proteína tipo ArfGAP que es homóloga a GLO3p de la levadura *S. cerevisiae*. MoGlo3 complementa parcialmente la función de la mutación en el gen *GLO3* de *S. cerevisiae*. De acuerdo con los hallazgos en *S. cerevisiae*, MoGlo3 está localizado en el Golgi, y su localización depende del dominio conservado de BoCCS. MoGlo3 se expresa durante las etapas de conidiación e infección temprana y es necesario para el crecimiento vegetativo, la producción de conidias y el desarrollo sexual. La cepa mutante Δ *Moglo3* es defectuosa en la endocitosis, la eliminación de las especies reactivas de oxígeno y en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (ER), los efectos combinados de estos defectos resultan en una disminución de la patogenicidad (**Zhang y col., 2017**). Recientemente se identificaron los siguientes miembros pertenecientes a la familia ARF MoArf1, MoArf6, MoArf11, MoArf13, MoArf18, MoCin4, and MoSar1. Las cuales están involucradas en el crecimiento y virulencia de este fitopatógeno (**Zhang et al., 2019**).

1.3 Generalidades del 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 a que la mayoría de sus representantes tienen hifas cenocíticas (no septadas) durante todo su ciclo de vida (**White y col., 2006; Morin-Sardin et al., 2017**).

Se ha propuesto eliminar al Phylum Zygomycota y ser distribuidos en un subphylum Mucormycotina, entre el Phylum Glomeromycota y 4 subphylum más (**Kwon-Chung, 2012**). Los miembros de este subphylum constituyen los hongos

terrestres más primitivos con los fósiles más antiguos que se originaron en la era precámbrica, entre 800 Ma y 1.2 -1.4 Ga. Las especies de *Mucor* se caracterizan por un alto potencial reproductivo y una vida corta que facilita la explotación exitosa en condiciones severamente perturbadas pero ricas en nutrientes (**Morin-Sardin et al., 2017**).

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, 1962; Orlowski, 1991**). 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 (**McIntyre y col., 2002**).

1.4 Generalidades de *Mucor circinelloides*

El hongo *M. circinelloides* es un mucoral dimórfico que crece como levadura en condiciones anaeróbicas y como hongo filamentoso en condiciones aeróbicas, lo cual en general correlaciona con un metabolismo fermentativo y oxidativo, respectivamente (**Lübbehüsen y col., 2003**).

M. circinelloides se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de distintos procesos biológicos, como es la síntesis de metabolitos secundarios, dimorfismo, respuesta a la luz, síntesis de lípidos y silenciamiento génico. Contiene un genoma un poco más pequeño de 36.6 megabases respecto a otros hongos por ejemplo el ascomyceto *Neurospora crassa* quien posee un genoma de 42.9 megabases (**Corrochano et al., 2016**).

En el caso de *M. circinelloides* posee 11,719 genes, además es de fácil manipulación y rápido crecimiento en condiciones de laboratorio. Su ventaja principal sobre otros mucorales es la existencia de un sistema eficaz de transformación genética que permite la introducción de DNA exógeno dentro del hongo (**Roncero y col., 1989; Gutiérrez y col., 2011**).

Se ha descrito como un hongo patógeno oportunista humano, agente causal de la mucormicosis, una enfermedad rara pero letal cuya incidencia ha ido en aumento durante los últimos años (**Álvarez y col., 2009**) Estudios recientes indican un incremento significativo de la mucormicosis debido al aumento en la población de pacientes inmunodeprimidos como consecuencia del SIDA, diabetes mal controlada, enfermedades hematológicas, trasplantes de órganos o de células hematopoyéticas (**Petrikkos y col., 2012**). Una de las principales preocupaciones relacionadas con la mucormicosis es la alta tasa de mortalidad que presenta, aproximadamente un 50% en general, pero más del 90% en los casos de infecciones diseminadas con un tratamiento no adecuado (**Skiada y col., 2013**).

1.5 Factores de virulencia en hongos

Un determinante de patogenicidad es un factor de virulencia, el cual está definido como cualquier componente metabólico microbiano que causa daño al huésped (**Casadevall y Pirofski., 1999**). Algunos de los factores de virulencia que han sido descritos son:

Termotolerancia

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. Se ha demostrado en cepas de origen clínico de *Sporothrix schenckii* aisladas de lesiones cutáneas, que no son capaces de crecer eficientemente a 37 °C, son incapaces de invadir órganos internos de ratones (**Hogan y col., 1996**).

Dimorfismo

Es la capacidad de algunos hongos de presentar dualidad fenotípica, es un proceso de diferenciación celular, que puede ser propiciado por diversos factores como cambios ambientales: humedad, pH, temperatura, nutrientes, disponibilidad de oxígeno (**Tabla 1**). Durante este proceso se modifica su fisiología y morfología para adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento (**Klein y Tebbets., 2007**).

En el caso de patógenos de humano este proceso permite evadir la respuesta inmunológica del huésped. Un ejemplo es *C. albicans* quien tiene la capacidad de desarrollarse como levadura en las mucosas del ser humano; sin embargo, al formar micelio, se infiltra en tejidos internos causando una infección invasiva de decenlace mortal (**Yamada-Okabe y col., 1999**). Cabe hacer mención que mutantes de *C. albicans* incapaces de hacer esta transición de levadura a micelio son menos virulentas.

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 son absorbidas y 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**).

Adhesión

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**). La importancia de la adhesión el proceso de infección puede ser explicado con el hongo *Candida glabrata* el cual posee proteínas de la familia Epa de las cuales las más estudiadas han sido Epa1, Epa6 y Epa7. Éstas tres proteínas son intermediarios en la adherencia hacia las células epiteliales y endoteliales humanas (**De Groot y col., 2013**).

Tabla 2. Factores que determinan el dimorfismo en ciertos hongos

Morfógeno	Hongo
Cambio de temperatura	<p><i>Talaromyces marneffeii</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Blastomyces dermatitides</i>, <i>Sporothrix schenckii</i>, <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, <i>Coccidioides immitis</i>, <i>Lacazia laboi</i> y <i>Emmansia sp.</i> (Nemecek y col., 2006)</p>
Cambio en la disponibilidad de nutrientes	<p><i>Cándida albicans</i> (Nemecek y col., 2006)</p>
Concentraciones de CO₂, Hexosas	<p><i>Mucor circinelloides</i> (McIntyre y col., 2002)</p>
pH	<p><i>Sporothrix schenckii</i> (Findlay y col., 1984)</p>

Estas especies tienen la capacidad de cambiar entre levadura y micelio en función del cambio de los factores descritos. Dependiendo de la especie, la levadura o la forma micelial pueden ser patógenas.

Producción de enzimas

Ciertas 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*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *C. neoformans* **(Ghannoum, 2000)**.

Por lo tanto 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.

1.6 Mucormicosis

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 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 **(Petrikkos., 2012; Petrikkos y Tsioutis, 2018)**.

La incidencia de micosis oportunistas han incrementado durante los últimos 20 años con rangos de mortalidad elevados en ausencia de terapia antifúngica (>90%) **(Petrikkos y col., 2012)**. 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; Dannaoui y Lackner, 2019)**.

Las manifestaciones clínicas de la mucormicosis dependen del sitio de infección:

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)**.

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)**.

Cutánea: Requiere de una lesión sucutánea para que el hongo pueda 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 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, está asociada mayormente a pacientes con alto grado de desnutrición **(Spellberg y col., 2005)**.

Diseminada: Tiene la capacidad de diseminarse 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.

La presencia de Mucorales en muestras clínicas es cada vez más frecuente, 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)**.

1.7 Factores de virulencia de Mucorales

Existen pocos reportes de factores de virulencia en Mucorales, los cuales incluyen, el tamaño de la espora, reguladores del dimorfismo o el metabolismo del hierro. El tamaño de las esporas contribuye a la virulencia en *M. circinelloides* (Li y col., 2011). Mutaciones en el gen que codifica a la subunidad catalítica de la calcineurina (*cnaA*) produjo esporas mas grandes y mas virulentas comparadas con aquellas esporas producidas por la cepa silvestre (Lee y col., 2013). Las transiciones morfológicas también contribuyen en la virulencia durante la infección al huésped. En una condición de crecimiento aeróbico, la cepa silvestre genera abundantes hifas, mientras que la mutante en el gen *cnbR*, el cual codifica a una subunidad regulatoria en *M. circinelloides*, generó células levaduriformes y exhibió una virulencia reducida comparada con la cepa silvestre (Lee y col., 2013). De hecho algunos receptores en la células del huésped pueden ser usados por algunos mucorales para generar daño celular, como es el caso de la proteína murina de membrana plasmática de células endoteliales GRP78, la cual es sobreexpresada durante la cetoacidosis diabética y la cual media la invasión en células endoteliales por *R. oryzae* (Liu y col., 2011). Mutaciones en los genes que codifican a los factores ADP-Rybosilación Arf1 y Arf3 (Patiño-Medina y col., 2018), además de la proteína Arl1 (Patiño-Medina y col., 2019) condujeron a la secreción de moléculas susceptibles a la acción de proteasas con actividad virulenta, las cuales contribuyen a la patogénesis en *M. circinelloides*. En el Mucoral *R. oryzae* el gen *ptr1*, el cual codifica a una permeasa de hierro de alta afinidad, es requerida para la patogenicidad en el modelo de ratón diabetizado (Ibrahim y col., 2010). El metabolismo del hierro es un factor muy importante para el adecuado crecimiento de los organismos, por lo cual todos los organismos, incluyendo los hongos, han generado diversas estrategias para su captura de hierro, incluidas la secreción de sideróforos. Los sideróforos son compuestos producidos por bacterias, hongos y plantas gramíneas para atrapar el hierro del medio ambiente. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (500–

1500 Daltons) que poseen una alta afinidad por el hierro (III) ($K_M > 10^{30}$ M), cuya biosíntesis está regulada por los niveles de hierro y cuya función es suministrar hierro a la célula **(Hider y Kong., 2010)**.

Todos los hongos producen sideróforos de tipo hidroxamato con la excepción de los hongos Mucorales, que secretan rizoferrina, un sideróforo de tipo policarboxilato **(Figura 2) (Thieken y Winkelmann, 1992)**.

En el mucoral *R. delemar* se ha descrito una enzima sintetasa clave para la biosíntesis de un sideróforo (Rfs) independiente de sintetazas ribosómicas NRPS (NIS), homólogo a SfnA que participa en la biosíntesis de estafiloferrina en *Staphylococcus aureus*. Se identificó una proteína en *R. delemar* con 22% de identidad y 37% de similitud con SfnA, que contiene un dominio de la familia lucA/lucC N-terminal, y un dominio transportador tipo FhuF de reductasa de hierro férrico conservado en el extremo C-terminal. La síntesis de dicho gen fúngico se ve reprimida por hierro como es de esperarse para un siderofo. La biosíntesis de la rizoferrina no se encuentra dilucidada sin embargo se plantea la hipótesis de que la síntesis de esta molécula debería requerir una sola enzima tipo Sfn para catalizar la condensación de dos moléculas de citrato en una molécula de diaminobutano (putrecina) en reacciones secuenciales **(Figura 3) (Carrol y col., 2017)**.

Se han descrito pocos factores de virulencia que son secretados por *M. circinelloides*, como por ejemplo, el metabolito secundario tóxico detectado hasta ahora en *M. circinelloides* corresponde al ácido 3-nitropropiónico, el cual tiene un efecto neurotóxico, inhibiendo la succinato deshidrogenasa **(Ludolph y col., 1991; Hollmann y col., 2008)**.

Sin embargo, aun son escasos los factores en *M. circinelloides* el metabolismo fermentativo tiene un papel clave en el proceso de la virulencia, una disfunción de la enzima que convierte acetaldehído a etanol (Adh1) genera una acumulación de acetaldehído en el medio extracelular, lo cual genera un ambiente tóxico para nemátodos y ratones **(Díaz-Pérez., y col 2019)**.

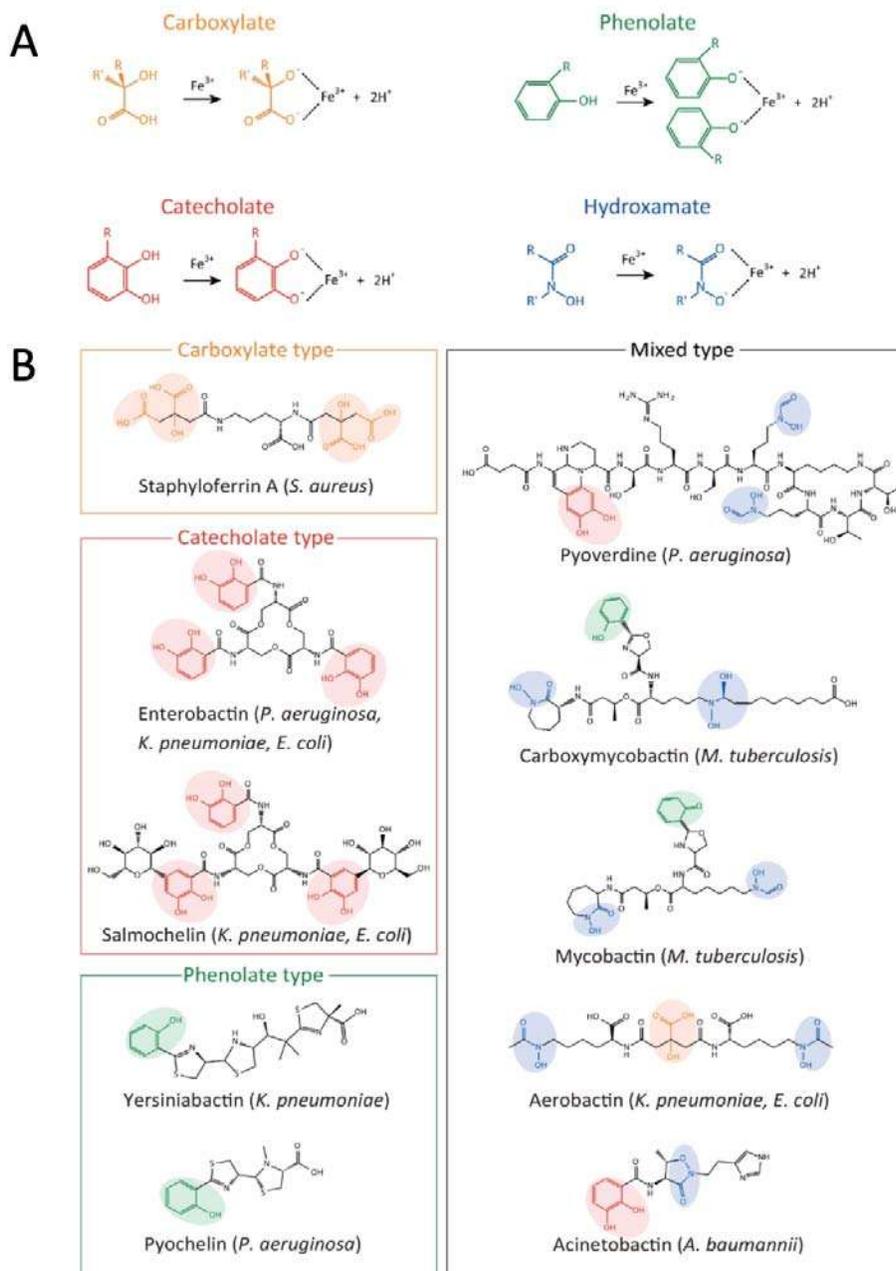


Figura 2 . Estructura química de sideróforos. (A) Se han descrito cuatro tipos generales de sideroforos con capacidad de unión de hierro: carboxilato (naranja), fenolato (verde), catecolato (rojo) e hidroxamato (azul). **(B)** Se muestran las estructuras de sideróforos de patógenos nosocomiales. Los sideróforos de tipo mixto contienen más de un tipo de sideroforos. Tomada de **(Wilson y col., 2016)**.

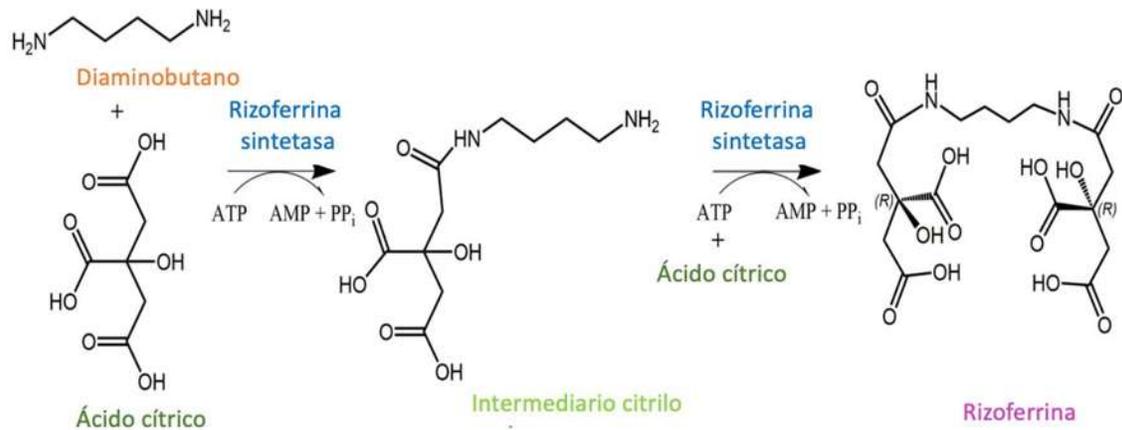


Figura 3. Propuesta de la vía biosintética para la rizoferrina fúngica. Se ha propuesto en la biosíntesis de rizoferrina a la enzima Rfs que cataliza la condensación dependiente de ATP del citrato con el diaminobutano (putrecina) en la primera etapa seguido de la adición de un segundo citrato al intermediario monocitril-diaminobutano (Tomada de Carrol y col., 2017).

Por otra parte la interrupción de la subunidad reguladora de la fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina A generó una mutante virulenta asociada a la generación de esporas de mayor tamaño respecto a la cepa silvestre (Lee y col., 2013), observándose una germinación más rápida en estas esporas de mayor tamaño lo cual conlleva a un tiempo más reducido en colonizar tejidos y lisar macrófagos.

Otro factor de virulencia prometedor que podría traducirse en nuevos blancos para medicamentos antimicóticos para tratar la mucormicosis, están basados en el mecanismo de absorción de hierro. En el proceso diabético, se genera un pH anormalmente ácido, lo cual desestabiliza los sistemas quelantes de hierro del huésped, lo que aumenta la cantidad de ión férrico libre (Fe^{+3}) en el plasma. Esta condición llamada cetoacidosis diabética supone una ventaja para los hongos

patógenos que han desarrollado un sistema de reducción de hierro perteneciente a la familia FRE de reductasas de membrana plasmática, este sistema de reducción está compuesto de tres componentes para la absorción de Fe^{3+} (Navarro y col., 2018).

1. El primer componente de este sistema es una metaloreductasa de membrana plasmática o reductasa férrica (codificada por genes *fre*) que reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} .
2. El ion ferroso Fe^{2+} se oxida luego mediante una ferroxidasa multicopper de transporte de hierro (codificada por los genes *fet3*) a Fe^{3+} .
3. El tercer componente del sistema, es una permeasa de hierro de alta afinidad (codificada por los genes *ftr1*) que finalmente permite su transporte dentro de la célula.

1.7.1 Función de las reductasas FRE de membrana plasmática en hongos

El papel de la familia FRE de reductasas de membrana plasmática en la absorción de hierro se estudió en *S. cerevisiae*, en el que se describieron varias metaloreductasas homólogas con una función redundante que confiere la capacidad de utilizar hierro. Estas reductasas de hierro se han asociado a la virulencia del patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, en el que mutantes que carecen del gen *FRE2* mostraron virulencia atenuada. Este fenotipo se relaciona con los defectos de crecimiento observados en estas cepas como consecuencia de su incapacidad para usar hierro del grupo hemo y las fuentes de transferrina del huésped, el papel de la ferroxidasa multicopper Cfo1, que es un ortólogo de la ferroxidasa FET3 de *S. cerevisiae*, también se ha relacionado con la virulencia en *C. neoformans*. Una mutante que carece de *CFO1* y *FRE2* mostraron un defecto de crecimiento más pronunciado, lo que indica que ambos componentes participan en el sistema de captación de alta afinidad (Navarro y col., 2018).

1.7.2 Función de las reductasas FRE de la membrana plasmática en Mucorales

Con respecto a Mucorales, solo la permeasa de hierro de alta afinidad Ftr1 se ha caracterizado y asociado a la virulencia en *R. oryzae* en el cual mutantes en el gen *ptr1* están afectadas en su capacidad de adquirir hierro durante el cultivo *in vitro* y presentan virulencia reducida durante las infecciones *in vivo* en modelos de ratón. Lo cual evidencia un papel crucial del sistema de captación de hierro de alta afinidad en el desarrollo de mucormicosis, correlacionando la susceptibilidad de los pacientes que presentan niveles desequilibrados de hierro disponible a esta infección **(Navarro y col., 2018)**.

Además, se ha demostrado mediante análisis de expresión de los genes *fet3a*, *fet3b* y *fet3c* que las *ferroxidasas* de *M. circinelloides* se requieren tanto a baja concentración de hierro disponible como durante la infección en un modelo de ratón, debido a que la inducción de estos se genera en ausencia de hierro lo que sugiere un papel funcional de sus proteínas codificadas en el metabolismo del hierro durante el desarrollo regular, mientras que las mutaciones sencillas en dichos genes disminuyen su virulencia, habiendo diferencia significativa en reducción de mortalidad en la cepa mutante *fet3c*, lo cual evidencia un papel principal en la absorción de hierro durante el proceso de infección **(Navarro y col., 2018)**.

1.8 Proteínas Arf en la morfogénesis y virulencia de *M. circinelloides*

M. circinelloides es un hongo dimórfico utilizado para estudiar la diferenciación celular que ha surgido como un modelo para caracterizar la mucormicosis, en el cual se han identificado cuatro genes que codifican el factor de ribosilación ADP (Arf) (*arf1-arf4*) y se ha reportado su papel en la morfogénesis y la virulencia **(Figura 3) (Patiño-Medina y col., 2018)**. Las proteínas Arfs son reguladores clave en el tráfico vesicular y están asociados con el crecimiento y la virulencia en los hongos **(Patiño-Medina y col., 2018)**. Arf1 y Arf2 son necesarias para la esporulación y desarrollo de la levadura, mientras que Arf1 participa en el crecimiento aeróbico. Por el contrario, Arf3 y Arf4 solo desempeñan roles

menores, pero aparentemente redundantes, durante el crecimiento aeróbico. Todas las cepas mutantes en los genes *arf* son más virulentas que la cepa de tipo silvestre en modelos de ratón y nematodos, siendo la mutante $\Delta arf3$ la más virulenta. Las proteínas Arfs regulan procesos celulares importantes como la morfogénesis y la virulencia, sentando las bases para caracterizar las redes moleculares subyacentes a esta regulación (**Patiño-Medina y col., 2018**).

Por otra parte, las proteínas Arl (Arf like protein) pertenecen a la familia Arf y están involucradas en el tráfico de vesículas y el ensamblaje de tubulina. Se han reportado la función de dos genes que codifican a proteínas Arl, *arl1* y *arl2*, en *M. circinelloides*. Se obtuvieron mutantes heterocariontes para el gen *arl1* ($\Delta arl1^{(+)(-)}$) indicando la esencialidad del gen en el crecimiento de *M. circinelloides*, sin embargo esto no conduce a una letalidad, debido a que este hongo es multinucleado en todas sus etapas de crecimiento, por lo cual se pueden obtener mutantes con nucelo mutantes y nucelos silvestres en la misma célula; además se obtuvo la mutante homocarionte *arl2* ($\Delta arl2$). Se describió la participación de estas dos proteínas en la morfogénesis, la virulencia y la susceptibilidad antifúngica, se encontró que Arl1 está implicada en la generación de un desarrollo adecuado del micelio, además produce una menor cantidad de esporas respecto a la cepa silvestre, y el crecimiento de dicha mutante *arl1* mostró una mayor susceptibilidad al dodecilsulfato y azoles, lo que sugiere un defecto en la pared celular que se vio respaldado por una disminución en el contenido de sacáridos. Estos defectos en la pared celular posiblemente se originaron por el tráfico anormal de vesículas. Mientras que la mutante en el gen *arl2* mostró menos defectos que la cepa silvestre (WT) (**Patiño- Medina y col., 2019**).

Por otra parte, fueron analizadas las posibles funciones de los productos de los genes *arl1* y *arl2* en el tráfico de vesículas de *M. circinelloides*, mediante tinción FM4-64 de esporas germinadas en condiciones aeróbicas. Para ambas cepas $\Delta arl1^{(+)(-)}$ y $\Delta arl2$, se observó un cambio en el patrón de la localización de la fluorescencia en ambas mutantes respecto a la cepa de WT con una pérdida de fluorescencia en la región apical y una distribución más dispersa de la tinción dentro

de las hifas. La microscopía confocal reveló que la tinción FM4-64 de $\Delta arl2 + arl2wt$ y cepa WT mostró una zona de fluorescencia brillante en una región que corresponde a la ubicación esperada de las vesículas apicales (**Figura 4**) (**Patiño-Medina y col., 2019**).

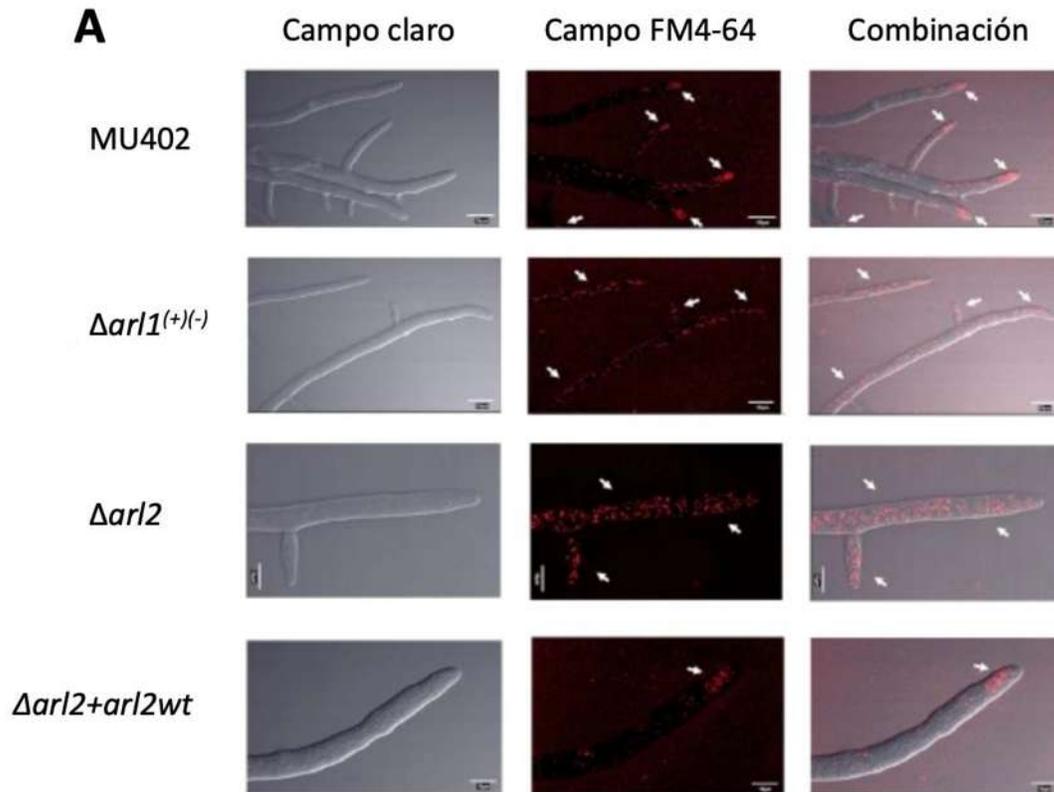


Figura 4. Los genes *arl1* y *arl2* regulan el tráfico de vesículas y el contenido de quitina en la pared celular en *M. circinelloides*. Se realizó una tinción con el colorante FM4-64 en germinulas de *M. circinelloides*. Las esporas de las cepas MU402, $\Delta arl1^{(+/-)}$, $\Delta arl2$, $\Delta arl2 + arl2wt$ fueron germinadas bajo condiciones aerobias, las cuales fueron teñidas con FM4-64. Haciendo uso del "método de bloqueo de agar invertido" (**Hickey et al., 2002**), las cepas se incubaron con FM4-64 para teñir endosomas o vacuolas maduras. La microscopía confocal mostró patrones de distribución de tinción FM4-64 distintos entre $\Delta arl1^{(+/-)}$ y $\Delta arl2$; en comparación con las cepas de tipo salvaje y $\Delta arl2 + arl2wt$. Las puntas de flecha blancas representan la tinción de los endosomas (**Tomada de Patiño-Medina y col., 2019**).

II. JUSTIFICACIÓN

M. circinelloides es uno de los agentes etiológicos de la infección oportunista conocida como mucormicosis (también conocida como zigomicosis). Esta es una infección mal diagnosticada, de prevalencia escasa pero mortal. La mucormicosis es una infección de tipo emergente y es reconocida como una infección prevalente en pacientes inmunodeprimidos y trasplantados (**Chayakulkeeree y col., 2006**). Se ha reportado recientemente un incremento en mucormicosis debido al aumento en la población de pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, pacientes diabéticos descompensados, VIH positivos, con malignidades hematológicas como leucemias, trasplantados, entre otros (**Kontoyiannis y col., 20012**). Sin embargo, es escaso el conocimiento a nivel molecular de los factores de virulencia secretados por este hongo, por lo que el conocimiento de dichos factores es fundamental para establecer posibles enfoques racionales para la regulación de la producción de dichos factores de este organismo.

III. HIPÓTESIS

Las mutantes en los genes *arf3* o *arl1^(+/-)* de *M. circinelloides* hipersecretan el sideróforo rizoferrina el cual aumenta la actividad virulenta en dichas mutantes.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar un factor de virulencia susceptible a proteasas secretado por las mutantes *arf3* o *arl1^(+/-)* de *M. circinelloides*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar al menos uno de los factores secretados con actividad virulenta susceptible a proteasas de la mutante *arf3* o *arl1^(+/-)* de *M. circinelloides*.
2. Demostrar la participación de un factor de virulencia secretado o la ruta de su síntesis por las mutantes *arf3* o *arl1^(+/-)* en la virulencia de *M. circinelloides*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

Fueron utilizadas las cepas de *M. circinelloides* R7B, ATCC 90680 (*leuA*⁻), auxótrofa a leucina (**Roncero y col., 1984**), obtenida mediante mutagénesis química a partir de la cepa silvestre de sexo (-) CBS 277.49 (**Schipper, 1976**). Además se utilizó la cepa MU402 (*leuA*⁻, *pyrG*⁻) que a su vez fue obtenida por mutagénesis química a partir de la cepa R7B (**Nicolás y col., 2007**) la cual es auxótrofa a leucina y uracilo, y finalmente fue usada la cepa MU402 (*leuA*⁻, *pyrG*⁻) y MU636 (*leuA*⁻, *pyrG*⁺), generada a partir de la cepa MU402 mediante la inserción genómica del gen *pyrG*, donada por el Dr. Victoriano Garre de la Universidad de Murcia, España (**Tabla 3**). La cepa de *E. coli* DH5 α (**Hanahan., 1983**) fue utilizada en los experimentos de clonación y propagación de plásmidos bacterianos (**Tabla 3**). Entre sus características más significativas destacan: que no permite la recombinación debido a la mutación *recA*⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos; ii) que porta una mutación en el gen *lacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente y iii) que puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo.

5.2 Medios de Cultivo

5.2.1 Medio YPG

Este medio fue utilizado para la obtención de esporas de *M. circinelloides* (MU402 y Δ *arf3*), 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). 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, 1962**).

5.2.2 Medio YNB

Medio selectivo utilizado para crecimiento de las cepas, el cual se preparó con medio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base) (Aldrich), 6.7 g por cada litro de medio y dextrosa al 2 %, y posteriormente a la esterilización a 15 lb de presión a 121 °C fue adicionado con niacina y tiamina 1 mg/mL y con leucina (Sigma-Aldrich) 0.005 % dado que MU402 es auxótrofa a leucina de este aminoácido.

Tabla 3. Cepas utilizadas

CEPA	CARACTERÍSTICAS
R7B	<i>M. circinelloides</i> (ATCC 90680) Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) derivada de la cepa ATCC 1216b.
MU402	<i>M. circinelloides</i> cepa auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y uracilo (<i>pyrG</i> ⁻); obtenida mediante mutagénesis química. Derivada de la cepa R7B (Nicolás y col., 2007)
$\Delta arf1$	Derivada de MU402. Mutante homocarionte en el gen <i>arf1</i> (157293). Auxótrofa a leucina y protótrofa a uracilo. Presenta hiperfilamentación con hifas acortadas, así como virulencia en los modelos <i>Mus musculus</i> BALB/c y <i>Caenorhabditis elegans</i> N2 (Patiño-Medina et al., 2018)
$\Delta arf3$	Derivada de MU402. Mutante homocarionte en el gen <i>arf3</i> (155350). Auxótrofa a leucina y protótrofa a uracilo. Presenta dicotomías en la punta de las hifas, así como virulencia en los modelos <i>Mus musculus</i> BALB/c y <i>Caenorhabditis elegans</i> N2 (Patiño-Medina et al., 2018).
$\Delta arl1^{(+/-)}$	Derivada de MU402. Mutante heterocarionte en el gen <i>arl1</i> (155647). Auxótrofa a leucina y protótrofa a uracilo. Presenta baja producción de esporas y virulencia en el modelo <i>C. elegans</i> N2. No crece en una fuente de carbono no fermentable. Sensible a SDS y antifúngicos (Patiño-Medina y col., 2019).
$\Delta arl1^{(+/-)}/\Delta rfs$	Derivada de MU402. Mutante heterocarionte en el gen <i>arl1</i> (155647), y mutante homocarionte en el gen <i>rfs</i> (1324925). Protótrofa a leucina.
<i>Mus musculus</i> BALB/c	Ratones albinos, de uso general en investigación inmunológica (producción de anticuerpos monoclonales, así como, hibridomas), defectos en desarrollo neuronal.
<i>Escherichia coli</i> OP50	Cepa resistente a estreptomycin, auxótrofa a uracilo, usada como alimento de nematodos.
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Derivada de la cepa silvestre Bristol (Brenner, 1974). Cepa estándar utilizada para investigación de <i>C. elegans</i> .
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Cepa estándar de laboratorio; F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , λ ⁻ .

5.2.3 Medio LB

Medio utilizado para crecer *E. coli* OP50, se preparó 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.

5.2.4 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.

5.2.5 Medio CAS-agar

Es la combinación de cuatro soluciones preparadas independientemente: a) solución indicadora de Fe-CAS (solución 1): 10 mL FeCl₃ 1 mM disuelto en HCl 10 mM, 50 mL de una solución CAS (1.21 mg/mL), esta última se añadió lentamente a 40 mL de una solución (1.82 mg/mL) de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA por sus siglas en inglés); b) solución amortiguadora (solución 2): disolución de 30.24 g PIPES (ácido piperazina-N,N'- bis[2-etanosulfónico]) en 750 mL de una solución salina: 0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl y 1.0 g NH₄Cl a pH 6.8, aforada a 800 mL, adicionando 15 g agar; c) solución 3: 2 g glucosa, 2 g manitol, 493 mg MgSO₄, 11 mg CaCl₂, 1.17 mg MnSO₄, 1.4 mg H₃BO₃, 0.04 mg CuSO₄, 1.2 mg ZnSO₄ y 1.0 mg Na₂MoO₄ en 70 mL de agua destilada; d) la soluciones se esterizaron a 15 psi, después se mezclaron y al final se adicionaron 30 mL de una solución de casaminoácidos 10 % (p/v) esterilizada por filtración (solución 4) (Alexander., 1991).

5.3 Condiciones de crecimiento de *M. circinelloides*

Se inoculó en medio YPG sólido, las cepas MU636 (silvestre), $\Delta arf3$, $\Delta arf1$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ se incubó a 28°C (**Bartnicki-García y Nickerson, 1962**).

5.3.1. Obtención y conteo de esporas

Se inocularon 100 esporas de *M. circinelloides* en placas Petri de YPG o YNB, 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 μ L 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.

5.3.2. Crecimiento en aerobiosis y obtención del sobrenadante de las cepas MU402, $\Delta arf1$, $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de *M. circinelloides*

Se inocularon 1×10^6 esporas por cada mililitro de medio de cultivo. Se adicionaron 500 mL de medio YNB en matraces Erlenmeyer de 2 L con leucina, se incubaron a 28 °C, con agitación constante a 150 rpm. Se obtuvo el sobrenadante proveniente de cultivos crecidos en condiciones de aerobiosis por 48 horas en medio YNB. Para separar el crecimiento micelial del sobrenadante de cultivo se realizó una filtración a vacío en papel filtro Whatman No 6 (3 μ m), a continuación

los sobrenadantes se centrifugaron hasta 3 veces a 800 x g durante 5 minutos, al término de cada ciclo se decantó el sobrenadante a un tubo Corning estéril. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

Con la finalidad de tener la certeza de que los sobrenadantes estuvieran ausentes de restos de micelio, se tomó una alicuota correspondiente al sobrenadante posterior a la filtración, con la cual se inocularon placas de medio mínimo YNB se incubaron durante 2 días a 28 °C y se corroboró la esterilidad de los mismos. Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

5.3.3 Concentración de proteínas mediante diálisis inversa utilizando membrana de diálisis de 2 kDa y polietilenglicol (PEG-5000)

En condiciones de esterilidad se fueron colocados 60 mL del sobrenadante (SS) de cultivo dentro de una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 2,000 Da. A continuación se cubrió completamente la membrana con el agente higroscópico PEG-5000, y se dejó llevar a cabo el proceso de diálisis a 4 °C durante 2 días, obteniendo un volumen final de 1.5 mL .

5.3.4 Precipitación protéica con acetona al 80 % de los SS de las cepas WT y mutantes de *M. circinelloides* previamente liofilizados

Partiendo de un volumen de 300 mL de sobrenadante de cada cepa, posteriormente liofilizados, y resuspendidos en 10 mL de H₂O destilada y 40 mL de acetona al 80 % La mezcla se incubó por 12 horas a -20 °C para que las proteínas se precipitaran, posteriormente se centrifugó por 10 min. a 5,000 rpm, la pastilla se lavó con acetona al 100 % y se decantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla obtenida y se resuspendió en 5 mL de agua ultrapura. A cada pastilla se le agregó buffer de bicarbonato de amonio 20 mM, esto para evitar la degradación de las proteínas presentes. Seguido de esto, se cuantificó la cantidad de proteína presente mediante método de Bradford, las muestras de los sobrenadantes fueron leídas a una longitud de onda de 595 nm obteniendo las siguientes concentraciones para la cepa silvestre y para la mutante de proteína presente.

5.3.5. Cuantificación de proteínas mediante método de Bradford.

La determinación de proteínas por este método consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el azul de Coomassie G-250, a la proteína comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (albúmina de suero bovino (BSA)). Por lo cual fueron preparadas diluciones estándar de proteína de 25, 50, 75, y 100 µg/mL usando 100 µL de disolución (H₂O), se tomaron entonces diferentes volúmenes de los sobrenadantes a los cuales se les cuantificó la proteína y fueron completados a 100 µL con la solución de disolución, a cada tubo se le añadió 1 mL de reactivo de Bradford, se agitó y se llevó a cabo la cuantificación midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm, y graficando la absorbancia contra la concentración de proteínas obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con dicha curva se interpoló la concentración de proteína presente en el sobrenadante de *M. circinelloides* al medir su absorbancia.

5.3.6. Crecimiento en medio rico YPG por 12 horas y cambio a medio mínimo YNB por 48 horas.

Con la finalidad de promover una mayor secreción de proteínas, las cepas fueron crecidas en medio de cultivo YPG, para lo cual fueron inoculadas 1×10^6 esporas/mL en 50 mL de medio YPG a 150 rpm durante 12 horas, posteriormente se llevó a cabo una filtración bajo condiciones de esterilidad utilizando papel filtro de 3 µm. La biomasa obtenida fue lavada hasta 6 veces con 15 mL de agua estéril, dicha biomasa fue transferida a un matraz de 250 mL con 50 mL de medio YNB adicionado con leucina y la germinación continuó durante 48 horas, en condiciones aeróbicas y 150 rpm. Transcurridas las 48 horas se obtuvieron los sobrenadantes mediante filtración (medio rico en nutrientes y peptona de gelatina como fuente de nitrógeno).

5.3.7 Determinación de glucosa en los SS de la cepa silvestre y las cepas mutantes

La determinación de glucosa se llevó a cabo mediante el método de glucosa oxidasa. Se inocularon 1×10^6 esporas por mL en medio YNB suplementado con leucina al 2 % de glucosa e incubadas en agitación constante a 150 rpm a 28 °C en condiciones aerobias por 48 horas. Posteriormente se obtuvieron por medio de filtración los sobrendantes de cultivo, tomándose 1 mL de cada uno para la determinación de glucosa.

5.3.8 Aislamiento de ADN genómico de *M. circinelloides*

El ADN de *M. circinelloides* se aisló siguiendo el protocolo descrito previamente (Roncero y col., 1984), con ligeras modificaciones. La extracción de ADN se realizó de muestras de micelio de *M. circinelloides* que se filtraron a través de papel filtro Whatman, las muestras se mantuvieron 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. Se agregó 0.4 mL de regulador de extracción (NaCl 0.4M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8) a aproximadamente 0.5 mL de polvo (muestra) contenidos en un microtubo eppendorf, posteriormente se adicionó 80 µL de SDS al 10 %, seguido de 8 µL de proteínasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 60 °C, enseguida se adicionó 320 µL de NaCl 5 M. Posteriormente se centrifugó la muestra por 30 minutos a 12,000 rpm. Se colectó el sobrenadante en tubo nuevo, se adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20 °C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 12,000 rpm, se realizaron 2 lavados con etanol al 70 % y se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se retiró el exceso de etanol y se procedió a secar la muestra de ADN a 37 °C, finalmente se resuspendió en 50 µL de agua estéril y 3 µL (0.5 µg/µL) de RNAasa, dejando incubar por 10 minutos a 37 °C. Las muestras de ADN se conservaron a -70°C.

5.3.9 Amplificación de ADN por PCR

El proceso de amplificación de ADN se llevó a cabo utilizando 20 picomoles de cada oligonucleótido (Tabla 3), y la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los oligonucleótidos utilizando la fórmula $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C \%) - 650/pb$ oligonucleótido) y polimerización (30 segundos por cada kb de producto a amplificar a 72 °C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. El termociclador utilizado fue Roche C-1000.

5.4 Análisis por electroforesis de ácidos nucleicos

Para caracterizarlos plásmidos, se separaron fragmentos de distinto tamaño producto de las digestiones con enzimas de restricción o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el ADN se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Bio-Rad). Se utilizó buffer TAE 1X y las concentraciones de agarosa variaron entre 0.7-1 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de ADN mediante luz ultravioleta se añadió bromuro de etidio a la agarosa a una concentración final de 0.5 µg/ mL.

La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en geles de agarosa. Las porciones del gel que contenían los fragmentos de interés se recortaron con un bisturí y el ADN se purificó con columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración y el tamaño de los plásmidos y fragmentos lineales purificados se calculó usando como referencia los marcadores λ DNA/*Hind*III (Fermentas) y GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), respectivamente.

5.4.1 Transformación de *E. coli*

Para propagar ADN plasmídico en *E. coli* se emplearon células competentes. La obtención de células competentes de la cepa DH5 α se realizó por el procedimiento

del cloruro de calcio. Para la transformación se utilizó el procedimiento de electroporación (**Sambrook y Russell., 2001**).

5.4.2 Amplificación de los fragmentos recombinantes rfsRP y rfsRL mediante PCR en fusión

La técnica de PCR en fusión se basa en la generación de ADN recombinante fusionado a partir de dos o más fragmentos de ADN en donde no se requieren vectores plasmídicos ni digestiones con enzimas de restricción.

Para la construcción del fragmento recombinante por PCR en fusión del gen *rfs* con el gen de selección *pyrG* o *leuA*, se amplificaron tres fragmentos que contenían secuencias solapantes entre ellos. Para esto se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron fragmentos de aproximadamente 1 kb correspondiente a la región 5' rio arriba del codón de inicio de la traducción del gen *rfs* y a la región 3' rio abajo del codón de paro de la traducción del gen *rfs*, estos oligonucleótidos contaban con una secuencia de 20 nucleótidos que hibridan con los extremos 5' y 3' del gen *pyrG* o *leuA*; el gen *pyrG* y *leuA* fueron amplificados por separado, permitiendo así la hibridación por complementariedad de bases durante la PCR en fusión.

Se diseñaron 4 oligonucleótidos:

- (1) rfs-pUFwd (oligonucleótido directo) y (3) rfs-pURev-pyrG/leuA (oligonucleótido reverso) usados para amplificar la región 5' del gen *rfs*. En el oligonucleótido (3) rfs-pURev-pyrG/leuA se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 3' que hibrida con el extremo 5' del gen *pyrG/leuA*.
- (2) rfs-pDRev (oligonucleótido directo) y (4) rfs-pDFwd-pyrG/leuA (oligonucleótido reverso) usados para amplificar la región 3' del gen *rfs*.

En el oligonucleótido (4) rfs-pDFwd-pyrG/leuA se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 5' que hibrida con el extremo 3' del gen *pyrG/leuA*.

De forma independiente se utilizaron los oligonucleótidos PyrG-FWR y PyrG-REV para amplificar el gen *pyrG* por PCR convencional a partir del plásmido pMAT1702 (**Trieu y col., 2017**) que contiene el gen *pyrG* silvestre y los oligonucleótidos leuA-FWR y leuA-REV para amplificar el gen *leuA* de la misma forma a partir del

plásmido *pleuA* que contiene el gen *leuA* silvestre (Arnau and stroman.,1993) amplificación de los genes marcadores incluyó su propio promotor y terminador. Se realizaron 3 PCRs individuales para obtener los tres fragmentos de ADN que componen la región 5', la región 3' y por otra parte el gen *pyrG/leuA*. Las condiciones de amplificación de PCR se llevaron a cabo utilizando 100 ng/ μ L de templado; 5 μ moles de cada oligonucleótido y 1 μ L de la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN y posteriormente se sometieron a 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineamiento (45 segundos a 60 °C) y la elongación (30 segundos por kb de producto a amplificar a 72 °C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de elongación durante 5 minutos y un último paso de 4 °C. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf. Una vez finalizadas las PCRs se corrieron en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron los amplicones. Una vez purificados los amplicones se cuantificaron sus concentraciones. Para la PCR en fusión se utilizaron como templado los productos ya purificados de los tres fragmentos: región 5', *pyrG*, región 3' en proporción 1:2:1. Para dicha reacción se utilizó un programa de PCR especial con un paso inicial de 95°C por 3 minutos, seguido por 10 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 segundos a 95 °C), temperatura de descenso (1 minuto a 70 °C), temperatura de alineamiento (30 segundos a 70 °C), temperatura de elongación (2 minutos a 68 °C), seguido de 25 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 segundos a 95 °C), temperatura de descenso (1 minuto a 70 °C), temperatura de alineamiento (30 segundo a 70 °C), elongación (2 minutos a 68 °C) y un paso final de 5 minutos a 68° C para finalmente quedarse a 4 °C hasta el procesamiento de las muestras amplificadas.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR

Oligonucleotido	Secuencia (5'-3')
1 Rfs-pUFwd	GGCGTctgcagTTCAATTTAGCGGCGCAGTGCATAG
3 Rfs-pURev-pyrG	caagtaccaatgctgaggca AAAGAGGCCGTCTTCCATGCCTTTT
4 Rfs-pDFwd-pyrG	cgatagcatggccagtgtac TGCGCGAGATCTCTCTTTTCCTCTTC
2 Rfs-pDRev	GCGATctgcagTAATGACAGCTGGCGGCAAAGACAG
3 Rfs-pURev-leuA	gaatagagttggtagggagca AAAGAGGCCGTCTTCCATGCCTTTT
4 Rfs-pDFwd-leuA	gtacattctggtaactcgac TGCGCGAGATCTCTCTTTTCCTCTTC
rfs CR 5' FWR	CAGACTTGTCAAGATCCAGCAGCTCC
rfs CR 3' REV	TAACGCCGAGCAGGGAATACTGTCA
PyrG FWR	TGCCTCAGCATTGGTACTTG
PyrG REV	GTACACTGGCCATGCTATCG
LeuA FWR	TGCTCCCTACCAACTCTATTC
LeuA REV	GTCGAGTTGACCAGAATGTAC
pyrG-R2	ATCCCACCAGAAGGAGTACATGG
LeuA3	AATCATTGGTCAATCTTACCG
rfs XhoI FWR	AGAGActcgagATGCCTGTCCCCTCTACTGA
rfs NotI REV	TAGTTgcggccgcTTAGACGCGAGGTGCTTGTT
pEUKA4-FWR	GAGACATTGCGAAATGTTATATAAACCCAAT
pEUKA4-REV	ATGAGCTGTATCTGGAAGAGGTAAACCCGAA

*Las letras en minúsculas ilustran la secuencia diana de los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos y las letras en minúscula y negrita la secuencia del gen marcador pyrG para el caso de los oligos de fusión del gen rfs.

5.4.3 Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de *E. coli* se aisló por el procedimiento de lisis alcalina (**Holmes y Quigley., 1981**) cuando no se necesitaba gran pureza (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *M. circinelloides*, etc.) o mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Applied Science o GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) cuando se requería una mayor pureza (secuenciación).

5.4.4 Complementación de la cepa Δrfs mutante de *M. circinelloides*

La complementación se llevó a cabo con el plásmido pEUKA4, el cual contiene el gen *leuA* que restaura la auxotrofia a leucina y un promotor inducible por glucosa *gpd1*: el promotor de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus niger* (Wollff y Arnau., 2002). Con los oligonucleótidos *rfs*-FWR-*XhoI* y *rfs*-REV-*NotI* se amplificó el marco de lectura abierto del gen *rfs*. Posteriormente el vector pEUKA4 y el gen *rfs* se sometieron a restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI*. El producto se purificó y se sometieron a ligación en una relación 1:5 respectivamente. El plásmido resultante se verificó por restricción y secuenciación.

5.4.5 Secuenciación de fragmentos de ADN

Se secuenció el fragmento clonado en el plásmido pEUKA4 (*rfs* wt) correspondientes al gen que codifica a la proteína Rfs silvestre usando los oligonucleótidos pEUKA4-FWR y pEUKA4-REV mediante el analizador de 4 capilares, modelo *ABY Prism 3130* de Applied Biosystems en el servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia, España para verificar la no alteración del ORF del gen silvestre.

5.4.6 Corroboración de las mutantes de *M. circinelloides* mediante PCR

A partir de ADN genómico de las clonas transformantes se amplificó como control positivo la región 5' con los oligonucleótidos 5'FWR y 5'REV. Para determinar la mutación en el locus *rfs* se usó un oligonucleótido directo que hibrida en la región 5' fuera del fragmento recombinante (*rfs* CR 5') (Tabla 4) y un oligonucleótido que hibrida en el gen de selección *pyrG* para la cepa mutante sencilla (*pyrG*-R2) o el oligonucleótido que hibrida en el gen *leuA* para la cepa doble mutante (*leuA*3). Una vez identificadas las clonas portadoras del fragmento recombinante, se verificó la homocariosis con los oligonucleótidos *rfs* CR 5' FWR y *rfs* CR 3' REV. Se seleccionaron al menos dos mutantes independientes para cada caso.

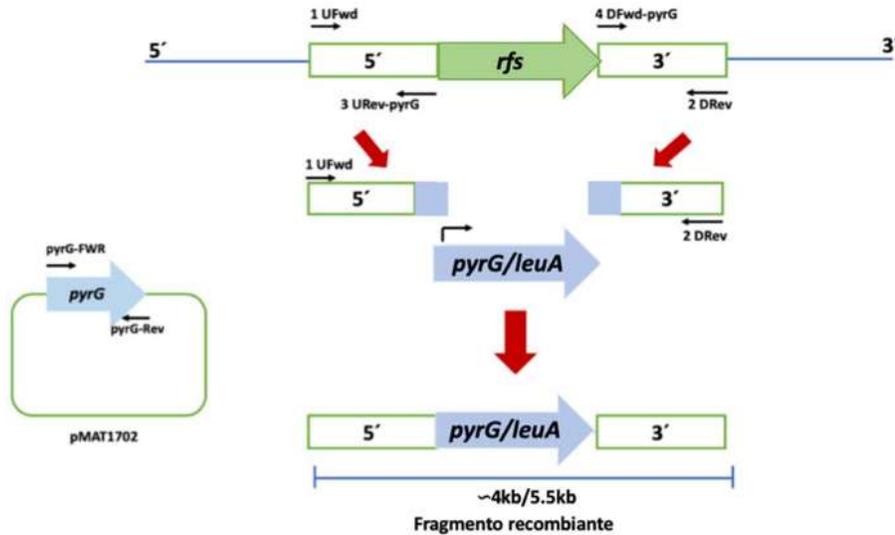


Figura 5. Esquema de la estrategia de la PCR en fusión para generar el fragmento recombinante del gen *rfs*. Se muestra la amplificación de las regiones 5' y 3' del gen *rfs* exceptuando el marco de lectura abierto con los oligonucleótidos señalados por las flechas en color negro y con la adición de nucleótidos correspondientes a la secuencia de *pyrG* en gris. La fusión se llevó a cabo por la hibridación de las regiones del gen *pyrG* contenidas en los fragmentos 5' y 3' del gen *rfs* en sus extremos, dando lugar al fragmento recombinante. De forma alternativa fue utilizado el marcador de selección *leuA* para la generación de dobles mutantes.

5.4.7 Análisis por RT-qPCR

Se realizó la extracción de ARN de micelio de 15 horas de germinación de cada mutante mediante el método previamente utilizado (**Valle-Maldonado y col., 2015**). Las muestras de ARN fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a $\lambda=260$ y 280 nm (**Krebs y col., 2009**). Se evaluó la relación A_{260}/A_{280} , se usaron muestras con una relación A_{260}/A_{280} de alrededor de $1.90 - 2.0$, lo cual indica una calidad óptima del ácido nucleico (**Yamaguchi y col., 1992; Wilfinger y col., 1997**). Las muestras de ARN total cuyo valor de relación A_{260}/A_{280} resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR. La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas (Tabla 3) con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada $25 \mu\text{L}$ de volumen de reacción contenía $5 \mu\text{L}$ de ARN templado ($100 \mu\text{g}$), $0.5 \mu\text{L}$ de mezcla de enzimas (retrotranscriptasa y ADN polimerasa), $12.5 \mu\text{L}$ de mezcla de reacción 2X, $0.5 \mu\text{L}$ de oligonucleótido directo ($10 \mu\text{M}$), $0.5 \mu\text{L}$ de oligonucleótido reverso ($10 \mu\text{M}$), $0.5 \mu\text{L}$ de sonda ($5 \mu\text{M}$), y $5.5 \mu\text{L}$ de agua libre nucleasas. La mezcla de reacción fue preparada en un gabinete para PCR (UVP). La RT-qPCR se inició por la adición de la transcriptasa reversa (50°C , 30 minutos) y la desnaturalización inicial (95°C , 5 minutos), seguidas por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron detectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C . Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm. En cada experimento fueron incluidos genes de expresión constitutiva como controles positivos y agua como control negativo.

5.4.8 Generación de mutaciones por deleción en *M. circinelloides*

5.4.9 Deleción génica mediante recombinación homóloga en *M. circinelloides*

Se amplificó al gen *rfs* mediante PCR y también al gen que permitió la selección positiva de las transformantes: *pyrG* para las mutaciones sencillas y *leuA* para las dobles mutaciones. Se obtuvieron los fragmentos del gen *rfs* mediante PCR de las regiones 5' y 3' rio arriba y rio abajo del ORF, con las cuales se flanquearon mediante PCR al gen *pyrG* o *leuA*. El producto de PCR *pyrG* o *leuA* flanqueado por regiones *rfs* se denominaron fragmentos de recombinación, los cuales fueron utilizados para la transformación de protoplastos de *M. circinelloides* MU636 mediante electroporación. Posteriormente se hizo la selección de transformantes bajo la condición selectiva correspondiente al marcador de selección usado, seguido de la identificación mediante PCR, Southern blot y RT-qPCR para determinar el evento de integración en el locus *rfs* deseado.

5.5 Transformación de *M. circinelloides*

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (**Gutiérrez y col., 2011**) generados según el protocolo descrito previamente (**Heeswijk y Roncero, 1984**). Los protoplastos al carecer de pared celular permiten la incorporación de ADN exógeno mediante electroporación. Para obtener protoplastos transformables se inocularon 1×10^7 esporas/mL en 25 mL de medio líquido YPG pH 4.5 suplementado cuando se requería con 200 µg/mL de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente se incubaron a 26 °C con agitación a 3 x g durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las germinulas se precipitaron durante 5 minutos a 58 x g y se lavaron dos veces en buffer fosfato-sorbitol (Sorbitol 0.5 M, fosfato sódico pH 6.5 10 mM), finalmente se resuspendieron en buffer fosfato-sorbitol a razón de 5 mL por cada 1×10^7 esporas inoculadas inicialmente. Para la digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/mL de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0.15 mg/mL de

quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals). Las germínulas se incubaron a 30 °C con agitación suave (50 rpm) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de pared celular. Para detener la digestión se añadieron 5 mL de sorbitol 0.5 M frío, se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 1000 rpm, se resuspendieron las células nuevamente en 5 mL de sorbitol 0.5 M frío y se centrifugaron en las mismas condiciones. Finalmente los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 µL de sorbitol 0.5 M. Para la transformación se añadieron 20 µL de ADN (1 µg de ADN plasmídico o 3 µg de ADN lineal) a 200 µL de protoplastos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm estéril previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros de electroporación: 0.8 kV, 25 µF de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω.

Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico se añadió 1 mL de YPG pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol frío y se transfirió a un tubo eppendorf estéril. La mezcla de transformación se incubó durante 1 hora a 26 °C con una agitación de 150 rpm para permitir la recuperación de los protoplastos. Seguido los protoplastos se centrifugaron durante 5 minutos a 250 rpm, se resuspendieron en 600 µL de YNB pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol + niacina + tiamina (+ leucina cuando fue necesario). Los protoplastos transformados se sembraron cuidadosamente en cajas del medio mínimo adecuado para la selección de las transformantes.

5.5.1 Selección fenotípica de las transformantes de *M. circinelloides*

La transformación en *M. circinelloides* se realizó transformando protoplastos por el procedimiento descrito en el apartado anterior, empleando ADN linearizado (fragmento recombinante). Los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3.2 con 0.5 M de sorbitol o medio YNB pH 3.2 con 0.5 M de sorbitol. Para identificar los transformantes que habían integrado el ADN exógeno se determinó el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG* o *leuA* durante cinco ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo.

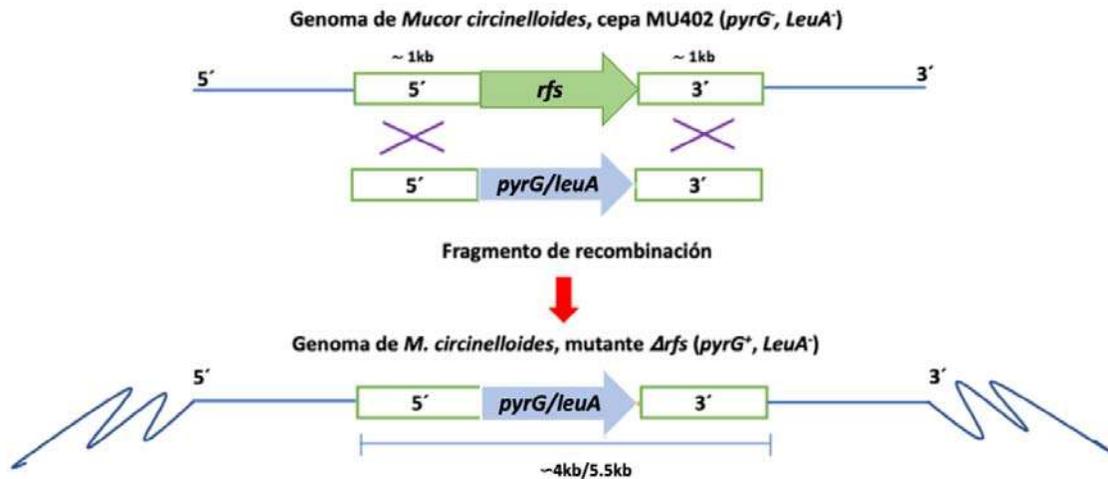


Figura 6. Evento de doble recombinación homóloga. Se muestran las regiones 5' y 3' del gen *rfs* que flanquean al marcador de selección (en este caso el gen *pyrG* o *leuA*). El diseño del fragmento recombinante favorece el evento de doble recombinación homóloga en el locus del gen silvestre. Se usó como cepa receptora a MU402 ($pyrG^-$, $leuA^-$) de *M. circinelloides*, lo cual genera la restauración de la auxotrofia a uracilo y la delección del gen *arf* de interés.

5.5.2 Manipulación y ensayos de virulencia en *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 μ L del precultivo de *E. coli*, el cual fue esparcido cada caja Petri de 100 x 15 mm con medio NGM a utilizar; mientras que en cajas Petri de 60 x 15 mm se adicionaron 250 μ L del precultivo bacteriano antes descrito. Se incubaron a 30 °C por 48 horas hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron pequeñas partes de agar con al menos un nematodo a cada caja Petri, previamente crecidas con la cepa de *E. coli*, se dejó incubar por 3 días a 20 °C hasta la fase adulta del nemátodo.

Se transfirió 1 mL de los distintos sobrenadantes de cultivos previamente crecidos de MU402 y $\Delta arf3$, a cada uno de los pozos de placas de 24 pozos (Corning).

Mediante la observación en un microscopio estereoscopio (Leica MZ75) los nemátodos (10-20) fueron transferidos con un “picker” a cada uno de los pozos utilizados. En todos los ensayos de virulencia los nemátodos fueron observados mediante un microscopio estereoscópico cada 12 horas por un tiempo no mayor a 60 horas. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nemátodo, es cuando éste permanece inmóvil a la estimulación física. Además, se usaron las sondas correspondientes a los genes *HSP3* y *HSP4* que codifican al homólogo del gen BIP de humano, cuyas proteínas están involucradas en el proceso de estrés de retículo endoplasmático (Ji y col., 2019). Dichas sondas son usadas en ensayos de RT-qPCR para determinar el nivel de daño celular.

5.5.3 Ensayos de infección en *Mus musculus*

Se utilizaron ratones machos Balb/c de aproximadamente 10-12 semanas de edad, a los cuales se les inoculó 0.5 mL del SS correspondiente por vía intraperitoneal con una jeringa de insulina 27G x ½ in., de 1 mL marca BD. Los animales se mantuvieron en observación por aproximadamente 3 días post-inoculación. Al término de los 3 días fueron eutanizados y se recolectó tejido de pulmón e hígado para determinar mediante ensayos de RT-qPCR los niveles de transcrito del gen que codifica a la interleucina IL-6 para determinar el grado de inflamación. Se realizó cada ensayo de acuerdo a la NOM-062-ZOO1999, tanto en el cuidado como en el manejo de los ratones.

5.5.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. 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).

VI. RESULTADOS

6.1 Efecto de los sobrenadantes producidos en medio YNB en la virulencia de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de evaluar si el grado de la virulencia se mantenía en el crecimiento de la cepa $\Delta arf3$ en un medio carente de proteínas, pero suplementado con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, se montaron cinéticas de crecimiento aeróbico en un medio. Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo a 48, 72 y 96 horas en medio mínimo YNB suplementado con leucina (1 $\mu\text{g/mL}$). Mediante filtración, se separó el sobrenadante de la biomasa generada (SS). Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de esterilidad de los SS de cultivo para descartar contaminación por *M. circinelloides* y se evaluó la capacidad de virulencia del SS frente al nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

La virulencia del SS de la cepa $\Delta arf3$ así como para $\Delta arl1^{(+)(-)}$ no aumentó significativamente en función al tiempo de crecimiento de la cepa, alcanzando un máximo de capacidad de virulencia a las 48 horas de crecimiento, por lo tanto el SS obtenido a las 48 horas post-incubación de las cepas mutantes fue seleccionado para su posterior análisis, mientras que el SS de la cepa silvestre (WT) se mantuvo con una actividad menos virulenta respecto al SS de las cepas mutantes independientemente del tiempo que fue obtenido (**Figura 7**).

6.1.1 Efecto de la desnaturalización por proteasa del sobrenadante (SS) en la virulencia de la cepa mutantes.

Con la finalidad de tratar de determinar la naturaleza química de alguno de los factores de virulencia secretados por la mutante $\Delta arf3$ al medio de cultivo, se le adicionó proteinasa K a cada uno de los SS de las cepas MU636, $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$, posteriormente se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Para descartar que los resultados obtenidos fueran atribuidos a la temperatura y no al efecto de la proteinasa K, se colocó un lote de muestras de SS a 37 °C durante 2 horas. Así como un lote de sobrenadantes no recibió tratamiento alguno, al cual se denominó control, en el cual los nematodos solamente estuvieron en contacto con el medio YNB esteril (**Figura 8**).

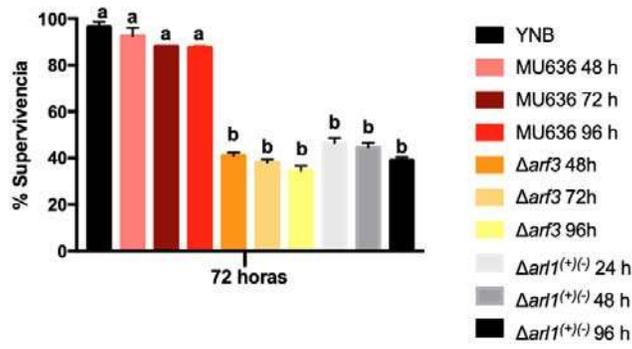


Figura 7. Virulencia de los sobrenadantes producidos en YNB por las cepas silvestre MU636 y mutantes $\Delta arf3$, $\Delta arl1^{(+/-)}$ durante el crecimiento aeróbico. Se montaron cinéticas de crecimiento aeróbico de 48, 72 y 96 horas en medio mínimo YNB inoculadas con 1×10^6 esporas/mL. Una vez obtenidos los sobrenadantes de cultivo fueron puestos en contacto con el nemátodo *C. elegans* y se cuantificó el porcentaje de supervivencia a las 72 horas. El medio YNB esteril fue usado como control de sobrevivencia de los nematodos. Se muestra el promedio de 3 ensayos realizados de manera independientes, n=3. ANOVA 1 vía, post-hoc Fisher, $p < 0.05$.

Se logró determinar que el SS control de las cepas $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ mantuvieron su capacidad de virulencia provocando un porcentaje de supervivencia del 40 y 45% respectivamente, así como también las muestras de SS que fueron sometidas al tratamiento con temperatura mostraron un porcentaje de supervivencia similar. Mientras que el SS de las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ tratados con proteínasa K disminuyeron su capacidad de virulencia. Respecto al SS de la cepa WT que mostró un comportamiento avirulento independientemente del tratamiento aplicado (**Figura 8**). Con lo cual se concluye que la virulencia del SS por la cepa mutante $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ está dado por factores susceptibles a la acción de proteasas.

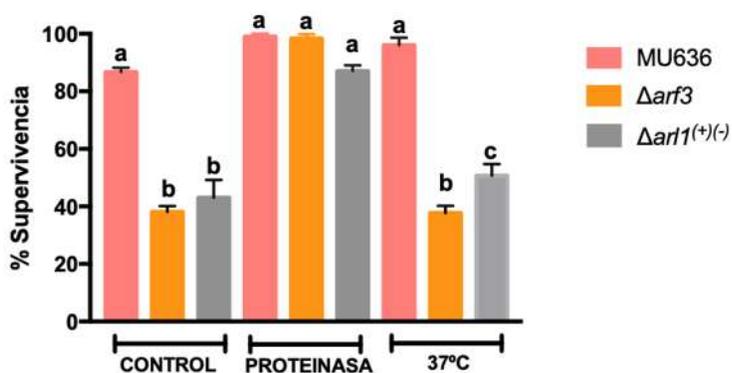


Figura 8. Efecto de proteasas en la actividad virulenta del sobrenadante (SS) de las cepas mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de *M. circinelloides*. Los SS de cultivo de las cepas fueron obtenidos a las 48 horas de crecimiento, los cuales se trataron con proteínasa K a 37 °C por 2 horas, a 37 °C por dos horas o sin tratamiento alguno (control), con los cuales se llevó a cabo el ensayo de virulencia en el nemátodo *C. elegans* determinando el porcentaje de sobrevivencia posterior a las 48 horas de interacción con los SS correspondientes. Se realizaron tres ensayos independientes n=3, análisis ANOVA 1 vía, post-hoc Fisher, p<0.05.

6.1.2 Concentración de proteínas mediante diálisis inversa utilizando membrana de diálisis de 2 kDa y polietilenglicol (PEG-5000).

Con el objetivo de concentrar las proteínas presentes en los SS de cultivo mediante la eliminación de agua del medio de cultivo, se implementó una técnica de diálisis inversa utilizando una membrana de tamaño de poro de 2 kDa, en la cual siguiendo las normas de esterilidad se colocaron 140 mL de sobrendante de cada cepa, a continuación se cubrió la membrana con el agente higroscópico PEG-5000, y se dejó llevar a cabo el proceso de diálisis a 4 °C durante 2 días. Partiendo de un volumen inicial de 60 mL se obtuvo un volumen al final del proceso de 1.5 mL, es decir el SS se concentró 40 veces. Los SS concentrados tanto de la cepa WT, así como de la cepa mutante $\Delta arf3$ presentaron viscosidad propia del PEG-5000, lo cual imposibilitó el uso de las muestras para cualquier análisis posterior, incluido el análisis tipo MALDI para conocer la presencia de pesos moleculares de moléculas, entre ellas posibles proteínas. Otra inconveniente fue la poca cantidad de proteína recuperada tanto en los SS sin concentrar fue de 13 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa WT y 8.8 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa $\Delta arf3$.

6.1.3 Crecimiento en medio rico YPG por 12 horas y cambio a medio mínimo YNB por 48 horas.

Con la finalidad de obtener una mayor secreción de proteínas al medio de cultivo (mayor a 13 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa silvestre, y 8.8 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa mutante) y conociendo que el crecimiento de *M. circinelloides* es mas abundante en medio YPG respecto a YNB (Valle-Maldonado., 2015). Dichas cepas fueron crecidas en medio de cultivo rico (YPG), durante 12 horas en aerobiosis, posteriormente se obtuvo la biomasa la cual se lavo con agua destilada estéril y se transfirió a medio YNB suplementados con leucina por 48 horas más. Al final de la incubación, se obtuvieron los SS y se procedió a evaluar la capacidad de viruencia de los mismos frente *C. elegans* (Figura 9).

Se determinó que la transición del crecimiento aerobio en YPG y despues en YNB disminuyó la capacidad de virulencia del SS de la cepa mutante $\Delta arf3$ de la cual se reportó un porcentaje de supervivencia del 80 %, mientras que el SS de la misma

cepa obtenida del crecimiento unicamente en medio YNB mostró un 40 % de sobrevivencia por 48 horas (**Figura 9**). El SS de la cepa WT no mostró una actividad virulenta independientemente del cultivo de crecimiento (**Figura 9**). Con lo cual se concluye que los factores de virulencia secretados por la cepa mutante $\Deltaarf3$ son reprimidos por un crecimiento en medio rico YPG (12 horas) y el correspondiente crecimiento en medio mínimo YNB (48 horas).

6.1.4 Precipitación protéica con acetona al 80% de los SS de las cepas WT y $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides* previamente liofilizados.

Con el objetivo de concentrar las proteínas presentes en los SS provenientes de las cepas WT y $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides*, en primer lugar se procedió a liofilizar 300 mL de cada uno de los SS y se resuspendieron en 10 mL de agua. Posteriormente, se precipitaron las proteínas mediante el método de acetona al 80% (80 mL de acetona y 20 mL de SS) para lo cual se adicionaron 40 mL de acetona al 80%. La mezcla se incubó por 12 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que las proteínas se precipitaran, posteriormente se las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm, la pastilla se lavó con acetona al 100 % y se decantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla obtenida y se resuspendió en 5 mL de agua ultrapura. A cada pastilla se le agregó 15 uL de buffer de bicarbonato de amonio 20 mM, esto para evitar la degradación de las proteínas presentes. Seguido de esto, se cuantificó la cantidad de proteína presente mediante método de Bradford, las muestras de los sobrenadantes fueron leídas a una longitud de onda de 595 nm obteniendo las siguientes concentraciones para la cepa silvestre 0.01313 mg/mL y para la mutante 0.0066 mg/mL de proteína presente. Es importante mencionar que las muestras presentaron un grado de viscosidad importante, lo cual que imposibilitó realizar análisis proteómicos posteriores.

Debido a que el método de precipitación de proteínas por acetona también tiene la capacidad de precipitar glucosa, se decidió determinar el consumo de glucosa de la cepa mutante $\Deltaarf3$ así como de la cepa silvestre MU636 a las 48 horas para evitar la posible interferencia de la glucosa.

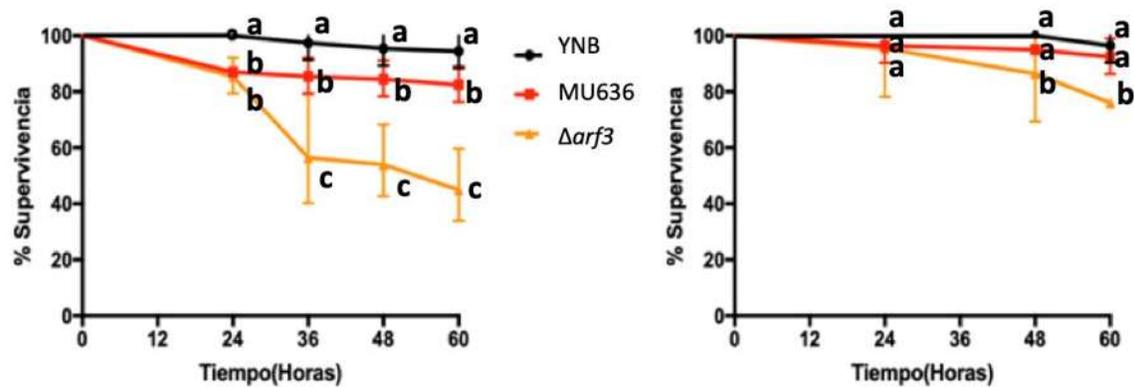


Figura 9. Efecto del crecimiento en medio rico YPG por 12 horas y cambio a medio mínimo YNB por 48 horas en la capacidad de virulencia del sobrenadante de la cepa mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*. Se realizaron cinéticas de crecimiento aeróbico por 12 horas en medio rico YPG. Una vez transcurridas las 12 horas, se obtuvo la biomasa y ésta se lavó con agua destilada, una vez retirado el medio rico, la biomasa se transfirió a medio YNB y se dejó crecer 48 horas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, transcurridas las 48 horas, se obtuvo el SS de cada cepa y se evaluó su capacidad de virulencia frente a *C. elegans*. Se realizó n= 3, análisis tipo Fisher, p<0.05.

6.1.5 Consumo de glucosa en medio mínimo (YNB) posterior a las 48 horas de crecimiento

Con la finalidad de determinar la cantidad de consumo de glucosa presente en el medio YNB adicionado con el 2 % de glucosa, se realizaron cinéticas de crecimiento aerobio de las cepa silvestre y mutante $\Deltaarf3$. Posteriormente transcurridas las 48 horas de incubación se obtuvieron los SS de cultivo y se determinó el consumo de glucosa, mediante la prueba de glucosa oxidasa. La cantidad de glucosa inicial presente en el medio fue de 2,000 mg/dL, posterior a las 48 horas de crecimiento se pudo observar que ambas cepas consumieron cerca del 20-25 % de la glucosa total del medio, registrando en el caso de la cepa silvestre 1,560 mg/dL y en la cepa $\Deltaarf3$ 1640 mg/dL de glucosa remanente en el medio de cultivo (**Tabla 5**). Esto indica que el crecimiento por 18 horas en medio YNB al 2% de glucosa, no promueve el consumo total de este azúcar, dejando una alta cantidad de glucosa sin utilizar alrededor deL 75 % de la concentracion inicial.

Tabla 5. Determinación del consumo de glucosa en medio mínimo (YNB) posterior a las 48 h de crecimiento aeróbico.

CEPA	GLUCOSA INICIAL (mg/dL)	GLUCOSA A LAS 48 HORAS POST-CRECIMIENTO mg/dL (% remanente)
MU636	2000	1,559 ± 135 (78%)
$\Deltaarf3$	2000	1,636 ± 106 (82%)

Se muestra el consumo de glucosa a las 48 horas post- crecimiento de ambas cepas en medio YNB adicionado con el 2% de glucosa. Los paréntesis indican el % de glucosa restante.

6.1.6 Efecto de la reducción de la concentración de la glucosa en el medio de cultivo YNB en la capacidad de virulencia de los SS de *M. circinelloides*.

Con base a los resultados anteriores donde se observó un consumo de glucosa cercano al 20-25% de glucosa después de las 48 horas de crecimiento (**Tabla 5**), se procedió a realizar el crecimiento en medio YNB suplementado con glucosa al 0.5 % e incubados en agitación constante a 28 °C en condiciones aerobias durante 48 horas. Posteriormente, los SS se obtuvieron mediante filtración y posteriormente se determinó la concentración de glucosa remanente a las 48 horas post crecimiento. La concentración de la glucosa consumida posterior a las 48 horas de crecimiento por la cepa WT fue de 73 ± 6.27 % de la glucosa inicial (500 mg/dL) mientras que la cepa mutante $\Delta arf3$ consume hasta el 97 ± 4.93 % del total de la glucosa presente en el medio (**Tabla 6**). Con esta modificación al medio de cultivo disminuimos la interferencia de glucosa no consumida por ambas cepas.

Tabla 6. Determinación del consumo de glucosa en el medio de cultivo YNB posterior a las 48 horas de crecimiento.

CEPA	GLUCOSA INICIAL (mg/dL)	GLUCOSA A LAS 48 HORAS POST-CRECIMIENTO mg/dL (% remanente)
MU636	500	135 (27%)
$\Delta arf3$	500	15 (3%)

Se muestra el consumo de glucosa a las 48 horas post- crecimiento de ambas cepas en medio YNB adicionado con el 2% de glucosa. Los paréntesis indican el % de glucosa restante.

Posteriormente se evaluó el efecto de la reducción de la concentración de glucosa al 0.5 % en el medio de cultivo sobre la capacidad de virulencia de los SS de *M. circinelloides*. En la **Figura 10** se muestra la supervivencia generada con los SS obtenidos mediante crecimiento en medio YNB suplementado al 0.5 % de glucosa posteriormente a las 48 horas de crecimiento. La capacidad de virulencia del SS de la cepa mutante $\Deltaarf3$ se mantuvo respecto al porcentaje de muertes generadas por el SS producido a partir del medio YNB suplementado con 2 % de glucosa en condiciones similares de crecimiento, generando hasta un 40 % de supervivencia del nemátodo *C. elegans*. Por otra parte el SS proveniente de la cepa WT obtenido en condiciones similares a la cepa $\Deltaarf3$ al 0.5% de glucosa mantuvo su comportamiento menos virulento. Estos datos, indican que los factores de virulencia secretados por la cepa mutante $\Deltaarf3$ se mantienen en el medio de cultivo en un crecimiento en YNB suplementado con el 0.5 % de glucosa y que dicha concentración de glucosa es practicamente consumida en su mayoría por parte de ambas cepas, siendo el consumo de la cepa silvestre 73 % y el de la cepa mutante 97 % de la glucosa total del medio.

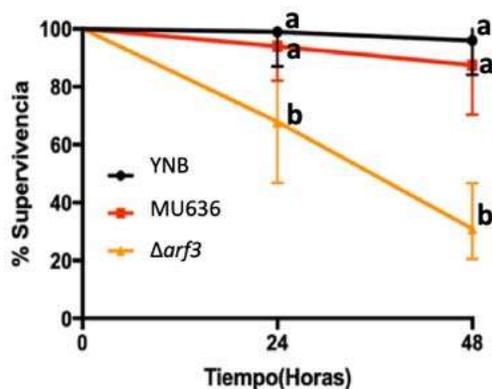


Figura 10. Efecto de la reducción de la glucosa en el medio de cultivo sobre la capacidad de virulencia de los SS de *M. circinelloides*. Mediante la inoculación de 1×10^6 esporas por 1 mL de medio de cultivo, se realizaron cinéticas

de crecimiento aeróbico en medio YNB suplementadas al 0.5 % de glucosa a 28 °C, en agitación constante de 150 rpm por 48 h. Se evaluó la capacidad de virulencia de los SS obtenidos correspondientes a cada una de las cepa analizadas. Se usó a *C. elegans* para determinar su sobrevivencia frente a dichos SS. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes. n= 4 Fisher, p<0.05

6.1.7 Separación de proteínas por exclusión molecular membrana de Amicon (10 kDa)

Con la finalidad de conocer el rango de peso molecular de las proteínas con actividad virulenta presente en el SS de la cepa mutante $\Delta arf3$, se tomaron 4 mL de cada SS y se sometieron a filtración por 4 h a 4,300 x g a 4 °C a través de una membrana de exclusión molecular Amicon Ultra-4, membrana PLGC Ultracel-PL de 10 kDa.

Al final de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones denominadas 10-V₁, que corresponde a la fracción del sobrenadante que se quedo retenida en la membrana, la cual contiene moléculas de 10 kDa o mayores de peso molecular. Además, se obtuvo la fracción 10-V₀, que corresponde a la fracción del SS que se filtro a través de la membrana y que corresponde a moléculas de 10 kDa o menores de peso molecular. Del total de 4000 mL iniciales de SS que se sometieron a filtración, se obtuvo un volumen final de 250 µL correspondiente a la fracción 10-V₁, mientras de la fracción 10-V₀ se obtuvo un volumen final de 3750 µL.

Posteriormente, ambas fracciones fueron evaluadas respecto a su actividad de virulencia frente al nemátodo *C. elegans*. Dado a que la el volumen inicial fue de 4 mL y el volumen final de la fracción 10-V₁ fue de 250 µL mientras que el volumen final de la fracción 10-V₀ fue de 3750 µL, se realizó la dilución (1:16) únicamente

de la fracción concentrada 10-V₁ en los ensayos de virulencia. Se determinó que la fracción denominada 10-V₁ de la cepa mutante $\Deltaarf3$ mostró un nivel de virulencia disminuido respecto al SS, sobreviviendo hasta el 87% de la población. Mientras que la fracción 10-V₀ de la misma cepa generó un 20 % de supervivencia. Por otra parte, las fracciones 10-V₁ y 10-V₀ de la cepa WT fueron avirulentas en el ensayo llevado a cabo en condiciones similares (**Figura 11**). Con estos resultados se concluye que el peso molecular de los factores con actividad virulenta secretadas al medio por la cepa mutante $\Deltaarf3$ es igual o menos de 10 kDa.

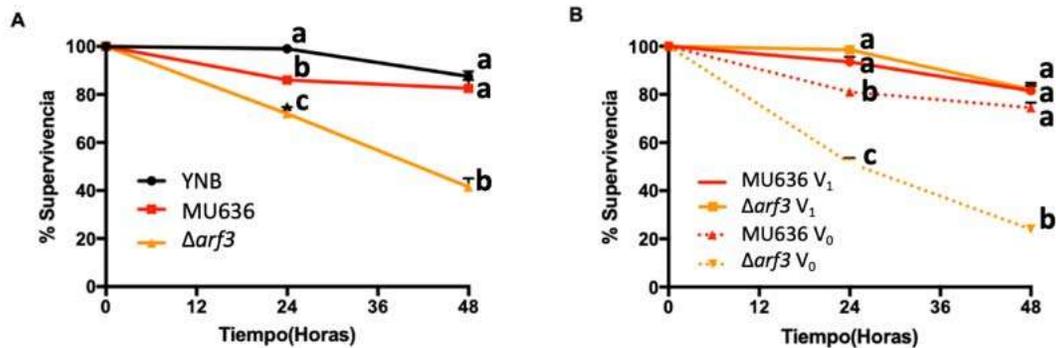


Figura 11. Separación de moléculas por exclusión molecular a través de membranas de Amicon de 10 kDa. (A) Se realizaron cinéticas de crecimiento en medio YNB al 0.5 % de glucosa mediante la inoculación de 1×10^6 esporas por 1 mL, incubadas en condiciones de aeróbiosis a 28 °C por 48 horas. Posteriormente, se obtuvieron los SS de cultivo de cada una de cepa, evaluándose la capacidad de viruelncia de dichos SS frente a *C. elegans*. **(B)** Los SS de cultivo se sometieron a exclusión molecular obteniéndose dos fracciones del sobrenadante 10-V₁ (fracción del sobrenadante que se queda retenida en la mebrana >10 kDa) y 10-V₀ (fracción del sobrenadante que pasa a través de la membrana <10 kDa). Se evaluó la capacidad de virulencia de cada una de las fracciones frente a *C. elegans* hasta las 48 horas. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes. N= 4 Fisher, p<0.05

6.1.8 Separación de proteínas por exclusión molecular membrana de Amicon (3 kDa)

Con base en los resultados obtenidos con la membrana de exclusión molecular de 10 kDa donde se demostró que la actividad de virulencia se mantiene en la fracción alrededor de 10 kDa. Para poder continuar con la determinación del peso molecular de la moléculas(s) con capacidad de virulencia secretada por la cepa mutante $\Delta arf3$ al medio de cultivo se procedió a realizar nuevamente la separación de moléculas utilizando una membrana de exclusión molecular de 3 kDa Amicon Ultra-4, membrana PLGC Ultracel-PL.

Siguiendo el protocolo de filtración a través de la membrana se colocaron 4 mL de SS de cada cepa y se sometieron a filtración por 4 horas a $4,300 \times g$ a $4^\circ C$. Terminado el proceso de separación, se obtuvieron dos fracciones denominadas 3- V_1 (fracción del sobrenadante que se queda retenida en la membrana >3 kDa) y 3- V_0 (fracción del sobrenadante que pasa a través de la membrana <3 kDa). Del volumen inicial de 4000 mL de cada uno de los SS, se obtuvo un volumen final de la fracción 3- V_1 de 250 μL ; mientras que de la fracción 3- V_0 se obtuvo un volumen final de 3.750 μL .

Posteriormente los SS de cultivo se sometieron a exclusión molecular utilizando membrana de exclusión molecular de 3 kDa, obteniéndose dos fracciones del sobrenadante 3- V_1 (fracción del sobrenadante que se queda retenida en la membrana >3 kDa) y 3- V_0 (fracción del sobrenadante que pasa a través de la membrana <3 kDa). Ambas fracciones fueron evaluadas respecto a su capacidad de virulencia contra el nemátodo *C. elegans*. La supervivencia en *C. elegans* generada de las fracciones V_1 y V_0 de la cepa mutante $\Delta arf3$ y la cepa silvestre MU636 resultantes de la filtración mediante exclusión molecular de 3 kDa. La capacidad de virulencia de la fracción denominada 3- V_1 de la cepa mutante $\Delta arf3$ disminuyó hasta un porcentaje de supervivencia del 90%, mientras que el porcentaje de supervivencia

del nemátodo al sobrendante de cultivo (sin fraccionar) de la misma cepa es alrededor del 40%.

Las fracciones 3-V₁ y 3-V₀ de la cepa WT mostraron ser similar de virulentas respecto al SS de la WT. Con estos resultados se concluye que el peso molecular de la o las proteínas con actividad virulenta secretadas al medio por la cepa mutante $\Delta arf3$ es igual o inferior a 3 kDa (**Figura 12**).

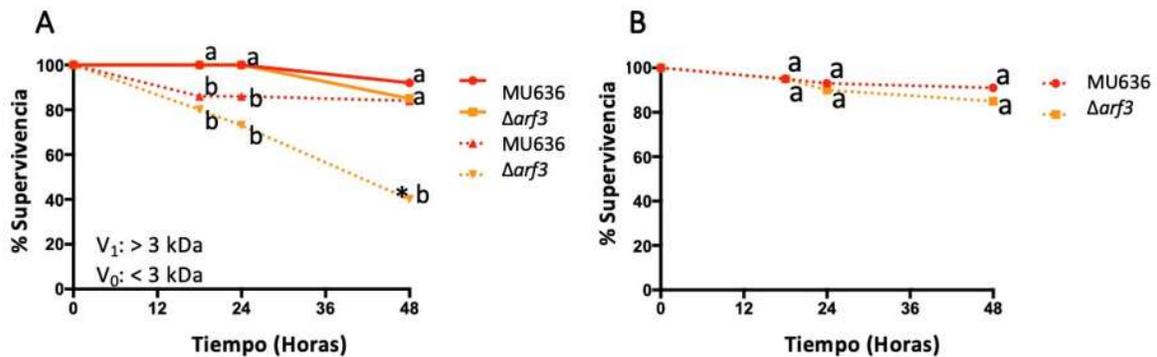


Figura 12. Separación de proteínas por exclusión molecular en membranas de Amicon (3 kDa) (A) Se montaron cinéticas de crecimiento aeróbico a 28 °C y en agitación 150 rpm de 12 horas, en medio YNB suplementado con leucina y glucosa al 0.5 %. Se obtuvieron los sobrendantes de cultivo (SS) a las 48 horas, los cuales fueron fraccionados membrana de exclusión molecular de tamaño de poro de 3 kDa. (B) Las fracciones correspondientes a 3-V₀ fueron expuestas a la acción de proteinasa K. Posteriormente se evaluó la capacidad de virulencia de todas las fracciones frente a *C.elegans*. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes. n= 4 Fisher, p<0.05.

6.1.9 Análisis mediante MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* desorción/ionización láser asistida por matriz) de la fracción de SS menor de 3 kDa de la cepa WT y la cepa mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*.

La fracción de SS de 3 kDa de ambas cepas fue analizada mediante MALDI *esta técnica* consiste en una ionización suave del analito que provoca la vaporización de intactas moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular entre hasta de 20 kDa, permitiendo conocer los componentes de la muestra. **(Croxxato y col., 2012)**. Con el objetivo de conocer el PM y posiblemente diferencias entre ambos SS, se analizó la fracción de 3 kDa obtenidas con anterioridad. Se puede observar que la mayoría de las moléculas en las fracciones de las cepas mutante *arf3* y WT, andan en un rango de PM inferior a 1,000 Da, encontrando una diferencia notable en una molécula cuyo PM es de 657 Da **(Figura 13)**. En general, estos datos sugieren que no hay una diferencia absoluta en la presencia o ausencia de picos (moléculas) entre ambas cepas, y que posiblemente el o los factores de virulencia secretados por la mutante pueden ser secretados por ambas cepas, sin embargo probablemente la mutante $\Delta arf3$ este secretando una mayor cantidad de dicho(s) factor(es).

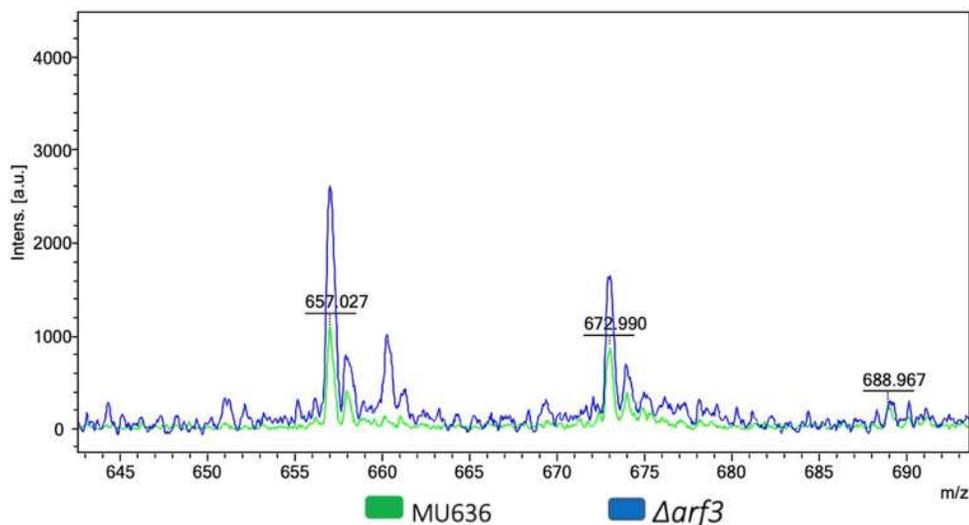


Figura 13. Análisis mediante MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) de la fracción de SS menor de 3 kDa de la cepa WT y la cepa mutante $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides*. Fueron colocados 5 uL de SS de cada cepa en la placa de análisis MALDI. La búsqueda diferencial en los espectros se realizó en el rango molecular correspondiente a una molécula con un peso molecular inferior a los 3 kDa. N= 2

6.2. Determinación del daño celular en *C. elegans* ocasionado por la fracción V_0 de 3 kDa de la cepa mutante $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides*.

Con el propósito de determinar el efecto de la fracción de 3 kDa de las cepas WT y $\Deltaarf3$ en el daño celular sobre *C. elegans*. Dichos SS fueron puestos en contacto con nemátodos, se recolectaron los nemátodos a las 12 horas post incubación con los SS y se determinaron que los niveles de ARNm de los genes que codifican a las chaperonas homólogas de BiP de mamífero, *HSP3* y *HSP4*, las cuales son proteínas residentes de retículo endoplásmico, cuya expresión es aumentada por estrés celular de distinta naturaleza incluyendo procesos infecciosos (Ji y col., 2019). Los niveles de ARNm de los genes que codifican a ambas chaperonas se encontraban hasta 2 veces más elevados en *C. elegans* expuesto al SS sin fraccionar de la mutante $\Deltaarf3$, que mostró un nivel relativo de 0.5 en los niveles de ARNm de *HSP4* en comparación con los niveles expresados por la exposición

con el SS de la cepa WT mostrando un valor relativo de 0.2, es decir hasta 2.5 veces más respecto a la cepa WT. Datos similares fueron obtenidos en los niveles de ARNm de *HSP4* en comparación con la cepa WT (**Figura 14**). Esto sugiere que la fracción V_0 proveniente de la cepa mutante $\Deltaarf3$ contiene moléculas que promueven el daño celular en *C. elegans*.

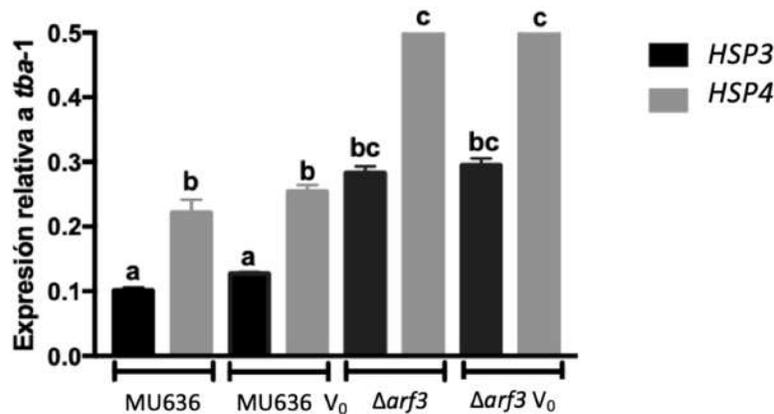


Figura 14. Determinación de daño celular en *C. elegans* ocasionado por la fracción fracción V_0 de <3 kDa de la cepa mutante $\Deltaarf3$ de *M. circumloides*. *C. elegans* fue expuesto a las fracciones V_1 y V_0 de las cepas silvestre y la cepa $\Deltaarf3$ por 24 horas y posteriormente se extrajo el RNA total de *C. elegans* expuesto a dichas fracciones. Se midieron los niveles de transcrito de los genes que codifican a las chaperonas *HSP3* y *HSP4* en los nematodos. Los datos fueron analizados mediante análisis tipo ΔCt . Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes. $n=4$ Fisher, $p<0.05$. Las barras que comparten la misma letra no son estadísticamente significativas.

6.2.1 Determinación de la naturaleza química y termotolerancia del factor de virulencia presente en la fracción V₀ de 3 kDa de la cepa mutante $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de conocer la naturaleza química relacionada a(los) factor(es) de virulencia presente(s) en la fracción de 3 kDa de la cepa $\Deltaarf3$, se evaluó la supervivencia de *C. elegans* frente a las fracción 3-V₀ de la cepa $\Deltaarf3$ y la cepa WT, las cuales fueron sometidas a un tratamiento con proteinasa K durante 2 horas a 37 °C. Como se muestra en la **Figura 15A** la fracción 3-V₀ de la cepa $\Deltaarf3$ tratado con proteinasa K disminuyó su capacidad de virulencia generando un 85% de supervivencia en *C. elegans*, comparado con el 40 % de supervivencia que se generó la misma fracción 3-V₀ a la cual no se le adicionó la enzima. Además, la fracción 3- V₀ sin proteinasa K, mantuvo su virulencia demostrando termotolerancia a 37 °C hasta por 2 horas, por lo cual se evaluó la capacidad de virulencia de esta fracción después de ser expuesta a 2, 4, 6 y 8 horas a la misma temperatura. La capacidad tóxica de la fracción 3-V₀ de la cepa $\Deltaarf3$ se mantuvo durante las 8 horas de exposición al calor (37 °C), generando un porcentaje de virulencia de aproximadamente ≈ 45 % (**Figura 15B**). Debido a que el factor de virulencia presente en la fracción 3-V₀ de la cepa $\Deltaarf3$ es estable hasta por 8 horas a 37 °C, se evaluó la resistencia de dicha fracción a una temperaturas de 98 °C durante 5 minutos y posteriormente se evaluó la capacidad tóxica del mismo en el nemátodo. Como se observa en la **Figura 15C** la fracción 3-V₀ mantiene el potencial tóxico generando hasta un 45 % de supervivencia en el organismo, comparado con el 40 % de supervivencia que genera la misma fracción antes de ser expuesta al calor. Estos resultados sugieren que el factor de virulencia secretado por dicha cepa podría ser una molécula con alta capacidad de resistencia a la temperatura.

Con estos resultados se concluye que el factor de virulencia secretado por la cepa mutante $\Deltaarf3$ es susceptible a la acción de la proteasa, sugiriendo una relación con una estructura de naturaleza protéica. Pero también se evidenció la capacidad termotolerancia hasta 98 °C por 5 minutos de dicho factor de virulencia.

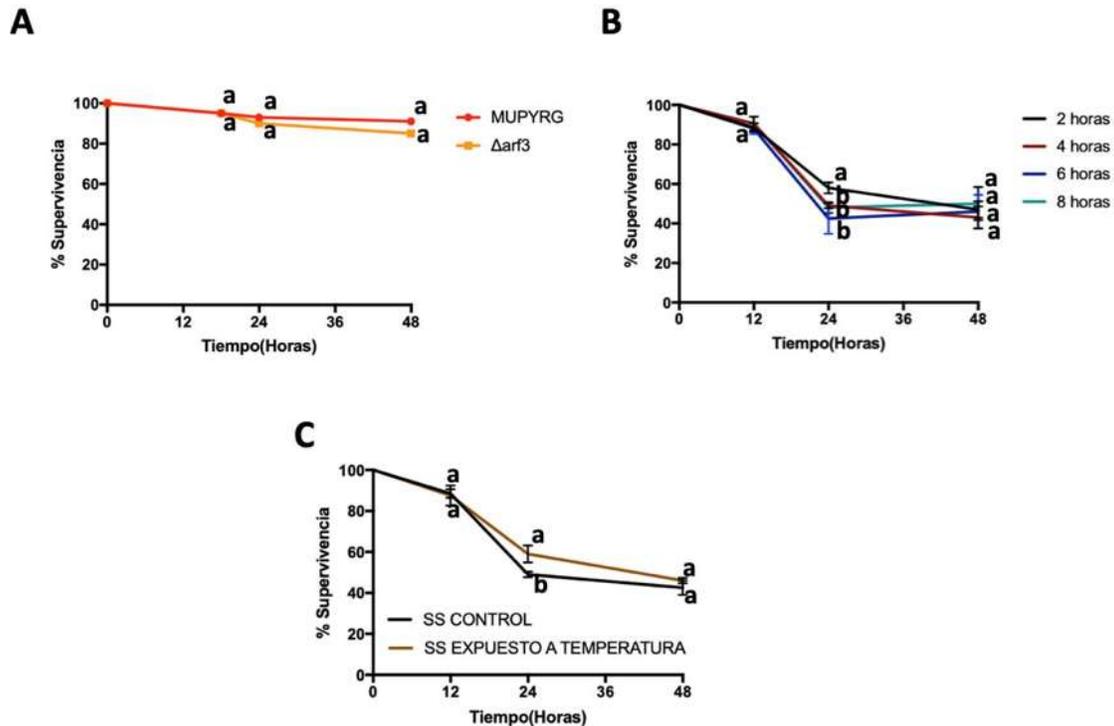


Figura. 15 Determinación de la naturaleza química y termotolerancia del factor de virulencia presente en la fracción V_0 (menor que) 3 kDa de la cepa mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*. **A)** A la fracción 3- V_0 se le adicionó proteinasa K (1 unidad/mL), se incubó durante 2 h a 37 °C. Se evaluó su capacidad de virulencia en *C. elegans* cuantificándose la supervivencia de los mismos. **B)** La fracción 3- V_0 fue expuesta a 37° C hasta 8 horas. Posteriormente, se evaluó su capacidad de virulencia frente a *C. elegans*. **C)** La fracción 3- V_0 de la cepa $\Delta arf3$ c fue expuesta a 98 °C durante 5 minutos. Posteriormente se evaluó su capacidad de virulencia en *C. elegans* cuantificándose el porcentaje de supervivencia hasta las 48 horas. Se muestra el promedio de 4 experimentos independientes. n= 4 Fisher, p<0.05. Las barras que comparten la misma letra no son estadísticamente significativas.

Con base a la termotolerancia, sensibilidad a proteasas y al posible tamaño de los factores de virulencia podemos pensar que las moléculas tipo péptidos de alrededor de 10 aminoácidos estables a altas temperaturas (**Mora-Montez y col., 2019**). Además, otra posibilidad pudieran ser moléculas tipo sideróforos cuyos pesos moleculares oscilan entre 500-1500 Da (**Azmi K y col., 2018**). Los sideróforos son moléculas orgánicas quelantes de iones Fe. Se ha reportado que los sideróforos de hongos son en su mayoría del tipo de hidroxamatos mientras que en mucorales son del tipo polycarboxilatos (**Figura 2**). Se reportó la participación de un sideróforo secretado por *R. delemar* que participa positivamente en la virulencia del mismo (**Carrol y col., 2017**). Por estos antecedentes nos dimos a la tarea de identificar al homólogo del producto del gen *rfs* de *R. delemar* y en *M. circinelloides*.

6.2.2 Identificación del homólogo Rfs de *R. delemar* en *M. circinelloides*

Con la finalidad de conocer en *M. circinelloides* la identidad del homólogo *rfs*, el cual codifica a una enzima que participa en la síntesis del sideroformo rizoferrina en el mucoral *R. delemar* (**Carrol y col., 2017**). Para lo cual se utilizó como sonda al gen *rfs* que codifica para la enzima NRPS (Por sus siglas en inglés, Non Ribosomal Protein Synthetase), con el cual se realizó una búsqueda en el genoma de *M. circinelloides* de los posibles homólogos y posteriormente un alineamiento tipo Blast de las secuencias. Se encontró que *M. circinelloides* posee un único homólogo a Rfs, el cual codifica a un producto con un porcentaje de identidad del 70 % y de similitud del 80 % respecto a la proteína Rfs de *R. delemar* (**Figura 16**). Lo cual sugiere fuertemente que *M. circinelloides* tiene el potencial de sintetizar un sideróforo similar a la rizoferrina anteriormente identificado en *R. delemar*.

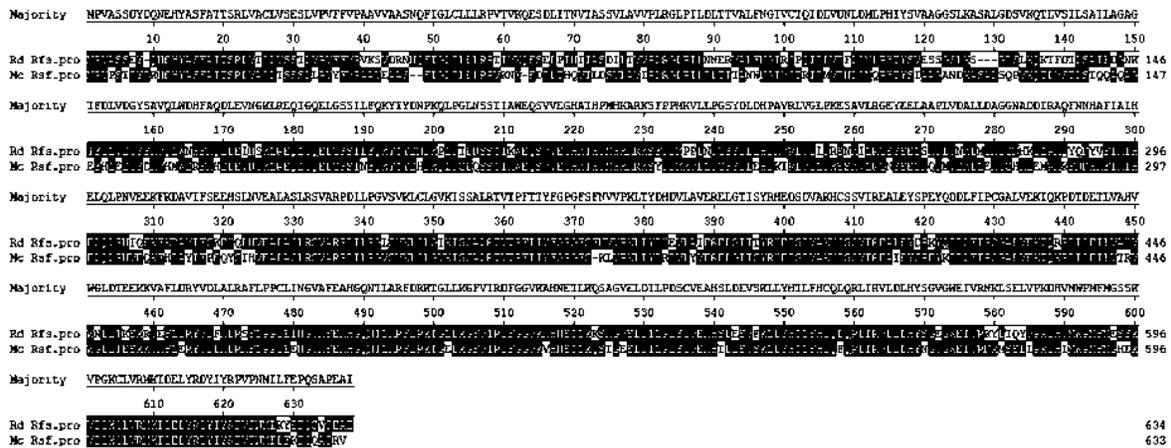


Figura 16. Alineamiento tipo blast en las secuencias aminoácidas Rfs *M. circinelloides* y *R. delemar*. En la primera línea se muestra la secuencia codificada por el gen *rfs* correspondiente a *R. delemar*, en la segunda línea se encuentra la secuencia de *M. circinelloides*, mostrándose en color negro aminoácidos idénticos.

6.2.3 Determinación de la presencia de la producción de sideróforo en las cepas de *M. circinelloides*

Con la finalidad de evidenciar si *M. circinelloides* secreta un sideróforo al medio de cultivo se procedió a realizar un crecimiento radial, utilizando como medio de cultivo sólido Cromo-Azurol-Sulfonato (CAS Agar), el cual tiene la cualidad de virar de color azul a anaranjado cuando el pH del medio se acidifica producto de la secreción de captadores de hierro. Se inocularon esporas de ambas cepas de *M. circinelloides* así como también se utilizó la cepa de *Pseudomonas fluorescens* como control positivo de la secreción de sideróforos. Mediante la observación del crecimiento en las placas se hizo notorio el cambio de coloración anaranjada que rodea el crecimiento del micelio en la cepa mutante $\Delta arf3$, el cual más notorio que en la cepa parental MU636 (Figura 17).

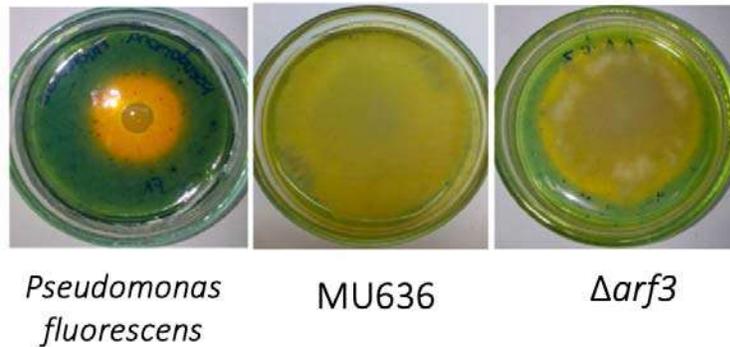


Figura 17. Análisis cualitativo de actividad de secreción de sideróforos por parte de las cepas de *M. circinelloides* al medio de cultivo. Fueron inculadas 100 esporas de cada cepa de *M. circinelloides* en el centro de la placa, evaluándose el cambio en la coloración del medio a partir del segundo día de crecimiento. Como control positivo se utilizó a la cepa *Pseudomonas fluorescens* las fotos corresponden al cuarto día de crecimiento. Se muestra el resultado de dos experimentos independientes.

6.2.4 Niveles de ARNm de *rfs* de *M. circinelloides* en cultivos líquidos

Con el objetivo de conocer la posible desregulación del gen que codifica a la enzima Rfs quien participa en la síntesis de la rizoferina en la cepa $\Deltaarf3$, así como también en las mutantes $\Deltaarf1$ y $\Deltaarl1^{(+)(-)}$ las cuales también han sido reportadas con anterioridad en nuestro grupo de trabajo como virulentas por la secreción de factores de virulencia. Se llevó a cabo la germinación aerobia de las distintas cepas en medio mínimo vogel adicionado o no con hierro, debido a que se ha reportado una mayor síntesis de este tipo de enzimas cuando el organismo crece en ausencia de este elemento (Carrol y col., 2017). Se recuperó la biomasa posterior a las 48 horas de crecimiento aeróbico en ambos medios, y se procedió a aislar el ARN total para medir los niveles de ARNm del gen *rfs* en presencia y ausencia de hierro mediante RTq-PCR, utilizando como gen de referencia a *tfc-1*. Todas las cepas de *M. circinelloides* presentan una acumulación del transcrito del gen *rfs* (Figura 18). Sin embargo, en presencia de hierro la cepa $\Deltaarf3$ mostró hasta 4 veces más ARNm del gen *rfs* en comparación con la cepa WT. Sin

embargo, cuando las esporas son germinadas en ausencia de hierro los niveles de transcrito en la cepa $\Deltaarf3$ aumentan 0.5 veces más comparado a los niveles de transcrito en presencia del ion, mientras que la diferencia es 3 veces mayor respecto a la cepa WT. La mutante $\Deltaarf1$ acumula niveles de transcrito similares a la cepa WT, pero interesantemente es insensible a la regulación por la presencia o ausencia de hierro; mientras que la cepa $\Deltaarl1^{(+)(-)}$ generó un poco más del doble de ARNm en comparación con la cepa WT cuando crecen en presencia de hierro y dos veces más cuando crece en ausencia del mismo. Esto sugiere que existe una desregulación de manera positiva de los niveles de ARNm del gen *rfs* en las cepas $\Deltaarf3$ y $\Deltaarl1^{(+)(-)}$, siendo más evidente la acumulación de ARNm en la cepa mutante $\Deltaarf3$.

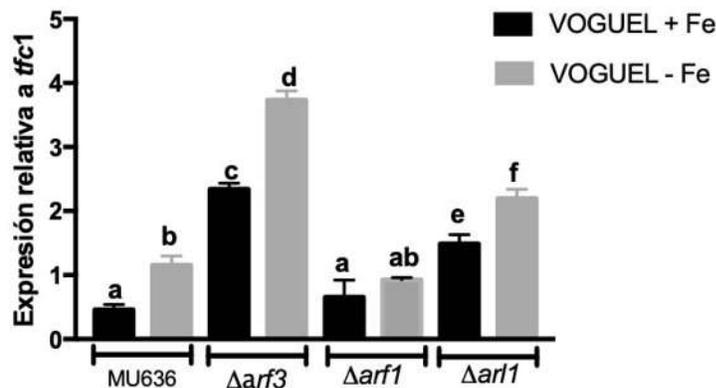


Figura 18. Niveles de RNAm de *rfs* de *M. circinelloides*. Esporas de las distintas cepas mutantes fueron inoculadas en medio Vogel en presencia o en ausencia de hierro (0.1 %), las cuales fueron crecidas durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Se obtuvo el ARN total a partir de la biomasa generada y se cuantificó el transcrito del gen *rfs* mediante RT-qPCR en cada una de las cepas. Se utilizó al gen *tfc-1* como gen de referencia. Los datos fueron analizados mediante análisis tipo ΔCt . Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes, cada uno por triplicado. las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, * $p < 0.05$.

6.2.5 Niveles de ARNm de *rfs* de *M. circinelloides* en hígado de ratón

Para comprobar que el sideróforo o genes relacionados con su síntesis en la cepa $\Deltaarf3$ tiene algún efecto sobre la virulencia en mamíferos, se inocularon intraperitonealmente a ratones Balb-c con 2×10^7 esporas en de las cepas de *M. circinelloides* que han sido reportadas como virulentas (Patiño-Medina y col., 2018, Patiño-Medina y col., 2019). Los animales fueron eutanizados a los 7 días post inoculación y se midieron los niveles de transcrito de *rfs* en hígado de ratón, mediante RT-qPCR y utilizando como gen de referencia a *ffc-1*. Como se puede observar todas las cepas tienen la capacidad de transcribir al gen *rfs*, sin embargo la cepa $\Deltaarf3$ sintetiza 3.5 veces más ARNm de *rfs* en comparación con la cepa WT, mientras que las cepas $\Deltaarf1$ y $\Deltaarl1^{(+/-)}$ tienen la capacidad de sintetizar alrededor del doble de ARNm de *rfs* respecto a la cepa WT. Estos ensayos permiten concluir que todas las cepas mutantes analizadas tienen la capacidad de acumular el transcrito del gen *rfs* posterior a la infección en el ratón. Sin embargo, los niveles de transcritos del gen *rfs* más elevados fueron los generados por la infección con SS de la cepa $\Deltaarf3$.

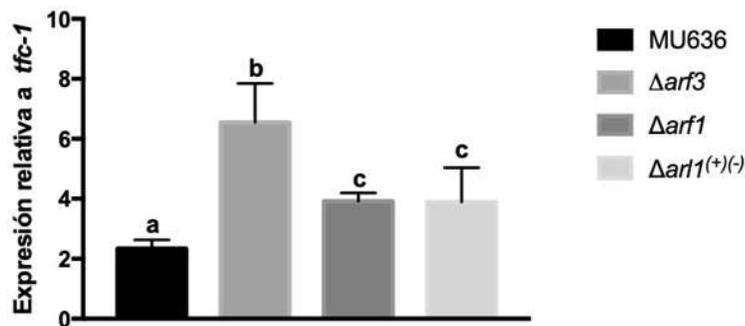


Figura 19. Niveles de ARNm de *rfs* de *M. circinelloides* en hígado de ratón.

Ratones fueron inoculados con 20×10^6 en 300 μ L, fueron eutanizados 7 días después de su inoculación, utilizándose 3 ratones por grupo. Se muestra el resultado de dos experimentos independientes cada uno por triplicado, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, * $p < 0.05$

6.2.6 Niveles de ARNm de *IL-6* en hígado de ratones inoculados con el SS o la fracción V₀ de *M. circinelloides*

Con la finalidad de evaluar el daño a nivel celular generado por la inoculación de esporas de las cepas reportadas como virulentas de *M. circinelloides* ($\Delta arf1$, $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$) y de la fracción 3-V₀ de la cepa $\Delta arf3$, se inocularon ratones *Balb-c* con dichas esporas y la fracción, al término de 7 días estos fueron sacrificados. La cuantificación de ARNm del gen *IL-6*, un marcador de inflamación generalizada de mamíferos (Tanaka y col., 2014), en los hígado de los ratones inoculados con las esporas de la cepa $\Delta arf3$ mostró el mayores nivel de ARNm de *IL-6* respecto a la cepa WT (alrededor de 10 veces). Mientras que la cepa $\Delta arf1$ generó cerca de 5 veces) y la cepa $\Delta arl1^{(+/-)}$ aumento alrededor de 4 veces más transcrito que la cepa WT (Figura 20A). Los resultados obtenidos tras la inoculación de ratones con la fracción 3-V₀ de la cepa $\Delta arf3$ mostró 2.5 veces más ARNm de *IL-6* en tejido hepático respecto a los tejidos provenientes de ratones inoculados con la misma fracción de la cepa WT. Estos experimentos evidenciaron que el factor de virulencia secretado por la mutante en el gen *arf3* tiene la capacidad de causar daño celular en el hígado del ratón.

6.2.7 Efecto de las mutaciones en los genes *arf3* y *arf4* en el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables

Debido a que el sideróforo rizoferrina se encuentra en el citosol pero la síntesis de sus precursores, el ácido cítrico el cual es sintetizado en las mitocondrias como resultado del ciclo de Krebs, y el diaminobutano (putrecina), es sintetizada a partir de la arginina la cual por acción de la agmatadina (mitocondrial) es convertida en ornitina la cual mediante la ornitina descarboxilasa (citosólica) es convertida en putrecina (Carrol y col., 2017). Quisimos examinar la posible disfunción del metabolismo oxidativo mediante la capacidad de crecimiento de las cepas de *M. circinelloides* en distintas fuentes de carbono fermentables y no fermentables. El crecimiento radial posterior a 5 días de crecimiento reveló que todas las cepas analizadas WT, $\Delta arf3$, $\Delta arf4$ y $\Delta arf3/\Delta arf4^{(+/-)}$ cubren la totalidad en la placa en presencia de glucosa (Figura 21), mientras que el crecimiento en glicerol como

única fuente de carbono, la mutante $\Deltaarf3$ mostró un menor crecimiento, sugiriendo una alteración en el metabolismo oxidativo.

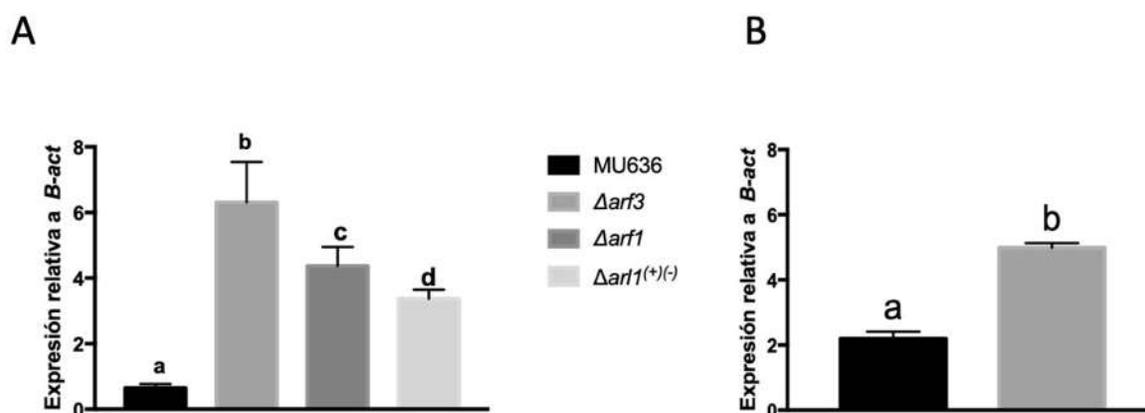


Figura 20. Niveles de RNAm de *IL-6* en hígado de ratones infectados con *M. circinelloides* Grupos de 6 ratones tipo *Balb-c*, fueron inoculados vía intraperitoneal con **A)** esporas de las distintas cepas mutantes o **B)** con la fracción menor de 3 kDa. Al término de 7 días fueron eutanizados ambos grupos y se recolectó el hígado para la cuantificación de ARNm de *IL-6* mediante RT-qPCR. n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, *p<0.05.

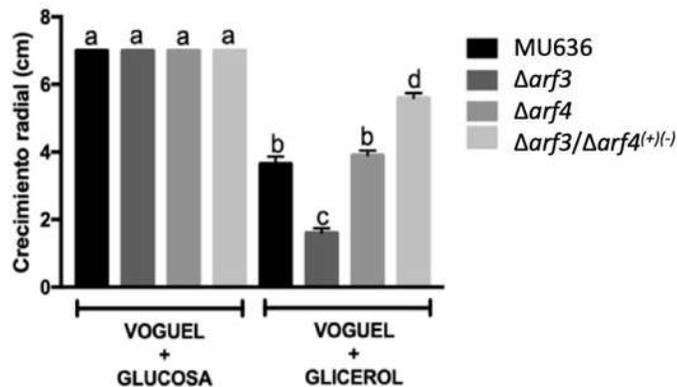


Figura 21. Efecto de las mutaciones en *arf3* y *arf4* en fuentes de carbono. 100 esporas fueron inoculadas en el centro de la placa con medio YPG + fuente de carbono fermentable (glucosa), así como en YPG + glicerol como única fuente de carbono no fermentable, se reportó el crecimiento radial hasta el día 5. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, *p<0.05.

De acuerdo con los resultados anteriores se sugiere que podría existir una desregulación en el metabolismo oxidativo, por lo cual se examinó la germinación en medio líquido YNB suplementado con glucosa o ácido oléico como únicas fuentes de carbono. El porcentaje de germinación de las cepas mutantes analizadas fue mayor al mostrado por la cepa silvestre en medio YNB suplementado con glucosa (**Figura 22**). Sin embargo, la germinación observada cuando fueron crecidas en ácido oléico como única fuente de carbono la germinación de la cepa mutante $\Delta arf3$ mostró una disminución del 60 % respecto a la cepa silvestre. Esto podría sugerir que existe una desregulación en el funcionamiento de las mitocondrias y/o peroxisomas.

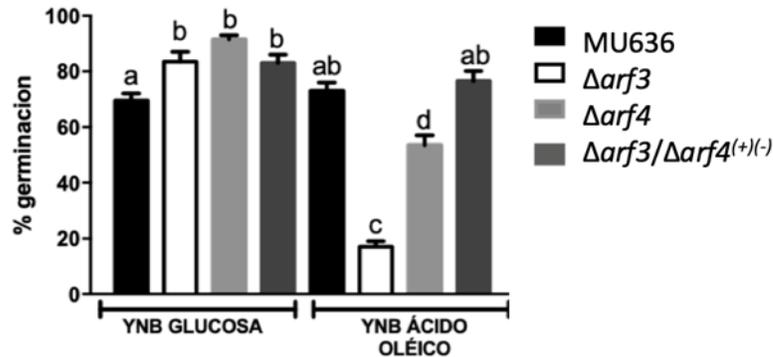


Figura 22. Germinación en ácido oléico de las cepas $\Delta arf3$ y $\Delta arf4$ de *M. circinelloides*. Esporas de las cepas de *M. circinelloides* fueron crecidas en aerobiosis en medio YNB + fuente de carbono fermentable (glucosa) + leucina, así como en YNB + ácido oléico (fuente de carbono no fermentable) + leucina. Reportándose el porcentaje de germinación posterior a 8 h de crecimiento. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes., las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, * $p < 0.05$.

6.2.8 Efecto de las mutaciones en *arf3* y *arf4* en el contenido de ADN mitocondrial.

Con la finalidad de saber si la capacidad de la cepa mutante $\Delta arf3$ de producir una mayor acumulación de transcrito de *rfs* es un defecto en la cantidad de mitocondrias o en algún componente de estos organelos se realizó un análisis de cuantificación de ADN mitocondrial en las esporas de el gen *atp9* que codifica a una subunidad de la ATPasa mitocondrial. Se observó que las esporas de la cepa mutante $\Delta arf3$ y la cepa WT poseen la misma carga de mitocondrias, a diferencia de las otras dos mutantes *arf*. Esto puede sugerir que la disfunción de

poder metabolizar fuentes de carbono no fermentables, quizás no es atribuible a la carencia de mitocondrias si no a un problema de los componentes de la misma, como las proteínas de transporte de electrones, enzimas del ciclo de Krebs entre otras.

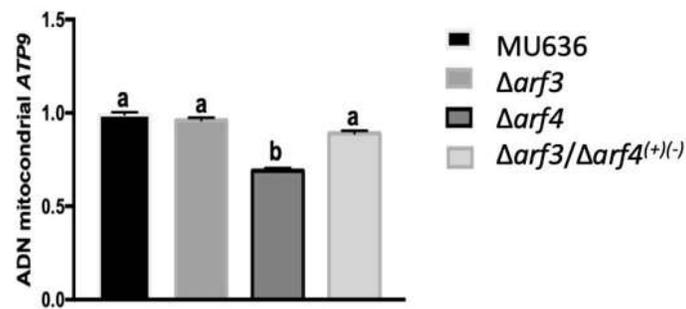


Figura 23. Efecto de las mutaciones en *arf3* y *arf4* en el contenido de DNA mitocondrial. 1×10^6 esporas de cada una de las cepas de *M. circinelloides* fueron utilizadas para la cuantificación de ADN mitocondrial, mediante q-PCR. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. $n=2$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher, $*p<0.05$.

6.2.9 Construcción del fragmento de recombinación para interrumpir el gen que codifica a la proteína Rfs de *M. circinelloides*.

Por otra parte, para llevar a cabo la interrupción del gen *rfs* de *M. circinelloides*, se realizó la construcción del fragmento recombinante mediante la estrategia de PCR en fusión, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se amplificó aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción y una región de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *rfs*, y por otra parte al se amplificó al gen *pyrG* (2 kb) o *leuA* (3.3 kb). Esta técnica permitió generar el fragmento recombinante sin necesidad de enzimas de restricción ni vectores de clonación (**Figura 24A y B**). Los productos de PCR se corroboraron en un gel de agarosa al 1 %, y cada uno de los fragmentos de ADN se purificaron y se

cuantificó su concentración (**Figura 24C**). Los tres fragmentos correspondientes a la región 5' del gen *rfs*, la región 3' del gen *rfs* y el gen marcador, se utilizaron como templado para el último paso, la PCR en fusión. El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se purificó recortando únicamente la banda correspondiente al tamaño esperado de la fusión de los tres fragmentos, es decir el fragmento recombinante de aproximadamente 4 kb para *rfsRP* y 6 kb para *rfsRL* (**Figura 24Cy D**).

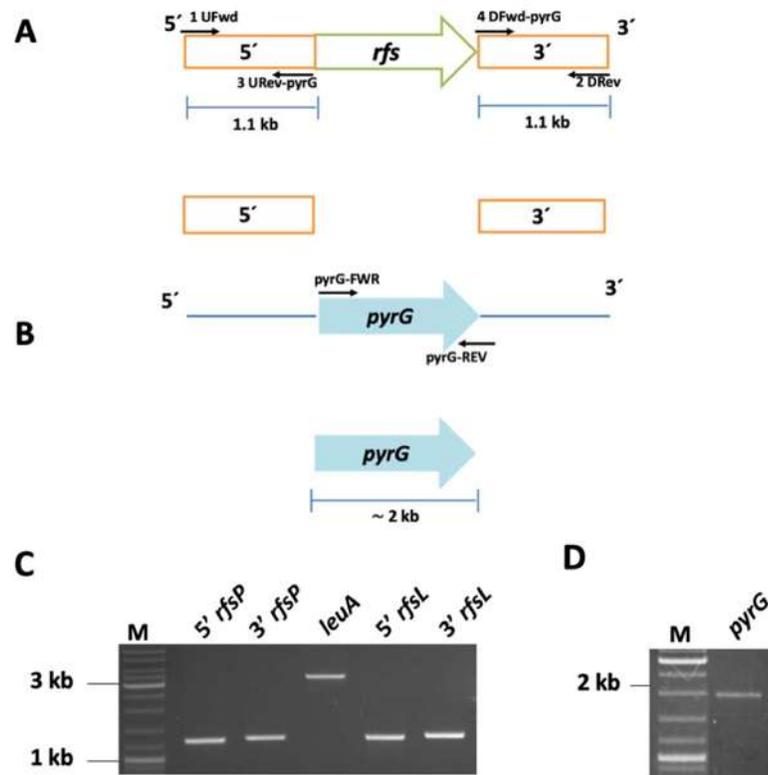


Figura 24. Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR convencional para la construcción del fragmento de recombinación para la delección del gen *rfs* de *M. circinelloides*. A) Esquema del gen *rfs* con las regiones 5' y 3' de 1.1 kb cada una, las cuales fueron amplificadas por PCR. **B)** Esquema del gen silvestre *pyrG* de *M. circinelloides* amplificado por PCR, el cual contiene su propio promotor y terminador. **C)** Gel de agarosa en donde se corroboró los tamaños de fragmentos de ADN esperados de 1.1 kb y 2 kb para las regiones 5', 3' del gen *rfs* y *leuA*. **D)** Corroboración del tamaño de fragmento *pyrG*

de 2 kb. Se usó el marcador de peso molecular de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix. De forma similar se llevo a cabo la construcción del fragmento recombinante con el marcador de selección *leuA*.

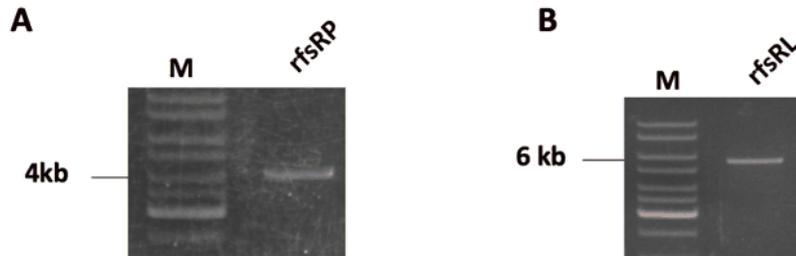


Figura 25. Confirmación mediante corrimiento electroforético del producto de PCR en fusión para la deleción del gen *rfs* de *M. circinelloides*. M: marcador de peso molecular de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix. **A)** En el carril 2) el fragmento recombinante rfsRP (~4kb) formado por el gen de selección *pyrG* flanqueado por las regiones 5' y 3' del gen *rfs*. **B)** El fragmento recombinante rfsRL (~6kb) formado por el gen de selección *leuA* flanqueado por las regiones 5' y 3' del gen *rfs*.

6.3 Transformación de *M. circinelloides* con los fragmentos recombinantes rfsR.

Para determinar la función de los genes *rfs* en la virulencia de *M. circinelloides*, se generó la mutante en dicho gen en la cepa MU402 mediante reemplazamiento del ORF del gen a interrumpir por el gen de selección *pyrG*. Se realizaron las transformaciones como se describe en materiales y métodos con los fragmentos de recombinación del gen *rfs*. Se obtuvieron 8 transformantes, los transformantes de *M. circinelloides* en el primer pase de selección son generalmente heterocarióntes (presencia de núcleos silvestres y mutantes en la misma célula), ya que el ADN exógeno (fragmentos recombinantes) no se integra en todos los núcleos. Para la obtención de las transformantes fue necesario realizar varios

ciclos de esporulación (5 ciclos, cada uno de 10 días de duración en promedio) en medio selectivo, esto para favorecer el enriquecimiento de los núcleos transformados. Tras los ciclos de esporulación en medio MMC sin uracilo, sin embargo tras el análisis molecular se observó que la integración del fragmento recombinante no había sustituido al gen *rfs*. Por lo tanto no se obtuvieron transformantes para el gen *rfs* en la cepa MU402.

6.3.1 Confirmación molecular de la mutante sencilla en el gen *rfs* de *M. circinelloides* mediante PCR.

Después de la selección de las presuntas mutantes, se procedió al análisis molecular de las mismas con la finalidad de corroborar la delección del gen *rfs* en la cepa MU402 de *M. circinelloides*. En este análisis fue necesario la extracción de ADN genómico de las presuntas cepas mutantes. Para la confirmación de la mutación en el gen *rfs*, se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *rfs* CR 5'FWR y *rfs* CR 3'REV (tabla 4), el oligonucleótido directo hibrida rio arriba excluyendo el fragmento de recombinación del gen *rfs*, y el oligonucleótido reverso hibrida rio abajo excluyendo el fragmento de recombinación. Por lo tanto una banda de amplificación positiva de 4.2 kb indicaría que el gen *pyrG* se ha integrado al genoma suplantando al ORF del gen *rfs* (**Figura 26**), y por consecuencia la presencia de la mutación esperada. Sin embargo el tamaño de la banda obtenida no correspondía a la esperada.

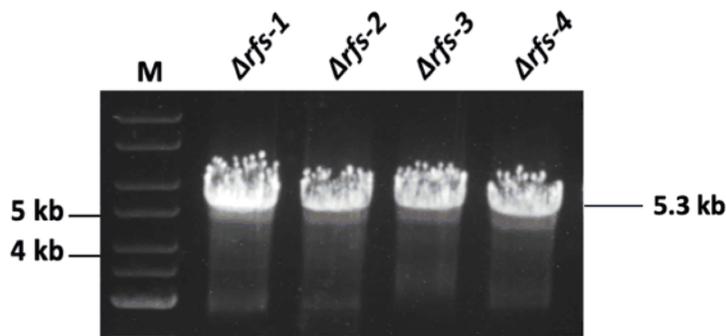


Figura 26. Confirmación molecular mediante PCR de la cepa mutante en el gen *rfs* de la cepa MU402 de *M. circinelloides*. Se muestra el corrimiento electroforético M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; carril 2, 3, 4 y 5). La banda que se muestra no es del tamaño esperado a la integración del marcador *pyrG* en el locus del gen *rfs* (4.2 kb).

6.3.2 Construcción del fragmento de recombinación para interrumpir el gen que codifica a la proteína Rfs en la mutante $\Delta arl1^{+(-)}$ de *M. circinelloides*.

Siguiendo la metodología explicada para la construcción del fragmento recombinante para la interrupción del gen *rfs* en la mutante sencilla en MU402, se realizó la interrupción del gen *rfs* de *M. circinelloides* en el fondo genético de la mutante $\Delta arl1^{+(-)}$, el fragmento recombinante se obtuvo mediante la estrategia de PCR en fusión, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se amplificó aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción y una región de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *rfs*, y por otra parte se amplificó al gen *leuA* (3.3 kb). (**Figura 24C**). Los productos de PCR se corroboraron en un gel de agarosa al 1 %, y cada uno de los fragmentos de ADN se purificaron y se cuantificó su concentración. Los tres fragmentos correspondientes a la región 5' del gen *rfs*, la región 3' del gen *rfs* y el gen marcador, se utilizaron como templado para el último paso, la PCR en fusión. El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se purificó recortando únicamente la banda correspondiente al tamaño esperado de la fusión de los tres fragmentos, es decir el fragmento recombinante de aproximadamente 6 kb para rfsRL (**Figura 26B**).

6.3.3 Confirmación molecular de la doble mutante en el gen *rfs* de la cepa mutante $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de *M. circinelloides* mediante PCR.

La confirmación molecular de las presuntas mutantes se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos mediante la extracción de ADN genómico. Para la confirmación de la mutación en el gen *rfs*, se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos *rfs* CR 5'FWR y *leuA3* (Tabla 4), el oligonucleótido directo hibrida río arriba excluyendo el fragmento de recombinación del gen *rfs*, y el oligonucleótido reverso hibrida río abajo en el inicio del marcador de selección *leuA* (Figura 26A). Por lo tanto una banda de amplificación positiva de 1.8 kb indicaría que el gen *leuA* se ha integrado al genoma suplantando al ORF del gen *rfs* (Figura 26A) y por consecuencia la presencia de la mutación esperada; por otra parte la presencia de una única banda demostraría una mutante homocariote, mientras que la presencia de una banda adicional de 1.3 referente al locus silvestre demostraría una mutante heterocariote. Por lo que al menos 2 clonas son mutantes homocariontes ($\Delta arl1^{(+)(-)} / \Delta rfs$) (Figura 26B).

6.3.4 Función de Rfs en la virulencia de la cepa $\Delta arl1^{(+)(-)}$ de *M. circinelloides*

Con la finalidad de llevar a cabo la demostración de la función de Rfs en la virulencia de la cepa $\Delta arl1^{(+)(-)}$, se procedió a crecer la cepa doble mutante $\Delta arl1^{(+)(-)} / \Delta rfs$ y su cepa parental $\Delta arl1^{(+)(-)}$, así como también la cepa silvestre MU636, posteriormente se separó por filtración el SS para usarlo en los ensayos de virulencia. Se observó que la cepa $\Delta arl1^{(+)(-)}$ fue la que generó una mayor virulencia con un 43% de sobrevivencia de los nematodos a las 72 horas del ensayo, mientras que la cepa silvestre se mostró totalmente avirulenta en el ensayo, y la cepa doble mutante $\Delta arl1^{(+)(-)} / \Delta rfs$ generó un 78% de sobrevivencia (Figura 27).

Estos datos indican que la mutación de *rfs* en la cepa mutante $\Delta arl1^{(+)(-)}$ disminuyó significativamente la virulencia en la cepa parental, sugiriendo fuertemente que el sideróforo rizoferrina es un factor de virulencia secretado por la cepa $\Delta arl1^{(+)(-)}$.

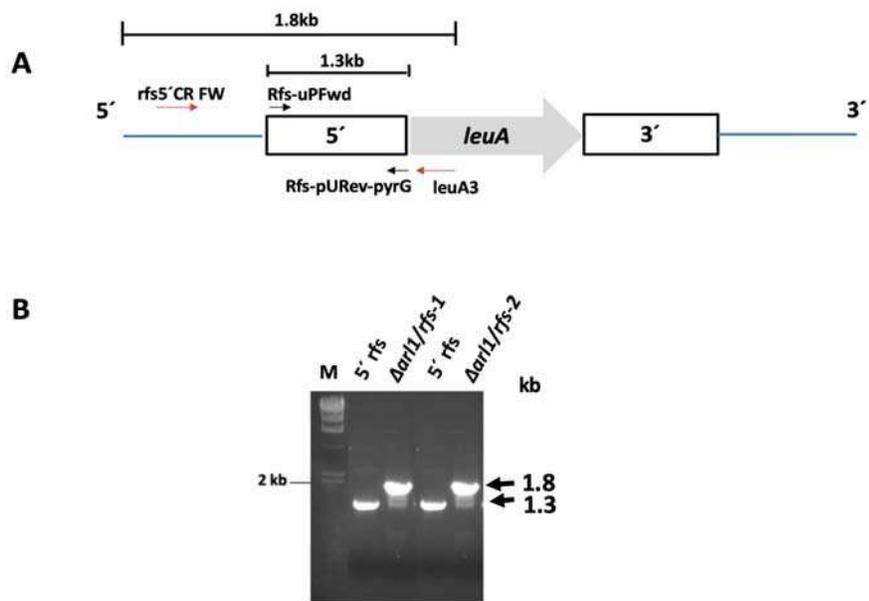


Figura 27. Confirmación molecular de la doble mutante en el gen *rfs* de la cepa mutante $\Delta arl1^{+(-)}$ de *M. circinelloides* mediante PCR.

A) Muestra las reacciones de PCR para la obtención de la cepa doble mutante ($\Delta arl1^{+(-)}/\Delta rfs$), el fragmento de 1.8kb indica la presencia de la mutación en el gen *rfs*, mientras que la amplificación de 1.3kb es positiva para la cepa silvestre y mutante dado que los oligonucleótidos directo y reverso están ubicados en la región 5' presentes en ambos fondos genéticos.

B) Se muestra el corrimiento electroforético M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; carril 1 y 3 : amplificación de ADN genómico de la cepa silvestre $\Delta arl1$, carril 2 y 4: Muestra la banda correspondiente a la integración del marcador *leuA* en el locus del gen *rfs* (1.8kb).

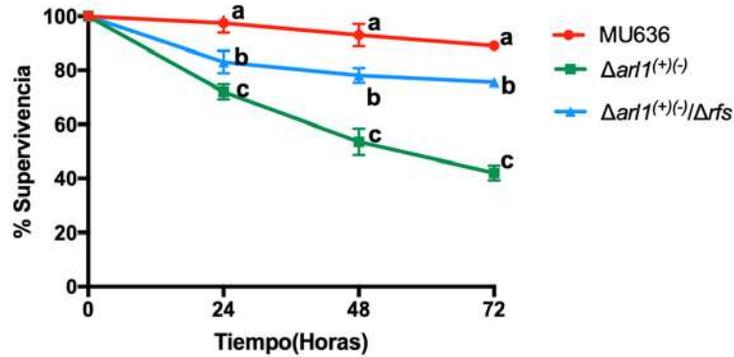


Figura 28. Función de Rfs en la virulencia de la cepa $\Delta arf1^{(+/-)}$ de *M. circinelloides*. Cultivos aerobios fueron crecidos durante 48 horas en medio YNB, los SS de cultivo se obtuvieron mediante filtración en condiciones estériles. Los nematodos fueron retados mediante su colocación en dichos SS y posteriormente se evaluó el % de supervivencia de *C. elegans* frente a los SS cuantificándose el porcentaje de supervivencia hasta las 72 horas. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. n= 4 Fisher, p<0.05. Las barras que comparten la misma letra no son estadísticamente significativas.

6.3.5 Construcción del fragmento de recombinación para interrumpir el gen que codifica a la proteína Rfs en la mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*.

Siguiendo la metodología explicada para la construcción del fragmento recombinante para la interrupción del gen *rfs* en la mutante sencilla en MU402, se realizó la interrupción del gen *rfs* de *M. circinelloides* en el fondo genético de la mutante $\Delta arf3$, el fragmento recombinante se obtuvo mediante la estrategia de PCR en fusión, como se describe en la sección de materiales y métodos. Se amplificó aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción y una región de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *rfs*, y por otra parte se amplificó al gen *leuA* (3.3 kb). (**Figura 24C**). Los productos de PCR se corroboraron en un gel de agarosa al 1 %, y cada uno de los fragmentos de ADN se purificaron y se cuantificó su concentración. Los tres fragmentos correspondientes a la región 5' del gen *rfs*, la región 3' del gen *rfs* y el gen marcador, se utilizaron como templado para el último paso, la PCR en fusión. El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y se purificó

recortando únicamente la banda correspondiente al tamaño esperado de la fusión de los tres fragmentos, es decir el fragmento recombinante de aproximadamente 6 kb para rfsRL (Figura 25B).

6.3.6 Confirmación molecular de la doble mutante en el gen *rfs* de la cepa mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides* mediante PCR.

La confirmación molecular de las presuntas mutantes se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos mediante la extracción de ADN genómico. Para la confirmación de la mutación en el gen *rfs*, se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos rfs CR 5'FWR y leuA3 (Tabla 4), el oligonucleótido directo hibrida río arriba excluyendo el fragmento de recombinación del gen *rfs*, y el oligonucleótido reverso hibrida río abajo en el inicio del marcador de selección leuA. Por lo tanto una banda de amplificación positiva de 1.8 kb indicaría que el gen *leuA* se ha integrado al genoma suplantando al ORF del gen *rfs* y por consecuencia la presencia de la mutación esperada (Figura 28A). Por lo que al menos 2 clonas son mutantes homocariontes ($\Delta arf3/\Delta rfs$) (Figura 28B).

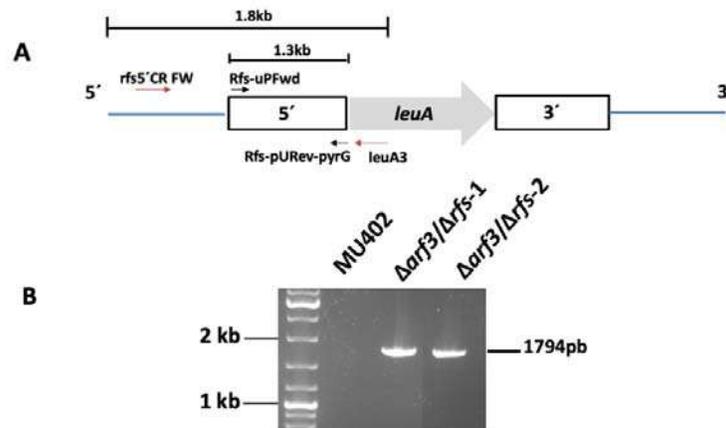


Figura 28. Confirmación molecular de la doble mutante en el gen *rfs* de la cepa mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides* mediante PCR. A) Muestra las reacciones de PCR para la obtención de la cepa doble mutante ($\Delta arf3/\Delta rfs$), el fragmento de 1.8kb indica la presencia de la mutación en el gen *rfs*.

B) Se muestra el corrimiento electroforético M: Marcador de tamaño de ADN GeneRuler DNA Ladder Mix; carril 1: amplificación de ADN genómico de la cepa silvete $\Delta arf3$, carril 2 y 3: Muestra la banda correspondiente a la integración del marcador *leuA* en el locus del gen *rfs* (1.8kb).

7. Discusión

M. circinelloides es un hongo dimórfico y patógeno oportunista (McIntyre y col., 2002; Lee y col., 2013) causante de la mucormicosis una rara pero mortal infección a la cual son susceptibles pacientes inmunosuprimidos (Chayakulkeeree., y col 2006). En este hongo se han descrito 4 genes que codifican a 4 distintas proteínas Arf (Arf1-4) y 2 genes que codifican a proteínas Arl (Arf like). Los Arf (ADP-ribosylation factor) son reguladores clave del proceso de tráfico vesicular y están asociados con el crecimiento y la virulencia en los hongos (Labbaoui y col., 2017; Patiño-Medina y col., 2018; Patiño-Medina y col, 2019). Se conoce que Arf3 y Arf4 poseen un 89% de identidad entre ellas y ambos comparten funciones similares durante el crecimiento aerobio, sin embargo la delección de *arf3* genera mayor virulencia en *C. elegans* através de moléculas secretadas al sobrenadante de cultivo (SS) (Patiño-Medina., 2018). Por otra parte, las proteínas Arl1 y Arl2 tienen un 54.40 y 78.57 % de identidad y similitud entre ellas, respectivamente, con funciones distintas en terminos de morfología y virulencia, siendo Arl1 quien tiene una función virulenta, a través de la secreción de moléculas al exterior celular (Patiño-Medina y col., 2019).

En este trabajo sugerimos que la delección de los genes *arf3* y *arl1*^(+/-) en *M. circinelloides* genera una desregulación de la exocitosis de alguna molécula, probablemente involucrando vesículas ya sea que conduzca directamente a la molécula secretada o através de cambios en la composición de ciertos organelos, lo que genera una secreción de moléculas al medio extracelular. El medio extracelular, es decir el SS de ambas cepas resultó generar un aumento de la actividad virulenta contra *C. elegans*, encontrándose que los SS de cultivo de las cepas mutantes en *arf3* y *arl1*^(+/-) son 50 % y 40% más virulentos respectivamente,

respecto al SS de la cepa silvestre. En las condiciones ensayadas el o los factores de virulencia secretados al menos en la mutante $\Deltaarf3$ no aumentó significativamente su presencia, medida con base a la virulencia generada contra el nematodo, en función del tiempo de crecimiento de las esporas en el medio.

La caracterización de la(s) molécula(s) con capacidad tóxica presentes en el SS de las cepas mutantes $\Deltaarf3$ y $\Deltaarl1^{(+/-)}$, reveló una susceptibilidad a la acción de la proteinasa K, es decir dichas moléculas tóxicas están relacionadas con una estructura proteica; ya que la exposición de los SS de las cepas mutantes $\Deltaarf3$ y $\Deltaarl1^{(+/-)}$ a la acción proteolítica generó un 100 % de supervivencia del nematodo. Es posible sugerir la presencia de proteínas con capacidad virulenta secretadas por ambas mutantes de *M. circinelloides*, ya que se ha descrito que los hongos secretan una plétora de hidrolasas, las cuales pueden tener una función importante en el daño celular (**Ghannoum, 2000**). Sin embargo, el análisis de la determinación de peso molecular a través de membranas de exclusión molecular ubica el rango igual o menor a 3,000 Da de la(s) molécula(s) con actividad virulenta, lo cual en teoría dejaría el margen a un péptido de 25-30 aminoácidos aproximadamente (considerando un PM de 110 Da por aminoácido), siempre y cuando se tratara de una molécula de naturaleza protéica. Datos obtenidos mediante análisis tipo MALDI reveló la presencia de moléculas inferior a un PM 1,000 Da en las fracciones provenientes de la cepa mutante $\Deltaarf3$ de *M. circinelloides*. Lo que sugiere que pudiese tratar de un péptido menor a 10 aminoácidos con actividad virulenta (**Flaherty y col., 2014**). Otra posibilidad sugerida por el rango de PM de las moléculas con actividad virulenta de la mutante $\Deltaarf3$, podrían ser moléculas de tipo sideróforo como los descritos en el Mucoral *R. delemar* (**Carrol y co., 2017**). Los sideróforos en general tienen pesos moleculares oscilan entre 500-1,500 Da, además se ha descrito que algunos sideróforos muestran una actividad virulenta (**Wilson, y col., 2016**). Como en los hongos *Aspergillus*, *Candida* y *Cryptococcus* los cuales explotan el mecanismo de unión de hierro mediado por sideróforos, ya sea para su supervivencia, virulencia, propagación o resistencia al estrés oxidativo generado *in vivo* durante la infección (**Hass y col., 2008; Balhara y col., 2016**). Al igual que *R. delemar*,

M. circinelloides es capaz de secretar al sideróforo rizoferrina (**Carrol y col., 2017**) y dicha molécula pudiera estar teniendo un papel en la virulencia. Cabe hacer mención que la estructura de la rizoferrina muestra enlaces de tipo peptídico lo cual sugiere la posible susceptibilidad a la acción proteolítica (**Figura 3**), sin embargo esto no está aun demostrado.

Cuando las esporas de *M. circinelloides* fueron crecidas en medio cromoazurolo para evidenciar la capacidad de secreción del sideróforo al medio extracelular (**Himpsl y col., 2019**), se logró evidenciar la secreción de moléculas de este tipo principalmente en la cepa mutante *arf3*. La rizoferrina es un sideróforo común que es sintetizado por hongos Mucorales y Entomoftorales (**Thieken y Winkelmann., 1992**). La síntesis de la rizoferrina requiere la actividad de la enzima Rfs, la cual usando como sustratos al citrato y la putrecina sintetiza la rizoferrina. En este trabajo se sugiere que las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$ secretan en mayor cantidad rizoferrina al medio de cultivo, esto debido a que la cuantificación de transcrito del gen *rfs* reveló una mayor acumulación en las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$ en comparación con la cepa WT, tanto en cultivos suplementados o no con Fe^{+2} . En un contexto patogénico, los microbios secretan sideróforos para adquirir y solubilizar el hierro férrico del huésped aumentando no solo su crecimiento, sino además de cambios estructurales como la formación de biopelículas en ciertas bacterias evitando la fagocitosis y aumentando la virulencia (**Wilson, y col., 2016**). Además, no solamente se evidenció la mayor acumulación del transcrito de *rfs* en las cepas $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$ (además de $\Delta arf1$) *in vitro*, si no también *in vivo*, ya que la infección de ratones y la cuantificación del ARNm de *rfs* en hígados de dichos animales infectados con las distintas cepas reveló una mayor acumulación de ARNm en tejidos de animales infectados con las distintas mutantes, siendo mayor la acumulación en los tejidos infectados con la mutante $\Delta arf3$ respecto a la cepa WT. Estos datos sugieren que existe una mayor síntesis de rizoferrina por parte de las mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$ durante el evento de infección en ratones. Recientemente en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el transcrito de *rfs* se incrementa durante el crecimiento de la cepa WT de *M. circinelloides* en presencia de suero sanguíneo (**comunicación personal de Valle-Maldonado,**

datos sin publicar), sugiriendo que el producto del gen *rfs* tiene un papel importante durante la infección en mamíferos por parte de la cepa WT de *M. circinelloides*.

Nuestros datos además indican una disfunción del metabolismo oxidativo en las cepas $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$ ya que al crecerlas en fuentes de carbono no fermentables mostraron un menor crecimiento en comparación con la cepa WT (**Figura 25 y Patiño-Medina y col., en revisión**). Esto es importante hacer mención ya que la biosíntesis de rizoferrina involucra sustratos provenientes de un metabolismo mitocondrial como es el ácido cítrico proveniente del ciclo de Krebs y la putrecina (**Carrol y col., 2017**), una vía de síntesis de la putrecina es a través de la ornitina, la cual es producida en la mitocondria (**Davis, 1986**). La cuantificación del ADN mitocondrial en la mutante *arf3* es similar a la cepa silvestre (**Figura 23**). Sin embargo, esta mutante muestra una menor capacidad de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, sugiriendo que el número de mitocondrias no disminuye, quizás existe una alteración en el metabolismo mitocondrial en esta cepa. Mientras que en la cepa $\Delta arl1^{(+/-)}$ se demostró una disminución considerable de las mitocondrias cuantificadas por qPCR usando un gen mitocondrial, *atp9* que codifica a una subunidad de la ATPasa (**Patiño-Medina y col., en revisión**). En general estos datos indican que ambas cepas mutantes $\Delta arf3$ y $\Delta arl1^{(+/-)}$, tienen posiblemente alteraciones en el metabolismo oxidativo que incluye alteraciones en el contenido y/o metabolismo mitocondrial que repercuten en el metabolismo oxidativo. Dado a que el metabolismo del hierro está implicado principalmente en reacciones de óxido reducción, siendo crucial en la respiración, estrés oxidativo entre otros procesos (**Beckmann y col., 2013**). Por lo tanto no sería de extrañar que la síntesis de un sideróforo como la rizoferrina dependa de un metabolismo oxidativo adecuado.

Por otra parte, al menos para la mutante $\Delta arf3$ el SS proveniente de levaduras no es virulento en comparación del SS que proviene de micelio. Estos datos sugieren que el metabolismo de la rizoferrina depende totalmente de un metabolismo oxidativo, aunque aún no contamos con esta certeza, para lo cual sería interesante medir los niveles de RNAm del gen *rfs* y de la rizoferrina en levaduras y micelio de

las cepas $\Delta arf3$, $\Delta arl1^{(+/-)}$ y WT. Para con lo cual definir que la acumulación del transcrito de *rfs* y del sideróforo ocurre principalmente en el crecimiento micelial.

Además, la administración a ratones por vía intraperitoneal de la fracción de 3 kDa de los SS provenientes de las distintas cepas, demostró una mayor acumulación de RNAm de interleucina IL-6 en los tejidos de ratones inoculados con dichas fracciones de las mutantes $\Delta arf3$ o $\Delta arl1^{(+/-)}$, mostrando una acumulación 5 o 4 veces más en contraste con la cepa WT, respectivamente. La citosina IL-6 es producida por monocitos y macrófagos, y su síntesis o elevación se usa comúnmente para evaluar la presencia de inflamación (**Tanaka y col; 2016; Del Giudice M y Gangestad SW; 2018**). Esto nuevamente sugiere, que existen moléculas en mayor concentración en las fracciones de 3 kDa de las cepas mutantes $\Delta arf3$ o $arl1^{(+/-)}$ las cuales tienen capacidad de generar inflamación. Sin duda, son una infinidad de moléculas presentes en el rango de 1,000 Da o menos presentes en la fracción de 3 kDa que podrían estar generando el proceso de inflamación; sin embargo, los sideroforos pudieran estar involucrados en dicho proceso inflamatorio. Por ejemplo, usando un modelo murino de neumonía, se describió que la secreción de sideróforos por *Klebsiella pneumoniae* indujo la secreción de IL-6, así como la diseminación bacteriana en el bazo, en comparación con cepas mutantes en la síntesis de sideróforos (**Holden y col., 2016**).

Con la intención de conocer si la rizoferina tenía un papel en la virulencia de las mutantes *arf3* y *arl1^{(+/-)}* de *M. circinelloides* se llevó a cabo la interrupción del gen *rfs* en dichos fondos genéticos. La mutación del gen *rfs* en la cepa mutante *arl1^{(+/-)}* mostró una menor virulencia de los SS de cultivos de la doble mutante en ensayos frente al nematodo, en comparación con la cepa parental *arl1^{(+/-)}* (**Figura 27**). Cabe hacer mención que los niveles de virulencia no son similares a la cepa WT (**Figura 27**), la cual es prácticamente avirulenta en nuestras condiciones, sugiriendo que otro (s) factores de virulencia desconocidos en la mutante *arl1^{(+/-)}*. Estos datos indican que la biosíntesis de la rizoferina tiene una función importante en la virulencia en la mutante *arl1^{(+/-)}*. A la fecha de entrega de este borrador de tesis aun estamos en la selección de presuntas mutantes en el gen *rfs*

en los fondos genéticos WT y $\Delta arf3$, con lo cual será interesante demostrar la función de este sideróforo en ambos fondos genéticos de *M. circinelloides*. Si la rizoferrina tiene un papel importante en la virulencia de la mutante *arl1*^(+/-) de *M. circinelloides*, esto quiere decir que la cepa WT tiene el potencial de aumentar la síntesis y secreción de rizoferrina en ciertas condiciones fisiológicas, como lo revelado en la presencia de suero sanguíneo que aumenta la acumulación del transcrito de *rfs* en la cepa WT (**Valle-Maldonado, y col. Datos sin publicar**). Además, en este contexto, se cultivo a *M. circinelloides* en medios de cultivo alterando las concentraciones de nitrógeno (sulfato de amonio) o de carbono (glucosa). Los resultados indican que el SS de la cepa WT crecida en concentraciones menores al 2% de glucosa, la cual es la concentración estándar de cultivo, condujo a un aumento en la virulencia de estos SS obtenidos cuando *M. circinelloides* fue crecida en 0.5% de glucosa (**Herrejon, Tesis de Licenciatura en proceso**). Actualmente, se esta investigando si estas condiciones de crecimiento con bajas concentraciones de glucosa conduce al aumento de la acumulacion del ARNm del gen *rfs* en *M. circinelloides* sugiriendo un aumento el producción de rizoferrina. Aunque la producción de sideróforos se logra principalmente por la deficiencia de hierro, otros factores como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el pH y la temperatura son esenciales para la síntesis de sideróforos, como en el caso de la cepa de *Bacillus sp.* PZ-1 se demostró variando las concentraciones de glucosa, pH y $Pb(NO_3)_2$ estimularon el crecimiento de la producción del siderofofo en este microorganismo (**Yu y col., 2017**).

La absorción de hierro se ha descrito como un factor limitante que determina la virulencia en otras infecciones por hongos, así como la mucormicosis, ya que la disponibilidad sérica de hierro predispone al huésped a sufrir esta infección (**Navarro-Mendoza., 2018**). Un mecanismo de captación de hierro se lleva a cabo mediante la síntesis de sideróforos proceso que se promueve con el crecimiento del micoorganismo en condiciones con bajas concentraciones de hierro. Los sideróforos son moléculas quelantes de hierro y todos los hongos producen sideróforos de hidroxamato excepto los Mucorales que secretan rizoferrina, un

sideróforo de policarboxilato (**Carrol y col; 2017**). Sin embargo, las características de virulencia de este patógeno no se han dilucidado completamente. Por lo cual en este trabajo se identificó a una molécula (rizoferrina) que funge como factor de virulencia, y que es secretada al medio extracelular por la cepa mutante en el gen *arl1^(+/-)* de *M.circinelloides*.

8. CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra que la biosíntesis de la rizoferrina tiene un papel importante en la virulencia de la mutante *arl1^(+/-)* de *M. circinelloides*. Indicando que en esta mutante ocurre una desregulación positiva en la transcripción del gen *rfs* involucrado en la biosíntesis de este sideróforo, lo cual conduce a un aumento de la virulencia. Este estudio tiene la relevancia de ubicar a la rizoferrina como un blanco farmacológico para bloquear su síntesis o función durante la infección de Mucorales, no solo a *M. circinelloides*.

9. REFERENCIAS

1. Álvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill A, W Stchigel A, Rinaldi MG, Guarro J. (2009). Spectrum of Zygomycete Species Identified in Clinically Significant Specimens in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 47(6):1650-1656.
2. Azmi K, Patrika S, Amrita S. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator- Siderophore: A review. *Microbiological Research* 212-213: 103-111
3. Balhara M, Chaudhary R, Ruhil S, Singh B, Dahiya N, Parmar VS, Jaiwal PK, Chhillar AK. (2016). Siderophores; iron scavengers: the novel & promising targets for pathogen specific antifungal therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 20(12):1477-1489.

4. Beckmann N, Schafferer L, Schrettl M, Binder U, Talasz H, Lindner H, Haas H. (2013). Characterization of the Link between Ornithine, Arginine, Polyamine and Siderophore Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 8(6):e67426.
5. Bartnicki-Garcia S, Nickerson WJ. (1962). Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal Bacteriology*. 84:841-858.
6. Bonifacino J.S, Glick BS. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116(2):153-166.
7. Carpenter G, Cohen S. 125I-labeled human epidermal growth factor. (1976). Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *Journal of Cell Biology*. 71(1):159-171.
8. Carpentier JL, Rees AR, Gregoriou M, Kris R, Schlessinger J, Orci L. (2008). Subcellular distribution of the external and internal domains of the EGF receptor in A-431 cells. *Experimental Cell Research*. 166(2):312-26.
9. Carroll S. C, Grieve CL, Murugathasan I, Bennet AJ, Czekster CM, Liu H, Naismith, Moore MM. (2017). The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of NIS gene Family. *International Journal Biochemical Cell Biology*. 89:136-146.
10. Casadevall A, Pirofski LA. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and immunity*. 67 (8):3703-3713.
11. Casadevall A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal biology reviews*. 21(4):130-132.
12. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 25(4):215-229.
13. Chayakulkeeree M, Sorrell T. C, Siafakas AR, Wilson CF, Pantarat N, Gerik K, Boadle R, Djordjevic JT. (2008). Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*. 69(4):809-826.
14. Chen YT, Wang IH, Wang YH, Chiu WY, Hu JH, Chen WH, Lee FS. (2019). Action of Arl1 GTPase and golgin Imh1 in Ypt6-independent retrograde

- transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Molecular Biology Cell* 30(8):1008-1019.
15. Clarke PR, Zhang C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9(6):464–477.
 16. Corrochano LM, Kuo A, Marcet-Houben M, Polaino S, Salamov A, Villalobos-Escobedo JM, Grimwood J, Álvarez MI, Avalos J, Bauer D, Benito EP, Benoit I, Burger G, Camino LP, Cánovas D, Cerdá-Olmedo E, Cheng JF, Domínguez A, Eliáš M, Eslava AP, Glaser F, Gutiérrez G, Heitman J, Henrissat B, Iturriaga EA, Lang BF, Lavín JL, Lee SC, Li W, Lindquist E, López-García S, Luque EM, Marcos AT, Martin J, McCluskey K, Medina HR, Miralles-Durán A, Miyazaki A, Muñoz-Torres E, Oguiza JA, Ohm RA, Olmedo M, Orejas M, Ortiz-Castellanos L, Pisabarro AG, Rodríguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Ruiz-Vázquez R, Sanz C, Schackwitz W, Shahriari M, Shelest E, Silva-Franco F, Soanes D, Syed K, Tagua VG, Talbot NJ, Thon MR, Tice H, de Vries RP, Wiebenga A, Yadav JS, Braun EL, Baker SE, Garre V, Schmutz J, Horwitz BA, Torres-Martínez S, Idnurm A, Herrera-Estrella A, Gabaldón T, Grigoriev IV. (2016). Expansion of Signal Transduction Pathways in Fungi by Extensive Genome Duplication. *Current Biology*. 26(12):1577-1584.
 17. Dannaoui E, Lackner M. (2009). Special Issue: Mucorales and Mucormycosis. *Journal of Fungi (Basel)*. 6(1):6.
 18. Davis RH (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Review* 50(3): 280–313.
 19. De Groot, P. W, Bader O, De Boer AD, Weig M, Chauhan N. (2013). Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell*. 12(4):470-481.
 20. Díaz-Pérez SP, Patiño-Medina JA, Valle-Maldonado MI, López-Torres A, Jacome-Galarza IE, Anaya Martínez V, Gómez Ruíz V, Campos-García J, Nuñez-Anita RE, Ortiz-Alvarado R, Ramírez-Díaz MI, Gutiérrez-Corona JF, Meza-Carmen V. (2019). Alteration of fermentative metabolism enhances *Mucor circinelloides* virulence. *Infection and Immunity*. 88(2):e00434-19.

21. East MP, Kahn RA. (2011). Models for the functions of Arf GAPs. *Seminars in cell & developmental biology*. 22(1):3–9.
22. Eden ER, White IJ, Futter CE. (2009). Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. *Biochemical Society Transactions*. (Pt 1):173-177.
23. Epp E, Vanier G, Harcus D, Lee AY, Jansen G, Hallett M, Sheppard DC, Thomas DY, Munro CA, Mullick A, Whiteway M. (2010). Reverse genetics in *Candida albicans* predicts ARF cycling is essential for drug resistance and virulence. *PLoS Pathogens*. 6(2):e1000753.
24. Fiedler MRM, Cairns TC, Koch O, Kubisch C, Meyer V. (2018). Conditional Expression of the Small GTPase ArfA Impacts Secretion, Morphology, Growth, and Actin Ring Position in *Aspergillus niger*. *Frontier Microbiology*. 9:878
25. Findlay GH, Vismer HF, Dreyer L. (1984). Studies on sporotrichosis. Pathogenicity and morphogenesis in the Transvaal strains of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 87(1-2):85-93.
26. Flaherty RA, Freed SD, Lee SW. (2014). The wide world of ribosomally encoded bacterial peptides. *PLoS Pathogens*. 10(7):e1004221.
27. Ghannoum MA. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Review*. 13(1):122-143.
28. Groux-Degroote S, Schulz C, Cogez V, Noël M, Portier L, Vicogne D, Solorzano C, Dall'Olio F, Steenackers A, Mortuaire M, Gonzalez-Pisfil M, Henry M, Foulquier F, Héliot L, Harduin-Lepers A. (2018). The extended cytoplasmic tail of the human B4GALNT2 is critical for its Golgi targeting and post-Golgi sorting. *FEBS Journal*. 285(18):3442-3463.
29. Gutiérrez A, López-García, Garre V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods*. 84(3):442-446.
30. Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*. 46:149-87.
31. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny

- PB, Mclaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman C. P, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V. Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio P, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner, WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*. 111(5):509-547.
32. Hider RC, Kong X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Products Report*. 27(5):637-657.
33. Hogan LH, Klein, Levitz SM. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clinical microbiology reviews*. 9(4):469-488.
34. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. *mBio*. 7(5):e01397-16
35. Hollmann M, Razzazi-Fazeli, E Grajewski. (2008). Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. *Mycotoxin Research*. 24(3):140-150.
36. Ibrahim AS, Gebremariam T, Lin L, Luo G, Hussein MI, Skory CD, Fu Y, French SW, Edwards JE Jr, Spellberg B. (2010). The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Molecular Microbiology*. 77:587-604.
37. Ibrahim, AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. (2012). Pathogenesis of mucormycosis. *Clinical infectious diseases*. 54(suppl 1): S16-S22.
38. Ji Z, Mingjie Y, Alexander-Floyd J, Gidalevitz T. (2019). HSP-4/BiP expression in secretory cells is regulated by a developmental program and not by the unfolded protein response. *PLOS Biology*. 17(3): e3000196.

39. Johnson KF, Kornfeld S. (1992). The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *Journal Cell Biology*. 119(2):249-257.
40. Klein BS, Tebbets B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology*. 10(4), 314-319.
41. Kontoyiannis DP, Lewis RE, Lortholary O, Spellberg B, Petrikos G, Roilides E, Ibrahim A, Walsh TJ. (2012) Future directions in mucormycosis research. *Clinical Infection Diseases*. 54(suppl 1):S79-S85.
42. Krebs S, Farrona S, Frazer L, Engelhorn J, Adrian J, Dong X, Goodrich J, Turck F. (2011). Tissue-Specific Expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis Is Maintained Independently of Polycomb Group Protein Repression. *The Plant Cell*. 23(9):3204-3214.
43. 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.
44. Labbaoui H, Bogliolo S, Ghugtyal V, Solis NV, Filler SG, Arkowitz RA, Bassilana M. (2017). Role of Arf GTPases in fungal morphogenesis and virulence. *PLoS Pathog*. 13(2):e1006205.
45. Lee FJ, Stevens LA, Kao YL, Moss J, Vaughan M. (1994). Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 269(33):20931-20937.
46. Lee SC, Heitman J. (2014). Sex in the Mucoralean Fungi. *Mycoses*. 57(s3):18-24.
47. Lee SC, Schmitdtke SN, Dangott LJ, Shaw BD. (2008). *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukariotic Cell*. 7(8):1278-88.
48. Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. (2013). Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*. 9(9):e1003625.

49. Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martinez SR, Heitman J, Lee SC. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*. 7(6): e1002086.
50. Liu M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, Edwards JE Jr, Filler SG, Ibrahim AS. (2010). The endothelial cell receptor GRP78 is required for Mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *Journal Clinical Investigation*. 120:1914-1924.
51. Lübbehüsen TL, 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.
52. Ludolph AC, Ludolph AG. (1991). Nitropropionic acid-abundant xenobiotic exitocin linked to putaminal necrosis and tardive dystonia. *Neurology*. 30:(252e253).
53. McIntyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J. (2002). Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (*syn. racemosus*) during submerged batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58(4):495-502.
54. Meza-Carmen V, Pacheco-Rodriguez G, Kang GS, Kato J, Donati C, Zhang CY, Vichi A, Payne DM, El-Chemaly S, Stylianou M, Moss J, Vaughan M. (2011). Regulation of growth factor receptor degradation by ADP-ribosylation factor domain protein (ARD)1. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. 108(26):10454-10459.
55. Mimoto A, Fujii M, Usami M, Shimamura M, Hirabayashi N, Kaneko T, Sasagawa N, Ishiura S. (2007). Identification of an estrogenic hormone receptor in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 364(4):883-888.
56. Mora MH. (2019). A perspective on the role of proteins and peptides in the virulence and pathogenesis. *Current Protein & Peptide Science*. 20(10):960-961.
57. Morin S S, Nodet P, Coton E, Jany JL. (2017). Dataset of differentially accumulated proteins in *Mucor* strains representative of four species grown on

- synthetic potato dextrose agar medium and a cheese mimicking medium. *Data Brief*. 11:214–220.
58. Morin-Sardin, Nodet P, Coton E, Jany J-L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*. 31:12-32.
59. Moss J, Vaughan M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *Journal of Biology Chemistry*. 270:12327-12330.
60. Navarro-Mendoza M. I, Pérez-Arques C, Murcia L, Lax C, Sanchis Capilla J, Francisco E, Garre V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific Reports*. 8(1):7660
61. Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Panchal S, Francisco E, Stephen JM, Ganguly P, Pangilinan J, Igor V, Heitman JG, Sanyal K, Garre V. (2018). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology*. 29: 3791–3802
62. Nemecek JC, Wüthrich M, Bruce S, Klein BS. (2006). Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. *Science*. 312(5773):583-588
63. Orłowski M. (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiological reviews*. 55(2):234-258.
64. Patiño-Medina JA, Maldonado-Herrera G, Pérez-Arques C, Alejandro-Castañeda V, Reyes-Mares NY, Valle-Maldonado MI, Campos-García J, Ortiz-Alvarado R, Jácome-Galarza IE, Garre V, Meza-Carmen V. (2018). Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current Genetic*. 64(4):853-869.
65. Patiño-Medina JA, Valle-Maldonado MI, Maldonado-Herrera G, Pérez Arques C, Jácome-Galarza IE, Díaz Pérez, Díaz Pérez AL, Araiza-Cervantes CA, Villagomez-Castro JC, Campos-García J, Ramirez-Díaz MI, Garre V, Meza-Carmen V. (2019). Role of Arf-like (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility Papel de las proteínas similares a Arf

- (Arl1 y Arl2) de *Mucor circinelloides* en la virulencia y la susceptibilidad antifúngica. *Fungal Genetics and Biology*. 129:40-51.
66. Patiño-Medina JA, Vargas-Tejeda D, Valle-Maldonado MI, Alejandre-Castañeda V, Jácome Galarza IE, Villegas Moreno J, Núñez Anita RE, Ramirez-Días MI, Ortiz Alvarado R, Meza Carmen V. (2019). Sporulation on blood serum increases the virulence of *Mucor circinelloides*. *Microbial Pathogenesis*. 137:103737.
67. Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. (2012). Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clinical Infection Disease*. 54(suppl1): S23-S34.
68. Petrikkos G, Tsioutis C. (2018). Recent Advances in the Pathogenesis of Mucormycoses. *Clinical Therapeutics*. 40(6):894-902.
69. Pfeffer SR. (2009). Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Letters*. 3;583(23):38116.
70. Polak A. (1990). Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses*. 33(5):215-224.
71. Ramana KV, 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.
72. Ramakishanan G, Perez NM, Carrol C, Moore MM, Nakamoto RK, Fox T. (2019). Citryl ornithine is an intermediate in a Three-Step biosynthetic pathway for rhizoferrin in *Francisella*. *ASC Chemical Biology*. 14(8):1760-1766.
73. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Review*. 13(2):236-301.
74. Roncero MIG, Jepsen LP, Strøman P, Van Heeswijck R. (1989). Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*. 84(2):335-343.
75. Rothman JE, Wieland FT. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272(5259):227-234.
76. Skiada A, Lanternier F, Groll A. H, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R. (2013). European Conference on Infections in Leukemia. Diagnosis and treatment of

- mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica*. 98(4):492–504.
77. Spang A. (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Current Opinion Cell Biology*. 21(4):531-536.
78. Spellberg B, Edwards J, Ibrahim A. (2005). Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(3):556-569.
79. Stearns T, Kahn R, Botsteint D, Hoyt. (1990). ADP Ribosylation Factor Is an Essential Protein in *Saccharomyces cerevisiae* and Is Encoded by Two Genes. *Molecular Cellular Biology*. 10(12):6690-6699.
80. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6(10):a016295.
81. Thielen A, Winkelmann G. (1992). Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiology Letters*. 73(1-2):37-41.
82. Van Heeswijk, R, Carlsberg, R. (1984). The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*. 49:597- 609.
83. Van Meel E, Qian Y, Kornfeld SA. (2014). Mislocalization of phosphotransferase as a cause of mucopolidosis III $\alpha\beta$. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 4;111(9):3532-3537.
84. White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*. 98(6): 872-884.
85. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*. 22(3):474-478.

86. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. (2016). Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine*. 22(12):1077-1090.
87. 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), 7243-724.
88. Yu S, Teng C, Bai X, Liang J, Song T, Dong L, Jin Y, Qu J. (2017). Optimization of Siderophore Production by *Bacillus sp.* PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnol.* 27(8):1500-1512.
89. Ze YZ, Eric CC. (2014). Endosome Signaling. *Methods in enzymology*. 535:179-200.
90. Zhang S, Xiu L, Lianwei L, Rui Y, Jialiang H, Haiteng Z, Xiaobo W, Ping W, Zhengguang Z. (2017). The Arf GAP protein Moglo3 regulates the development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Environmental microbiology*. 19(10):3982–3996.
91. Zhang S, Yang L, Li L, Zhong K, Wang W, Liu M, Li Y, Liu X, Yu R, He J, Zhang H, Zheng X, Wang P, Zhang Z. (2019). System-Wide Characterization of MoArf GTPase Family Proteins and Adaptor Protein MoGga1 Involved in the Development and Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *MBio*.10(5):e02398-19.