



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. CMEB

Laboratorio de Diferenciación celular. IIQB

Participación de las subunidades Gpg en el crecimiento micelial de *Mucor circinelloides*

TESIS

Presenta: QFB. David Vargas Tejeda

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Asesor: D.C. Víctor Meza Carmen (IIQB)

Co-Asesor: D.C. Martha Isela Ramírez Díaz (IIQB)

Morelia, Mich. Marzo 2020



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Diferenciación celular. IIQB

Participación de las subunidades Gpg en el crecimiento micelial de *Mucor circinelloides*

Presenta: QFB. David Vargas Tejeda

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Asesor: D.C. Víctor Meza Carmen (IIQB)

Co-Asesor: D.C. Martha Isela Ramírez Díaz (IIQB)

Comité Sinodal

D.C. Rosa Elvira Nuñez Anita (CMEB)

D.C. Alejandro Bravo Patiño (CMEB)

D.C. Gustavo Santoyo Pizano (IIQB)

ÍNDICE

Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
Abreviaturas	v
Prefijos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
1. Introducción	1
1.1. <i>Mucor circinelloides</i>	1
1.1.1. Importancia del estudio de <i>M. circinelloides</i>	2
1.1.2. Genes implicados en el dimorfismo y virulencia de <i>M. circinelloides</i>	4
1.1.3. Mucormicosis	6
1.2. Vías de transducción de señales	7
1.2.1. Proteínas G	8
1.2.1.1. Proteínas G heterotriméricas	9
1.2.1.2. Ciclo de activación de las proteínas G	10
1.3. Proteínas G heterotriméricas en hongos	11
1.3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
1.3.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.3.3. <i>Aspergillus nidulans</i>	12
1.3.4. <i>Mucor circinelloides</i>	13
2. Justificación	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. Metodología experimental en general	21
6. Materiales y métodos	22
6.1. Cepas utilizadas	22
6.2. Medios de cultivo	23
6.2.1. YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)	23
6.2.2. YNB (Yeast Nitrogen Base)	24
6.2.3. LB (Luria Bertanis)	24
6.2.4. MMC (Medio Mínimo Casa-aminoácidos)	24
6.2.5. NGM (Nematode Growth Medium)	24
6.3. Oligonucleótidos y condiciones de PCR	25
6.4. Extracción total de DNA	27
6.5. Aislamiento de DNA plasmídico	28
6.6. Electroforesis en geles de agarosa	29

6.7.	Construcción del fragmento recombinante para eliminar a los genes <i>gpg2</i> y <i>gpg3</i> por PCR en fusión	29
6.8.	Clonación de los fragmentos recombinantes en el vector TOPO	33
6.8.1.	Transformación de bacterias	33
6.8.2.	Aislamiento de plásmidos (ZYPPPLY PLASMID MINIPREP KIT)	34
6.8.3.	PCR en colonia	34
6.9.	Transformación de <i>M. circinelloides</i>	34
6.10.	Corroboración de las mutantes por PCR	36
6.11.	Corroboración de las mutantes mediante RT-qPCR	37
6.12.	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i>	39
6.13.	Crecimiento radial en sustrato sólido de <i>M. circinelloides</i>	40
6.14.	Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	40
6.15.	Transiciones levadura-micelio y micelio-levadura	40
6.16.	Crecimiento en baja tensión de oxígeno (O ₂)	41
6.17.	Crecimiento y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	42
6.18.	Ensayos de virulencia con <i>C. elegans</i>	42
6.19.	Análisis estadístico	43
7.	Resultados	43
7.1.	Obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes <i>gpg2</i> y <i>gpg3</i>	43
7.2.	Obtención de los fragmentos recombinantes por PCR en fusión	45
7.3.	Clonación de los fragmentos recombinantes en el vector comercial pCR®-Blunt II-TOPO®	46
7.4.	Corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ por PCR	50
7.5.	Corroboración de la ausencia del transcrito de los genes <i>gpg2</i> y <i>gpg3</i> en las clonas mutantes de $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ respectivamente	54
7.6.	Caracterización de las mutantes $\Delta gpg1-3$	56
7.6.1.	Crecimiento aeróbico en sustrato sólido en medio rico YPG y medio mínimo YNB de las cepas mutantes $\Delta gpg1-3$	56
7.6.2.	Crecimiento en sustrato líquido en medio rico YPG en aerobiosis y anaerobiosis de las cepas mutantes $\Delta gpg1-3$	59
7.6.3.	Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 de <i>M. circinelloides</i> en el crecimiento en baja tensión de oxígeno	61
7.6.4.	Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 en el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	62
7.6.5.	Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 en la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	64
8.	Discusión	66
9.	Anexo	71
9.1.	Obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes <i>gpb2</i> y <i>gpb3</i>	71
9.2.	Obtención de los fragmentos recombinantes R-gpb2-pyrG y R-gpb3-pyrG por PCR en fusión	73
9.3.	Corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ por PCR	75
9.4.	Corroboración de la ausencia del transcrito de los genes <i>gpb2</i> y	79

<i>gpb3</i> en las clonas mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ respectivamente	
9.5. Crecimiento aeróbico en sustrato sólido medio rico YPG y medio mínimo YNB de las cepas mutantes $\Delta gpb1-3$	81
9.6. Participación de las subunidades Gpb1-3 en el crecimiento a baja tensión de oxígeno de <i>M. circinelloides</i>	82
9.7. Participación de las subunidades Gpb1-3 en el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	83
9.8. Participación de las subunidades Gpb1-3 en la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	85
10. Referencias	87

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas	11
Figura 2. Expresión de los genes que codifican para subunidades G β y G γ durante el dimorfismo en <i>M. circinelloides</i>	15
Figura 3. Niveles de expresión de los genes <i>gpb1</i> , <i>gpg1</i> , <i>gpg2</i> y <i>gpg3</i> de <i>M. circinelloides</i> , en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	18
Figura 4. Estrategia de la PCR en fusión para formar el fragmento recombinante del gen <i>gpg2</i>	31
Figura 5. Estrategia de la PCR en fusión para formar el fragmento recombinante del gen <i>gpg3</i>	32
Figura 6. Amplificación de los fragmentos 5' <i>gpg2</i> y 3' <i>gpg2</i> del gen <i>gpg2</i> ; y amplificación del gen <i>pyrG</i>	44
Figura 7. Amplificación de los fragmentos 5' <i>gpg3</i> y 3' <i>gpg3</i> del gen <i>gpg3</i> ; y amplificación del gen <i>pyrG</i>	44
Figura 8. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' <i>gpg2</i> y 3' <i>gpg2</i> del gen <i>gpg2</i>	45
Figura 9. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' <i>gpg3</i> y 3' <i>gpg3</i> del gen <i>gpg3</i>	46
Figura 10. Clonación del fragmento recombinante Rgpg2-pyrG en el vector pCR®-Blunt II-TOPO®.	48
Figura 11. Clonación del fragmento recombinante Rgpg3-pyrG en el vector PCR®-Blunt II-TOPO®.	49
Figura 12. Corroboración de la mutación en el gen <i>gpg2</i> mediante PCR	52
Figura 13. Corroboración de la mutación en el gen <i>gpg3</i> mediante PCR	53
Figura 14. Corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ mediante RT-qPCR	54
Figura 15. Corroboración de las mutantes $\Delta gpg3$ mediante RT-qPCR	55
Figura 16. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> en el crecimiento radial en sustrato sólido	57
Figura 17. Morfología colonial del crecimiento radial en sustrato sólido de las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1-3$	58
Figura 18. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> de <i>M.</i>	60

<i>circinelloides</i> sobre la germinación.	
Figura 19. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> de <i>M. circinelloides</i> en la germinación a baja tensión de oxígeno	61
Figura 20. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> en el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	63
Figura 21. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> sobre la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	65
Figura 22. Posibles interacciones de las subunidades Gpg1 y Gpg2 con la subunidad Gpb1	70
Figura 23. Amplificación de los fragmentos 5' <i>gpb2</i> y 3' <i>gpb2</i> del gen <i>gpb2</i> ; y amplificación del gen <i>pyrG</i>	72
Figura 24. Amplificación de los fragmentos 5' <i>gpb3</i> y 3' <i>gpb3</i> del gen <i>gpb3</i> ; y amplificación del gen <i>pyrG</i>	72
Figura 25. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' <i>gpb2</i> y 3' <i>gpb2</i> del gen <i>gpb2</i>	74
Figura 26. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' <i>gpb3</i> y 3' <i>gpb3</i> del gen <i>gpb3</i>	74
Figura 27. Corroboración de la mutación en el gen <i>gpb2</i> mediante PCR	77
Figura 28. Corroboración de la mutación en el gen <i>gpb3</i> mediante PCR	78
Figura 29. Corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ mediante RT-qPCR	80
Figura 30. Corroboración de las mutantes $\Delta gpb3$ mediante RT-qPCR	80
Figura 31. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1-3</i> en el crecimiento radial en sustrato sólido	81
Figura 32. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1-3</i> de <i>M. circinelloides</i> en la germinación a baja tensión de oxígeno	82
Figura 33. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1</i> y <i>gpg1-3</i> en el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	84
Figura 34. Efecto de la mutación de los genes <i>gpb1-3</i> sobre la virulencia de <i>M. circinelloides</i>	86

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación del número de subunidades de proteínas G en hongos	13
Tabla 2. Funciones de algunas subunidades de proteínas G heterotriméricas en <i>M. circinelloides</i>	16
Tabla 3. Porcentajes de identidad de las proteínas Gpg de <i>M. circinelloides</i> respecto a STE18P de <i>S. cerevisiae</i>	17
Tabla 4. Cepas utilizadas	23
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	26
Tabla 6. Condiciones de PCR para la obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes <i>gpg2</i> y <i>gpg3</i>	27
Tabla 7. Condiciones para PCR en fusión	33
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$	37
Tabla 9. Condiciones de amplificación para el PCR punto final	37
Tabla 10. Oligonucleótidos y sondas utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ por RT-qPCR	39
Tabla 11. Oligonucleótidos para la obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes <i>gpb2</i> y <i>gpb3</i>	73
Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$	76
Tabla 13. Oligonucleótidos y sondas utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ por RT-qPCR	79

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADP: Adenosín difosfato

ARF: ADP rybosilation factor

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

GAP: Proteína activadora de GTPasa (GTPase-activating protein).

GDP: Guanosín difosfato

GEF: Proteína intercambiadora de nucleótidos (Guanine Nucleotide Exchange Factor)

GMPc: Guanosin monofosfato ciclico

GTP: Guanosín trifosfato

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (G Protein Coupled Receptor)

kDa: kilo Daltons

kb: kilo pares de bases

PI: Punto Isoeléctrico

PM: Peso molecular

ORF: Open Read Frame

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

PREFIJOS

M: Mega (1×10^6)

μ : micro (1×10^{-6})

n: nano (1×10^{-9})

Resumen

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas por tres subunidades ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$), en hongos controlan procesos tales como diferenciación, reproducción sexual, patogénesis, morfogénesis, entre otros. Estas proteínas se encuentran interactuando con receptores especializados, llamados receptores acoplados a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés), en ausencia de una señal el heterotrímero se encuentra inactivo permaneciendo unido. Sin embargo, cuando un ligando (señal) estimula al GPCR este activa el heterotrímero disociándolo en dos unidades de señalización: $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, las cuales poseen funciones celulares específicas. *Mucor circinelloides* es un hongo dimórfico descrito como patógeno oportunista, siendo la fase micelial la morfología virulenta. *M. circinelloides* posee el repertorio más grande de subunidades de proteínas G heterotriméricas presentes en el reino fungí 12 $G\alpha$, 3 $G\beta$ y 3 $G\gamma$, mientras que los demás hongos tienen un promedio de 3 $G\alpha$, 1 $G\beta$ y 1 $G\gamma$. El RNAm que codifica para la subunidad Gpb1 ($G\beta$) de este mucoral se acumula principalmente en micelio, sugiriendo un papel importante en su desarrollo. Datos recientes de nuestro grupo de trabajo indican que la mutación en el gen *gpb1* genera una cepa menos virulenta y forma más levaduras en bajas concentraciones de oxígeno que la cepa silvestre. El paradigma indica que la subunidad Gpb1 necesita unirse a una subunidad gama para formar un dímero funcional. Por lo que el objetivo de este trabajo fue, encontrar que subunidad $G\gamma$ de *M. circinelloides* interacciona con Gpb1. Se utilizaron las cepas mutantes $\Delta gpg1$, $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ con la finalidad de encontrar un fenotipo similar a la cepa $\Delta gpb1$ de *M. circinelloides*. En ensayos de virulencia con el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se observó que a diferencia de la cepa silvestre las cepas $\Delta gpg2$ y $\Delta gpb1$ generaron una menor virulencia, lo que sugiere que estas dos subunidades interaccionan en esta condición. Por otra parte, en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno la mutante $\Delta gpg1$ presentó un fenotipo similar al de $\Delta gpb1$, produciendo más levaduras que hifas. Nuestros datos sugieren que la subunidad Gpb1 puede estar interaccionando con varias unidades Gpgs dependiendo de las condiciones de crecimiento.

Palabras clave: *Mucor circinelloides*, proteínas G heterotriméricas, dímero, virulencia, micelio.

Abstract

Heterotrimeric G proteins are conformed by three different subunits: $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$. These subunits are participated in many processes on fungi, for example: cellular differentiation, sexual reproduction, pathogenesis, morphogenesis, and etcetera. These proteins have a tiny relation with GPCR (G Protein Coupled Receptors), they are interacting each other. At the beginning, the heterotrimeric G protein is integrated, but at the moment a signal is interacting with the GPCR, the heterotrimeric protein is divided in $G\alpha$ -GTP subunit and $G\beta\gamma$ -dimer. Each one has different and individual functions into the cell.

Mucor circinelloides is an emergent pathogen and dimorphic fungus, its hyphae is the virulence morphology. This zygomycete has the biggest collection about G protein subunits on fungus. It has 12 $G\alpha$, 3 $G\beta$ y 3 $G\gamma$ compares to the rest of the fungus, because they have only 3 $G\alpha$, 1 $G\beta$ y 1 $G\gamma$. The *Gpb1* mRNA has the most presence in mycelial morphology, so that it means, this gene could be participated on mycelial development. On one hand, the mutation on *gpb1* gene results in a less virulence mutant strain compares with the wild type (MU636), on the other hand this mutant $\Delta gpb1$ produce more yeast than hyphae on low oxygen tension, compares to the wild type. The paradigm of these subunits tells that the *Gpb1* subunit needs a Gpg subunit to complete the functional dimer to get a function. Therefore the objective for this work is to find which Gpg subunit interacts with *Gpb1* subunit on those conditions.

In this work, we use the $\Delta gpg1$, $\Delta gpg2$ and $\Delta gpg3$ mutant strains, to compare phenotypes with the $\Delta gpb1$ mutant strain. We carried out virulence assays with *Caenorhabditis elegans*, in this case, we found that the $\Delta gpg2$ and $\Delta gpb1$ mutants have the same phenotype and both are less virulence than the wild type. In the other hand we performed a low oxygen tension assay, for this experiment, the mutants $\Delta gpg1$ and $\Delta gpb1$ have the same phenotype, they produced more yeast than the wild type. Whit all of this we can mention the possibility than the *Gpb1* subunit can interact whit different Gpg subunits.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Mucor circinelloides*

El género *Mucor* pertenece a la familia Mucoraceae, del orden de los Mucorales, además de encontrarse en el Phylum Zygomycota, el cual ha sido considerado como un linaje basal del reino Fungí, 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 y col., 2017**).

Se ha propuesto eliminar al Phylum Zygomycota y los miembros de dicho Phylum pasarían a 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 millones de años y 1.2 -1.4 mil millones de años. 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**).

Mucor circinelloides es un hongo zigomiceto, descrito como patógeno oportunista, debido a que es uno de los agentes etiológicos de la enfermedad denominada Mucormicosis; la cual ataca a pacientes inmunocomprometidos (**Bastidas y col., 2012**).

M. circinelloides es un hongo dimórfico que posee dos estados morfológicos, micelio (forma virulenta) y levadura (forma avirulenta) (**Lübbehüsen y col., 2003**). Las cuales dependen de las condiciones ambientales y de la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno.

El crecimiento de la hifa es esencial para el desarrollo del micelio en este mucoral, ya que le permite generar una mejor colonización (**Orlowski, 1991**).

El crecimiento de la hifa se produce por medio de una extensión apical de las nuevas células provenientes de la célula madre original. Las hifas secundarias se generaran a partir del crecimiento de células subapicales (**Ocampo y col., 2012**).

En *M. circinelloides* el crecimiento micelial está involucrado de manera positiva en la virulencia; una mutación en el gen que codifica para la subunidad CnbR, subunidad regulatoria de la calcineurina, encargada de la unión de Ca^{+2} y de la subunidad CnaA subunidad catalítica de la calcineurina, para la activación del complejo, provoco la generación de una cepa mutante monomórfica que solo producía levaduras aún en presencia de oxígeno. Esta mutante resulto menos virulenta con respecto a la cepa silvestre (**Lee y col., 2013**).

1.1.1 Importancia del estudio de *M. circinelloides*

Este zigomiceto es muy versátil, desde hace tiempo se ha utilizado como modelo de estudio en la regulación de la diferenciación celular, siendo su dimorfismo el evento más estudiado (**Lübbenhüsen y col., 2003**) y en estudios de respuesta a la luz (**Murcia-Flores y col., 2008**). *M. circinelloides* posee la capacidad de generar diferentes tipos de esporas: Las artrosporas, las cuales produce en situaciones de estrés y que surgen de la ruptura de las hifas; las zigoesporas que son sus esporas sexuales y las esporangioesporas (esporas asexuales). Estas últimas son las esporas de dispersión asexual del hongo, estas son capaces de producir los dos diferentes tipos de morfologías dependiendo de las condiciones del medio ambiente. En un ambiente de anaerobiosis con una fuente de carbono fermentable conllevara el desarrollo de levaduras, mientras que en presencia de oxígeno (O_2) y con una fuente de carbono fermentable o no fermentable las esporas desarrollaran micelio (**Lübbenhüsen y col., 2003**).

Esta versatilidad en su capacidad metabólica fermentativa u oxidativa le permite conquistar diversos nichos biológicos (**Orlowski, 1991; McIntyre et al., 2002**). Además de ser un patógeno oportunista en humanos, se le ha asociado a la contaminación de algunos frutos, como el noni (**Nishijima y col., 2011**).

M. circinelloides se ha utilizado en diversos procesos en el campo de la biotecnología, como lo es en la industria alimenticia, debido a que acumula diversas enzimas, algunas utilizadas en el proceso de preparación de quesos (Morin-sardin y col., 2017).

Existen reportes en los cuales este zigomiceto es utilizado para la expresión heteróloga de enzimas de interés industrial, tales como la producción de glucosa-oxidasa (Bredenkamp y col., 2010).

Por otra parte se ha utilizado como control biológico de helmintos que afectan a animales de granja (Cortiñas y col., 2015, Arroyo y col., 2016) además se le ha utilizado como una posible fuente de ácidos grasos para la fabricación de biodiesel (Qiao y col., 2018) y se ha investigado para su uso en la obtención de etanol (Wikandari y col., 2012).

El genoma de este organismo es de 36.6 Mb (millones de pares de bases) distribuido en 11,719 genes y ya se encuentra secuenciado y disponible en la red (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home>) (Corrochano y col., 2016). El tamaño del genoma de este zigomiceto es similar al de otros hongos como el ascomiceto *Aspergillus nidulans* que cuenta con 30 Mb (David y col., 2008), el zigomiceto *Rhizopus oryzae* con 45.3 Mb (Ma y col., 2009) y el basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* de 20 Mb (Li y col., 2007).

El estudio de este organismo fúngico es muy amplio y diverso; hoy en día se cuenta con diversas herramientas moleculares de las cuales se pueden hacer uso para su estudio. Por ejemplo, la existencia de un sistema de transformación genética, que permite la introducción de ADN exógeno en *M. circinelloides* (Roncero y col., 1984; Gutiérrez y col., 2011); así como el uso de vectores autorreplicativos, los cuales nos permiten complementar auxotrofías presentes en las cepas de *M. circinelloides* (*Leu⁻*, *pyrG⁻*) (Roncero y col., 1989; Benito y col., 1995).

Además la generación de procedimientos para la integración, por un evento de doble recombinación homóloga, de fragmentos lineales de ADN en el genoma de este mucoral, permite la generación de mutantes por reemplazamiento génico (Navarro y col., 2001).

Todas estas herramientas moleculares convierten a *M. circinelloides* en el zigomiceto con el mayor repertorio de recursos moleculares para analizar una función específica (López-García, 2015).

1.1.2 Genes implicados en el dimorfismo y virulencia de *M. circinelloides*

En *M. circinelloides* el crecimiento de la hifa y la formación de la levadura, están reguladas por el tráfico vesicular. Existen proteínas que poseen el factor ADP de ribolisación, denominadas (ARF, por sus siglas en inglés), las cuales son proteínas G monoméricas pertenecientes a la súper familia de proteínas oncogénicas de sarcoma (Ras por sus siglas en inglés) la cual tiene como característica la modificación postraducciona por lípidos que dicta la interacción con las membranas (Wennerberg y col., 2005). Se encargan de la formación de vesículas; *M. circinelloides* posee cuatro diferentes genes que codifican para proteínas de este tipo (*arf1-4*) (Patiño-Medina y col 2018). La mutación en estos genes provoca una desregulación en la morfogénesis, por ejemplo, la proteína Arf-1 participa de manera positiva en el tamaño de la célula madre, la longitud de la hifa y la filamentación; las proteínas Arf-3 y Arf4 participan de manera positiva en la polarización, además dentro del grupo de trabajo se reportó que las cepas mutantes $\Delta arf-1$ y $\Delta arf-3$ son más virulentas que la cepa silvestre, debido a que estas cepas participan en el control de la secreción de factores de virulencia. Mientras que la proteína Arf-2 participa de manera positiva en el desarrollo de la levadura (Patiño-Medina y col., 2017).

La familia de proteínas ARF agrupa a tres grupos: las proteínas Arf (ADP ribosylation factor) mencionadas anteriormente, las proteínas Arf-like (Arl por sus siglas en inglés) y las proteínas relacionadas a Ras y asociadas con la secreción (Sar por sus siglas en inglés, Secretion-Associated and Ras-related protein). Las proteínas Arl son proteínas relacionadas estructuralmente con las proteínas Arf (50-60 % identidad) y participan también en el tráfico vesicular (**Kahn y col. 2006**).

En *M. circinelloides* se reportó la presencia de dos genes que codifican para estas proteínas, *arl-1* y *arl-2*. La mutación del gen *arl-1* condujo a defectos en el desarrollo aeróbico y en la sensibilidad a detergentes y azoles; además de que aumenta la virulencia, por lo que es un regulador negativo de la misma. Por otro lado en conjunto ambos genes participan en el tráfico vesicular y en la composición de la pared celular (**Patiño-Medina y col., 2019a**).

Se ha reportado que el tamaño de la espora está asociado con la virulencia en *M. circinelloides* (**Li y col., 2011**); dentro del grupo de trabajo se reportó la presencia de 12 genes codificantes para subunidades G α de proteínas G heterotriméricas (**Valle-Maldonado y col., 2015**), de los cuales se encontró que los genes *gpa11* y *gpa12* participan en la regulación del tamaño de la espora, siendo reguladores positivos de la virulencia, debido a que las mutantes $\Delta gpa11$, $\Delta gpga12$ y $\Delta gpga11/\Delta gpa12$ son menos virulentas respecto a la cepa silvestre (**Patiño-Medina y col., 2019b**) lo que implica que la vía de la calcineurina no es del todo responsable de la correlación del tamaño de la espora y la virulencia.

Por otro lado se han reportado factores de virulencia generados por *M. circinelloides*, tal es el caso del acetaldehído, el cual es un producto secundario del metabolismo oxidativo del hongo; este producto aumenta en la cepa mutante M5 en la cual el gen *ADH-1* es mutado, generando una cepa más virulenta que la cepa silvestre (**Díaz-Pérez y col., 2019**).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha reportado que el crecimiento de *M. circinelloides* en presencia de suero 10 % en medio sólido YPG, genera esporas más virulentas que las esporas silvestres que fueron obtenidas en medio YPG (sin suero) (**Patiño-Medina y col., 2019c**). Por lo que se sugiere que la virulencia del hongo, puede estar censada por la presencia de alguna molécula en el suero sanguíneo, dentro del mismo reporte se señaló que el suero desnaturalizado (tratamiento de 24 h a 55 °C) no causa el mismo efecto, que el suero nativo en este mucoral (**Patiño-Medina y col., 2019c**). Lo que sugiere que el factor que aumenta la virulencia y resistencia de las esporas crecidas en suero nativo (10 %), es termosensible.

1.1.3 Mucormicosis

La mucormicosis engloba a un grupo de micosis poco frecuentes, causadas por hongos pertenecientes al phylum Glomeromycota y subphylum Mucoromycotina (antes clase de los Zigomicetos), incluyendo a los géneros *Absidia*, *Mucor* y *Rhizomucor*; siendo las especies más aisladas: *Rhizopus arrhizus* (antes *R. oryzae*), *Mucor circinelloides* (**Zaballos y col., 2003**) y *Lichtheimia corymbifera* (antes *Absidia*) (**Almaslamani y col., 2009**). La mucormicosis ataca a pacientes inmunocomprometidos y es la tercera causa más frecuente de infección invasiva por hongos, después de la aspergilosis y la candidiasis (**Petrikkos y col., 2015**).

La mucormicosis tiene una incidencia mundial de entre 430 y 1,700 casos por 1,000,000 de habitantes; en el caso de los Estados Unidos de América se reportan 2 casos por un millón de habitantes, con un cálculo de 500 casos nuevos al año (**Ziberbeg y col., 2014, Kontoyiannis y col., 2016**). Cabe mencionar que en México no existen datos estadísticos por lo que no se descarta la posibilidad de la existencia de casos clínicos.

El diagnóstico diferencial de la mucormicosis basado en los signos clínicos es complicado, debido a que posee el mismo cuadro clínico que las micosis causadas por los géneros *Aspergillus* y *Candida* (**Lisbshitz y col., 1981**).

Sin embargo, el diagnóstico por laboratorio puede ser realizado mediante la adecuada observación del micelio, (con una adecuada recuperación de material biológico) debido a que las hifas del género *Mucor* son cenocíticas, mientras que las hifas de los otros dos géneros son septadas (**Ocampo y col., 2012**). Además de que existen pruebas moleculares por PCR para determinar el género del agente etiológico (**Hammond y col., 2011; Hata y col., 2008**).

La mucormicosis se clasifica de acuerdo a su localización anatómica en: rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, cutánea y diseminada. Siendo esta última la que posee un 70% de mortalidad sin un tratamiento médico adecuado (**Aslani y col., 2007**). Esta enfermedad ataca a pacientes inmunocomprometidos, siendo pacientes potenciales aquellos que poseen enfermedades tales como, Diabetes mellitus, en donde la variedad rinocerebral es la más común, en hasta un 80% de los casos (**Abramson y col., 1967**). Las enfermedades hematológicas son otro factor de predisposición para la mucormicosis, en donde la variedad pulmonar es la más común (**Dehority y col., 2009**). Además existen otros factores de predisposición, tales como los pacientes con HIV-SIDA, y pacientes recientemente trasplantados (**Greenberg y col., 1980**).

1.2 Vías de transducción de señales

Las condiciones medio ambientales a las que se ve expuesta una célula en su medio ambiente, son las causantes de las respuestas fisiológicas que esta genera para poder adaptarse a sobrevivir. Para que un organismo sea capaz de sobrevivir debe poder responder adecuadamente a estos estímulos provenientes del medio extracelular a los cuales denominaremos señales; estas señales son reconocidas mediante una determinada vía de transducción de señales (**Berg y col., 2002**).

La transducción de señales en la célula involucra a 3 estructuras importantes: El componente receptor como el GPCR, que es el encargado de recibir la señal y pasarla a un componente transductor por ejemplo las proteínas G heterotriméricas, las cuales se activan y pasan la señal a moléculas efectoras con actividad enzimática como la adenilato ciclasa (**Levitzki y Bar-Sinai, 1991**), fosfolipasas (**Smrcka y col., 2012**) o canales iónicos como canales de K^+ , Ca^{2+} o Cl^- (**Zhang, 2011**).

La activación de las proteínas efectoras conducirá a cambios en la concentración de segundos mensajeros tales como el AMPc, GMPc, diacilglicerol o inositol trifosfato, Ca^{2+} entre otras, y estos desencadenarán reacciones fisiológicas específicas (**Neer, 1994**).

1.2.1 Proteínas G

Estas proteínas reciben su nombre, debido a que unen e hidrolizan nucleótidos de guanina (**McCudden y col 2005**). Existen dos familias de proteínas G; las proteínas G monoméricas y las proteínas G heterotriméricas; todas ellas están involucradas en diversas funciones celulares.

Dentro de las proteínas G monoméricas existen las familias Ras, Rho, Ran, Rab y Arf (**Takai y col., 2001**) La familia Ras se ha asociado a procesos de oncogénesis (**Repasky y col., 2004**), la familia Rho se ha visto involucrada en la regulación de la organización de actina, en el ciclo celular (**Etienne-Manneville y Hall, 2002**), la familia Ran participa en el transporte de RNA y proteínas del núcleo al citoplasma (**Weis, 2003**), la familia Rab, cumple la función de regular el transporte vesicular y el tráfico entre varios orgánulos de las rutas endocítica y exocítica, por medio de la direccionalidad que esta les brinda a las vesículas (**Zerial Y McBride, 2001**), por último la familia Arf se encuentra involucrada en la formación de vesículas, ya que actúa como una proteína reclutadora de otras proteínas como clatrina (**Nielsen y col., 2008**).

La otra gran familia está compuesta por las proteínas G heterotriméricas.

1.2.1.1 Proteínas G heterotriméricas

Estas proteínas son componentes transductores en las vías de señalización. Sirve como intermediario entre el receptor localizado en la membrana plasmática con los efectores intracelulares. Estas proteínas se encuentran estructuralmente compuestas por tres subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ (**McCudden y col., 2005**).

La subunidad $G\alpha$ tiene la característica de unir los nucleótidos de guanina, GDP o GTP, y es el que determina el estado de activación del heterotrímero. La subunidad $G\alpha$ presenta homología con las proteínas G monoméricas, debido a que ambas tienen los dominios que cumplen con la actividad de GTPasa, pero la diferencia más grande es el tamaño. La subunidad $G\alpha$ es la más grande con un peso de 35-45 kDa en comparación con las G monoméricas de 20-25 kDa (**Takai y col., 2001**). Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, forman un dímero muy estable que no se disocia en condiciones fisiológicas (**Schwindinger y Robishaw, 2001, Delgado-Jarana y col., 2005**).

El heterotrímero presenta dos conformaciones las cuales son las siguientes:

-Heterotrímero asociado. Es la conformación cuaternaria que adopta el heterotrímero donde la subunidad $G\alpha$ está asociada a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$; recordando que estas últimas son adyacentes entre sí la subunidad $G\alpha$ tiene unido GDP en esta conformación. Además, el heterotrímero está anclado en la membrana plasmática mediante las subunidades $G\alpha$, y $G\gamma$, las cuales son susceptibles de presentar modificaciones postraduccionales (miristoilación para $G\alpha$ y farnesilación o geranil-geranilación para $G\gamma$) favoreciendo la interacción con la membrana celular. La subunidad $G\alpha$ es la que tiene contacto directo con el receptor, funcionalmente se describe a este heterotrímero como inactivo (**Tesmer, 2010**)

-Heterotrímero disociado. Cuando ocurre la interacción de una señal extracelular con el receptor, se promueve el intercambio del GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, conduciendo a un cambio conformacional de la subunidad $G\alpha$, alterando de forma negativa la interacción con el dímero $G\beta\gamma$ y produciendo finalmente una disociación del trímero. Esto favorece la disociación de la subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$, los cuales interaccionan con diferentes efectores generando diversas respuestas fisiológicas, por eso esta conformación se conoce como activa (Tesmer, 2010).

1.2.1.2 Ciclo de activación de las proteínas G

Las proteínas G ciclan entre sus dos estados (activo e inactivo), y las proteínas G heterotriméricas no son la excepción. Estas se encuentran reguladas por las tasas de intercambio de GDP por GTP y por la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP. El primer paso es catalizado por proteínas denominadas GEF (Guanine Exchange Factor por sus siglas en inglés) las cuales son factores de intercambio de nucleótidos de guanina. Además, los GPCRs se han propuesto como proteínas del tipo GEF cuando ocurre la unión del ligando y la activación correspondiente del receptor (Figura 1).

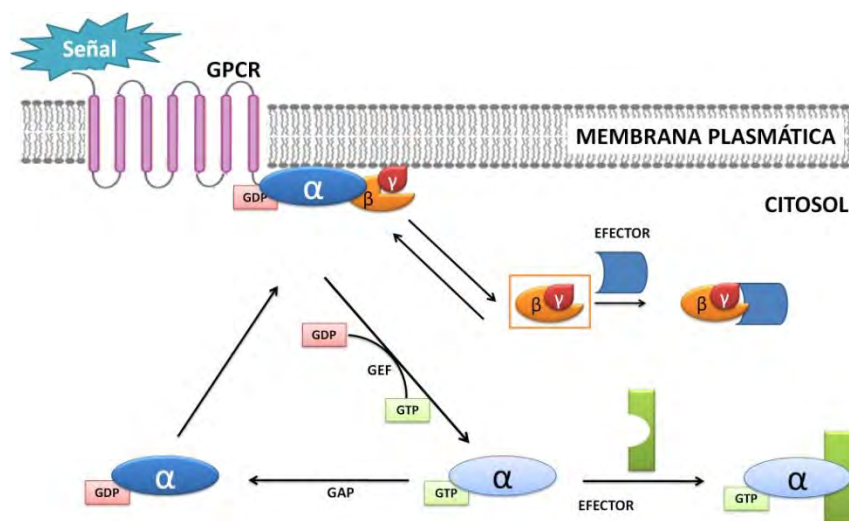


Figura 1. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. En la imagen se puede apreciar un esquema general del ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. Al inicio el heterotrímero se encuentra asociado, cuando el GPCR interacciona con la señal, este sufre un cambio en la estructura terciaria, lo que provoca una transformación en la estructuración de la subunidad $G\alpha$ (actividad GEF) haciéndola más a fin por el GTP y logrando intercambiar el nucleótido. Esto ocasiona la disociación del heterotrímero en la subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$, los cuales se encuentran activos y pueden interaccionar con diferentes efectorios para activar vías de señalización y generar respuestas fisiológicas específicas. El ciclo se completa cuando el GTP de la subunidad $G\alpha$ -GTP es hidrolizado a GDP volviendo a la subunidad $G\alpha$ más a fin por el dímero $G\beta\gamma$ reasociando el heterotrímero, para esto es necesario la participación de una proteína GAP (GTPase Activating Protein), la cual aumenta la actividad de GTPasa de la subunidad $G\alpha$ (Modificada de Milligan y col. 2006).

1.3 Proteínas G heterotriméricas en hongos

1.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

El primer gen de la familia de proteínas G heterotriméricas descrito en hongos, fue el que codifica a una subunidad $G\alpha$ (*Gpa1p*) de *Saccharomyces cerevisiae* para lo cual, por medio de un ensayo de Southern blot usando como sonda el ADNc de la subunidad $G\alpha$ de *Mus musculus*, se localizó dicho gen en el genoma de *S. cerevisiae* (Nakafuku y col., 1987). De igual manera las primeras subunidades beta y gamma fueron descritas en este hongo levaduriforme $G\beta$ (STE4p) y $G\gamma$ (STE18p) (Whiteway y col., 1989).

Las proteínas G heterotriméricas están involucradas en la regulación del crecimiento micelial de *S. cerevisiae*, el receptor de glucosa (GPCR1) a través de Gpa1, incrementa los niveles de AMPc por la activación de la adenilato ciclasa, lo que conduce a la formación de pseudohifas (**Kallal y col., 1997**).

1.3.2 *Fusarium oxysporum*

La formación de las hifas es necesaria en la patogénesis de diversos hongos; se ha reportado que las subunidades de proteínas G heterotriméricas participan en la regulación positiva de la filamentación, un ejemplo de esto es la subunidad G β (FGB1) de *Fusarium oxysporum* la cual se ha reportado que participa en el desarrollo de la hifa, debido a que la mutante careciente de este gen, produce una cepa con deficiencias en el crecimiento polarizado, las cuales son restauradas con la adición de AMPc, lo cual indica la participación de la vía AMPc-PKA de este hongo (**Delgado-Jarana y col., 2005**).

Además se ha descrito la participación de una subunidad G α de *F. oxysporum* FGA2 y FGB1 como reguladores positivos de la virulencia, ya que participan en el desarrollo y la virulencia por medio de la proteína cinasa dependiente de AMPc (**Guo y col., 2016**).

1.3.3 *Aspergillus nidulans*

Es un hongo filamentoso perteneciente al phylum *Ascomycota*, en el cual ya también se han reportado funciones de genes que codifican para subunidades de proteínas G heterotriméricas, tal es el caso de la proteína FadA G α , quien participa de manera positiva en la esporulación y en la producción de la mycotoxina de *Aspergillus nidulans* (**Hicks y col., 1997**).

Por otro lado en un estudio del año 1999 se reportó que el gen *sfaD* que codifica para una subunidad G β de *A. nidulans*, actúa en el crecimiento normal del hongo y participa de manera negativa en la esporulación, debido a que la reprime (**Rosén y col., 1999**), actuando como un antagonista de la de la subunidad FadA (subunidad G α de *A. nidulans*), además el gen *sfaD* participa en la resistencia a la presión osmótica, debido a que su mutación resulta en una cepa mutante en la cual se incrementa la resistencia osmótica (**Coca y col., 2000**).

1.3.4 *Mucor circinelloides*

Previamente se describió en *M. circinelloides* el repertorio más numeroso de proteínas G heterotriméricas presentes en el reino fungí: 12G α , 3G β y 3G γ (**Valle-Maldonado y col., 2015**) El número promedio de subunidades G α G β y G γ reportadas en hongos es de tres subunidades G α , una subunidad G β y una subunidad G γ (**Tabla 1**) (**Li y col., 2007**). Por lo tanto *M. circinelloides* tiene en promedio 3 veces más la cantidad de subunidades en comparación con otros hongos.

Tabla 1. Comparación del número de subunidades de proteínas G en hongos

Organismo	Phylum	Número de subunidades			Tamaño genoma (Mb)/Genes	Referencia
		G α	G β	G γ		
<i>Mucor circinelloides</i>	Zygomycota	12	3	3	36.6/11,719	Valle-Maldonado y col. (2015) <i>Fungal Biol</i> 119(12): 1179-1193
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ascomycota	3	1	1	31/10,982	Brice y col. (2013) <i>Front microbiol</i> 26(4): 1-12
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomycota	3	1	2	20/6,572	Li y col. (2007) <i>Mol Biol Cell</i> 18(11): 4201-4209
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	2	1	1	12/5,885	Kübler y col. (1997) <i>J Biol Chem</i> 15;272 (33): 2021-2033

Los niveles de transcrito de las subunidades G α , G β y G γ de proteínas G heterotriméricas han sido evaluados en diversos hongos y se han asociado a diversas funciones como son detección de nutrientes, luz, feromonas y participación en transiciones morfológicas, patogénesis.

Dentro del grupo de trabajo se realizó el análisis de cuantificación de RNAm de los diferentes genes que codifican para proteínas G de *M. circinelloides* durante el proceso dimórfico, incluyendo el estadio de espora, siendo el gen *gpb1* el que se acumula más su transcrito (RNAm) en la fase micelial (**Figura 2**). Por lo cual este gen *gpb1* es un candidato para evaluar en este contexto (**Valle-Maldonado y col., 2015**). Datos recientes muestran que el gen *gpb1* regula de manera positiva la virulencia, dando su mutación generó una cepa ($\Delta gpb1$) menos virulenta que la silvestre (MU636) (**Valle-Maldonado y col., 2019 En revisión**).

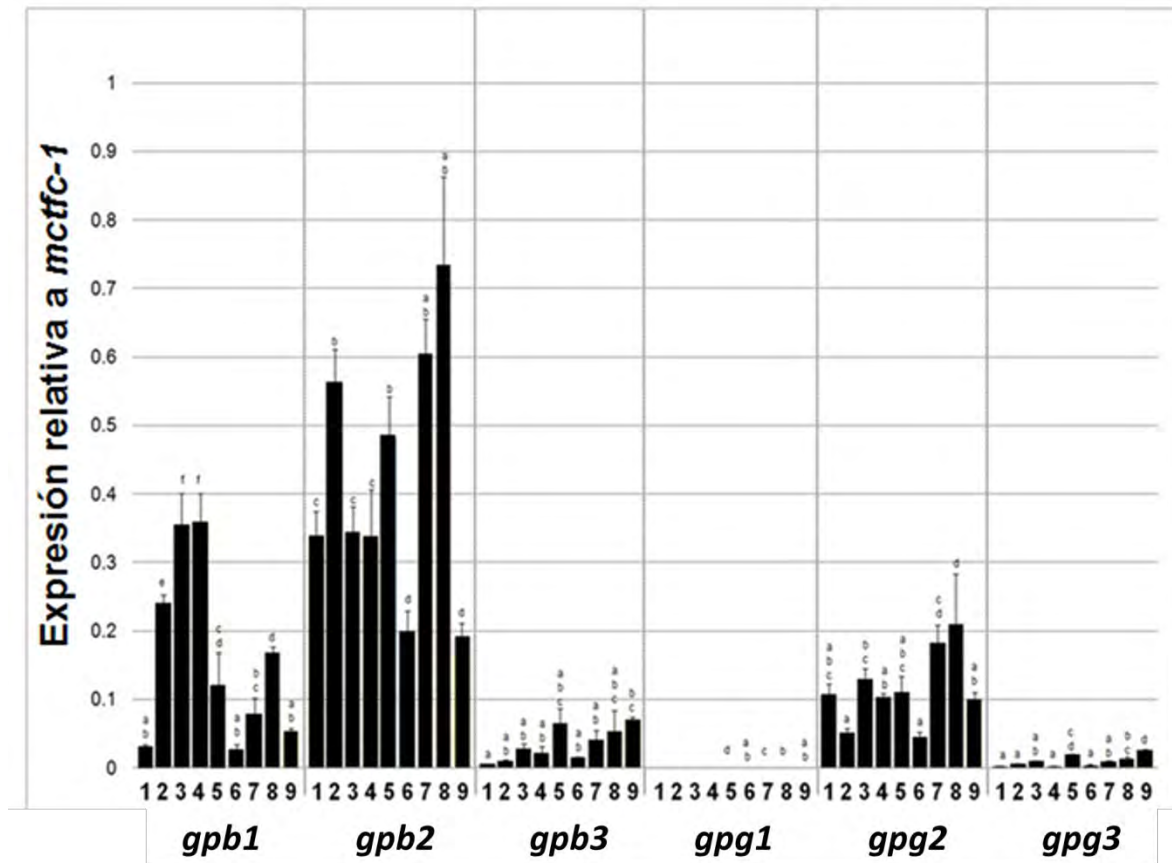


Figura 2. Expresión de los genes que codifican para subunidades G β y G γ durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Tomada de Valle-Maldonado y col., 2015 Se observan los niveles relativos de transcrito entre los genes (*gpb1-gpb3*) de las subunidades G β y los genes (*gpg1-gpg3*) de las subunidades G γ de proteínas G heterotriméricas, con el gen normalizador *tfc-1* durante el dimorfismo. Los estadios morfológicos evaluados fueron, 1: esporas; 2, 3, 4: crecimiento aeróbico (6, 12 y 24 horas), 5: transición micelio-levadura; 6, 7, 8: crecimiento anaeróbico (6, 12 y 24 horas); 9: transición levadura-micelio. El análisis utilizado para la relación de los datos de RT-PCR es un δ ct. N=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

Es escaso el conocimiento de todas las subunidades G heterotriméricas en *M. circinelloides*, sin embargo, ya se han descrito algunas funciones de las subunidades de proteínas G heterotriméricas en este mucoral (**Tabla 2**); se generaron mutantes en los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* las cuales generaron cepas con una deficiencia en la producción de esporas, por lo que se puede asumir que estos genes participan en el desarrollo de una adecuada esporulación; además se generó una doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ la cual generó esporas más grandes, siendo un poco más de dos veces más grandes que la cepa silvestre (MU636) y a pesar de que se ha reportado que el tamaño de la espora está directamente relacionado con la virulencia (**Li y col., 2011**) esta mutante resultó ser menos virulenta que la cepa silvestre (**Patiño-Medina y col., 2019b**). Además esta doble mutante en los genes *gpa11* y *gpa12* mostró niveles bajos de transcrito del gen *cnaA*, el cual codifica para la subunidad catalítica A de la calcineurina que participa de manera positiva en la virulencia (**Lee y col., 2013**). Indicando que la vía de la calcineurina está bajo control de Gpa11 y Gpa12 (**Patiño-Medina y col., 2019b**)

Tabla 2. Funciones de algunas subunidades de proteínas G heterotriméricas en *M. circinelloides*.

Proteína	Función
Gpa11	Una adecuada esporulación ¹
Gpa12	Una adecuada esporulación ¹
Gpa11/Gpa12	Regulan el tamaño de la espora ¹ Controlan negativamente la velocidad de germinación aerobia ¹ Regulación positiva de la virulencia ¹
Gpb1	Regulación positiva de la filamentación en sustrato sólido y líquido ² Regulación positiva de la virulencia ²

1 (Patiño medina y col., 2019b) 2 (Valle-Maldonado, 2019 PLOS ONE en revisión)

El transcrito del gen que codifica para subunidad Gpb1 es el que más se acumula en la forma micelial de los tres genes de subunidad β que posee *M. circinelloides*, lo que sugiere que tiene un rol importante durante el desarrollo de esta morfología (Valle-Maldonado y col., 2015). La eliminación del gen *gpb1* reveló su participación esencial en las transiciones dimórficas respecto a la cepa silvestre. Además recordando que el micelio es la fase virulenta de este hongo, también se observó una menor virulencia en ratones diabetizados, ya que la cepa mutante $\Delta gpb1$ presentó una menor invasividad y respuesta inflamatoria en el huésped en comparación con la cepa silvestre (Valle-Maldonado y col., 2019 en revisión).

La función celular de las subunidades G β por lo general es mediante una interacción con la subunidad Gy para formar un dímero biológicamente funcional, capaz de activar una vía de señalización (Tesmer, 2010). En el caso de *M. circinelloides* existen tres subunidades Gy (Gpg1-Gpg3), por lo que una de ellas debe interaccionar con la subunidad Gpb1 para formar un dímero activo y funcional. Estas 4 proteínas poseen un porcentaje de identidad similar con la proteína STE18 de *S. cerevisiae* las cuales se muestran en la (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de identidad de las proteínas Gpg de *M. circinelloides* respecto a STE18P de *S. cerevisiae*.

Nombre	Subunidades Gy	Número de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	P.I.	% Identidad			
	Número de ID de la Proteína				Sc STE18p (NP_012619.1)	McGpg1	McGpg2	McGpg3
McGpg1	144686	75	8.4	5.23	33.3	100	54.7	69.7
McGpg2	145510	79	8.3	8.31	34.2	54.7	100	60.5
McGpg3	146836	77	8.5	7.87	32.5	69.7	60.5	100

Se evaluaron los niveles de transcrito de los diferentes genes que codifican para subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en diferentes medios, los cuales contenían diversas fuentes de carbono (fermentable y no fermentable) y nitrógeno (orgánica e inorgánica) (**Figura 3**). Encontrando que los genes *gpb1* y *gpg2* se encuentran reprimidos por la presencia de la fuente de nitrógeno inorgánica en el medio de cultivo; además de que ambos presentan el mismo patrón de expresión, lo cual puede ser referencia a que ambos participan dentro de una misma vía.

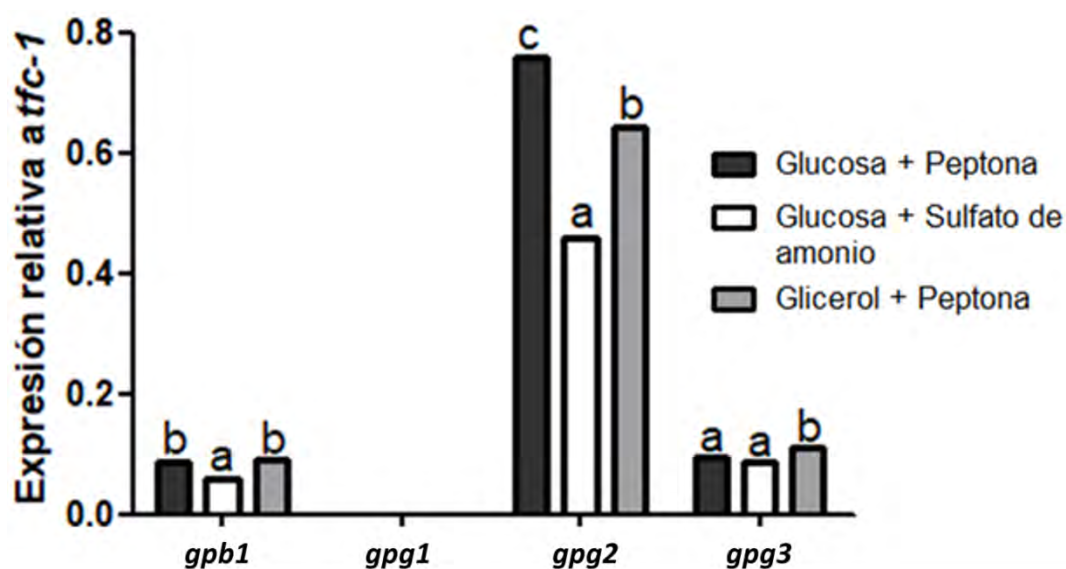


Figura 3. Niveles de expresión de los genes *gpb1*, *gpg1*, *gpg2* y *gpg3* de *M. circinelloides*, en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Se inocularon 5×10^5 esporas/mL de la cepa R7B de *M. circinelloides* y fueron incubadas a 150 rpm, 28°C durante 12 h. Se analizaron los niveles de expresión de RT-qPCR por medio de un análisis δ ct. Análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher $p < 0.05$.

Los datos de expresión obtenidos anteriormente ubican a la subunidad Gpg2 como un posible candidato para ser quien interacciona con la subunidad Gpb1, debido a que es el gen que acumulo más transcrito en la fase micelial, y al igual que Gpb1. Además, ambos genes son estimulados transcripcionalmente por la presencia de cambios en la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Sugiriendo que al menos en esta condición pudieran estar formando un dímero.

2 Justificación

Mucor circinelloides es un hongo dimórfico, patógeno oportunista, en el cual la fase micelial está involucrada positivamente en la virulencia. Se ha observado que la mutación en el gen *gpb1* genera defectos en las transiciones dimórficas aunado al hecho de que esta mutante genera menos virulencia respecto a la cepa silvestre. El hecho de que en este mucoral no se ha reportado la función de ninguna subunidad gama de proteínas G heterotriméricas durante el desarrollo micelial y/o virulencia, nos ubica en una área de oportunidad para describir la posible interacción de la subunidad Gpb1 con alguna de las tres subunidades Gpgs que posee este Mucoral, siendo quizás la Gpg2 una de los candidatos lógicos a considerar.

Por lo que conocer que proteína gama interacciona con la subunidad Gpb1 generará conocimiento en la regulación de la morfología micelial de este mucoral dimórfico, siendo dicha morfología la implicada en el proceso de virulencia.

3 Hipótesis

La subunidad Gpg2 es necesaria para el crecimiento micelial de *Mucor circinelloides*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

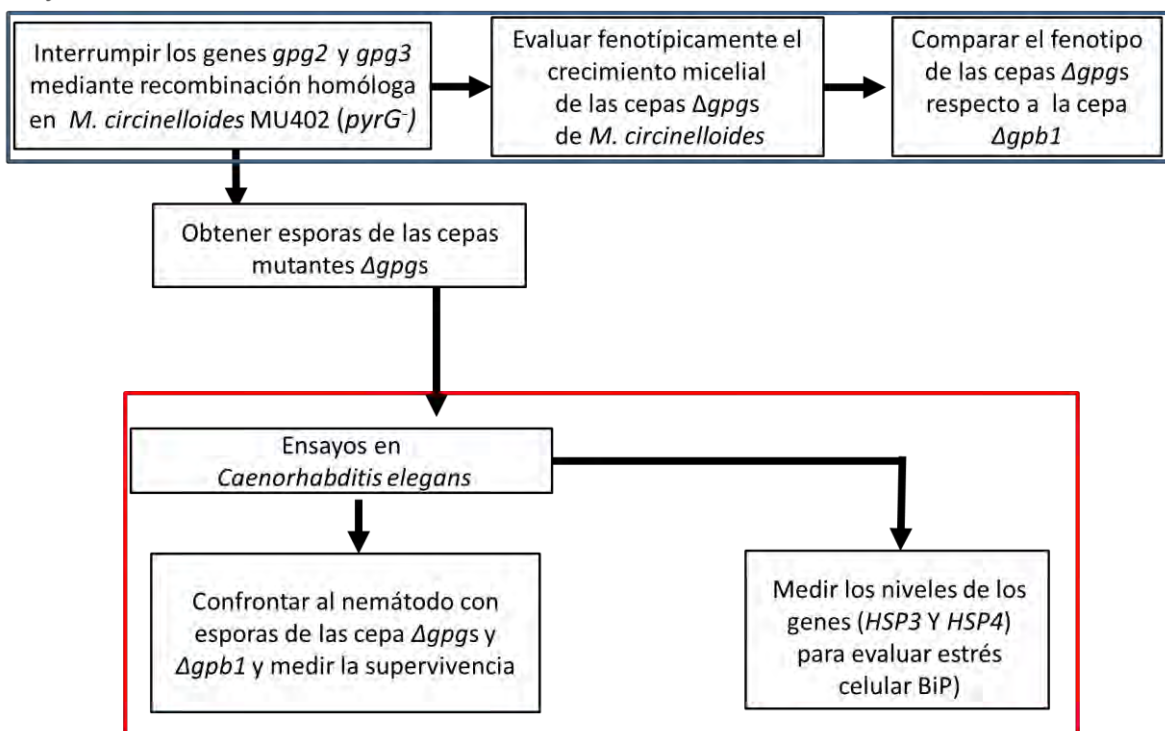
Demostrar la función de las subunidades Gpgs en el desarrollo micelial de *M. circinelloides*.

4.2 Objetivos específicos

1. Demostrar la participación de los genes *gpgs* en el crecimiento micelial de *M. circinelloides*.
2. Demostrar la participación de los genes *gpgs* en la virulencia de *M. circinelloides*.

5 Metodología experimental en general

Objetivo 1



Objetivo 2

6 Materiales y métodos

6.1 Cepas utilizadas

La cepa de *M. circinelloides* MU402 auxótrofa a leucina (*leuA*⁻) y uracilo (*pyrG*⁻); fue obtenida mediante mutagénesis química, derivada de la cepa R7B (Nicolás y col., 2007). Además para los ensayos realizados con las cepas mutantes, se hizo uso de la cepa MU636 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 4**(Navarro-Mendoza y col., 2019).

Se utilizaron las cepas homocariontes $\Delta gpg1$ (*leuA*⁻) y $\Delta gpb1$ (*leuA*⁻) generadas previamente en nuestro grupo de trabajo, y corroboradas por medio de PCR, RT-qPCR y Southern-Blot

Para los experimentos de clonación y propagación de plásmidos se utilizó a la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1983). Esta cepa posee una mutación del gen *lacZ* la cual puede ser fácilmente complementada por una gran variedad de plásmidos comerciales, además de que puede permanecer en congelación en estado competente por largos periodos de tiempo.

Tabla 4. Cepas utilizadas

Cepa	Características
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Cepa estándar; F ⁻ , recA1, endA1, gyrA96, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁻), supE44, thi-1, relA1, lacZ.
<i>Escherichia coli</i> One-shot TOP10	Cepa estándar. F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen)
<i>M. circinelloides</i> MU402	Auxótrofa a leucina (<i>leuA</i> ⁻) y uracilo (<i>pyrG</i> ⁻); obtenida mediante mutagénesis química. Derivada de la cepa R7B (Nicolás y col., 2007).
<i>M. circinelloides</i> MU636	Derivada de MU402 (<i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁻) a la cual se le integro el gen <i>pyrG</i> ; esta cepa fue donada por el Dr. Victoriano Garre Mula de la Universidad de Murcia, España; y fue utilizada como control en todos los experimentos. (Navarro-Mendoza y col., 2019)
<i>M. circinelloides</i> Δ <i>gpb1</i>	Derivada de MU402 (<i>gpb1</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺), obtenida por la eliminación del gen <i>gpb1</i> . (Valle-Maldonado y col., 2019 revisión)
<i>M. circinelloides</i> Δ <i>gpg1</i>	Derivada de MU402 (<i>gpg1</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺), obtenida por la eliminación del gen <i>gpg1</i> . (Reyes-Mares, sin publicar)
<i>M. circinelloides</i> Δ <i>gpg2</i>	Derivada de MU402 (<i>gpg2</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺), obtenida por la eliminación del gen <i>gpg2</i> . (Este trabajo)
<i>M. circinelloides</i> Δ <i>gpg3</i>	Derivada de MU402 (<i>gpg3</i> ⁻ , <i>leuA</i> ⁻ , <i>pyrG</i> ⁺), obtenida por la eliminación del gen <i>gpg3</i> . (Este trabajo)
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Cepa estándar, derivada de la cepa silvestre Bistol (Brenner, 1974).

6.2 Medios de cultivo

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

Cada litro de medio contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) (**Bartnicki-García, 1968**).

6.2.2 YNB (Yeast Nitrogen Base)

Medio mínimo sin aminoácidos, cada litro de medio YNB contenía 20 g de dextrosa (BD Bioxon), 6.7 g de Yeast Nitrogen Base (SIGMA); para la preparación del medio sólido se agregaron 20 g de agar bacteriológico. Tras esterilizar se adicionó tiamina y niacina a una concentración de 1 µg/mL y leucina a una concentración de 1 µg/mL (Lasker y Borgia, 1980).

6.2.3 LB (Luria Bertanis)

Cada litro de caldo LB, contenía 10 g de peptona de caseína (BD Bioxon), 5 g de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker) y 5 g de extracto de levadura (BD Bioxon). Para el sustrato sólido se añadió 15 g de agar (BD Bioxon). Cuando fue necesario se utilizó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, como marcador de selección.

6.2.4 MMC (Medio Mínimo Casa-aminoácidos)

Cada litro de medio MMC contenía 10 g de medio bacto casa-aminoácidos (BD Difco), 0.5 g de bacto yeast nitrogen w/o aminoacids (BD Difco), 20 g de glucosa (BD Bioxon) y 15 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido. Además de ser enriquecido con Sorbitol 90.7 g/L y llevado a un pH de 3.7 para el crecimiento de las posibles transformantes. Posterior a la esterilización se adicionó tiamina y niacina a una concentración final de 1 µg/mL (Nicolás y col., 2007).

6.2.5NGM (Nematode Growth Medium)

Medio utilizado para el mantenimiento de los nematodos *Caenorhabditis elegans*, cada litro contenía 2 g de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker), 4 g de peptona de caseína (Solbiosa), 3 g de fosfato de potasio monobásico (KHPO₄) (Golden Bell), 0.5 g de fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄) (Meyer) y 20 g de agar (BD Bioxon); suplementado con 1 mL de una solución 5 mg/mL de Colesterol (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100 % (J.T. Baker) y estreptomycin 10 mg/mL.

6.3 Oligonucleótidos y condiciones de PCR

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias obtenidas en la base de datos del genoma de *M. circinelloides*, y fueron analizados con el software Snap-Gene los cuales se muestran en la **Tabla 5**. Se diseñaron oligonucleótidos directo ((1)Gpg2-U-Fwd) y reverso ((3)Gpg2-U-Rev-pyrG) para un fragmento de 1 Kb aproximadamente río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *gpg2*, mientras que para *gpg3* se usaron los oligonucleótidos directo ((7)Gpg3-U-Fwd) y reverso ((9)Gpg3-U-Rev); se utilizó otra pareja de oligonucleótido directo ((4)Gpg2-D-Fwd-pyrG) y reverso ((2)Gpg2-D-Rev)) que amplifican una región de 1 Kb aproximadamente río abajo del codón de paro de la traducción de *gpg2* y de forma similar se usaron la pareja de oligonucleótidos directo ((10)Gpg3-D-Fwd) y reverso ((8)Gpg3-D-Rev) para *gpg3*. Esto para poder eliminar al ORF del gen por medio de un evento de recombinación homóloga.

Cabe mencionar que los oligonucleótidos ((3)Gpg2-U-Rev-pyrG y (9)Gpg3-U-Rev-pyrG) poseen 20 nucleótidos solapantes para los primeros 20 nucleótidos en el extremo 5' de *pyrG*, mientras que los oligonucleótidos ((4)Gpg2-D-Fwd-pyrG y (10)Gpg3-D-Fwd-purG) tienen 20 nucleótidos que hibridan con los 20 últimos nucleótidos de *pyrG* en su extremo 3'.

Por otra parte, se amplificó el gen *pyrG* con los oligonucleótidos directo ((5) *pyrG*-Fwd) y reverso ((6) *pyrG*-Rev); el cual codifica para la enzima 5-fosfato orotidin fosfatasa, la cual está involucrada en el segundo paso de la síntesis de UMP que es parte de la ruta metabólica de las pirimidinas, restaurando así la autotrofia a uracilo de la cepa silvestre MU402. Para la amplificación por PCR se realizó una mezcla de reacción en la cual se agregaron 5 µL de DNA total de la cepa silvestre MU402, los oligonucleótidos Directo y Reverso (los cuales amplifican el ORF de *pyrG* sin agregar pares de bases excedentes), se utilizaron a una concentración de 10 µM (se agregó 1 µL de cada uno de ellos), a la reacción se le agregaron 12.5 µL de una mezcla llamada Master Mix (Promega), la cual contiene la enzima Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción.

La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando un termociclador T100™ Thermal Cycler Bio-Rad utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'—————→3'	TM (°C) / GC (%)
(1)Gpg2-U-Fwd	GGCGGGgaattcGCTATAAATCAGCCTTCCAGCA	71.9/52.94
(3)Gpg2-U-Rev-pyrG	<u>caagtaccaatgctgaggca</u> GGAATGGAAGCTTGAGAGAGAGAGA	73.1/47.73
(4)Gpg2-D-Fwd-pyrG	<u>cgatagcatggccagtgtac</u> CTTTGCTACTGCTTACTGCCACT	74.25/51.16
(2)Gpg2-D-Rev	GCGGgaattcGGCAATGGTAGGATGAAGAA	68.73/50.00
(5) pyrG-FWD	GCACCGgagctcTGCTCAGCATTGGTACTTTG	76.66/59.38
(6) pyrG-REV	GTGTGGgagctcGTACACTGGCCATGCTATCG	76.33/59.38
(7)Gpg3-U-Fwd	AGTGCTctcgagGCAAACTACCTTAGTCTGATCCG	74.86/50.00
(9)Gpg3-U-Rev-pyrG	<u>caagtaccaatgctgaggca</u> GCAGAGACGCTGCTATACTACT	76.97/50.00
(10)Gpg3-D-Fwd-pyrG	<u>cgatagcatggccagtgtac</u> TCTTGGCTTTACCAGGATACAGA	77.01/48.84
(8)Gpg3-D-Rev	GAGAGctcgagGAGCATATCCAGCAACTTTTGG	73.46/51.52

*Las letras en minúscula representan secuencias de reconocimiento por endonucleasas. Las letras en minúsculas subrayadas indican las bases del *genpyrG* con las que se pretende realizar el PCR en fusión para obtener el fragmento recombinante.

Tabla 6. Condiciones de PCR para la obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes *gpg2* y *gpg3*

Amplicones	Desnaturalización Inicial	Condiciones de Amplificación 35 Ciclos			
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final
<i>pyrG</i>	95°C/5'	95°C/15''	60°C/30''	72°C/2'	72°C/10'
5'- <i>gpg2</i> , 3'- <i>gpg2</i> 5'- <i>gpg3</i> ,3'- <i>gpg3</i>	95°C/5'	95°C/15''	62°C/30''	72°C/1'30''	72°C/10'

*En la tabla se muestran las condiciones utilizadas para la amplificación del gen *pyrG* y los amplicones 5'-*gpg2* y 3'-*gpg2*, 5'-*gpg3* y 3'-*gpg3*.

6.4 Extracción total de DNA

El DNA total de *M. circinelloides* se aisló con base al protocolo descrito por **Heeswikk y Roncero (1984)**. La extracción se realizó del micelio del hongo el cual fue filtrado a través de un papel filtro Whatman, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta que fueron procesadas.

La lisis celular se realizó mediante el rompimiento por nitrógeno líquido empleando un mortero con pistilo. Se agregó posteriormente 0.4 mL de regulador de extracción (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8), a aproximadamente 0.5 µg de polvo (muestra) contenidos en un microtubo eppendorf, en seguida se adicionaron 80 µL de SDS al 10 %, seguido de 8 µL de proteínaasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 60 °C; posteriormente se adicionó 320 µL de NaCl 5 M y se centrifugó por 30 min a 12,000 rpm. Se recolectó el sobrenadante y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20 °C por 10 min.

Posteriormente se centrifugó por 20 min a 12,000 rpm y se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, se retiró el exceso de etanol y la muestra se secó a 37 °C, para finalmente resuspenderla 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 DNA final se conservaron a -70 °C.

6.5 Aislamiento de DNA plasmídico

El DNA de los plásmidos recombinantes fue obtenido a través del método de lisis alcalina (**Birboim y Doly, 1979; Ish-Horowics y Burke, 1981**), de acuerdo al protocolo:

Se dejó crecer un cultivo bacteriano en caldo Luria por 18 horas a 37 °C en incubadora orbital con agitación constante (220 rpm); se cosecharon las bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 mL, centrifugando durante 2 min a 12,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µL de una solución de STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se le adicionaron 20 µL de enzima lisozima (20 mg/mL), posteriormente se mezcló y se dejó incubando durante 5 min a 37°C.

En el siguiente paso se le agregó 300 µL de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (Dodecil sulfato de sodio) 1 %, se agitó y se incubó por 10 min en hielo. Posteriormente se le añadió 200 µL de una solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8, se mezcló y se incubó por 10 min en hielo (formación de precipitado). Se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm y con un palillo estéril se tomaron los restos celulares del fondo del tubo; al sobrenadante se le añadió 500 µL de una mezcla de fenol-cloroformo, se agitó moderadamente y se centrifugo durante 10 min a 12000 rpm; se recuperó la fase acuosa superior y se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío y se llevó a incubar por 20 min a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min para recuperar el DNA precipitado, el cual se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70 %, centrifugando por 2 min a 12,000 rpm.

Al finalizar la pastilla se secó a 65 °C y se resuspendió en 50 µL de H₂O grado HPLC estéril, y se le adicionó 5 µL de RNAasa (2 mg/mL), se incubó a 37 °C por 30 min; posteriormente se inactivo a 65 °C por 15 min. Las muestras de DNA fueron sometidas a electroforesis o se almacenaron a -20 °C.

6.6 Electroforesis en geles de agarosa

El corrimiento electroforético de las muestras obtenidas en el aislamiento de plásmido y de los productos de PCR se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0.8 % en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M pH 8 y EDTA 0.001 M pH 8). El gel se corrió en una cámara de electroforesis horizontal con el amortiguador ya mencionado. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga (azul de bromofenol 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5 % y sacarosa 40 %). El corrimiento se realizó a un voltaje de 75 volts por 40 min. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01 % por 5 min y se reveló en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. Como marcador de DNA molecular se utilizó el Lambda DNA ladder digerido con *Hind*III y 1 Kb-DNA ladder para los productos de PCR.

6.7 Construcción del fragmento recombinante para eliminar a los genes *gpg2* y *gpg3* por PCR en fusión

La técnica de PCR en fusión se basa en la generación de fragmentos de DNA recombinante, fusionando dos o más fragmentos sin el requerimiento de vectores plasmídicos ni digestiones con enzimas de restricción (**Figura 4**). Para la construcción de nuestro fragmento recombinante del gen *gpg2* con el gen de selección *pyrG*, se amplificaron tres fragmentos que contenían secuencias solapantes entre ellos. Por lo que se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de dos fragmentos de 1 Kb aproximadamente uno río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *gpg2* y el otro río abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpg2*.

Los oligonucleótidos diseñados tenían 20 nucleótidos que hibridan con los extremos 5' y 3' del gen *pyrG*, este fue amplificado por separado, permitiendo así la complementariedad de bases durante la PCR fusión. Los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 5**.

Se realizaron tres reacciones de PCR por separado para obtener los tres fragmentos. La mezcla de reacción utilizada para el PCR en fusión es: 75 ng/μL de *pyrG*, 50 ng/μL de cada uno de los fragmentos 5' y 3'; 5 μmoles de cada oligonucleótido y 1 μL de la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs inc.) siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Y se utilizaron las condiciones de la **Tabla 7**.

Para el gen *gpg3*, se realizó el mismo procedimiento, amplificando las dos regiones 5' y 3' de 1 Kb aproximadamente, para realizar la PCR fusión y obtener el fragmento recombinante (**Figura 4**), necesario para la eliminación de este gen, y posteriormente obtener su mutante.

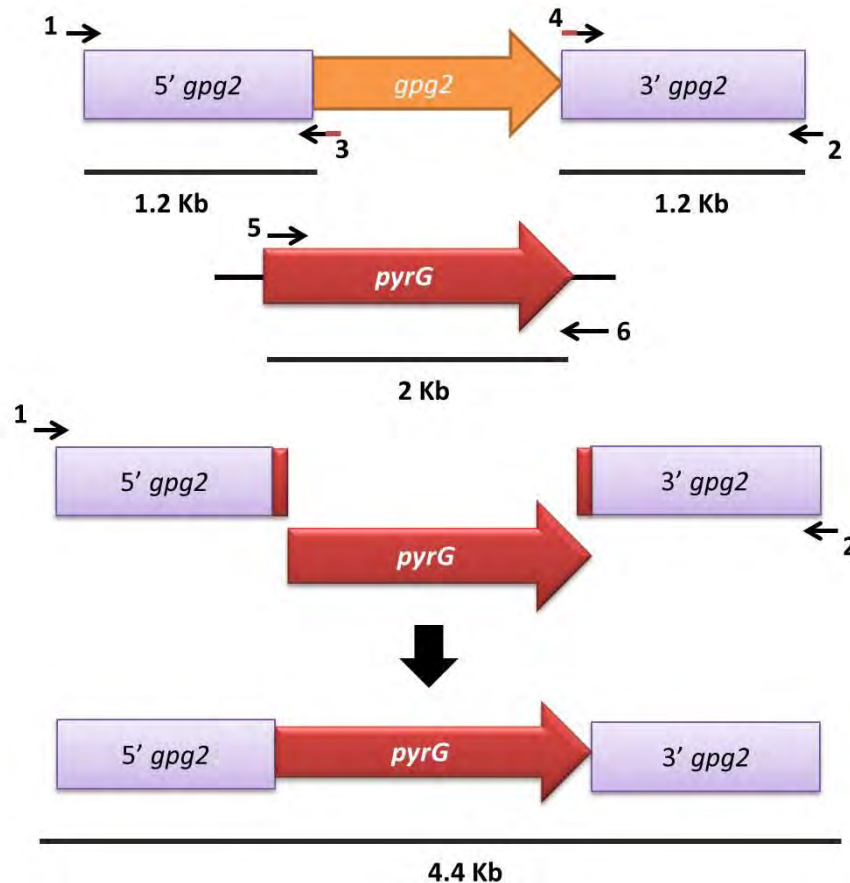


Figura 4. Estrategia de la PCR en fusión para formar el fragmento recombinante del gen *gpg2*. En el esquema se muestran las amplificaciones de los fragmentos 5' y 3' del gen *gpg2* exceptuando al marco de lectura abierta, los oligonucleótidos se muestran por las flechas en color negro, y con la adición de nucleótidos correspondientes para la secuencia de *pyrG* en rojo. La fusión se llevó a cabo por la hibridación de las regiones del gen *pyrG* contenidas en los fragmentos 5' y 3' del gen *gpg2* en sus extremos, produciendo el fragmento recombinante.

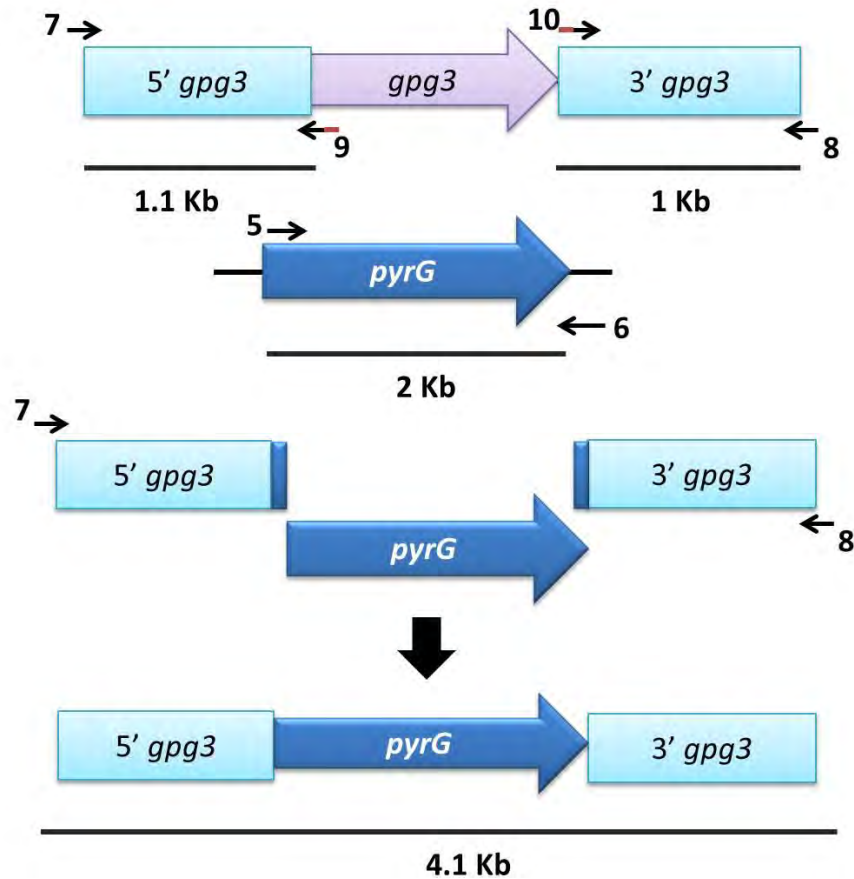


Figura 5. Estrategia de la PCR en fusión para formar el fragmento recombinante del gen *gpg3*. Se amplificaron dos regiones 5' y 3' de 1 Kb aproximadamente, se muestran en flechas las zonas de hibridación de los oligonucleótidos. En flecha azul se muestra el amplicón del gen *pyrG*. La fusión se llevó a cabo por la hibridación de las regiones del gen *pyrG* contenidas en los fragmentos 5' y 3' del gen *gpg3* en sus extremos.

Tabla 7. Condiciones para PCR en fusión.

Condiciones de Amplificación 30 Ciclos				
Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final
98°C/30''	98°C/10''	62°C/30''	72°C/5'	72°C/10'

6.8 Clonación de los fragmentos recombinantes en el vector TOPO

Posteriormente obtenidos los fragmentos recombinantes se prosiguió a clonar en el vector comercial pCR®-Blunt II-TOPO®. Para lo cual fueron necesarios 12 ng del fragmento por 1 µl del vector. Se preparó la reacción con un volumen final de 6 µl y se dejó a 4 °C toda la noche. Posteriormente se transformaron células competentes de *Escherichia coli*, las cuales se cultivaron en Agar LB con Kanamicina (Km) 50 µg/mL y X-gal como marcadores de selección. Las colonias transformantes se apreciaron en color blanco. Se prosiguió a aislar las colonias transformantes y a realizar la extracción del plásmido por Minipreps.

6.8.1 Transformación de bacterias

Se utilizaron viales One Shot de *E. coli*, las cuales se colocaron en hielo; posteriormente se les agregaron 2 µL de la reacción de clonación de TOPO mencionada en el apartado anterior y se mezcló. Se prosiguió a incubar el vial en hielo por 20 min, después de eso se les dio un golpe de calor a 42 °C por 30 seg, se añadió 250 µL de medio SOC para células, y se incubaron a 37 °C por una hora en agitación (200 rpm). Se dispersaron 10-50 µL en placas de Agar LB con Kanamicina (50 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

6.8.2 Aislamiento de plásmidos (ZYPPLY PLASMID MINIPREP KIT)

Se seleccionaron las colonias blancas de las placas de Agar LB y se crecieron en medio LB líquido con Kanamicina (50 µg/mL) a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó para obtener la pastilla de células, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de 7X Lysis Buffer (Blue), se mezcló cuidadosamente de 4 a 6 veces y se incubó por 2 min a temperatura ambiente.

Se agregaron 350 µL del buffer de neutralización amarillo y se mezcló completamente. Posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm por 4 min y el sobrenadante se transfiere a una columna (Zymo-Spin) y se centrifugó por 15 segundos a 11,000 rpm., se añadieron 200 µL del buffer de lavado (Endo-Wash) y se centrifugó por 30 seg a 11,000 rpm. Después se agregaron 400 µL del segundo buffer de lavado (Zyppy wash buffer) y se centrifugó por 1 min a 11,000 rpm; terminando se transfirió la columna a un tubo limpio y se añadieron 30 µL de agua de grado molecular y se centrifugó por 30 seg, obteniendo así el plásmido.

6.8.3 PCR en colonia

Para realizar la corroboración de la transformación de *E. coli*; fueron seleccionadas aquellas colonias de color blanco (marcador de selección *lacZ*⁺) obtenidas posterior a la transformación con los plásmidos correspondientes y colocadas en tubos de reacción, para realizar la amplificación de los fragmentos clonados (con los oligonucleótidos de la **Tabla 5** y condiciones de la **Tabla 7**).

6.9 Transformación de *M. circinelloides*

Se realizaron 5 reacciones de PCR para la amplificación del fragmento recombinante utilizando como templado el plásmido PSL-62-1 (obtenido con el aislamiento de MINIPREP). Posteriormente se purificó el fragmento para obtener una concentración de 3 µg por reacción de transformación.

Se creció la cepa MU402 de *M. circinelloides* en medio YPG + UU (Uridin 6.1 g, Uracilo 5.6/100 mL), durante 3 días, posteriormente se colectaron las esporas; las cuales fueron resuspendidas en 24 mL de YPG + 1 mL UU en un matraz (**Vellanki y col., 2018**).

Se incubaron en agitación (300 rpm) a 26 °C de 3-4 hasta obtener aproximadamente el 50 % de germínulas, posteriormente se transfirió el cultivo a un tubo de 50 mL para centrifugar y decantar el sobrenadante. Se proseguirá a lavar las células dos veces con buffer de fosfatos pH 6.5 por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos.

Se preparó una solución de lisis con 25 mg de enzima lítica suspendida en 5 mL de buffer de fosfatos, la cual posteriormente se filtra a través de una membrana de 0.022 µm para limpiarla.

Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 4 mL de buffer de fosfatos, transfiriéndola a un matraz de 20 mL al cual se le añadió 1 mL de la solución de lisis recién preparada (Lysis Enzyme) y 100 µL de Quitosanasa RD, y se incubó a 26 °C con una agitación a 60 rpm durante 90 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron los 5 mL en un tubo de 15 mL el cual se llenó con Sorbitol 0.5 M frío y se realizaron dos lavados por centrifugación a 800 rpm por 5 minutos con la misma solución. La pastilla se resuspendió en 800 µL de sorbitol 0.5 M frío, para realizar 8 diferentes transformaciones

Para la preparación de la mezcla de reacción para la transformación se deben agregar 100 µL de solución de protoplastos (obtenida en el paso anterior), y 10 µL del DNA (fragmento recombinante) a una concentración de 1 µg total, utilizando como control 10 µL de agua destilada, se mezcló con una pipeta y se transfirió a la cubeta de electroporación.

Se aplicó un pulso eléctrico con una fuerza de 800V, una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 400 Ohms. Inmediatamente después del pulso se le añadió 1mL de YPG + sorbitol pH 4.5 frío, manteniendo las cubetas en hielo.

La mezcla se transfirió posteriormente a un tubo de 1.5 mL y se incubó a 26 °C y 150 rpm, al finalizar el tiempo se centrifugó la muestra a 11,000 rpm durante 5 minutos, resuspendiendo la pastilla en un volumen final de 400 μ L de sorbitol 0.5 M frío.

Se inocularon 200 μ L de la suspensión en una placa de MMC 3.7 + sorbitol y se incubaron por 4 días a 26 °C en oscuridad.

6.10 Corroboración de las mutantes por PCR

La corroboración de las mutantes se realizó mediante cuatro reacciones de PCR, para lo cual se diseñaron los siguientes oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 8**; los oligonucleótidos P1 y P4 se encuentran en regiones fuera de los fragmentos 5' y 3' esto para poder amplificar ambos fragmentos, el que contiene al gen *gpg2* y al que posee el fragmento recombinante. Los oligonucleótidos P2 y P3 se encuentran en regiones dentro de *pyrG* esto para corroborar la correcta orientación del inserto. Por último, se diseñaron los oligonucleótidos P5 y P6 para amplificar el ORF del gen *gpg2* así demostrando la ausencia de este en la mutante y su presencia en la cepa silvestre MU402.

Para corroborar la cepa mutante $\Delta gpg3$, se llevó a cabo el procedimiento anterior. Se generaron los oligonucleótidos P7 y P8, los cuales hibridan fuera de las zonas de amplificación de los fragmentos 5' y 3' de *gpg3*. Lo cual nos permitirá conocer si el fragmento recombinante se encuentra en el locus correcto. Estos serán utilizados en reacciones con los oligonucleótidos P2 y P3 de *pyrG*, como se muestra en la **Figura 10** de la sección de resultados. Además para demostrar la ausencia del gen *gpg3*, se diseñaron los oligonucleótidos P9 y P10 para amplificar al ORF de este gen. Las condiciones utilizadas para las reacciones de PCR se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$.

Oligonucleótido	Secuencia 5' $\longrightarrow$ 3'	TM (°C) /GC (%)
P1 <i>gpg2</i> FWD	GCGTCTACATAGATGCTCTCAA	62.23/45.45
P2 <i>pyrG</i> REV	TCAAAAAGAGAGCGAGCACA	62.44/45.00
P3 <i>pyrG</i> FWD	AACCCCTCACGAAGTCATTG	63.13/50.00
P4 <i>gpg2</i> REV	GCTGTAATCGGCTGCTTTT	61.70/45.00
P5 <i>gpg2</i> FWD	ATGGCAGAAAAACACCAA	62.03/40.00
P6 <i>gpg2</i> REV	TTACATGATTGTACAGCAGC	58.37/40.00
P7 <i>Gpg3</i> -C-Fwd	GCAGACACATTCAAAGAGGACA	63.64/45.45
P8 <i>Gpg3</i> -C-Rev	GAGAGCTCGAGGAGCATATCCAGCAACTTTTGG	73.46/51.52
P9 <i>Gpg3</i> -ORF-Fwd	ATGGCCAGACAACTGTTC	61.53/45.00
P10 <i>Gpg3</i> -ORF-Rev	CTACATGATTTGACATGATG	54.35/45.00

Tabla 9. Condiciones de amplificación para el PCR punto final.

Condiciones de Amplificación 10 Ciclos				
Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final
98 °C/30 ''	98 °C/10 ''	62 °C/30 ''	72 °C/3 '	72 °C/10 '

6.11 Corroboración de las mutantes mediante RT-qPCR

Para llevar a cabo la corroboración de la mutación de los genes *gpg2* y *gpg3* en las respectivas mutantes *gpg2* y *gpg3*, se realizó la extracción de RNA de micelio de 24 h de germinación de cada mutante utilizando el método descrito por **Valle-Maldonado y col., 2015**.

Las muestras de RNA se cuantificaron espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a $\lambda=260\text{nm}$ y $\lambda=280\text{nm}$, siendo las absorbancias que indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas respectivamente (**Krebs y col., 2009**). Se evaluó la relación A_{260}/A_{280} , en donde una relación $A_{260}/A_{280} \geq 1.90\text{-}2.0$, indica una calidad óptima del ácido nucleico (**Yamaguchi y col., 1992**). Las muestras de RNA total cuyo resultado de la relación es menor a 1.8 fueron descartadas para el análisis de RT-qPCR.

La amplificación y detección de los genes se realizó por medio del método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, las sondas y oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 10**, poseen estructuras secundarias mínimas; todos ellos fueron diseñados mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 μL de volumen de reacción contenía 5 μL de RNA templado (100 μg), 0.5 μL de mezcla de enzimas (retrotranscriptasa y DNA polimerasa), 12.5 μL de mezcla de reacción 2X, 0.5 μL de oligonucleótido directo (10 μM), 0.5 μL de oligonucleótido reverso (10 μM), 0.5 μL de sonda (5 μM), y 5.5 μL de agua libre nucleasas. La mezcla de reacción fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

Las condiciones para la reacción de RT-qPCR fueron las siguientes: la adición de transcriptasa reversa (50 °C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95 °C, 5 min), se prosiguieron con 45 ciclos de amplificación de 95 °C / 15 seg, 60 °C / 30 seg, 72 °C / 30 seg. Las señales de fluorescencia fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm. Cada experimento se realizó con la utilización de los genes de expresión constitutiva, como controles positivos y agua como control negativo.

Tabla 10. Oligonucleótidos y sondas utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ por RT-qPCR

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm (°C) / GC (%)
<i>gpg2</i> (145510)	CAGTTGGACATTCCCAGAATAACAG	65.83 / 44
	CCCACACTGAAGGCACCAA	67.12 / 57.9
	CAGAAGCATCCACAAGCTTGATATCGTA	68.14 / 42.9
<i>gpg3</i> (146836)	TGTTTCTGAAGCAAGTCGATCATTG	66.45 / 40
	GATGCGCCACATCCATTGTC	67.1 / 55
	CGATTACTGTCAATCCACCCCTGATTTGA	69.68 / 44.8
<i>tfc-1</i> (106349)	AGCAGGATATGGAAGGCGCTTTATC	69.7/48
	GGGCATCTGTGGCAATCTTTC	68.1/52.38
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	74.1/52

*Los números entre paréntesis indican el número ID en la base de datos de *M. circinelloides* (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>).

*Las sondas para detectar los genes *gpgs* y *gpbs* fueron diseñados por Valle-Maldonado 2013, tesis de maestría.

6.12 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides*

Para realizar la obtención de esporas, se creció en placas de sustrato sólido del medio YPG al hongo. Se inocularon 100 esporas de las diferentes cepas de *M. circinelloides* y se incubaron a 28 °C en presencia de luz durante 6 días. Las esporas fueron colectadas agregando 10 mL de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico; posteriormente las esporas se recuperaron y colocaron en un tubo de 50 mL donde se concentraron mediante centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Las esporas se resuspendieron en 20 mL de H₂O destilada estéril y se conservaron a 4 °C.

El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika), depositando 20 µL en la parte superior y 20 µL en la inferior, respectivamente. Se contaron los cuadrantes central y de los extremos superiores e inferiores en ambas celdas de la cámara, contando 10 en total. Dicha cantidad se multiplicó por el factor de 2.5×10^4 y el resultado obtenido se expresó en esporas por mL de la muestra. Las esporas se conservaron a 4 °C.

6.13 Crecimiento radial en sustrato sólido de *M. circinelloides*

Se inocularon 100 esporas de manera central en placas de Petri con sustrato sólido del medio necesario (YPG, YNB). Las cuales se llevaron a incubar a 28 °C por un periodo de 6 días. Cada día se realizó la lectura del diámetro de la colonia generada, para evaluar su crecimiento.

Y las esporas generadas fueron recolectadas como en el procedimiento anterior, y contadas para medir la capacidad de esporulación de las cepas ensayadas.

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

Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentoso, se adicionaron 10 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 125 mL y se incubaron a 28 °C con agitación constante a 150 rpm. Para el crecimiento levaduriforme, se utilizaron vasos de precipitados de 10 mL, los cuales se llenaron en su totalidad, sobrepasando aún más la última marca de graduación con el medio de cultivo, y fueron cerrados con un tapón de corcho, el cual posee una aguja que permite el escape de CO₂; y se incubaron a 28 °C sin agitación, esto permite una atmosfera en ausencia de O₂.

6.15 Transiciones levadura-micelio y micelio-levadura

Para realizar el ensayo con el fin de evaluar la transición levadura-micelio, se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio en vasos de precipitado de 10 mL los cuales se describen en el proceso de germinación en anaerobiosis; se incubaron por 12 h a 28°C y posteriormente las levaduras fueron centrifugadas a 3000 rpm y colocadas en matraces de 125 mL, con 10 mL de medio líquido YPG. Estas fueron llevadas a incubación a 28 °C con 150 rpm de agitación, permitiendo la entrada de oxígeno al medio, y activando la transición hacia la fase micelial. Se tomó muestra cada hora durante las próximas 4 horas, a las cuales se les realizó una cuenta diferencial de las células en transición y se reportó en porcentaje.

Para la transición de micelio-levadura, se inocularon matraces de 125 mL como una germinación aeróbica, durante 6 horas, posteriormente se recuperaron las germínulas y se colocaron en vasos de precipitado de 10 mL y se llevaron a anaerobiosis. Se tomó muestra cada hora durante 4 horas, y se realizó una cuenta diferencial de las células en transición, reportando el resultado en porcentaje.

6.16 Crecimiento en baja tensión de oxígeno (O₂)

El ensayo se realizó en matraces de 125 mL, los cuales contenían 10 mL de sustrato líquido de YPG. Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio. Se incubaron, a 28 °C con una velocidad de 50 rpm, esto permite que exista una baja tensión de oxígeno en el líquido; por lo que las esporas podrán generar micelio o levaduras, teniendo un crecimiento mixto para las cepas.

Posteriormente se evaluó la cuenta diferencial de germínulas y levaduras presentes a las 6 horas, y se observaron las diferencias.

La concentración de oxígeno fue determinada por medio de un medidor de oxígeno, (**Dissolved oxygen and Temperature meter, Hanna instruments, model: HI9146**). Se midió el porcentual de oxígeno respecto al atmosférico, en el medio líquido YPG, sin agitación y con agitación 150 rpm y 50 rpm; se observó que la concentración de oxígeno en la agitación más alta (150 rpm) fue de 17 % con respecto al atmosférico (20 %), mientras que en las revoluciones bajas 50 rpm la concentración de oxígeno (O₂) fue de 7 % y el medio sin agitación de 4 % de O₂ respecto al atmosférico. Nota: la concentración atmosférica de oxígeno es de 209.400 ppm (20 % del aire) (**Harrison y col., 1968**).

6.17 Crecimiento y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Se inoculo a la cepa de *E. coli* OP50 en caldo LB con estreptomicina (10 µg/mL), incubándose a 37 °C con agitación constante a 200 rpm por 48 horas. Esta bacteria es la fuente de comida del nematodo. Posteriormente se recuperaron las células y fueron lavadas con agua desionizada estéril. Y se conservaron en un volumen de 30 mL de la misma a -20 °C. Se utilizaron 200 uL del suspendido de *E. coli* OP50 y se inocularon en medio NGM + estreptomicina (10 µg/mL) sólido con ayuda de un hisopo de algodón estéril. Las placas de NGM se llevaron a incubar a 37 °C por 48 horas hasta su crecimiento total.

Para inocular a *C. elegans* se transfirió una pequeña parte de agar de un cultivo previo con al menos un nematodo vivo, a la nueva placa conteniendo a la cepa *E.coli* OP50 y se dejó incubar por 3 días a 18 °C hasta la fase adulta del nematodo.

6.18 Ensayos de virulencia con *C. elegans*

El experimento se llevó a cabo en placas de 24 pozos, en las cuales se añadió 1 mL de sustrato líquido YPG. Se inocularon 1×10^3 esporas en cada uno, en los cuales se colocaron de 15-20 nematodos. Se evaluó el porcentaje de supervivencia cada 12 horas, durante 60 horas (3 días), y se graficaron los resultados.

Se realizó un segundo ensayo a las 12 horas, en el cual se recuperaron los nematodos, para medir los niveles de expresión de dos genes marcadores de estrés celular en *C. elegans*, *HSP3* y *HSP4* que codifican para chaperonas, las cuales son homologas de una proteína del retículo endoplásmico denominada BiP la cual se incrementa en procesos de estrés celular, incluidos procesos infecciosos (Cerezo y col., 2016).

6.19 Análisis estadístico

A todos los datos se les aplicó el análisis de varianza (Anova) de una sola vía, con la prueba post hoc Fisher con una $p < 0.05$. El cual se efectuó en el software "STATISTICA"¹⁰. Las diferencias estadísticas se muestran con letras y/o asteriscos.

7 Resultados

7.1 Obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes *gpg2* y *gpg3*

Con la finalidad de conocer la participación de las subunidades Gy de proteínas G heterotriméricas en el desarrollo micelial de *M. circinelloides*, se realizaron mutantes por medio de un evento de doble integración homóloga, en la cual se eliminaron a los genes *gpgs*. Por lo que fue necesario obtener dos regiones de 1 Kb aproximadamente, que flanquearan a cada uno de estos genes en el sentido 5' del codón de inicio, y 3' del codón de paro. Que posteriormente fueron fusionadas al gen marcador *pyrG*. Todo este proceso fue realizado con ayuda del grupo de trabajo del Dr. Soo Chan Lee en la Universidad de Texas de San Antonio (UTSA).

Para la amplificación, por medio de reacciones de PCR, de los fragmentos *gpg2* 5' (1.182 Kb) y *gpg2* 3' (1.190 Kb) se utilizaron a las parejas de oligonucleótidos (1)Gpg2-UFwd y (3)Gpg2-URev-pyrGy (4)Gpg2-DFwd-pyrG y (2)Gpg2-DRev respectivamente.

Por otro lado, se realizó la amplificación por PCR del gen *pyrG* con la pareja de oligonucleótidos (5) pyrG-FWD y (6) pyrG-REV, obteniendo un tamaño de 2 Kb (**Figura 6**). Para el caso de la obtención de las amplificaciones del gen *gpg3*, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos (7)Gpg3-U-Fwd y (9)Gpg3-U-Rev para el fragmento 5'*gpg3* (1.115 Kb) y la pareja (10)Gpg3-D-Fwd y (8)Gpg3-D-Rev para el fragmento 3'*gpg3* (1.070 Kb). Y nuevamente se amplificó al gen *pyrG* los cuales se pueden observar en la **Figura 7**.

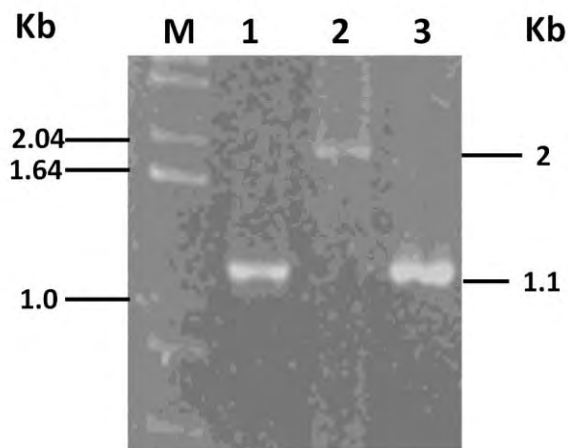


Figura 6. Amplificación de los fragmentos 5'*gpg2* y 3'*gpg2* del gen *gpg2*; y amplificación del gen *pyrG*. En el carril 1, se muestra la banda de un tamaño de 1.1 Kb, correspondiente al fragmento *gpg2* 5'. En el carril 2 se observa la amplificación al gen *pyrG* de 2 Kb aproximadamente. En el carril 3, se muestra una banda de amplificación del fragmento *gpg2* 3' de 1.1 Kb.

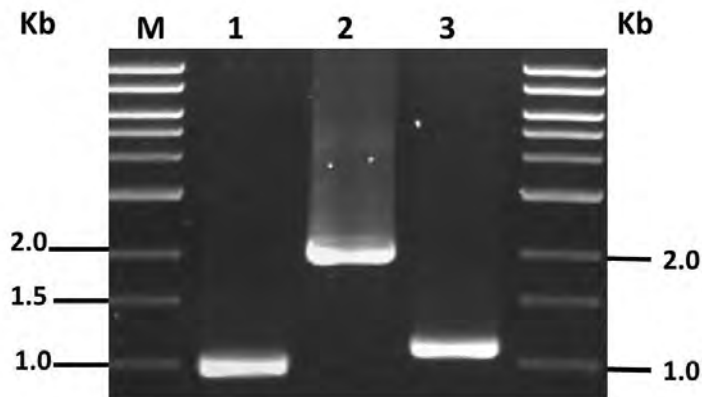


Figura 7. Amplificación de los fragmentos 5'*gpg3* y 3'*gpg3* del gen *gpg3*; y amplificación del gen *pyrG*. En la imagen puede observarse en el carril 1 la banda de amplificación correspondiente al fragmento 5' de *gpg3* de 1.1 Kb, mientras que en carril 3 podemos apreciar la banda de amplificación para el fragmento 3' de *gpg3* de 1.0 Kb aproximadamente. En el carril 2 se observa el amplicón correspondiente al gen *pyrG* de 2.0 Kb.

7.2 Obtención de los fragmentos recombinantes por PCR en fusión

Posterior a la obtención de los fragmentos, se realizó la PCR en fusión con las condiciones mencionadas en la **Tabla 7**, utilizando los oligonucleótidos (1)Gpg2-UFwd y (2)Gpg2-DRev (Debido a que flanquean las regiones terminales de cada uno de los fragmentos generados en la PCR anterior), para la generación del fragmento recombinante Rgpg2-pyrG de 4.4 Kb producto de la unión de los fragmentos del gen *gpg2* y el gen marcador *pyrG*, el cual se puede apreciar en la **Figura 8**.

Mientras que para los fragmentos del gen *gpg3* en la **Figura 9**, se utilizaron los oligonucleótidos (7)Gpg3-U-Fwd y (8)Gpg3-D-Rev para realizar el PCR en fusión y así obtener la amplificación de 4.1 Kb correspondientes para el fragmento recombinante Rgpg3-pyrG.

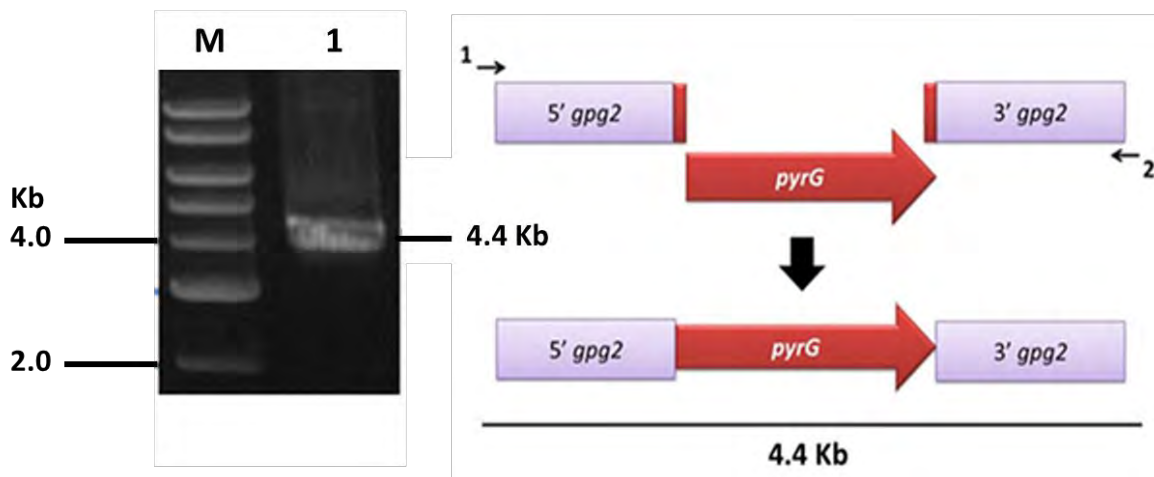


Figura 8. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' *gpg2* y 3'*gpg2* del gen *gpg2*. En el carril uno se muestra el marcador 1 kb plus DNA-Ladder. En el carril 2 se puede observar la banda correspondiente al tamaño esperado de 4.4 Kb del fragmento recombinante Rgpg2-pyrG.

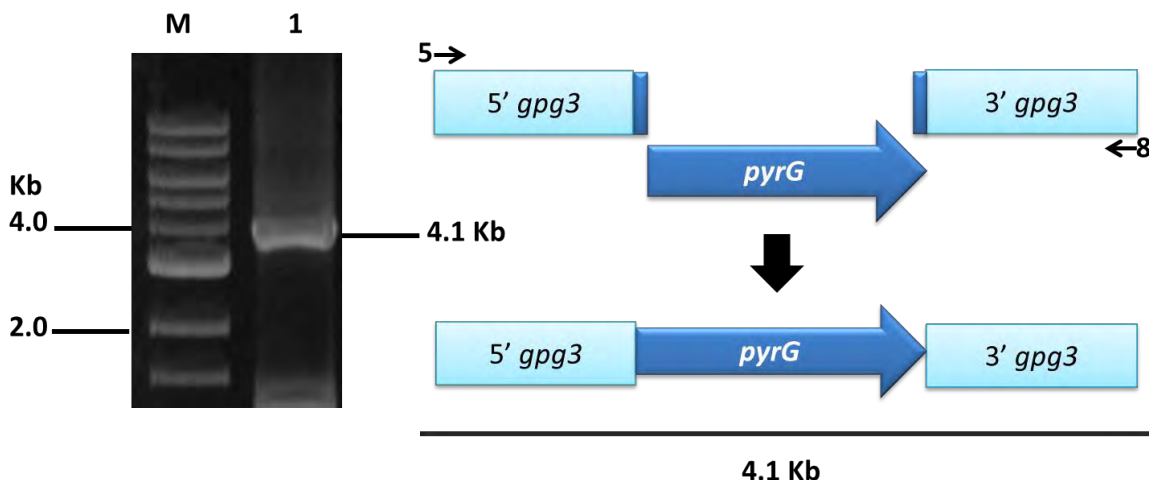


Figura 9. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5'gpg3 y 3'gpg3 del gen gpg3. En el gel se puede observar al marcador 1 Kb plus DNA-Ladder y en el carril 1 la banda de amplificación de 4.1 Kb correspondiente para el fragmento recombinante Rgpg3-pyrG.

7.3 Clonación de los fragmentos recombinantes en el vector comercial pCR®-Blunt II-TOPO®

Los fragmentos recombinantes (Rgpg2-pyrG y Rgpg3-pyrG) obtenidos en las diferentes PCR en fusión, fueron clonados en el vector pCR®-Blunt II-TOPO®, como se menciona en la sección de materiales y métodos.

Las reacciones de ligación fueron utilizadas en la transformación de las células competentes de *E.coli*. De las cuales se seleccionaron las colonias de color blanco obtenidas a las 24 horas. Para realizar una reacción de PCR con los oligonucleótidos (1)Gpg2-UFwd y (2)Gpg2-DRev para corroborar la presencia del fragmento Rgpg2-pyrG, de las 5 colonias seleccionadas se obtuvieron 3 que contaban con el fragmento (**Figura 10A**).

Las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio líquido LB + Kanamicina (10 µg/mL), para posteriormente realizar el aislamiento del plásmido. Una vez obtenido el plásmido, se realizó la alineación del mismo, utilizando a la enzima de restricción *SmaI* debido a que solo contiene un corte dentro de la secuencia del plásmido, esto para corroborar el tamaño del plásmido TOPO-Rgpg2-pyrG (**Figura 10C**); en la **Figura 10B** se puede apreciar el corrimiento electroforético del plásmido antes y después de la digestión con la enzima *SmaI*.

Para el caso del fragmento recombinante Rgpg3-pyrG, se obtuvieron 10 colonias, a las cuales se les realizó el PCR con los oligonucleótidos (7)Gpg3-U-Fwd y (8)Gpg3-D-Rev (**Figura 11A**), para corroborar la presencia de este fragmento, obteniendo 4 colonias positivas seleccionando 3, las cuales tenían las bandas de mayor intensidad. Posteriormente se realizó el aislamiento de DNA plasmídico de estas colonias, los cuales fueron llevados a digestión con la enzima *SmaI* para corroborar el tamaño del plásmido TOPO-Rgpg2-pyrG (**Figura 11C**); en la **Figura 10B** se muestra la electroforesis del plásmido previo y posterior a la digestión enzimática.

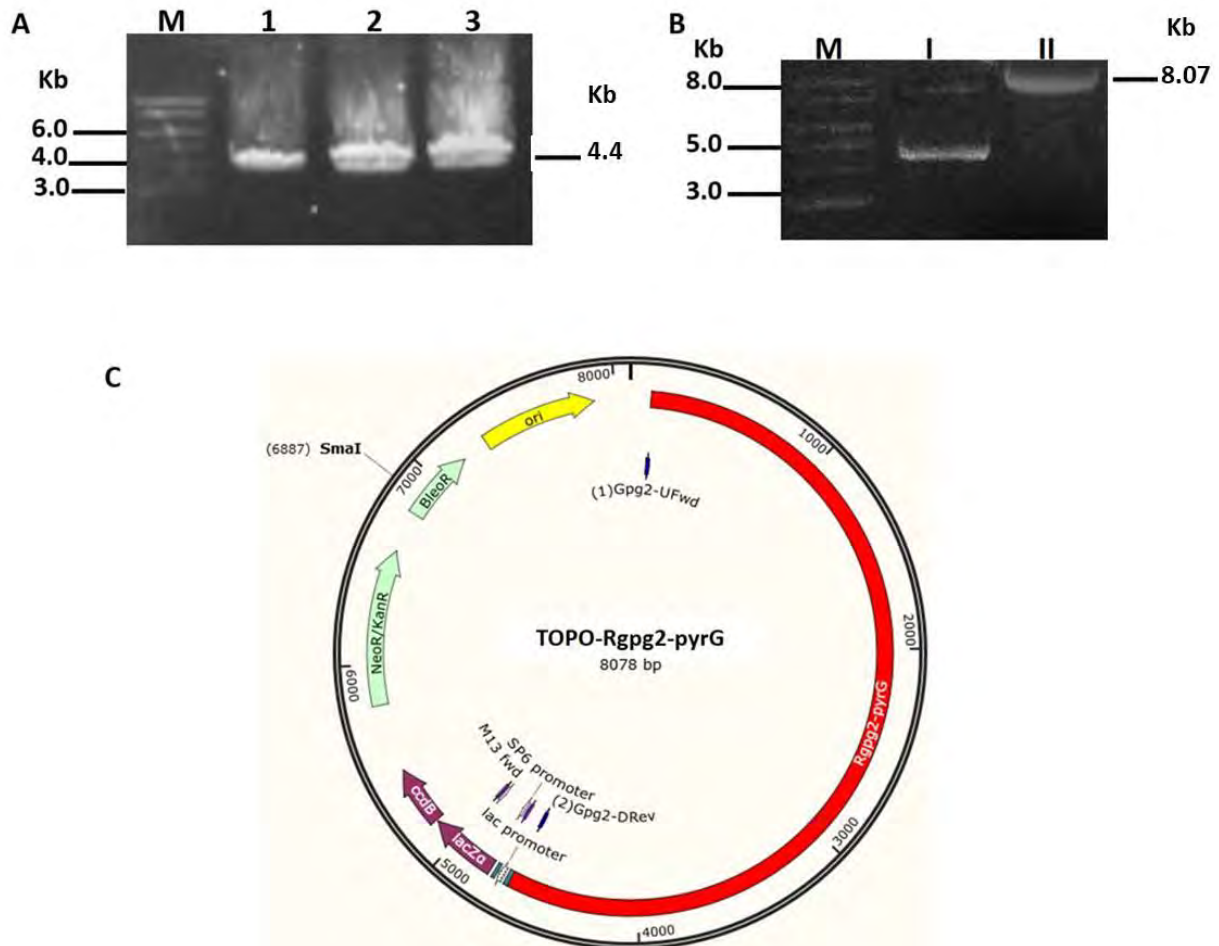


Figura 10. Clonación del fragmento recombinante Rgpg2-pyrG en el vector pCR®-Blunt II-TOPO®. **A)** Electroforesis de los productos de PCR de las 3 colonias positivas para el fragmento recombinante Rgpg2-pyrG (4.4 Kb). **B)** Electroforesis del plásmido TOPO-Rgpg2-pyrG I. Sin digerir. II. Digerido con la enzima *SmaI* (8.07 Kb). **C)** Mapa del vector Topo-Rgpg2-pyrG que muestra el sitio único de restricción de la enzima *SmaI*.

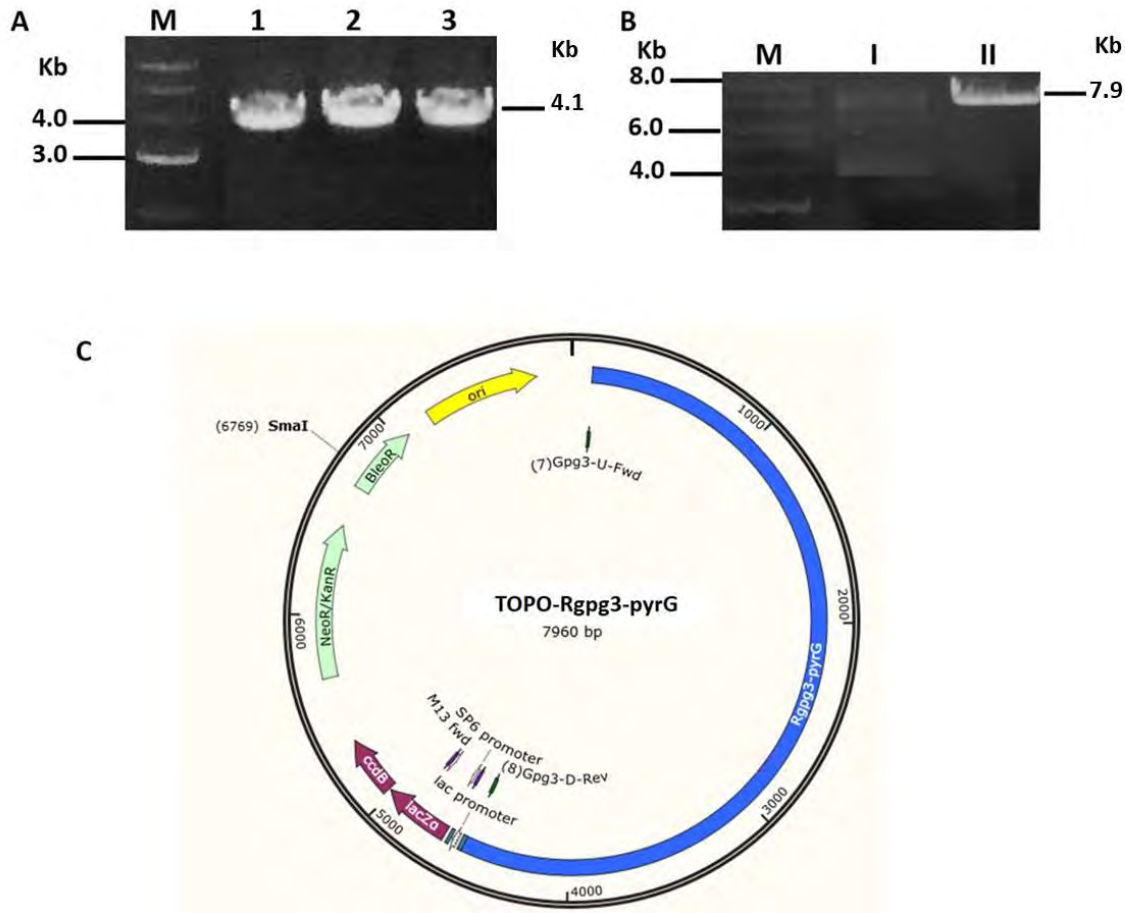


Figura 11. Clonación del fragmento recombinante Rgpg3-pyrG en el vector pCR®-Blunt II-TOPO®. **A)** Electroforesis de los productos de PCR de las 3 colonias positivas para el fragmento recombinante Rgpg3-pyrG (4.1 Kb). **B)** Electroforesis del plásmido TOPO-Rgpg3-pyrG I. Sin digerir II. Digerido con la enzima *SmaI* (7.9 Kb). **C)** Mapa del vector Topo-Rgpg3-pyrG que muestra el sitio único de restricción de la enzima *SmaI*.

7.4 Corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ por PCR

Una vez clonados los fragmentos recombinantes, se realizaron reacciones de PCR para obtener una concentración mínima de 3 μ g totales en un volumen de 10 μ L para la transformación de los protoplastos de la cepa MU402. Una vez realizado el evento de transformación, se obtuvieron cultivos monoespóricos de las probables transformantes. Posteriormente, con la finalidad de demostrar que el fragmento recombinante Rgpg2-pyrG se recombino en el locus correcto eliminando del genoma el gen *gpg2*, se realizó la corroboración de las mutantes por medio de reacciones de PCR independientes. De igual manera se corroboró mediante PCR la correcta inserción del fragmento recombinante Rgpg3-pyrG y la eliminación del gen *gpg3* en la mutante $\Delta gpg3$.

Para realizar las reacciones de PCR, se realizó la extracción de DNA genómico de las 2 supuestas transformantes obtenidas en el medio de selección posterior a los cultivos monoespóricos. Para la primera reacción se utilizaron los oligonucleótidos P1/P2 para corroborar la cepa $\Delta gpg2$, los cuales amplificaron a un fragmento de 2 Kb, en caso de que el fragmento recombinante se hubiese insertado correctamente en la orientación 5'; ya que el oligonucleótido P1 se encuentra 181 pares de bases río arriba fuera de la inserción del fragmento recombinante y el oligonucleótido P2 tiene su secuencia de hibridación dentro del gen marcador *pyrG* entre las posiciones 746-765 (**Figura 12**). En una segunda reacción de PCR, el oligonucleótido P3 hibrida dentro de la secuencia del gen *pyrG* entre las posiciones 1457-1476, y el oligonucleótido P4 hibrida a 50 pb río abajo dentro de la inserción del fragmento recombinante. Se observó la amplificación del fragmento en ambas mutantes con un fragmento de amplificación de 4.5 kb. Para la tercera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos P1/P4; la amplificación fue positiva tanto en las cepas transformantes y silvestre, ya que los oligonucleótidos están fuera del fragmento recombinante, por lo que se generaron amplicones con una variación en sus tamaños.

Para la cepa silvestre se amplificó un fragmento de 2.9 Kb, mientras que para la transformante se generó un fragmento de 4.5 Kb. Para la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos P5 y P6 los cuales están diseñados para amplificar al gen *gpg2* el cual posee 0.3 Kb; las cepas transformantes no tuvieron amplificación, mientras que la cepa silvestre generó el amplicón debido a que conserva el gen silvestre *gpg2* (**Figura 12**).

Después de observar todas las bandas de amplificación esperadas podemos comprobar que efectivamente se realizó la correcta eliminación del gen *gpg2* del genoma de la ahora mutante $\Delta gpg2$. Cabe mencionar que se obtuvieron dos clonas mutantes en *gpg2*: $\Delta gpg2T1$ y $\Delta gpg2T2$.

Para el caso de la corroboración de la cepa $\Delta gpg3$, se realizaron las cuatro diferentes reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos P7/P2 para la obtención de un fragmento de 1.9 Kb para la verificación del extremo 5', en la segunda reacción se utilizaron los oligonucleótidos P3/P8 para la verificación del extremo 3' en la cual se obtuvo un fragmento de 1.9 Kb. En la reacción 3 se utilizaron los oligonucleótidos P7/P8 los cuales amplificaron un fragmento de 4.1 Kb en la cepa mutante y 2 Kb en la cepa silvestre (MU402). Como cuarta reacción, se utilizaron P9/P10 los cuales amplificaron al ORF del gen *gpg3* de 0.3 Kb en la cepa silvestre (MU402), mientras que en las dos clonas mutantes obtenidas no existió amplificación, por lo que podemos decir que obtuvimos a nuestra cepa mutante, ya que la eliminación del gen *gpg3*, fue correcta (**Figura 13**).

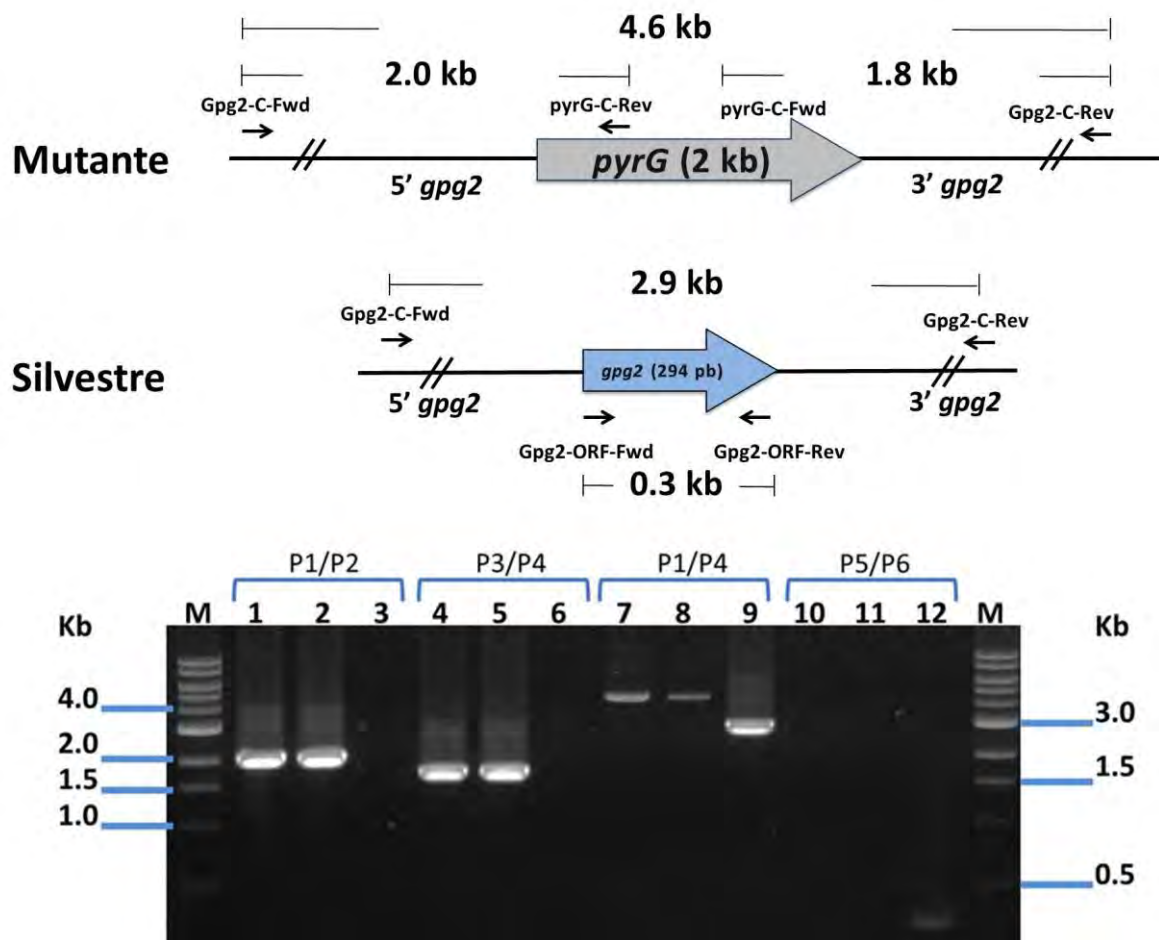


Figura 12. Corroboración de la mutación en el gen *gpg2* mediante PCR. En los carriles 1 y 2 se muestran el resultado del PCR con los oligonucleótidos P1/P2 que amplifican una banda de 2.0 Kb en dos transformantes ($\Delta gpg2$ T1 y $\Delta gpg2$ T2) y en el carril 3 a la cepa silvestre MU402. En los carriles 4 y 5 se muestra el resultado de una segunda reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos P3/P4 que amplificaron un fragmento de 1.8 Kb en las transformantes y en el carril 6 para MU402. Una tercera reacción de PCR con los oligonucleótidos P1/P4, se muestra en los carriles 7 y 8 observando una banda de 4.6 Kb, en las transformantes ($\Delta gpg2$ T1 y $\Delta gpg2$ T2) mientras que en carril 9 la cepa silvestre MU402 se observó un fragmento de 2.9 kb. En la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos P5/P6 que amplifican al ORF del gen *gpg2*, en los carriles 10-12 observando en este último la banda correspondiente al gen *gpg2* de 0.3 Kb para la cepa silvestre.

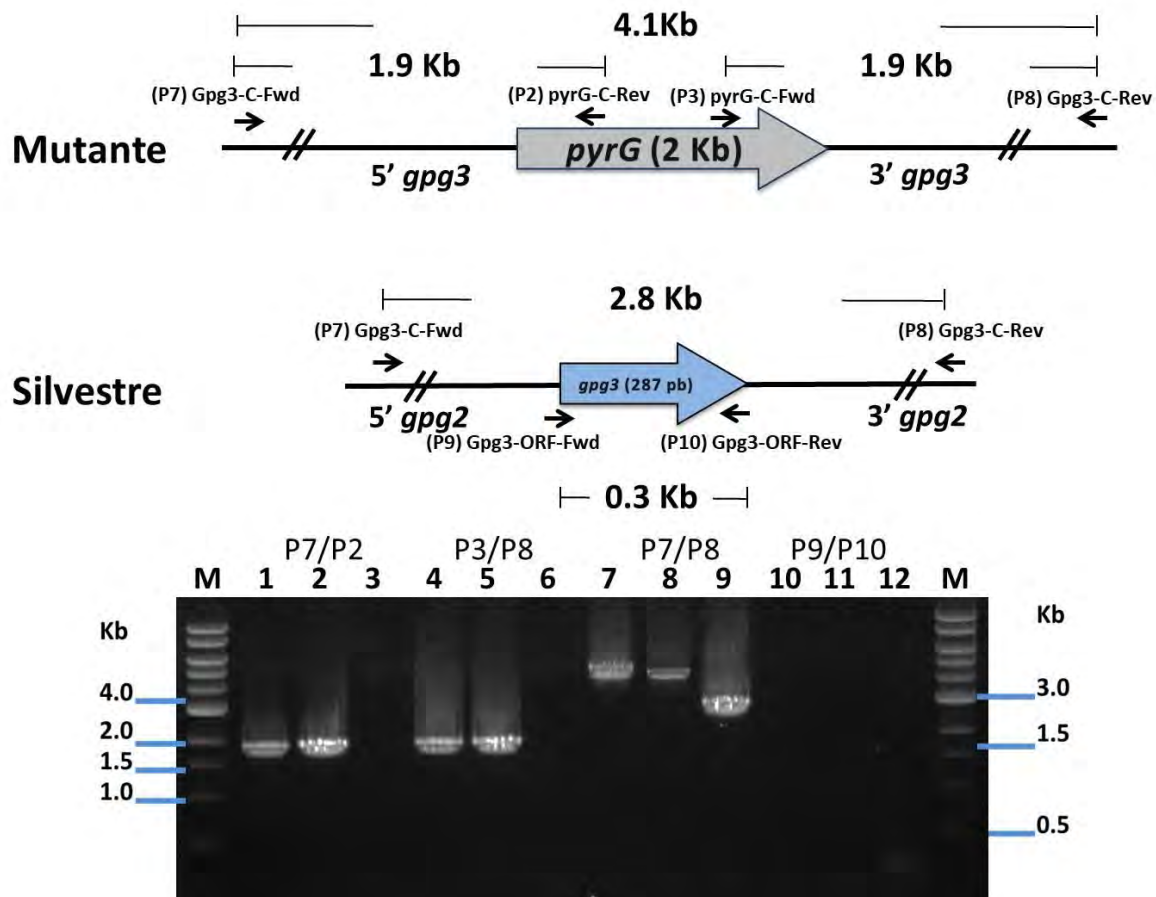


Figura 13. Corroboración de la mutación en el gen *gpg3* mediante PCR. En los carriles 1 y 2 se muestra el producto de PCR de 1.9 Kb con los oligonucleótidos P7/P2 en las dos transformantes ($\Delta gpg3$ T1 y $\Delta gpg3$ T2) y el carril 3 corresponde a la cepa silvestre MU402. En la segunda reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos P3/P8 que amplificaron un fragmento de 1.9 Kb, en los carriles 4 y 5, en ambas transformantes y el carril 6 corresponde a la cepa silvestre. Una tercera reacción de PCR con los oligonucleótidos P7/P8, que se muestra en los carriles 7 y 8 observándose una banda de 4.1 Kb en las transformantes ($\Delta gpg3$ T1 y $\Delta gpg3$ T2) mientras que en el carril 9 (MU402), se observó un fragmento de 2.8 Kb. Para la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos P9/P10 que amplificaron al ORF del gen *gpg3*, en carriles 10 y 11 ($\Delta gpg3$ T1 y $\Delta gpg3$ T2), y en el carril 12 se muestra la amplificación de 0.3 Kb para la cepa silvestre MU402.

7.5 Corroboración de la ausencia del transcrito de los genes *gpg2* y *gpg3* en las clonas mutantes de $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ respectivamente

Para corroborar la ausencia de transcrito de el gen *gpg2* (el cual fue eliminado) en las diferentes clonas mutantes $\Delta gpg2$, se realizó una extracción de RNA total a partir de las esporas de las cepa silvestre MU636 y las clonas mutantes de $\Delta gpg2$ ($\Delta gpg2T1$ y $\Delta gpg2T2$); a las cuales posteriormente se midió la cantidad de expresión del transcrito del gen *gpg2* por medio de una reacción de RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos (directo y reverso) y la sonda del gen *gpg2* mostradas en la **Tabla 9** en la sección de Materiales y Métodos. No existe acumulación del transcrito en las esporas de las mutantes $\Delta gpg2T1$ y $\Delta gpg2T2$ (**Figura 14**), por lo que podemos asumir que son mutantes homocariontes en el gen *gpg2*.

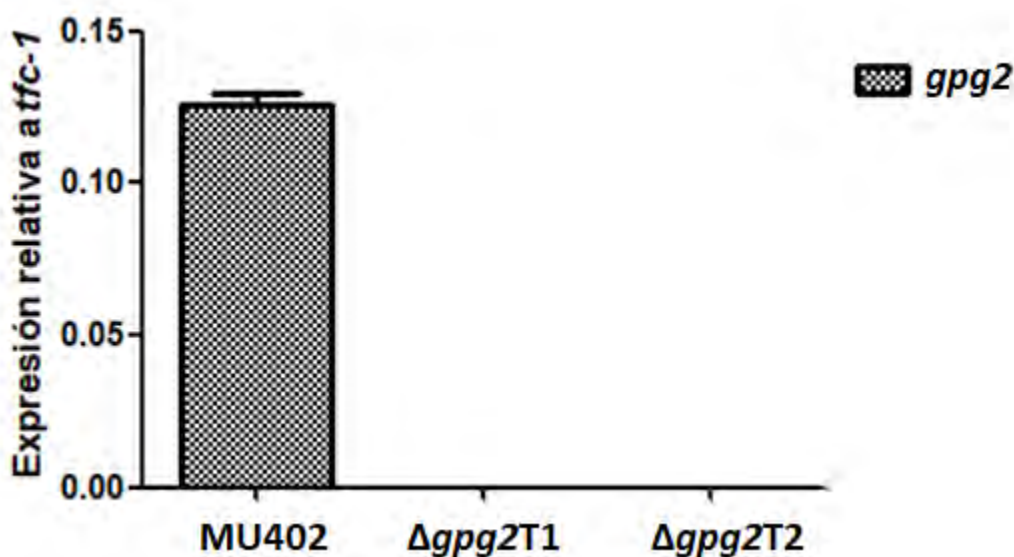


Figura 14. Corroboración de las mutantes $\Delta gpg2$ mediante RT-qPCR. Cepa silvestre MU402 (Control +) y las dos clonas mutantes $\Delta gpg2$. El RNA total fue obtenido a partir de esporas de las diferentes mutantes $\Delta gpg2T1$ y $\Delta gpg2T2$ y de la cepa MU402. Se usaron sondas específicas para el gen *gpg2* y del gen *tfc-1* (**Tabla 10**) el cual fue usado como gen normalizador en los ensayos de expresión. Experimento realizado 3 veces de forma independiente.

Para corroborar la eliminación del gen *gpg3*, se evaluó la presencia de transcrito (RNA_m) en las esporas de las cepas transformantes ($\Delta gpg3$ T1 y $\Delta gpg3$ T2). Se realizó la extracción de RNA total de las esporas de las mutantes y la cepa silvestre MU636, para evaluar la presencia del transcrito del gen *gpg3* por medio de RT-qPCR (**Figura 15**), utilizando los oligonucleótidos y la sonda mostradas en la **Tabla 9** de la sección de Materiales y Métodos. Al no existir presencia del transcrito en ninguna de las clonas mutantes, podemos argumentar que las mutantes son homocariontes en el gen *gpg3*.

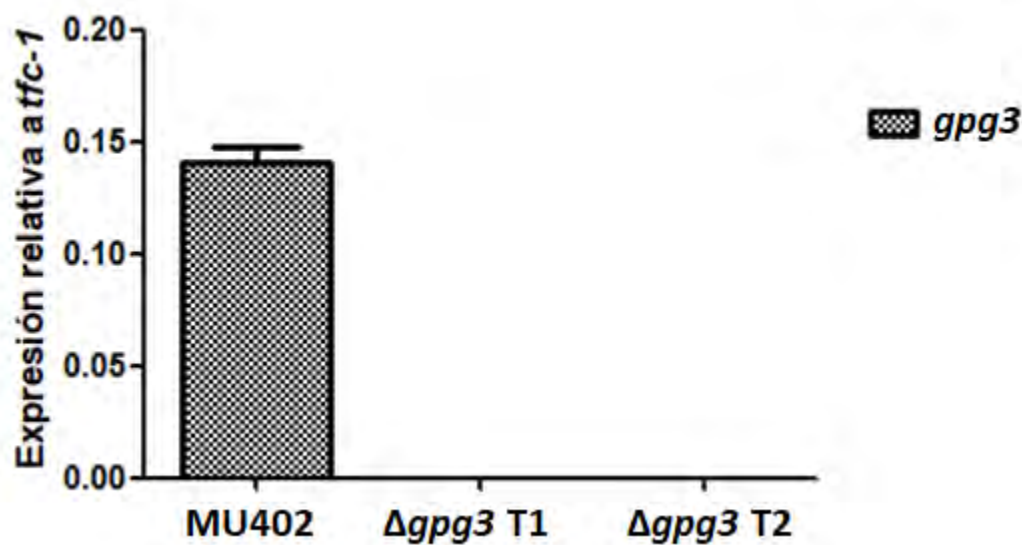


Figura 15. Corroboración de las mutantes $\Delta gpg3$ mediante RT-qPCR. Cepa silvestre MU402 (Control +) y las dos clonas mutantes $\Delta gpg3$. El RNA total fue obtenido a partir de esporas de las diferentes mutantes ($\Delta gpg3$ T1 y $\Delta gpg3$ T2) y de la cepa MU402. Se usaron sondas específicas para el gen *gpg3* y del gen *tfc-1* (**Tabla 10**) el cual fue usado como gen normalizador en los ensayos de expresión. Se realizó el experimento 3 veces de manera independiente.

7.6 Caracterización de las mutantes $\Delta gpg1-3$

Posterior a la corroboración de las mutantes, se prosiguió a realizar la caracterización de las mismas en conjunto de otras dos mutantes $\Delta gpb1$ (**Valle-Maldonado y col., 2020** manuscrito en **revisión**) y $\Delta gpg1$ (**Reyes-Mares 2017 Datos sin publicar**) las cuales ya se habían generado en trabajos previos.

Dentro del grupo de trabajo se describió que la mutante $\Delta gpb1$, es una cepa menos virulenta que la cepa silvestre de *M. circinelloides* (**Valle-Maldonado y col., 2020Revisión**), quizás debido a la deficiencia en el crecimiento micelial, recordando que esta es la morfología virulenta, además de la incapacidad de formar adecuadamente micelio en condiciones de baja tensión de oxígeno. Por otra parte, el paradigma establece que la subunidad Gpb necesita estar unidas a una subunidades Gpg para formar un dímero funcional y poder alterar una vía de transducción de señales involucrada en una función determinada.

Con la finalidad de encontrar a la subunidad gama de *M. circinelloides* que interaccione con la subunidad Gpb1, se prosiguió a caracterizar fenotípicamente en diferentes contextos a las cepas mutantes $\Delta gpg1$, $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ con respecto a la cepa silvestre MU636 (Control) y a la cepa $\Delta gpb1$, para encontrar correlaciones en alteraciones fisiológicas entre estas subunidades.

7.6.1 Crecimiento aeróbico en sustrato sólido en medio rico YPG y medio mínimo YNB de las cepas mutantes $\Delta gpg1-3$.

Con el fin de conocer si es que alguna de las mutantes posee alguna deficiencia o eficiencia en el desarrollo micelial se procedió a evaluar el crecimiento radial en sustrato sólido. Para lo cual se utilizaron dos medios en los que se varió la fuente de nitrógeno, siendo orgánica (peptona de gelatina) para el medio rico YPG e inorgánica (sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$) para el medio mínimo YNB.

Se inocularon 100 esporas de manera central de las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpgs$, en placas con los medios mencionados y se midió la longitud de la colonia (diámetro), diariamente durante 6 días (tiempo necesario para cubrir el área superficial de la placa). Al final del ensayo no se observaron diferencias significativas de las mutantes con respecto al control (MU636) (Figuras 16 y 17).

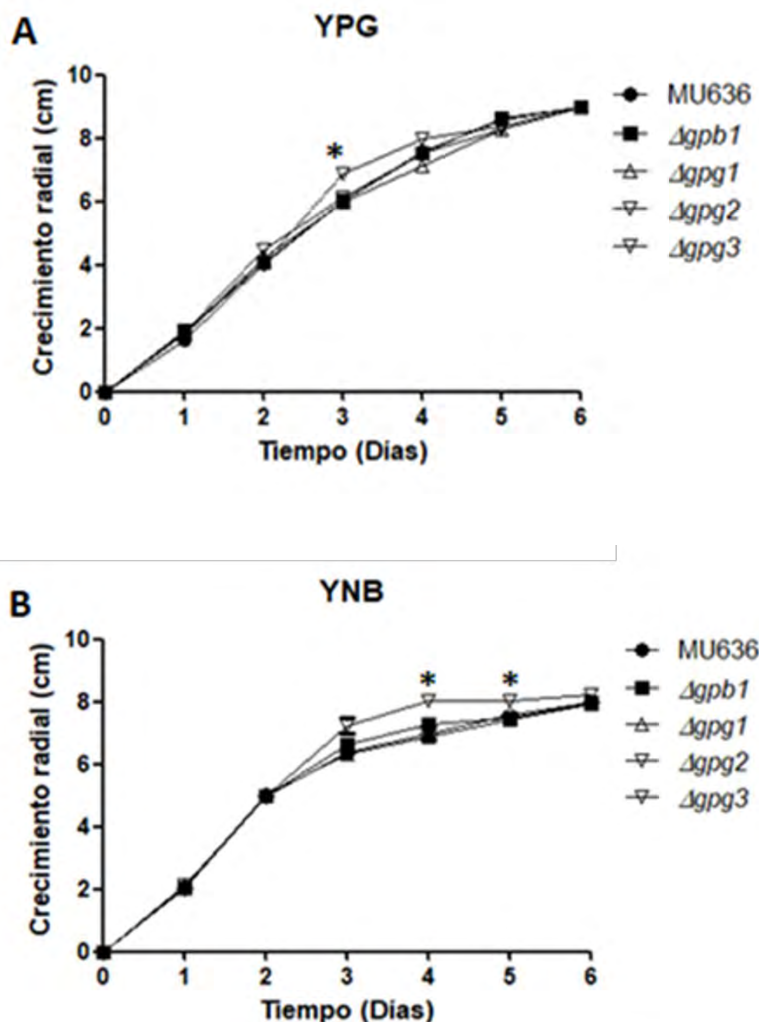


Figura 16. Efecto de la mutación de los genes *gpb1* y *gpg1-3* en el crecimiento radial en sustrato sólido. A) Se inocularon 100 esporas en medio sólido YPG, se evaluó el diámetro durante 6 días post-inoculación. **B)** Se inocularon 100 esporas en medio sólido YNB, se evaluó el diámetro durante 6 días post inoculación, n=4, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher $p < 0.05$.

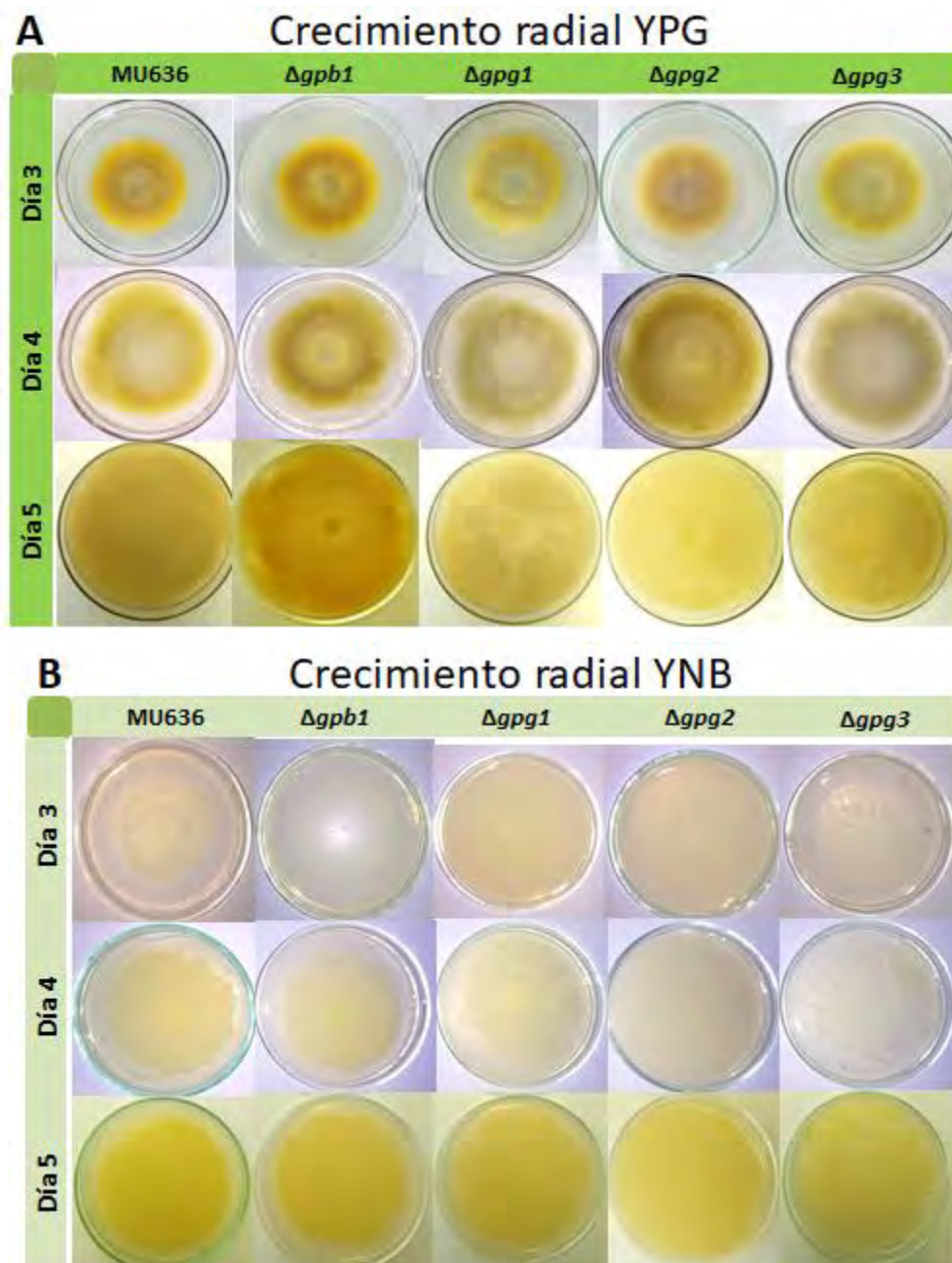


Figura 17. Morfología colonial del crecimiento radial en sustrato sólido de las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1-3$. **A)** Se observan las fotografías del crecimiento radial de las cepas MU636 (silvestre) y las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1-3$, en medio rico YPG de los días 3-5 post-inoculación. **B)** Se observan las fotografías del crecimiento radial de las cepas MU636 (silvestre) y las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1-3$, en medio mínimo YPG de los días 3-5 post-inoculación. El experimento se realizó con una n=4.

7.6.2 Crecimiento en sustratolíquido en medio rico YPG en aerobiosis y anaerobiosis de las cepasmutantes $\Delta gpg1$ -3

Al no obtener diferencias significativas en los crecimientos en sustrato sólido, se prosiguió al evaluar la velocidad de germinación de las diferentes mutantes en medio líquido YPG (medio rico). Recordando que *M. circinelloides* es un hongo dimórfico, el cual puede desarrollar dos estadiosdiferentes, según las condiciones de cultivo en las que este se encuentre. Además de que se han caracterizado diferentes subunidades de proteínas G heterotriméricas en la morfogénesis en otros hongos.

Se evaluó la generación de hifas en aerobiosis y levaduras en anaerobiosis a diferentes tiempos (**Figura 18**).

En la **Figura 18A** se puede apreciar que en la germinación en aerobiosis existe una diferencia muy discreta a la hora 3, en la cual se observó un mayor porcentaje de germínulas, por parte de las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$ en comparación con la cepa silvestre. En la **figura 18B** podemos observar que a las 2 horas las cepas $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ tienen una mayor germinación en anaerobiosis en comparación con el control (MU636). Además, observamos que la cepa $\Delta gpg1$, tuvo un comportamiento similar en la germinación anaerobia en comparación con la cepa $\Delta gpb1$ y a la cepa silvestre (MU636), indicando que la ausencia de Gpb1 y Gpg1 no tuvo una diferencia en el crecimiento levaduriforme.

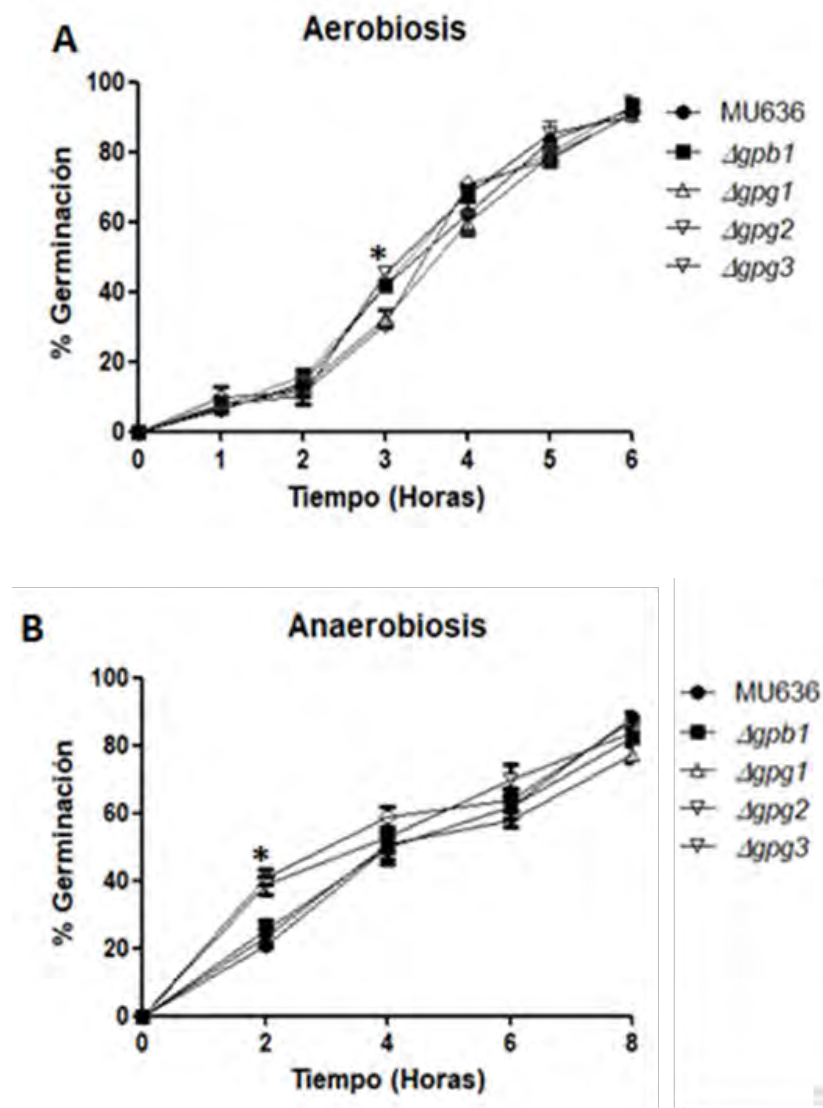


Figura 18. Efecto de la mutación de los genes *gpb1* y *gpg1-3* de *M. circinelloides* sobre la germinación. Se inocularon 5×10^5 esporas/mL en medio YPG, se registró la germinación en: **A)** Aerobiosis cada hora durante 6 horas. **B)** Anaerobiosis a las 2, 4, 6 y 8 horas de crecimiento. $n=3$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher $p<0.05$.

7.6.3 Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 de *M. circinelloides* en el crecimiento en baja tensión de oxígeno

Dentro del grupo de trabajo se ha evaluado la participación de la subunidad Gpb1 de *M. circinelloides* en el crecimiento a bajas revoluciones (50 rpm), generando una baja tensión de oxígeno en el medio. En estas condiciones la cepa silvestre genera la formación de germínulas (hifas) en un 90% y levaduras en un 10%. Siendo la mutante $\Delta gpb1$, quien genera mayor cantidad de levaduras 70 % en comparación con la cepa silvestre (Valle-Maldonado y col., 2019 En revisión).

Con la finalidad de conocer que subunidad gama genera un fenotipo similar a la subunidad Gpb1 de *M. circinelloides* en esta condición, se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG en matraces, los cuales se incubaron a 28 °C a 50 rpm, durante 6 horas y se recuperaron las esporas germinadas para determinar la proporción de levaduras e hifas en el medio (Figura 19).

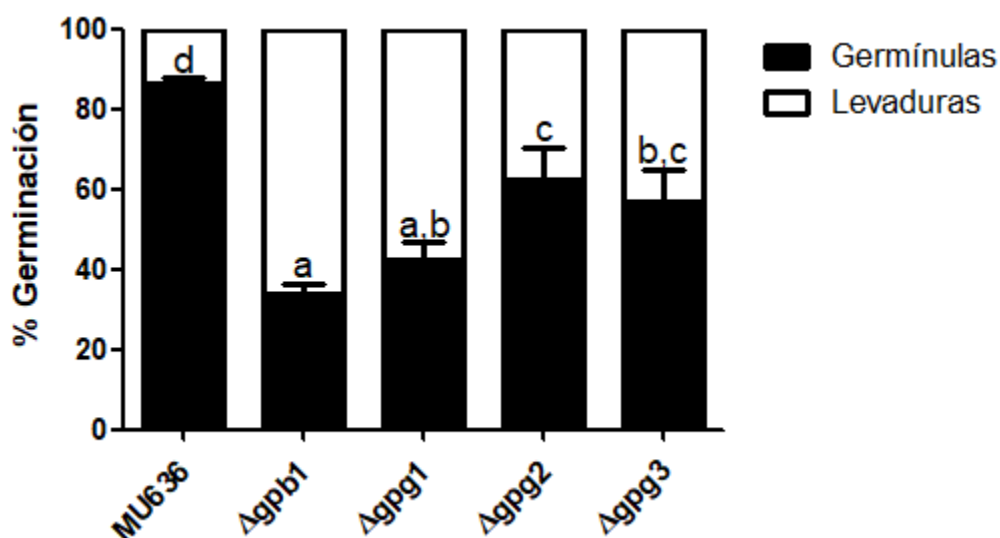


Figura 19. Efecto de la mutación de los genes *gpb1* y *gpg1-3* de *M. circinelloides* en la germinación a baja tensión de oxígeno. Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG, las cuales se incubaron a 28 °C con una agitación de 50 rpm por 6 horas, posteriormente se realizó una cuenta diferencial de germínulas (hifas) y levaduras. n=4, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher $p < 0.05$.

7.6.4 Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 en el dimorfismo de *M. circinelloides*

Las transiciones morfológicas, revelan la capacidad de un microorganismo dimórfico de responder y adaptarse a las condiciones presentes en el ambiente que lo rodea. Por lo que se evaluaron las diferentes mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpgs$ en las transiciones de levadura a micelio y de micelio a levadura.

Como podemos observar en el ensayo de la transición de levadura a micelio (**Figura 20A**) la cepa $\Delta gpb1$ es la que se encuentra más retardada en realizar dicha transición, en comparación con las demás cepas incluyendo el control. Pero en la transición de micelio a levadura en la **Figura 20B** las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$ presentan el mismo comportamiento realizando la transición de manera más rápida, por lo que esto puede ser relacionado con su capacidad virulenta, ya que una mayor tendencia a formar levaduras puede convertirlas en cepas menos virulentas que la silvestre. Dentro del mismo ensayo nos percatamos que la cepa $\Delta gpg3$ no realiza eficientemente esta transición y se queda estancada por debajo de las demás cepas (**Figura 20B**).

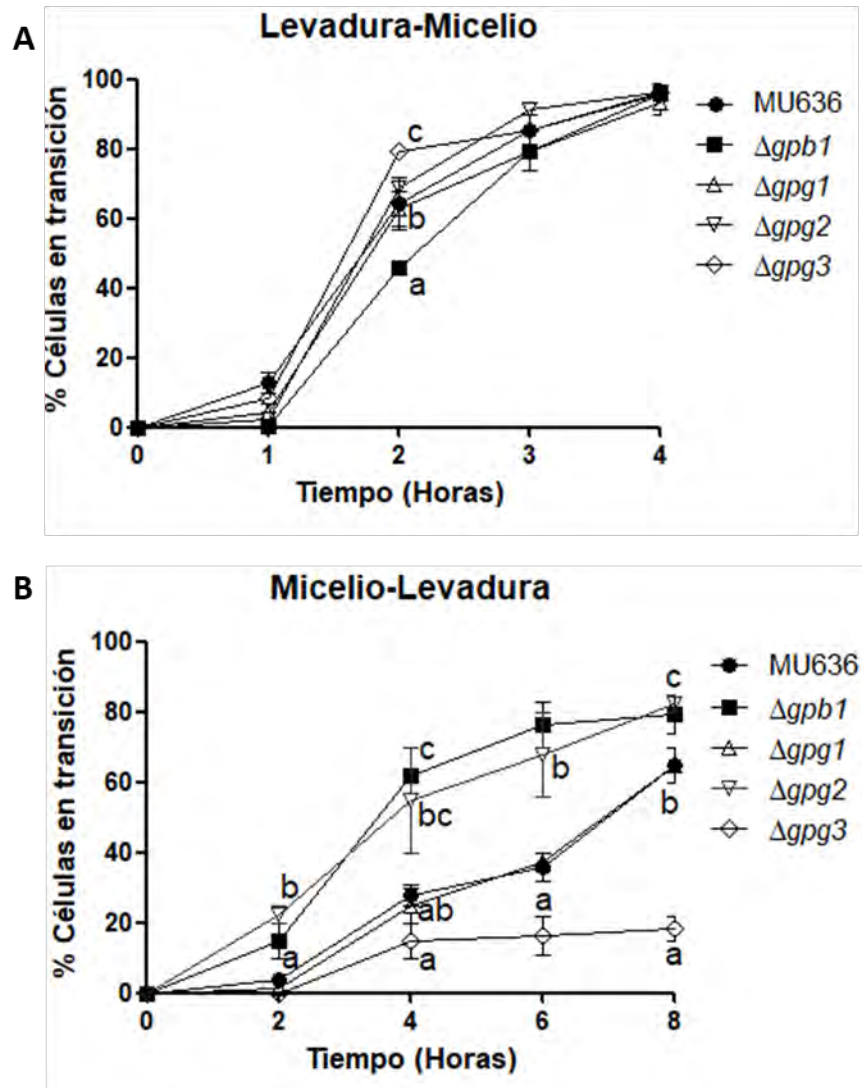


Figura 20. Efecto de la mutación de los genes *gpb1* y *gpg1-3* en el dimorfismo de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG. **A)** Se muestra el porcentaje de células en transición de levadura a micelio. **B)** Se muestra el porcentaje de células en transición de micelio a levadura. $n=2$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p<0.05$.

7.6.5 Participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1-3 en la virulencia de *M. circinelloides*

Como se ha mencionado en los antecedentes, la cepa $\Delta gpb1$ es menos virulenta que la cepa silvestre (MU636). Por lo que es necesario conocer a la subunidad Gy que pueda estar correlacionando en este contexto con la subunidad Gbpb1.

Para lograr esto se realizó un ensayo de supervivencia con el modelo *C. elegans*, en el cual se colocaron de 15-20 nematodos en 1 mL de medio YPG y se les inoculó 1×10^3 esporas de las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpgs$. Se realizó conteo de nematodos vivos cada 12 h, por las siguientes 48 h, para reportar supervivencia. Como podemos observar, en la supervivencia no existen diferencias de las cepas mutantes respecto a la cepa silvestre (**Figura 21A**).

Debido al dato anterior, se realizó otro ensayo similar en el cual se recuperaron los nematodos a las 24 horas post infección con las distintas cepas, se realizó la extracción de RNA total de los nematodos y se cuantificó la expresión de genes *HSP3* y *HSP4*, los cuales codifican para chaperonas homologas de BIP involucrada en estrés celular (**Cerezo y col., 2016**) en *C. elegans*. Cuando se realizó el análisis de los marcadores de estrés celular, se observó que las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$, causaron los menores niveles de RNA m de los marcadores de estrés en el nematodo, respecto a la cepa silvestre (**Figura 21B**). Por lo que podemos sugerir que estas cepas ($\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$) son menos virulentas que la cepa silvestre, lo que podría suponer que estas subunidades participan juntas en la regulación positiva de la virulencia.

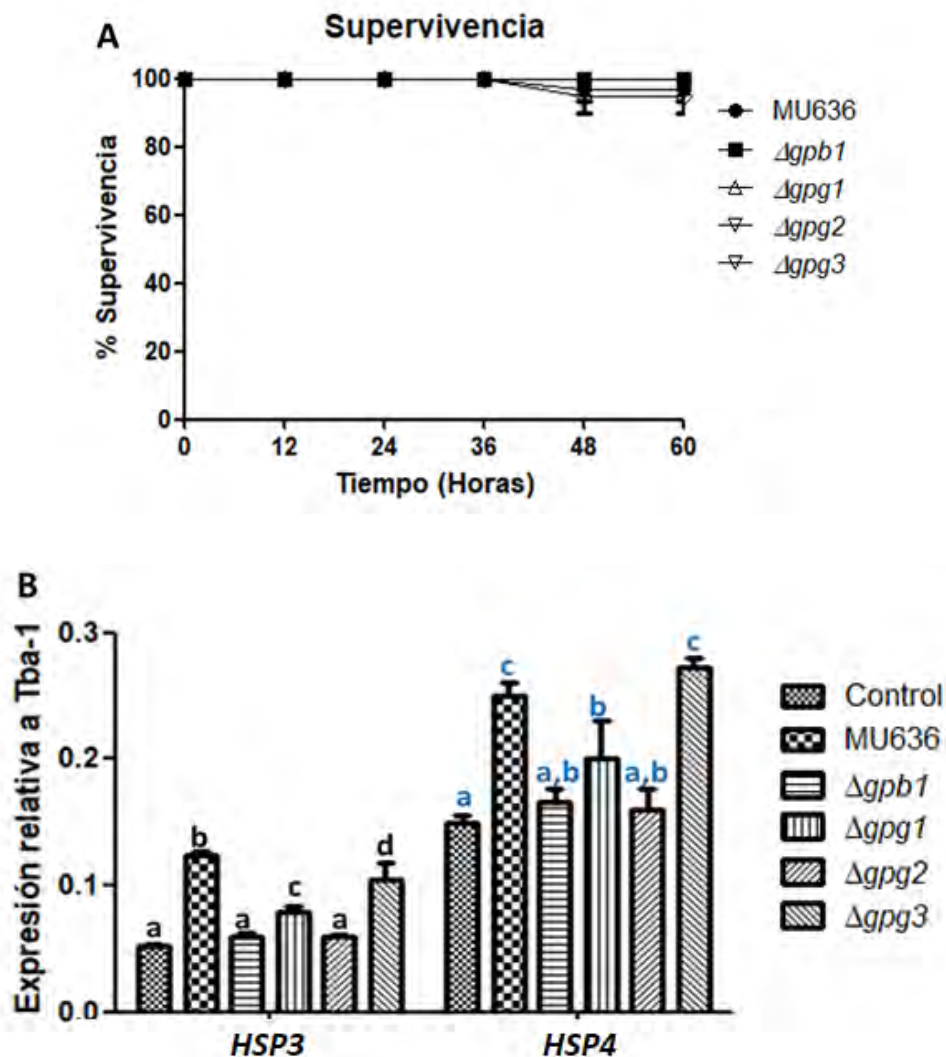


Figura 21. Efecto de la mutación de los genes *gpb1* y *gpg1-3* sobre la virulencia de *M. circinelloides*. Se inocularon 1×10^3 esporas por cada mL de medio YPG, en placas de 24 pozos con 15-20 nematodos (*C. elegans*). **A)** Se muestra el ensayo de supervivencia el cual se monitoreo cada 12 h durante 60 h, y se reportó la supervivencia de los nematodos. **B)** Se realizó el mismo ensayo durante 24 h, a este tiempo se recuperaron los nematodos para realizar RT-qPCR, para medir los niveles de RNAm de los genes *HSP3**HSP4* de *C. elegans*. El control está dado por nematodos en el medio YPG sin presencia de esporas $n=2$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p<0.05$.

8. Discusión

M. circinelloides posee tres genes diferentes (*gpb1-gpb3*) que codifican para subunidades beta de proteínas G heterotriméricas y tres diferentes genes (*gpg1-gpg3*) que codifican para subunidades gama de proteínas G heterotriméricas (Valle-Maldonado y col., 2015) de los cuales solamente se ha evaluado al gen *gpb1* en contextos de morfogénesis y virulencia (Valle-Maldonado y col., 2020 en revisión). Por lo que en este trabajo se evaluó la participación de los genes *gpgs* en el contexto del dimorfismo y la virulencia. Debido a que el paradigma establece que las subunidades G β necesitan de una subunidad G γ para poder formar un dímero funcional (Tesmer, 2010), se evaluaron fenotípicamente en la morfogénesis y virulencia, todas las cepas mutantes en los genes *gpgs*, a la par de la mutante en el gen *gpb1*, con la finalidad de encontrar correlaciones fenotípicas de la mutación en el gen *gpb1* con alguna subunidad G γ lo cual podría sugerir una posible interacción.

Las identidades de las diferentes subunidades gama de proteínas G heterotriméricas de *M. circinelloides* con la subunidad STE18p de *Saccharomyces cerevisiae* (Versele y col., 2001) van de 32.5 al 34.2%, además no existe una diferencia marcada entre los porcentajes de identidad y similitud de las tres subunidades de *M. circinelloides*, la subunidad Gpg2 tiene una identidad del 54.7 % con la subunidad Gpg1, mientras que la Gpg2 con Gpg3 muestran 60.5 % de identidad. Por lo que se evaluó la acumulación de transcrito de los genes que codifican para estas subunidades, resultando el gen *gpg2* el que más transcrito acumulaba (Valle-Maldonado y col., 2013) en los diferentes estadios del hongo, especialmente en la fase micelial.

Las tres mutantes en los genes gama no generaron un defecto absoluto en la morfogénesis. Sin embargo durante la transición micelio-levadura la cepa $\Delta gpg3$ fue incapaz de generar más de un 20 % de células en transición, quizás porque es incapaz de cambiar eficientemente a un metabolismo fermentativo de manera eficiente cuando se ha comprometido a realizar un metabolismo oxidativo.

La ausencia de un defecto en el fenotipo de manera absoluta por parte de las distintas cepas mutantes en los genes *gpgs* sugiere que probablemente hay un mecanismo compensatorio que se activa cuando se anula un gen que pertenece una familia de genes. Se ha descrito en *M. circinelloides* que la mutación de *arf3* o de *arf4*, dos genes que codifican para proteínas Arf (ADP-Ribosylation factor) no generan un defecto evidente durante el crecimiento micelial. Sin embargo la doble mutación es letal en *M. circinelloides*, generando una doble mutante heterocarionte en el segundo gen eliminado, dicha mutante tiene defectos en la polaridad de la hifa a diferencia de las mutantes sencillas que no muestran defectos en su polaridad (**Patiño-Medina y col., 2018**); o como en como *Cryptococcus neoformans*; en donde las subunidades Gpg1 y Gpg2 regulan positivamente la respuesta a feromonas (**Li y col., 2007**). Por lo que no encontrar un defecto absoluto en la morfogénesis en las 3 mutantes en los genes *gpgs* de *M. circinelloides*, puede deberse a un efecto de redundancia funcional y quizás la generación de cepas doble mutantes podría ayudar a definir una posible función de estas proteínas en la morfogénesis.

Interesantemente durante la transición de micelio a levadura existe una correlación fenotípica entre las mutantes *gpb1* y *gpg2*, en donde ambas mutantes generan células levaduriformes más rápido a partir de hifas (un 55 % a las 4 h), respecto a la cepa silvestre (**Figura 21**). Estos datos quizás sugieren que las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$ cuando generaron hifas y al cambiar a una condición de anaerobiosis son más propensas a desarrollar levaduras respecto a la cepa silvestre quizás por la activación más eficiente de un metabolismo fermentativo.

Ya se ha observado que la cepa $\Delta gpb1$ es más propensa a mantener la morfología levaduriforme durante las transiciones dimórficas respecto a la cepa silvestre (**Valle-Maldonado, Artículo en revisión 2020**). Sin embargo, ninguna cepa mutante sencilla en los genes gama exhibió un fenotipo similar durante la transición levadura a micelio como el mostrado por la cepa mutante en *gpb1*.

Esto sugiere que en la transición levadura-micelio más de una proteína Gpg puede estar asociada con la proteína Gpb1 y la ausencia de una de las tres proteínas Gpg no es suficiente para generar un fenotipo similar a la cepa $\Delta gpb1$, por lo que es necesario la generación de dobles o una triple mutantes en los genes *gpgs* que nos revele una correlación fenotípica durante la transición levadura-micelio como el mostrado por la cepa mutante en *gpb1*.

Por otra parte durante la germinación de las esporas en una condición de bajas concentraciones de oxígeno del 8 % respecto a las condiciones aeróbicas estándar usadas del 17 % de oxígeno. Esta condición de bajo oxígeno genera niveles de oxígeno similares a los encontrados en ciertas áreas o tejidos anatómicos del cuerpo por ejemplo, el peritoneo tiene un 5.3 a 6.7 % (**Renvall y Niinikoski 1980**) de oxígeno, mientras que los intestinos tienen un 7.6 % de oxígeno disponible (**Carreau y col., 2011, Ortíz-Prado y col., 2019**). En estas condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, todas las cepas mutantes en los genes *gpgs* generan una mayor cantidad de levaduras (40-70 %) y una menor cantidad de hifas (30-60 %), respecto a la cepa silvestre la cual genera un 15 % de levaduras y un 85 % de hifas. Mientras que la cepa $\Delta gpb1$ genera un 70 % de levaduras y un 30 % de hifas, estas proporciones de células vegetativas observadas en la mutante en *gpb1* son más similares a la cepa mutante en *gpg1*, sugiriendo que quizás este interactuando Gpb1 preferencialmente con Gpg1 en una condición de bajo oxígeno.

Se ha observado que la mutación en el gen *gpb1* genera un fenotipo menos virulento en modelo de ratón diabético (**Valle-Maldonado, tesis de doctorado en proceso**). Los ensayos en los nematodos revelan que tanto la cepa $\Delta gpb1$ así como las 3 mutantes en los genes *gpgs* generaron un fenotipo avirulento junto con la cepa silvestre, esto revelado por la capacidad de sobrevivencia del nematodo en dicho ensayo (**Figura 20A**). Sin embargo, el uso de un marcador de estrés general como son los genes *HSP3* y *HSP4* que codifican a proteínas homologas de BIP en humano.

BIP es una proteína cuya función es actuar como chaperona residiendo en el retículo endoplásmico. Es una proteína clave en la regulación de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico (RE), este proceso se refiere a las alteraciones que ocurren durante el plegamiento de proteínas en el RE. Son diversos los factores que conducen a un aumento del incorrecto plegamiento de proteínas, como ciertas mutaciones, alteraciones en el metabolismo, factores ambientales, incluso procesos infecciosos, pueden promover un aumento del plegamiento erróneo de proteínas provocando una señalización inflamatoria por parte de las células estresadas (Hasnain y col., 2012). La activación transcripcional del gen BIP se usa ampliamente como marcador biológico para el inicio de la respuesta de estrés del RE (Baumeister y col., 2005).

La exposición de los nematodos a las distintas cepas de *M. circinelloides* nos reveló, que las esporas de las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$, condujo a una menor acumulación en general del transcrito de ambos genes *HSP3* y *HSP4* en el nematodo respecto a las demás cepas mutantes (Figura 20B), dichos niveles siendo más similares sus niveles de RNA a aquellos nematodos que nunca estuvieron en contacto con ninguna cepa. Por lo que prácticamente se podrían considerar avirulentas respecto a la cepa silvestre. Esta correlación de fenotipos avirulentos de las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg2$, sugieren que en esta condición ambas proteínas pueden tener una función similar pudiendo formar un dímero funcional.

Este estudio, aunque preliminar logra sugerir las posibles interacciones de la proteína Gpb1 con Gpg1 y Gpg2, dichas interacciones pudieran ser reguladas espacio temporalmente como lo que se observó, ya que durante el crecimiento en bajos niveles de oxígeno se observa un mayor parecido fenotípico entre la mutación de *gpb1* y *gpg2*; mientras que durante la transición micelio levadura, al igual que durante el proceso virulento las mutantes en *gpb1* y *gpg2* son más similares (Figura 22).

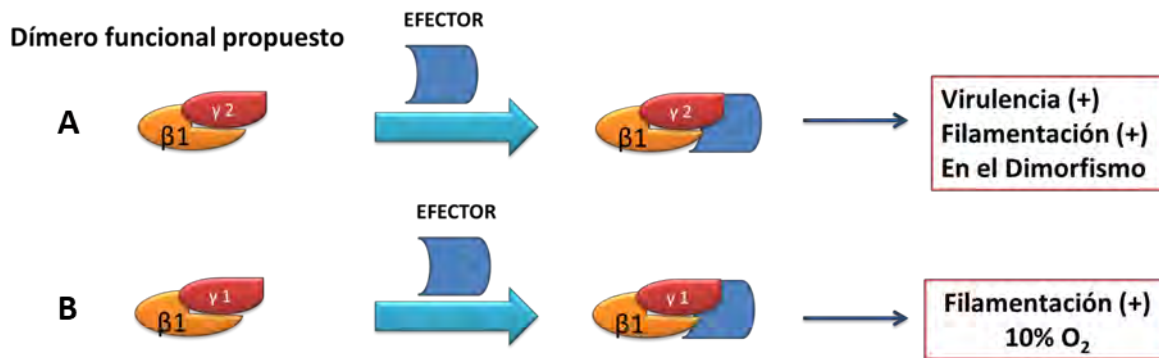


Figura 22. Posibles interacciones de las subunidades Gpg1 y Gpg2 con la subunidad Gpb1.

A) El dímero funcional propuesto está formado por la subunidad Gpb1 y la subunidad Gpg2, las cuales participan positivamente en la virulencia, debido a que la ausencia de alguno de los genes que codifican para alguna subunidad generan mutantes menos virulentos que la cepa silvestre. Además participan positivamente en la filamentación en la transición de micelio-levadura, debido a que las cepas mutantes en estos genes generan cepas que realizan de manera más eficiente la transición. **B)** El dímero funcional compuesto por la subunidad Gpb1 y la subunidad Gpg1 las cuales participan positivamente en la filamentación a bajas tensiones de oxígeno, ya que la mutación en los genes *gpb1* y *gpg1* generan mutantes con la capacidad de producir más levaduras en esta condición.

9 ANEXO

Durante el desarrollo metodológico también se obtuvieron las mutantes en los genes *gpb2* y *gpb3*. Esto con la finalidad de tener toda la batería de mutantes en los genes beta y gamma de *M. circinelloides*.

9.1 Obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes *gpb2* y *gpb3*

Con la finalidad de conocer la participación de las subunidades beta de proteínas G heterotriméricas en el desarrollo micelial de *M. circinelloides*, se realizaron mutantes por medio de un evento de doble integración homóloga, en la cual se eliminaron a los genes *gpbs*. Al igual que para los genes se obtuvieron dos regiones de 1 Kb aproximadamente, en el sentido 5' del codón de inicio, y 3' del codón de paro. Los cuales posteriormente se unieron al gen marcador *pyrG*, por medio de un PCR en fusión. Todo este proceso fue realizado con ayuda del grupo de trabajo del Dr. Soo Chan Lee, en la Universidad de Texas en San Antonio (UTSA).

Para la amplificación de los fragmentos 5' *gpb2* (1Kb) y 3' *gpb2* (1Kb) por reacciones de PCR, se utilizaron a las parejas de oligonucleótidos (1)Gpb2-U-Fwd y (3)Gpb2-U-Rev-*pyrG* (4)Gpb2-D-Fwd-*pyrG* y (2)Gpb2-D-Rev respectivamente (**Figura 23**).

Para el caso del gen *gpb3*, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos (7)Gpb3-U-Fwd y (9)Gpb3-U-Rev para el fragmento 5' *gpb3* (0.9 Kb) y la pareja (10)Gpb3-D-Fwd y (8)Gpb3-D-Rev para el fragmento 3'*gpb3* (1.1 Kb) (**Figura 24**).

En una reacción de PCR aparte se realizó la amplificación del gen *pyrG* con la pareja de oligonucleótidos ((5) *pyrG*-FWD y (6) *pyrG*-REV) obteniendo un tamaño de 2 Kb (**Figuras 23 y 24**).

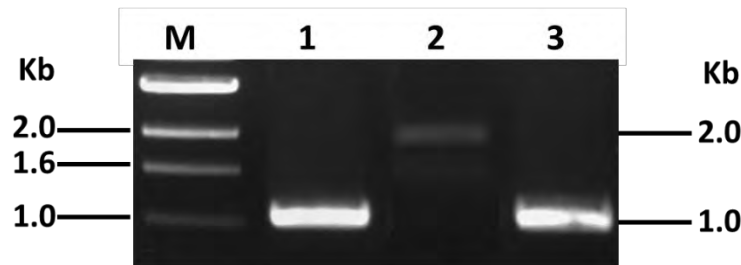


Figura 23. Amplificación de los fragmentos 5'*gpb2* y 3'*gpb2* del gen *gpb2*; y amplificación del gen *pyrG*. En el carril 1, se muestra la banda amplificación de 1 Kb, correspondiente al fragmento 5' *gpb2*. En el carril 2 se observa la amplificación al gen *pyrG* de 2 Kb aproximadamente. En el carril 3, se muestra una banda de amplificación del fragmento 3' *gpb2* de 1.1 Kb.

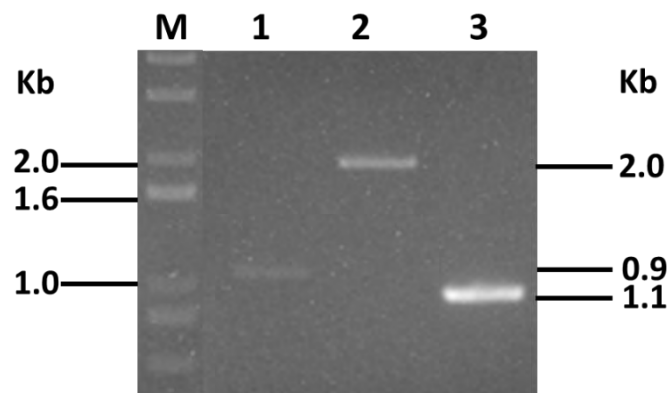


Figura 24. Amplificación de los fragmentos 5'*gpb3* y 3'*gpb3* del gen *gpb3*; y amplificación del gen *pyrG* En la imagen puede observarse en el carril 1 la banda de amplificación correspondiente al fragmento 5' *gpg3* de 0.9 Kb, mientras que en carril 3 podemos apreciar la banda de amplificación para el fragmento 3' *gpg3* de 1.1 Kb aproximadamente. En el carril 2 se observa el amplicon correspondiente al gen *pyrG* de 2.0 Kb.

Tabla 11. Oligonucleótidos para la obtención de los fragmentos 5' y 3' de los genes *gpb2* y *gpb3*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'  3'	TM (°C) / GC (%)
(1)Gpb2-U-Fwd	TCAATGAAGCCTCCCAAGCTA	63.80/47.62
(3)Gpb2-U-Rev-pyrG	caagtaccaatgctgaggcaGGCTTGTTAGACGAGGAAAAG	76.29/68.00
(4)Gpb2-D-Fwd-pyrG	<u>cgatagcatggccagtgtac</u> CCTCCTCGACATTTGAGATGC	78.13/53.66
(2)Gpb2-D-Rev	GCCTCTATGTTTTGCCTTGC	62.05/50.00
(5) pyrG-FWD	GCACCGgagctcTGCTCAGCATTGGTACTTTG	76.66/59.38
(6) pyrG-REV	GTGTGGgagctcGTACACTGGCCATGCTATCG	76.33/59.38
(7)Gpb3-U-Fwd	GCTTGACTGCAACCTTCTTCTT	63.88/45.45
(9)Gpb3-U-Rev-pyrG	<u>caagtaccaatgctgaggca</u> CAAGCCTCGTTGATTCAATACAGC	77.18/47.73
(10)Gpb3-D-Fwd-pyrG	<u>cgatagcatggccagtgtac</u> ATTGTGCCTGTGAGGAGGAGTAAT	78.23/50.00
(8)Gpb3-D-Rev	GACCACTGTCTTCTCAGAGATATG	65.02/48.00

*Las letras en minúsculas subrayadas indican las bases de pyrG con las que se pretende realizar el PCR en fusión para obtener el fragmento recombinante.

9.2 Obtención de los fragmentos recombinantes Rgpb2-pyrG y Rgpb3-pyrG por PCR en fusión

Posterior a la obtención de los fragmentos, se realizó la PCR en fusión con las condiciones mencionadas en la **Tabla 7**, utilizando los oligonucleótidos (1)Gpb2-U-Fwd y (2)Gpb2-D-Rev, para la generación del fragmento recombinante Rgpb2-pyrG de 4.3 Kb producto de la unión de los fragmentos del gen *gpb2* y el gen marcador pyrG, el cual se puede apreciar en la **Figura 25**.

Mientras que en la **Figura 26** observamos el producto del PCR en fusión para los fragmentos del gen *gpb3*, donde fueron requeridos los oligonucleótidos (7)Gpb3-U-Fwd y (8)Gpb3-D-Rev, obteniendo la amplificación de 4.1 Kb correspondiente para el fragmento recombinante Rgpb3-pyrG.

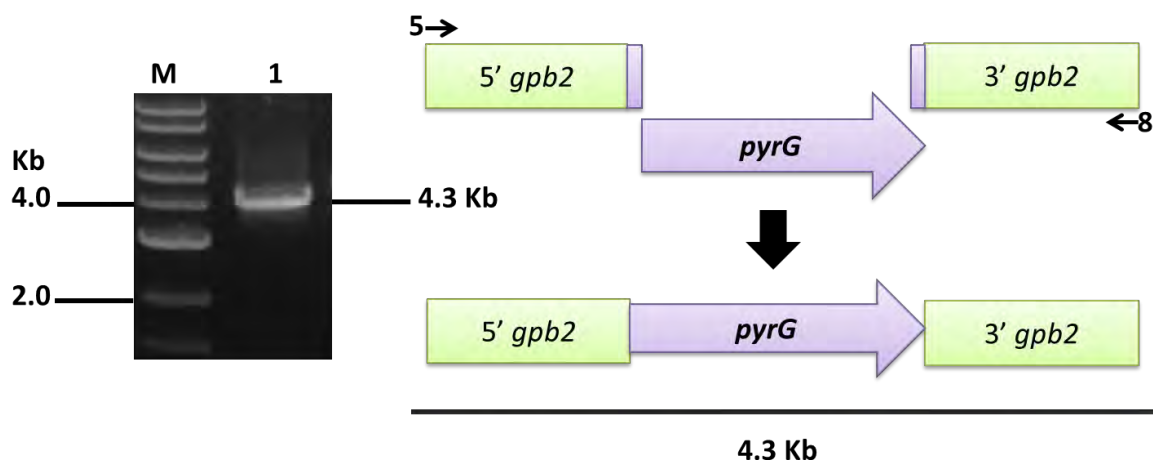


Figura 25. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' *gpb2* y 3' *gpb2* del gen *gpb2*. En el gel se aprecia el marcador 1 Kb plus DNA-Ladder y en el carril 2 se puede observar la banda correspondiente al tamaño esperado de 4.3 Kb del fragmento recombinante Rgpb2-pyrG.

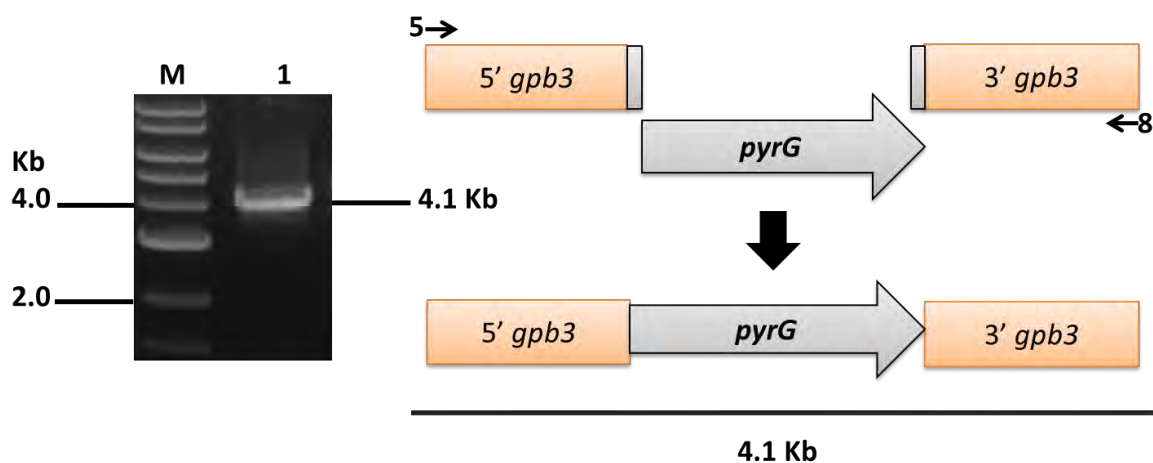


Figura 26. Producto del PCR fusión de los fragmentos 5' *gpb3* y 3' *gpb3* del gen *gpb3*. En el gel se puede observar al marcador 1 Kb plus DNA-Ladder. En el carril 1 se muestra la banda de 4.1 Kb correspondiente al fragmento recombinante Rgpb3-pyrG.

9.3 Corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ por PCR

Posterior a la obtención de los fragmentos recombinantes se realizaron reacciones de PCR para obtener una concentración mínima de 3 μ g totales purificados en un volumen de 10 μ L para la transformación de los protoplastos de MU402.

Se obtuvieron cultivos monoespóricos de las probables transformantes. Para demostrar que el fragmento recombinante Rgpb2-pyrG se recombinó en el locus correcto del gen *gpb2*; se realizó la corroboración de las mutantes por medio de reacciones de PCR independientes. De igual manera se corroboró la correcta inserción del fragmento recombinante Rgpb3-pyrG y la eliminación del gen *gpg3* en las mutantes $\Delta gpb3$ mediante PCR.

Para la primera reacción se utilizaron los oligonucleótidos O1/P2 para corroborar la cepa $\Delta gpb2$, los cuales amplificaron a un fragmento de 1.6 Kb, debido a que el oligonucleótido O1 se encuentra 144 pares de bases río arriba fuera de la inserción del fragmento recombinante y el oligonucleótido P2 hibrida dentro del gen marcador *pyrG* entre las posiciones 746-765 (**Figura 27**). En una segunda reacción de PCR, se utilizó el oligonucleótido P3 que hibrida dentro de la secuencia del gen *pyrG* entre las posiciones 1457-1476, y el oligonucleótido O4 hibrida a 57 pb río abajo fuera de la inserción del fragmento recombinante, obteniendo un fragmento de 1.9 kb. Para la tercera reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos O1/O4; la amplificación fue positiva tanto en las cepas transformantes y silvestre, ya que los oligonucleótidos están fuera del fragmento recombinante, por lo que se generaron amplicones con una variación en sus tamaños. Para la cepa silvestre se amplificó un fragmento de 3.5 kb, mientras que para la transformante se generó un fragmento de 4.3 kb. Para la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos O5 y O6 los cuales están diseñados para amplificar al gen *gpb2* el cual posee un tamaño de 1.2 kb; las cepas transformantes no tuvieron amplificación, mientras que la cepa silvestre generó el amplicón debido a que conserva el gen silvestre *gpb2* (**Figura 27**).

Al obtener todas las bandas de amplificación esperadas podemos corroborar que se realizó la correcta eliminación del gen *gpb2* del genoma de las ahora mutantes $\Delta gpb2$ T1 y T2.

Para el caso de la corroboración de la cepa $\Delta gpb3$, se realizaron las cuatro de igual manera las diferentes reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos O7/P2 para la obtención de un fragmento de 1.4 kb para verificar la inserción en el extremo 5'; en la segunda reacción se utilizaron los oligonucleótidos P3/O8 para la verificación del extremo 3' en la cual se obtuvo un fragmento de 1.9 kb. En la reacción 3 se utilizaron los oligonucleótidos O7/O8 los cuales amplificaron un fragmento de 4.1 kb en la cepa mutante y 3.4 kb en la cepa silvestre (MU402). Como cuarta reacción, se utilizaron O9/O10 los cuales amplificaron al ORF del gen *gpb3* de 1.2 kb en la cepa silvestre (MU402), obteniendo la banda de amplificación esperada en la cepa silvestre (**Figura 28**).

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$

Oligonucleótido	Secuencia5' 	TM (°C) /GC (%)
O1 Gpb2-C-Fwd	GCGTCTACATAGATGCTCTCAA	68.56/48.00
P2 pyrG-C-Rev	TCAAAAAGAGAGCGAGCACA	62.44/45.00
P3 pyrG-C-Fwd	AACCCCTCACGAAGTCATTG	63.13/50.00
O4 Gpb2-C- Rev	ATCCACCTTTAGGAATTTCTTC	58.87/36.36
O5 Gpb2-ORF-Fwd	ATGAGCTCCATTACAACCGA	61.69/45.00
O6Gpb2-ORF-Rev	TCAAGCCCACACCTTTAATAGAT	62.37/39.13
O7 Gpb3-C-Fwd	GCAGACACATTCAAAGAGGACA	67.26/50.00
O8 Gpb3-C-Rev	ATGTCATTATCGTTGATTTGAA	57.22/27.27
O9 Gpb3-ORF-Fwd	ATGCAGCACCAGGACGACATTT	67.64/50.00
O10 Gpb3-ORF-Rev	CTATGCCCAAATCTTGAGAT	57.73/40.00

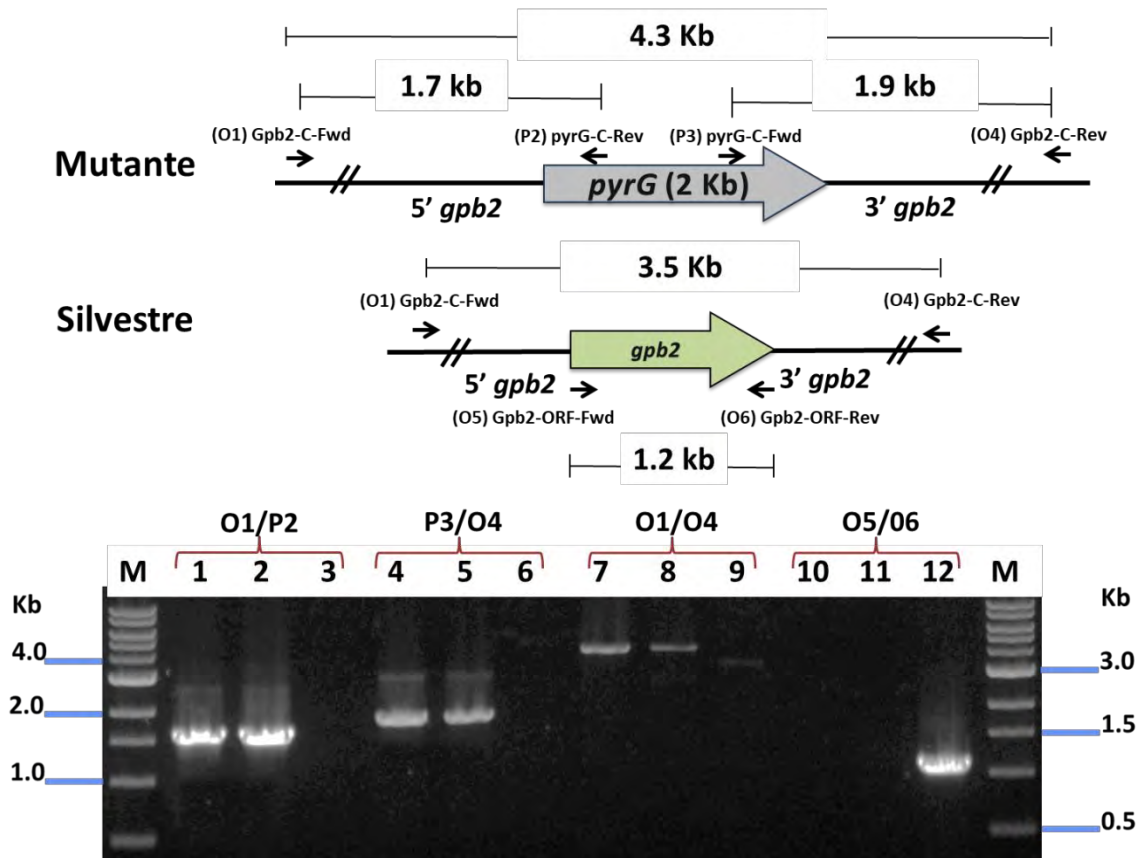


Figura 27. Corroboración de la mutación en el gen *gpb2* mediante PCR. En los carriles 1 y 2 se muestran el resultado del PCR con los oligonucleótidos O1/P2 que amplifican una banda de 1.7 Kb aproximadamente en dos transformantes ($\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2) y en el carril 3 a la cepa silvestre MU402 (sin amplificación). En los carriles 4 y 5 se muestra el resultado de la segunda reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos P3/O4 que amplificaron un fragmento de 1.9 Kb en las transformantes y en el carril 6 para MU402 (sin amplificación). Una tercera reacción de PCR con los oligonucleótidos O1/O4, se muestra en los carriles 7 y 8 observando una banda de 4.3 Kb, en las transformantes ($\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2) mientras que en el carril 9 correspondiente a la cepa silvestre MU402 se observó un fragmento de 3.5 Kb. En la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos O5/O6 que amplifican al ORF del gen *gpb2*, en los carriles 10-12 observando en este último la banda correspondiente al gen *gpb2* de 1.2 Kb aproximadamente correspondiente a la cepa silvestre MU402.

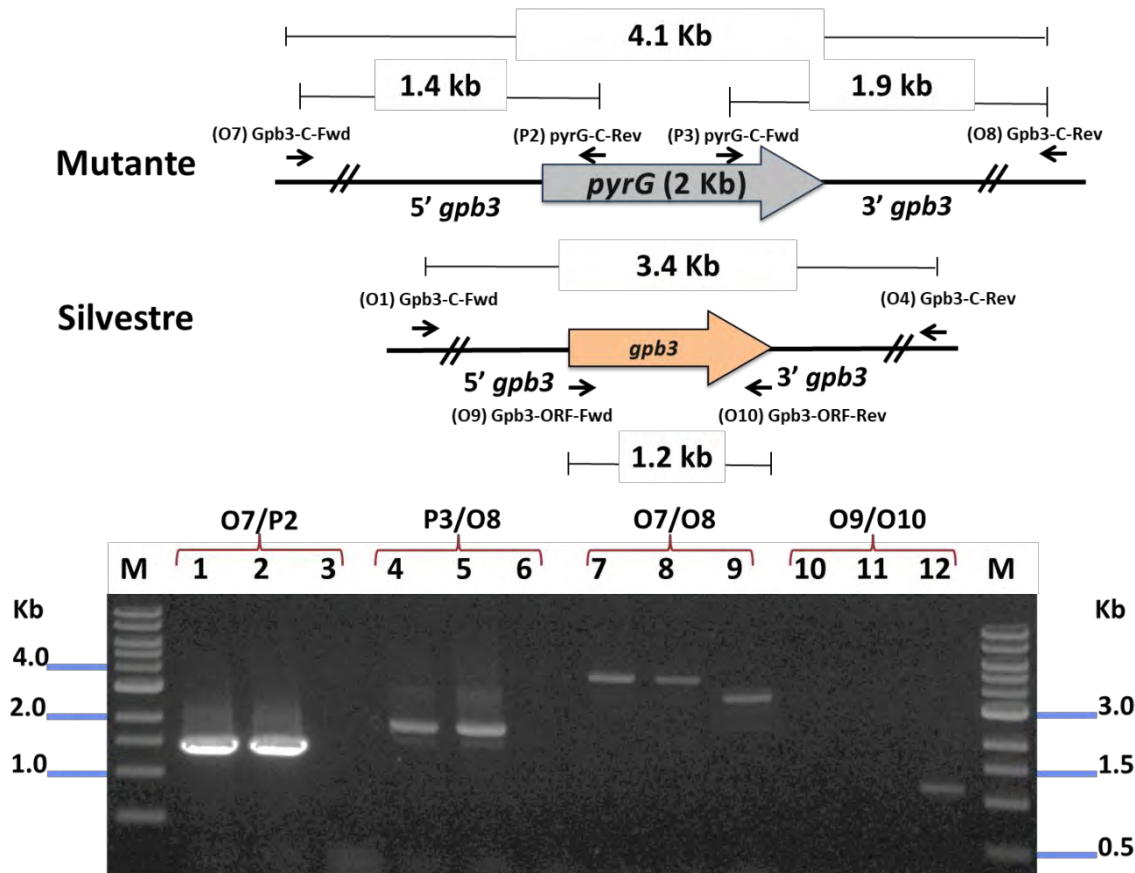


Figura 28. Corroboración de la mutación en el gen *gpb3* mediante PCR. En los carriles 1 y 2 se muestra una banda de 1.4 Kb, resultado del PCR con los oligonucleótidos O7/P2 que amplifican las dos transformantes ($\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2); en el carril 3 se observa la cepa silvestre MU402 (sin amplificación). En los carriles 4 y 5 se muestra el resultado de la segunda reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos P3/O8 que amplificaron un fragmento de 1.9 Kb en las transformantes y en el carril 6 para MU402 (sin amplificación). Una tercera reacción de PCR con los oligonucleótidos O7/O8, se muestra en los carriles 7 y 8 observando una banda de 4.1 Kb, en las transformantes ($\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2) mientras que en el carril 9 correspondiente a la cepa silvestre MU402 se observó un fragmento de 3.4 Kb. En la cuarta reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos O9/O10 que amplifican al ORF del gen *gpb3*, en los carriles 10-12 observando en este último la banda correspondiente al gen *gpb3* de 1.2 Kb aproximadamente correspondiente a la cepa silvestre MU402.

9.4 Corroboración de la ausencia del transcrito de los genes *gpb2* y *gpb3* en las clonas mutantes de $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ respectivamente

Para corroborar la ausencia de transcrito de los genes *gpb2* y *gpb3* en las diferentes clonas mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ respectivamente, se realizó una extracción de RNA total a partir de las esporas de las cepa silvestre MU636 y las clonas mutantes de $\Delta gpb2$ ($\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2) y $\Delta gpb3$ ($\Delta gpb3$ T1 y $\Delta gpb3$ T2) en las cuales se cuantifico la cantidad de expresión del transcrito de los genes *gpb2* y *gpb3* por medio de una reacción de RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos (directo y reverso) y las sondas correspondientes para el gen *gpb2* y el gen *gpb3* mostradas en la **Tabla 13**.

Al evaluar los resultados podemos observar, que no existe acumulación del transcrito del gen *gpb2* en las esporas de las mutantes $\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2 (**Figura 29**), y no hay expresión del gen *gpb3* por parte de las mutantes $\Delta gpb3$ T1 y $\Delta gpb3$ T2 (**Figura 30**), por lo que podemos asumir que son mutantes homocariontes en el genes *gpb2* y *gpb3* respectivamente.

Tabla 13. Oligonucleótidos y sondas utilizados para la corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ por RT-qPCR

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm (°C) / GC (%)
<i>gpb2</i> (167321)	AGCCGCTGCAAGAAGAGAAG	66.08 / 55
	CGTTGTGTCTGCCAATGCT	65.33 / 52.6
	AGGCATTGAAAGAGCGTATCAACAGCG	69.77 / 46.4
<i>gpb3</i> (177805)	GCGAGGGCTTGATTTATTCAGCTT	66.67 / 45.8
	CCCAATGACCATGACCTTCCAAT	66.85 / 47.8
	ACGATCAAGGTGTGGAATTCATCTGGCA	69.52 / 46.4
<i>tfc-1</i> (106349)	AGCAGGATATGGAAGGCGCTTTATC	69.7/48
	GGGCATCTGTGGCAATCTTTC	68.1/52.38
	TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	74.1/52

*Los números entre paréntesis indican el número ID en la base de datos de *M. circinelloides* (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>).

*Las sondas para detectar los genes *gpb3* fueron diseñados por Valle-Maldonado 2013, tesis de maestría.

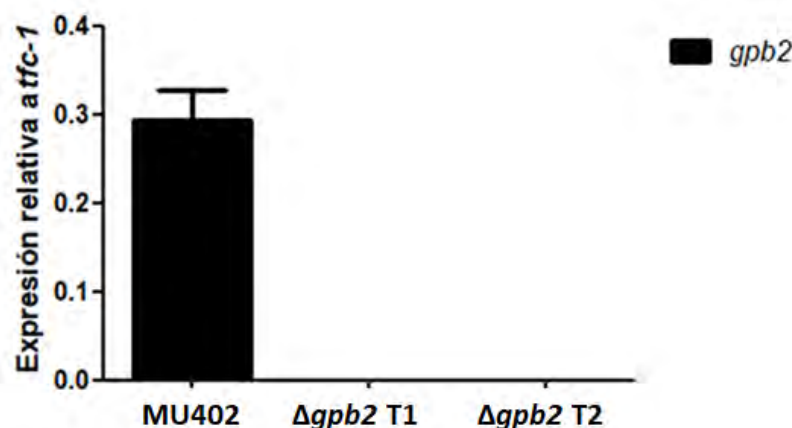


Figura 29. Corroboración de las mutantes $\Delta gpb2$ mediante RT-qPCR. Cepa silvestre MU402 (Control +) y las dos clonas mutantes $\Delta gpb2$. El RNA total fue obtenido a partir de esporas de las diferentes mutantes $\Delta gpb2$ T1 y $\Delta gpb2$ T2 y de la cepa MU402. Se usaron sondas específicas para el gen *gpg2* y del gen *tfc-1* (Tabla 13) el cual fue usado como gen normalizador en los ensayos de expresión. Experimento realizado 3 veces de forma independiente.

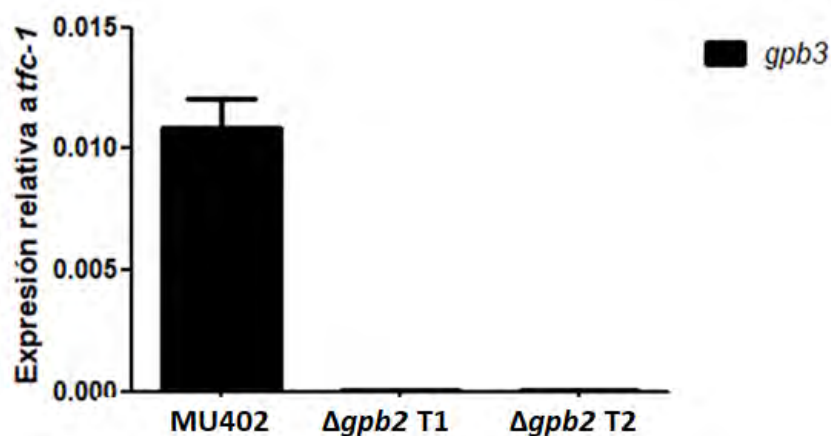


Figura 30. Corroboración de las mutantes $\Delta gpg3$ mediante RT-qPCR. Cepa silvestre MU402 (Control +) y las dos clonas mutantes $\Delta gpb3$. El RNA total fue obtenido a partir de esporas de las diferentes mutantes ($\Delta gpb3$ T1 y $\Delta gpb3$ T2) y de la cepa MU402. Se usaron sondas específicas para el gen *gpb3* y del gen *tfc-1* (Tabla 13) el cual fue usado como gen normalizador en los ensayos de expresión. Se realizó el experimento 3 veces de manera independiente.

9.5 Crecimiento aeróbico en sustrato sólido en medio rico YPG y medio mínimo YNB de las cepasmutantes $\Delta gpb1-3$

Posterior a la corroboración de las mutantes en los genes *gpb1-3*; con la finalidad de evaluar la participación de las subunidades Gpbs en el crecimiento radial en sustrato sólido de *Mucor circinelloides*, se realizó un experimento en el cual se inocularon 100 esporas de las cepas mutantes $\Delta gpb1-3$ y la cepa silvestre MU636 en placas de medio sólido YPG (medio rico) y YNB (medio mínimo); evaluando el crecimiento cada día durante 6 días (**Figura 31**).

Para el caso del medio rico YPG, se observó que la cepa mutante $\Delta gpb3$ tuvo un crecimiento radial disminuido en comparación con las demás cepas mutantes y silvestre (**Figura 31A**). Mientras tanto en el medio mínimo YNB es la cepa mutante $\Delta gpb2$ quien presentó una disminución en el crecimiento radial a los días 4 y 5 en comparación con el resto de las cepas, aunque este crecimiento retrasado se reestablece en los últimos días del ensayo (**Figura 31B**).

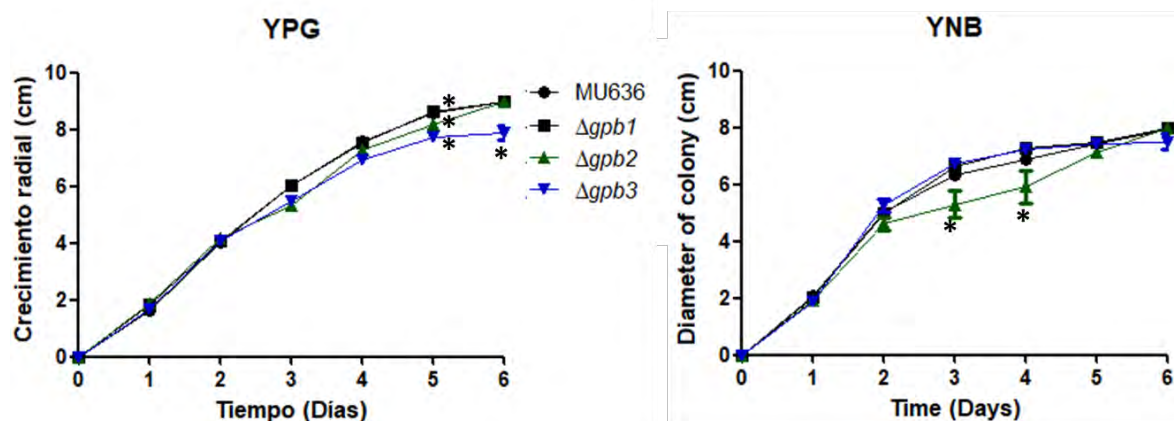


Figura 31. Efecto de la mutación de los genes *gpb1-3* en el crecimiento radial en sustrato sólido. A) Se inocularon 100 esporas en medio sólido YPG, se evaluó el diámetro durante 6 días post-inoculación. **B)** Se inocularon 100 esporas en medio sólido YNB, se evaluó el diámetro durante 6 días post inoculación, n=4, análisis de varianza ANOVA de una vía, Fisher p<0.05.

9.6 Participación de las subunidades Gpb1-3 en el crecimiento a baja tensión de oxígeno de *M. circinelloides*

Dentro del grupo de trabajo se realizaron ensayos en donde se disminuían las revoluciones por minuto hasta 50 rpm, provocando una baja en la concentración de oxígeno disuelto en el medio, lo que ocasiona un cambio morfológico en *M. circinelloides*, produciendo ambas morfologías (Germínulas y Levaduras).

Con la finalidad de evaluar la participación de las subunidades Gpbs en la germinación a bajas revoluciones de *Mucor circinelloides*, se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG, y se llevaron a 50 rpm durante 6 horas. La cepa mutante $\Delta gpb1$ resultó ser quien produce más levaduras que germínulas 4 veces más, en comparación con la cepa silvestre y las otras mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ (**Figura 32**). Lo que corresponde a lo ya reportado en el grupo de trabajo (**Valle-Maldonado y col., 2019 en revisión**), que la subunidad Gpb1 participa de manera positiva en la filamentación a baja tensión de oxígeno.

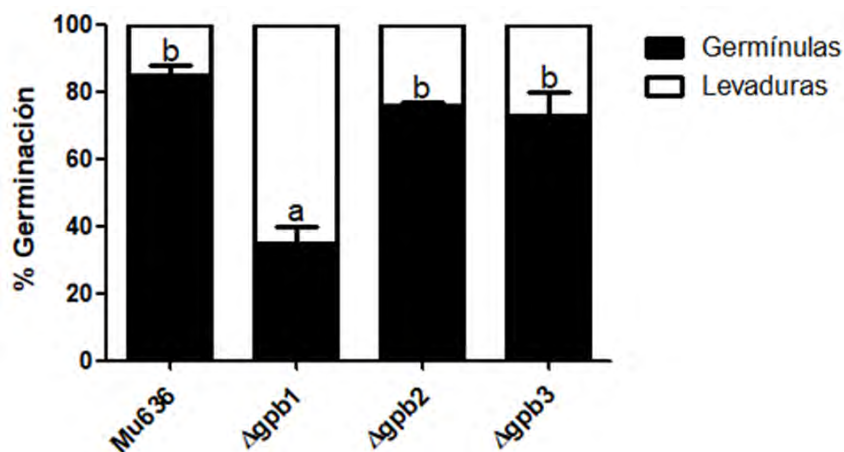


Figura 32. Efecto de la mutación de los genes *gpb1-3* de *M. circinelloides* en la germinación a baja tensión de oxígeno. Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG, las cuales se incubaron a 28 °C con una agitación de 50 rpm por 6 horas, posteriormente se realizó una cuenta diferencial de germínulas (hifas) y levaduras. $n=4$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher $p<0.05$.

9.7 Participación de las subunidades Gpb1-3 en el dimorfismo de *M. circinelloides*

Con la finalidad de conocer si las subunidades Gpb1-3 participan en el dimorfismo de *M. circinelloides*, se evaluaron las cepas mutantes $\Delta gpb1-3$ en las transiciones de levadura-micelio y micelio-levadura.

En el ensayo de la transición de levadura a micelio (**Figura 33A**) se observa que las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpb3$ realizan más dicha transición de manera más lenta, en comparación con la cepa $\Delta gpb2$ y la cepa silvestre MU636. Por otro lado la cepa mutante $\Delta gpb2$ genera más células en transición en las horas 2 (65 %) y 3 (90 %) en comparación con las demás cepas.

En la transición de micelio a levadura (**Figura 33B**) se observa que todas las cepas mutantes presentan el mismo comportamiento realizando la transición de manera más rápida, en comparación con la cepa silvestre MU636.

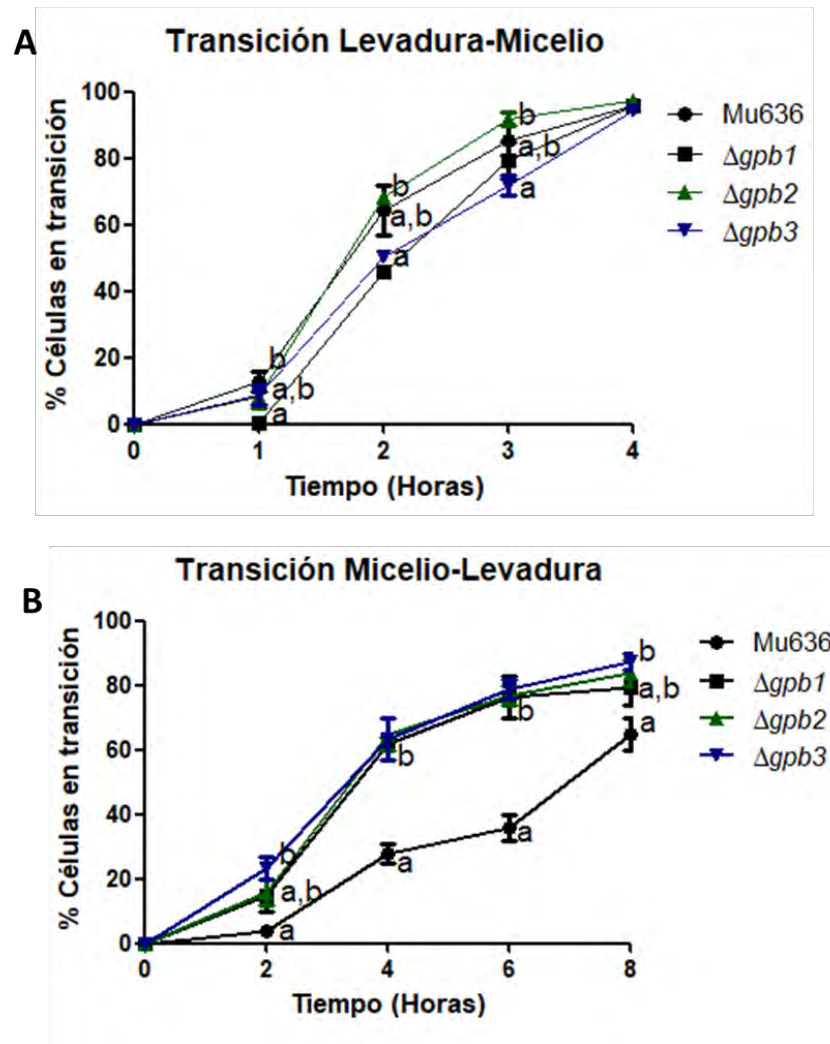


Figura 33. Efecto de la mutación de los genes *gpb1-3* en el dimorfismo de *M. circinelloides*. Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG. **A)** Se muestra el porcentaje de células en transición de levadura a micelio. **B)** Se muestra el porcentaje de células en transición de micelio a levadura. $n=2$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p<0.05$.

9.8 Participación de las subunidades Gpb1-3 en la virulencia de *M. circinelloides*

Como se ha mencionado en los antecedentes, la cepa $\Delta gpb1$ es menos virulenta que la cepa silvestre (MU636). Pero aún no se ha descrito la participación de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ en la virulencia de este mucoral.

Con la finalidad de conocer la participación de las subunidades Gpb2 y Gpb3 de *M. circinelloides* en la virulencia, se realizó un ensayo de supervivencia con el modelo *C. elegans*, en el cual se colocaron de 15-20 nematodos en 1 mL de medio YPG inoculando 1×10^3 esporas de las cepas $\Delta gpb1-3$.

Se realizó conteo de nematodos vivos cada 12 h, por las siguientes 48 h, para reportar supervivencia. Observando que la cepa mutante $\Delta gpb2$, es la cepa quien genera más muertes en el periodo ensayado en comparación con las demás cepas mutantes y la cepa silvestre MU636 (**Figura 34A**).

Con el fin de conocer el estrés generado por las cepas en el nematodo, se realizó otro ensayo en el cual se recuperaron los nematodos a las 24 horas post infección con las distintas esporas, se realizó la extracción de RNA total de los nematodos y se cuantificó la expresión de genes *HSP3* y *HSP4*, los cuales codifican para chaperonas homologas de la proteína BIP involucrada en estrés celular (**Cerezo y col., 2016**) en *C. elegans*.

Al realizar el análisis de los marcadores de estrés celular, se observó que la cepa $\Delta gpb1$, fue quien generó menos niveles de RNAm de los marcadores de estrés en el nematodo, respecto a la cepa silvestre y las demás cepas mutantes (**Figura 34B**). Por otro lado las cepas mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ parecen generar el mismo daño que la cepa silvestre MU636, por lo que no podemos definir que alguna cepa sea más virulenta que la silvestre.

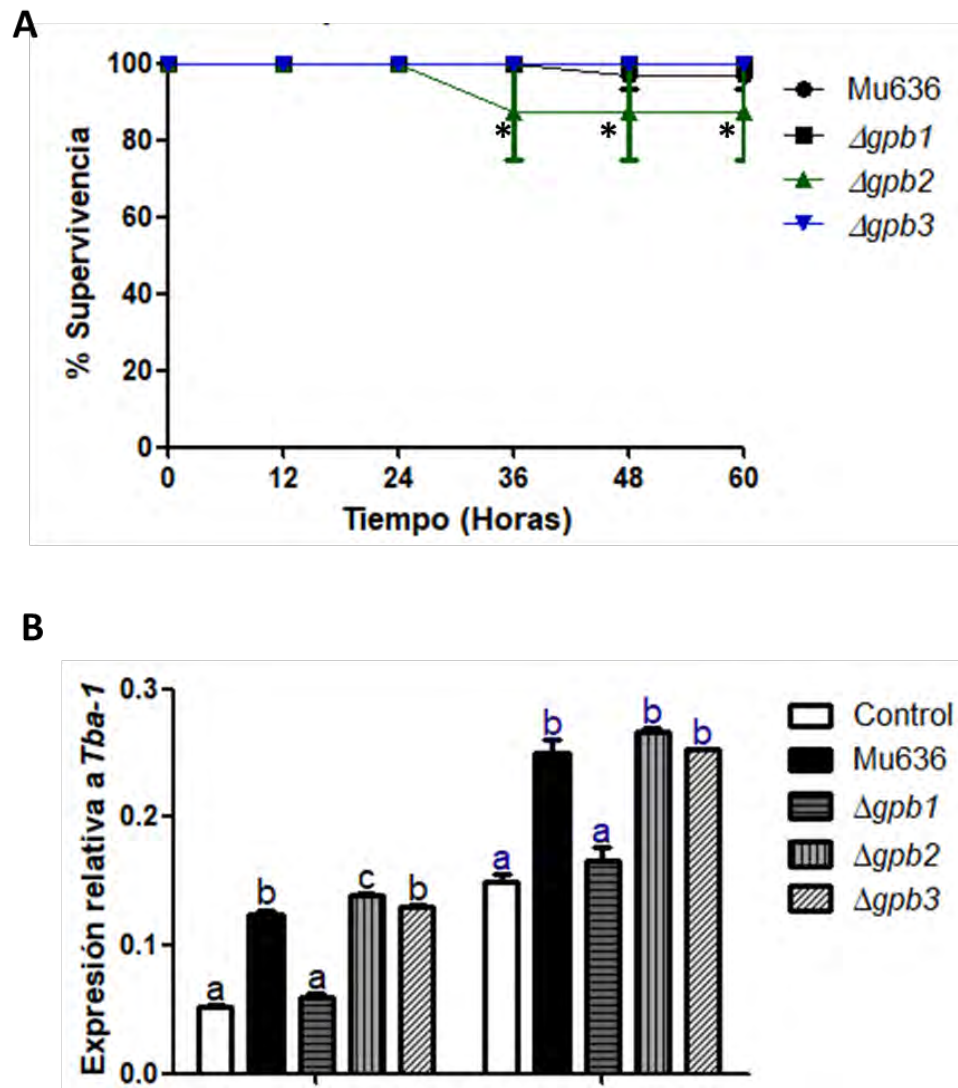


Figura 34. Efecto de la mutación de los genes *gpb1-3* sobre la virulencia de *M. circinelloides*.

Se inocularon 1×10^3 esporas por cada mL de medio YPG, en placas de 24 pozos con 15-20 nematodos (*C. elegans*). **A)** Se muestra el ensayo de supervivencia el cual se monitoreo cada 12 h durante 60 h, y se reportó la supervivencia de los nematodos. **B)** Se realizó el mismo ensayo durante 24 h, a este tiempo se recuperaron los nematodos para realizar RT-qPCR, para medir los niveles de RNAm de los genes *hsp3* Y *hsp4* de *C. elegans*. El control está dado por nematodos en el medio YPG sin presencia de esporas $n=2$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p<0.05$.

10 Referencias

- Almaslamani M, Taj-Aldeen SJ, García-Hermoso D, Dannaoui E, Alsoub H, Alkhal A. 2009. An increasing trend of cutaneous zygomycosis caused by *Mycocladoscorymbifer* (formerly *Absidiacorymbifera*): report of two cases and review of primary cutaneous *Mycocladoscorymbifer* infections. *Medical Mycology* **47**:532-538.
- Arroyo, F. L., Arias, M. S., Cazapal-Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Suárez, J., Miguélez, S., Paz-Silva, A. 2016. The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control*, **92**:38–44.
- Bartnicki-Garcia S. 1968. Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of Bacteriology* **96**:1586-1594.
- Bastidas R.J., Shertz C.A., Lee S.C., Heitman J. 2012. Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryotic cell* **11**:270-281.
- Benito E. P., Campuzano V., López-Matas M. A., De Vicente J. I., Eslava A. P. 1995 Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circineiloides* OMPdecase-deficient mutants. *Molecular Genetics and Genomics* **248**: 126-135.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. Biochemistry. Fifth Edition. W H Freeman. New York. pp 600.
- Bredenkamp A., Velankar H., van Zyl W. H., Görgens J. F. 2010. Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast* **27**: 849–860.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**(1):71-94.
- Carreau A., El Hafny –Rahbi B., Matejuk A., Grillon C., Kieda C. 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**(6): 1239-1253.
- Cerezo M., Benhida R & Rocchi S. 2016. Targeting BiP to induce Endoplasmic Reticulum stress and cancer cell death. *Oncoscience* **3**: 306-307.
- Coca M.A., Damsz B. Yun D.J., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Narasimhan M.L. 2000. Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*. **22**(1):61-69.

Cortiñas, F. J., Cazapal-Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Miguélez, S., Suárez, J., Arias, M. S. 2015. Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. *Biocontrol Science and Technology*, **25**(12):1443–1452.

David H., Özçelik İ. Ş, Hofmann G., Nielsen J. 2008. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* **9**(1): 163.

Dehority W, Willert J, Pong A. 2009. Zygomycetes infections in pediatric hematology oncology patients: a case series and review of the literature. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **31**:911-919.

Delgado-Jarana J., Martínez-Rocha L., Roldán-Rodríguez R., Roncero M., Di Pietro A. 2005. *Fusarium oxysporum* G-protein B subunit Fgb1 regulates hyphal growth development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genetics and Biology* **42**:61-72.

Díaz-Pérez S.P., Patiño-Medina J.A., Valle-Maldonado M.I., López-Torres A., Jacome-Galarza I.E., Anaya-Martínez V., Gómez-Ruiz V., Campos-García J., Nuñez-Anita R.E., Ortiz-Alvarado R., Ramírez-Díaz M.I., Gutiérrez-Corona J.F., Meza-Carmen V. 2019. Alteration of fermentative metabolism enhances *Mucor circinelloides* virulence. *Infection and Immunity* **88**(2): pii: e00434-19.

Etienne-Manneville S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**:629-635.

Greenberg RN, Cohen G. 1980. Rhinomaxillary mucormycosis in a kidney transplant patient. *Oral Surgery* **50**:33-38.

Guo L., Yang L., Liang C., Wang J., Liu L., Huang J. 2016. The G-protein subunits FGA2 and FGB1 play distinct roles in development and pathogenicity in the banana fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **93**:29-38.

Gutiérrez A., López-García S., Garre V. 2011. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* **84**(3): 442-446.

Hammond SP, Bialek R, Milner DA, Petschnigg EM, Baden LR, Marty FM. 2011. Molecular methods to improve diagnosis and identification of mucormycosis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:2151-2153.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**(4):557-580.

Harrison M., Roy M. 1968. Handbook of air pollution analysis. *PHS Publication AP-44*:190-247.

Hata DJ, Buckwalter SP, Pritt BS, Roberts GD, Wengenack NL. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *Journal of Clinical Microbiology* **46**:2353-2358.

Heeswijk R van, Roncero M. I. G. 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications* **49**:691-702.

Hicks J.K., Yu J.H., Keller N.P., Adams T.H. 1997 *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal*. **16**(16):4916-4923

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404003#/C404003>

Kahn R. A., Cherfils J., Elias M., Lovering R. C., Munro S., Schurmann A. 2006. Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of Cell Biology* **172**(5): 645.

Kallal L., Kurjan J. 1997. Analysis of the Receptor Binding Domain of Gpap1p, the Galpha Subunit Involved in the Yeast Pheromone Response Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **17**:2897-2907.

Kontoyannis D.P., Yang H., Song J., Kelkar S.S., Yang X., Azie N., Harrington R., Fan A. Lee E., Spalding J.R. 2016. Prevalence, clinical and economy burden of mucormycosis-related hospitalizations in the United States: a retrospective study. *BMC Infectious Diseases*. **16**:730

Lasker B.A., Borgia P.T. 1980. High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* **141**(2):565-569.

Lee S.C., Li A., Calo S., Heitman J. 2013. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *Plos Pathogens* **9**:e1003625.

Levitzki A., Bar-Sinai A. 1991. The regulation of adenylyl cyclase by receptor-operated G proteins. *Pharmacology & Therapeutics* **50**:271-283.

Li C.H., Cervantes M., Springer D.J., Boekhout T., Ruiz-Vazquez R.M., Torres-Martinez S.R., Heitman J., Lee S.C. 2011. Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens* **7**(6): e1002086. doi:10.1371/journal.ppat.1002086

Li L., Shen G., Zhang Z.G., Wang Y.L., Thompson J.K., Wang P. 2007. Canonical Heterotrimeric G Proteins Regulating Mating and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell* **18**:4201-4209.

Li L., Wright S.J., Krystofova S., Park G., Borkovich K.A. 2007. Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *The Annual Review of Microbiology* **61**:423-52.

- Lisbihsitz Y, Pagani J. 1981. Aspergillosis and mucormycosis: two types of opportunistic fungal pneumonia. *Radiology***140**:301-306
- López-García S. 2015. Análisis genómico-funcional de la regulación de la expresión génica por la luz en el hongo *Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral en la Universidad de Murcia, España.
- Lübbehüsen T.L., Nielsen J., McIntyre M. 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of Applied Microbiology* **95**:1152–1160.
- Ma L. J., Ibrahim A. S., Skory C., Grabherr M. G., Burger G., Butler M., Elias M., Idnurm A., Lang B. F., Sone T., Abe A., Calvo S. E., Corrochano L. M., Engels R., Fu J., Hansberg W., Kim J. M., Kodira C. D., Koehrsen M. J., Liu B., Miranda-Saavedra D., O’Leary S., Ortiz-Castellanos L., Poulter R., Rodriguez-Romero J., Ruiz-Herrera J., Shen Y. Q., Zeng Q., Galagan J., Birren B. W., Cuomo C. A., Wickes B. L. 2009 Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopusoryzaerevalis* a whole-genome duplication. *PLoS Genetics* **5**(7): e1000549.
- McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P., Willard F.S. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences***62**: 551-577.
- McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology***58**: 495-502.
- Milligan G., Kostenis E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147 Supp 1**:46-55.
- Murcia Flores L., Garre V., Ruiz-Vázquez R. M., Torres-Martínez S. 2008. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters* **280**(1): 81-88.
- Nakafuku M., Itoh H., Nakamura S., Kaziro Y. 1987. Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**:2140-2144.
- Navarro E., Lorca-Pascual J. M., Quiles-Rosillo M. D., Nicolás F. E., Garre V., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R. M. 2001. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics***266**: 463-470.

- Navarro-Mendoza M.I., Pérez-Arques C., Panchal S., Nicolás F.E., Mondo S.J., Ganguly P., Pangilian J., Grigoriev I.V., Hetman J., Sanyal K., Garre V. 2019. Early Diverging Fungus *Mucor circinelloides* Lacks Centromeric Histone CENP-A and Displays a Mosaic of Point and Regional Centromeres. *Current Biology* **29**:3719-3802.
- Neer E.J. 1994. G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Science* **3**:3-14.
- Nicolás F. E., de Haro J. P., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R. M. 2007. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology* **44**:504–516
- Nicolás F.E., de Haro J.P., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R.M. 2007. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dice-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology* **44**:504-516.
- Nielsen E., Cheung A.Y., Ueda T. 2008. The regulatory *RAB* and *ARFGTPases* for vesicular trafficking, *Plant Physiology* **147**:1516-1526.
- Nielsen M.G., Gadagkar S.R., Gutzwiller L. 2010. Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *BMC Evolutionary Biology* **10**:113.
- Nishijima K. A., Wall M. M. 2011. First report of association of *Mucor circinelloides* on Noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. *Plant Disease* **95**(3): 360.
- Ocampo J., Fernández-Núñez L., Silva F., Pereyra E., Moreno S., Garre V., Rossi S. 2009. A Subunit of Protein Kinase A Regulates Growth and Differentiation in the Fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell* **8**:933-944.
- Ocampo J., McCormack B., Navarro E., Moreno S., Garre V., Rossi S. 2012. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell* **11**:989-1002.
- Orlowski M. 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews* **55**: 234-258.
- Ortíz-Prado E., Dunn J.F., Vasconez J., Castillo D., Viscor G. 2019. Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *American Journal of Blood Research* **9**(1):1-14
- Patiño-Medina J.A. 2017. Participación de los productos de los genes *arf1* y *arf2* en el crecimiento y virulencia de *Mucor circinelloides* Tesis de maestría. del programa Maestría en Biología Experimental del IIQB de la UMSNH.

Patiño-Medina J.A., Valle-Maldonado, M. I., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Jácome-Galarza, I. E., Díaz-Pérez, C., Meza-Carmen, V. 2019a. Role of Arf-like proteins (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal Genetics and Biology*. **129**:40-51 doi:10.1016/j.fgb.2019.04.011

Patiño-Medina J.A., Vargas-Tejeda D., Valle-Maldonado M.I., Alejandre-Castañeda V., Jácome-Galarza I.E., Villegas-Moreno J., Núñez-Anita R.E., Ramírez-Díaz M.I., Ortiz-Alvarado R., Meza-Carmen V. 2019c. Sporulation on blood serum increases the virulence of *Mucor circinelloides*. *Microbial Pathogenesis* **137**: 103737

Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alejandre-Castañeda, V., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Meza-Carmen, V. 2017. Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current Genetics*, **64** (4:853–869. doi:10.1007/s00294-017-0798-0

Patiño-Medina, J. A., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Pérez-Arques, C., Nuñez-Anita, R. E., Meza-Carmen, V. 2019b. Heterotrimeric G-alpha subunits Gpa11 and Gpa12 define a transduction pathway that control spore size and virulence in *Mucor circinelloides*. *PLOS ONE*, **14**(12), e0226682. doi:10.1371/journal.pone.0226682

Pérez-Sánchez L., González E., Colón-Lorenza E.E., González-Velázquez W., González-Méndez R., Rodríguez-del Valle N. 2010. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC Microbiology* **10**:317.

Qiao, W., Tao, J., Luo, Y., Tang, T., Miao, J., & Yang, Q. 2018. Microbial oil production from solid-state fermentation by a newly isolated oleaginous fungus, *Mucor circinelloides* Q531 from mulberry branches. *Royal Society Open Science*, **5**(11), 180551. doi:10.1098/rsos.180551

Renvall S. & Niinikoski J. 1980. Kinetics of oxygen in peritoneal cavity. Effects of chemical peritonitis and intraperitoneally administered colloids in rats. *The Journal of Surgical Research* **28**(2): 132-139

Repasky G.A., Chenette E.J., Der C.J. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does *Raf* function alone to mediate *Ras* oncogenesis? *Trends in cell biology* **14**: 639-647.

Roncero M. I. G., Jepsen L. P., Strøman P., van Heeswijk R. 1989. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* **84**: 335-343.

- Rosén S., Yu J.H., Adams T.H. 1999. The *Aspergillus nidulans* *sfad* gene encodes a G protein B subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO Journal* **18**(20): 5592-5600.
- Schwindinger W.F., Robishaw J.D. 2001. Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**:1653-1660.
- Smrcka A.V., Brown J.H., Holz G.G. 2012. Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell signal* **24**:1333-1343.
- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. 2001. Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews* **81**:154-188.
- Tesmer J.J.G. 2010. The Quest to Understand Heterotrimeric G Protein Signaling. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**:650-658.
- Valle-Maldonado M.I. 2013. Identificación y expresión de los genes que codifican para proteínas G heterotriméricas en *Mucor circinelloides*. Tesis de Maestría del programa Maestría en Biología Experimental del IIQB de la UMSNH.
- Valle-Maldonado M.I., Jácome-Galarza I.E., Díaz-Pérez A.L., Martínez-Cadena G., Campos-García J., Ramírez-Díaz M.I., Reyes-De la cruz H., Riveros-Rosas H., Díaz Pérez C., Meza-Carmen V. 2015. Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. *Fungal Biology* **119**:1179-1193.
- Valle-Maldonado M.I., Jácome-Galarza I.E., Gutiérrez-Corona F., Ramírez-Díaz M.I., Campos-García J., Meza-Carmen V. 2014. Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molecular Biology*. Rep D01 10.1007/s 11033-014-3818-x
- Vellanki S., Vavarro-Mendoza M.I., García A., Murcia L., Perez-Arques C., Garre V., Nicolás F. E., Lee S.C. 2018. *Mucor circinelloides* : Growth, Maintenance, and Genetic Manipulation. *Current Protocols in Microbiology* e53 **49** :10.1002/cpmc.53
- Versele M., Kirk P.M. 2001. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO reports* **2**(7):574-579.
- Weis K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**:441-451.
- Wennerberg K., Rossman K. L., Der C. J. 2005 The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**: 843-846.
- Whiteway M., Houghan L., Dignard D., Thomas D.Y., Bell L., Saari G.C., Grant F.J., MacKay V.L. 1989. The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor G protein. *Cell* **56**(3): 467-477.

Wikandari R., Millati R., Lennartsson P. R., Harmayani E., Taherzadeh M. J. 2012. Isolation and characterization of zygomycetes fungi from tempe for ethanol production and biomass applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167**(6): 1501.

Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., Sharefkin J.B. 1992. Effect of different laboratory techniques for guanidium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *Genome Research* **1**:286-290.

Yu J.H., Rosén S., Adams, T.H. 1999. Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the aspergillus FibA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics*. **151**(1):97-105.

Zerial M., McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**:107-117.

Zhang W. 2011. Roles of heterotrimeric G proteins in guard cell ion channel regulation. *Plant Signaling and Behavior* **6**:986-990.

Zilberbeg M.D., Shorr A.F., Huang H., Chaudhari P., Paly V.F., Menzin J. 2014. Hospital days, hospitalization costs, and inpatient mortality among patients with mucormycosis: a retrospective analysis of US hospital discharge data. *BMC Infectious Diseases*. **14**:310