



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico – Biológicas

LABORATORIO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

TÍTULO DE LA TESIS:

**“FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Gpb1
(SUBUNIDAD BETA 1) Y Gpg1 (SUBUNIDAD GAMA 1) EN LA
SEÑALIZACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL Y VIRULENCIA MEDIADA
POR CALCIO EN *Mucor lusitanicus*”**

**Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Biología Experimental**

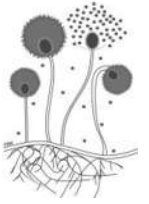
PRESENTA:

QFB. FRANCISCO RÍOS MÍRELES

Director de tesis: D.C. VÍCTOR MEZA CARMEN

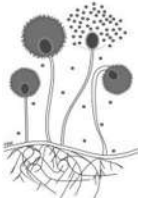


Morelia, Michoacán, junio 2025

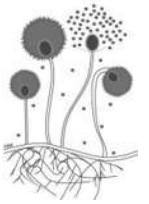


A. ÍNDICE

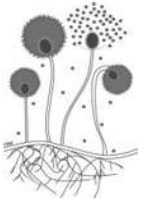
A. ÍNDICE	2
B. ÍNDICE DE FIGURAS	7
D. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	11
E. ABREVIATURAS Y NOMBRE COMPLETO DE ORGANISMOS.....	14
F. COLORANTES Y MARCADORES DESCRITOS EN INVESTIGACIÓN ÚTILES PARA LA TINCIÓN/VISUALIZACIÓN DIFERENCIAL DE ESTRUCTURAS CELULARES.....	15
Blanco de calcofluor (CFW, por sus siglas en inglés).....	15
DAPI (Diamino-2-fenilindol)	15
FM4-64	15
GFP (Proteína verde fluorescente).....	15
G. SÍMBOLOS DE ELEMENTOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS DE COMPUESTOS USADOS	16
H. PREFIJOS.....	17
I. RESUMEN	18
J. ABSTRACT.....	20
I. INTRODUCCIÓN	22
1.1 Generalidades de los hongos	22
1.2 Hongos filamentosos.....	22
1.3 Hongos patógenos de humanos.....	24
1.4 Filum Mucoromycota	27
1.4.1 Subfilum Mucoromycotina.....	29
1.4.2 Orden Mucorales.....	29
1.4.3 Género <i>Mucor</i>	30
1.5 <i>Mucor lusitanicus</i>	31
1.5.1 Generalidades	31
1.5.2 Reproducción sexual y asexual de <i>M. lusitanicus</i>	33
1.5.3 Crecimiento de <i>M. lusitanicus</i>	34
1.5.4 Dimorfismo en <i>M. lusitanicus</i>	35
1.6 Factores de virulencia en <i>M. lusitanicus</i>	38
1.6.1 Tamaño de las esporas.....	38
1.6.2 Transiciones morfológicas.....	39
1.6.3 Resistencia al ataque por el sistema inmunológico	39



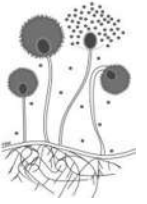
1.6.4 Sistemas para la adquisición de hierro	39
1.6.5 Invasión celular mediada por receptores.....	41
1.7 Mucormicosis	41
1.8 Proteínas G	42
1.8.1 Proteínas G monoméricas	43
1.8.2 Proteínas G heterotriméricas	43
1.8.2.1 Subunidades G α	45
1.8.2.2 Subunidades G $\beta\gamma$	45
1.8.3 Proteínas G heterotriméricas en hongos	45
1.8.4 Proteínas G heterotriméricas en <i>M. lusitanicus</i>	48
1.9 Funciones biológicas del calcio en hongos filamentosos	49
1.9.1 La maquinaria de señalización por calcio.....	50
1.10 Sistemas de alta afinidad por calcio en hongos filamentosos	51
II. ANTECEDENTES	53
III. JUSTIFICACIÓN.....	56
IV. HIPÓTESIS.....	57
V. OBJETIVO GENERAL.....	57
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	58
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	59
8.1 Cepas utilizadas	59
8.2 Medios de cultivo	60
8.2.1 Medio YPG (Yeast, Peptone, Glucose/ Levadura, Peptona, Glucosa)	60
8.2.2 Medio YNB (Yeast Nitrogen Base/ Base de Nitrógeno de Levadura)	60
8.2.3 Medio Vogel	61
8.2.4 Medio NGM (Nematode Growth Medium/ Medio para crecimiento de nematodos)	61
8.3 Condiciones generales de crecimiento de las cepas usadas	62
8.3.1 Crecimiento de <i>E. coli</i>	62
8.3.2 Crecimiento de <i>M. lusitanicus</i>	62
8.3.3 Crecimiento y mantenimiento de nematodos de <i>C. elegans</i>	62
8.3.4 Crecimiento y mantenimiento de <i>Galleria mellonella</i>	62
8.4 Experimentos fisiológicos.....	63
8.4.1 Obtención y conteo de esporas de <i>M. lusitanicus</i>	63



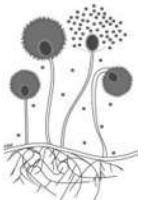
8.4.2 Crecimiento radial de <i>M. lusitanicus</i> en un sustrato sólido	64
8.4.3 Cinética de crecimiento en aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	64
8.4.4 Cinética de crecimiento en anaerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	65
8.4.5 Crecimiento en baja tensión de oxígeno (O ₂) de <i>M. lusitanicus</i>	65
8.4.6 Generación de biomasa de <i>M. lusitanicus</i>	66
8.4.7 Consumo de oxígeno de las células de <i>M. lusitanicus</i>	66
8.4.8 Cuantificación del radical OH [·]	67
8.4.9 Producción de sobrenadantes de <i>M. lusitanicus</i>	67
8.4.10 Ensayo de supervivencia de <i>C. elegans</i>	68
8.4.11 Ensayo de supervivencia de <i>G. mellonella</i>	68
8.5 Análisis bioinformático	68
8.6 Análisis de imágenes	69
8.7 Análisis estadístico	69
IX. Resultados	70
9.1 Crecimiento en medio sólido	70
9.1.1 Crecimiento de MU636 y las cepas mutantes <i>Δgpb1-3</i> y <i>Δgpg1-3</i> en condiciones de aerobiosis en un sustrato sólido	70
9.1.2 Evaluación del efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa silvestre de <i>M. lusitanicus</i> (MU636)	72
9.1.3 Evaluación del efecto del EDTA en el crecimiento radial de la cepa WT de <i>M. lusitanicus</i> . 76	
9.1.4 Efecto del calcio en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en un medio sólido	78
9.1.5 Efecto del EDTA en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas	80
9.2 Crecimiento en medio líquido	82
9.2.1 Evaluación de la velocidad de germinación en medio líquido de las esporas de la cepa WT de <i>M. lusitanicus</i> obtenidas de placas que fueron suplementadas con calcio	83
9.2.2 Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación en anaerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	84
9.2.3 Evaluación de la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> obtenidas de placas suplementadas con EDTA	88
9.2.4 Evaluación del efecto de la adición de EDTA al medio líquido en la velocidad de germinación de <i>M. lusitanicus</i>	90
9.2.5 Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las mutantes en las subunidades beta y gama de <i>M. lusitanicus</i>	92



9.2.6 Efecto del calcio en el crecimiento micelial (biomasa) en condiciones de aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	95
9.2.7 Función de las subunidades beta y gama de las proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> en el crecimiento aeróbico (biomasa) en presencia de calcio	96
9.2.8 Efecto del calcio en la morfología de <i>M. lusitanicus</i> creciendo a bajas concentraciones de oxígeno	99
9.2.9 Efecto las subunidades beta y gama de las proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> en la morfología generada a bajas concentraciones de oxígeno en presencia de calcio	100
9.3 Efecto de la adición de calcio durante el cultivo de <i>M. lusitanicus</i> en algunos parámetros del metabolismo oxidativo mitocondrial.	104
9.3.1 Efecto de la adición de calcio en la velocidad de germinación aerobia de <i>M. lusitanicus</i> usando distintas fuentes de carbono	104
9.3.2 Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa de las mutantes en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> en presencia de una fuente de carbono no fermentable.....	107
9.3.3 Efecto de la adición de calcio sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis durante el desarrollo micelial de <i>M. lusitanicus</i>	112
9.3.3.1 Efecto de la adición simultanea de calcio e inhibidores de la cadena transportadora de electrones en la respiración de <i>M. lusitanicus</i>	114
9.3.4 Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	118
9.3.5 Efecto de la adición de calcio en la generación del radical OH [·] durante el crecimiento en aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	121
9.3.5.1 Efecto de la adición de calcio en la producción del radical OH [·] en las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	122
9.3.6 Efecto del calcio extracelular en la toxicidad del sobrenadante de <i>M. lusitanicus</i>	124
9.3.7 Evaluación de la virulencia de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> obtenidas de medio sólido suplementado con calcio	126
9.3.8 Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	127
9.4 Identificación de posibles péptidos señal o motivos de direccionalidad mitocondrial en la secuencia primaria de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	129
9.5 Posibles sitios de fosforilación por PKA en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	133
9.6 Efecto del nifedipino y el verapamilo sobre la velocidad de germinación y la tasa de consumo de oxígeno de las esporas de <i>M. lusitanicus</i>	135



9.7 Identificación de proteínas formadoras de canales de calcio de alta afinidad en <i>M. lusitanicus</i>	137
9.8 Análisis <i>in silico</i> de los residuos conservados de cisteína-prolina en la estructura primaria de la posible proteína Mid1 de <i>M. lusitanicus</i>	139
9.9 Análisis <i>in silico</i> de los residuos y/o motivos o dominios conservados en la estructura primaria de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de <i>M. lusitanicus</i>	140
X. DISCUSIÓN.....	142
XI. CONCLUSIÓN	165
XII. REFERENCIAS.....	166



B. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de una hifa.	23
Figura 2. Algunas de las aplicaciones biotecnológicas de los hongos.....	24
Figura 3. Árbol filogenético del reino fúngico basado en una alineación concatenada de 192 proteínas ortólogas conservadas	28
Figura 4. Reproducción sexual y asexual de <i>M. lusitanicus</i>	34
Figura 5. Crecimiento de <i>M. lusitanicus</i> en un sustrato sólido	35
Figura 6. Reproducción asexual de <i>M. lusitanicus</i> en medio líquido	37
Figura 7. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas.....	44
Figura 8. Principales sistemas de transporte de calcio en hongos.....	52
Figura 9. Efecto de las mutaciones en los genes de subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> en el crecimiento micelial en medio sólido.	70
Figura 10. Crecimiento radial de las mutantes en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> (MU636).	71
Figura 11. Efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa silvestre de <i>M. lusitanicus</i> (MU636).	73
Figura 12. Efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa WT de <i>M. lusitanicus</i> (MU636).	75
Figura 13. Efecto del EDTA en el crecimiento radial de la cepa WT de <i>M. lusitanicus</i> (MU636).	77
Figura 14. Efecto del calcio en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas.	79
Figura 15. Efecto del EDTA en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas.	82
Figura 16. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> en condiciones de aerobiosis.	84
Figura 17. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> en condiciones de aerobiosis.	85
Figura 18. Efecto del calcio extracelular sobre la longitud y el número de hifas de las células de <i>M. lusitanicus</i>	86
Figura 19. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> en condiciones de aerobiosis en medio Vogel-2 %.	88
Figura 20. Evaluación de la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> obtenidas de placas que fueron suplementadas con EDTA.	89
Figura 21. Evaluación del efecto que tiene el EDTA agregado al medio líquido sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i>	91
Figura 22. Efecto del EDTA sobre la longitud y el número de hifas de las células de <i>M. lusitanicus</i> .91	

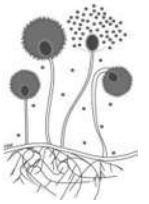


Figura 23. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en subunidades beta y gama de <i>M. lusitanicus</i>	93
Figura 24. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en subunidades beta y gama de <i>M. lusitanicus</i>	94
Figura 25. Efecto del calcio en la generación de biomasa de <i>M. lusitanicus</i> durante el crecimiento micelial en medio rico y medio mínimo.	95
Figura 26. Efecto del calcio en la generación de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> durante el crecimiento micelial en medio rico.....	97
Figura 27. Efecto del calcio en la generación de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> durante el crecimiento micelial en medio mínimo.	98
Figura 28. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de <i>M. lusitanicus</i> a bajas concentraciones de oxígeno.	100
Figura 29. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de las mutantes en subunidades beta y gama de <i>M. lusitanicus</i> a bajas concentraciones de oxígeno.	101
Figura 30. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> a bajas concentraciones de oxígeno.	103
Figura 31. Efecto del calcio extracelular sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente carbono fermentable y una no fermentable.	105
Figura 32. Efecto del calcio extracelular sobre la velocidad de germinación de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente carbono fermentable y una no fermentable en medio Vogel.	106
Figura 33. Efecto de la adición de calcio sobre la producción de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente de carbono no fermentable.	108
Figura 34. Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa en condiciones de aerobiosis de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente carbono no fermentable.....	110
Figura 35. Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa en condiciones de aerobiosis de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente carbono no fermentable.....	111
Figura 36. Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i> usando una fuente de carbono fermentable y una no fermentable.	114
Figura 37. Efecto de la adición de calcio e inhibidores de la cadena respiratoria sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i>	116
Figura 38. Efecto de la adición de calcio e inhibidores de la cadena respiratoria sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de <i>M. lusitanicus</i> en medio sintético.	118

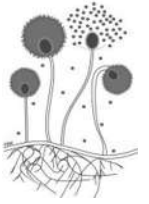
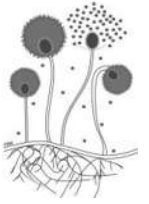
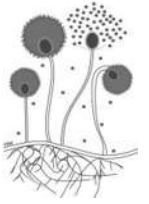


Figura 39. Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno de las mutantes en subunidades betas y gamas de <i>M. lusitanicus</i>	120
Figura 40. Efecto de la adición de calcio en la producción del radical OH \cdot durante el crecimiento micelial de <i>M. lusitanicus</i>	122
Figura 41. Efecto de la adición de calcio en la producción del radical OH \cdot durante el crecimiento micelial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	123
Figura 42. Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de <i>M. lusitanicus</i>	125
Figura 43. Evaluación de la virulencia de las esporas de <i>M. lusitanicus</i> obtenidas de medio suplementado con calcio usando a <i>G. mellonella</i> como modelo de infección	126
Figura 44. Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	128
Figura 45. Predicción de la exportación mitocondrial de las diferentes subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando los programas TargetP (Azul) y Mitoprot (Rojo).....	131
Figura 46. Efecto del nifedipino y el verapamilo sobre la velocidad de germinación y la tasa de consumo de oxígeno de las esporas de <i>M. lusitanicus</i>	136
Figura 47. Residuos conservados de C-P en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína Mid1 de <i>M. lusitanicus</i>	139
Figura 48. Residuos conservados de ácido glutámico (E) en las secuencias primarias de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de <i>M. lusitanicus</i>	140
Figura 49. Residuos conservados de cisteína (C) y ácido aspártico (D) en las secuencias primarias de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de <i>M. lusitanicus</i>	141
Figura 50. Modelo propuesto de la participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1 en el metabolismo oxidativo mitocondrial mediado por calcio en <i>M. lusitanicus</i>	162



C. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Símbolos de elementos y fórmulas químicas de compuestos.....	16
Tabla 2. Prefijos del Sistema Internacional de Unidades	17
Tabla 3. Primer lista de hongos patógenos de la OMS.....	26
Tabla 4. Algunas de las especies dimórficas de <i>Mucor</i>	31
Tabla 5. Tamaño del genoma de algunas especies de hongos	32
Tabla 6. Número de proteínas G heterotriméricas en algunas especies de hongos	46
Tabla 7. Funciones de algunas proteínas G heterotriméricas en algunas especies de hongos	47
Tabla 8. Cepas utilizadas	59
Tabla 9. Predicción de la localización subcelular de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando algoritmos computacionales.....	131
Tabla 10. Identificación de los probables motivos de reconocimiento para TOM20 en la secuencia primaria de aminoácidos de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i> usando un algoritmo computacional	132
Tabla 11. Predicción de posibles sitios de fosforilación por PKA en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de <i>M. lusitanicus</i>	134
Tabla 12. Características de las posibles proteínas homologas a Cch1 y Mid1 de <i>M. lusitanicus</i> ..	137
Tabla 13. Porcentajes de identidad y similitud de la proteína Mid1 de <i>M. lusitanicus</i> en comparación con la proteína de otras especies de hongos.....	138
Tabla 14. Porcentajes de identidad y similitud de las proteínas Cch1 de <i>M. lusitanicus</i> en comparación con la proteína de otras especies de hongos.....	138



D. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AMP: Adenosín monofosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

BUD: Proteína del polarisoma; factor promotor de la nucleación

BNI: Formina; componente del polarisoma; (Bud Necked Involved)

CCS: Calcium cell survival (Supervivencia celular mediada por calcio)

CDC: Proteína controladora del ciclo celular

CHS: Quitina sintasa

CHSs: Familia de quitina sintasas

CFW: Blanco de calcoflúor

CaSR: Receptor extracelular para la detección de calcio

cm: centímetro

DKA: Siglas en inglés para cetoacidosis diabética

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FM4-64: 4-64 (*N*-(3-trietilamoniumpropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) hexatrienilo) piridinio dibromuro)

FPPL: Fungal Priority Pathogens List

GPCRS: Receptores Acoplados a Proteínas G

GSC: complejo de glucano sintasas

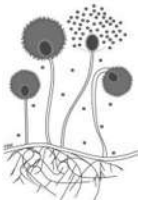
GTP: Guanosín trifosfato

GDP: Guanosín difosfato

G α : Subunidad α de proteína G heterotrimérica

G β : Subunidad β de proteína G heterotrimérica

GY: Subunidad γ de proteína G heterotrimérica



G β Y: Dímero β Y de proteína G heterotrimérica

GFP: proteína verde fluorescente

GTPasa: Enzima con actividad GTPasa

Gpb1: subunidad beta 1 de proteína G heterotrimérica

Gpb2: subunidad beta 2 de proteína G heterotrimérica

Gpb3: subunidad beta 3 de proteína G heterotrimérica

GEF: Factor intercambiador de guanidina

gpb1: gen que codifica a la subunidad beta 1 de proteína G heterotrimérica

GalXM: Galactoxilomanana

GXM: Glucoronoxilomanana

Glc-NAc: N-acetilglucosamina

HACS: High Affinity Calcium Channels

I+D: Investigación y Desarrollo

LUCA: Last Universal Common Ancestor

LB: Lysogeny Broth

L: Litro

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

mL: Mililitro

Mpb: Millones de pares de bases

NGM: Nematode Growth Medium

OMS: Organización Mundial de la Salud

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PKA: Proteína cinasa A

PkaR: subunidad regulatoria de la proteína cinasa A

PkaC: subunidad catalítica de la proteína cinasa A

RGS: Reguladores de señalización por proteínas G



RAC: una GTPasa

rpm: Revoluciones por minuto

Rho: Es una GTPasa

SI: Sistema Internacional

Spk: Spitzenkörper

SPA: Componente del polarisoma; Antígeno del polo del huso (Spindle Pole Antigen)

YPG: Yeast Peptone Glucose

YNB: Yeast Nitrogen Base

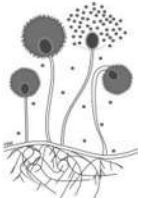
var: Variante

Δ gpb1: mutante por delección del gen codifica a la subunidad beta 1 de proteína G heterotrimérica

μ L: Microlitro

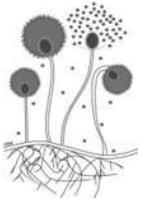
μ m: Micrómetro

β -1,4-Glc-NAc: quitina



E. ABREVIATURAS Y NOMBRE COMPLETO DE ORGANISMOS

- A. victoria:** *Aequorea victoria*
- S. cerevisiae:** *Sacharomyces cerevisiae*
- S. pombe:** *Schizosaccharomyces pombe*
- M. circinelloides:** *Mucor circinelloides*
- M. lusitanicus:** *Mucor lusitanicus*
- M. rouxii:** *Mucor rouxii*
- A. tumefaciens:** *Agrobacterium tumefaciens*
- A. fumigatus:** *Aspergillus fumigatus*
- G. mellonella:** *Galleria mellonella*
- H. capsulatum:** *Histoplasma capsulatum*
- H. uvarum:** *Hanseniaspora uvarum*
- C. albicans:** *Candida albicans*
- C. neoformans:** *Cryptococcus neoformans*
- N. crassa:** *Neurospora crassa*
- E. coli:** *Escherichia coli*
- C. elegans:** *Caenorhabditis elegans*
- C. auris:** *Candida auris*
- C. glabrata:** *Candida glabrata*
- Spp:** especies de
- C. tropicalis:** *Candida tropicalis*
- C. gattii:** *Cryptococcus gattii*
- R. oryzae:** *Rhizopus oryzae*
- R. delemar:** *Rhizopus delemar*
- R. microsporus:** *Rhizopus microsporus*
- U. maydis:** *Ustilago maydis*



F. COLORANTES Y MARCADORES DESCRITOS EN INVESTIGACIÓN ÚTILES PARA LA TINCIÓN/VISUALIZACIÓN DIFERENCIAL DE ESTRUCTURAS CELULARES

Blanco de calcofluor (CFW, por sus siglas en inglés)

El blanco de calcofluor es un fluórocromo no específico que se une a la celulosa y a la quitina de las paredes celulares de hongos, plantas y algas. Es usado como un método rápido para la detección de levaduras y hongos patógenos.

DAPI (Diamino-2-fenilindol)

Es un colorante fluorescente usado para teñir núcleos, contenido de ADN, células fijas y células vivas (aunque de manera menos eficiente, por lo que también se usa como un marcador de la viabilidad de la membrana). Se une en regiones ricas en timina y adenina.

FM4-64

Es un colorante que tiñe selectivamente las membranas vacuolares de levaduras con fluorescencia de color rojo. Es altamente lipofílico y es una importante herramienta para visualizar la dinámica y la morfología de los orgánulos vacuolares y para estudiar la ruta endocítica.

GFP (Proteína verde fluorescente)

La proteína verde fluorescente es una proteína fluorescente producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite fluorescencia verde en el espectro visible. El gen que codifica esta proteína está aislado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador.

G. SÍMBOLOS DE ELEMENTOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS DE COMPUESTOS USADOS

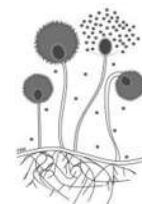
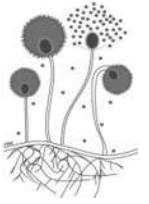


Tabla 1. Símbolos de elementos y fórmulas químicas de compuestos

Nombre IUPAC	Nombre común	Fórmula química del compuesto
Cloruro de calcio	Cloruro de calcio	CaCl ₂
Ácido 2,2',2'',2'''-(Etano-1,2-dinitrilo) tetraacético	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈
2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo	Nifedipino	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆
(RS)-2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil-metil-amino]-2-(1-metiletil)pentanenitrilo	Verapamilo	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄

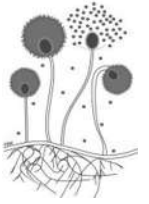


H. PREFIJOS

Los prefijos del Sistema Internacional (SI) se utilizan para nombrar a los múltiplos y submúltiplos de cualquier unidad del SI, ya sean unidades básicas o derivadas. Estos prefijos se anteponen al nombre de la unidad para indicar el múltiplo o submúltiplo decimal de la misma; del mismo modo, los símbolos de los prefijos se anteponen a los símbolos de las unidades.

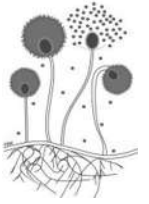
Tabla 2. Prefijos del Sistema Internacional de Unidades

Nombre	Símbolo	Notación convencional	Notación científica
Peta	P	1000000000000000	10^{15}
Tera	T	1000000000000	10^{12}
Giga	G	1000000000	10^9
Mega	M	1000000	10^6
Kilo	K	1000	10^3
Unidad		1	10^0
Mili	m	0.001	10^{-3}
Micro	μ	0.000001	10^{-6}
Nano	n	0.000000001	10^{-9}
Pico	p	0.000000000001	10^{-12}
Femto	f	0.000000000000001	10^{-15}



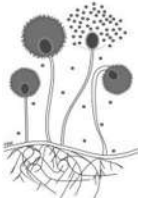
I. RESUMEN

Mucor lusitanicus es un hongo dimórfico perteneciente al orden de los Mucorales, considerado un modelo biológico para el entendimiento de la infección oportunista conocida como mucormicosis. Este Mucoral crece como micelio o levadura y en términos generales, el micelio exhibe un metabolismo de tipo oxidativo y un fenotipo virulento, mientras que las levaduras correlacionan con un metabolismo de tipo fermentativo y un fenotipo no virulento. En otros hongos filamentosos, se ha descrito que el calcio extracelular estimula procesos celulares como el crecimiento y la virulencia de 2 formas principalmente, ya sea a través de su transporte pasivo al interior de la célula mediado por canales de calcio o a través de la percepción de este ion mediante su unión a receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. En este proyecto se evaluó la participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1 de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en el metabolismo oxidativo mitocondrial mediado por calcio. Para ello se usaron como herramientas genéticas a las mutantes por delección en las 3 subunidades beta y en las 3 subunidades gama de proteínas G heterotriméricas que posee este Mucoral. Nuestros resultados mostraron que las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ permanecieron insensibles al estímulo por calcio en cada uno de los experimentos evaluados en cuanto al crecimiento y virulencia englobados en el metabolismo oxidativo mitocondrial, mientras que la cepa silvestre respondió positivamente a esta señal por calcio extracelular aumentando su crecimiento y virulencia. El resto de las mutantes ($\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$ y $\Delta gpg2$) se comportaron muy similar a la cepa WT a excepción de la mutante $\Delta gpg3$, la cual se comportó muy similar a la cepa WT en los experimentos en los que no se le suplemento con calcio extracelular, mientras que al ser tratada con calcio redujo su crecimiento significativamente sugiriendo un probable defecto a nivel de barreras como la pared celular, la membrana plasmática y/o sistemas encargados de la regulación de sustancias extracelulares. Estos datos sugieren que las subunidades Gpb1 y Gpg1 son esenciales para que *M. lusitanicus* pueda responder a las señales extracelulares mediadas por calcio, y que al tener ambas mutantes un fenotipo muy similar en todos los experimentos evaluados también sugiere que ambas



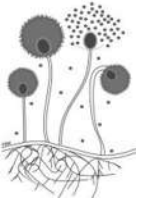
subunidades probablemente estarían formando un dímero $G\beta 1$ - $G\gamma 1$ funcional para el control de los procesos antes descritos posiblemente a través de la represión de la vía AMPc-PKA. Además, los análisis *in silico* sugirieron que el genoma de este Mucoral posee los genes necesarios para la expresión de las proteínas Cch1 y Mid1, necesarias para la formación de canales de calcio de alta afinidad (HACS) ubicados en la membrana plasmática que permitirían el ingreso del calcio extracelular al interior de la célula a través del transporte pasivo, permitiendo la homeostasis por calcio necesaria para el metabolismo de las células. Por otro lado, experimentos fisiológicos en los que se usaron a los fármacos nifedipino y verapamilo, conocidos por bloquear a canales de calcio de alta afinidad en otros hongos filamentosos, apoyan la hipótesis de que este Mucoral posee la maquinaria necesaria para el transporte pasivo del calcio extracelular a través del complejo Cch1-Mid1 ubicado en la membrana plasmática.

Palabras clave: metabolismo oxidativo, calcio, proteínas G heterotriméricas, virulencia, canales de calcio de alta afinidad



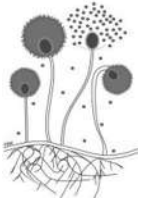
J. ABSTRACT

Mucor lusitanicus is a dimorphic fungus belonging to the order of Mucorales, considered a biological model for understanding the opportunistic infection known as mucormycosis. This Mucoral grows as mycelium or yeast, and in general terms, the mycelium exhibits an oxidative type of metabolism and a virulent phenotype, while yeasts correlate with a fermentative type of metabolism and a non-virulent phenotype. In other filamentous fungi, extracellular calcium has been described as a stimulator of cellular processes, such as growth and virulence. This ion has been reported to stimulate these processes primarily through two pathways: either through passive transport into the cell mediated by calcium channels or through the perception of this ion by binding to heterotrimeric G protein-coupled receptors. This project evaluated the role of the Gpb1 and Gpg1 subunits of heterotrimeric G proteins of *M. lusitanicus* in calcium-mediated mitochondrial oxidative metabolism. For this purpose, deletion mutants in the 3 beta subunits and in the 3 gamma subunits of heterotrimeric G proteins that this Mucoral possesses were used as genetic tools. Our results showed that the $\Delta gpb1$ and $\Delta gpg1$ mutants remained insensitive to calcium stimulation in each of the experiments evaluated in terms of growth and virulence encompassed in mitochondrial oxidative metabolism, while the wild type strain responded positively to this extracellular calcium signal increasing its growth and virulence. The rest of the mutants ($\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$ and $\Delta gpg2$) behaved very similar to the WT strain except for the $\Delta gpg3$ mutant, which behaved very similar to the WT strain in experiments in which it was not supplemented with extracellular calcium. In contrast, when treated with calcium it reduced its growth and virulence significantly suggesting a probable defect at a barrier level such as the cell wall, the plasma membrane and/or systems responsible for the regulation of extracellular substances. These data suggest that the Gpb1 and Gpg1 subunits are essential for *M. lusitanicus* to respond to calcium mediated extracellular signals, and that since both mutants have a very similar phenotype in all the experiments evaluated, it also suggests that both subunits would probably be forming a functional G β 1-GY1 dimer to control the processes described above, possibly through the



repression of the cAMP-PKA pathway. Furthermore, *in silico* analysis suggested that the genome of this Mucoral has the needed genes for the expression of the Cch1 and Mid1 proteins, which make up High-Affinity Calcium Channels (HACS) located in the plasma membrane that would allow the uptake of extracellular calcium through passive transport, allowing calcium homeostasis necessary for cell metabolism. On the other hand, physiological experiments using the drugs nifedipine and verapamil, known to block HACS in other filamentous fungi, support the hypothesis that this Mucoral possesses the necessary machinery for the passive transport of extracellular calcium through the Cch1-Mid1 complex located in the plasma membrane.

Keywords: oxidative metabolism, calcium, heterotrimeric G proteins, virulence, high-affinity calcium channels



I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas que van desde los microscópicos como levaduras e hifas, a los macroscópicos como los champiñones. Estos organismos son abundantes a escala mundial debido a su tamaño pequeño y a su estilo de vida críptico en el suelo, materia muerta y en descomposición, como simbioses con algas, hongos, briofita, plantas superiores y animales. Aunque los hongos son de naturaleza muy diversa, su fisiología celular básica y su genética comparten algunos componentes en común con las células vegetales y animales (Mohanta y Bae, 2015).

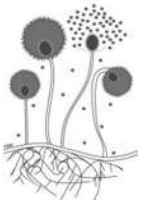
En la actualidad, la clasificación taxonómica aceptada de los hongos se basa en el concepto de especie filogenética y por tanto en estudios filogenéticos (Mohanta y Bae, 2015). El tamaño del genoma de los hongos está en el intervalo de 8.97 a 177.57 millones de pares de bases nitrogenadas en su ADN (Tabla 5) (Mohanta y Bae, 2015).

El reino de los hongos está actualmente clasificado en varios filum principales como lo son Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Glomeromycota, Entomophthoromycota, y Microsporidia y en subfilum llamados Kickxellomycotina, Mucoromycotina y Zoopagomycotina (Spatafora et al., 2017).

1.2 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos han probado ser mejores modelos de estudio que las levaduras en cuanto a los análisis de procesos celulares tales como el crecimiento polarizado, la exocitosis, la endocitosis y el tráfico de orgánulos mediado por el citoesqueleto (Riquelme & Martínez-Núñez, 2016).

Las hifas son un sistema de filamentos microscópicos que contienen vesículas empacadas en sus puntas en crecimiento y que pueden elongarse y ramificarse



para crear una red de tubos interconectados, que en conjunto forman lo que se conoce como micelio. Una de las características que distinguen a las hifas es la presencia o ausencia de septos. En especies de hongos con hifas aseptadas, el núcleo se encuentra en una masa común de citoplasma. En hifas septadas, cada segmento contiene uno, dos o más núcleos (Webster & Weber, 2007) (Figura 1).

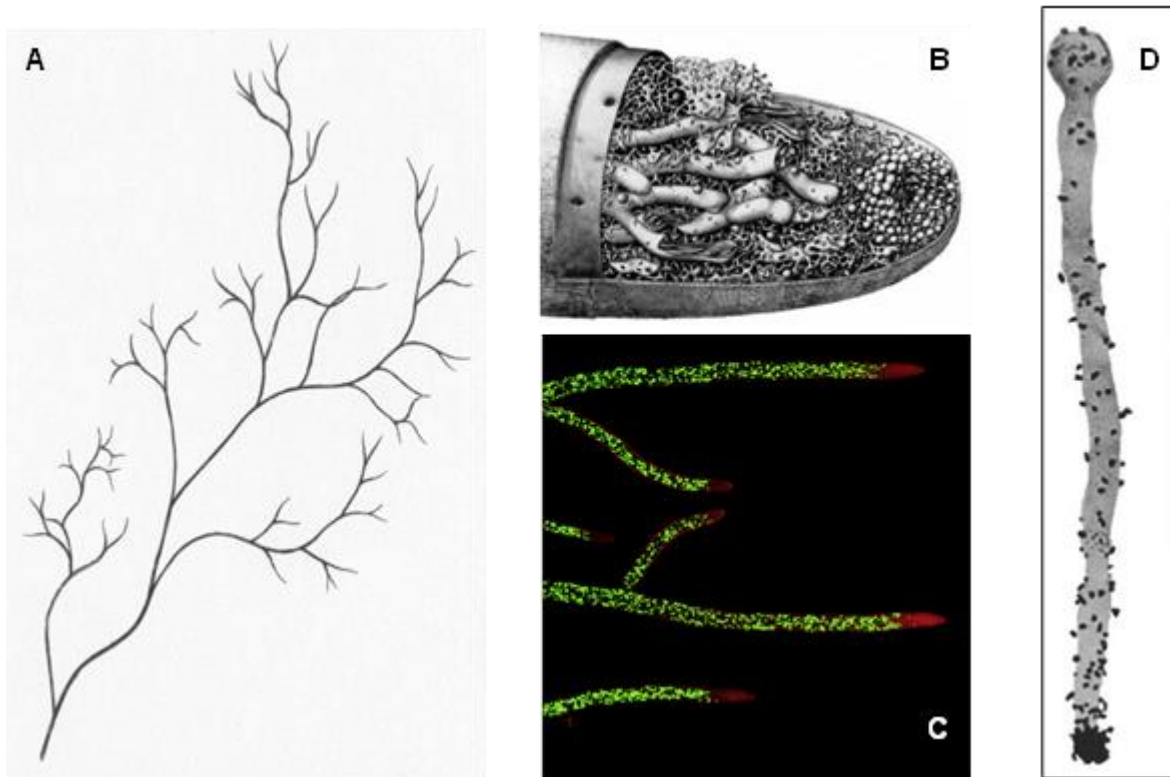
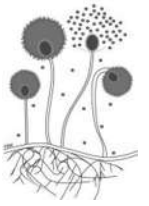


Figura 1. Estructura básica de una hifa. **A.** La primera ilustración publicada de una hifa por Malpighi, 1675–1679; **B.** Diagrama que muestra el interior de una punta hifal empacada con vesículas que forman el Spitzenkörper cuya posición dirige la dirección del crecimiento hifal; **C.** Hifas de *Neurospora crassa* en las que se han resaltado los núcleos con la proteína verde fluorescente (GFP) y la membrana plasmática y vesículas secretoras teñidas con rojo FM4-64; **D.** Se representa el patrón polarizado de la síntesis de la pared celular en germínulas de *Mucor rouxii* marcadas con N-acetil-D-glucosamina tritiada (Tomada y modificada de Money, 2021).



1.3 Hongos patógenos de humanos

El reino de los hongos incluye hasta 6 millones de especies y son notables en términos de la amplitud y profundidad de su impacto en la salud global, la agricultura, la biodiversidad, la ecología, la fabricación y la investigación biomédica (Figura 2) (Yadav et al., 2018b).

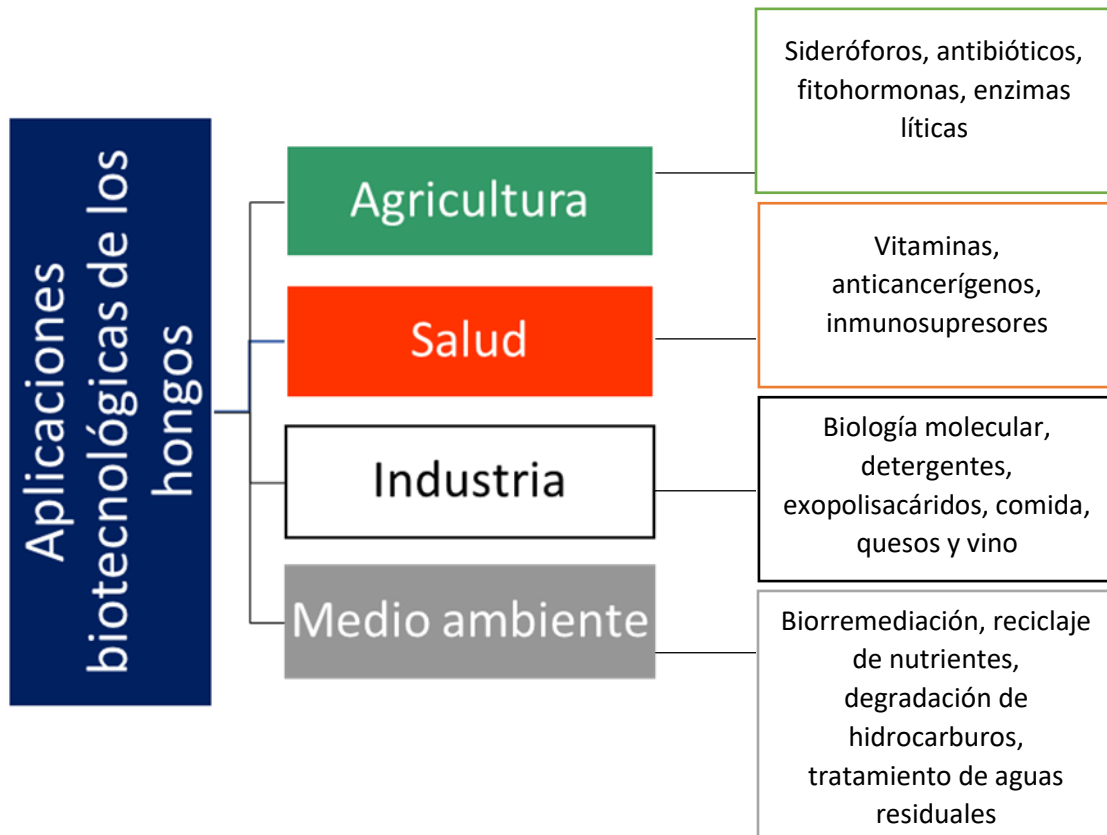
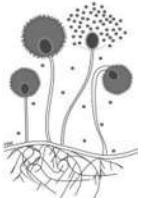


Figura 2. Algunas de las aplicaciones biotecnológicas de los hongos. Se describió que los hongos tienen un sinnúmero de aplicaciones biotecnológicas y mientras más se les estudia, mejor se pueden aprovechar sus propiedades. Los hongos endófitos han mostrado ser una de las mejores fuentes de compuestos bioactivos naturales, los cuales tienen potenciales biotecnológicos en diversos campos, tales como en la industria alimenticia, en la medicina, el medio ambiente y la agricultura. (Tomada y modificada de Yadav et al., 2018b).

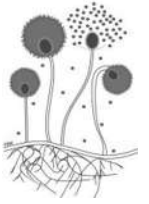
Más de 600 especies de hongos están asociados con los humanos, ya sea como comensales y miembros de nuestro microbioma o como patógenos que causan algunas de las enfermedades infecciosas más letales (Konopka et al., 2019). Los



hongos patógenos de humanos causan más de mil millones de infecciones humanas cada año, lo que resulta en más de 1.6 millones de muertes anuales (Rokas, 2022). Las personas con sistemas inmunitarios debilitados son la más vulnerables, pero las personas sanas también corren el riesgo de contraer patógenos conocidos y emergentes, especialmente en situaciones en las que la infección implica un gran inóculo y con el aumento global en la incidencia de infecciones fúngicas invasivas y la aparición y propagación de patógenos fúngicos resistentes a todas las clases actuales de antifúngicos (Konopka et al., 2019; Benedict et al., 2018).

El impacto total de las enfermedades fúngicas en los seres humanos no es claro, debido en parte a la falta general de un requisito para que los trabajadores de la salud informen las infecciones fúngicas. Esta brecha ha tenido muchas consecuencias graves, entre ellas una conciencia pública limitada sobre los hongos y una capacitación insuficiente sobre los hongos y las enfermedades fúngicas para los estudiantes de medicina, salud pública y microbiología. Además, hay evidencia reciente de que la cantidad de especies de hongos asociada con los humanos está subestimada debido al hecho de que muchas especies aún no se pueden cultivar en el laboratorio (Findley et al., 2013; Konopka et al., 2019). La ignorancia resultante sobre los hongos pone a la sociedad en un riesgo significativo con la aparición de nuevos patógenos fúngicos, incluidos aquellos para los que ninguna de las opciones de tratamiento actuales es eficaz (Konopka et al., 2019).

En octubre de 2022 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primer lista de hongos patógenos prioritarios (FPPL, por sus siglas en inglés) en la que se priorizan sistemáticamente a los hongos patógenos de humanos, teniendo en cuenta sus necesidades de investigación y desarrollo (I+D) y la importancia percibida para la salud pública. La lista está dividida en tres categorías: prioridad crítica, prioridad alta y prioridad media. La prioridad de esta lista se centró en aquellos hongos patógenos que pueden causar infecciones fúngicas sistémicas agudas y subagudas y para los cuales se ha demostrado la resistencia a los medicamentos u otros desafíos de tratamiento y manejo. El grupo crítico incluye a



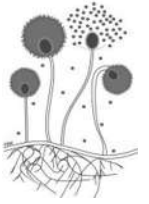
Cryptococcus neoformans, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. El grupo de alta prioridad incluye a *Candida glabrata*, *Histoplasma spp.*, agentes causante de eumicetoma, Mucorales, *Fusarium spp.*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. Finalmente, los hongos patógenos de prioridad media incluyen a *Scedosporium spp.*, *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides spp.*, *Pichia kudriavzevii*, *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffeii*, *Pneumocystis jirovecii* y *Paracoccidioides spp.* (Tabla 3) (WHO, 2022).

Tabla 3. Primera lista de hongos patógenos de la OMS

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

Tomada y modificada de WHO, 2022

En esta lista publicada por la OMS, se incluyen a los Mucorales y los incluye dentro del grupo de alta prioridad debido a que en este grupo de hongos existe una gran ausencia de información clínica relevante, lo que engloba datos como la incidencia global anual, el tiempo de estancia en el hospital una vez que se atiende a la infección y al aumento en la incidencia de infecciones causadas por especies de hongos de este grupo en los últimos 10 años. Además, de que la prevención de la mucormicosis invasiva es un desafío. Aunado a esto, hay que agregar que el acceso a diagnósticos convencionales y la disponibilidad y asequibilidad de tratamientos basados en evidencia es desconocido. Otro punto importante para incluirlo dentro de este grupo es la resistencia intrínseca a varios agentes antifúngicos, entre los que destacan los azoles de cadena corta como el fluconazol, el voriconazol y las



equinocandinas y que, además algunas especies/cepas tienen altos valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) para antifúngicos como la anfotericina B (WHO, 2022).

1.4 Filum Mucoromycota

Hace tiempo los hongos zigomicetos se clasificaron como un solo filum, Zygomycota, en general, con base en la reproducción sexual por zigosporas, reproducción asexual frecuente por esporangios, ausencia de esporocarpos multicelulares y la producción de hifas cenocíticas. Sin embargo, el análisis filogenético molecular basado en unos pocos genes no apoyó la monofilia del filum y fue posteriormente abandonado. En su lugar, se propuso la existencia de dos clados principales, los filum Mucoromycota y Zoopagomycota. El abandono del filum Zygomycota se formalizó en Hibbett et al. (2007), que trató a los hongos zigomicetos como cuatro subfilums, incluidos Entomophthoromycotina, Kickellomycotina, Mucoromycotina y Zoopagomycotina (Figura 3). Éste último comprende Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina y Zoopagomycotina; constituye el linaje divergente más antiguo de zigomicetos y contiene especies que son principalmente parásitos y patógenos de animales pequeños (por ejemplo, amebas, insectos, etc.) y otros hongos, es decir, micoparásitos. Mucoromycota comprende Glomeromycotina, Mortierellomycotina y Mucoromycotina; consiste principalmente en hongos micorrízicos, endófitos de raíces y descomponedores de material vegetal (Spatafora et al., 2016).

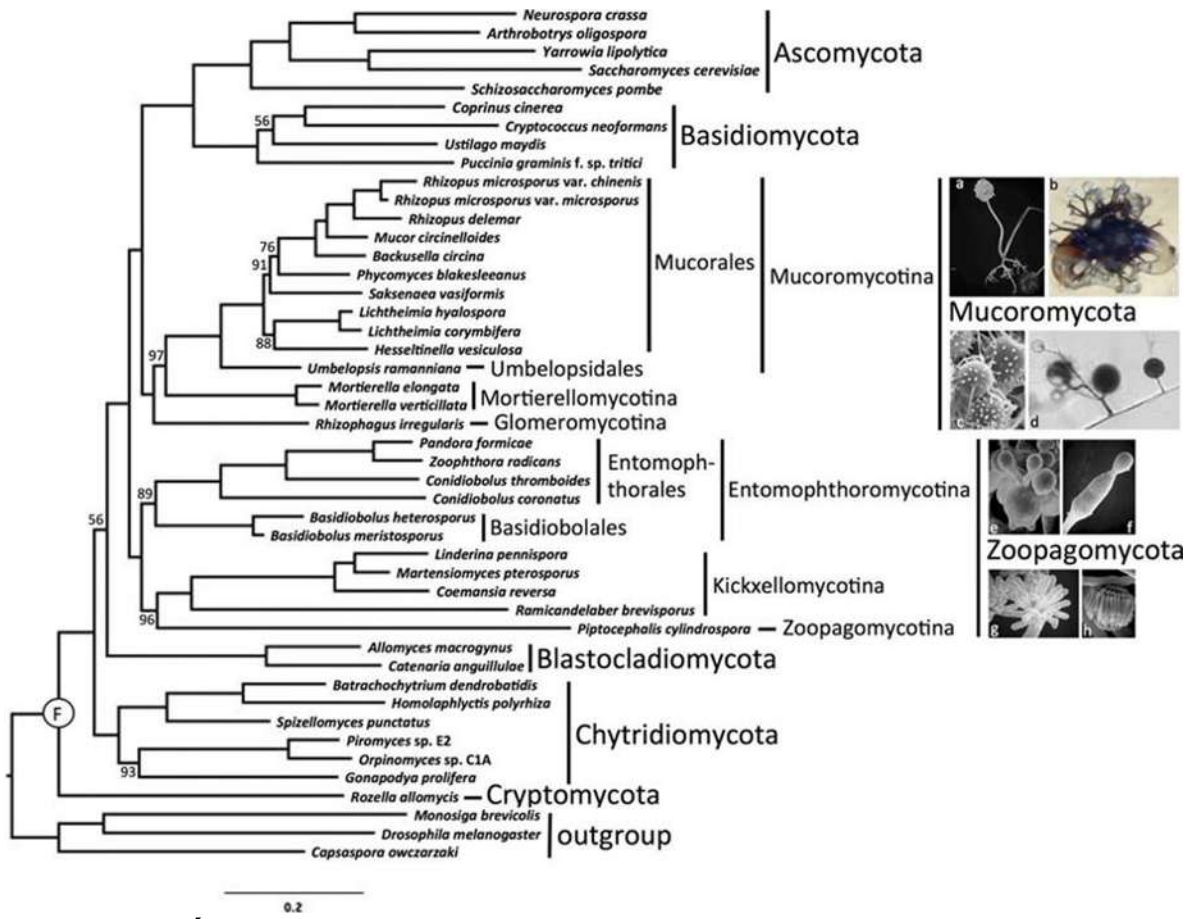
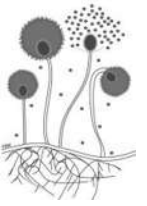
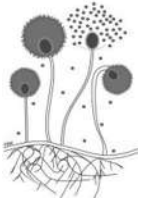


Figura 3. Árbol filogenético del reino fúngico basado en una alineación concatenada de 192 proteínas ortólogas conservadas. Todas las ramas recibieron particiones de corrida del 100 % excepto donde se indique el número arriba o debajo de su rama respectiva. Las imágenes de ejemplo incluyen: (a) esporangio de *Rhizopus spp.* (MEB). (b) zigospora de *Phycomyces spp.* (MCC). (c) clamidosporas de *Mortierella spp.* (MEB). (d) hifa y esporas de *Rhizophagus spp.* (MCC). (e) conidios secundarios (replicativos) de *Conidiobolus spp.* que se forman en conidios primarios (MEB). (f) conidio balistospórico de *Basidiobolus spp.* (MEB). (g) merosporangio de *Piptocephalis spp.* (MEB). (h) merosporangio de *Linderina spp.* (MEB). MCC: Microscopia de Campo Claro, MEB: Microscopia Electrónica de Barrido (Tomada y modificada de Spatafora et al., 2016).



1.4.1 Subfilum Mucoromycotina

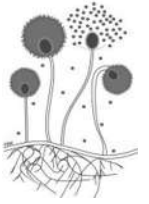
Este subfilum incluye a los géneros de *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, y *Rhizomucor*. Muchos de estos se caracterizan por tener un rápido crecimiento, en ser primeros colonizadores de sustratos ricos en carbono, con varias especies utilizadas en la industria para la producción y fermentación de ácidos orgánicos (Spatafora et al., 2016).

A su vez, el subfilum Mucoromycotina contiene a los órdenes Endogonales, Umbelopsidales y Mucorales (Figura 3) (White et al., 2006). Especialmente el orden Mucorales de Mucoromycotina abarca varias especies patógenas humanas, causantes de la infección fúngica conocida como mucormicosis. Aunque las infecciones por hongos mucorales son menos comunes en comparación con las aspergilosis o las candidiasis, estos hongos se reconocen cada vez más como la fuente de infección en pacientes inmunocomprometidos (Schwartz et al., 2016).

1.4.2 Orden Mucorales

Los Mucorales son saprófitos del suelo con un comportamiento parasitario ocasional hacia plantas y animales. Comprenden un antiguo linaje cuya distancia evolutiva de los filos de otros hongos parásitos humanos es evidente en la estructura de sus hifas, las cuales son frágiles, de paredes delgadas y que carecen de septos, y en la composición de sus paredes celulares, en las que la quitina y el quitosano desempeñan los roles estructurales que cumplen los glucanos en los Dikarya (Figuras 7 y 9) (Köhler, 2017).

Los Mucorales son económicamente importantes como agentes de fermentación de productos de soja y productores de enzimas, han sido usados en biotecnología para la biotransformación de compuestos importantes para la industria farmacéutica y médica tales como esteroides y terpenoides (Figura 2). Los mucorales producen esporas asexuales unicelulares, conocidas como esporangiosporas (Walther et al., 2019).

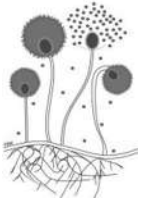


La adquisición de micronutrientes como el hierro es un requisito básico para un patógeno fúngico. En los Mucorales, es probable que esta capacidad haya evolucionado en su interacción con bacterias: la deferoxamina, un compuesto usado en la terapia de quelación en pacientes con sobrecarga de hierro, de quienes por ejemplo *Rhizopus spp.* puede adquirir hierro, es un sideróforo bacteriano (Boelaert et al., 1993). La importancia de la homeostasis del hierro también se ve reflejado en la descripción del genoma de uno de los antiguos representantes de los mucorales *Lichteimia spp.*, en el que las permeasas de hierro/zinc, las hemo oxigenasas y transportadores de sideróforos no presentes en *Rhizopus spp.* fueron descubiertos, por lo que un vínculo entre la limitación de hierro y la señalización mediada por calcineurina fue descubierta (Schwartz et al., 2014).

1.4.3 Género *Mucor*

Mucor es el género más extenso en especies dentro de los Mucorales. Sus especies comprenden principalmente saprofitos, pero también endófitos, parásitos de plantas y patógenos de humanos causantes de mucormicosis (Walther et al., 2019; Hurdeal et al., 2021). Las especies de este género forman colonias de crecimiento rápido que se caracterizan por esporangióforos simples o ramificados. Además, comprende especies mesofílicas con algunas pudiendo crecer a temperaturas elevadas, pero nunca a más de 42 °C (Hurdeal et al., 2021). Hasta la fecha, se sabe que 12 especies del género *Mucor* son causantes de infecciones: *M. amphibiorum*, *M. circinelloides*, *M. griseocyanus*, *M. indicus*, *M. irregularis*, *M. janssenii*, *M. lusitanicus*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *M. ramosissimus*, *M. variicolumellatus* y *M. velutinosus* (Pham et al., 2023). Los miembros de este género causan infecciones cutáneas predominantemente pero también la forma diseminada y manifestaciones gastrointestinales han sido reportadas. El género *Mucor* está formado por 76 especies aceptadas y es el género más grande de los mucorales (Wagner et al., 2019).

Las especies de este género llevan a cabo un proceso de diferenciación celular conocido como dimorfismo (Tabla 4), durante el cual las esporangiosporas,



dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales, germinan para producir levaduras o hifas alargadas que se ramifican (Figuras 4 y 6) (Orlowski, 1991).

Tabla 4. Algunas de las especies dimórficas de *Mucor*

Especies dimórficas	
<i>M. racemosus</i>	<i>M. mucedo</i>
<i>M. rouxii</i>	<i>M. hiemalis</i>
<i>M. genevensis</i>	<i>M. miehei</i>
<i>M. bacilliformis</i>	<i>M. pusillus</i>
<i>M. subtilissimus</i>	<i>M. rammanianus</i>
	<i>M. subtilissimus</i>

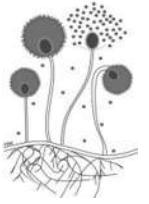
Modificada de Orlowski, 1991

1.5 *Mucor lusitanicus*

1.5.1 Generalidades

Con base en la morfología y experimentos de apareamiento, la especie de *Mucor* clínicamente más relevante, *Mucor circinelloides*, se solía dividir en cuatro formas: *f. circinelloides*, *f. griseocyanus*, *f. janssenii* y *f. lusitanicus*. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes, morfológicos y de apareamiento han establecido una re-clasificación taxonómica, en la que cada una de las formas de *M. circinelloides* representa una sola especie (Wagner et al., 2019; Walther et al., 2019).

Una ventaja importante de este hongo sobre las demás especies de Mucorales es que su genoma se encuentra secuenciado y se puede acceder a él en el siguiente enlace: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>. El genoma de este microorganismo está distribuido en 9 cromosomas, con un total de 11,719 genes en 36.61 millones de pares de bases (Mpb). Su tamaño de genoma es similar cuando se compara con la de otras especies de hongos, por ejemplo, los tamaños promedio



del genoma de hongos que pertenecen a las divisiones *Basidiomycota* y *Ascomycota* son de 46.48 Mpb y 36.91 Mpb, respectivamente (Tabla 5) (Mohanta & Bae, 2015).

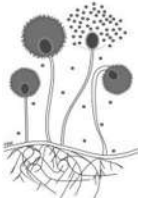
Tabla 5. Tamaño del genoma de algunas especies de hongos

No	Nombre de la especie de hongo	División	Tamaño del genoma (pb)	Número de genes
1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Ascomycota</i>	34.85	11910
2	<i>Cryptococcus vishniacci</i>	<i>Basidiomycota</i>	19.69	7232
3	<i>Lichtheimia hyalospora</i>	<i>Mucoromycotina</i>	33.28	12062
4	<i>Mortierella elongata</i>	<i>Mucoromycotina</i>	49.96	14964
5	<i>Mucor lusitanicus</i>	<i>Mucoromycotina</i>	36.6	11719
6	<i>Neurospora discreta</i>	<i>Ascomycota</i>	37.3	9948
7	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	<i>Mucoromycotina</i>	53.9	16528
8	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Oomycota</i>	64	19805
9	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Mucoromycotina</i>	25.97	10905
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	12.07	6575

Modificada de Mohanta & Bae, 2015

Se demostró que *M. lusitanicus* es un organismo modelo de estudio en los Mucorales debido a su capacidad de ser transformado genéticamente (Roncero, 1984; van Heeswijck & Roncero, 1984; Roncero et al., 1989; Garre et al., 2015). La transformación permitió la creación de mutantes para entender diferentes procesos biológicos tales como la biosíntesis de carotenos y su vía de regulación (Iturriaga et al., 2001), la regulación por la luz azul, el metabolismo y acumulación de lípidos, el dimorfismo y la diferenciación celular (Wolff et al., 2002), entre otros (Garre et al., 2015; Homa et al., 2022).

Este hongo ha sido utilizado en una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, como fuente de ácidos grasos para la producción de lípidos con potencial médico y cosmético (Funtikova et al., 2002), para la producción de biodiesel (Wei et al., 2013), para la producción de diversas enzimas utilizadas en la producción de quesos (Morin-Sardin et al., 2017) como la renina (Lübbehüsen et al., 2004), en la producción de proteínas heterólogas al aprovechar su naturaleza dimórfica, tales como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Wolff & Arnau,



2002) o como la glucosa oxidasa (Bredenkamp et al., 2010), y también se ha reportado su uso para la producción de etanol (Lübbehüsen et al., 2004; Fonseca-Peralta et al., 2022).

1.5.2 Reproducción sexual y asexual de *M. lusitanicus*

La reproducción asexual de este Mucoral involucra la formación de esporangios multiesporados que se forman sobre una columela, los cuales producen esporangiosporas (Morin-Sardin et al., 2017). Estas esporangiosporas son elipsoidales y pueden desarrollarse en forma de hifas o de levaduras según las condiciones de crecimiento (Lübbehüsen et al., 2003) (Figuras 4 y 6). La reproducción sexual involucra esporas sexuales, conocidas como zigosporas, que resultan de la fusión de gametangios similares, que surgen de un solo micelio en especies homotálicas (Morin-Sardin et al., 2017). Las especies del género *Mucor* son heterotálicas, con dos tipos sexuales (+) y (-), idénticos morfológicamente. Las zigosporas pueden permanecer en reposo durante años antes de germinar y producir un esporangióforo, similar al que se produce en la reproducción asexual (Figura 4) (Lübbehüsen et al., 2003). En tanto que la reproducción sexual es mediada por la feromona ácido trispórico, el cual es un compuesto volátil constituido por 18 carbonos derivado de la estructura del β -caroteno (Lee & Heitman, 2014). Además, un tercer tipo de espora existe las artrosporas, las cuales son estructuras muy poco estudiadas y se ha descrito que su probable función es la de fungir como un mecanismo de supervivencia, ya que se forma al final del crecimiento estacionario o bajo condiciones nutricionales desfavorables (Figura 4) (Orlowski, 1991).

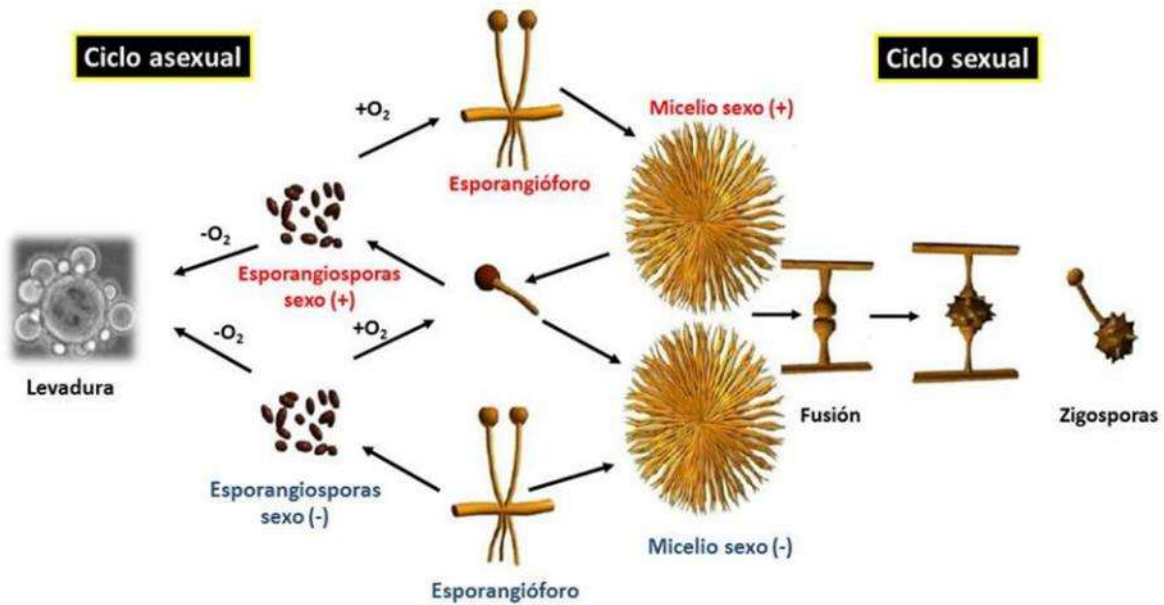
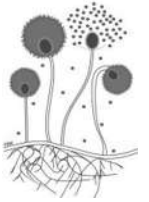
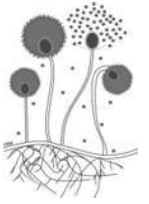


Figura 4. Reproducción sexual y asexual de *M. lusitanicus*. Se muestra un esquema representativo del ciclo de reproducción sexual y asexual de *M. lusitanicus*. En el caso de la reproducción asexual, a partir de una esporangiospora (célula haploide) que crece en ausencia de oxígeno y en presencia de una fuente de carbono fermentable, esta se desarrollará en forma de levadura, por el contrario, cuando la esporangioespora crece en aerobiosis, se desarrollará en forma de hifa. En el ciclo sexual, las hifas de los dos tipos sexuales (+) y (-) se fusionarán para producir zigosporas (célula producto de la meiosis), proceso que está bajo regulación por feromonas, en específico, por el ácido trispórico (Tomada y modificada de López-García, 2015).

1.5.3 Crecimiento de *M. lusitanicus*

El crecimiento hifal de *M. lusitanicus* es rápido y con abundante producción de esporas, estas últimas con las características de poseer una alta capacidad de absorción de humedad, alta adherencia a distintas superficies y las cuales pueden dispersarse en aire húmedo, además de que pueden germinar rápidamente en un ambiente húmedo cuando encuentran un sustrato favorable (Morin-Sardin et al., 2017).



Se ha reportado que las condiciones óptimas de crecimiento de la mayoría de las especies de Mucorales son las siguientes: a una temperatura de 20-25 °C, a un pH de 5.0-6.0, a una humedad relativa entre 90-95 % (Morin-Sardin et al., 2016).

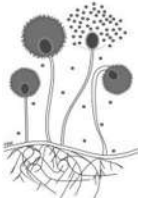


Figura 5. Crecimiento de *M. lusitanicus* en un sustrato sólido. Se muestra el crecimiento típico de este Mucoral en una placa de Petri que contenía medio YPG al 2 % de glucosa suplementado con agar en el que se inocularon por estriado 100 esporas de *M. lusitanicus* y las cuales se incubaron a temperatura ambiente con ciclos de luz y oscuridad por 7 días (Imagen propia).

Además, otras características importantes de este microorganismo son que es considerado un microorganismo Crabtree-positivo (Lübbehüsen et al., 2004; Homa et al., 2022), esto hace referencia a que este hongo puede producir etanol tanto en condiciones aerobias como anaerobias y al igual que otros Mucorales, posee la habilidad del dimorfismo morfológico (Figura 6) (Homa et al., 2022).

1.5.4 Dimorfismo en *M. lusitanicus*

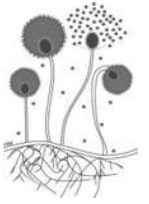
El dimorfismo es la capacidad de cambiar entre dos formas morfológicas: la forma de levadura y la forma filamentosa (Figuras 4 y 6). El estado morfológico está determinado por una combinación de estímulos ambientales y está frecuentemente asociado con la patogénesis (Orlowski, 1991; Wolff et al., 2002). El dimorfismo ha evolucionado en múltiples linajes del reino fúngico, incluyendo a los ascomicetos, basidiomicetos, y en algunos miembros de los *Mucorales* (Tabla 4) (Lee et al.,



2013). En los hongos, de forma general la fase filamentosa es multicelular (Figura 1), mientras que el estado levaduriforme es normalmente unicelular y uninucleado. En *M. lusitanicus* tanto la forma filamentosa como la levaduriforme son multinucleadas (Wolff et al., 2002). Los hongos dimórficos han evolucionado para retener toda la información genómica necesaria para alternar entre una morfología a otra (Cánovas-Márquez et al., 2023). En el caso de los Mucorales, el dimorfismo y su rol en la virulencia ha sido estudiado en *M. lusitanicus* (Tahiri et al., 2023). En las especies estudiadas de *Mucor*, la ausencia de oxígeno y la presencia de CO₂ y hexosas fermentables inducen el crecimiento levaduriforme, mientras que el oxígeno y la escasez de nutrientes inducen el crecimiento hifal (Orlowski, 1991; Tahiri et al., 2023). Esto significa que este hongo produce hifas filamentosas en aerobiosis, desarrollando un micelio cenocítico, pero crece en forma esférica y multipolar en forma de levadura en anaerobiosis (Figura 6) (Homa et al., 2022). El dimorfismo de *Mucor spp.* determina su morfología y el tipo de metabolismo y su potencial virulento, siendo el crecimiento hifal de tipo virulento a bajas concentraciones de glucosa (Alejandre-Castañeda et al., 2022; Cánovas-Márquez et al., 2023).

Estudios han descrito a múltiples factores que controlan el dimorfismo, tal es el caso de la vía de la PKA (proteína cinasa A) dependiente de AMPc (Orlowski, 1991) y la fosfatasa calcineurina (Lee et al., 2013; Lee et al., 2015).

En nuestro grupo de trabajo se han descrito diversos elementos moleculares que están involucrados tanto en la morfología, el metabolismo oxidativo y el dimorfismo en *M. lusitanicus*. Las proteínas G heterotriméricas regulan positivamente el crecimiento micelial en una atmósfera a bajas concentraciones de oxígeno a través de la vía de la proteína cinasa A (PKA). Al generar las mutantes (por delección) en los genes *pkaR1* o *gpb1*, que corresponden a una de las 4 subunidades regulatorias de la PKA o a la subunidad beta 1 de las proteínas G heterotriméricas en *M. lusitanicus*, respectivamente, resultan en un aumento en el crecimiento de tipo levaduriforme en una atmósfera a bajas concentraciones de oxígeno y disminuye su virulencia en un modelo murino con cetoacidosis diabética (DKA, por sus siglas



en inglés) (Valle-Maldonado, et al. 2020). La mutación (por delección) en el gen *adh1*, que codifica a la proteína alcohol deshidrogenasa 1, produce una cepa monomórfica de tipo hifal, que carece de la capacidad para llevar a cabo un metabolismo de tipo fermentativo y que muestra un mayor potencial virulento en ratones comparada con la cepa silvestre (Díaz-Pérez et al. 2020).

La mutante (por delección) en el gen *cnbR*, que codifica a la subunidad reguladora de la calcineurina, resulta en un fenotipo caracterizado por una alta actividad de PKA y una morfología levaduriforme, incluso bajo la presencia de oxígeno, sugiriendo una relación entre la vía de señalización por la PKA y la vía de señalización de la calcineurina en el dimorfismo de *M. lusitanicus*. Además, de que dicha mutación redujo la virulencia en el modelo de *Galleria mellonella*, confirmando una vez más, que la morfología hifal es la virulenta (Lee et al., 2013).

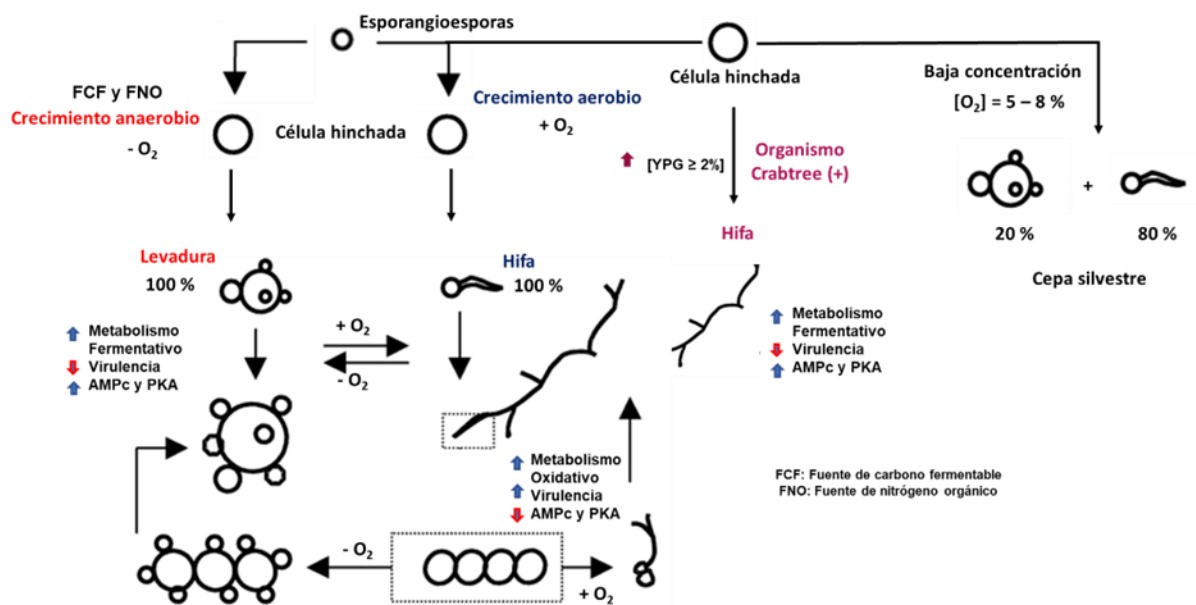
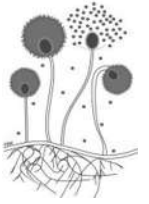


Figura 6. Reproducción asexual de *M. lusitanicus* en medio líquido. Se muestra un esquema que ayuda a entender la reproducción asexual y el dimorfismo de este hongo. Cuando las esporangiosporas se inoculan en un medio líquido, en el que se encuentran las condiciones favorables para su crecimiento, la esporangiospora aumenta su tamaño. Así, dependiendo de las condiciones nutricionales y ambientales, la esporangiospora de *M. lusitanicus* puede crecer en forma de hifa



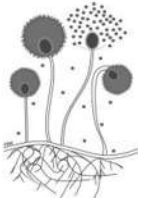
(morfología que se ha relacionado con un metabolismo oxidativo favorecido, alto potencial virulento y bajos niveles de AMPc y baja actividad de PKA) o en forma de levadura (morfología que se ha relacionado con un metabolismo fermentativo favorecido, bajo potencial virulento y altos niveles de AMPc y alta actividad de PKA). Aunque estos estadios morfológicos no son finales, ya que, si las condiciones de crecimiento cambian, el hongo es capaz de hacer transición de una morfología a otra. Además, las artrosporas dependiendo de las condiciones de crecimiento pueden generar tanto la morfología levaduriforme como la hifal. En este esquema también se hace énfasis en la capacidad de este Mucoral de comportarse como un organismo Crabtree-positivo, lo que le permite fermentar bajo una atmósfera aerobia a altas concentraciones de glucosa, en el que el crecimiento es de tipo hifal, pero de fenotipo similar al de una levadura. La cepa silvestre puede generar una mezcla de morfologías (levaduriforme e hifal) cuando se crece a bajas concentraciones de oxígeno (Tomada y modificada de Lübbehüsen et al., 2003).

1.6 Factores de virulencia en *M. lusitanicus*

Se han descrito algunos factores de virulencia en Mucorales con sus bases bioquímicas y moleculares bien conocidas (Díaz-Pérez et al., 2020).

1.6.1 Tamaño de las esporas

En *M. lusitanicus*, se ha encontrado que existe una relación entre el tamaño de las esporangiosporas y la virulencia: las esporangiosporas más largas son más virulentas que las esporangiosporas más pequeñas. Las esporangiosporas más largas comienzan la invasión hifal inmediatamente después de la fagocitosis en las células del sistema inmune del hospedero, además de que germinan dentro de los macrófagos, mientras que las esporangiosporas pequeñas tienen un largo periodo de crecimiento isotrópico (Li et al., 2011). La vía de la calcineurina regula el tamaño de las esporas debido a que las mutantes que carecen de la subunidad catalítica CnaA producen esporas más grandes, y éstas son más virulentas que la cepa silvestre (Lee et al., 2013).



1.6.2 Transiciones morfológicas

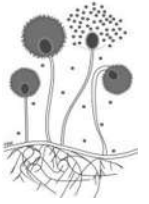
Otro de los factores de virulencia que se han descrito en este hongo son las transiciones morfológicas, en las que la vía de la calcineurina juega un papel muy importante; se ha descrito que las hifas o la transición de levadura a hifa se vinculan con un fenotipo virulento (Lee et al., 2013). Esto descrito con mayor detalle en el apartado de dimorfismo en *M. lusitanicus*.

1.6.3 Resistencia al ataque por el sistema inmunológico

Las esporas de *M. lusitanicus* pueden sobrevivir al ataque del sistema inmunológico en estudios *in vitro* en líneas celulares de macrófagos y en estudios *in vivo* en el modelo de estudio de pez cebra. Una vez que las esporas superan las barreras físicas, los macrófagos y los neutrófilos son rápidamente reclutados en el sitio de la infección. A pesar de que estas células, principalmente macrófagos, fagocitan las esporas, a menudo no logran deshacerse de ellas. Se ha descrito que las esporas de este hongo muestran una respuesta genética inducida por la fagocitosis para permitir la germinación dentro del fagosoma y poder sobrevivir en su entorno hostil. El análisis funcional de los genes implicados en la respuesta identificó a 2 factores de transcripción, designados como Atf1 y Atf2, como los principales actores en la respuesta. Estos factores de transcripción están involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y además también participan en el metabolismo de macronutrientes. Aún más importante, estos factores de transcripción inducen la expresión de genes como *aqp1* y *chi1* cuando las esporas de este hongo son fagocitadas. Se ha demostrado que tanto los factores de transcripción Atf1 y Atf2 como los genes *aqp1* y *chi1* son necesarios para la germinación dentro de los fagosomas en el que el ambiente interno es ácido (Cánovas-Márquez et al., 2023; Pérez-Arques et al., 2019).

1.6.4 Sistemas para la adquisición de hierro

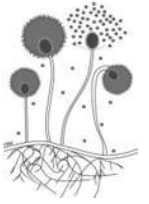
El hierro, frecuentemente en la forma de grupo hemo o centros hierro-azufre, es usado en muchos procesos bioquímicos esenciales, tales como la reducción del



nitrógeno atmosférico, la síntesis de desoxirribonucleótidos, en la respiración, en el ciclo de Krebs y en la síntesis de numerosas moléculas pequeñas como los aminoácidos, lípidos y esteroides. Los hongos emplean distintas estrategias para adquirir hierro de su ambiente, entre los que se encuentran la acidificación del medio, la reducción del ion férrico a la forma ferrosa más soluble, la secreción de moléculas solubles quelantes de hierro (sideróforos) y distintos sistemas de captación (Philpott, 2006).

El hierro es uno de los micronutrientes necesarios más importantes para el crecimiento y propagación de hongos patógenos durante la infección (Chakraborty et al., 2020). En *M. lusitanicus*, se ha descrito a un sistema de ferroxidasas útiles para la asimilación de hierro. Este sistema está formado por las enzimas Fet3a, Fet3b y Fet3c, las cuales se expresan en grandes cantidades durante la infección en un modelo murino susceptible a mucormicosis y se ha descrito que su expresión *in vitro* es regulada por la disponibilidad del hierro en el medio y el estado dimórfico. En la morfología levaduriforme y bajo condiciones de anaerobiosis se expresa específicamente *fet3a*, mientras que en condiciones de aerobiosis y crecimiento aerobio se expresan específicamente los genes *fet3b* y *fet3c*. Además de que dichos genes son necesarios para una virulencia completa (Navarro-Mendoza et al., 2018). En *R. oryzae*, se ha descrito a una permeasa de alta afinidad por hierro, Ftr1. Esta proteína regula positivamente la adquisición de hierro durante el crecimiento y virulencia de este hongo en modelos murinos para mucormicosis (Ibrahim et al., 2010).

Un mecanismo alternativo para la captación de hierro involucra la biosíntesis y secreción de sideróforos. Estos compuestos de bajo peso molecular son producidos bajo condiciones extremas de estrés por hierro, que los hongos usan para quelar hierro del medio extracelular. La mayoría de los hongos producen sideróforos de tipo hidroxamato, sin embargo, los Mucorales producen sideróforos de tipo carboxilato (Howard, 1999). Este policarboxilato presente en los Mucorales, llamado rizoferrina, fue aislado de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. La estructura química de la rizoferrina consiste en dos ácidos cítricos unidos a una molécula de



diaminobutano con una configuración-*R, R* alrededor del centro quiral (Drechsel et al., 1991; van der Helm & Winkelmann, 1994).

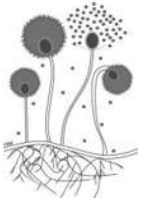
En *M. lusitanicus*, la molécula de rizoferina es sintetizada por una sintetasa peptídica no ribosomal (NRPS, por sus siglas en inglés) codificada por el gen *rfs* (Carroll et al., 2017).

1.6.5 Invasión celular mediada por receptores

La angiainvasión es un proceso característico de la mucormicosis. Existen receptores (GRP78) endoteliales que median la invasión celular por Mucorales. Un total de 17 genes similares a proteínas de cubierta de esporas (Coth) constituyen una familia de quinasas que participan en la formación de esporas, y que además se les ha considerado como factores de virulencia (Szebenyi et al., 2023). Las proteínas Coth de *M. lusitanicus* juegan un papel muy importante, estas son proteínas de la superficie celular que son similares a las proteínas bacterianas, y de las cuales se ha descrito que son ligandos para los receptores GRP78 (Gebremariam, et al., 2014; Cánovas-Márquez et al., 2023). Las proteínas de cubierta de esporas Coth2 y Coth3 funcionan como invasinas que interactúan con el receptor GRP78 de la célula hospedera para mediar las interacciones patógenas (Gebremariam, et al., 2014). Coth4 regula la formación de la pared celular de las esporas al afectar el contenido total de quitina (Szebenyi et al., 2023). La expresión de estas proteínas en el cuerpo humano es significativamente más alta en presencia de altos niveles de glucosa, hierro y cuerpos cetónicos, potencialmente llevando a una mucormicosis letal de tipo cerebral/rinoorbital (Alqarihi et al., 2020).

1.7 Mucormicosis

La mucormicosis es una infección fúngica rara, severa, invasiva y muy agresiva causada por miembros del orden de los Mucorales. *Rhizopus*, *Lichteimia*, *Mucor* y *Apophysomyces* son los principales géneros potenciales causantes de mucormicosis (Petrikos et al., 2012; Ziaee et al., 2016). Comparada con otras

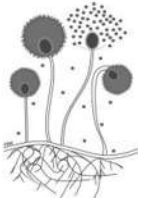


infecciones fúngicas, la mucormicosis tiene una alta tasa de mortalidad: ~50 % de las infecciones totales y >90 % en las infecciones diseminadas (Li et al., 2011).

Algunos de los hongos que causan mucormicosis están geográficamente distribuidos (*Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*) o localizados (*Apophysomyces*, *Cunninghamella* en EE. UU. o *Saksenaea* en EE. UU. y Asia) (Benny et al., 2014). Los Mucorales son vasotrópicos, causando angiainvasión e infarto de tejidos. La mayoría de las infecciones en humanos resultan de la inhalación de las esporangioesporas presentes en el aire o por la inoculación directa de piel dañada o mucosas. La mucormicosis es también más frecuente en pacientes con diabetes mellitus con o sin cetoacidosis, quienes padecen de malignancias hematológicas, neutropenia severa o prolongada y que están profundamente inmunodeprimidas, aquéllos que reciben quimioterapia, quienes han recibido un trasplante de células madre alogénicas, la sobrecarga de hierro sérico debido a hemocromatosis o transfusiones de sangre excesivas y el uso crónico de corticosteroides (Petrikos et al., 2012; Köhler, 2017). Los Mucorales causan varios cuadros clínicos de mucormicosis, según la parte del cuerpo que entre en contacto con las esporas de hongos del medio ambiente (Konopka et al., 2019). El espectro de la infección va de la forma cutánea, la rinocerebral, la sinopulmonar, la gastrointestinal y hasta la diseminada (Petrikos et al., 2012).

1.8 Proteínas G

Existen dos clases generales de proteínas G: las proteínas G monoméricas y las proteínas G heterotriméricas. Ambas clases de proteínas se encuentran presentes en las células eucariotas y se caracterizan por su habilidad de unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina. Cuando estas proteínas se encuentran activadas, pueden modificar la función de una variedad de efectores dentro de la célula. La mayoría de estos efectores son enzimas que producen segundos mensajeros intracelulares. Ejemplos de estos efectores enzimáticos incluyen a las adenilato ciclasas, las guanilato ciclasas y la fosfolipasa C. Los segundos mensajeros producidos por estas



enzimas desencadenan complejas cascadas de señalización bioquímica (Purves et al., 2001).

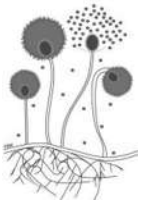
1.8.1 Proteínas G monoméricas

Las proteínas G monoméricas cumplen funciones celulares como la reorganización del citoesqueleto, la polaridad celular, la progresión del ciclo celular, la expresión de genes y otros eventos significativos para las células. El miembro más destacado de esta clase de proteínas es la GTPasa Ras, por lo que a esta clase de proteínas también se le conoce como la superfamilia Ras (Song et al., 2019). Estas proteínas a su vez son divididas en las siguientes subfamilias de acuerdo con su secuencia, estructura y función: Ras (Rat sarcoma), Rho (Ras homology), Arf (ADP-ribosylation factor), Rab (Ras-like in brain) y Ran (Ras-like nuclear) (Reiner & Lundquist, 2005).

El genoma de *M. lusitanicus* posee 4 proteínas de tipo Arf, siendo Arf1 y Arf2 necesarias para una adecuada esporulación, además Arf1 está involucrada en el desarrollo micelial, mientras que Arf2 en el desarrollo levaduriforme (Patiño–Medina et al., 2018).

1.8.2 Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades distintas: α , β y γ . Estas proteínas a su vez se encuentran acopladas a proteínas receptoras ubicadas en la membrana plasmática referidas como receptores transmembranales o también conocidos como receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) (Nestler & Duman., 1999). Los GPCR representan la familia más larga de receptores transmembranales y son responsables de la transducción de señales extracelulares a respuestas intracelulares por diversos estímulos como la luz, protones, Ca^{2+} , aminoácidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, esteroides, y ácidos grasos. Todos los GPCR poseen la misma arquitectura fundamental que consiste en siete dominios transmembranales y comparten mecanismos de transducción de señales comunes. Los GPCR activados estimulan el intercambio de GTP por GDP en proteínas $G\alpha$, disociando las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ que a su



vez desencadenan respuestas biológicas mediante la unión a proteínas efectoras que regulan señales río abajo (Figura 7) (Xue et al., 2008).

En consecuencia, muchos tipos de proteínas efectoras se ven influenciadas por las proteínas G heterotriméricas: canales iónicos, adenilato ciclasas, fosfodiesterasas, fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5–bifosfato (PIP₂,) y fosfolipasa A. Además, se les ha descrito en varios procesos intracelulares, como el transporte vesicular y el ensamblaje del citoesqueleto (Nestler & Duman., 1999).

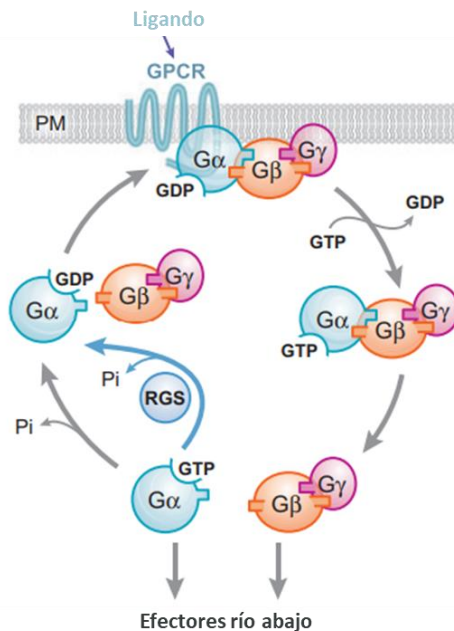
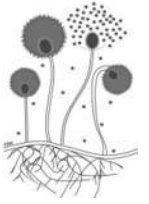


Figura 7. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. Se muestra un esquema de la activación de las proteínas G heterotriméricas. El ciclo comienza con la unión de un ligando extracelular (señal) a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), lo que conlleva el intercambio de GDP-GTP en la subunidad G α y la posterior disociación del dímero G $\beta\gamma$. Ambos, G α -GTP y el dímero G $\beta\gamma$ podrían regular efectoras río abajo. La hidrólisis de GTP mediante la actividad intrínseca GTPasa de la subunidad G α resulta en la re-asociación de G α -GDP con el dímero G $\beta\gamma$ y el GPCR, y con esto completando el ciclo. RGS (regulator of G protein signaling, por sus siglas y nombre en inglés) son reguladores de la señalización de proteínas G, los cuales aceleran la tasa de hidrólisis por las proteínas G α (flecha azul) (Tomada y modificada de Li et al., 2007a).



1.8.2.1 Subunidades G α

Las subunidades G α contienen un dominio con actividad GTPasa y sitio de unión a GTP. El cual se ha descrito que también tiene un papel muy importante en la unión de las subunidades $\beta\gamma$ (Nestler & Duman., 1999). Esta subunidad tiene un peso de 38-52 kDa. Generalmente, las subunidades G α constituyen la parte de reconocimiento del receptor de las proteínas G heterotriméricas (El-Defrawy & Hesham, 2020) y presentan un motivo susceptible de miristoilación que juega un papel importante en su anclaje a la membrana plasmática (Buss et al., 1987).

1.8.2.2 Subunidades G $\beta\gamma$

En estudios iniciales, se creía que los dímeros G $\beta\gamma$ eran proteínas inactivas que simplemente secuestraban a las subunidades G α activas o que las anclaban a la membrana plasmática. Sin embargo, se ha comprobado que las subunidades $\beta\gamma$, actuando como dímeros, son moléculas biológicas altamente activas que desempeñan papeles importantes en diversas funciones celulares (Milligan & Kostenis, 2006). Estas proteínas son más pequeñas que las subunidades G α , teniendo un peso de 35 kDa para las subunidades G β y de 8-10 kDa para las subunidades G γ . Se ha descrito que estas 2 subunidades se encuentran siempre asociadas y se anclan a la membrana plasmática a través de modificaciones postraduccionales de tipo isoprenil en la subunidad G γ (El-Defrawy & Hesham, 2020).

1.8.3 Proteínas G heterotriméricas en hongos

Desde el primer reporte de la presencia de proteínas G heterotriméricas en hongos filamentosos en 1993, se ha demostrado que estas proteínas son esenciales para el crecimiento, el desarrollo sexual y asexual y en su virulencia. Se ha descrito que la mayoría de los hongos filamentosos poseen 3 subunidades G α , 1 subunidad G β y 1 subunidad G γ , aunque existen excepciones (Tabla 6) (Li et al., 2007b).

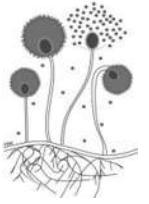


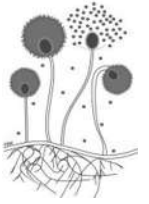
Tabla 6. Número de proteínas G heterotriméricas en algunas especies de hongos

Organismo	Filum	Número de subunidades			Tamaño de genoma (Mpb)	Referencia
		G α	G β	G γ		
<i>M. lusitanicus</i>	<i>Muromycota</i>	12	3	3	36.6	Valle-Maldonado et al. (2015). <i>Fungal Biology</i> , 119(12), 1179–1193
<i>N. crassa</i>	<i>Ascomycota</i>	3	1	1	43	Galagan et al. (2003). <i>Nature</i> 422, 859–868
<i>A. fumigatus</i>	<i>Ascomycota</i>	3	1	1	31	Brice et al. (2013). <i>Frontiers in microbiology</i> , 26(4): 1-12
<i>C. neoformans</i>	<i>Basidiomycota</i>	3	1	2	20	Li et al. (2007). <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 18(11): 4201-4209
<i>U. maydis</i>	<i>Basidiomycota</i>	4	1	1	20.5	Kämper et al. (2006). <i>Nature</i> 444, 97–101
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ascomycota</i>	2	1	1	12	Kübler et al. (1997). <i>The Journal of biological chemistry</i> , 272(33), 20321–20323

Los nombres completos de los organismos se encuentran en el apartado E. Abreviaturas y nombre completo de organismos (elaboración propia).

Por ejemplo, el genoma de *Rhizopus oryzae* contiene 4 subunidades G α , y las funciones de esta subunidad varían dependiendo de la especie de hongos, la subunidad G α (*magC*) de *Magnaporthe grisea* es esencial para una correcta conidiación (Liu & Dean, 1997) o que esta subunidad (*bcg-2*) de *Botrytis cinérea* es esencial para una completa patogenicidad (Gronover et al., 2001).

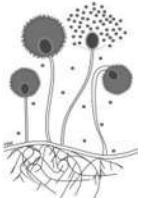
Así también, la mayoría de los hongos filamentosos posee 1 sola subunidad G β , aunque existen excepciones como en *R. oryzae*, cuyo genoma posee hasta 4 subunidades G β . Para la subunidad G γ también hay excepciones, pues algunos hongos filamentosos como *C. neoformans*, *Coprinus cinereus*, *Podospira anserina*, *R. oryzae* entre otros, poseen más de 1 subunidad G γ en su genoma (Li et al., 2007b).



En la tabla 7 se muestran algunas funciones de las subunidades G α , G β y G γ de algunas especies de hongos.

Tabla 7. Funciones de algunas proteínas G heterotriméricas en algunas especies de hongos

Organismo	Subunidad	Función	Referencia
<i>Magnaporthe grisea</i>	MagC (α)	Regulador positivo de la conidiación	Liu & Dean, 1997
	MGB1 (β)	Regulador positivo de la conidiación, esencial para el reconocimiento superficial y virulencia en plantas de arroz	Nishimura, Park & Xu, 2003
	MGG1 (γ)	Regulador positivo de la conidiación, apareamiento y patogenicidad	Li et al., 2015
<i>Aspergillus nidulans</i>	GanB (α)- SfaD(β)- GpgA(γ)	Formación del heterotrímero GanB(α)-SfaD(β)-(γ)GpgA para el control de la germinación de conidios a través de la vía cAMP/PKA	Lafon et al., 2005
	SfaD(β)	Regulador positivo del crecimiento vegetativo Regulador negativo de la esporulación	Rosén, Yu & Adams, 1999
	GpgA(γ)	Esencial para el crecimiento vegetativo y para el desarrollo sexual y asexual	Seo, Han & Yu, 2005
<i>Ustilago maydis</i>	Gpa3 (α)	Transmisión de la señal para el apareamiento por feromonas y para una completa patogenicidad	Regenfelder et al., 1997
	Bpp1	Control de la señalización vía cAMP	Müller et al., 2004
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GpaA (α)	Colectivamente regulan el crecimiento vegetativo, la germinación, el desarrollo asexual, la resistencia al estrés oxidativo y la producción de gliotoxina	Choi et al., 2020
	GpaB (α)		
	GanA (α)		



	AfuSfaD (β)- AfuGpgA (γ)	El dímero es un regulador positivo del crecimiento y de la conidiación	Shin, Kwon & Yu, 2009
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Gpa2	Colectivamente regulan la virulencia en un modelo murino	Li, L., et al., 2007a
	Gpa3		
	GPB1 (β)	Regulador positivo del apareamiento y la fructificación haploide	Wang, Perfect & Heitman, 2000
	Gpg1 (γ)	Reguladores positivos de la producción de feromonas y apareamiento	Li, L., et al., 2007a
	Gpg2 (γ)		

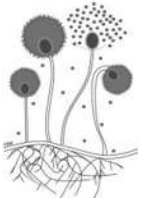
(Elaboración propia).

1.8.4 Proteínas G heterotriméricas en *M. lusitanicus*

El genoma de este Mucoral codifica a un gran repertorio de proteínas G heterotriméricas altamente conservadas, y se le ha considerado de los más bastos entre las distintas especies de hongos: 12 subunidades $G\alpha$, 3 subunidades $G\beta$ y 3 subunidades $G\gamma$ (Valle-Maldonado et al., 2015). Se puede observar una comparación del número de proteínas G heterotriméricas en algunos hongos filamentosos en la tabla 7.

Algunas de las subunidades de proteínas G heterotriméricas de este Mucoral ya se han estudiado, por ejemplo, las subunidades Gpa11 y Gpa12 regulan el tamaño de la espora, la esporulación y la tasa de germinación de las esporas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis además de regular positivamente la virulencia en un modelo murino sugiriendo que la vía de la calcineurina está bajo el control de estas proteínas (Patiño-Medina et al., 2019b).

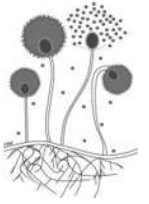
En cuanto a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de *M. lusitanicus*, nuestro grupo de trabajo describió que la subunidad $G\beta 1$ controla el crecimiento de tipo hifal y las transiciones morfológicas a bajas concentraciones de oxígeno a través de la represión de los niveles de AMPc a través de la vía de la PKA y es esencial para la virulencia en un



modelo murino. Además, se sugirió que probablemente la subunidad Gpb1 y PkaR1 se encuentran en la misma vía de señalización. En el mismo estudio también encontraron que la región promotora del gen *gpb1* poseía un supuesto motivo consenso (CATTCTT) para el factor de transcripción TEC1p a 50 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (Valle-Maldonado et al., 2020). Tiempo después, se describió que el genoma de este Mucoral posee 2 homólogos a TEC1p, *tec1* y *tec2*, a los cuales se les asocio con funciones redundantes, participando activamente en el crecimiento hifal y virulencia de este hongo a través del aumento del metabolismo oxidativo mitocondrial, y se propuso que la subunidad Gpb1 controla la activación de estas proteínas Tec, probablemente a través de la vía AMPc-PKA, ya que experimentos fisiológicos demostraron que la acumulación del transcrito de estos genes es mucho menor en la mutante $\Delta gpb1$, que en la cepa silvestre a bajas concentraciones de oxígeno, y que además, la sobreexpresión de los genes *tec* en $\Delta gpb1$, $\Delta gpb1 \cdot tec1^{O/E}$ y $\Delta gpb1 \cdot tec2^{O/E}$, restauraron el crecimiento hifal y la alta toxicidad de los sobrenadantes contra el nemátodo *C. elegans*, comparado con la toxicidad de los sobrenadantes de la cepa silvestre y la mutante $\Delta gpb1$ (mucho menos tóxicos) (Alejandre-Castañeda et al., 2023).

1.9 Funciones biológicas del calcio en hongos filamentosos

El ion calcio (Ca^{2+}) representa una molécula de señalización universal, comúnmente se le conoce como un segundo mensajero en sistemas eucariotas, debido a que puede afectar a la mayoría de los procesos celulares (Shemarova & Nesterov, 2005; Verkhatsky & Parpura, 2014). La señalización mediada por calcio puede regular la transcripción de genes, la conformación de proteínas, el metabolismo energético, la endocitosis, la exocitosis y el reordenamiento del citoesqueleto (Plattner & Verkhatsky, 2013). En los hongos tiene un papel importante en el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la tolerancia a condiciones de estrés, en la virulencia (Roy et al., 2020), en la regulación del ciclo celular, en la esporulación (Wang et al., 2012), en el crecimiento de la punta hifal, así como para el establecimiento y mantenimiento del crecimiento direccional de la hifa (Yu et al., 2012).



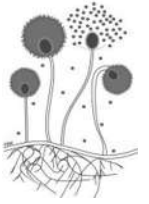
1.9.1 La maquinaria de señalización por calcio

La concentración de calcio afuera de la célula es tan alta como 10^{-3} M (Chin & Means, 2000), mientras que la concentración basal de calcio libre en el citosol ($[Ca^{2+}]_c$) en los hongos se mantiene alrededor de ~ 50 - 200 nM (Iida, Yagawa & Anraku, 1990; Halachmi & Eilam, 1993). Las células pueden almacenar el exceso de calcio en varios compartimentos intracelulares, incluyendo al retículo endoplasmático, la mitocondria y las vacuolas (Cornelius & Nakashima, 1987).

Los hongos utilizan un sistema de regulación relativamente simple, en la que se incluyen distintos tipos de proteínas de membrana plasmática y otros ubicados en distintos orgánulos que pueden regular las concentraciones intracelulares de calcio (Cai y Clapham, 2012). En estos organismos, se han descrito 6 tipos principales de transportadores de calcio, incluyendo a las bombas de Ca^{2+} , los intercambiadores de Ca^{2+}/H^+ (Lange & Peiter, 2020), los sistemas de calcio de alta afinidad (HACS, por sus siglas en inglés), los sistemas de calcio de baja afinidad (LACS, por sus siglas en inglés), los canales de calcio similares a TRP y el uniportador de calcio mitocondrial (MCU, por sus siglas en inglés) (Figura 8) (Tisi et al., 2016).

La vacuola en los hongos es considerada uno de los orgánulos más importantes para el almacenamiento de calcio, las Ca^{2+} -ATPasas y los intercambiadores de Ca^{2+}/H^+ son transportadores importantes que guían la entrada de calcio hacia las vacuolas (Pittman, 2011). Varias proteínas, incluidas las Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático (SERCA), el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , y el uniportador mitocondrial son responsables de secuestrar el exceso de calcio en el citoplasma, transportándolo ya sea al medio externo o a diferentes compartimentos celulares (Berridge et al., 2003) (Figura 8).

En eucariotas, los flujos de calcio a través de la membrana plasmática están controlados por dos tipos de canales de calcio altamente selectivos, los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales operados por almacenamiento (tipo Orai) (Verkhatsky & Parpura, 2014) (Figura 8).



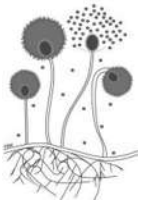
Se ha identificado una vía de supervivencia celular mediada por calcio (Calcium cell survival, CCS, por sus siglas en inglés) en hongos patógenos y lo conforman principalmente cuatro proteínas: la calmodulina, la calcineurina (serina/treonina fosfatasa) y el canal de calcio (Cch1 y Mid1) ubicado en la membrana plasmática (Yu et al., 2012).

1.10 Sistemas de alta afinidad por calcio en hongos filamentosos

En *S. cerevisiae*, se han identificado al menos dos sistemas diferentes transportadores de calcio ubicados en la membrana plasmática: los sistemas de alta afinidad por calcio (HACS) y los sistemas de baja afinidad por calcio (LACS) (Cunningham, 2011). Los HACS en hongos, consisten por lo menos de dos subunidades, Cch1 y Mid1, las cuales actúan como la ruta de entrada para el calcio extracelular más importante cuando las concentraciones de calcio al interior de la célula son bajas (Groppi et al., 2011). Se ha descrito que Cch1 es un homólogo de la subunidad catalítica α de los canales de calcio activados por voltaje de tipo L de mamíferos, mientras que Mid1 es probablemente una subunidad reguladora con cierta similitud por la subunidad $\alpha 2\delta$ de canales activados por voltaje en animales (Paidhungat & Garrett, 1997; Fischer et al., 1999; Cunningham, 2011).

A la fecha, se han predicho homólogos de Cch1 y Mid1 en varias especies de hongos, que abarcan a ascomicetos y basidiomicetos (Wolfe & Pearce, 2006). Además de *S. cerevisiae*, se ha llevado a cabo la caracterización de Cch1 o Mid1 en otros hongos como en *C. albicans*, en el que se ha descrito que estas proteínas juegan un papel importante en la morfogénesis, en la respuesta al estrés oxidativo y en la virulencia (Yu et al., 2012).

En *A. fumigatus*, las mutantes por delección en los genes *cchA*, *midA* y *yvcA*, que son los homólogos de los genes de *S. cerevisiae* que codifican a los canales de calcio dependientes de voltaje *CCH1*, *MID1* y *YVC1* vacuolar, respectivamente, no fueron virulentos en el modelo de ratones con aspergilosis invasiva, lo que sugiere que estos canales contribuyen a la virulencia de este hongo (de Castro et al., 2014).



En *A. nidulans*, CchA y MidA participan en la regulación de la conidiación, la polaridad de la hifa y en los componentes de la pared celular en ambientes con baja concentración de calcio (Wang et al., 2012).

La delección de *mid1* en *Claviceps purpurea* resultó en la pérdida completa de la virulencia hacia plantas de centeno. Análisis detallado de los ovarios infectados *in vitro* de las plantas de centeno demostraron que las mutantes de $\Delta mid1$ tenían múltiples ramas apicales que fueron incapaces de infectar el tejido del hospedero, sugiriendo que Mid1 es esencial para la generación de la fuerza mecánica necesaria para la penetración (Bormann & Tudzynski, 2009).

Estudios previos han demostrado que los HACS son requeridos en la respuesta a distintos tipos de estrés; además en la tolerancia a antifúngicos, sugiriendo que Cch1 y Mid1 representan blancos para el desarrollo de nuevos fármacos (de Castro et al., 2014).

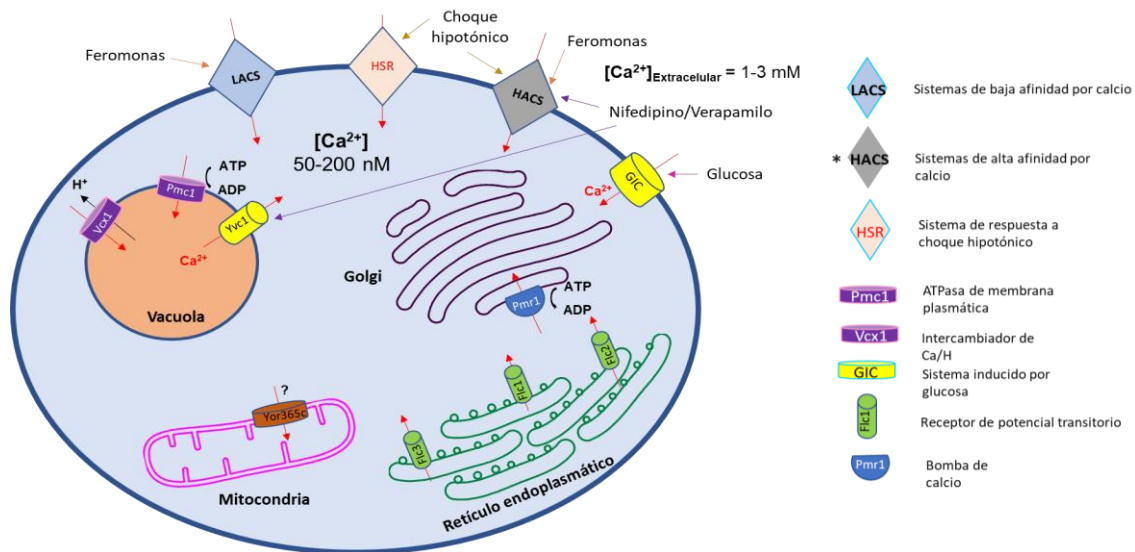
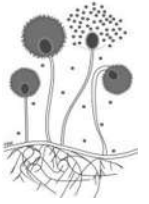
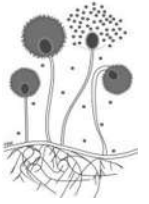


Figura 8. Principales sistemas de transporte de calcio en hongos. Se muestra una representación de la ubicación celular de los distintos sistemas de transporte de calcio identificados ya sea molecular o funcionalmente en hongos. Además, se ilustran algunos estímulos externos que se han descrito que activan (flechas en color rojo) o inhiben (flechas en color morado) a los mismos (Modificada de Tisi et al., 2016).



II. ANTECEDENTES

M. lusitanicus es un organismo modelo usado para el estudio de diversos procesos biológicos dentro del orden de los Mucorales. Especialmente, para el entendimiento de las bases bioquímicas y moleculares de la mucormicosis, una infección fúngica oportunista que se asocia con alta mortalidad, rápida progresión y amplia resistencia a los antifúngicos de uso común, la cual es causada por varios miembros de este grupo (Jáger et al., 2024). Las proteínas G heterotriméricas actúan como transductores de señales en los hongos, desempeñando funciones esenciales en diversos procesos biológicos, como el crecimiento, el desarrollo sexual y asexual, la morfología de las células, la virulencia, y otros. Funcionan uniendo los receptores de la superficie celular a las proteínas efectoras citoplasmáticas, mediante señales externas y desencadenando respuestas intracelulares (Li et al., 2007b). Las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas forman un dímero funcional, el cual es esencial para la transducción de señales en la célula (Hynes et al., 2004; Navarro-Olmos et al., 2010). En hongos filamentosos como *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *M. grisea*, entre otros, ciertos dímeros- $\beta\gamma$ regulan procesos como la conidiciación, el desarrollo sexual y asexual, la patogenicidad, el crecimiento vegetativo y la esporulación (Nishimura et al., 2003; Lafon et al., 2005; Choi et al., 2020). El genoma de *M. lusitanicus* posee 3 subunidades beta (Gpb1-Gpb3) y 3 subunidades gama (Gpg1-GpG3) de proteínas G heterotriméricas (Valle-Maldonado et al., 2015). La subunidad Gpb1 de proteínas G heterotriméricas de este Mucoral es un regulador de las transiciones dimórficas, controla el crecimiento micelial en condiciones de bajo oxígeno disuelto en el medio a través del control de los niveles de AMPc, a través de la vía de señalización de la PKA y es esencial para la virulencia. Además, la región promotora del gen *gpb1* posee un supuesto motivo consenso (CATTCTT) para el factor de transcripción TEC1p a 50 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (Valle-Maldonado et al., 2020). Alejandre-Castañeda et al. (2023), propusieron que la subunidad Gpb1 controla la activación de proteínas Tec en este Mucoral, probablemente a través de la vía AMPc-PKA, ya que la acumulación del transcrito de los genes de estas proteínas es mucho menor

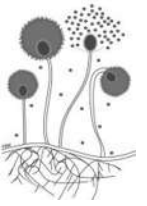


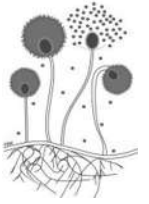
en la mutante $\Delta gpb1$, que en la cepa WT a bajas concentraciones de oxígeno, y que, además, la sobreexpresión de los genes *tec* en $\Delta gpb1$, $\Delta gpb1 \cdot tec1^{O/E}$ y $\Delta gpb1 \cdot tec2^{O/E}$, restauraron el crecimiento hifal y la alta toxicidad de los sobrenadantes contra el nemátodo *C. elegans*, comparado con la toxicidad de los sobrenadantes de la cepa silvestre y la mutante $\Delta gpb1$ (mucho menos tóxicos). Recientemente, Patiño-Medina et al. (2025), usando mutantes por delección en proteínas G heterotriméricas de este Mucoral, encontraron que las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ mostraron un comportamiento similar en aspectos como el crecimiento micelial, mayor producción de células levaduriformes a bajas concentraciones de oxígeno, mayor concentración de AMPc y mayor actividad de PKA, sugiriendo que las subunidades Gpb1 y Gpg1 regulan positivamente el crecimiento hifal y reprimen el desarrollo levaduriforme a bajas concentraciones de oxígeno mediante el control de la vía de la PKA. Así también, mostraron que Gpg1 es esencial, al igual que Gpb1 para el mantenimiento de la virulencia. Debido a los fenotipos comunes encontrados para las cepas mutantes, sugirieron que Gpb1 y Gpg1 podrían formar un dímero funcional que induce el crecimiento micelial y la virulencia, y que controlan positivamente el metabolismo oxidativo, probablemente a través de la mitofagia.

El calcio es conocido como el segundo mensajero universal y el mantenimiento de la homeostasis del calcio regula procesos fundamentales para las células. El incremento citoplásmico de calcio regula sucesos río abajo activando factores de transcripción o proteínas que a su vez regulan procesos biológicos específicos (Moreau, 1987). En hongos filamentosos este ion controla procesos como la progresión del ciclo celular, la esporulación, la germinación de las esporas, el crecimiento y la orientación de la punta hifal, la ramificación de las hifas, la expresión de genes, la virulencia y los ciclos circadianos (Liu et al., 2015a).

En *M. lusitanicus*, no se ha descrito el papel que tiene este ion en procesos como la esporulación, la germinación de las esporas, en el crecimiento micelial, en la virulencia y otros procesos biológicos importantes, ni de la maquinaria que necesita para la movilización de este desde el exterior. Tomando en cuenta que las subunidades Gpb1 y Gpg1 son reguladores positivos de procesos como el

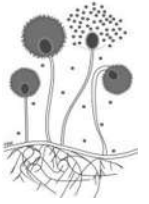
crecimiento micelial y la virulencia, se investigó si estas proteínas participan en la percepción de señales extracelulares de calcio para la promoción de dichos procesos biológicos a través de un metabolismo oxidativo mitocondrial.





III. JUSTIFICACIÓN

M. lusitanicus es un modelo biológico para entender la diferenciación celular y la virulencia ligada a la mucormicosis, una infección fúngica angioinvasiva y oportunista que afecta principalmente a personas que presentan factores de riesgo como *diabetes mellitus*, malignancias hematológicas, desnutrición, falla renal, trasplantes de órganos y sistemas inmunológicos débiles. Las subunidades G heterotriméricas son elementos clave en la morfogénesis y virulencia a través de la vía de señalización por la proteína cinasa A (PKA) de *M. lusitanicus*. El crecimiento micelial se correlaciona con un metabolismo oxidativo y un fenotipo virulento, mientras que un crecimiento levaduriforme conlleva a un metabolismo de tipo fermentativo y de fenotipo poco virulento. El calcio estimula positivamente el crecimiento micelial en *M. lusitanicus* sugiriendo que aumenta el metabolismo oxidativo mitocondrial. Conocer si las proteínas G heterotriméricas participan en la regulación de la señalización por calcio ayudará a entender las bases moleculares de la morfogénesis y la virulencia de este Mucoral, además de que dicho conocimiento puede ser traducido a otros Mucorales causantes de mucormicosis.



IV. HIPÓTESIS

Las proteínas Gpb1 y Gpg1 controlan positivamente la señalización por calcio mediante el aumento del crecimiento y la virulencia a través de un metabolismo oxidativo mitocondrial en *M. lusitanicus*.

V. OBJETIVO GENERAL

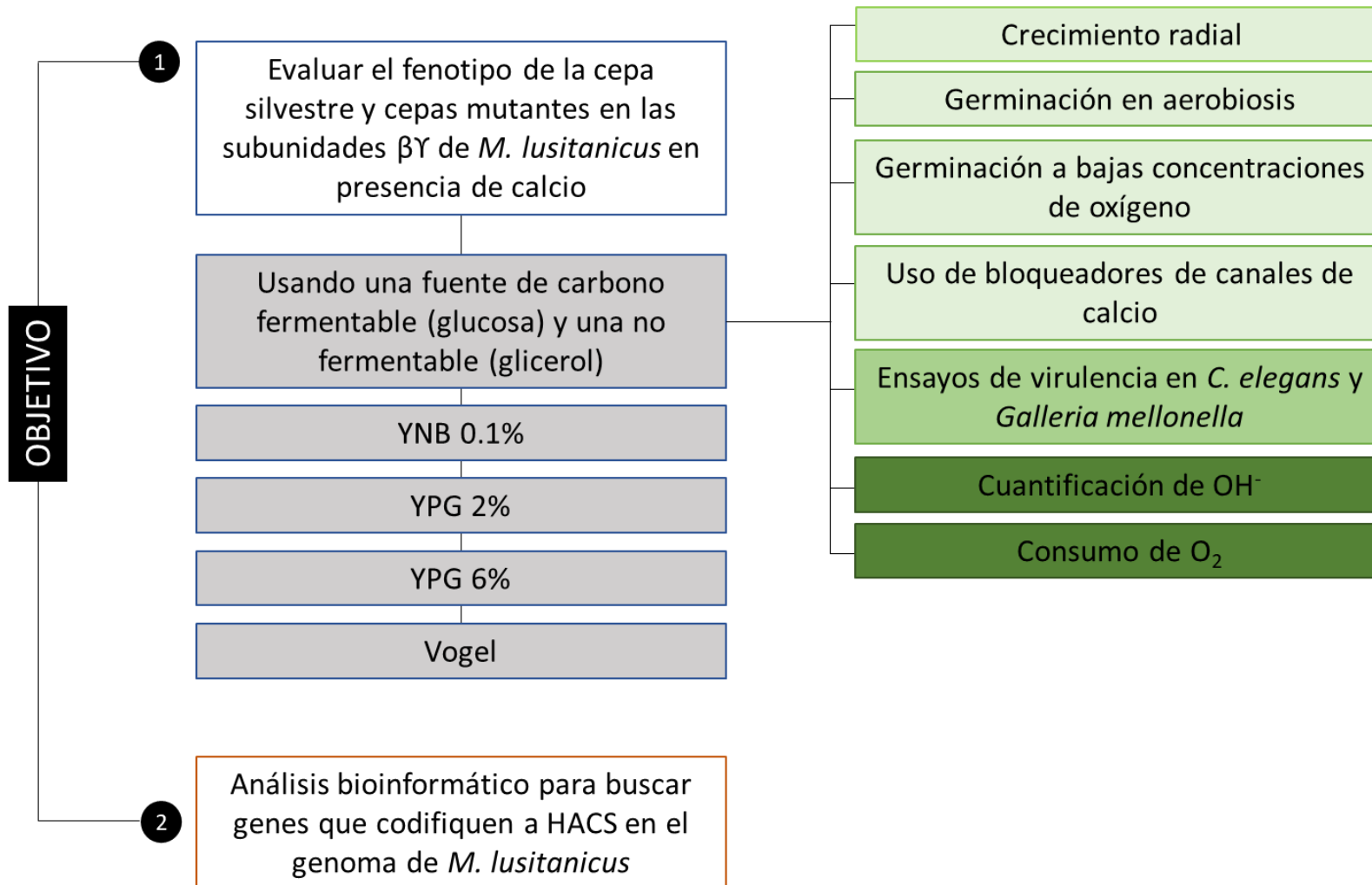
Determinar la participación de las proteínas Gpb1 y Gpg1 en la señalización por calcio mediante el aumento del crecimiento y virulencia a través de un metabolismo oxidativo mitocondrial en *M. lusitanicus*.

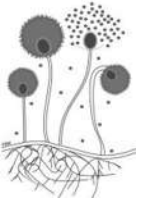
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Analizar la participación de las proteínas Gpb1 y Gpg1 en el estímulo por calcio en el metabolismo oxidativo mitocondrial de *M. lusitanicus*.
- 2 Realizar la identificación de los genes que codifican a los canales de calcio de alta afinidad en *M. lusitanicus*.



VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL





VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas utilizadas

Para los experimentos se utilizó a la cepa silvestre de *M. lusitanicus*, MU636, la cual contiene la inserción genómica del gen *pyrG*, generada a partir de la cepa MU402 que es auxótrofa a leucina (*leuA*⁻) y uracilo (*pyrG*⁻), y que, a su vez, esta última fue obtenida por mutagénesis química (Nicolás et al., 2007), derivada de la cepa silvestre R7B ATCC 90680 (*leuA*⁻), auxótrofa a leucina (Roncero et al., 1984). La cepa silvestre MU636 fue donada a nuestro grupo de trabajo por el Dr. Victoriano Garre de la Universidad de Murcia, España (tabla 8).

También se usaron a las cepas homocariontes mutantes (por delección) en las subunidades beta y gamma de *M. lusitanicus*: $\Delta gpb1$ (*leuA*⁻), $\Delta gpb2$ (*leuA*⁻), $\Delta gpb3$ (*leuA*⁻), $\Delta gpg1$ (*leuA*⁻), $\Delta gpg2$ (*leuA*⁻) y $\Delta gpg3$ (*leuA*⁻) generadas previamente en nuestro grupo de trabajo.

Tabla 8. Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>M. lusitanicus</i> MU636	<i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Navarro-Mendoza et al., 2018
<i>M. lusitanicus</i> $\Delta gpb1$	<i>gpb1</i> ⁻ / <i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Valle-Maldonado et al., 2020
<i>M. lusitanicus</i> $\Delta gpb2$	<i>gpb2</i> ⁻ / <i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Vargas-Tejeda, tesis de maestría, 2020
<i>M. lusitanicus</i> $\Delta gpb3$	<i>gpb3</i> ⁻ / <i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Vargas-Tejeda, tesis de maestría, 2020
<i>M. lusitanicus</i> $\Delta gpg1$	<i>gpg1</i> ⁻ / <i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Reyes-Mares, tesis de maestría, 2017
<i>M. lusitanicus</i> $\Delta gpg2$	<i>gpg2</i> ⁻ / <i>leuA</i> ⁻ / <i>pyrG</i> ⁺	Vargas-Tejeda, tesis de maestría, 2020



<i>M. lusitanicus</i> Δ gpg3	<i>gpg3</i>/<i>leuA</i>⁻/<i>pyrG</i>⁺	Vargas-Tejeda, tesis de maestría, 2020
<i>Escherichia coli</i> OP50	<i>E. coli</i> [ura⁻, strR, rnc⁻, (delta)attB::<i>FRT-lacI-lacUV5p-T7</i>]	Xiao, et al., 2015
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Es una cepa estándar de <i>C. elegans</i>, derivada de la cepa silvestre de Bistol	Brenner, 1974
<i>Galleria mellonella</i>	Es un organismo modelo de estudio usado para ensayos de virulencia con bacterias y hongos	Giammarino, 2024

8.2 Medios de cultivo

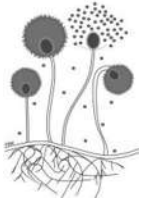
8.2.1 Medio YPG (Yeast, Peptone, Glucose/ Levadura, Peptona, Glucosa)

Es un medio rico, en 1 L de agua destilada se adicionaron 20 g de glucosa (2 % p/v) (BD Bioxon®), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon®), 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon®) y 20 g de agar bacteriológico en caso de ser medio sólido (BD Bioxon®) (Bartnicki-García, 1968). Se ajusto la cantidad de glucosa cuando fue necesario. Una vez preparada la mezcla, se esterilizó en una olla de presión a 15 libras de presión, 121°C por 20 minutos y dejándose enfriar para poder usarlo. YPG-2 % hace referencia al medio YPG con un porcentaje de glucosa del 2 %.

8.2.2 Medio YNB (Yeast Nitrogen Base/ Base de Nitrógeno de Levadura)

Este es un medio mínimo sin aminoácidos y sin una fuente de carbohidratos.

Un litro de agua destilada contenía 20 g de dextrosa (BD Bioxon®), 6.7 g de Yeast Nitrogen Base (SIGMA®) y para la preparación del medio sólido se agregan 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon®). Una vez que el medio se esterilizó en una olla de presión a 15 libras de presión, 121 °C por 20 minutos y este se enfrió, se le adicionó con tiamina y niacina a una concentración de 1 µg/mL y leucina a una concentración



de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lasker y Borgia, 1980). La proporción de glucosa aquí descrita equivale a un medio al 2% de glucosa. YNB-0.1 % hace referencia al medio YNB con un 0.1 % de glucosa.

8.2.3 Medio Vogel

Es un medio mínimo y sintético para hongos, el cual puede adaptarse a las necesidades específicas del proyecto de investigación, en mi caso, controlar la concentración de calcio presente en el medio. El medio sólo contiene las sales necesarias para el crecimiento y debe ser suplementado con glucosa como fuente de carbono y con las vitaminas necesarias.

En 250 mL de agua desionizada se agregan 2 g de NaCl, 2 g de MgSO_4 , 16 g de KH_2PO_4 , 28.8 g de $[\text{NH}_4^+]\text{PO}_4$, 1 g de CaCl_2 , 0.0526 g de ZnSO_4 , 0.01 g de FeSO_4 , 0.002 g de CuSO_4 y 0.0004 g de MnSO_4 . Esta cantidad de sales en el volumen indicado corresponden a una solución concentrada 50 veces (50x), la cual se esteriliza en una olla de presión a 15 libras de presión, 121 °C por 20 minutos. Una vez que se desee preparar un medio Vogel, hay que hacer los cálculos necesarios para preparar una solución 1X en el volumen final deseado a partir del stock 50x. Hay que suplementar con la cantidad de glucosa deseada y las vitaminas necesarias para el crecimiento (Metzenberg, 2003).

8.2.4 Medio NGM (Nematode Growth Medium/ Medio para crecimiento de nematodos)

Es un medio utilizado para el mantenimiento de los nematodos *C. elegans*.

Un volumen de 1L de agua destilada contenía 2g de cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker), 4g de peptona de caseína (Solbiosa), 3g de fosfato de potasio monobásico (KHPO_4) (Golden Bell®), 0.5g de fosfato de potasio dibásico (KH_2PO_4) (Meyer) y 20g de agar (BD Bioxon®); suplementado con 1 mL de una solución de 5 mg/mL de colesterol (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100 % (J.T. Baker) y estreptomycin 10 mg/mL. Una vez preparada la mezcla, se lleva a esterilizar en una olla de presión



a 15 libras de presión, 121 °C por 20 minutos y este se deja enfriar lo suficiente para posteriormente verterlo en cajas de Petri de plástico.

8.3 Condiciones generales de crecimiento de las cepas usadas

8.3.1 Crecimiento de *E. coli*

La bacteria *E. coli* OP50 se inoculo en el medio LB líquido suplementado con estreptomycin (10 µg/mL) y se incubo a una temperatura de 37 °C en agitación constante a 200 rpm durante 48 horas. Posteriormente se recuperaron las células y fueron lavadas con agua desionizada estéril y se conservaron en un volumen de 30 mL y fueron congeladas a -20 °C.

8.3.2 Crecimiento de *M. lusitanicus*

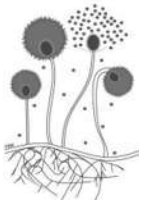
La cepa silvestre (MU636) y las mutantes en las subunidades de proteínas G heterotriméricas se crecieron por espatulado o por crecimiento radial en los distintos medios en una matriz sólida (haciendo uso de agar) a 28 °C por 5 días con periodos de luz y oscuridad.

8.3.3 Crecimiento y mantenimiento de nematodos de *C. elegans*

Se inocularon 200 µL del suspendido de *E. coli* OP50 en una placa que contenía medio sólido NGM suplementado con estreptomycin (10 µg/mL) 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 nemátodo.

8.3.4 Crecimiento y mantenimiento de *Galleria mellonella*

La temperatura de su mantenimiento fue de 30–35 °C, una humedad relativa del 75-85 % con circulación de aire y suficiente alimento. Para los ensayos en los que se



utilizó este modelo biológico, se usaron larvas de aproximadamente 20 días desde que eclosionaron del huevo.

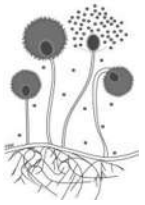
8.4 Experimentos fisiológicos

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

En este trabajo se usó el estadio asexual de *M. lusitanicus*, la cual produce esporangiosporas (denominadas a partir de ahora como esporas). La esporas fueron obtenidas previa inoculación por estriado de 100 esporas de las diferentes cepas de *M. lusitanicus* en la superficie de placas de Petri que de medio YPG-2 % sólido. Dichas placas se incubaron a 28 °C en presencia de luz durante 5 días. Posterior al crecimiento, las esporas fueron colectadas agregando 10 mL de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico estéril; posteriormente las esporas se recuperaron y colocaron en un tubo cónico de 50 mL donde se concentraron mediante centrifugación a 2,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Las esporas se resuspendieron en 20 mL de H₂O destilada estéril, se etiquetaron con la información correspondiente a cada cepa y se conservaron en refrigeración a 4 °C.

Para contar las esporas, se tomaron alícuotas de las mismas en tubos cónicos estériles de 1 mL marca Eppendorf®, de ser necesario se diluyeron con agua para poder contarlas en una cámara de Neubauer (hematocitómetro, marca PGC Scientific) con ayuda de un microscopio óptico ATC 2000 (Marca Leika) usando el objetivo de 40x. Una vez que se contaron las esporas en los distintos cuadrantes, se sumaron y se multiplicaron por el factor de 2.5 x 10⁴ (equivalente al volumen de la cámara) y el resultado obtenido se multiplicó por el factor de dilución empleado para hacer la dilución, el resultado se expresó en esporas/mL. Una vez que se colectaron las esporas y se contaron en la cámara de Neubauer, se aplicó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de esporas/cm²:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{Esporas totales}}{(\text{Número de placas})(\text{Área superficial de la placa})}$$

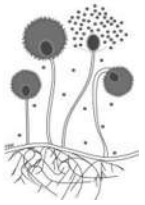


8.4.2 Crecimiento radial de *M. lusitanicus* en un sustrato sólido

En placas de Petri que contenían el sustrato sólido de interés se inocularon 100 esporas justo en el centro de la placa en donde se formó una pequeña gota y se dejó secar antes de tapar la placa. Una vez inoculadas, las placas de Petri se incubaron a 28 °C por un periodo de 5 días con ciclos de luz y oscuridad de 12 h cada uno. Cada 24 h se realizó la medición del diámetro de la colonia generada. Además, las esporas generadas al fin del experimento fueron recolectadas y se contaron para medir la capacidad de esporulación de las cepas ensayadas. Hay que aclarar que, la medición del diámetro de la colonia se realizó hasta la parte más externa del crecimiento (si se hace un zoom a las fotografías representativas del crecimiento de las colonias, se puede observar que este extremo es de color pálido, ya que la medición del diámetro de la colonia se hacía a las primeras horas de la mañana por lo que aún no había una exposición a la luz, pero representa la extensión del ápice del micelio o, en otras palabras, el nuevo crecimiento).

8.4.3 Cinética de crecimiento en aerobiosis de *M. lusitanicus*

Se realizó para evaluar el porcentaje de células germinadas durante un intervalo de tiempo. Además, permite la observación, con ayuda de un microscopio, del crecimiento vegetativo en sus primeras etapas. Para este experimento se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento micelial, se adicionaron 10 mL de medio en matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, posteriormente se incubaron a 28 °C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora (marca comercial FAITHFUL). Cada 2 horas se tomó una muestra de 200 μ L del matraz que fue inoculado e incubado, y dicha muestra se colocó en un tubo cónico de 1 mL marca Eppendorf® que contenía 200 μ L de formol al 10 % (v/v) para fijar la muestra. Posteriormente, en un portaobjetos limpio se colocaban 20 μ L de cada muestra obtenida de la cinética de germinación y se observaba con ayuda de un microscopio óptico y bajo un objetivo de 40x. Se contaron al menos 100 células en total registrando el número de células que habían germinado.

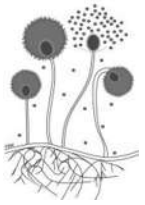


8.4.4 Cinética de crecimiento en anaerobiosis de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento levaduriforme, se adicionaron 10 mL de medio en vasos de precipitados de 10 mL estériles, lo cuales se taparon con un tapón de corcho estéril, el cual poseía una aguja estéril en su centro, lo cual permite el escape de CO_2 ; se incubaron a 28°C sin agitación en una estufa lo que favorece una atmósfera sin O_2 ; el sistema fue modificado del sistema “auto-anaeróbico” descrito anteriormente (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993). Se dejaron crecer por 4 h para favorecer el crecimiento isotrópico de las células, y a partir de la hora 4, se tomaron muestras cada 2 h de 200 μL del vaso de precipitados que fue inoculado e incubado, y dicha muestra se colocó en un tubo cónico de 1 mL marca Eppendorf® con 200 μL de formol para fijar la muestra. Posteriormente, en un portaobjetos limpio se colocaron 20 μL de cada muestra obtenida de la cinética de germinación y fue observada con ayuda de un microscopio óptico y bajo un objetivo de 40x. Se contaron 100 células en total registrando el número de células germinadas.

8.4.5 Crecimiento en baja tensión de oxígeno (O_2) de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. Se adicionaron 10 mL de medio en matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, una vez que se inocularon los matraces con los tratamientos a evaluar, se incubaron a 28°C con agitación constante a 40 rpm o a 50 rpm en una incubadora (marca comercial FAITHFUL). La agitación a 40 rpm o 50 rpm permite la generación de una baja tensión de oxígeno en el líquido (Valle-Maldonado et al., 2020) permitiendo un crecimiento mixto para las cepas. Pasadas 6 horas de incubación se tomó una muestra de 200 μL del matraz que fue inoculado e incubado, y dicha muestra se colocó en un tubo cónico de 1 mL marca Eppendorf® con 200 μL de formol para fijar la muestra. Posteriormente, en un portaobjetos limpio se colocaron 20 μL de cada muestra obtenida de la cinética de germinación y fue observada con ayuda de un microscopio óptico y bajo un objetivo de 40x. Se contaron 100 células en total, y se registraron el número de células germinadas como hifas.

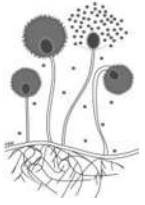


8.4.6 Generación de biomasa de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento micelial, se adicionaron 25 mL de medio en matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, si el experimento evaluaba el efecto que tiene el calcio en la velocidad de la germinación de las esporas, a esos 25 mL de medio se les agregó el volumen necesario de la solución madre 1 M de cloruro de calcio para obtener la concentración deseada de calcio en el medio, una vez que se inocularon los matraces con los tratamientos a evaluar, se incubaron a 28 °C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora (marca comercial FAITHFUL). Se midió el crecimiento a las 24 h, 48 h y 72 h. La biomasa generada a cada tiempo se filtró al vacío y se colectó en papel filtro previamente pesado y secado. Después del secado y enfriado, los filtros con la biomasa se pesaron en una balanza analítica hasta que el peso se mantuvo constante.

8.4.7 Consumo de oxígeno de las células de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento micelial, se adicionaron 10 mL de medio en matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, si el experimento evaluaba el efecto que tiene el calcio en la respiración de las células, a esos 10 mL de medio se les agregó el volumen necesario de la solución madre 1 M de cloruro de calcio, se incubaron a 28 °C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora (marca comercial FAITHFUL) por 3 horas para el medio YPG-2 % y por 4 horas para el medio YNB-0.1 %. Pasado el tiempo de incubación para cada medio, las células se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 10 mL de agua destilada para lavar y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones, se repitió el proceso una vez más. La concentración de oxígeno fue determinada por medio de un medidor de oxígeno, (Dissolved oxygen and Temperature meter, Hanna instruments, model: HI9146). Los resultados se analizaron en el programa Excel® en el que se calcularon los valores de la línea recta, siendo el valor de la



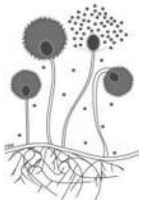
pendiente el valor de la respiración y tomando un valor mínimo de R^2 de 0.9 para cada uno.

8.4.8 Cuantificación del radical $\text{OH}\cdot$

Las esporas de cada una de las cepas evaluadas se cultivaron en el medio de cultivo líquido correspondiente y se incubaron durante 2 h a 150 r.p.m. a 28 °C, después de ese periodo de crecimiento, las células se recuperaron por centrifugación a 2,000 rpm durante 5 minutos y posteriormente se lavaron con el buffer HEPES 10 mM a un pH de 7, y se repitió el proceso desde la centrifugación tres veces. Después se les adicionó la molécula fluorescente 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF) a una concentración de 10 μM disuelto en buffer HEPES con 0.1 % de dimetilformamida y glucosa al 110 mM por 30 minutos en oscuridad, posteriormente las células se recuperaron por centrifugación y se lavaron tres veces con buffer HEPES y finalmente se resuspendieron en buffer HEPES con glucosa. Las muestras se mantuvieron en oscuridad hasta su procesamiento mediante el instrumento VARIOSKAN LUX (Thermo Fisher Scientific®) para la cuantificación del radical hidroxilo con un filtro de emisión de 520 nm y a una línea de excitación de 490 nm.

8.4.9 Producción de sobrenadantes de *M. lusitanicus*

Se inocularon 5×10^5 esporas de la cepa de interés por cada mL de medio de cultivo. En el caso de crecimiento micelial, se adicionaron 10 mL de medio en matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, si el experimento evaluaba el efecto que tiene el calcio en la velocidad de la germinación de las esporas, se agregó el calcio necesario, se incubaron a 28 °C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora (marca comercial FAITHFUL®) por 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se separó la biomasa (micelio) del sobrenadante de cultivo mediante filtración al vacío con papel filtro Whatman® No.6 (3 μm), el líquido se colectó en un tubo cónico de 15 mL estéril, se rotulo y se congeló a -20 °C hasta su uso.



8.4.10 Ensayo de supervivencia de *C. elegans*

Para evaluar el efecto tóxico de los sobrenadantes, se colocó 1 mL de los distintos sobrenadantes en cada uno de los pozos (por duplicado) de placas de 24 pozos (Marca Corning®). Con ayuda de un microscopio de tipo estereoscópico (Leica® MZ75) y con una asa de nicromo se transfirieron de 10-20 nematodos a cada uno de los pozos que contenían sobrenadante. La placa con los nematodos se incubó por 30 minutos a 18 °C y se contaron los nematodos vivos, a partir de este momento se volvieron a incubar y se observaron cada 12 h por un tiempo de 72 h en total. El criterio que se tomó en cuenta para determinar si los nematodos estaban muertos, fue cuando estos permanecían inmóviles a la estimulación física con el asa de nicromo. Se registraron los resultados en la bitácora personal de laboratorio y después se graficaron en un programa estadístico.

8.4.11 Ensayo de supervivencia de *G. mellonella*

Se formaron grupos de 20 larvas de *G. mellonella* las cuales fueron colocadas en cajas de Petri de plástico estériles y vacías. Las larvas se inocularon con 10,000 esporas en un volumen total de 20 µL con ayuda de una jeringa y aguja para insulina, en la última pro-pata (en el hemocele) de cada larva. Las esporas inoculadas correspondían a la cepa silvestre o a las esporas obtenidas de cada tratamiento. Además, se inoculó un grupo con agua salina fisiológica estéril como control y se dejó otro grupo sin inocular. Una vez que se inocularon las larvas, estas se incubaron a temperatura ambiente y se observaban y contaban cada día, separando a las larvas muertas de las vivas.

8.5 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se realizó la búsqueda de canales de calcio de alta afinidad (HACS, por sus siglas en inglés) en la base de datos del genoma de *M. lusitanicus* (CBS277.49 v3.0). En hongos filamentosos, se ha descrito que estos canales están formados por dos proteínas, la proteína Cch1 y la proteína Mid1. Se usaron como sondas a las proteínas homologas Cch1 (P50077, UniProt) y Mid1



(P41821, UniProt) de *S. cerevisiae*. Se realizó un Blast proteína-proteína (con análisis filtrado) en el genoma de *M. lusitanicus* para buscar posibles proteínas homologas. Una vez obtenidas las posibles proteínas homologas para Cch1 y Mid1 en *M. lusitanicus*, se depuraron las secuencias mediante un alineamiento global entre ellas en el programa bioinformático Bioedit[®], en el que se tomó en cuenta el porcentaje de identidad y similitud entre ellas, para discernir cuáles eran diferentes. Una vez que las posibles secuencias primarias de proteínas homologas de *M. lusitanicus* fueron depuradas, se hizo un alineamiento global en el programa Bioedit[®] con las proteínas homologas para Cch1 y Mid1 de otros organismos, en los que se hizo el análisis de porcentaje de identidad y similitud global. Además, también se analizaron residuos, motivos y dominios conservados en cada una de las proteínas en los programas ClustalW[®] y Jalview[®].

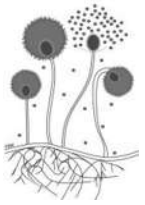
8.6 Análisis de imágenes

La captura de imágenes de las células fue mediante el uso de un microscopio Optihot-2 (Marca NIKON[®]) y una cámara Coolpix S10 (Marca NIKON[®]) usando el objetivo de 40x para la magnificación.

Además, se usó el software Q-capture[®] PRO-7 y la aplicación suite para Leica[®] para medir el tamaño de las células.

8.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) en el programa estadístico que provee la aplicación del Software Prism[®] versión 8.1. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos en las gráficas, valor de $p < 0.05$.



IX. Resultados

9.1 Crecimiento en medio sólido

9.1.1 Crecimiento de MU636 y las cepas mutantes $\Delta gpb1-3$ y $\Delta gpg1-3$ en condiciones de aerobiosis en un sustrato sólido

Con el objetivo de conocer el fenotipo de las mutantes en las subunidades beta y gama de las proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* (tabla 1MM), se evaluó el crecimiento micelial por medio de crecimiento radial. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en placas de medio YPG al 2 % de glucosa y se midió el diámetro de la colonia cada día (durante 5 días) (Figuras 9 y 10).

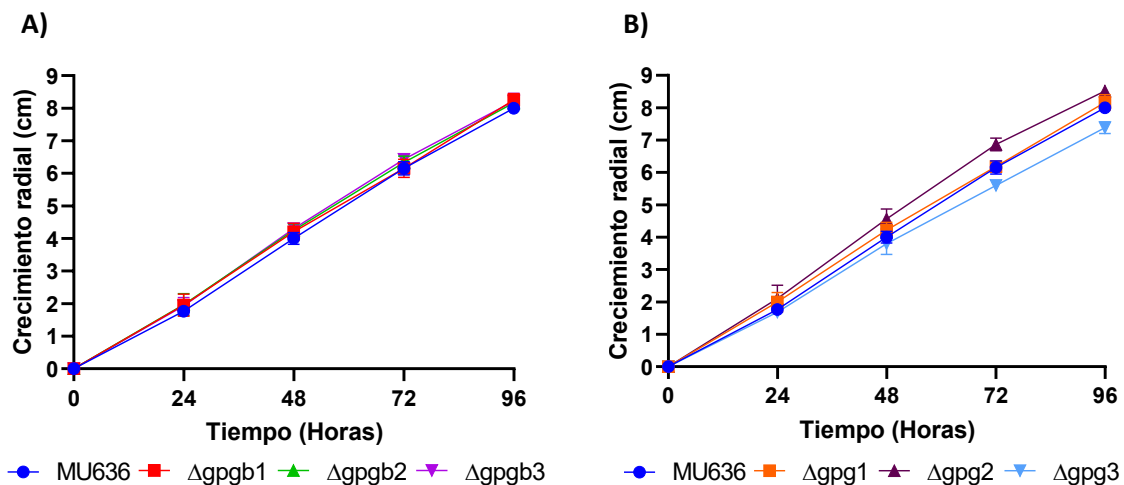


Figura 9. Efecto de las mutaciones en los genes de subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en el crecimiento micelial en medio sólido. Crecimiento radial en medio sólido YPG-2 %. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, se midió el diámetro de la colonia cada día. **A)** Se muestran el crecimiento radial de las mutantes en las subunidades betas; **B)** y de para las subunidades gama y la cepa silvestre. n=3, se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

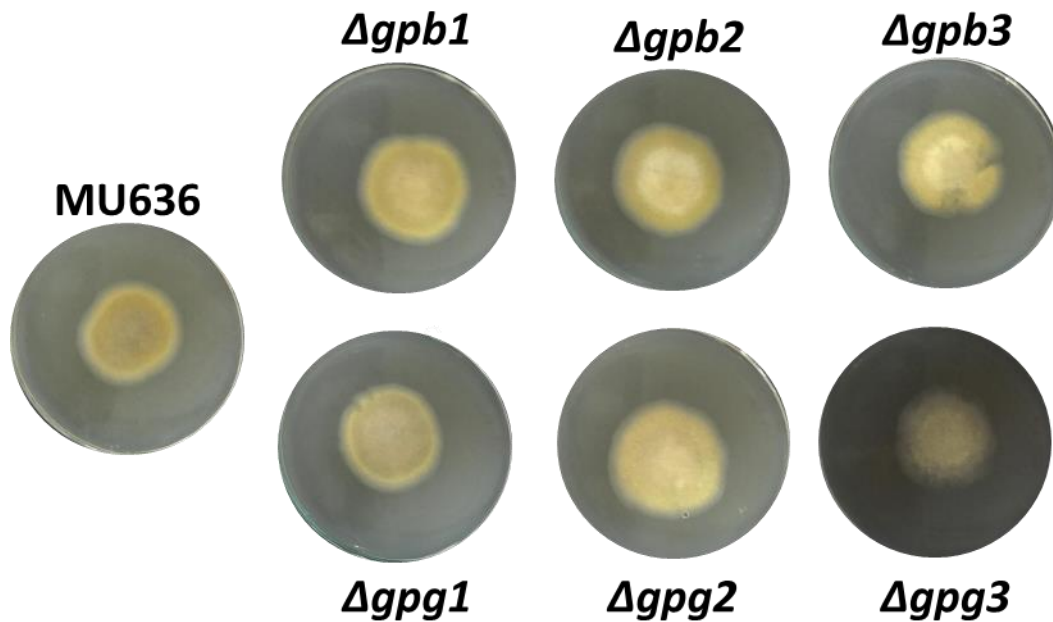
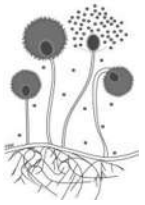
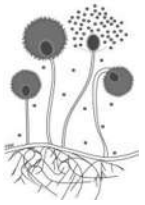


Figura 10. Crecimiento radial de las mutantes en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* (MU636). Se muestran fotografías representativas del crecimiento radial en medio YPG-2 % de la cepa silvestre (MU636) y de las mutantes $\Delta gpb1-3$ y $\Delta gpg1-3$ en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de las 48 horas de crecimiento. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3.

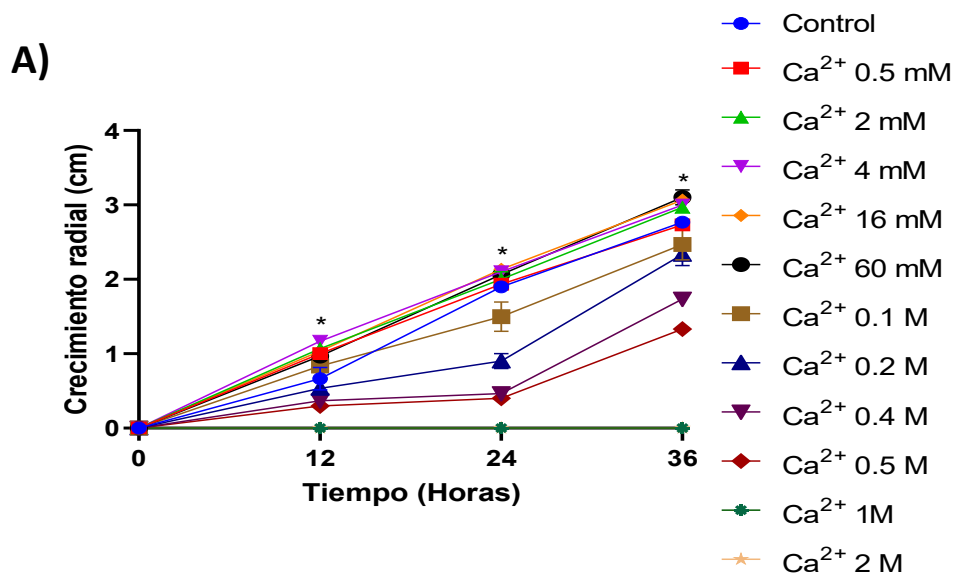
La morfología de las colonias de las cepas mutantes en las subunidades de las proteínas G heterotriméricas es muy similar al de la cepa silvestre MU636 (WT). Las colonias eran de color amarillo y con el paso de los días se tornaban de color gris-negro debido a la presencia de las esporas. El análisis estadístico reveló que no hubo diferencias significativas entre las cepas mutantes en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas y la cepa silvestre (MU636) en el crecimiento, al final del experimento.



9.1.2 Evaluación del efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* (MU636)

Debido a que el calcio estimula el crecimiento micelial y la esporulación en otros hongos (Wang et al., 2012; Yu et al., 2012; Roy et al., 2020) se probó el efecto que tiene este ion sobre el crecimiento radial de *M. lusitanicus*.

Se realizó el crecimiento radial en medio YPG-2 % suplementado con concentraciones crecientes de CaCl_2 (0.5, 2, 4, 16 y 60 mM y 0.1, 0.2, 0.4, 1 y 2 M). En el centro de cada placa se inocularon 100 esporas de WT y se incubaron a 28°C por 36 h con periodos de luz y oscuridad y se midió el diámetro de la colonia por dos días (Figura 11). Al segundo día se observó que, respecto al control, las concentraciones de 2 mM, 4 mM, 16 mM y 60 mM de CaCl_2 estimularon significativamente ($*p<0.05$) el crecimiento radial, mientras que las concentraciones de 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M de CaCl_2 reprimieron significativamente ($*p<0.05$) el crecimiento y a las concentraciones de 1 M y 2 M de CaCl_2 no hubo crecimiento. Al día 5 de crecimiento, se observó que el rango de concentraciones de 0.5 mM–0.2 M de CaCl_2 evaluadas cubrieron totalmente la placa, mientras que el rango de concentraciones de 0.4 M–0.5 M de CaCl_2 no la cubren. A las concentraciones de 1 M y 2 M de CaCl_2 no hubo crecimiento.



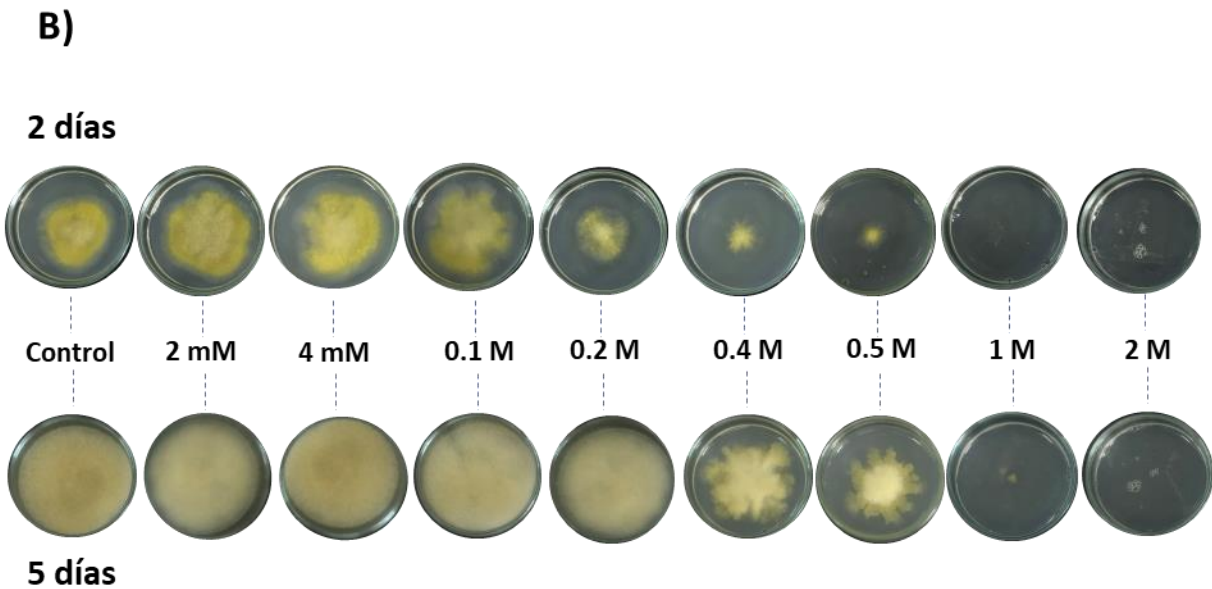
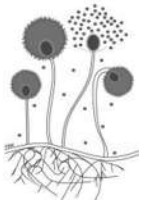
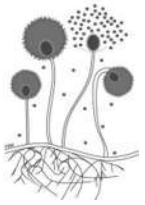


Figura 11. Efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* (MU636). A) Crecimiento radial en medio YPG-2 % suplementado con concentraciones crecientes de CaCl₂ (0.5 mM–2 M). Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3. B) Se muestran fotografías representativas de la morfología de colonia del crecimiento radial en medio YPG-2 % de la cepa WT en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de los 2 y 5 días de crecimiento. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa (de 4 cm de diámetro) y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

En las fotografías del crecimiento radial a los 2 días de cada uno de los tratamientos, se observaron colonias de color amarillo, color que es característico de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* debido a la producción de β -carotenos. Es interesante mencionar que desde la concentración de 0.1 M–0.5 M de CaCl₂ el crecimiento ya no es uniforme en sus bordes, como sí lo es para las concentraciones de 0.5 mM – 4 mM de CaCl₂.

A los 5 días de crecimiento se pudo observar que la morfología de la colonia del control y de los tratamientos con 0.5 mM–0.2 M de CaCl₂ mostraban el desarrollo de micelio aéreo que daba una apariencia algodonosa y con una coloración que iba



del marrón al gris negruzco por la producción de esporas. Los tratamientos con 0.4 M y 0.5 M de CaCl_2 no mostraron el desarrollo de micelio aéreo, ni un cambio en el color de la colonia, permaneciendo de color amarillo. Además, a estas concentraciones de CaCl_2 se observó que el crecimiento seguía siendo de tipo no polarizado como se observó a los 2 días de crecimiento.

A partir de estos experimentos, se decidió proseguir a evaluar las concentraciones más bajas (siendo 0.5, 2 y 4 mM de CaCl_2) de calcio en las que se observó que estimularon significativamente el crecimiento micelial comparado con el control.

En la figura 11 se usaron placas de Petri de 4 cm de diámetro, para determinar si también en placas de Petri de 9 cm de diámetro se presenta el mismo efecto positivo en el crecimiento radial de la cepa WT.

Se evaluaron las concentraciones de CaCl_2 a evaluar (0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl_2) se inocularon 100 esporas de la cepa WT en el centro de cada placa de YPG-2 %, las cuales se incubaron a 28 °C por 5 días con periodos de luz y oscuridad y se midió el diámetro de la colonia cada día. Además, para cuantificar el efecto que tiene el calcio sobre la esporulación de la cepa WT, se colectaron las esporas (Figura 12), como se describe en el apartado de materiales y métodos.

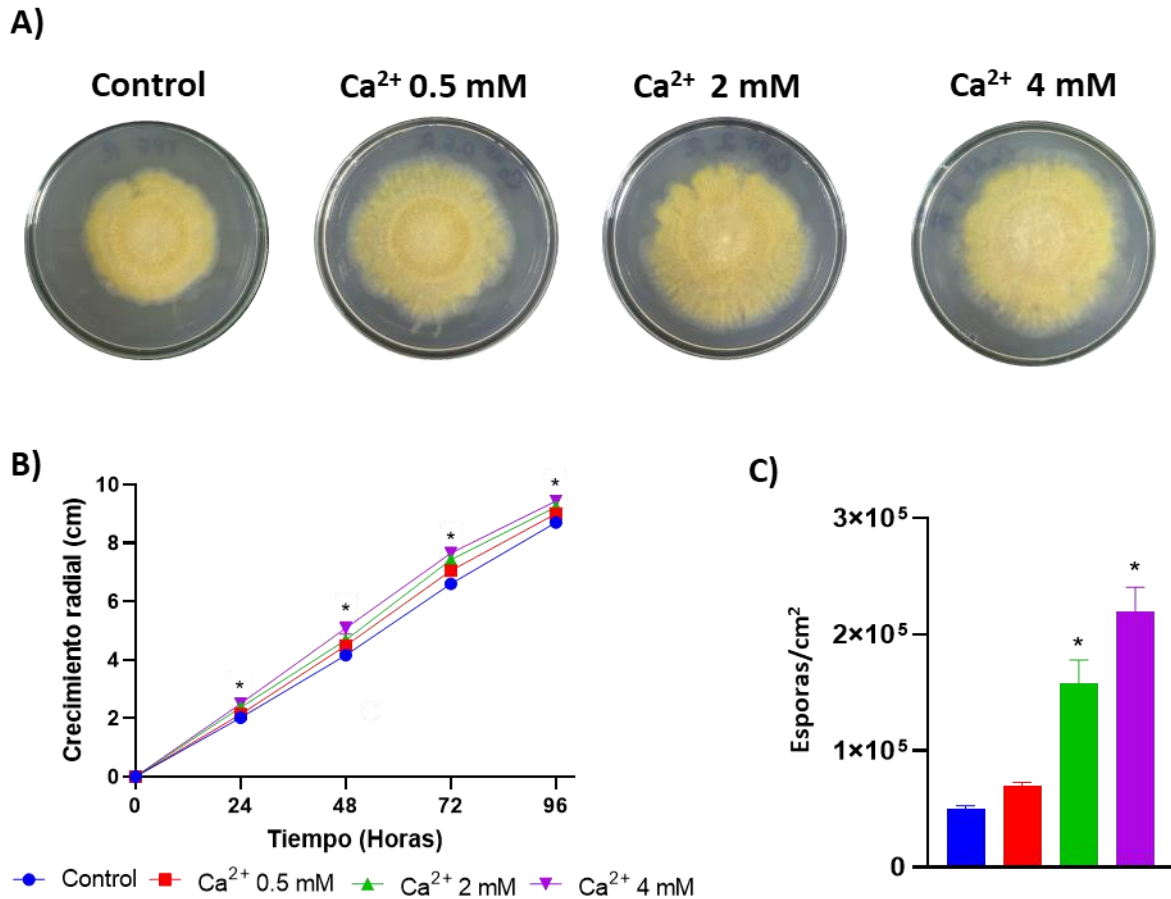
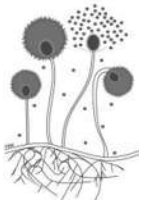
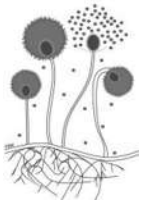


Figura 12. Efecto del calcio en el crecimiento radial de la cepa WT de *M. lusitanicus* (MU636). **A)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las colonias por crecimiento radial en medio YPG-2 % suplementadas con CaCl₂ (0.5 mM–4 mM) de la cepa silvestre (MU636) en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de las 72 h de crecimiento. **B)** Se muestra el crecimiento radial (diámetro de la colonia) de la cepa WT que creció en placas suplementadas con calcio. **C)** Gráfica que representa el efecto que tiene el calcio sobre la esporulación de *M. lusitanicus*. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

En las fotografías del crecimiento radial de cada uno de los tratamientos, se observan colonias de color amarillo, color que es característico de la cepa WT.



Se observó que el calcio estimuló el crecimiento radial de *M. lusitanicus*, este efecto se cuantificó y se visualizó como un mayor diámetro de la colonia en aquellos sustratos que contenían CaCl_2 (0.5 mM - 0.4 mM) comparado con el control (MU636). Este estímulo significativo (p valor) en el crecimiento se pudo observar desde las 24 horas a la concentración de 4 mM de CaCl_2 y se mantuvo hasta la última medición del diámetro de la colonia, para la concentración de 2 mM de CaCl_2 el estímulo significativo en el crecimiento se observó desde las 48 horas y para la concentración de 0.5 mM de CaCl_2 se observó un estímulo significativo en el crecimiento a partir de las 72 horas.

Los tratamientos con 2 mM y 4 mM de CaCl_2 estimularon significativamente ($*p < 0.05$) la producción de esporas de la cepa WT comparada con el control.

9.1.3 Evaluación del efecto del EDTA en el crecimiento radial de la cepa WT de *M. lusitanicus*

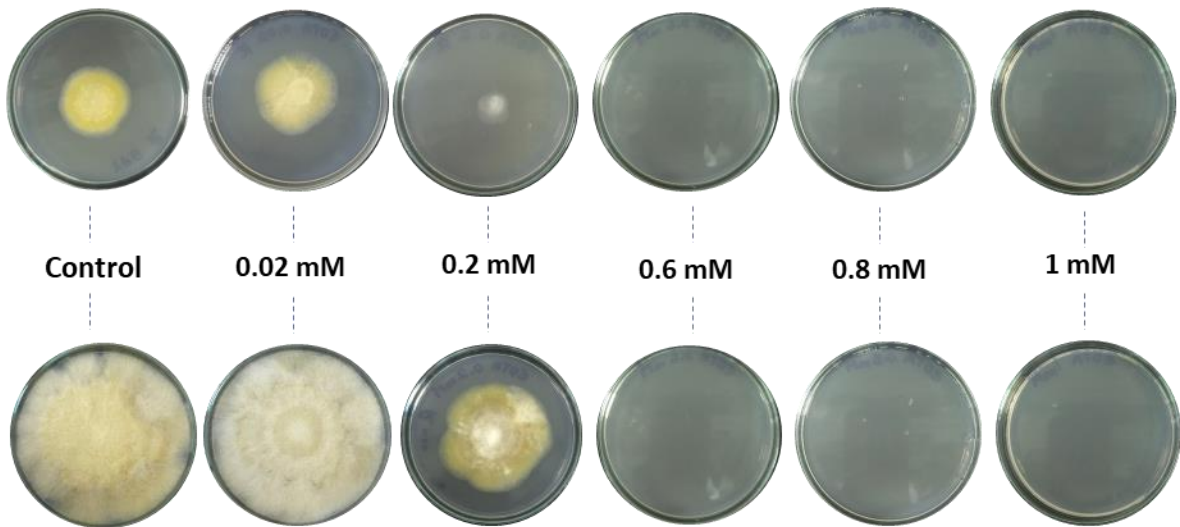
Se realizó el crecimiento radial en medio sólido de YPG-2 % suplementado con concentraciones crecientes de EDTA (0.02 mM, 0.2 mM, 0.6 mM, 0.8 mM y 1 mM). En el centro de cada placa se inocularon 100 esporas de la cepa silvestre y se incubaron a 28 °C por 36 horas con periodos de luz y oscuridad y se midió el diámetro de la colonia durante 5 días (Figura 13).

Se observó que la concentración de 0.02 mM de EDTA aparentemente no tuvo efecto en el crecimiento respecto al control (MU636), pero el micelio generado fue de color blanco, comparada con el control que es de color amarillo y que con el tiempo se tornó de un color grisáceo o negruzco. A 0.2 mM de EDTA se observó un crecimiento reducido comparado con el control a los 2 días de crecimiento; además, el micelio generado fue de color blanco no logrando formar un tapete de micelio en toda la placa. A las concentraciones de 0.6 mM–1 mM de EDTA no hubo crecimiento (Figura 13). Además, se observó que el EDTA desde la concentración mínima probada, redujo la esporulación (Figura 13).



A)

2 días



5 días

B)

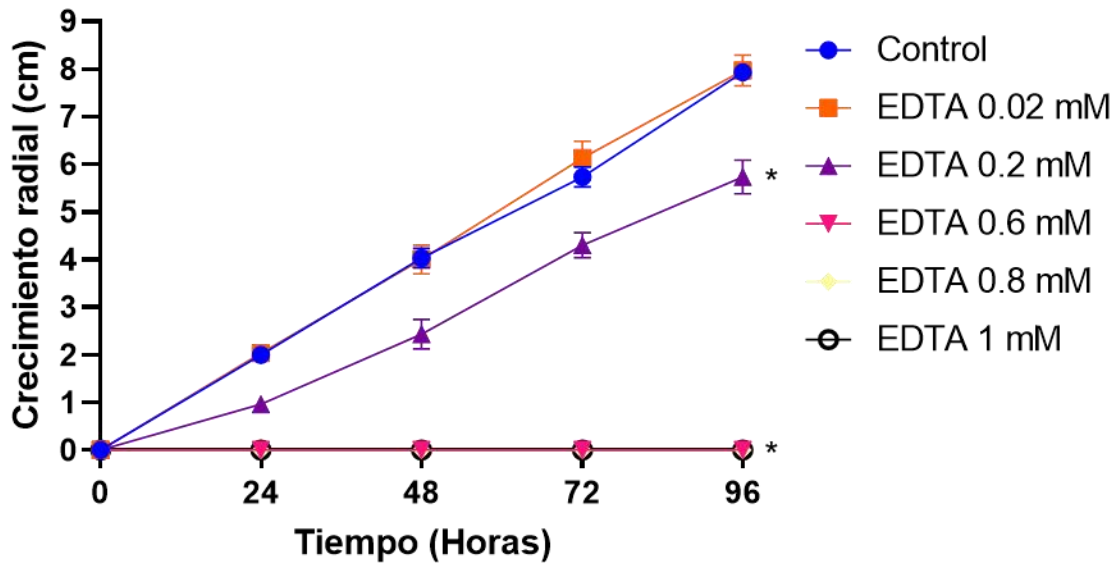
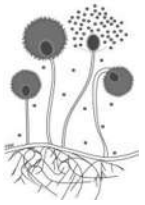


Figura 13. Efecto del EDTA en el crecimiento radial de la cepa WT de *M. lusitanicus* (MU636). **A)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las colonias por crecimiento radial en medio YPG-2 % suplementadas con EDTA (0.02 mM–1 mM) de la cepa silvestre (MU636) en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de las 48 horas de crecimiento. **B)** Se muestra el crecimiento



radial (diámetro de la colonia) de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* que creció en placas suplementadas con concentraciones crecientes de EDTA. Se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

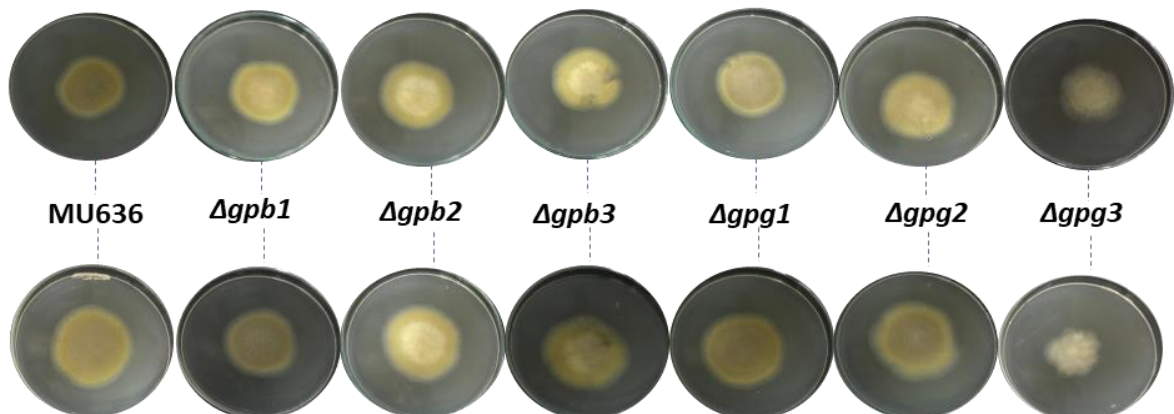
9.1.4 Efecto del calcio en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en un medio sólido

En experimentos previos (Figuras 11 y 12) se evaluó el efecto del calcio sobre el crecimiento radial de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* (MU636), con el objetivo de conocer si este ion tiene un efecto en el crecimiento radial de las mutantes en proteínas G heterotriméricas $\Delta gpb1-3$ y $\Delta gpg1-3$, se realizaron experimentos similares a los anteriores.

Se observó que la cepa WT de *M. lusitanicus* (MU636) respondió al estímulo por calcio, lo que se tradujo en un mayor crecimiento y en un mayor diámetro respecto al control (sin calcio) (Figura 14, B) línea azul y D) línea negra punteada). Respecto a las mutantes en proteínas G heterotriméricas, en las subunidades beta, se observó que todas respondieron al estímulo por calcio (Figura 14, D) y tienen un crecimiento significativamente mayor (*p<0.05) cuando se les compara con la cepa silvestre sin tratamiento y con cada una de las mutantes sin tratamiento.

A)

Control



Calcio

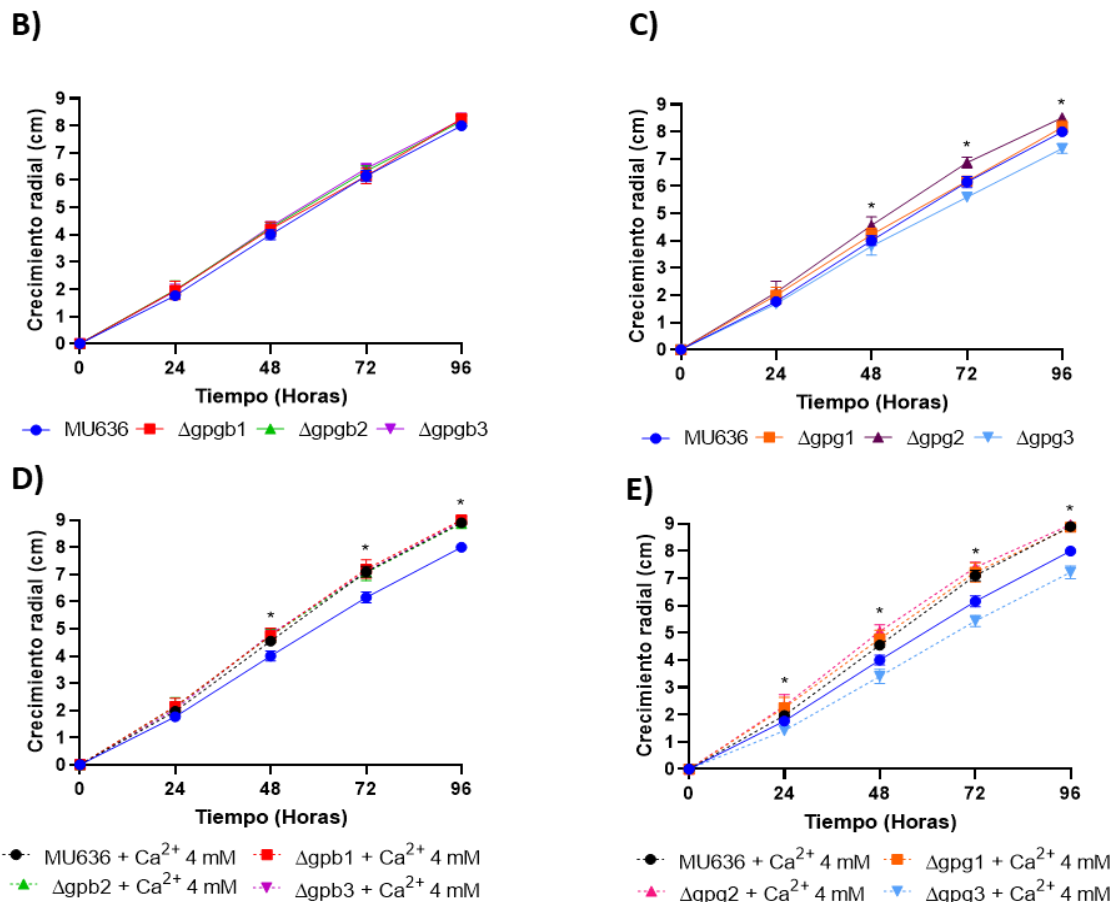
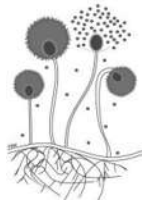
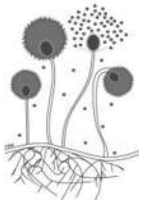


Figura 14. Efecto del calcio en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas. **A)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las colonias por crecimiento radial en medio YPG-2 % (control, arriba) y YPG-2 % suplementadas con 4 mM de CaCl₂ (tratamiento, abajo) de la cepa silvestre (MU636) y de las mutantes por delección en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de las 48 h de crecimiento. **B) y C)** Se muestra el crecimiento radial (diámetro de la colonia) de la cepa WT y de las mutantes por delección en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en medio YPG-2 % (control). **D) y E)** Se muestra el crecimiento radial (diámetro de la colonia) de la cepa WT y de las mutantes por delección en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas en medio YPG-2 % suplementado con 4 mM de CaCl₂ (tratamiento). Para este experimento se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.



Dos de las subunidades gama ($\Delta gpg1$ y $\Delta gpg2$), al igual que la cepa WT, mostraron un mayor crecimiento en la presencia de calcio (Figura 14, E) respecto a las cepas silvestre y las mutantes cuando se crecieron sin calcio (Figura 14, C). Interesantemente, en presencia de calcio la mutante en $\Delta gpg3$ redujo significativamente ($*p < 0.05$) su crecimiento respecto a la cepa silvestre (MU636) crecida en presencia de calcio, siendo más notorio cuando la cepa silvestre creció en presencia de $CaCl_2$.

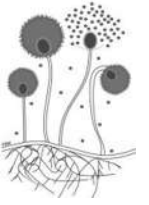
En general, las mutantes beta y gama tienen el mismo crecimiento radial que la cepa silvestre (MU636) en presencia de calcio a excepción de la mutante en $\Delta gpg3$, que mostró un crecimiento reducido en presencia de calcio.

9.1.5 Efecto del EDTA en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas

Debido a que la concentración de 0.2 mM de EDTA tuvo un efecto negativo en el crecimiento radial de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* (MU636), se usó esta concentración para evaluar el efecto que tiene en las mutantes $\Delta gpb1-3$ y $\Delta gpg1-3$.

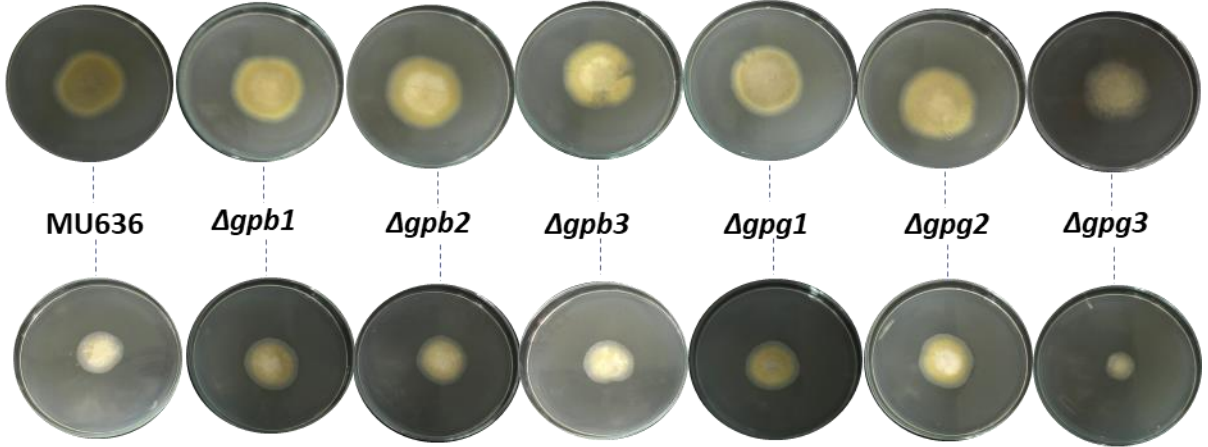
De forma general se observó que el EDTA tuvo un efecto significativo ($*p < 0.05$) en la disminución del crecimiento radial en la cepa silvestre de MU636 y en todas las mutantes en proteínas G heterotriméricas $\Delta gpb1-\Delta gpb3$ y $\Delta gpg1-\Delta gpg2$ al comparar su crecimiento sin EDTA. La excepción fue la mutante en $\Delta gpg3$, que mostró un crecimiento aún más reducido en presencia de EDTA. Además, la coloración de las colonias cuando crecieron en presencia de EDTA fue de un color blanco y con una producción de esporas disminuida con respecto al control.

Los resultados se muestran en la figura 15.



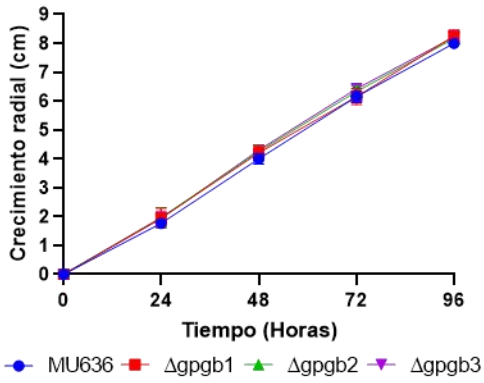
A)

Control

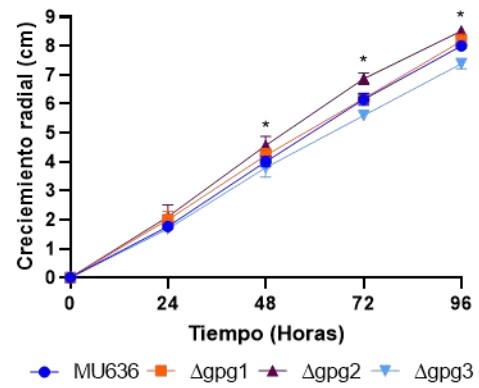


EDTA

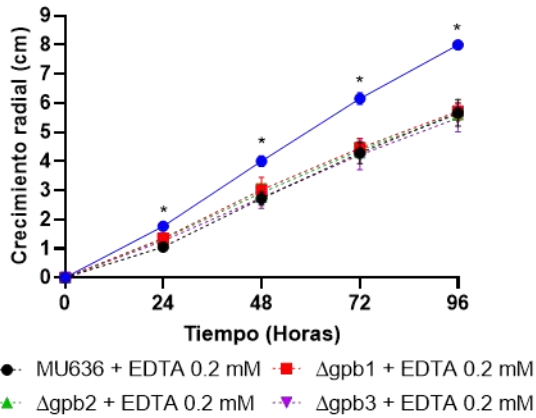
B)



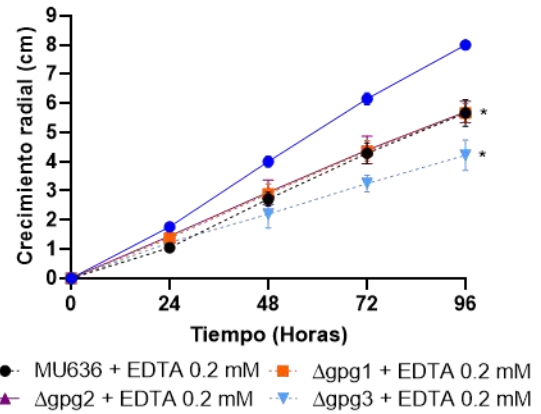
C)



D)



E)



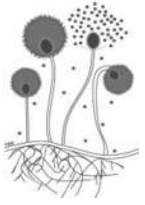
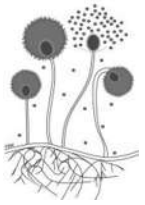


Figura 15. Efecto del EDTA en el crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas. **A)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las colonias por crecimiento radial en YPG-2 % (control, arriba) y YPG-2 % suplementadas con 0.2 mM de EDTA (tratamiento, abajo) de la cepa silvestre (MU636) y de las mutantes en subunidades beta y gama en condiciones de aerobiosis y en un sustrato sólido de las 48 h de crecimiento. **B) y C)** Se muestra el crecimiento radial (diámetro de la colonia) de la cepa WT y de las mutantes en subunidades beta y gama. **D) y E)** Se muestra el crecimiento radial de la cepa WT y de las mutantes en las subunidades beta y gama en medio YPG-2 % suplementado con 0.2 mM de EDTA (tratamiento). Para este experimento se inocularon 100 esporas de cada cepa en el centro de la placa y se incubaron a 28 °C por 5 días, n=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

A este punto, se observó de forma general, que la cepa silvestre de *M. lusitanicus* respondió a la adición extracelular de calcio en el medio, aumentando su crecimiento radial y su capacidad de esporulación. En este medio de crecimiento se observó que las mutantes se comportan de manera similar al de la cepa silvestre y que responden al estímulo por calcio a excepción de la mutante en gama 3, la cual reduce su crecimiento radial al crecer en un medio suplementado con calcio. Además, se demostró que el calcio es necesario para el crecimiento de las cepas.

9.2 Crecimiento en medio líquido

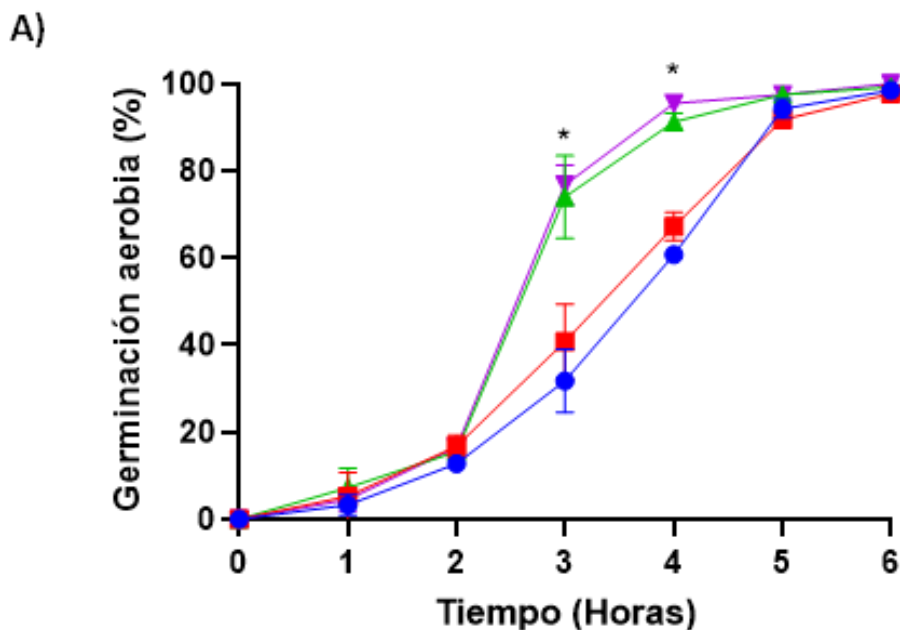
El crecimiento de MU636 en medio sólido suplementado con CaCl₂ mostró un efecto significativo en su crecimiento. En los experimentos siguientes se evaluó el efecto que tiene este ion en medio líquido.



9.2.1 Evaluación de la velocidad de germinación en medio líquido de las esporas de la cepa WT de *M. lusitanicus* obtenidas de placas que fueron suplementadas con calcio

Se evaluó la velocidad de germinación de las esporas de la cepa silvestre de *M. lusitanicus* (MU636) en el medio líquido YPG-2 %.

En la figura 16 se muestra la velocidad de germinación de las esporas que fueron producidas en presencia de 0.5 mM – 4 mM de CaCl_2 , así como la morfología celular que se observó en cada uno de los tratamientos evaluados. Los resultados mostraron que al suplementar el medio con 2 mM y 4 mM de CaCl_2 tuvo un efecto significativo ($*p < 0.05$) sobre la velocidad de germinación de dichas esporas en un medio líquido. Este efecto significativo se apreció a las 3 y 4 horas respecto al control. Además, se observó que la célula madre tenía un mayor diámetro comparado con el de la célula madre del control; además, se observó que con dichos tratamientos la célula madre presentó hiperfilamentación, tubos germinativos con un mayor diámetro y de mayor longitud a diferencia del control, en el que la célula madre sólo presentaba en su mayoría 2 tubos germinativos de menor diámetro y longitud.



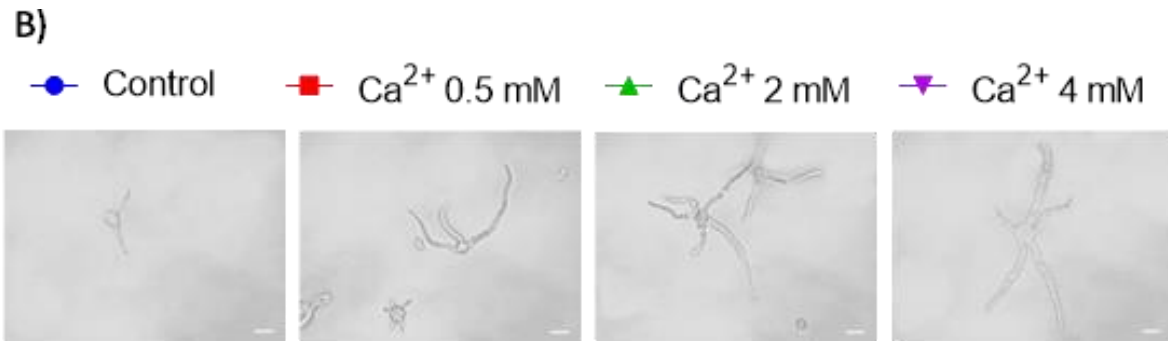
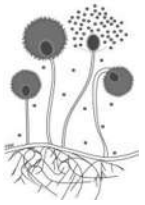


Figura 16. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en condiciones de aerobiosis. Para este experimento se usaron las esporas de *M. lusitanicus* que fueron recolectadas de placas que contenían cada uno de los tratamientos evaluados. **A)** Se inocularon 5×10^5 esporas/mL de medio y se incubaron 6 h a 28°C y a 150 rpm en una incubadora rotatoria. **B)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las células a las 4 h de germinación de cada uno de los tratamientos. La barra de longitud en las fotografías corresponde a $20\ \mu\text{m}$, $n=3$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, $*p<0.05$.

La concentración de 0.5 mM de CaCl_2 no tuvo un efecto significativo sobre la velocidad de germinación comparado con el control; sin embargo, la célula madre presentó hiperfilamentación y sus tubos germinativos presentaron, aparentemente, un mayor diámetro y longitud.

9.2.2 Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación en anaerobiosis de *M. lusitanicus*

En este experimento se evaluó si la adición del calcio directamente al cultivo líquido seguía manteniendo el efecto positivo sobre la velocidad de germinación. El suplementar el medio de cultivo directamente con calcio (0.5 mM–4 mM), estos mostraron un efecto positivo y significativo ($*p<0.05$) sobre la velocidad de germinación de las esporas de MU636 desde la primera hora y hasta concluir el experimento en comparación a la germinación de las esporas sin calcio. En cuanto a la morfología de las células (Figura 17, B).

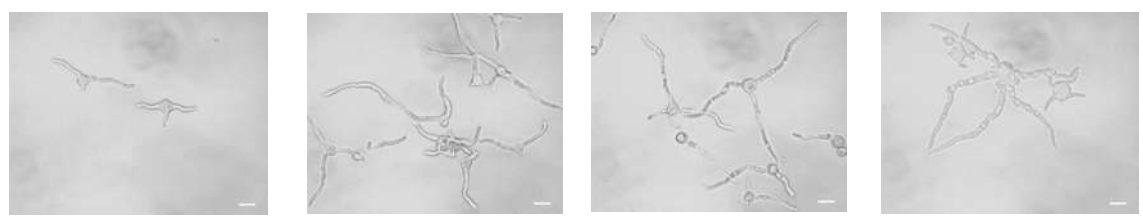
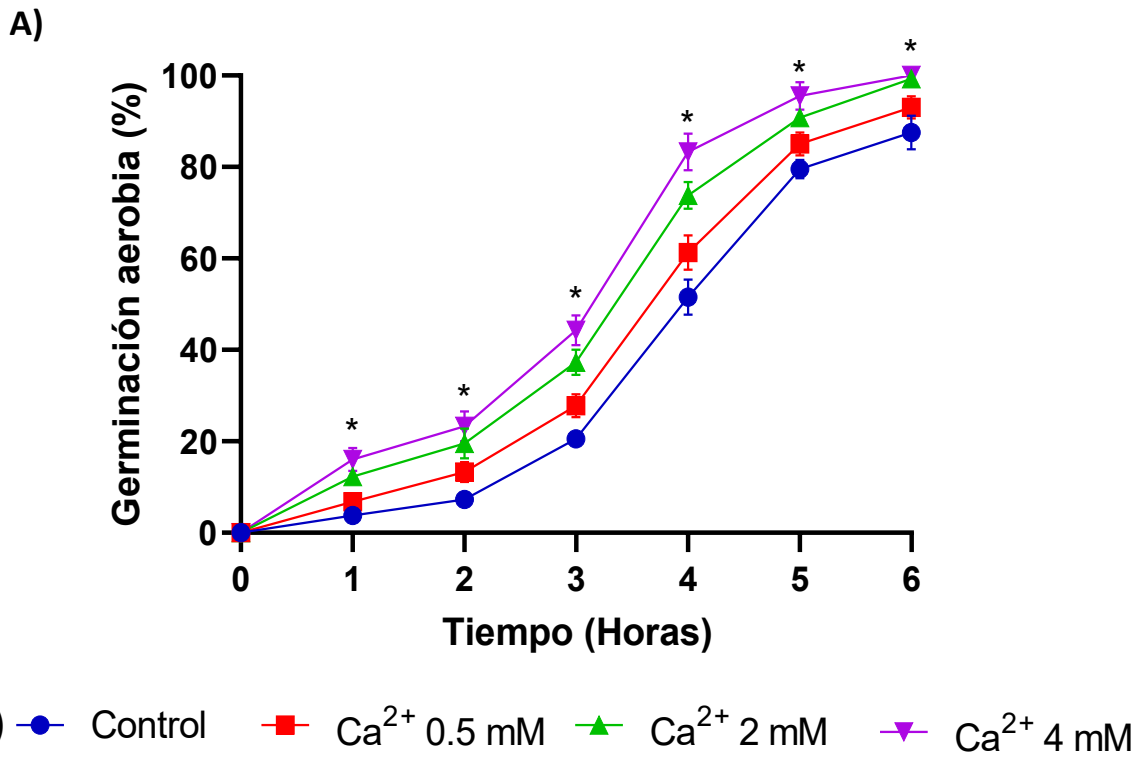
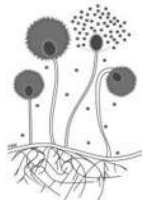
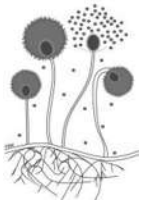


Figura 17. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en condiciones de aerobiosis. Para este experimento se usaron las esporas de *M. lusitanicus* que fueron recolectadas de placas de YPG-2 % y al medio de cultivo líquido se le adicionaron cada uno de los tratamientos de calcio evaluados. **A)** Se inocularon 5×10^5 esporas/mL de medio y se incubaron 6 h a 28 °C y a 150 rpm en una incubadora rotatoria. **B)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las células a las 4 h de germinación de cada uno de los tratamientos analizados. La barra de longitud en las fotografías corresponde a 20 μ m, n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.



Se observó que los tratamientos con calcio promueven la hiperfilamentación, el alargamiento de las hifas, el aumento en el grosor de las hifas y su ramificación, así como el aumento en el diámetro de la célula madre cuando se les compara con la morfología observada para las células del control en el que la célula madre sólo presentaba en su mayoría 2 tubos germinativos de menor diámetro y longitud (Figura 18).

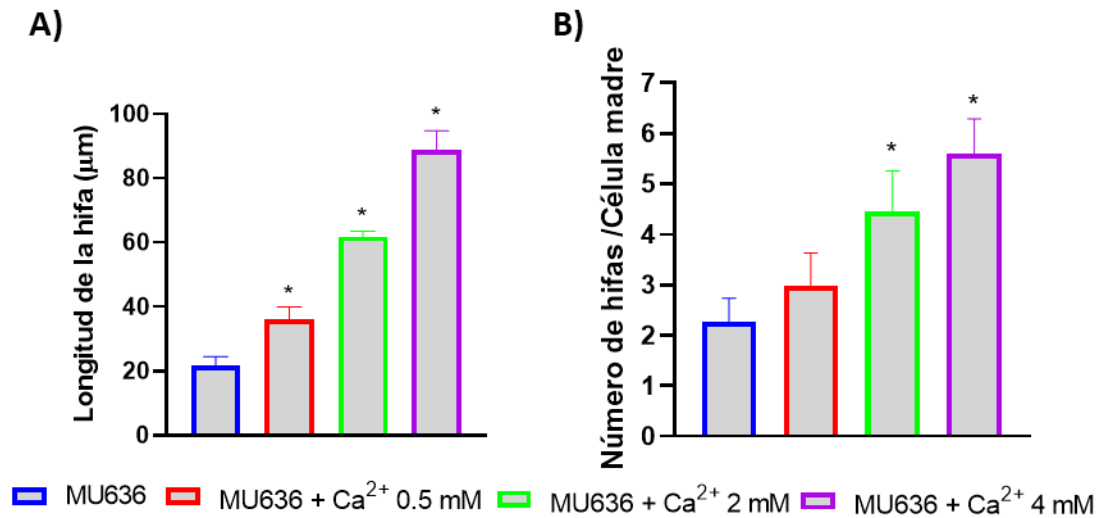
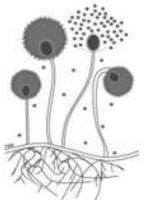


Figura 18. Efecto del calcio extracelular sobre la longitud y el número de hifas de las células de *M. lusitanicus*. Se inocularon 5×10^6 esporas en 10 mL de medio líquido YPG-2 % y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. Para los tratamiento con CaCl₂ se adicionó al cultivo el volumen necesario del stock para obtener concentraciones del ion a 0.5 mM, 2 mM y 4 mM. Se midió la longitud de la hifa (A) y el número de hifas por cada célula (B) a la hora 4 de germinación. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

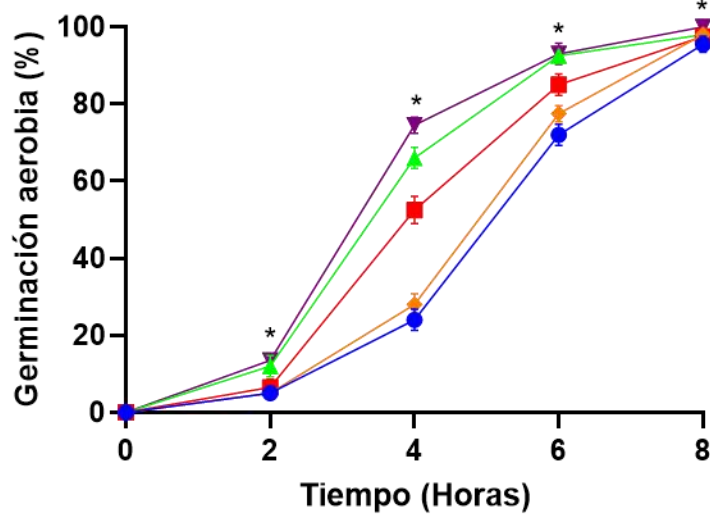
Dado que el medio líquido YPG-2 % contiene calcio, se decidió también evaluar el efecto que tiene el calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en un medio de cultivo en el que la concentración de calcio fuera controlada. Se optó por usar el medio Vogel, el cual es un medio mínimo y sintético para hongos, para controlar la concentración de calcio presente en el medio. Usando al medio Vogel-2 % suplementado con varias concentraciones de calcio se



decidió evaluar la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus*, bajo las mismas condiciones de crecimiento usadas para el medio YPG-2 %. Los resultados de este experimento se muestran en la siguiente figura (Fig. 19).

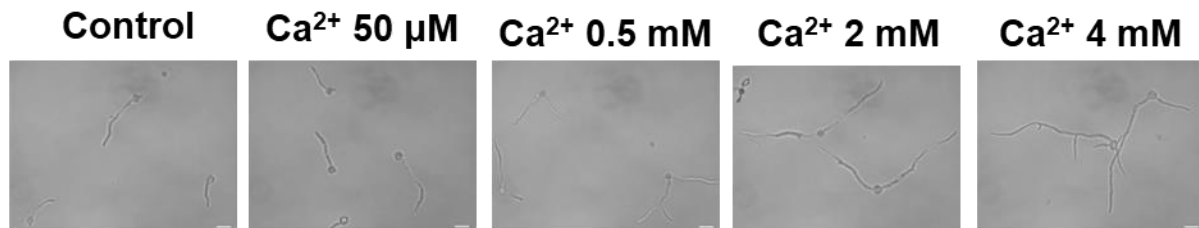
El medio Vogel-2 % arrojó resultados muy similares a los obtenidos para la velocidad de germinación evaluados en el medio de cultivo YPG-2 % (figura 19, panel A y figura 17). Este medio Vogel generó un aumento significativo en la velocidad de germinación de las esporas en presencia de las concentraciones de calcio evaluadas desde las primeras 2 horas del crecimiento y hasta el final del experimento al compararlos con los resultados del control. En la concentración más baja de calcio evaluada (50 μM de CaCl_2), no se observó un cambio estadísticamente significativo comparado con el control en cuanto a la velocidad de germinación, ni en la morfología.

A)



● Control ◆ Ca^{2+} 50 μM ■ Ca^{2+} 0.5 mM ▲ Ca^{2+} 2 mM ▼ Ca^{2+} 4 mM

B)



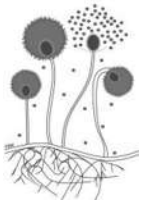


Figura 19. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en condiciones de aerobiosis en medio Vogel-2 %. Para este experimento se usaron las esporas de *M. lusitanicus* que fueron recolectadas de placas de YPG-2 % y al medio de cultivo líquido se le adicionaron cada uno de los tratamientos de calcio evaluados. **A)** Se inocularon 5×10^5 esporas/mL de medio y se incubaron 8 h a 28 °C y a 150 rpm en una incubadora rotatoria. **B)** Se muestran fotografías representativas de la morfología de las células a las 4 h de germinación de cada uno de los tratamientos analizados. La barra de longitud en las fotografías corresponde a 20 μm , $n=3$, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, $*p<0.05$.

La morfología a las 4 horas de crecimiento de las células generadas en la condición control (en el medio Vogel sin calcio) y en la concentración de 50 μM de CaCl_2 , se observó que de las células madre emergió un único tubo germinativo, mientras que para el resto de las concentraciones de calcio evaluadas la célula madre presentaba de 2 hasta 4 tubos germinativos por célula. Además, el calcio también promovió el alargamiento de las hifas y su ramificación, esta última característica del crecimiento ausente en el crecimiento obtenido para el control.

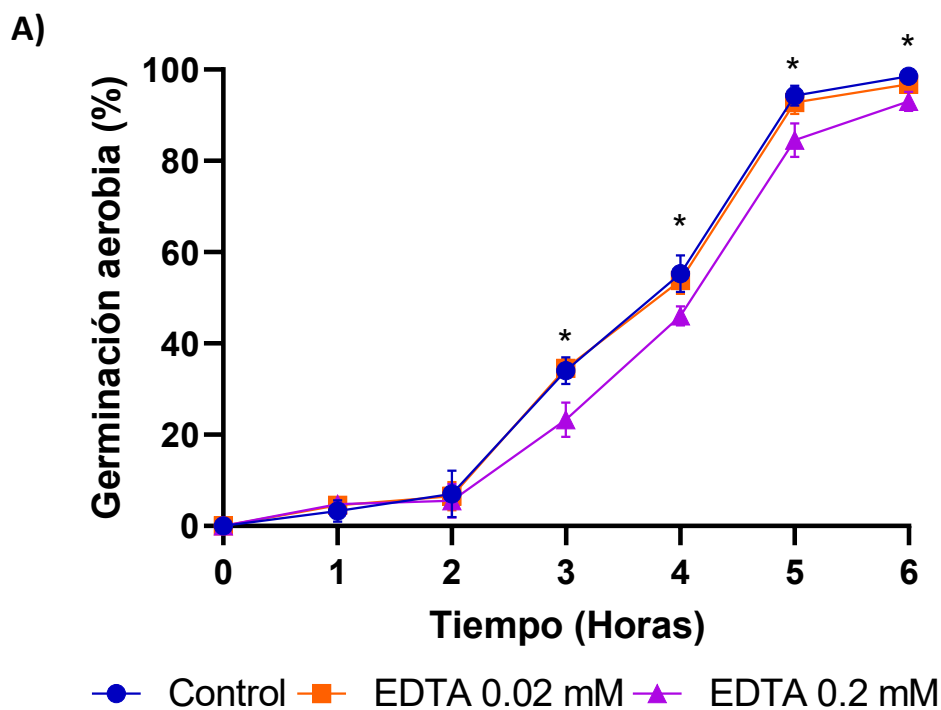
9.2.3 Evaluación de la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* obtenidas de placas suplementadas con EDTA

Debido a que el EDTA tuvo un efecto significativo ($*p<0.05$) en la disminución del crecimiento radial de este Mucoral, por lo que se probó su efecto en un sustrato líquido.

Se inocularon 5×10^6 de esporas de MU636 (fueron obtenidas de placas a las cuales se les había suplementado con la concentración deseada de EDTA) en 10 mL de medio líquido YPG-2 % y se incubaron durante 8 h a 28 °C y a 150 rpm en una incubadora rotatoria. Se tomaron muestras cada 2 h y después se observaron bajo el objetivo de 40x del microscopio. En la figura 20 se observan los resultados del experimento.



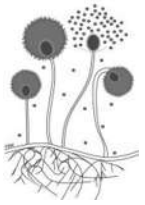
Se observó una disminución significativa ($*p<0.05$) en la velocidad de germinación de las esporas desde la hora 3 manteniéndose hasta el final del experimento de las esporas que fueron recolectadas de placas (medio sólido) a las que se les suplementó con 0.2 mM de EDTA. Para el tratamiento de 0.02 mM de EDTA se observó una velocidad de germinación similar a la del control durante todo el experimento. Además, se observó que los tratamientos con EDTA tienen la misma morfología que las células del control (Figura 20, B).



B)



Figura 20. Evaluación de la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* obtenidas de placas que fueron suplementadas con EDTA. A) Se muestra una curva representativa de la velocidad de germinación de las esporas tratadas con EDTA. Se inocularon 5×10^6 esporas en 10 mL de medio líquido YPG-

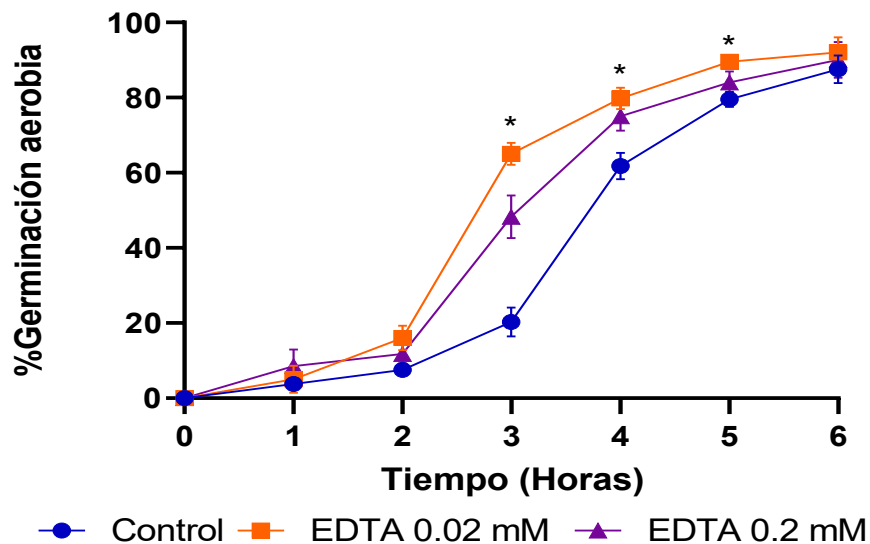


2 % y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. **B)** Imágenes representativas de la morfología de las células a la hora 4 de la germinación. La barra de longitud en las fotografías corresponde a 20 μ m, n = 3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, * $p < 0.05$.

9.2.4 Evaluación del efecto de la adición de EDTA al medio líquido en la velocidad de germinación de *M. lusitanicus*

Se observó que el suplementar las placas con EDTA al 0.2 mM resultó en una disminución significativa (* $p < 0.05$) en la velocidad de germinación de las esporas en medio líquido que recibieron dicho tratamiento comparado con el control (figura 20). El efecto de la adición del EDTA en el medio líquido directamente tuvieron un efecto significativamente mayor (* $p < 0.05$) sobre la velocidad de germinación de las esporas en comparación con el control (figura 21). En cuanto a la morfología de las células que germinaron, se pudo observar que la célula madre era más pequeña en los tratamientos con EDTA y solo presentaban un único tubo germinativo.

A)



B)



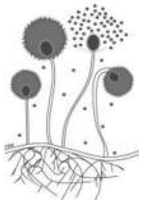


Figura 21. Evaluación del efecto que tiene el EDTA agregado al medio líquido sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus*. A) Velocidad de germinación de las esporas tratadas con 0.02 mM y 0.2 mM de EDTA. **B)** Imágenes representativas de la morfología de las células a la hora 4 de la germinación. Se inocularon 5×10^6 esporas en 10 mL de medio líquido YPG al 2 % de glucosa y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. La barra de longitud en las fotografías corresponde a 20 μm , $n = 3$, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, $*p < 0.05$.

En la siguiente figura (Fig. 22) se puede observar en el panel A, que la longitud de las hifas de MU636 tienen una longitud promedio de aproximadamente 21 μm y con el tratamiento de 0.02 mM de EDTA una longitud de 18 μm en promedio, que no fue significativo comparado con la del control, solo el tratamiento con 0.2 mM de EDTA mostró una reducción significativa en la longitud de la hifa (7 μm en promedio). En cuanto al número de hifas, se observó que ambos tratamientos con EDTA redujeron significativamente ($*p < 0.05$) el número de hifas por cada célula madre.

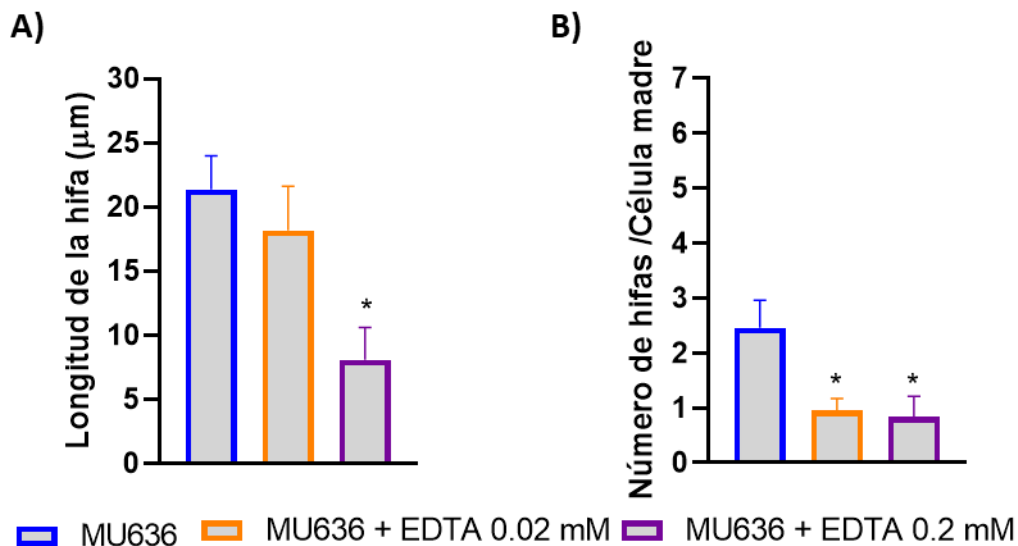
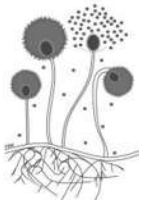


Figura 22. Efecto del EDTA sobre la longitud y el número de hifas de las células de *M. lusitanicus*. Se inocularon 5×10^6 esporas en 10 mL de medio líquido YPG-2 % y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. Para los tratamiento con EDTA se adicionó al cultivo el volumen necesario del stock para obtener concentraciones de la molécula



a 0.02 mM y 0.2 mM. Se realizaron las mediciones a la hora 4 de germinación. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

9.2.5 Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las mutantes en las subunidades beta y gama de *M. lusitanicus*

El crecimiento radial de las mutantes en subunidades beta y gama en el medio YPG-2 % mostraron un crecimiento similar al de la cepa silvestre, de igual manera cuando las placas fueron suplementadas con calcio, solo la mutante $\Delta gpg3$ mostró un crecimiento significativamente (*p<0.05) menor.

Con el objetivo de evaluar si este fenómeno se mantenía en medio líquido, se realizó el experimento usando las mutantes en subunidades beta y gama en condiciones de aerobiosis y suplementando el medio líquido con la concentración 4 mM de calcio, con la cual se observó un mayor efecto sobre el crecimiento radial en la cepa WT.

Los resultados de este experimento demostraron que las mutantes en las subunidades beta 1 y gama 1 tienen una ligera disminución en la velocidad de germinación y las mutantes restantes crecen de forma similar a la cepa silvestre (figura 23, panel A y B,). Con el tratamiento con calcio (C y D) se observó que $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ no responden al estímulo por la adición de calcio comparado con los datos obtenidos para la cepa WT, la mutante $\Delta gpg3$ disminuyó significativamente (*p<0.05) su velocidad de germinación y el resto de las mutantes aumentaron significativamente (*p<0.05) la velocidad de germinación como la cepa WT.

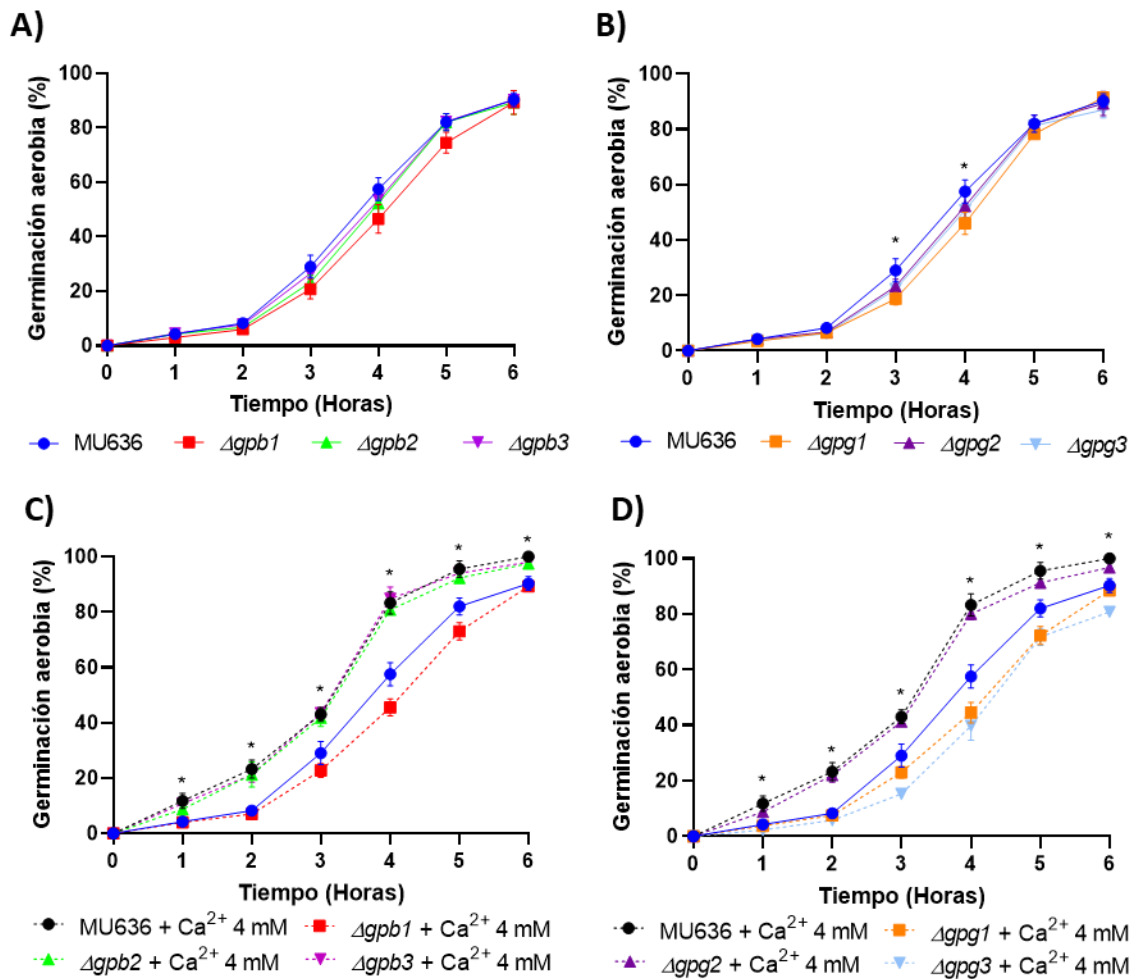
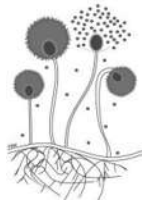
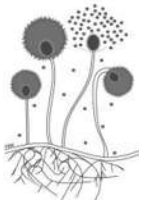


Figura 23. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en subunidades beta y gamma de *M. lusitanicus*. Se muestra la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en proteínas G heterotriméricas en 10 mL de medio líquido YPG-2 % suplementado con la concentración de 4 mM de $CaCl_2$. Se inocularon 5×10^6 esporas y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. n = 3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, * $p < 0.05$.

Cuando se usó el medio mínimo YNB-2 %, el cual es un medio que estimula el metabolismo oxidativo, se observó (Figura 24 panel A y B, control) que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ tuvieron una velocidad de germinación significativamente menor (* $p < 0.05$) en comparación con los datos de la cepa WT y el resto de las mutantes. La velocidad de germinación para todas las cepas usadas disminuyó en comparación de los resultados obtenidos en el medio YPG-2 %. Al suplementar el



medio YNB-2 % con 4 mM de CaCl_2 , se observó un aumento significativo ($*p < 0.05$) en la velocidad de germinación (Figura 22 panel C y D) de la cepa silvestre y las cepas $\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$ y $\Delta gpg2$. Las cepas $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ no respondieron al estímulo por calcio en este medio. Interesantemente, la cepa en $\Delta gpg3$ disminuyó significativamente ($*p < 0.05$) su velocidad de germinación en comparación de la condición sin tratamiento o respecto a la cepa WT.

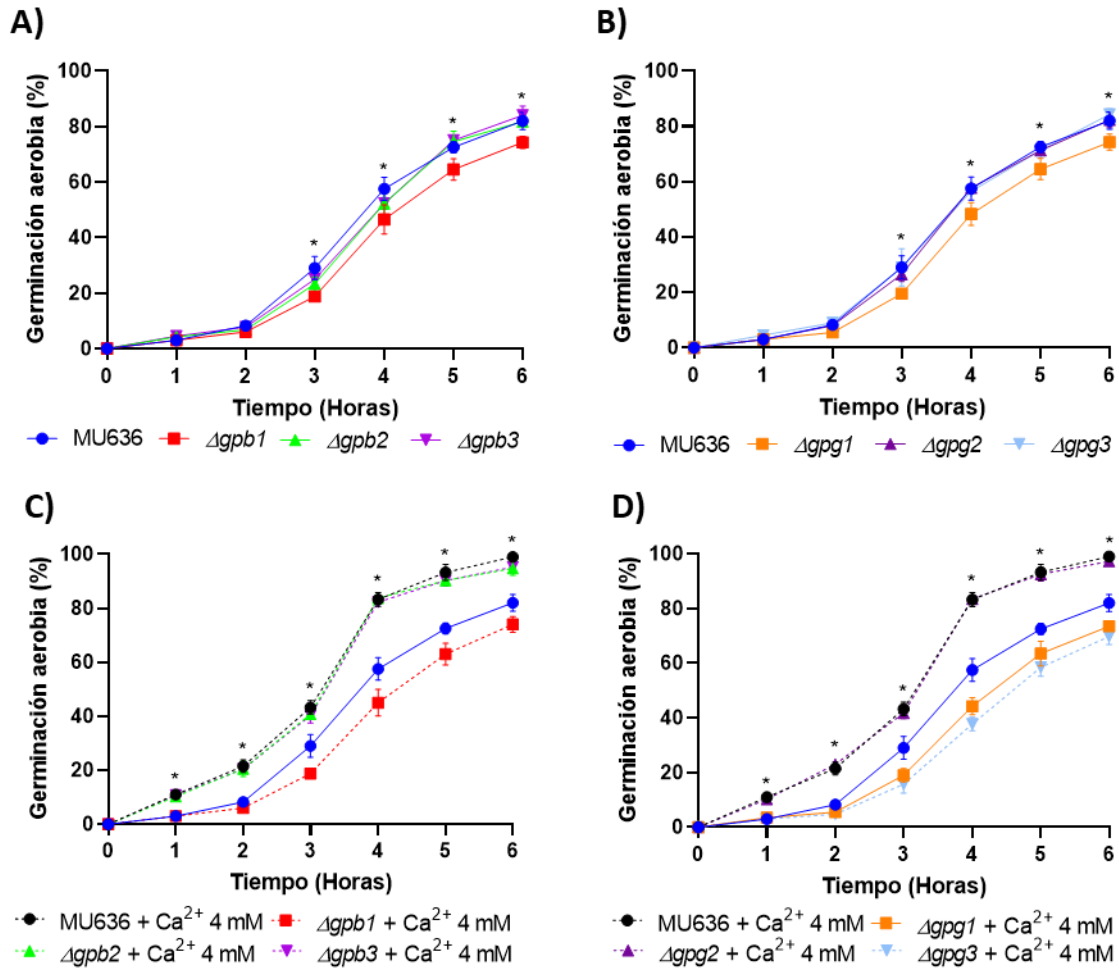
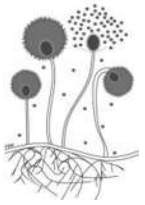


Figura 24. Efecto del calcio sobre la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en subunidades beta y gama de *M. lusitanicus*. Se muestra la velocidad de germinación de las esporas de las mutantes en proteínas G heterotriméricas en 10 mL de medio líquido YNB-2 % suplementado con la concentración de 4 mM de CaCl_2 . Se inocularon 5×10^6 esporas y se incubaron a 28



°C a 150 rpm. n = 3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

9.2.6 Efecto del calcio en el crecimiento micelial (biomasa) en condiciones de aerobiosis de *M. lusitanicus*

Debido a que el calcio promovió el crecimiento radial *M. lusitanicus* (figura 11 y 12, crecimiento radial) y con la finalidad de demostrar que el calcio genera un efecto similar en un medio líquido, se realizó el experimento de generación de biomasa, en el que se cuantificó el crecimiento micelial en YPG-2 % y YNB-2 %. En ambos medios de cultivo se observó un efecto positivo en el aumento de la generación de biomasa desde la concentración de 0.5 mM de CaCl₂, siendo más evidente en YPG-2 % en la concentración más alta de calcio usada (4 mM) en comparación con el control, este efecto positivo se observó desde las primeras horas de crecimiento y se mantuvo a lo largo del experimento (figura 25).

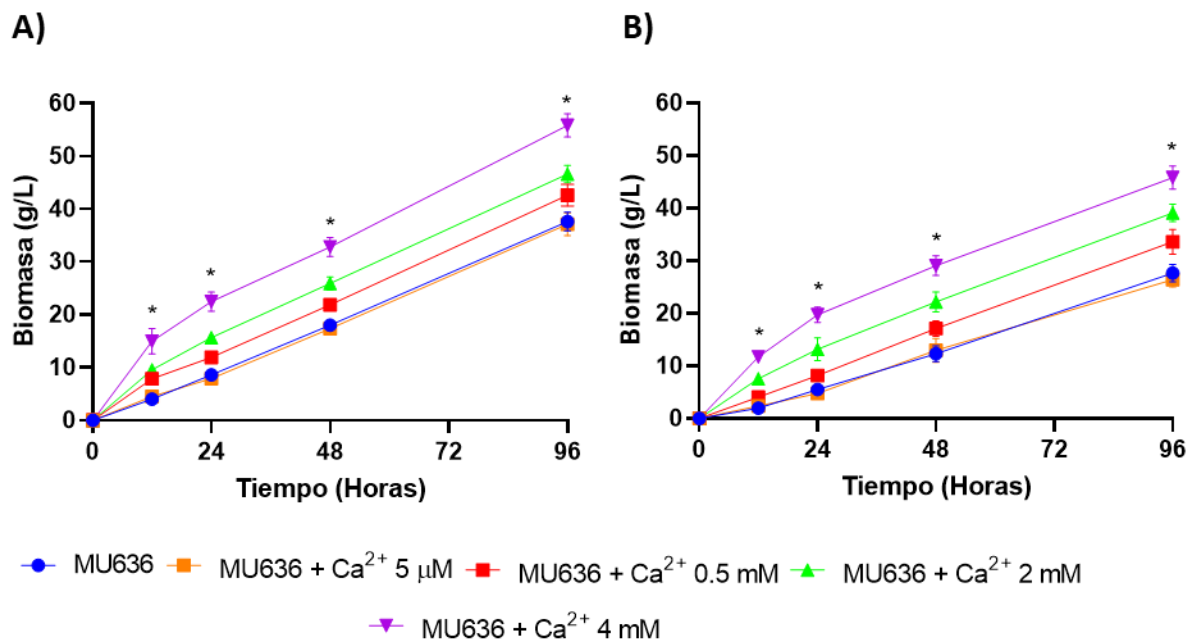
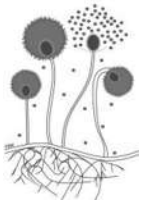


Figura 25. Efecto del calcio en la generación de biomasa de *M. lusitanicus* durante el crecimiento micelial en medio rico y medio mínimo. Se inocularon



12.5×10^6 de esporas en 20 mL de medio líquido y se incubaron a 28 °C a 150 rpm. **A)** Medio YPG-2 % (medio rico). **B)** Medio YNB-2% (Medio mínimo). Para los tratamientos con calcio se adicionó al cultivo el volumen necesario del stock para obtener las concentraciones de 5 μ M, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

9.2.7 Función de las subunidades beta y gama de las proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en el crecimiento aeróbico (biomasa) en presencia de calcio

Con el objetivo de elucidar si las proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* participan en la generación de biomasa en presencia de calcio, se hizo uso de las mutantes en los genes que codifican a estas proteínas y se crecieron en YPG-2 % y YNB-2 %. Se observó que las mutantes en subunidades beta 1 y gama 1 generaron una menor biomasa comparado con la cepa WT, siendo significativamente menor (*p<0.05) su crecimiento y además no respondieron al estímulo por calcio a ninguna de las concentraciones de calcio evaluadas a comparación de la cepa silvestre y al de las mutantes sin tratamiento con calcio (figura 26). La cepa WT y las demás mutantes tuvieron una producción de biomasa muy similar a las condiciones mencionadas. Con los tratamientos con calcio, la cepa WT respondió significativamente (*p<0.05) aumentando la producción de biomasa en presencia de calcio, al igual que también lo hicieron las mutantes en las subunidades beta 2, beta 3 y gama 2, siendo muy parecido al de la cepa WT y mayor si se comparan al de la biomasa producida por las mutantes sin el tratamiento con calcio. La mutante en la subunidad gama 3 disminuyó significativamente (*p<0.05) la generación de biomasa cuando fue tratada con calcio a diferencia de la condición sin tratamiento con calcio o de la cepa WT.

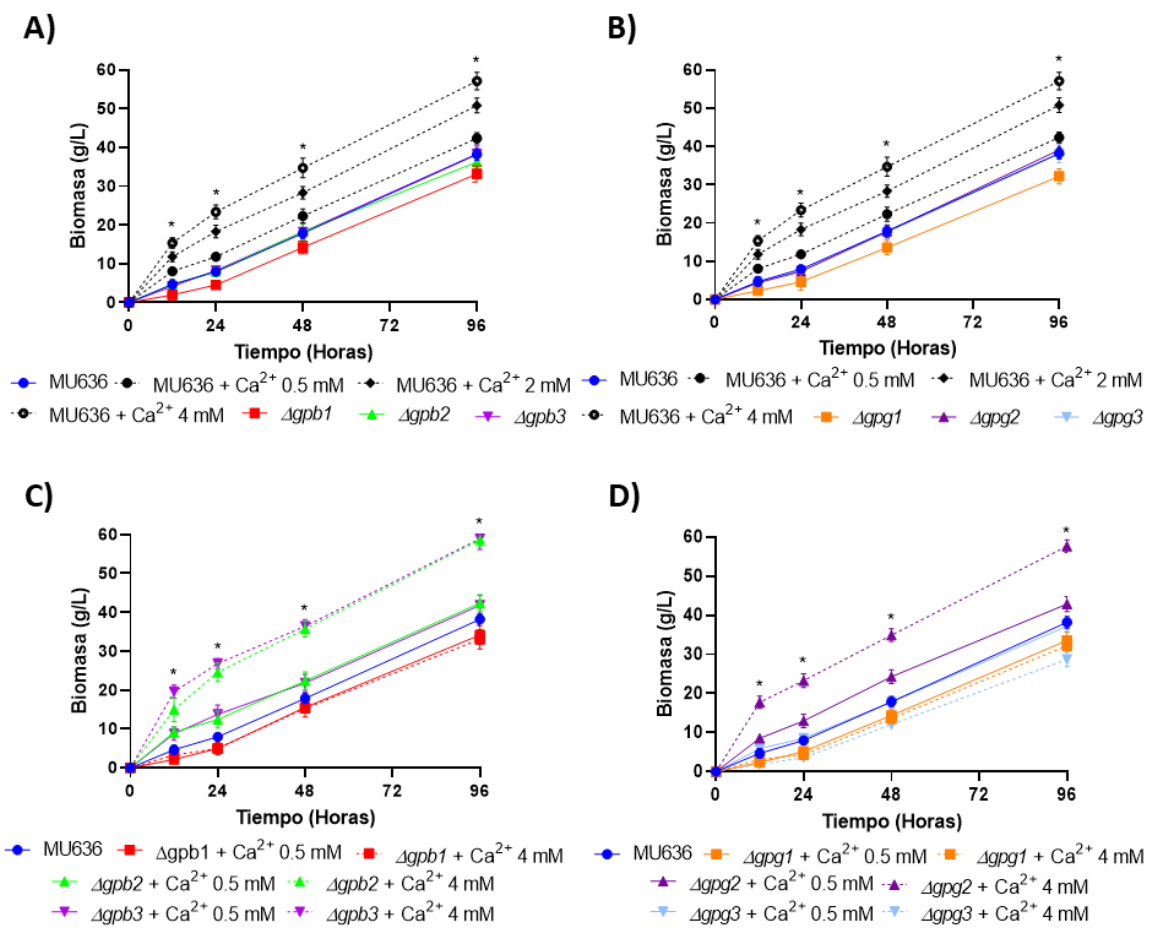
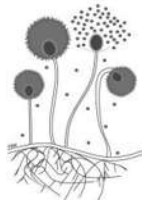
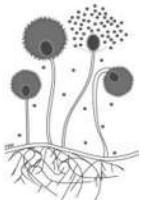


Figura 26. Efecto del calcio en la generación de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gamma de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* durante el crecimiento micelial en medio rico. Se inocularon 12.5×10^6 de esporas en 20 mL de medio líquido YPG al 2 % de glucosa y se incubaron a 28 °C a 150 rpm, se obtuvo la biomasa a distintos tiempos. **A) y B)** Biomasa obtenida para las mutantes en subunidades beta y cepa WT. **C) y D)** Biomasa obtenida para las mutantes en subunidades gamma y cepa WT con los tratamientos con calcio (5 μ M, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM, se muestra en líneas de color negro punteadas). n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

De igual forma, se evaluó la generación de biomasa de las mutantes en proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en el medio mínimo YNB-2 % y a las mismas condiciones de crecimiento que en el experimento anterior. En la figura 27 se puede observar que el comportamiento de las mutantes y de la cepa WT es muy similar a



los resultados obtenidos en el medio rico YPG-2 % con y sin tratamiento con calcio, sin embargo, en este medio se pudo observar que el crecimiento y por ende la generación de biomasa fue menor.

Estos resultados sugieren que las subunidades beta 1 y gama 1 son necesarias para el crecimiento aerobio micelial, el cual es estimulado por la adición de calcio extracelular.

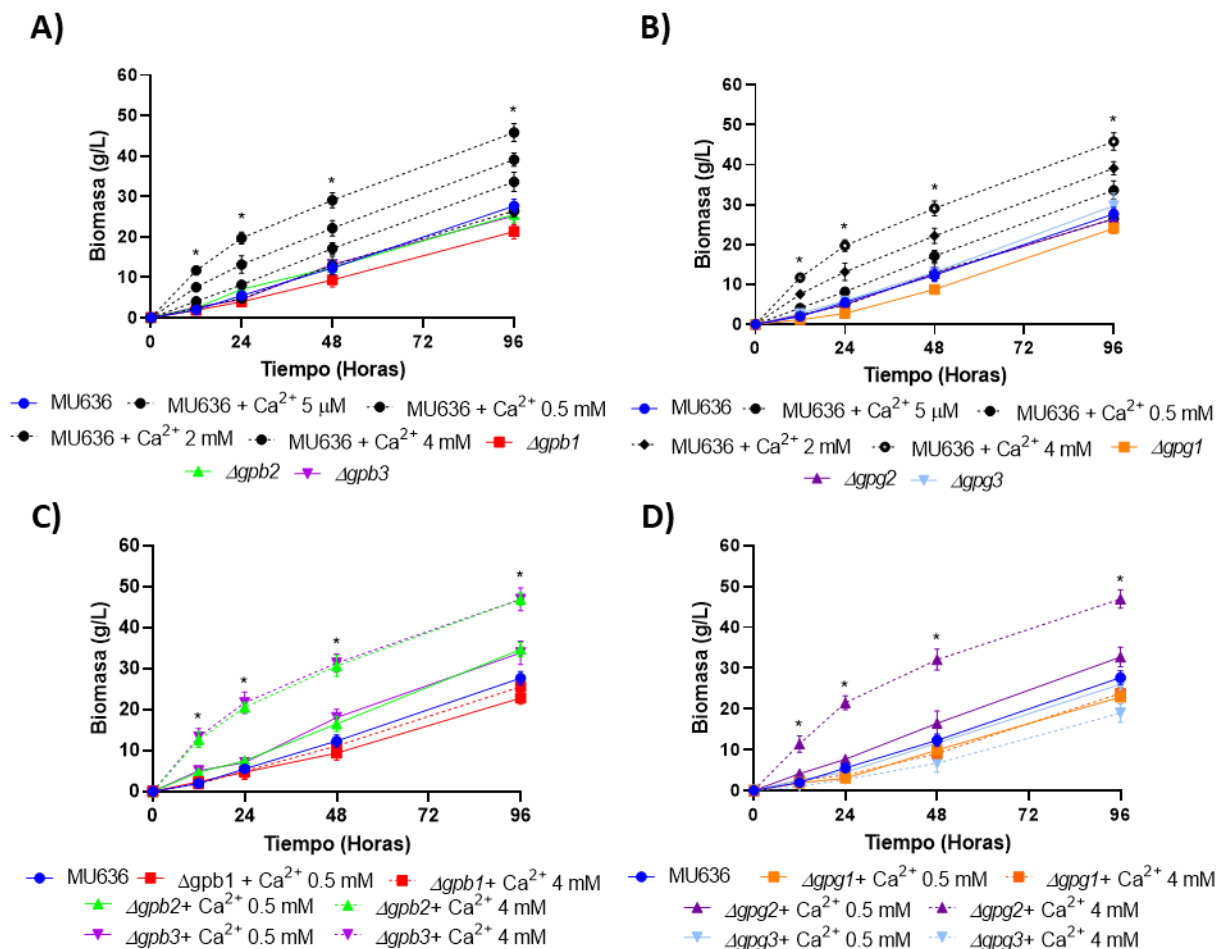
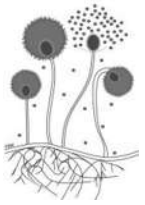


Figura 27. Efecto del calcio en la generación de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* durante el crecimiento micelial en medio mínimo. Se inocularon 12.5×10^6 de esporas en 20 mL de medio líquido YNB-2 % y se incubaron a 28 °C a 150 rpm, se obtuvo la biomasa a distintos tiempos. **A) y **B)** Biomasa obtenida para las mutantes**



en subunidades beta y cepa WT. **C) y D)** Biomasa obtenida para las mutantes en subunidades gama y cepa WT con los tratamientos con calcio (5 μ M, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM, se muestra en líneas de color negro punteadas). n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

9.2.8 Efecto del calcio en la morfología de *M. lusitanicus* creciendo a bajas concentraciones de oxígeno

Cuando los matraces se agitan a 150 rpm (14.4 ± 1.2 % de oxígeno), la morfología resultante de *M. lusitanicus* es completamente de hifas (100 %); mientras que, a bajas concentraciones de oxígeno, se generó una mezcla de morfologías, entre 80 % hifas y 20 % de levaduras aproximadamente (Valle-Maldonado et al., 2020). Dados estos antecedentes, se prosiguió a evaluar el efecto que podría tener el calcio extracelular sobre el crecimiento micelial de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno. El crecimiento a 40 rpm (4.9 ± 0.45 %) mostró que la cepa WT generó alrededor de un 58 % de hifas y aproximadamente un 42 % de levaduras (figura 28, panel A)

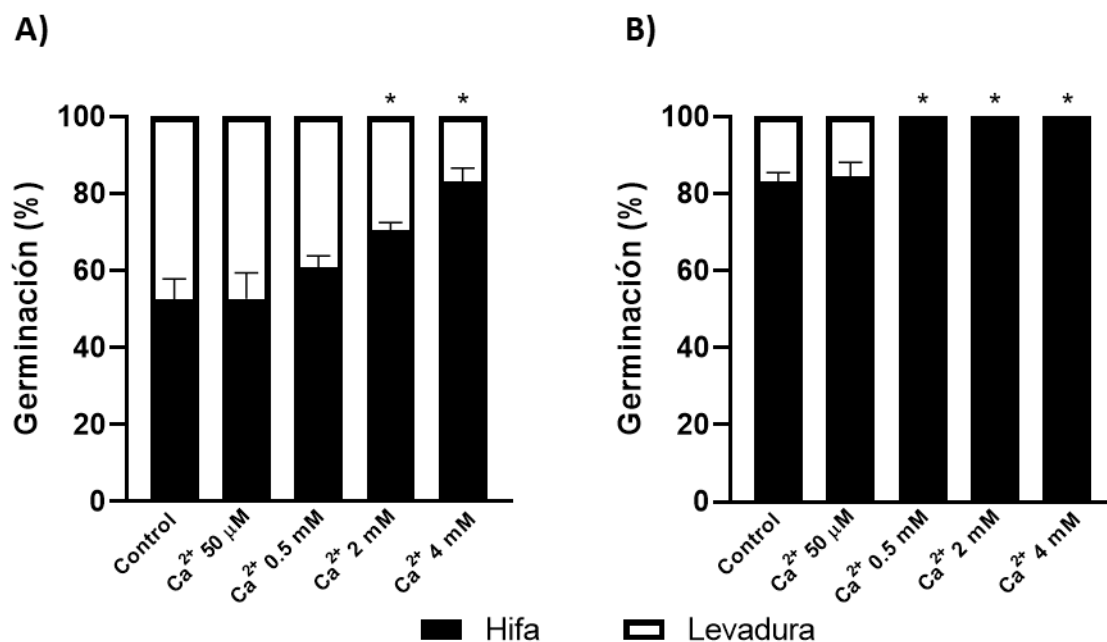




Figura 28. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio líquido YPG-2 % (control), y se probaron las concentraciones de calcio y se incubaron a 28 °C a **A)** 40 rpm y a **B)** 50 rpm durante 6 h, al finalizar el experimento se tomaron alícuotas y se fijaron con formol y posteriormente se contaron 100 células (hifas y levaduras) bajo el objetivo de 40x del microscopio óptico. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

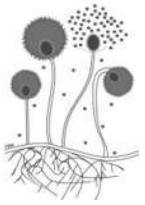
La adición de calcio a 40 rpm mostró un aumento significativo (*p<0.05) en la morfología hifal desde la concentración de 2 mM y 4 mM de CaCl₂ en las que se obtuvo aproximadamente un 70 % y 80 % de dicha morfología, respectivamente, comparado con el 58 % de hifas en la ausencia de calcio.

En el panel B se puede observar que la agitación a 50 rpm (7.3 ± 0.56 % de oxígeno), generó alrededor de un 82 % de hifas y aproximadamente un 18 % de levaduras en la cepa WT, lo que coincide con lo reportado por Valle-Maldonado et al. (2020). Se observó que la adición de 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl₂ indujeron un aumento significativo de hifas (100 %), comparado con el 80 % de la condición control. Además, la adición de calcio a 50 rpm generó un mayor porcentaje de hifas en *M. lusitanicus*, que las observadas a 40 rpm.

Estos datos sugieren que el CaCl₂ ejerce un efecto positivo en el crecimiento hifal de *M. lusitanicus* aún a bajas concentraciones de oxígeno y su efecto aumentó cuando la concentración de oxígeno presente en el medio también aumentó.

9.2.9 Efecto las subunidades beta y gama de las proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en la morfología generada a bajas concentraciones de oxígeno en presencia de calcio

Se prosiguió a evaluar el efecto que podría tener el calcio extracelular sobre las mutantes en los genes que codifican a las subunidades de las proteínas G heterotriméricas a bajas concentraciones de oxígeno, usando la concentración de 4



mM de CaCl_2 . Las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ crecieron de manera similar a la cepa WT en medio rico YPG-2 % a una tensión de oxígeno de 4.9 ± 0.45 % en la que generaron una mezcla de morfologías (aproximadamente 60 % hifas y 40 % levaduras). Por otro lado, las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ tuvieron un crecimiento significativamente menor ($*p < 0.05$) de la forma micelial comparado con el de la cepa WT; solo generaron un 37 % de la forma micelial y un 63 % de la forma levaduriforme. Las mutantes $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ mostraron un ligero aumento que fue significativo ($*p < 0.05$) en la germinación de tipo hifal (70 %) comparado con el valor de la cepa WT (60 %) (figuras 29 y 30).

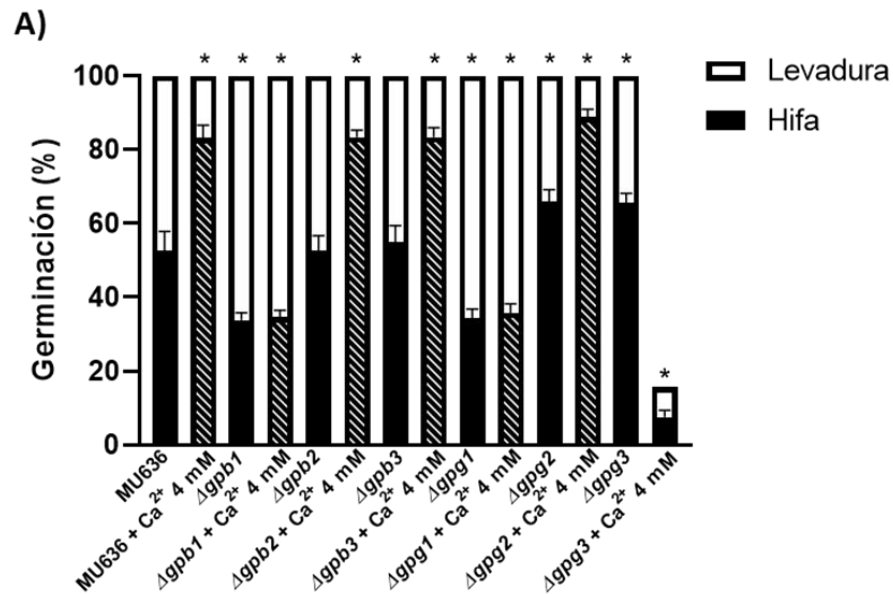
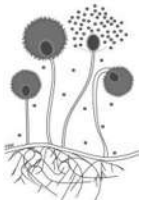
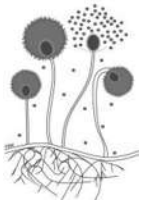


Figura 29. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de las mutantes en subunidades beta y gama de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno. A) Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio líquido YPG-2 % (control) y como tratamiento con calcio se usó la concentración de 4 mM y se incubaron a 28 °C a 40 rpm durante 6 h, al finalizar el experimento se tomaron alícuotas y se fijaron con formol y posteriormente se contaron 100 células (hifas y levaduras) bajo el objetivo de 40x del microscopio óptico. $n=3$, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, $*p < 0.05$.



La adición de 4 mM de CaCl_2 y al mantener la tensión de oxígeno a 4.9 ± 0.45 % (40 rpm) se observó que las cepas $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ respondieron de manera positiva y significativa ($*p < 0.05$) al estímulo por calcio, al igual que lo hizo la cepa WT, generando un aumento del 40 % en la morfología hifal (80 % total), comparado a un 60 % cuando el calcio no está presente. La cepa $\Delta gpg2$ tuvo un ligero aumento que fue significativo ($*p < 0.05$) en la proporción de hifas (90 %) comparado con el 70 % sin calcio, mientras que la cepa WT generó en presencia de calcio un 80 %. Las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ no respondieron al estímulo por calcio bajo estas condiciones, manteniendo la misma mezcla de morfologías que cuando dichas mutantes no recibieron el tratamiento con calcio (37 % de hifas y 63 % de levaduras). La mutante en $\Delta gpg3$ redujo significativamente la generación de ambas morfologías cuando se adiciona calcio, generando aproximadamente un 7 % de hifas y un 5 % de levaduras (el resto de las esporas no germinó); en comparación con la ausencia de calcio o respecto con la cepa WT con y sin adición de calcio.

El crecimiento de las cepas $\Delta gpb2$ y $\Delta gpb3$ en YPG-2 % con una tensión de oxígeno de 7.3 ± 0.56 % (50 rpm) crecieron de manera similar al de la cepa WT, generando una mezcla de morfologías correspondiente a un 80 % de hifas y un 20 % de levaduras aproximadamente en cada caso. Mientras que, en el tratamiento con calcio, generaron un 100 % de la morfología de tipo hifal (figura 30). Nuevamente, bajo estas condiciones de crecimiento, las cepas $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ tuvieron un ligero aumento significativo en la generación de la morfología hifal (96 %) comparado con el valor obtenido para la cepa WT. Por otro lado, las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ bajo estas condiciones de crecimiento generaron una mezcla de morfologías de aproximadamente un 55 % de la forma micelial y un 55 % de la forma levaduriforme, y al recibir el tratamiento con calcio se mostraron insensibles a este estímulo, generando el mismo porcentaje de morfologías, y en ambos casos, su crecimiento fue significativamente menor comparado al del control. La mutante en $\Delta gpg3$ generó aproximadamente un 96 % de la forma micelial y un 4 % de la forma levaduriforme y cuando recibió el tratamiento con calcio, su crecimiento disminuyó significativamente ($*p < 0.05$) si se le compara a cuando no recibió el tratamiento y



con el control y el control con tratamiento, generando aproximadamente un 8 % de hifas y un 6 % de levaduras (el resto de las esporas no germinó).

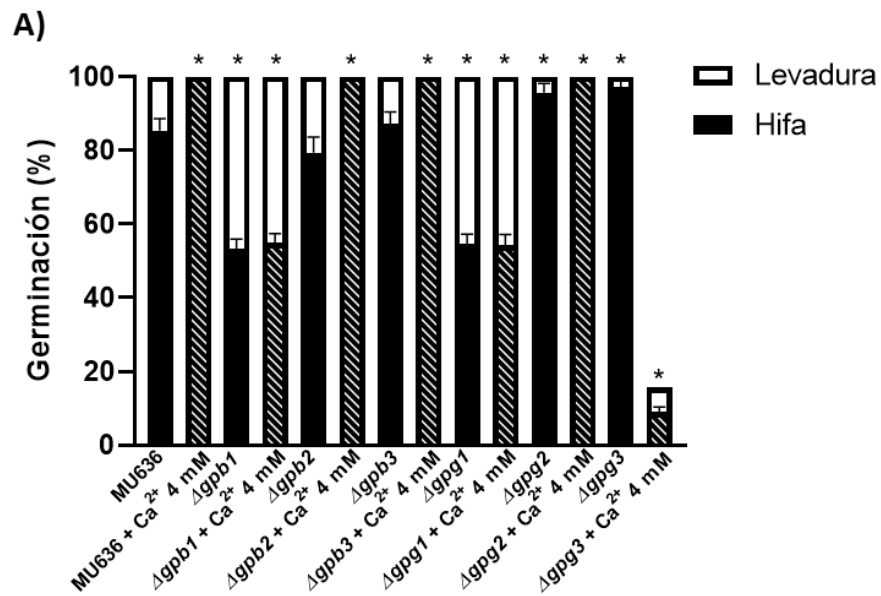


Figura 30. Efecto del calcio sobre la morfología de crecimiento de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno. A) Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio líquido YPG al 2 % de glucosa (control) y como tratamiento con calcio se utilizó la concentración de 4 mM y se incubaron a 28 °C a **50 rpm** durante 6 h, al finalizar el experimento se tomaron alícuotas y se fijaron con formol y posteriormente se contaron 100 células (hifas y levaduras) bajo el objetivo de 40x del microscopio óptico. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

Hasta este punto, los resultados en conjunto sugieren que a las primeras horas de crecimiento (de forma general, las primeras 6 h) el calcio extracelular adicionado al medio de cultivo tuvo un efecto positivo en la velocidad de germinación de las esporas y en la longitud de la hifa durante el crecimiento aeróbico de la cepa WT de *M. lusitanicus*, ya sea el medio rico o un medio mínimo. Además, las mutantes en los genes que codifican a las proteínas Gpb1 y Gpg1 no respondieron al estímulo por calcio. Mientras que la mutante en $\Delta gpg3$ disminuyó su crecimiento micelial



durante los tratamientos con calcio, y el resto de las mutantes en estas proteínas se comportaron como la cepa WT independientemente de la adición de calcio.

9.3 Efecto de la adición de calcio durante el cultivo de *M. lusitanicus* en algunos parámetros del metabolismo oxidativo mitocondrial.

Los resultados anteriores, mostraron que el calcio tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento hifal de la cepa WT y en algunas mutantes en las subunidades de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*; sugiriendo que el aumento en el crecimiento micelial podría correlacionar con el aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial.

Para comprobar esto, se evaluó el consumo de oxígeno y la producción de ERO haciendo uso de condiciones de crecimiento que promueven el metabolismo oxidativo mitocondrial de este hongo, como una baja concentración de glucosa (0.1 %) y una fuente de nitrógeno no orgánico o una fuente de carbono no fermentable como el glicerol (Alejandre-Castañeda et al., 2022; Patiño-Medina et al., 2025).

9.3.1 Efecto de la adición de calcio en la velocidad de germinación aerobia de *M. lusitanicus* usando distintas fuentes de carbono

Se evaluó la velocidad de germinación en dos medios mínimos, el medio YNB-0.1 %, el cual contiene bajas concentraciones de glucosa y el medio YNG (Yeast, Nitrogen, Glicerol) al 111 mM, el cual contiene como fuente de carbono no fermentable al glicerol a una concentración equimolar al 2 % de glucosa usado en el medio estándar YPG-2 %.

Se observó que las concentraciones de 2 mM y 4 mM de CaCl_2 tuvieron un efecto significativo ($*p < 0.05$) sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en el medio YNB-0.1 % desde el primer (hora 2) y último tiempo (hora 8) evaluados al ser comparadas con el porcentaje de la velocidad de germinación de la cepa WT que no recibió un tratamiento con calcio. Las concentraciones de calcio



inferiores no tuvieron un efecto sobre este parámetro y a estas condiciones de crecimiento (Figura 31, panel A).

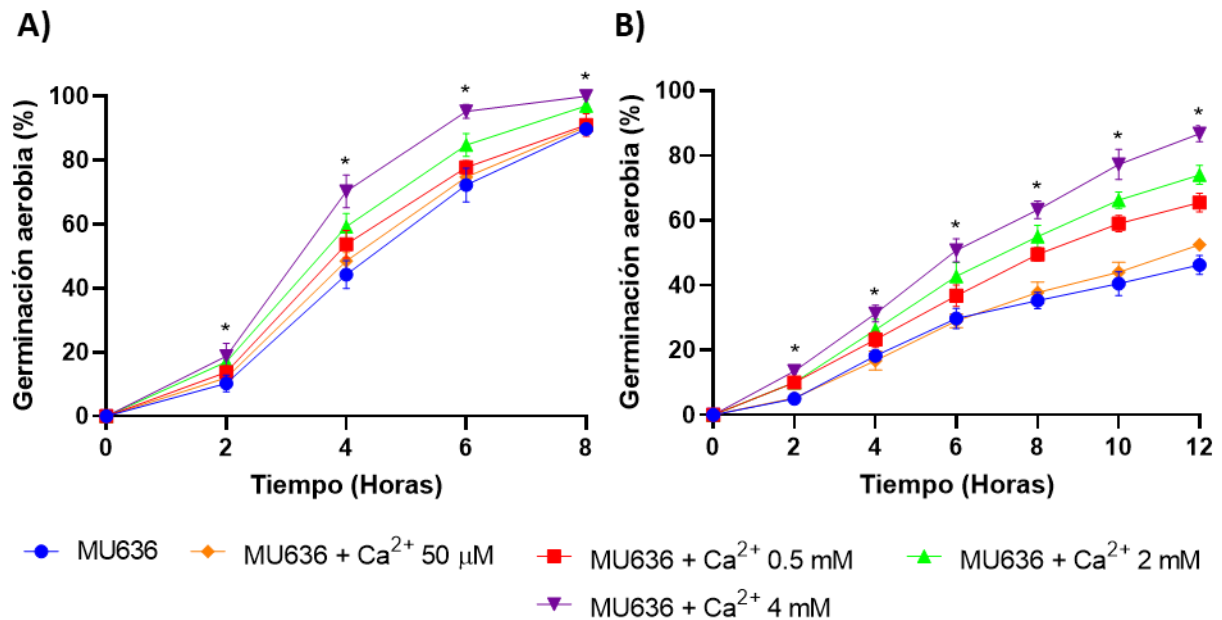
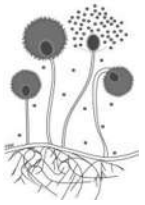


Figura 31. Efecto del calcio extracelular sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* usando una fuente carbono fermentable y una no fermentable. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de **A)** medio YNB-0.1 % y en 10 mL de **B)** medio YNG-111 mM, como tratamientos con calcio se evaluaron las concentraciones de 50 μ M, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl₂ y se incubaron a 28 °C a 150 r.p.m. durante 8 o 12 h, al finalizar el experimento se tomaron alícuotas y se fijaron con formol y posteriormente se contaron 100 células (hifas y esporas/células hinchadas) bajo el objetivo de 40x del microscopio óptico. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

Por otro lado, se observó que la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en el medio YNG-111 mM suplementado con las concentraciones de 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl₂ tuvieron un efecto significativo (*p<0.05) sobre este parámetro desde el primer tiempo evaluado (hora 2) y hasta el final del experimento (hora 12) comparado con los resultados obtenidos para la cepa WT que no recibió el tratamiento con calcio (Figura 31, panel B). En este medio también fue evidente



que la fuente de carbono condiciona la velocidad de germinación, ya que esta fue significativamente menor ($*p > 0.05$) al usar una fuente de carbono no fermentable (glicerol, panel B), que cuando se usa una fuente de carbono fermentable (panel A) como la glucosa.

También se evaluó la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en el medio Vogel suplementado con una fuente de carbono fermentable como es glucosa al 0.1 % (Vogel-0.1 %) y con una fuente de carbono no fermentable como es el glicerol al 111 mM (VG-111 mM), esto para controlar la cantidad de calcio presente en el medio. Los resultados se muestran en la siguiente figura (Fig. 32).

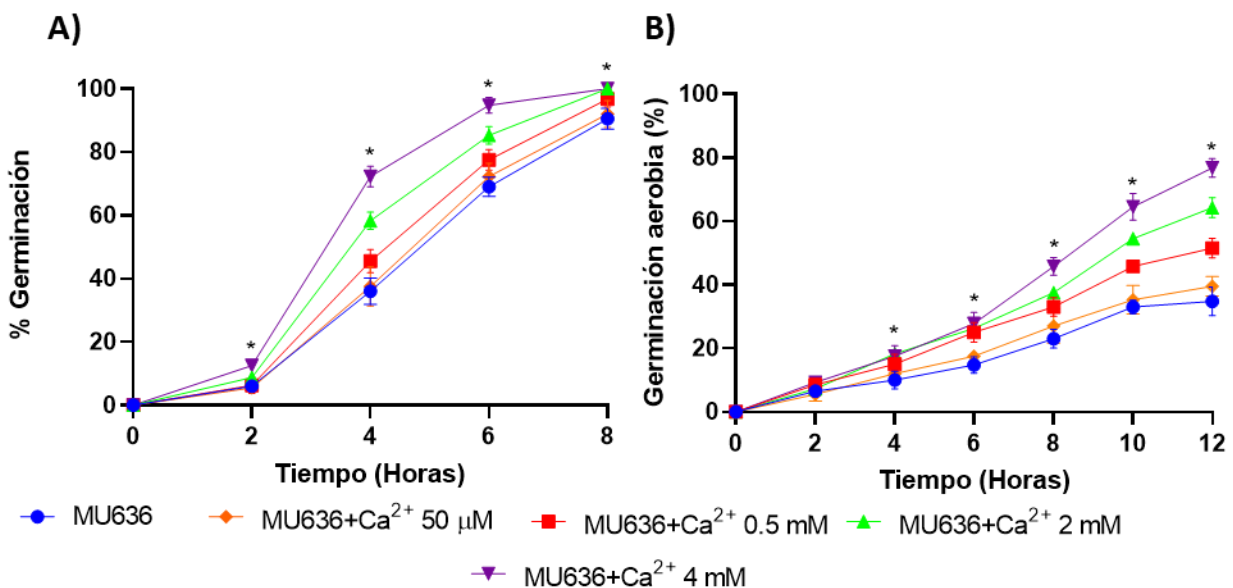
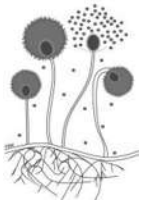


Figura 32. Efecto del calcio extracelular sobre la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* usando una fuente carbono fermentable y una no fermentable en medio Vogel. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de **A)** medio Vogel-0.1 % y en 10 mL de **B)** medio VG-111 mM, como tratamientos con calcio se evaluaron las concentraciones de 50 μM, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl₂ y se incubaron a 28 °C a 150 r.p.m. durante 8 o 12 h, al finalizar el experimento se tomaron alícuotas y se fijaron con formol y posteriormente se contaron 100 células (hifas y esporas/células hinchadas) bajo el objetivo de 40x del microscopio óptico. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, $*p < 0.05$.



Los resultados de estos experimentos mostraron datos muy similares a los obtenidos bajo las mismas condiciones para el medio YNB-0.1 % y para el medio YNG-111 mM. En ambos medios, se apreció un aumento significativo ($*p<0.05$) de la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* al ser suplementados con calcio, siendo mucho más evidente en el medio suplementado con glicerol, el cual es un sustrato que se usó para condicionar el metabolismo oxidativo mitocondrial.

9.3.2 Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa de las mutantes en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en presencia de una fuente de carbono no fermentable

Los datos previos mostraron que el calcio estimuló significativamente ($*p<0.05$) la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus* en los tres medios mínimos, siendo mucho más evidente su efecto en el medio que contenía glicerol al 111 mM, desde la concentración de 0.5 mM, por lo que para el siguiente experimento se usó esta concentración.

Este experimento se realizó con el fin de conocer si el calcio mantiene su efecto a tiempos mayores de 8 horas, tiempo en el que se da paso al crecimiento vegetativo de tipo hifal, favorecido por un metabolismo oxidativo y en el que en teoría todas las esporas inoculadas en el medio ya han germinado, y además para saber qué proteínas G heterotriméricas están implicadas en este proceso estimulado por calcio. En los paneles A y C de la figura 33 se puede observar que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ en el medio YNG-111 mM presentan un crecimiento significativamente ($*p<0.05$) menor comparado con el crecimiento de la cepa WT de *M. lusitanicus*.

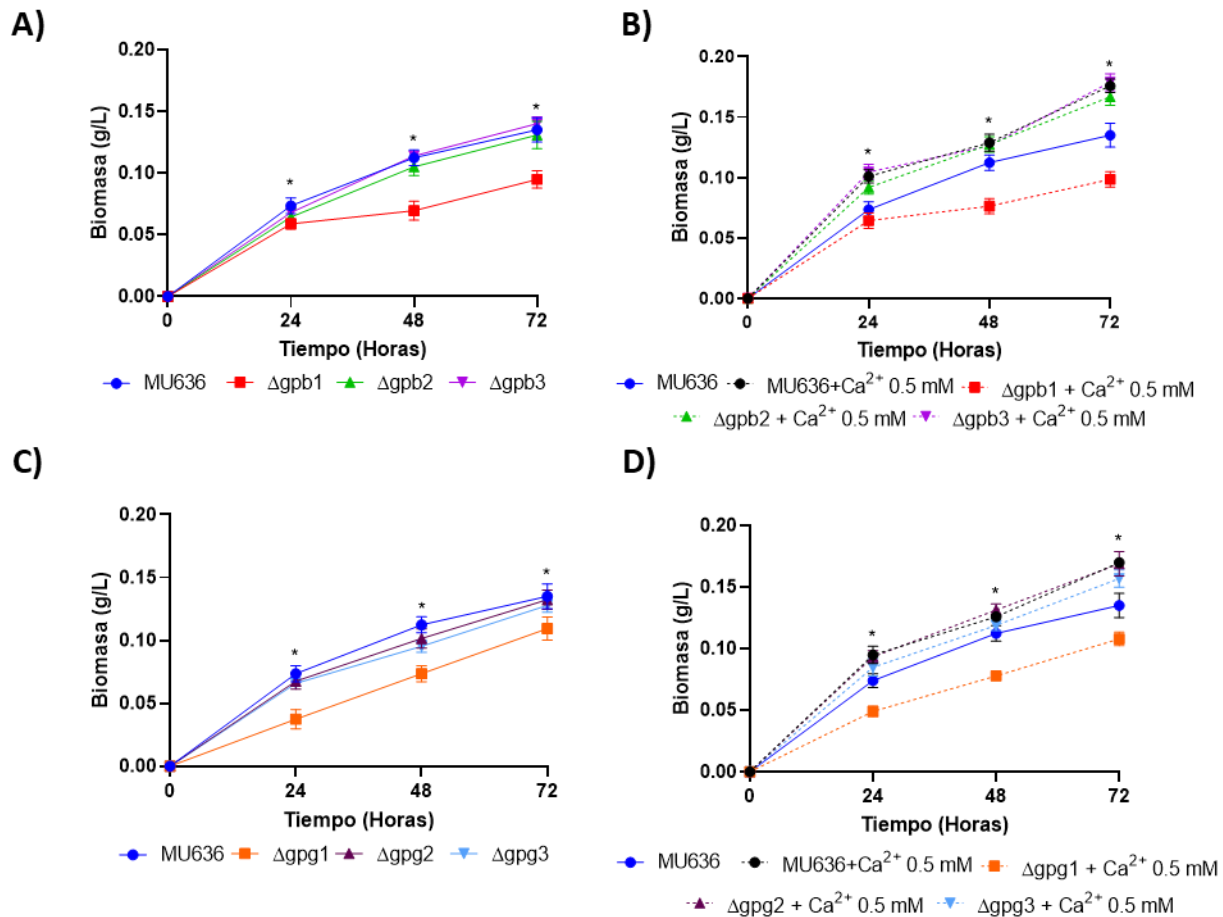
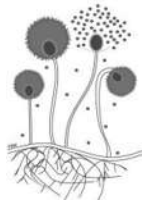


Figura 33. Efecto de la adición de calcio sobre la producción de biomasa de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando una fuente de carbono no fermentable. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio mínimo YNG-111 mM y como tratamiento con calcio se evaluó la concentración de 0.5 mM de CaCl_2 y se incubaron a 28 °C a 150 rpm durante 24, 48 y 72 h, al finalizar cada tiempo de crecimiento, se filtró y se recolectó la biomasa, se secó y se pesó. **A)** Mutantes en subunidades beta de *M. lusitanicus*. **B)** Mutantes en subunidades beta más el tratamiento con calcio. **C)** Mutantes en subunidades gama. **D)** Mutantes en subunidades gama más el tratamiento con calcio. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

Las demás mutantes (Paneles A y C) se comportaron de manera muy similar a la cepa WT y no se observaron cambios significativos en la producción de biomasa. Al recibir el tratamiento de 0.5 mM de CaCl_2 (Paneles B y D) las mutantes $\Delta gpb1$ y



Δgpg1 se mostraron insensibles y su crecimiento fue menor comparado con el de la cepa WT que recibió el tratamiento con calcio y la cual mostró un crecimiento significativo mayor (* $p < 0.05$) y también al compararlo con los resultados obtenidos para la misma sin el tratamiento con calcio. El resto de las mutantes (Paneles B y D) mostraron un crecimiento significativo mayor (* $p < 0.05$) comparado con sus mutantes respectivas que no fueron tratadas con calcio (Paneles A y C) y fue muy similar al crecimiento obtenido para la cepa WT que recibió el tratamiento con calcio.

Estos datos sugieren que las mutantes *Δgpb1* y *Δgpg1* son necesarias para percibir el estímulo por calcio extracelular en un medio mínimo que favorece la actividad mitocondrial.

Por otro lado, los resultados obtenidos para el crecimiento en el medio VG-111 mM suplementado con la concentración de CaCl_2 de 0.5 mM (figura 34), no mostraron un cambio significativo (* $p < 0.05$) en el aumento o descenso de la producción de biomasa en la mayoría de las cepas evaluadas, sólo fue de notar que las mutantes en *Δgpb1* y *Δgpg1* crecen menos significativamente (* $p < 0.05$) que la cepa WT; lo que sugiere por los resultados de otros experimentos, que la concentración de calcio evaluada (0.5 mM) no fue suficiente para lograr estimular este parámetro fisiológico. Haciendo énfasis en que este medio (Vogel) no tiene calcio *per se*.

Se repitió el experimento, pero ahora la concentración de calcio evaluada en la producción de biomasa en el medio VG-111 mM fue de 4 mM de CaCl_2 . Los resultados se muestran en la siguiente figura (Fig. 35).

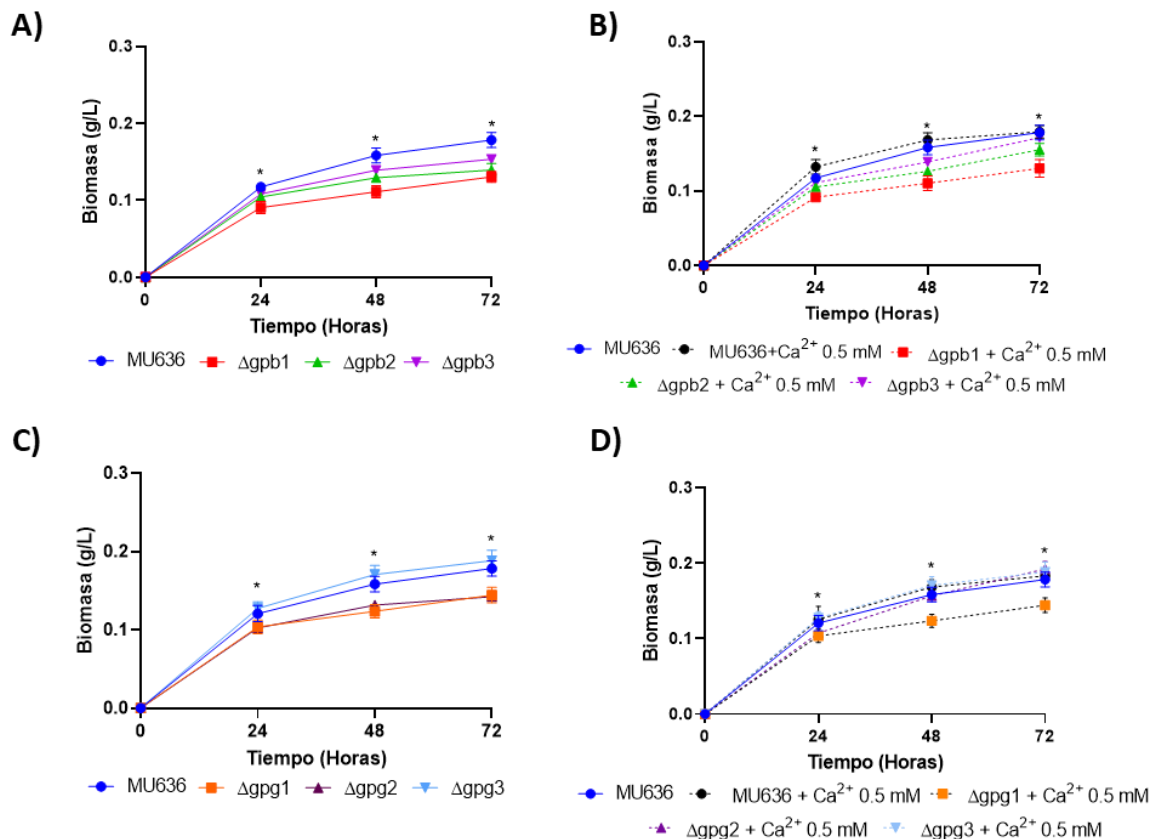
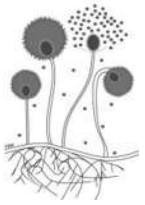


Figura 34. Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa en condiciones de aerobiosis de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando una fuente carbono no fermentable. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio mínimo VG al 111 mM y como tratamiento con calcio se evaluó la concentración de 0.5 mM de CaCl_2 y se incubaron a 28 °C a 150 rpm durante 24, 48 y 72 h, al finalizar cada tiempo de crecimiento, se filtró y se recolectó la biomasa, se secó y se pesó. **A)** Mutantes en subunidades beta de *M. lusitanicus*. **B)** Mutantes en subunidades beta más el tratamiento con calcio. **C)** Mutantes en subunidades gama. **D)** Mutantes en subunidades gama más el tratamiento con calcio. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

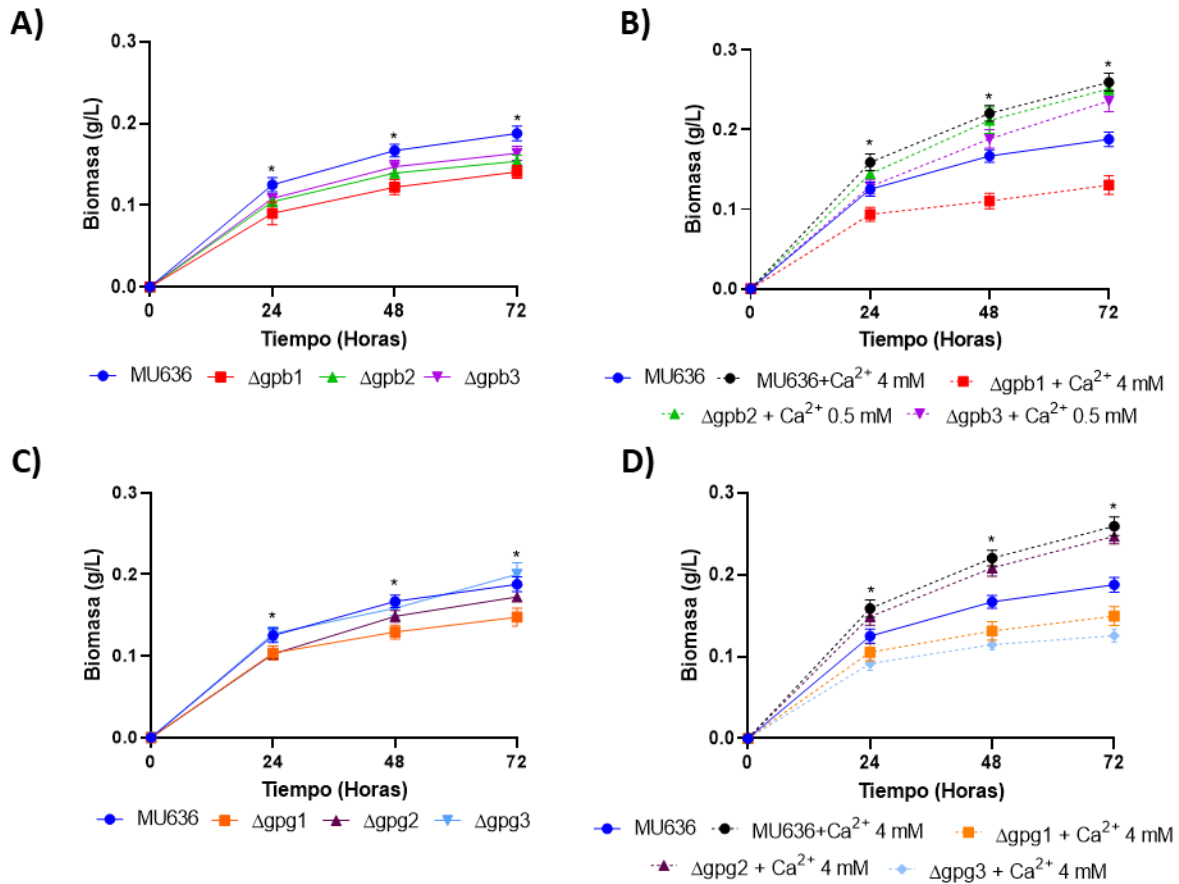
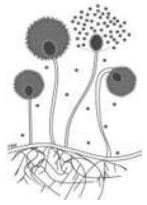
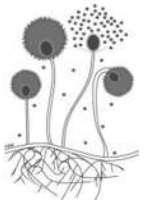


Figura 35. Efecto de la adición de calcio en la producción de biomasa en condiciones de aerobiosis de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando una fuente carbono no fermentable. Se inocularon 6×10^6 de esporas en 10 mL de medio mínimo VG al 111 mM y como tratamiento con calcio se evaluó la concentración de 4 mM de CaCl₂ y se incubaron a 28 °C a 150 rpm durante 24, 48 y 72 h, al finalizar cada tiempo de crecimiento, se filtró y se recolectó la biomasa, se secó y se pesó. **A)** Mutantes en subunidades beta de *M. lusitanicus*. **B)** Mutantes en subunidades beta más el tratamiento con calcio. **C)** Mutantes en subunidades gama. **D)** Mutantes en subunidades gama más el tratamiento con calcio. n=3, las barras en el gráfico corresponden al error estándar, análisis de varianza ANOVA de una vía, Dunnet, *p<0.05.

El uso de una concentración mayor de CaCl₂ (4 mM) para la generación de biomasa de las mutantes en proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en VG al 111 mM



se pudo observar que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ tienen un crecimiento significativamente menor ($*p < 0.05$) que el de la cepa WT y no responden al estímulo por calcio. La mutante en $\Delta gpg3$ al recibir el tratamiento con calcio disminuyó la producción de biomasa significativamente ($*p < 0.05$) comparado con la biomasa resultante de su mutante respectiva la cual no recibió el tratamiento con calcio o si se compara con el crecimiento de la cepa WT. El resto de las mutantes en subunidades beta y gama respondieron al estímulo por calcio como lo hizo la cepa WT.

Estos datos del crecimiento (generación de biomasa) de las mutantes en proteínas G heterotriméricas y de la cepa WT de *M. lusitanicus*, sugieren como en experimentos anteriores, que las subunidades beta 1 y gama 1 de proteínas G heterotriméricas son necesarias para que la célula pueda responder el estímulo por calcio extracelular y en acción pueda tener un efecto sobre el crecimiento, además también en estos experimentos se observó que el calcio está estimulando la actividad mitocondrial, ya que al hacer uso de una fuente de carbono no fermentable como el glicerol, suplementado con una concentración de calcio suficiente, la producción de biomasa es significativamente superior ($*p < 0.05$) comparado a cuando el medio de crecimiento no se suplementó con calcio.

9.3.3 Efecto de la adición de calcio sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis durante el desarrollo micelial de *M. lusitanicus*

Con la finalidad de seguir probando la hipótesis de que el calcio extracelular estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial, se prosiguió a evaluar un parámetro indirecto de la actividad de las mitocondrias, la tasa de consumo de oxígeno.

La tasa de consumo de oxígeno es un parámetro integrador y completo del metabolismo celular y de la función mitocondrial. Debido a que la respiración celular está acoplada a la síntesis de ATP, muchos procesos que producen o consumen ATP se pueden estudiar mediante la respirometría. Para las vías que generan ATP a través de la fosforilación oxidativa, la respiración celular se puede utilizar para evaluar la actividad enzimática o nodos metabólicos al ofrecer sustratos energéticos



a mitocondrias aisladas o a células intactas, cada uno de los cuales, requiriendo diferentes vías metabólicas para la oxidación, pero todas convergiendo en el consumo de oxígeno (Divakaruni & Jastroch, 2022).

Este parámetro se evaluó en los medios YPG-2 %, Vogel-2 %, y YPG-6 % de glucosa, YNB-0.1 %, Vogel-0.1 % de glucosa y el medio Vogel-Glicerol al 111 mM y sus tratamientos respectivos con calcio a 150 rpm y a 28 °C. El experimento se realizó según lo descrito en el apartado de materiales y métodos (8.4.7). Los resultados se muestran en la figura 36.

Para la cepa WT de *M. lusitanicus* (MU636) en cada uno de los medios evaluados sin calcio, se muestra el valor basal. La tasa de consumo de oxígeno de la cepa WT fue significativamente mayor (* $p < 0.05$) en los medios YNB-0.1 %, Vogel-0.1 % y Vogel Glicerol al 111 mM, mientras que fue significativamente menor (* $p < 0.05$) en los medios YPG-2 % y YPG-6 %. Así también, con los tratamientos con calcio desde 0.5 mM a 4 mM, se observó que este ion aumentó significativamente (* $p < 0.05$) la tasa de consumo de oxígeno en todos los medios a excepción del medio YPG-6 %. El tratamiento con 50 μ M de CaCl_2 no mostró un aumento en este parámetro fisiológico en ninguno de los medios ensayados.

Estos datos sugieren que el calcio extracelular tiene un efecto significativo (* $p < 0.05$) en el aumento de la tasa de consumo de oxígeno de las células de *M. lusitanicus* (MU636) en medios mínimos y sintéticos usando una fuente de carbono fermentable, y esa diferencia significativa se exagera con el uso de una fuente de carbono no fermentable como el glicerol.

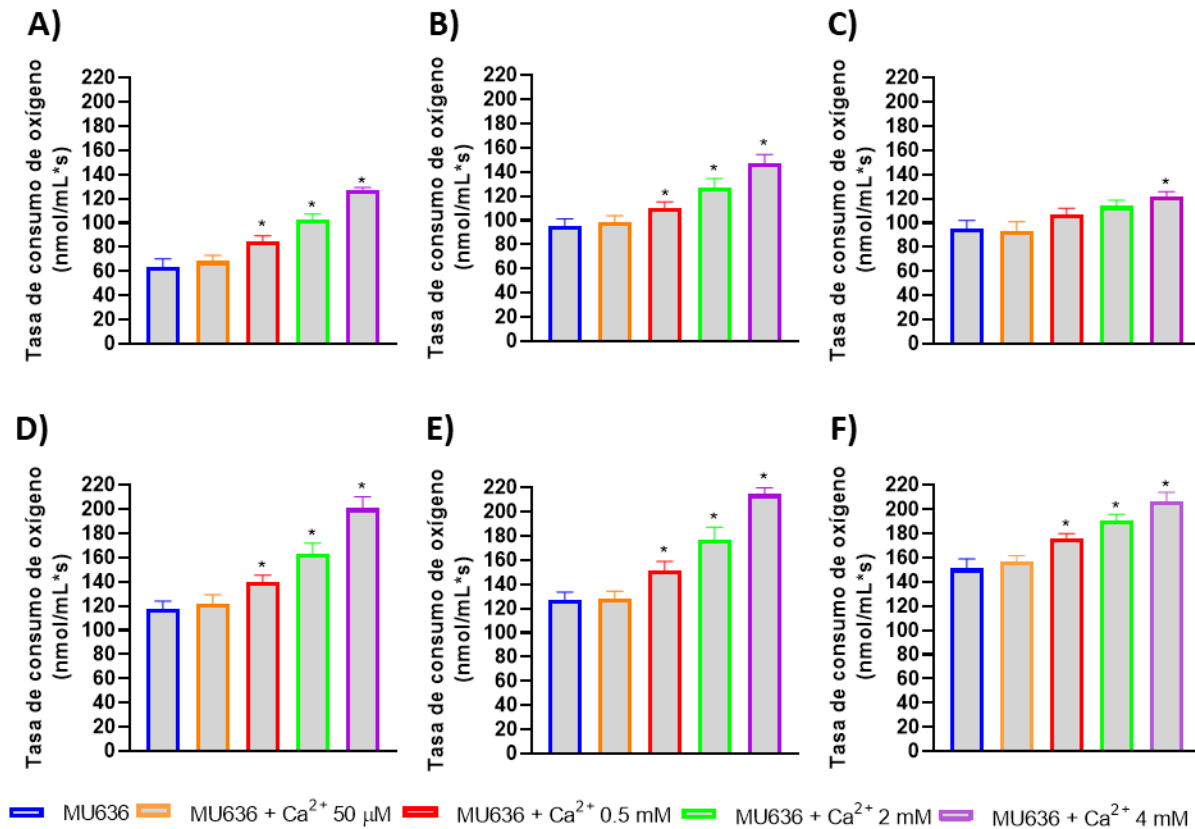
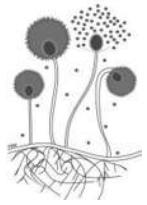


Figura 36. Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de *M. lusitanicus* usando una fuente de carbono fermentable y una no fermentable. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno de germinulas de *M. lusitanicus* de 4 horas en los medios **A)** YPG-2 %, **B)** Vogel-2 %, **C)** YPG-6 %, **D)** YNB-0.1 %, **E)** Vogel-0.1 % y **F)** VG-111 mM. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

9.3.3.1 Efecto de la adición simultanea de calcio e inhibidores de la cadena transportadora de electrones en la respiración de *M. lusitanicus*

Se evaluó la tasa de consumo de oxígeno en los medios YNB-0.1 % y Vogel-0.1 % en presencia de dos inhibidores de la cadena transportadora de electrones: el cianuro de potasio (KCN) y la antimicina A (AA). En hongos filamentosos, se ha demostrado que el cianuro de potasio es un inhibidor del complejo IV de la cadena



transportadora de electrones, mientras que la antimicina A es un inhibidor del complejo III de la misma (Duvenage et al., 2019). Para el caso del KCN, en nuestro grupo de trabajo se ha descrito la concentración de 0.5 mM de KCN como una concentración subinhibitoria, que permite evaluar el efecto que tiene este compuesto sobre la respiración celular de este hongo durante el crecimiento micelial (Alejandre–Castañeda et al., 2022). Por otro lado, para este experimento se usaron las concentraciones de 1 μ M y de 10 μ M de AA para evaluar su efecto sobre la respiración. Las concentraciones de calcio evaluadas fueron 50 μ M, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl_2 .

En la figura 37 panel A, se obtuvieron valores muy similares a los obtenidos en la figura R28; el calcio estimuló significativamente ($*p<0.05$) la tasa de consumo de oxígeno. En el panel B, se observan los resultados de la tasa de consumo de oxígeno cuando al medio se le agregó KCN, se pudo observar que dicho parámetro disminuye significativamente ($*p<0.05$) comparado con el control, y en los tratamientos en los que se agregó en conjunto el KCN y la concentración de calcio correspondiente, se observó que a partir de la concentración de 0.5 mM de CaCl_2 hasta la de 4 mM, la tasa de consumo de oxígeno aumentó comparado con el tratamiento con KCN, pero nunca se restableció la tasa de consumo de oxígeno equiparablemente al control. En el panel C se observa la tasa de consumo de oxígeno cuando el medio se suplementó con antimicina A a 1 μ M y en el panel D cuando se suplementó con antimicina A a 10 μ M. Se observó que desde la concentración más baja probada de esta molécula la tasa de consumo de oxígeno disminuyó significativamente ($*p<0.05$) comparado con el control, y esta caída es mucho más evidente a la concentración más alta. En ambos casos, al suplementar con las concentraciones de calcio 2 mM y 4 mM en conjunto con la antimicina A, se observó que hubo un aumento en la tasa de consumo de oxígeno comparado con el tratamiento solo con antimicina A, pero dicho aumento no restauró la tasa de consumo de oxígeno al nivel del control.

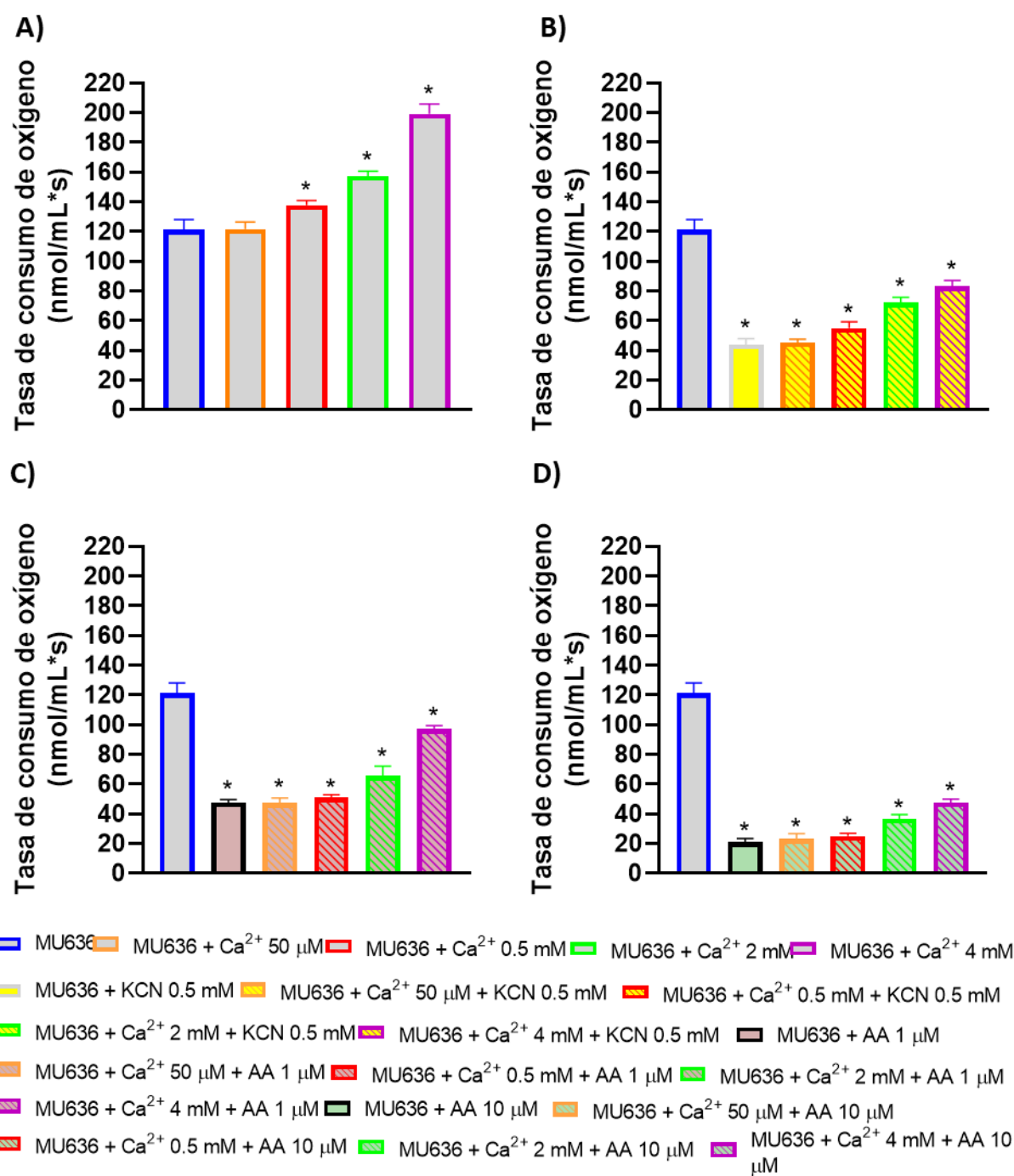
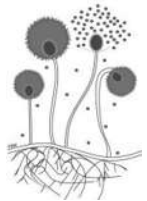
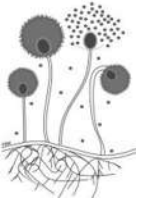
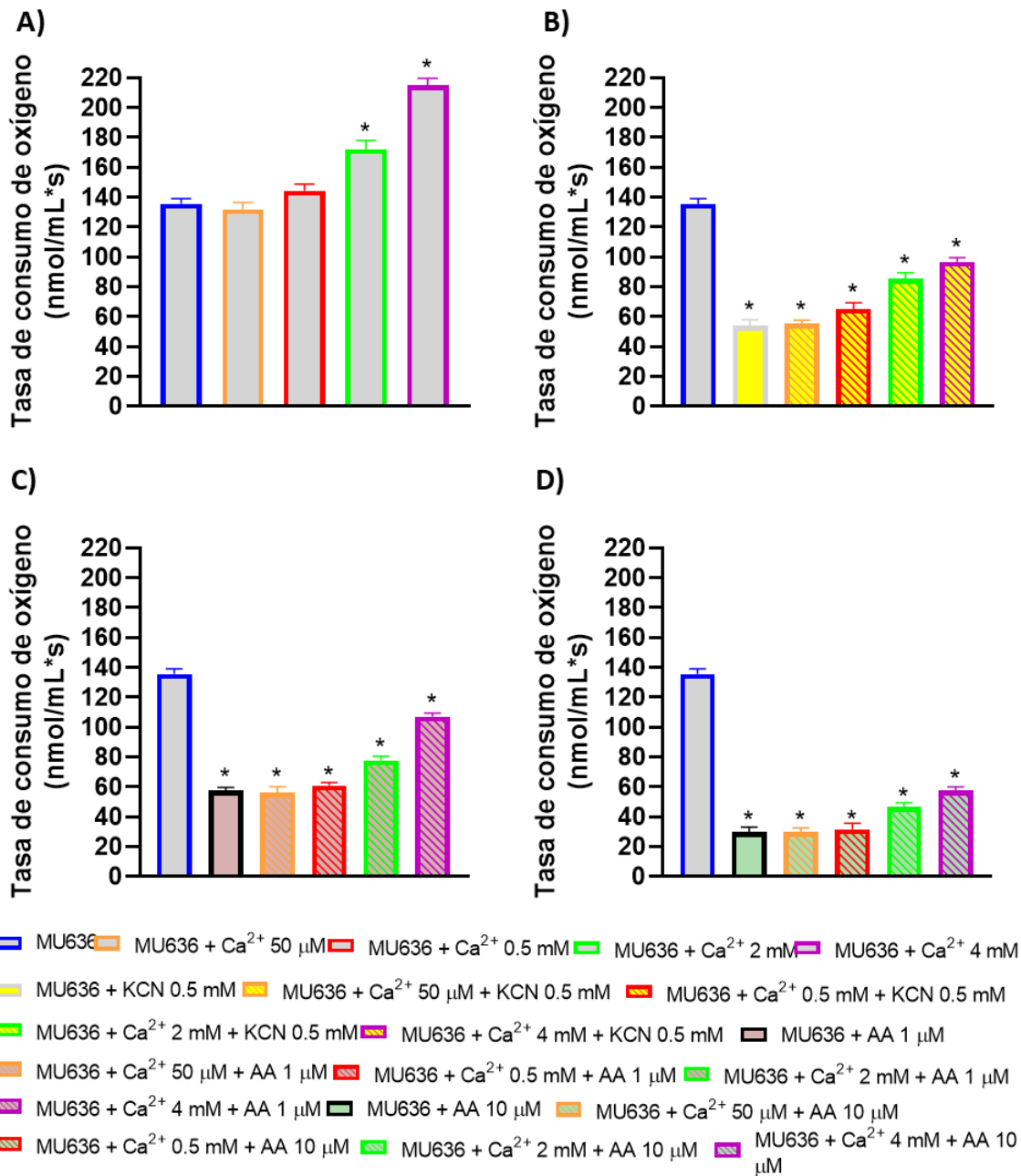


Figura 37. Efecto de la adición de calcio e inhibidores de la cadena respiratoria sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de *M. lusitanicus*. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno de germínulas de *M. lusitanicus* de 4 horas en el medio YNB-0.1 % suplementado con **A)** Calcio 50 μM–4 mM, **B)** KCN + calcio, **C)** AA 1 μM + calcio, **D)** AA 10 μM + calcio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al



error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

En la figura 38 se observan los resultados obtenidos del mismo experimento, pero haciendo uso del medio mínimo sintético Vogel-0.1 %. En este medio de cultivo, y en todos los casos ensayados, se observó el mismo comportamiento que con el medio YNB-0.1 %.



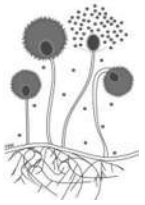


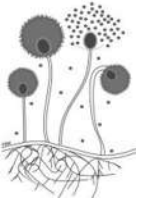
Figura 38. Efecto de la adición de calcio e inhibidores de la cadena respiratoria sobre la tasa de consumo de oxígeno en condiciones de aerobiosis de *M. lusitanicus* en medio sintético. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno de germínulas de *M. lusitanicus* de 4 horas en el medio Vogel-0.1 % suplementado con **A)** Calcio 50 μM –4 mM, **B)** KCN + calcio, **C)** AA 1 μM + calcio, **D)** AA 10 μM + calcio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

Estos datos en conjunto sugieren que el calcio estimula a diferentes niveles de la respiración celular y probablemente de la cadena transportadora de electrones, lo que se refleja como un aumento en la tasa de consumo de oxígeno aún en presencia de un inhibidor de esta, y además también sugiere que este *Mucor* puede estar usando un sistema alternativo de respiración celular.

9.3.4 Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*

Para averiguar si las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* están involucradas en la respiración celular, se hizo uso de las mutantes en dichas proteínas para medir la tasa de consumo de oxígeno en los medios YPG-2 %, Vogel-2 %, YNB-0.1 %, Vogel-0.1 % y YPG-6 % y en los mismos medios suplementados con la concentración de 4 mM de CaCl_2 . En la figura 39 se muestran los resultados.

En todos los medio evaluados se observó que las mutantes $\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$ y $\Delta gpg2$ se comportaron de manera similar a la cepa WT en ausencia de suplementación con calcio. En cambio, cuando fueron suplementados con calcio dichas mutantes aumentaron significativamente (*p<0.05) su tasa de consumo de oxígeno si se les compara con el valor para cada medio que tuvo la cepa WT sin calcio o con sus mutantes respectivas; sin embargo, en algunos medios no alcanzaron a tener el mismo valor de consumo de oxígeno que el de la cepa WT que recibió el tratamiento



con calcio. Por otra parte, las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ en todos los medios evaluados tuvieron una tasa de consumo significativamente inferior (* $p < 0.05$) comparado con el de la cepa WT y no respondieron al estímulo por calcio extracelular.

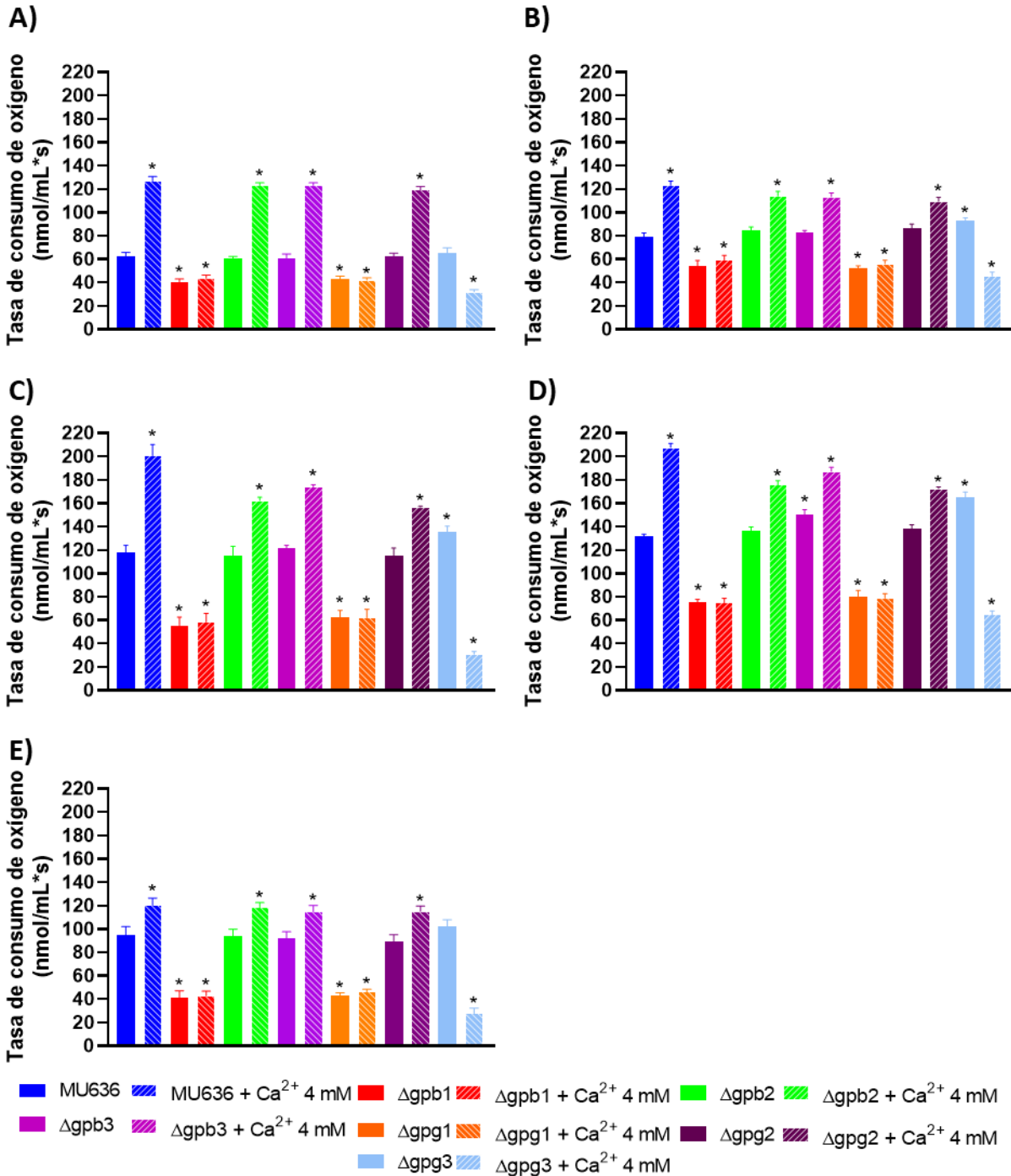
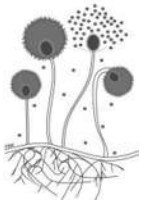




Figura 39. Efecto de la adición de calcio en la tasa de consumo de oxígeno de las mutantes en subunidades betas y gamas de *M. lusitanicus*. Se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno de germínulas de *M. lusitanicus* de 4 horas en los medios **A)** YPG-2 %, **B)** Vogel-2 %, **C)** YPG-6 %, **D)** YNB-0.1 % y **E)** Vogel-0.1 %. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

Interesantemente, la mutante en $\Delta gpg3$ en algunos de los medios sin calcio adicionado, mostró una tasa de consumo de oxígeno significativamente mayor (*p<0.05) que el de la cepa WT o que las otras mutantes, sin embargo, en todos los medios de cultivo cuando se les suplementó con la concentración de 4 mM de CaCl_2 , dicha mutante mostró una tasa de consumo de oxígeno significativamente menor (*p<0.05) que el de la cepa WT con o sin calcio, menor al de las otras mutantes con o sin el tratamiento con calcio y mucho menor comparada con su mutante respectiva sin el tratamiento con calcio. Además, también se observó de forma general, que el calcio extracelular tuvo un efecto más marcado sobre la tasa de consumo de oxígeno en aquellos medios que se usaron para estimular el metabolismo oxidativo mitocondrial (YNB-0.1 % y Vogel-0.1 %).

Estos datos sugieren que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ probablemente tienen algún defecto en algún punto de su metabolismo oxidativo, principalmente aquellos que están involucrados con la respiración celular, ya que fueron insensibles al estímulo por el calcio extracelular, lo que se vio reflejado como una menor tasa de consumo de oxígeno y sin un cambio aparente al recibir dicha señal extracelular. También sugieren que la mutante en $\Delta gpg3$, puede tener un defecto en el manejo y/o sensibilidad a altas concentraciones de calcio extracelulares, ya que al igual que con otros parámetros fisiológicos evaluados, la tasa de consumo de oxígeno se vio afectada por este ion.

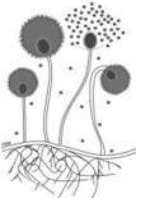


9.3.5 Efecto de la adición de calcio en la generación del radical $\text{OH}\cdot$ durante el crecimiento en aerobiosis de *M. lusitanicus*

El término “especies reactivas de oxígeno” (ERO), hace referencia a un término usado en el área de las ciencias naturales y médicas para describir a un grupo de moléculas que se generan a partir de reacciones de óxido–reducción o por excitación electrónica del oxígeno molecular. La reactividad de estas moléculas es bastante diferente y con puntos blanco bastante específicos. Se pueden dividir en dos grupos, de tipo no radicales y especies de tipo radical (con al menos un electrón libre). En este último grupo se encuentra el radical hidroxilo, $\text{OH}\cdot$, el cual es considerado la especie más reactiva de este grupo y que se forma por la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por un metal en la llamada reacción de Fenton, involucrando el hierro libre (Fe^{2+}). Las principales fuentes enzimáticas y endógenas de H_2O_2 son las oxidasas NADPH transmembranales (NOX) y la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Sies & Jones, 2020).

En nuestro grupo de trabajo se ha estandarizado un protocolo para medir al radical hidroxilo por medio de un método fluorimétrico (descrito en el apartado 8.4.8) usando a la molécula fluorescente 3'-(p-aminofenil) fluoresceína (APF), y se ha usado para describir su relación con el metabolismo oxidativo mitocondrial, ya que la producción de ERO está relacionada con la actividad de la cadena transportadora de electrones. Para cuantificar el radical $\text{OH}\cdot$ en la cepa silvestre de *M. lusitanicus*, se usaron los medios YNB-0.1 % y Vogel-0.1 % y en su caso los medios fueron suplementados con las concentraciones de calcio evaluadas en este proyecto. Los resultados del experimento (Figura 40) mostraron que, en ambos medios de cultivo, el calcio solo tuvo efecto significativo ($*p<0.05$) sobre la producción del radical $\text{OH}\cdot$ a la mayor concentración de calcio evaluada (4 mM) en comparación con el control (medio sin calcio añadido), así también se observó que el medio YNB-0.1 % promovió la producción de este radical de oxígeno en comparación con el medio Vogel-0.1 %.

Estos datos sugieren, que el medio de cultivo condiciona la producción del radical $\text{OH}\cdot$, y que en los medios evaluados el calcio no promovió la producción de este tipo



de ERO, por lo que en el futuro se tendría que implementar un método de cuantificación de las otras moléculas que pertenecen a este grupo para saber si el calcio estimula su producción.

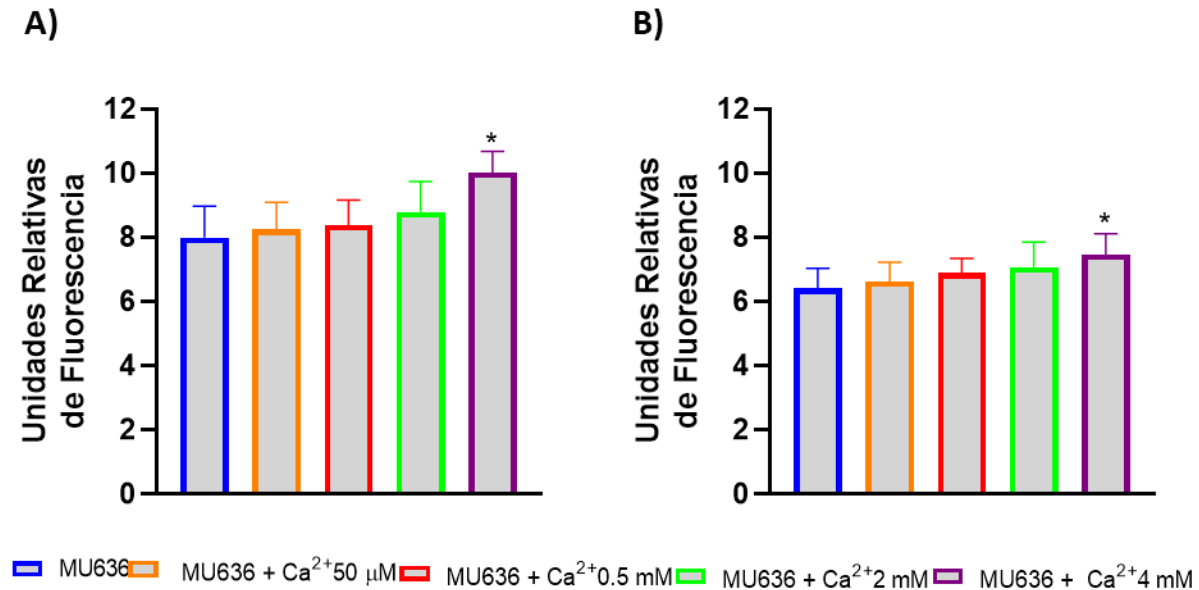
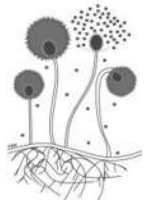


Figura 40. Efecto de la adición de calcio en la producción del radical OH⁻ durante el crecimiento micelial de *M. lusitanicus*. Se cuantificó la presencia del radical OH⁻ en germínulas de 4 horas de crecimiento en los medios **A)** YNB-0.1 % y en **B)** Vogel-0.1 % usando la molécula fluorescente APF y en su caso los medios se suplementaron con las concentraciones 50 μm, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl₂. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

9.3.5.1 Efecto de la adición de calcio en la producción del radical OH⁻ en las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*

Para conocer si las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas están implicadas en la producción del radical OH⁻, se cuantificó la presencia de esta ERO en germínulas de 4 horas de crecimiento de las mutantes de estas proteínas de *M.*



lusitanicus usando los medios de cultivo YNB-0.1 % y Vogel-0.1 % y su suplementación con la concentración de CaCl_2 4 mM (Figura 41).

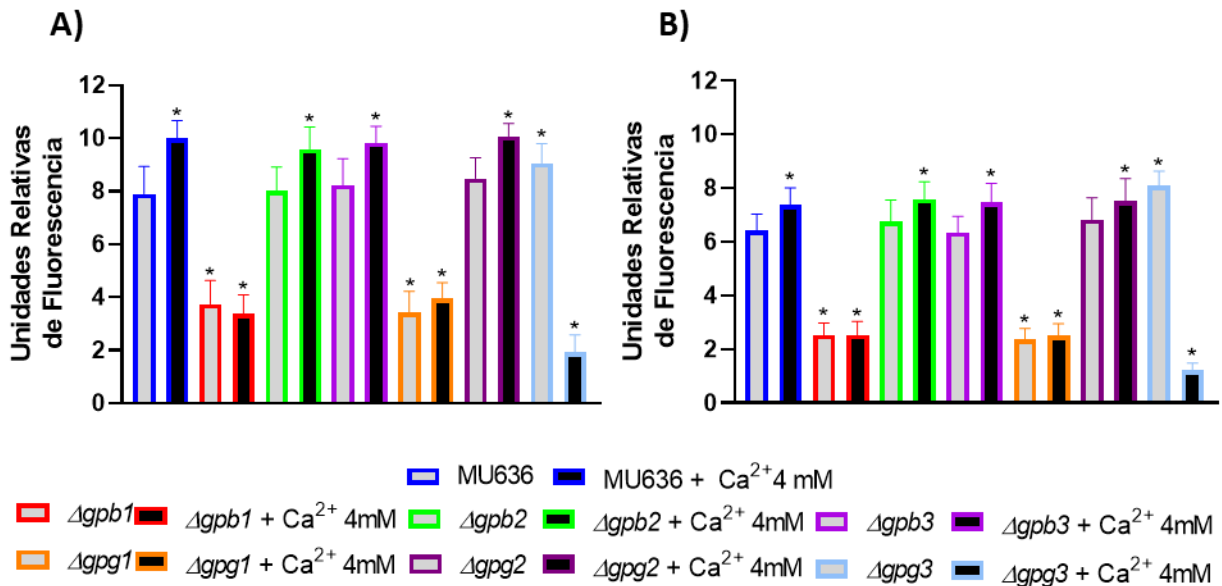
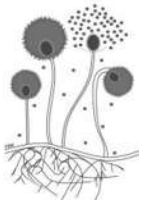


Figura 41. Efecto de la adición de calcio en la producción del radical $\text{OH}\cdot$ durante el crecimiento micelial de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*. Se cuantificó la presencia del radical $\text{OH}\cdot$ en germínulas de 4 horas de crecimiento en los medios **A)** YNB-0.1 % y en **B)** Vogel-0.1 % usando la molécula fluorescente APF y en su caso el medio se suplementó con la concentración de 4 mM de CaCl_2 . Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.

En el experimento previo, se encontró que solo la concentración de 4 mM de CaCl_2 tuvo un efecto significativo sobre la producción de este radical en la cepa WT, por lo que para este experimento de igual manera se usó dicha concentración de calcio. Los resultados del experimento (Figura 41 A y B) mostraron que esta concentración de calcio tuvo un incremento significativo (*p<0.05) sobre la producción del radical $\text{OH}\cdot$ en las mutantes $\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$ y $\Delta gpg2$ y se comportaron como la cepa WT. Nuevamente, las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ mostraron niveles del radical $\text{OH}\cdot$



significativamente inferiores ($*p<0.05$) comparados con el de la cepa WT y no respondieron al calcio extracelular. Por otra parte, la mutante $\Delta gpg3$ mostró una mayor producción de $\text{OH}\cdot$ comparado con el valor de la cepa WT en ambos medios de cultivo y al suplementar los medios con la concentración de calcio evaluada, la producción de $\text{OH}\cdot$ disminuyó significativamente ($*p<0.05$) comparado con los valores obtenidos para la cepa WT y para el resto de las mutantes y su tratamiento con calcio. Además, también se observó que, a las condiciones del experimento, el medio YNB-0.1 % favoreció la producción de esta ERO.

Estos datos sugieren que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ podrían tener algún defecto en los sistemas celulares encargados en la producción del radical $\text{OH}\cdot$, y que su presencia es fundamental para la generación de esta ERO. Así también, se puede sugerir que la mutante $\Delta gpg3$ presenta un cambio en su fenotipo al ser extremadamente sensible a altas concentraciones de calcio evaluadas.

9.3.6 Efecto del calcio extracelular en la toxicidad del sobrenadante de *M. lusitanicus*

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el sobrenadante (SS) libre de células obtenido posterior a las 48 horas después del crecimiento aerobio contiene moléculas secretadas por *M. lusitanicus* que son capaces de generar daño en *C. elegans*. En este sentido, se ha usado al medio YPG-2 % como un medio que estimula tanto el metabolismo oxidativo como el fermentativo; al medio YNB-0.1 % como un medio que estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial y al medio YPG-6 % como un medio que estimula el metabolismo fermentativo (Alejandre–Castañeda et al., 2022). Para evaluar si el calcio extracelular aumenta la toxicidad del sobrenadante de la cepa WT de este Mucoral, se obtuvieron los SS en los medios antes mencionados y se probó su toxicidad frente al nematodo *C. elegans*, los datos se muestran en la figura 42.

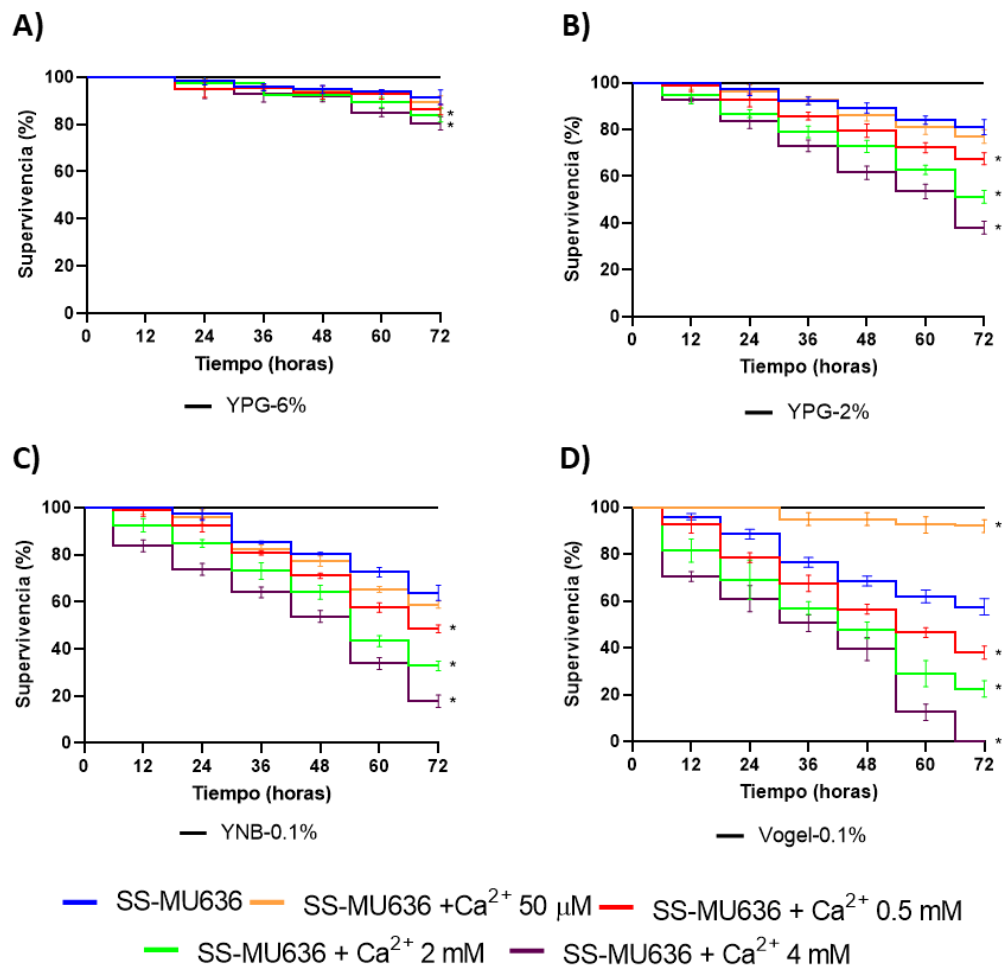
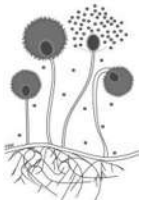


Figura 42. Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de *M. lusitanicus*. Se midió la toxicidad de los sobrenadantes (SS) de la cepa WT de *M. lusitanicus* obtenidos a las 48 horas de crecimiento a 28 °C a 150 r.p.m. en los medios **A)** YPG-6 %, **B)** YPG-2 %, **C)** YNB-0.1 % y **D)** Vogel-0.1 % y en su caso el medio se suplementó con calcio (50 μM, 0.5 mM, 2 mM y 4 mM), frente al nematodo *C. elegans* incubados a 18 °C durante un periodo de 72 h. Las líneas negras representan al medio de cultivo suplementado con la concentración de calcio más alta evaluada. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba Mantel-Cox, *p<0.05.

Al suplementar los medios de cultivo con las concentraciones de CaCl₂ evaluadas, y en especial con las concentraciones de 2 y 4 mM de CaCl₂ se observó un aumento significativo (*p<0.05) en la toxicidad de los SS en todos los medios de cultivo.



Siendo el medio mínimo YNB-0.1 % y el medio sintético Vogel-0.1 % los que tuvieron la mayor toxicidad de los sobrenadantes al ser suplementados con altas concentraciones de calcio.

Estos datos sugieren que la concentración de calcio presente en el medio tiene un papel importante en algún punto del metabolismo mitocondrial, ya que en medios que estimulan este metabolismo como el medio YNB-0.1 % y Vogel-0.1 % suplementados con calcio mostraron un aumento en su toxicidad.

9.3.7 Evaluación de la virulencia de las esporas de *M. lusitanicus* obtenidas de medio sólido suplementado con calcio

Con la finalidad de evaluar el efecto que tiene suplementar las placas de medio sólido YPG-2 % con diferentes concentraciones de calcio (0.5 mM, 2 mM y 4 mM) en la virulencia de las esporas de la cepa WT de *M. lusitanicus*, se realizaron ensayos de infección usando a *G. mellonella* como modelo de estudio. Los resultados de este experimento se muestran en la siguiente figura (Fig. 43).

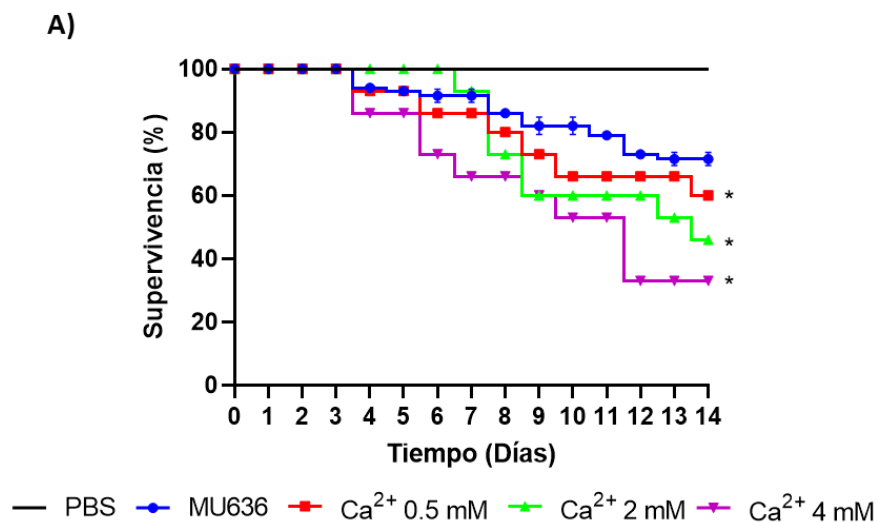
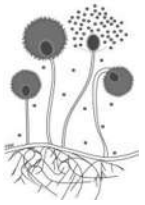


Figura 43. Evaluación de la virulencia de las esporas de *M. lusitanicus* obtenidas de medio suplementado con calcio usando a *G. mellonella* como modelo de infección. Se evaluó la virulencia de las esporas de *M. lusitanicus* que fueron obtenidas de placas de YPG-2 % suplementadas con las concentraciones de



0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl_2 de 7 días de crecimiento. De estas esporas se inocularon 10,000 en 20 μL de PBS en cada una de las 20 larvas de *G. mellonella* usadas por tratamiento, se siguió el experimento por 14 días. **A)** Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis con la prueba Mantel-Cox, *p<0.05.

Los resultados del experimento mostraron que a partir del día 5 después de la infección, las larvas que fueron inoculadas con esporas provenientes de placas de YPG-2 % suplementadas con 4 mM de CaCl_2 mostraron un menor porcentaje de supervivencia comparado con el de la cepa WT que no recibió tratamiento con calcio y ese comportamiento se mantuvo hasta el final del experimento. A partir del día 9 después de la infección, las larvas que fueron inoculadas con esporas provenientes de placas suplementadas con 0.5 mM y 2 mM de calcio, comenzaron a tener un menor porcentaje de supervivencia comparado con el control.

Estos datos sugieren que el suplementar el medio de cultivo con calcio genera que haya un mayor crecimiento de la colonia, una mayor esporulación (Figura 12), así como que dichas esporas sean más virulentas en un modelo de infección como *G. mellonella*.

9.3.8 Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*

Con la finalidad de evaluar si el calcio estimula la toxicidad del sobrenadante de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*, se realizaron ensayos de supervivencia usando los SS obtenidos libres de células del crecimiento en el medio que estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial (YNB al 0.1 % de glucosa). Los resultados del experimento se muestran en la figura 44.

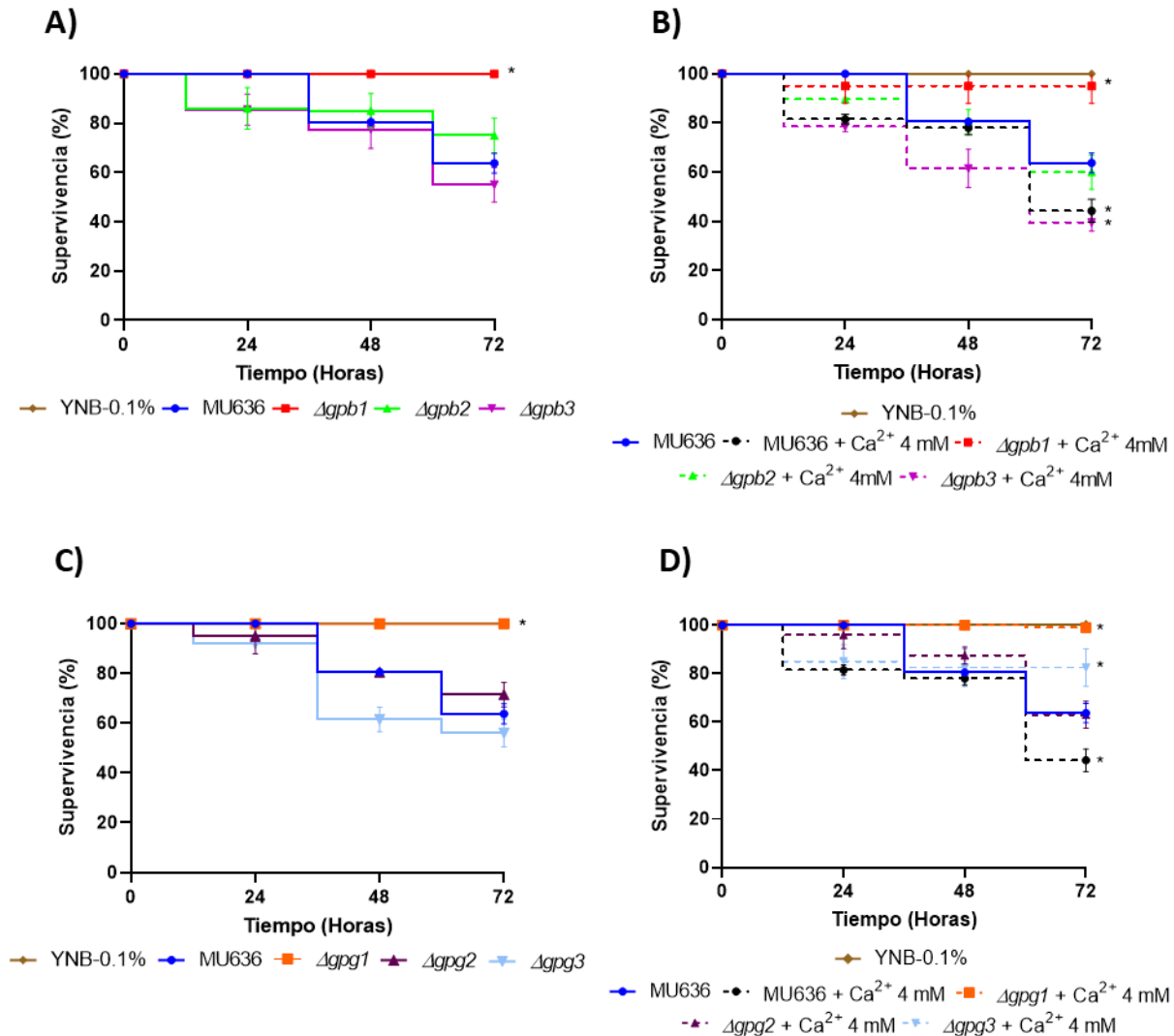
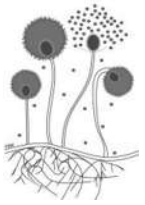
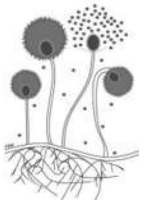


Figura 44. Efecto de la adición de calcio en la toxicidad del sobrenadante de las mutantes en subunidades beta y gamma de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*. Se midió la toxicidad de los sobrenadantes (SS) de la cepa WT y de las mutantes en subunidades beta y gamma de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* obtenidos a las 48 h de crecimiento a 28 °C a 150 r.p.m. en el medio YNB-0.1 % frente al nematodo *C. elegans*. Se muestran los datos obtenidos para **A)** las mutantes en subunidades beta, **B)** las mutantes en subunidades beta tratadas con calcio, **C)** las mutantes en subunidades gamma y **D)** las mutantes en subunidades gamma tratadas con calcio. La concentración de calcio evaluada fue la de 4 mM. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras

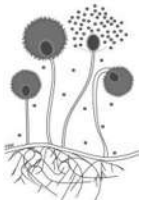


corresponden al error estándar, se realizó el análisis con la prueba Mantel-Cox, $*p < 0.05$.

Los SS de las mutantes $\Delta gpb2$, $\Delta gpb3$, $\Delta gpg2$ y $\Delta gpg3$ mostraron un efecto tóxico similar al de la cepa WT (60 % de supervivencia, figura 44 A y C). Los SS obtenidos del tratamiento con calcio, mostraron que el SS de las mutantes $\Delta gpb2$ y $\Delta gpg2$ mantuvieron el mismo efecto tóxico que cuando no fueron tratadas con calcio, por otro lado, el SS de la mutante $\Delta gpb3$ aumento su toxicidad (40 % de supervivencia, similar al de la cepa WT al ser tratado con calcio) en comparación al SS de su respectiva mutante al no ser tratado con calcio. Interesantemente, el SS de la mutante $\Delta gpg3$ redujo significativamente ($*p < 0.05$) su toxicidad (80 % de supervivencia) al ser tratado con calcio en comparación a los valores obtenidos para la misma mutante sin ser tratada con calcio y con los valores obtenidos para la cepa WT sin y con calcio. Los SS de las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ no son tóxicos frente al nematodo *C. elegans* (100 % de supervivencia, figura 44 A y C) en comparación a la toxicidad del sobrenadante de la cepa MU636 (60% de supervivencia), y tampoco respondieron al estímulo por calcio, mientras que el sobrenadante de la cepa WT tratado con calcio resultó ser significativamente ($*p < 0.05$) más tóxico (40 % de supervivencia, figura 44, B) que el sobrenadante no tratado con calcio.

Estos datos sugieren que probablemente las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ pueden tener un defecto a nivel del metabolismo oxidativo mitocondrial y que de este depende la síntesis de un factor tóxico liberado en el SS que posiblemente es estimulado por la presencia de calcio extracelular. De igual manera, probablemente la mutante en $\Delta gpg3$ tiene un defecto que la hace mucho más sensible a crecer en altas concentraciones de calcio; hasta este punto, se desconoce cuál o cuáles podrían ser esos defectos.

9.4 Identificación de posibles péptidos señal o motivos de direccionalidad mitocondrial en la secuencia primaria de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*



Dado que las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* respondieron de distinta manera al efecto que tiene el calcio extracelular sobre distintos parámetros fisiológicos en el medio de cultivo que estimula el metabolismo oxidativo mitocondrial (YNB-0.1 %), principalmente a que las mutantes de interés, $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$, permanecieron insensibles al estímulo por calcio y mostraron tener una probable menor actividad mitocondrial según los experimentos fisiológicos realizados, y por otra parte debido a que se ha descrito que en células eucariotas algunas proteínas de tipo G heterotriméricas son capaces de translocar a compartimentos endomembranales (Ajith Karunarathne et al., 2012; Andreeva et al., 2008; O'Neill et al., 2012; Saini et al., 2007; Saini et al., 2009) o a que pueden regular a ciertas proteínas de la dinámica mitocondrial (Zhang et al., 2010), fue de interés identificar si estas proteínas poseían ciertos péptidos señal, motivos o dominios implicados en la direccionalidad mitocondrial. Para ello, se realizó una búsqueda de estos posibles sitios de direccionalidad mitocondrial en cada una de las secuencias primarias de aminoácidos de las subunidades beta y gama de *M. lusitanicus* utilizando herramientas computacionales.

Al realizar el análisis para la búsqueda de péptidos señal en las secuencias primarias de aminoácidos de estas proteínas, usando los programas Signal-BLAST (<http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html>), TargetP - 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>), SignalP - 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) y PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>), no se encontró ningún motivo relacionado a la búsqueda de interés. Sin embargo, los programas MitoProt (<https://ihg.helmholtz-munich.de/ihg/mitoprot.html>) y TargetP - 2.0, sugirieron cierta probabilidad de que las proteínas puedan ser exportadas a la mitocondria, siendo la subunidad beta 3 de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*, la más probable en ser exportada a la mitocondria, seguido de la subunidad gama 1. Estos datos de probabilidad para las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas se pueden apreciar en la figura 45.

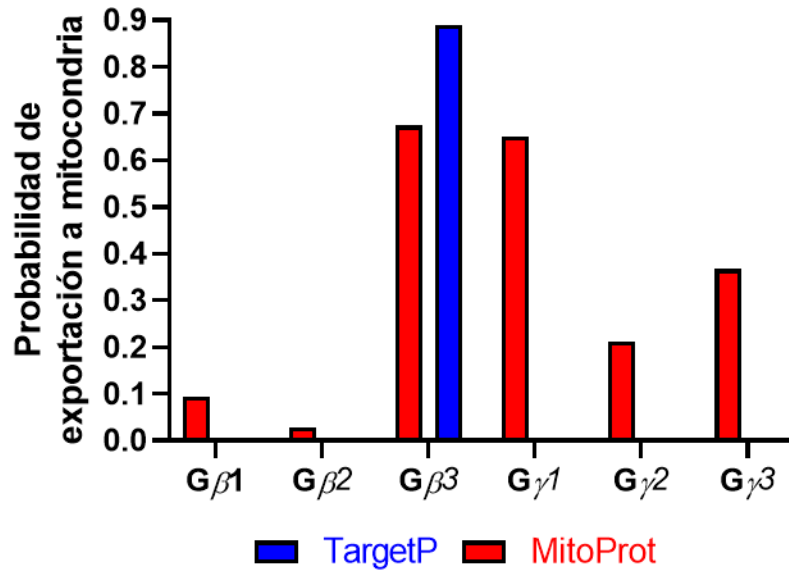
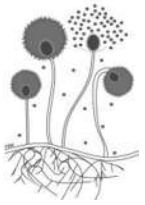
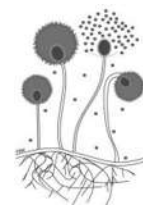


Figura 45. Predicción de la exportación mitocondrial de las diferentes subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando los programas TargetP (Azul) y Mitoprot (Rojo). Se observa en el gráfico la probabilidad (0-1) calculada por algoritmos de que las proteínas sean exportadas a la mitocondria.

Por otra parte, con el fin de obtener más información que respalde la información antes presentada, también se realizó el análisis de la probable localización celular de estas proteínas usando los algoritmos PSORT II y DeepLoc – 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/>), y se encontró la información que se plasma en la siguiente tabla (Tabla 9).

Tabla 9. Predicción de la localización subcelular de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando algoritmos computacionales

Proteína	Algoritmo											
	PSORT II						DeepLoc -1.0					
	Probabilidad de localización						Probabilidad de localización					
	MP	CIT	NUC	MIT	AG	VC	MP	CIT	NUC	MIT	AG	VC
G β 1	-	0.65	0.08	-	-	0.04	-	0.40	0.55	-	-	-
G β 2	-	0.65	0.17	-	-	0.04	-	0.31	0.51	-	-	-



Gβ3	-	0.17	0.08	0.61	-	0.04	-	-	-	0.99	-	-
GY1	0.17	-	0.30	0.35	-	-	0.75	0.05	-	0.01	0.17	-
GY2	0.18	-	0.35	0.35	-	-	0.71	0.04	-	-	0.19	0.05
GY3	-	-	0.7	0.26	-	-	0.61	-	-	0.02	0.26	0.04

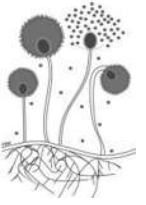
MP: Membrana plasmática; CIT: Citoplasma; NUC: Núcleo; MIT: Mitochondria; AG: Aparato de Golgi; VC: Vacuolar, - : no especificado. Los valores en color rojo indican la más alta probabilidad.

Los datos de la tabla nuevamente sugieren que la subunidad beta 3 tiene una alta probabilidad de localización mitocondrial. Los datos de este análisis difirieron entre los algoritmos para la localización subcelular de cada una de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*, por lo que hay que corroborar con lo que se ha descrito en la literatura para este hongo y otros.

Finalmente, las secuencias primarias de estas proteínas fueron analizadas con el programa MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates>), para identificar posibles motivos de direccionalidad mitocondrial, y se encontró que las subunidades Gβ1 y Gβ3, poseen dos motivos de reconocimiento para TOM20 de direccionalidad mitocondrial (posiciones 50-54, 65-69 para Gβ1 y 66-70, 83-87 para Gβ3; resaltados en color rojo), el resto de las subunidades poseen un solo motivo de reconocimiento por TOM20, sus posiciones son 63-67 Gβ2, posiciones 11-15 para GY1, posiciones 13-17 para GY2 y las posiciones 11-15 para GY3. El análisis también arrojó que cada subunidad posee un sitio de corte por la enzima MPP (resaltado en color azul). Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Identificación de los probables motivos de reconocimiento para TOM20 en la secuencia primaria de aminoácidos de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* usando un algoritmo computacional

Proteína	Ubicación del probable motivo de reconocimiento mitocondrial
Gβ1	MPNTNNDSDIPERIAAARREAEALKERIKQRKEALADTTLQEMAKDVEPLPRIVMKARRTLKGHLAKIYS MHWASDKRHLVSASQDGKLIWVWDAYSTNKVHAIPLRSSWVMTCAAPSGNFVACGGLDNICSIYNLRT RDGPVVPARELSAHNGYLSCCRFINDRQILTASGDMTCMLWDIDAGVKTEEFADHTGDVMSLSLGTNP NVFVTGACDSTAKVWDIRTKRCVQTFVGHESDINAVQFFPDGNSFATGSDDATCRLFDLRADCELSVY SHESILCGITSIGFSPSGRLLFGGYDDYNCNVWDTLKCERVGVLSAHDNRVSLGVAGDGMALCTGSW DSTLKVWA



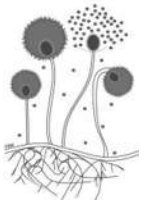
Gβ2	MSSITTDIAERTAAARREAEQLKDKIKQKESLADTTLSQVAQNVEKLPRLSMKVRR T LKGHLAKIYAMQ WAADKRHLVSASQDGKLLVWDAYSTNKIYAIPLRSSWVMTCAYPSPGNFVASGGLDNICSIFNLKARES PTKPARELSGHTGYLSCCRFLSDAQLTSSGDTCVLWDIDAGVKIDEFTDHTGDVMSLSISSNPSVSVS GACDATAKIWDIRSKKCVQSFSGHESDINAVQFFPNGNAIGTGSDDASCRLFDLRADRELNIFTHEQVF SGITSVAFSISGRLLFGGYDDYHCHVWDTLRGERVGVLSGHENRVSCLGVSTDGMLCTGSWDNLLK VWA
Gβ3	MLAASR K AIISTASKATYATAATASQITTAANGVKVASSQEPGQTASLAVVNGGARAESGSNAG VAHFL KNYGFKNNADRT AFRIA REAEIAGGVLSSNLHESLVFSAELLKDDVELFAEILSDVVTQKQFQEHEFIDV AHQTAAESINALGNPEISAIEAAHHVAFRTGLGNSIFAKRTARVNNATVKSFAQSLFTSGNVALVGTGVDH EILQNLAEYLNLPSPGKLSLEATKYFGGETRIESVSNKGNYVLAFEGAALNSSEYAALQVLRQALGGEVN IKHTAGSGILAQTAAKFAEGTEIKAFNLGYSDAGLFGVQVSASTAETGAAIAAAVEQLKAVAKGLSSDDFS RAVAQAKYAATAGFETRLDLETLAGAALNSGKYTSAADAVSAFEKVTTSDVAQIAEKLFKSKPTSVALG DLTTLPYADSVSL
Gγ1	MPRQAIAEAK LRKLL ELNDKLEQLEISRIPISEASR S LIEYCQTNQDMMIPSVWGNRNPDPFAEPTAGC GCVLM
Gγ2	MARKTPNISEAK LTRLLE YKNL RQ LDIPRITVSEASTSLISYCKETKDPLVPSVWGPIDKKEDPFAPSH SGGCCTIM
Gγ3	MARQTVSET LLKIL ELNGKLR Q LDIPRIPVSEASRLIDYQCSTPDLMLPSVWGNRHPDPFAEPANG CGASCQIM

Las letras en color rojo indican la ubicación de los motivos de reconocimiento a TOM20. Las letras resaltadas en color azul indican el sitio de corte por la enzima MPP.

Estos datos en primera instancia sugieren que la subunidad beta 3 de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*, tiene una alta probabilidad de que sea exportada a la mitocondria, y que una vez localizada en ese orgánulo, cabe la posibilidad de que pueda tener una función como proteína única con algún fin o que en su caso, pueda ser exportada como un dímero asociada a alguna subunidad beta; estos casos hasta la fecha se desconocen en este Mucoral y quedan por ser descifrados en el futuro, así como de evidenciar si otras subunidades de estas proteínas pueden dirigirse a orgánulos endomembranosos para realizar alguna función específica.

9.5 Posibles sitios de fosforilación por PKA en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*

Se realizó la búsqueda de los posibles sitios de fosforilación por PKA en las secuencias primarias de aminoácidos de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* con el programa pkaPS



(<https://mendel.imp.ac.at/pkaPS/>). El análisis sugirió que ninguna de las subunidades gama de este hongo posee probables sitios de fosforilación por PKA, sin embargo, para las subunidades beta se encontró que la subunidad G β 1 posee 4 sitios probables de fosforilación en las posiciones 60, 108, 150 y 326, que la subunidad G β 2 posee 9 sitios probables de fosforilación en las posiciones 2, 32, 52, 58, 106, 139, 148, 161 y 324 y que la subunidad G β 3 posee 4 sitios probables de fosforilación en las posiciones 60, 231, 348 y 418. La ubicación de los probables sitios de fosforilación para cada proteína se puede apreciar en la tabla 11.

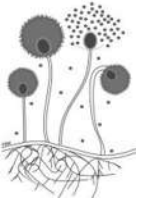
Tabla 11. Predicción de posibles sitios de fosforilación por PKA en las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus*

Proteína	Ubicación de los probables sitios de fosforilación
Gβ1	MPNTNNDSDIPERIAAARREAEALKERIKQRKEALADTTLQEMAKDVEPLPRIVMKARR T LKGHLAKIYS MHWASDKRHLVVSASQDGKLVWDAYSTNKVHAIPLRS S WVMTCAYAPSGNFVACGGLDNICSIYNLRT RDGPVVRPAREL S AHNGYLSCCRFINDRQILTASGDMTCMLWDIDAGVKTEEFADHTGDVMSLSLGTNP NVFVTGACDSTAKVWDIRTKRCVQTFVGHESDINAVQFFPDGNSFATGSDDATCRLFDLRADCELSVY SHESILCGITSIGFSPSGRLLFGGYDDYNCNVWDTLKCERVGVLSAHDNRV S CLGVAGDGMALCTGS WDSTLKVWA
Gβ2	M S SITTDIAERTAAARREAEQLKDKIKQKKE S LADTTLSQVAQNVEKLPRL S MKVRR T LKGHLAKIYAMQ WAADKRHLVVSASQDGKLLVWDAYSTNKIYAIPLRS S WVMTCAYAPSGNFVASGGGLDNICSIYNLKARE S P T KPAREL S GHTGYLSCCRFL S DAQILTSSGDTTCVLWDIDAGVKIDEFTDHTGDVMSLSISNPSVVF SGACDATAKIWDIRSKKCVQSFSGHESDINAVQFFPNGNAIGTGSDDASCRLFDLRADRELNIFTHEQV FSGITSVAFSISGRLLFGGYDDYHCHVWDTLRGERVGVLSGHENRV S CLGVSTDGMALCTGSWDNLL KVWA
Gβ3	MLAASRKAISTASKATYATAATASQITTAANGVKVASSQEPGQTASLAVVVNGGARAE S GSNAGVAHF LKNYGFKNNADRTAFRIAREAEIAGGVLSSNLSHESLVFSAELLKDDVELFAEILSDVVTKQKFQEHEFID VAHQTAESINALGNPEISAIEAAHVAFRTGLNSIFAKRTARVNNATVKSFAQSLFTSGNVALVGTGV DHEILQNLAEYLNLP S SGKL S LEATKYFGGETRIESVSNKGNVLAFFEGAALNSSEYAALQVLRQALGG EVNIKHTAGSGILAQTAAKFAEGTEIKAFNLGYSDAGLFGVQVSASTAETGAAIAAAVEQLKAVAKGL S DDFSRAVAQAKYAATAGFETRLDTLETLGAQALNSGKYTSAADAVSAFEKVTTSDVAQIAEKLFSK P T SVALGDLTTPYADSVSL

Las letras resaltadas en color **amarillo** indican el probable sitio de fosforilación por la enzima PKA.

Los resultados del análisis mostraron que las secuencias primarias de aminoácidos de cada una de las subunidades beta poseen residuos de aminoácidos como serina (S) y treonina (T) como probables sitios de fosforilación, estos residuos se han descrito que son los blancos de fosforilación por la PKA, prefiriendo a los residuos de serina sobre los de treonina (Knappe et al., 2020).

Estos datos sugieren que las subunidades beta de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* podrían ser reguladas a nivel postraduccional por la vía de la cAMP-PKA.



9.6 Efecto del nifedipino y el verapamilo sobre la velocidad de germinación y la tasa de consumo de oxígeno de las esporas de *M. lusitanicus*

Los hongos y levaduras generan señales mediadas por calcio en respuesta a estreses ambientales a través de canales de calcio compuestos esencialmente por las proteínas Cch1 y Mid1 (Hayashi et al., 2020). Así mismo, estos canales de calcio fúngicos son inhibidos parcialmente por los bloqueadores de canales de calcio de tipo-L, los fármacos nifedipino y verapamilo (Teng et al., 2008; Yu et al., 2014).

Para averiguar si este *Mucor* responde a estos fármacos, se midió la velocidad de germinación y la tasa de consumo de oxígeno de las esporas y germínulas respectivamente, como se describió en materiales y métodos para cada parámetro.

Los resultados en la figura 46, muestran que ambos fármacos inhibieron parcialmente la velocidad de germinación de las esporas (paneles A y B) y de la tasa de consumo de oxígeno de las germínulas (paneles C y D) de *M. lusitanicus* en comparación a los valores obtenidos para la cepa WT que no recibió el tratamiento, y que dicha disminución en ambos parámetros es dependiente de la concentración del fármaco.

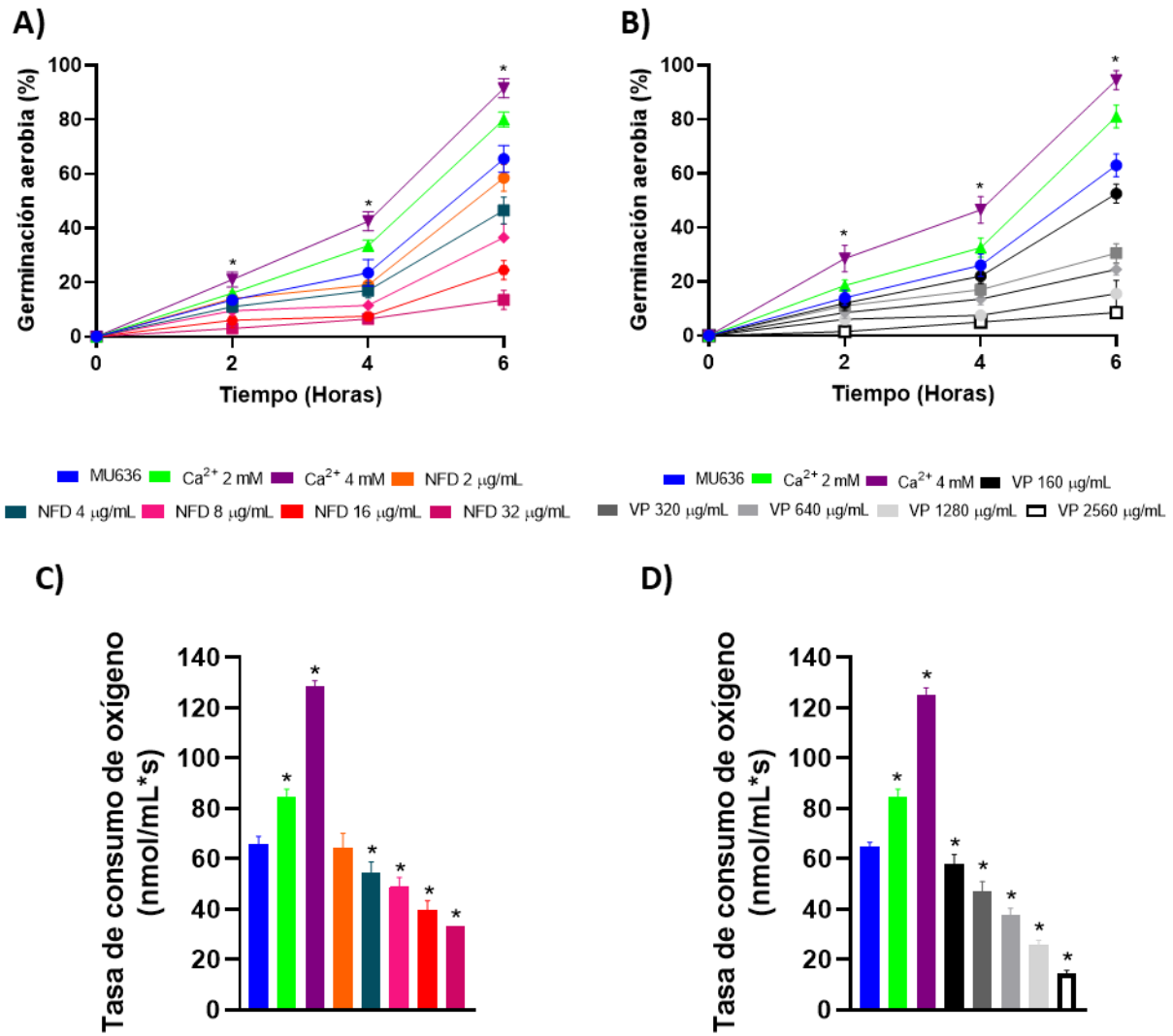
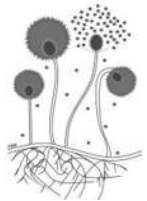


Figura 46. Efecto del nifedipino y el verapamilo sobre la velocidad de germinación y la tasa de consumo de oxígeno de las esporas de *M. lusitanicus*. Se midió la velocidad de germinación de las esporas de MU636 en el medio YPG-2 % durante 6h a 28 °C y a 150 rpm en presencia de **A)** Nifedipino (NFD) y **B)** Verapamilo (VP), y la tasa de consumo de oxígeno de las germínulas a las 4h de crecimiento en el medio YPG-2 % en presencia de **C)** NFD y **D)** VP. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n=3). Las barras corresponden al error estándar, se realizó el análisis de varianza ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnet, *p<0.05.



9.7 Identificación de proteínas formadoras de canales de calcio de alta afinidad en *M. lusitanicus*

Con la finalidad de averiguar si este Mucoral posee las proteínas que forman los HACs, se realizó la búsqueda de éstas en el portal del genoma de este Mucoral (CBS277.49 v3.0) y se realizó un BLAST proteína-proteína como se describió en materiales y métodos.

Los resultados del análisis sugieren que este Mucoral posee 4 posibles proteínas homologas a Cch1 (Cch1MI1, Cch1MI2, Cch1MI3 y Cch1MI5) y una única posible proteína homologa a Mid1 (Mid1MI). Algunas características de éstas se presentan en la siguiente tabla (Tabla 12).

Tabla 12. Características de las posibles proteínas homologas a Cch1 y Mid1 de *M. lusitanicus*

Posible proteína CCh1 en <i>M. lusitanicus</i>			
Número de acceso (NCBI)	Nombre interno en el análisis	Localización	Número de aminoácidos
KAF1800845.1	CchMI1	Hebra_07:1185382-1192487 (+)	3060
OAD00432.1	CchMI2	Hebra_07:2358046-2365554 (-)	2216
OAD00067.1	CchMI3	Hebra_07:1186480-1192025 (+)	1548
OAD00120.1	CchMI5	Hebra_07:1345939-1354479 (-)	2454
Posible proteína Mid1 en <i>M. lusitanicus</i>			
Número de acceso (Mycocosm)	Nombre interno en el análisis	Localización	Número de aminoácidos
190437	MidMI1	Hebra_06:2398606-2402757 (+)	984

Además, a través de un análisis global de la secuencia primaria de aminoácidos de estas proteínas, se obtuvo el porcentaje de identidad y similitud con la secuencia primaria de aminoácidos de las proteínas Cch1 y Mid1 de otras especies de hongos, los resultados se muestran en las tablas 13 y 14.



Tabla 13. Porcentajes de identidad y similitud de la proteína Mid1 de *M. lusitanicus* en comparación con la proteína de otras especies de hongos

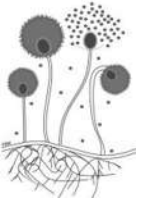
Proteína Mid1		
Microorganismo	<i>M. lusitanicus</i>	
	% Identidad	% Similitud
<i>P. blakesleeanus</i>	44.14	58.54
<i>L. corymbifera</i>	41.39	57.64
<i>J. flammicorona</i>	31.58	42.88
<i>S. pombe</i>	20.99	34.99
<i>A. niger</i>	20.82	33.91
<i>C. albicans</i>	19.66	31.5
<i>N. crassa</i>	19.39	29.45
<i>S. cerevisiae</i>	16.39	30.29
<i>C. neoformans</i>	12.94	25.37

Tabla 14. Porcentajes de identidad y similitud de las proteínas Cch1 de *M. lusitanicus* en comparación con la proteína de otras especies de hongos

Proteína Cch1								
Organismo	<i>M. lusitanicus</i>							
	<i>Cch1MI1</i>		<i>Cch1MI2</i>		<i>Cch1MI3</i>		<i>Cch1MI5</i>	
	%Id	%Sim	%Id	%Sim	%Id	%Sim	%Id	%Sim
<i>Cch1MI1</i>	100	100	15.94	28.61	50.49	50.52	13.28	26.53
<i>Cch1MI2</i>	15.94	28.61	100	100	20.07	34.59	21.70	37.46
<i>Cch1MI3</i>	50.49	50.52	20.07	34.59	100	100	16.07	30.46
<i>Cch1MI5</i>	13.28	26.53	21.70	37.46	16.07	30.46	100	100
<i>M. ambiguss</i>	64.57	65.84	21.83	38.80	73.36	74.44	17.40	34.34
<i>C. neoformans</i>	20.90	33.02	21.57	38.93	27.22	42.40	17.50	33.13
<i>Homo sapiens – TipoL-1α</i>	10.09	21.66	10.90	23.24	13.26	27.64	9.21	20.92
<i>Homo sapiens – TipoT-1α</i>	9.09	20.57	11.06	23.59	9.97	21.85	9.62	21.38

%Id = % de identidad, %Sim = % de similitud.

Los porcentajes de identidad y similitud sugieren que tanto la proteína Mid1 como las proteínas Cch1 de *M. lusitanicus* son más idénticas y similares a las proteínas de otras especies de Mucorales, que a las proteínas de otras especies de hongos.



9.8 Análisis *in silico* de los residuos conservados de cisteína-prolina en la estructura primaria de la posible proteína Mid1 de *M. lusitanicus*

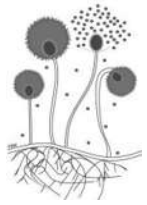
Para tener mayor certeza de que la posible proteína Mid1 de *M. lusitanicus*, sea homóloga a las ya descritas en otros hongos filamentosos, se decidió hacer un alineamiento global de las secuencias primarias de aminoácidos de las proteínas Mid1 de varias especies de hongos con la de este Mucoral, y se buscaron residuos conservados de cisteína y prolina en la mismas secuencias primarias de aminoácidos, ya que éstas se han descrito que se encuentran conservadas en el extremo carboxilo terminal de esta proteína y algunas de ellas son requeridas para la actividad funcional de Mid1 (Vu et al., 2015).

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 47.

	720	730	740	750	760			
<i>C.neofomans</i> /1-558	SSPRNP	SLPI	PAYSYYELL	PCMST	CNRADRS	CPVTMGIR	CPK	
<i>J.flammicorona</i> /1-577	RNPWIDATLS	PG	GWIELL	PCIDL	CYYVVQS	CPPFVNFA	CPQ	
<i>M.lusitanicus</i> /1-511	RNPWIDETLK	PG	EWTELL	PCIDL	CYHVVQS	CPPFMQFY	CPD	
<i>L.corymbifera</i> /1-478	RNPWIDEALE	PG	TWTELL	PCIDL	CYQVVQS	CPPFMAFN	CPK	
<i>P.blakesleeanus</i> /1-510	RNPWIDQNMT	PG	PWVELL	PCIDL	CYRVVQS	CPPFLQFN	CP I	
<i>S.cerevisiae</i> /1-548	RNDYLNKFIK	PLDDYYEIL	PCIDM	CYTLVRN	CP	SDFQFS	CPN	
<i>C.albicans</i> /1-559	RNEFLADV IQ	PNQDYEEVL	PCVNV	QAIVRD	CP	ANFGFL	CPT	
<i>S.pombe</i> /1-486	RYPLIDEVIQ	PG	PYKEVL	PCSYL	CYSLASS	CP	LDLGFAC	CPK
<i>M.crassa</i> /1-676	RSSRIDEFIK	PG	PYKEVL	PCDYL	CYRLVQS	CP	SSMGFG	CPL
<i>A.niger</i> /1-610	RNPLIDSLIR	PG	PYKEVL	PCQGV	CHSLVRN	CP	SILGF	SCPE

Figura 47. Residuos conservados de C-P en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína Mid1 de *M. lusitanicus*. Se muestra el alineamiento de las secuencias primarias de aminoácidos de la proteína Mid1 de varias especies de hongos. Los residuos conservados de cisteína (C) y prolina (P) en el extremo carboxilo terminal se encuentran resaltados en color amarillo. Marcado por un contorno de color rojo se encuentra la secuencia alineada de *M. lusitanicus*.

Los resultados del alineamiento sugieren que la proteína Mid1 de *M. lusitanicus* posee los dos motivos dipeptídicos de cisteína-prolina que se han descrito como conservados en hongos filamentosos (Vu et al., 2015).



9.9 Análisis *in silico* de los residuos y/o motivos o dominios conservados en la estructura primaria de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de *M. lusitanicus*

Al igual que para la proteína Mid1, para las probables proteínas Cch1 de *M. lusitanicus*, también se realizó un análisis informático para comprobar que dichas proteínas poseen ciertos residuos y/o motivos o dominios conservados a los cuales se les ha asociado con ciertas funciones en otras especies de hongos filamentosos.

En la figura 48 se muestra el alineamiento y la identificación de 3 residuos de ácido glutámico (E) en las secuencias primarias de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de *M. lusitanicus* y que concuerdan con el alineamiento de las de otras especies de hongos en el análisis y con los canales de calcio de tipo-L de humanos. Se ha descrito que estos residuos ácidos son el sitio de unión del ion Ca^{2+} en el poro del canal, y que contribuyen a su selectividad iónica. En mamíferos está formado por 4 residuos de ácido glutámico y en los hongos por 3 residuos, formando el motivo EEEE y N/QEEE respectivamente (Prole & Taylor, 2012).

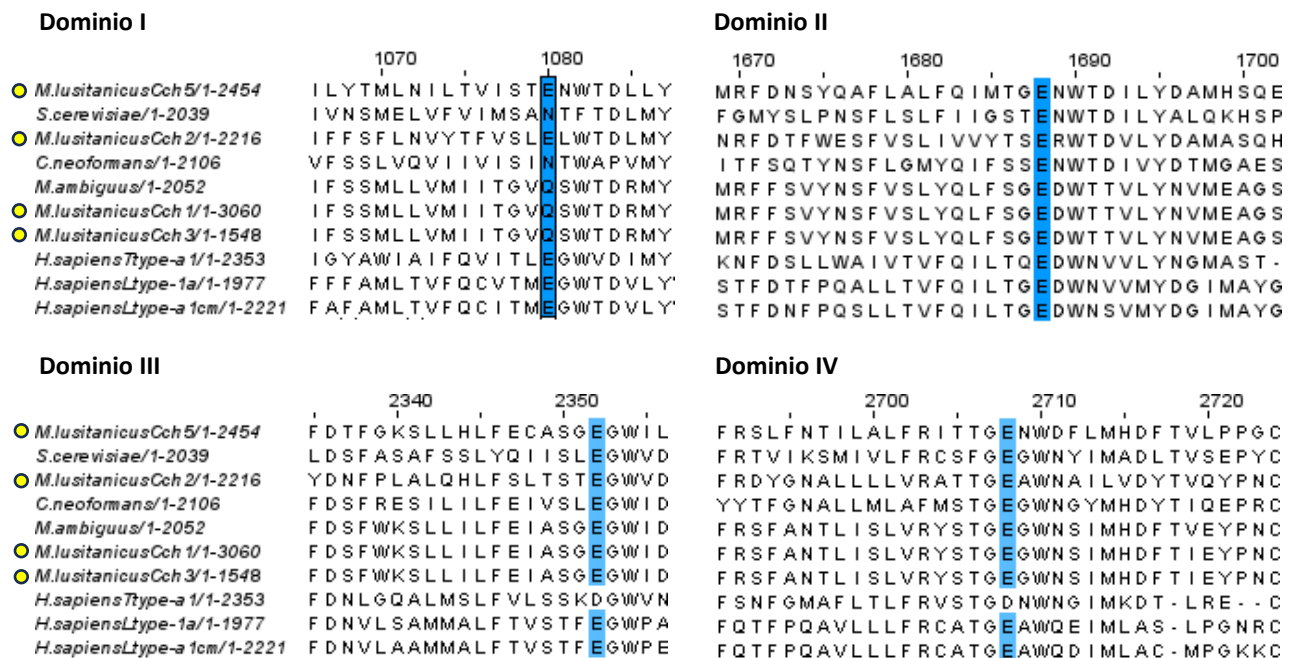


Figura 48. Residuos conservados de ácido glutámico (E) en las secuencias primarias de aminoácidos de las posibles proteínas Cch1 de *M. lusitanicus*.



X. DISCUSIÓN

M. lusitanicus posee genes que codifican a 3 subunidades beta (Gpb1-Gpb3) y 3 genes que codifican a 3 subunidades gama (Gpg1-Gpg3) de proteínas G heterotriméricas (Valle-Maldonado et al., 2015), siendo el gen *gpb1* el más estudiado y al cual se le ha asociado como un regulador positivo del crecimiento micelial en este Mucoral a bajas condiciones de oxígeno a través de la vía de la PKA, además, este gen es esencial para su virulencia (Valle-Maldonado et al., 2020). En este trabajo se observó la participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1 en la percepción de señales extracelulares de calcio y su respuesta a distintos parámetros fisiológicos relacionados con el metabolismo oxidativo mitocondrial y virulencia de este Mucoral.

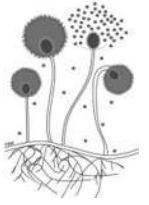
El calcio extracelular cumple un papel esencial en distintos procesos celulares en los hongos filamentosos, entre los que se destacan el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la tolerancia a condiciones de estrés, en la virulencia (Roy et al., 2020), en la regulación del ciclo celular, en la esporulación (Wang et al., 2012), en el crecimiento de la punta hifal, así como para el establecimiento y mantenimiento del crecimiento direccional de la hifa (Yu et al., 2012). Dado que a las proteínas G heterotriméricas se les ha asociado con un rol activo en la transducción de señales extracelulares a respuestas intracelulares por diversos estímulos como la luz, protones, Ca^{2+} , aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, entre otros (Xue et al., 2008), se decidió evaluar si las subunidades Gpb1-Gpb3 y Gpg1-Gpg3 de *M. lusitanicus* respondían a señales extracelulares de calcio. Los datos mostraron una participación principal de las subunidades Gpb1 y Gpg1.

Al evaluar el crecimiento radial de las mutantes en proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en el medio sólido YPG-2 % no se observó ningún defecto en su crecimiento comparado con el de la cepa WT. Esto puede ser explicado en parte por el hecho de que las deleciones de genes individuales a menudo no muestran fenotipos fácilmente detectables porque otros genes pueden realizar funciones similares por redundancia, por compensación o por otra causa dentro de la célula y, por lo tanto, pueden “enmascarar” la ausencia del gen de interés (Goranov &



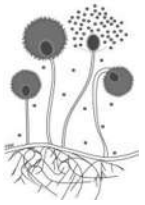
Madhani, 2014). Recordando que, la mayoría de los hongos filamentosos poseen 1 única subunidad G β y 1 única subunidad G γ (Li et al., 2007b), y que *M. lusitanicus* posee 3 subunidades G β y 3 subunidades G γ (Valle-Maldonado et al., 2015). Por lo que posiblemente, algunas de ellas podrían tener funciones similares o compensatorias en ausencia de alguna otra. Posiblemente la sobreexpresión de los genes o la construcción de cepas dobles mutantes (Sopko et al., 2006) podrían aclarar la función específica asociada a cada subunidad en particular. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la esencialidad de un gen depende del contexto; por lo tanto, un gen puede ser esencial solo bajo un conjunto dado de condiciones de crecimiento, pero no bajo otras condiciones. Por lo tanto, la dependencia del contexto de la esencialidad se puede extender desde los medios de cultivo a otros parámetros de crecimiento como la temperatura, la exposición a la luz, la humedad relativa, entre otros (Dikicioglu et al., 2013). Esto sugiere que el contexto evaluado no fue relevante para encontrar algún defecto en el crecimiento de las mutantes en proteínas G heterotriméricas de este Mucoral.

Teniendo en cuenta que la concentración de calcio fuera de la célula es tan alta como >100 mM (Chin & Means, 2000; Liu et al., 2015), mientras que la concentración basal de calcio libre en el citosol ($[Ca^{2+}]_c$) en los hongos filamentosos se mantiene alrededor de ~50-200 nM (Iida, Yagawa & Anraku, 1990; Halachmi & Eilam, 1993), y que en la literatura se encontró que las concentraciones de calcio evaluadas para estudiar su efecto en el crecimiento, esporulación, virulencia y otros procesos biológicos en especies de hongos filamentosos como *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *A. fumigatus*, *C. purpurea*, entre otros, rondan en el rango de **1-200 mM** (Halachmi & Eilam, 1989; Bormann & Tudzynski, 2009; de Castro et al., 2014). El crecimiento radial en el medio YPG-2 % mostró que *M. lusitanicus* tiene una alta tolerancia a la sal de CaCl₂, siendo las concentraciones de 2, 4, 16 y 60 mM de CaCl₂ las que tuvieron un efecto significativo (*p<0.05) sobre el crecimiento radial de la cepa WT; mientras que concentraciones superiores (0.1-0.5 M) limitaron el crecimiento o lo abolieron por completo (1 M y 2 M). También se observó un aumento significativo (*p<0.05) en su esporulación con las concentraciones de 2 mM y 4 mM de CaCl₂. Los resultados obtenidos fueron similares a lo descrito para

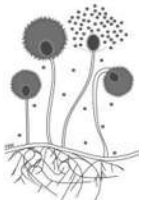


otras especies de hongos filamentosos como *Botrytis cinerea*, en el que la concentración de 1 mM de CaCl_2 estimuló significativamente ($*p<0.05$) el crecimiento micelial (radial) y la producción de conidios en el medio PDA, mientras que una concentración de 2.7 mM de este ion inhibió su crecimiento (Boumaaza et al., 2015). Para *Botryosphaeria dothidea* se reportó que una concentración de 9 mM de CaCl_2 aumentó significativamente ($*p<0.05$) su crecimiento radial comparado con el control (Biggs, 2004). Por otro lado, distintos estudios han reportado que la naturaleza de la sal de calcio y las altas concentraciones de este ion pueden suprimir el crecimiento de diversos hongos filamentosos como *Monilinia fructicola* (Biggs et al., 1997), *Penicillium expansum*, *Glomerella cingulata*, *B. cinerea* (Conway et al., 1992) y *Alternaria alternata* (Maouni et al., 2007). En cuanto a otras especies de Mucorales, Tian et. al. (2002) documentaron que solo la concentración de 180 mM de CaCl_2 inhibió significativamente ($*p<0.05$) el crecimiento y la germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* en el medio PDA. Los datos obtenidos para *M. lusitanicus* y la información bibliográfica sugieren que las distintas especies de hongos filamentosos responden de manera distinta al CaCl_2 , en algunos estimula su crecimiento y algunos otros son menos tolerantes afectando su crecimiento.

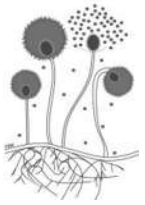
En cuanto a la esporulación, las condiciones extracelulares que promueven la esporulación incluyen el agotamiento de nutrientes, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, el estado de carbono y nitrógeno, la señalización por calcio, el pH y otros (Ajmal et al., 2022). En hongos filamentosos se ha documentado que algunas sales de calcio han sido usadas para inducir la esporulación, por ejemplo, se ha usado el agar agua suplementado con 30 g/L de CaCO_3 para aumentar significativamente ($*p<0.05$) la esporulación de *Alternaria solani*, *A. alternata* y *A. dauci*, y algo interesante de esto, fue que solo el CaCO_3 y no el CaCl_2 , ni el Na_2CO_3 , fue el responsable de la esporulación, además también concluyeron que ni la glucosa, ni la fuente de nitrógeno (extracto de levadura o casaminoácidos) son responsables de la esporulación a corto plazo (Shahin & Shepard, 1979; Masangkay et al., 2000). En especies de *Penicillium notatum* y *P. cyclopium* una concentración de 2.5 mM de CaCl_2 aumento significativamente ($*p<0.05$) la producción de conidios en medio



líquido (Ugalde & Pitt, 1986). La manera en que el calcio tiene un efecto sobre la esporulación en hongos filamentosos aún no ha sido resuelta, sin embargo, la evidencia experimental sugiere que el sitio principal de acción del calcio no necesariamente es intracelular (Hadley & Harrold, 1958). Existe la teoría de que los iones de calcio podrían unirse a la membrana plasmática, cambiando sus propiedades funcionales resultando en la inducción de la esporulación (Ugalde & Pitt, 1986). Ugalde et al. (1990) demostraron que la exposición de protoplastos de *P. cyclopium* a una concentración 10 mM de CaCl_2 fue suficiente para aumentar significativamente ($*p < 0.05$) la conidiación, y que la presencia de un quelante de calcio como el BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) podía revertir el efecto, aunque señalaron que queda por aclarar si la señal de calcio se transduce a la célula a través de un segundo mensajero o por el propio catión (Ugalde, Virto & Pitt, 1990). Coutinho & Correa (1999), demostraron que la inducción de la esporulación del hongo acuático *Blastocladiella emersonii* es absolutamente dependiente del calcio extracelular. Demostraron que las células vegetativas del hongo obtenidas de medios con o sin calcio no esporulan al ser transferidas a medios carentes de calcio o con CaCl_2 y la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EGTA). Lo mismo sucedió con el uso de bloqueadores de canales de calcio como el CoCl_2 y nifedipino, con el ionóforo A23187 y con los antagonistas de la calcineurina, trifluoperazina y clorpromazina al estar presentes en los cultivos al menos 60 minutos después de la inducción. Por lo que concluyeron que el calcio acumulado intracelularmente durante el crecimiento vegetativo no fue suficiente o no se movilizó para iniciar la esporulación, y que es posible que se produzca una entrada de calcio mediada por canales de calcio de alta afinidad (HACS), esenciales para la respuesta. También sugirieron que una proteína similar a la calmodulina media los eventos de calcio en la esporulación. Nuestros resultados mostraron que el CaCl_2 estimuló significativamente ($*p < 0.05$) la esporulación de *M. lusitanicus* en el medio YPG-2 %, sin embargo, desconocemos el mecanismo por el cual este proceso es estimulado, por lo que en el futuro sería interesante elucidar el mecanismo por el cual tiene su efecto.



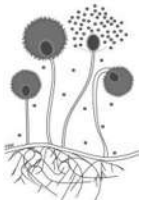
Tomando en cuenta los resultados de estos experimentos y con la información de la literatura se decidió hacer uso de las concentraciones 0.5 mM, 2 mM y 4 mM de CaCl_2 en los experimentos posteriores involucrando a las mutantes en proteínas G heterotriméricas, ya que fueron las concentraciones mínimas a las que se observó un efecto significativo ($*p < 0.05$) sobre el crecimiento de este Mucoral, y además dichos valores se encuentran por debajo, dentro y superiores del rango de las concentraciones normales de calcio presentes en la sangre humana 8-10 mg/dL (2-2.5 mmol/L) (Yee, 2007), siendo esto relevante, ya que las especies de Mucorales causantes de mucormicosis se caracterizan por ser angioinvasivas (Patil et al., 2016) y existen casos aislados documentados de mucormicosis en el que los pacientes presentaron hipercalcemia > 10.5 mg/dL (> 2.6 mmol/L) (Chi et al., 2015; Terk et al., 1992; Ukoha & Nguyen, 2021; Yee, 2007), lo que sugiere que la mucormicosis podría ser una causa infecciosa de hipercalcemia no dependiente de la hormona paratiroidea (PTH) (de Lucena et al., 2024). Igualmente, también existen casos reportados de mucormicosis en los que se encontraron depósitos de oxalato de calcio monohidratado, dihidratado y carbonato de calcio asociados con elementos fúngicos en el parénquima pulmonar, en el cartílago bronquial, en las paredes de los vasos sanguíneos y otros tejidos (Madiwale, Murlidharan & Hase, 2008; Rassaei et al., 2009; Reyes & Rippon, 1984), lo que muestra que las infecciones fúngicas y la deposición de oxalato de calcio no se limitan a la aspergilosis (Payne et al., 2017). El estudio de estas concentraciones de calcio fue relevante para observar si el calcio de alguna forma (aún desconocida) promueve la patogénesis de este Mucoral. A pesar de que las concentraciones seleccionadas fueron relativamente altas comparadas con las concentraciones citosólicas de calcio en el citoplasma de los hongos filamentosos, hay que tomar en cuenta que no todo el calcio suplementado en los medios de cultivo se encuentra disponible, ya que se ha descrito que los hongos filamentosos utilizan sistemas de regulación, en la que se incluyen distintos tipos de proteínas de membrana plasmática y otros ubicados en distintos orgánulos como las vacuolas, las mitocondrias y el retículo endoplasmático que pueden regular las concentraciones intracelulares de calcio (Cai y Clapham, 2012). Aunque las concentraciones de calcio seleccionadas fueron



altas, la propia célula y el medio limitan la concentración del ion y su biodisponibilidad.

En los experimentos en los que se evaluó el efecto del calcio sobre el crecimiento radial de las mutantes en proteínas G heterotriméricas se observó que la mayoría respondió al estímulo por calcio al igual que lo hizo la cepa WT, sin embargo, la mutante $\Delta gpg3$ disminuyó su crecimiento radial significativamente (* $p < 0.05$) en comparación de la cepa WT. Esto fue interesante, ya que, sin el tratamiento con calcio, dicha mutante no presentó un fenotipo diferente al resto de las mutantes o a la cepa WT, y se esperaba el mismo comportamiento. Esto sugiere que la mutación del gen *gpg3* es esencial para la tolerancia a altas concentraciones de calcio, y que su mutación probablemente afecta sistemas encargados de mantener concentraciones basales de este catión al interior de la célula para evitar su citotoxicidad (Biggs, 2004). Verificar esto en el futuro, sería de interés.

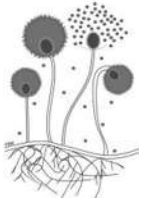
El EDTA, en hongos patógenos de humanos tiene una variedad de actividades antifúngicas dependiendo de la especie, una de ellas es la quelación del calcio extracelular, previniendo su ingreso a la célula causando daño y la muerte eventual (Yang et al., 2023). En nuestro caso, la concentración de 0.2 mM de EDTA afectó significativamente (* $p < 0.05$) el crecimiento radial de la cepa WT y de las cepas mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* e interesantemente el crecimiento en la presencia de esta molécula fue diferente al control, siendo de color blanco el tapete que se formó. Además, la mutante $\Delta gpg3$ fue mucho más sensible a su efecto, creciendo mucho menos. Estos datos son consistentes a los realizados en otras especies de hongos como *B. cinerea*, *C. albicans* y *Geotrichum candidum* en los que una concentración de 75 mM de EDTA inhibió significativamente su crecimiento (Talibi et al., 2015). En cuanto a *M. lusitanicus*, el crecimiento de las colonias jóvenes tiende a ser de color amarillo tornándose de un color gris por la aparición de esporas en la superficie (Papp et al., 2006; Fazili et al., 2022). Este color amarillo del crecimiento se ha asociado a la acumulación de β -caroteno al ser expuesta a la luz (Navarro, Sandmann & Torres-Martínez, 1995; Fraser et al., 1996), mientras que las colonias



pueden llegar a ser de color blanco en ausencia de luz debido a la poca acumulación de β -caroteno (Zhang et al., 2016). En cuanto a nuestros datos, descartamos por completo que el color blanco de las colonias en presencia de EDTA se deba a la falta de exposición a la luz, ya que las placas estuvieron expuestas a 12 horas/día de luz dentro del laboratorio, y los controles tanto para la cepa WT como de las mutantes bajo estas condiciones de exposición siempre tuvieron un color amarillo característico. Este color de la colonia tras el tratamiento con EDTA concuerda por lo descrito por Liu et al., (2022), quienes describieron que una concentración de 0.5 mM de esta molécula causó que la colonia originalmente verde de *Aspergillus flavus* se tornara de color blanco totalmente. Estos resultados sugieren que las mutaciones en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas no participan en la pigmentación de las colonias y que probablemente el EDTA puede quelar iones que son importantes para el crecimiento y la producción de β -carotenos de este Mucoral.

En cuanto al crecimiento reducido de la mutante $\Delta gpg3$ en presencia de calcio o EDTA, en comparación del crecimiento de la cepa WT y del resto de las mutantes, se puede inferir que probablemente su mutación afecta de alguna manera (desconocida) a la integridad de la membrana plasmática incrementando su permeabilidad, lo que se traduciría en un menor control de las sustancias extracelulares que ingresan a la célula, incrementando su sensibilidad y susceptibilidad a los tratamientos con calcio y EDTA, y por eso probablemente creció menos. Algo similar ha sido reportado para *A. flavus* en el que se evaluó el efecto del EDTA, mostrando un efecto inhibitorio en su crecimiento micelial y la formación de conidios a través de un aumento de la autofagia y la apoptosis mediada por esta molécula (Liu et al., 2022). Queda por corroborar si algo similar sucede en esta mutante de *Mucor spp.*

El crecimiento de las hifas de los hongos filamentosos se da principalmente por la extensión de la punta hifal, el cual se caracteriza por un equilibrio dinámico entre la síntesis y la expansión de la pared celular y la membrana plasmática y de la aplicación de fuerzas expansivas derivadas de la fuerza de turgencia o del citoesqueleto, procesos que son dependientes de iones Ca^{2+} (Jackson & Heath,



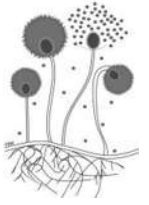
1993). Cada hifa fúngica está rodeada por una pared celular que le provee con fuerza mecánica y la protege de cambios bruscos de presión osmótica y de los impactos estresantes del medio ambiente. Esta estructura es dinámica y constantemente se renueva y cambia en respuesta a las condiciones que la rodean, permitiendo su crecimiento (Mogilnaya et al., 2017). El crecimiento ocurre mediante la biosíntesis apical y la remodelación de los componentes de polisacáridos, procesos que involucran el abastecimiento direccional y coordinado del material necesario para la formación de membrana plasmática y el crecimiento de la pared celular. Los cambios morfogénéticos inician cuando la espora comienza a crecer isotrópicamente durante las primeras horas de hidratación; poco después, se rompe la simetría, el crecimiento comienza a ser polarizado y el resultante tubo germinativo continúa extendiéndose apicalmente por crecimiento polarizado hasta convertirse en una hifa madura. Las ramificaciones de la hifa desde compartimentos subapicales genera nuevas puntas hifales capaces de fusionarse unas con otras para generar el micelio (Riquelme y Martínez-Núñez, 2016). El Spitzenkörper (Spk) es el elemento más importante del ápex en las hifas de hongos filamentosos, consiste en una conspicua acumulación de vesículas, ribosomas, microfilamentos de actina, iones y otro material amorfo que abastece a la punta hifal en crecimiento (Mogilnaya et al., 2017; Webster y Weber, 2007). Una alta densidad de canales de calcio en la membrana plasmática en la zona del ápex de la punta hifal permite el establecimiento de un gradiente de calcio en colaboración con el secuestro de calcio por varios orgánulos subapicales tales como las vacuolas, las mitocondrias y el retículo endoplasmático para permitir el crecimiento (Jackson & Heath, 1993; Webster y Weber, 2007).

Los resultados del crecimiento evaluados, que incluyó la velocidad de germinación a condiciones estándar de oxígeno, a bajas concentraciones de oxígeno y la producción de biomasa de la cepa WT y de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* en presencia de calcio (2 y 4 mM) mostraron que este ion tuvo un efecto significativo (* $p < 0.05$) aumentando estos parámetros de crecimiento, afectando también la morfología de las células en las que se observó que la célula madre presentaba hiperfilamentación,



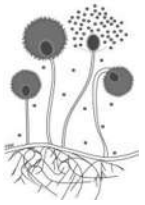
ramificaciones e hifas más alargadas en comparación del control y que el EDTA interesantemente también aumento significativamente ($*p<0.05$) la velocidad de germinación, pero afecto la morfología de las hifas, las cuales presentaron una célula madre pequeña y una única hifa de tamaño pequeño. El crecimiento dependió de un metabolismo oxidativo mitocondrial, ya que la adición de calcio en el medio de cultivo tuvo un mayor efecto en el crecimiento en los medios que estimulan este tipo de metabolismo, como el YNB-0.1 % (Alejandre–Castañeda et al., 2022), Vogel-0.1 %, YNG-111 mM y VG-111 mM, los cuales contienen una baja concentración de glucosa y una fuente de nitrógeno inorgánico o glicerol como fuente de carbono no fermentable respectivamente, para forzar a las células a usar exclusivamente su metabolismo oxidativo mitocondrial. El uso del glicerol 111 mM permitió observar con mayor claridad, que el calcio tuvo un efecto sobre el la velocidad de germinación, la cual dependió de un metabolismo oxidativo mitocondrial, ya que el metabolismo de este compuesto es llevado a cabo por la mitocondria para que pueda entrar a las rutas metabólicas que la transformaran en energía y sea aprovechada en estos procesos celulares, demostrando que la adición extracelular de calcio aumentó significativamente ($*p<0.05$) el crecimiento en comparación del control. Los datos sugieren que el aumento en el crecimiento a través del metabolismo oxidativo mitocondrial de *M. lusitanicus* mediado por calcio dependió principalmente de las subunidades Gpb1 y Gpg1, ya que su ausencia no mostró efecto alguno sobre el crecimiento en presencia de este ion. Por otra parte, la mutación en $\Delta gpg3$ mostró ser muy sensible a altas concentraciones de calcio (2 y 4 mM) en todos los parámetros de crecimiento evaluados, y que en apartados anteriores se describió la probable explicación de ello.

La velocidad de germinación es el tiempo que le toma a la espora para hincharse hasta el momento en que existe la emergencia del o de los tubos germinativos (Boonruang y Lerkkasemsan, 2023). En nuestro caso, la emergencia de tubos germinativos de las esporas de la cepa WT y de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* (a excepción de las mutantes $\Delta gpb1$, $\Delta gpb2$ y $\Delta gpg3$) fue significativamente mayor ($*p<0.05$) en la presencia de calcio (2 y 4 mM) a partir de la hora 2 y manteniéndose así hasta la



hora 8 de crecimiento, siendo más evidente en los medios usados para estimular el metabolismo oxidativo mitocondrial, en comparación con el control. Los experimentos de generación de biomasa mostraron que el efecto del calcio a las concentraciones de 0.5, 2 y 4 mM se mantenía al menos hasta la hora 96 de crecimiento, que fue el tiempo mayor evaluado. Nuestros datos concuerdan con lo descrito por Saavedra-Molina et al. (1990), Robson et al. (1991) y Jackson & Heath (1989), quienes describieron que el incrementar las concentraciones externas de calcio generalmente resulta en un aumento en la tasa de extensión de la hifa con una morfología normal y en menor frecuencia con hifas ramificadas. Interesantemente la concentración de 0.2 mM de EDTA aumentó significativamente (* $p < 0.05$) la velocidad de germinación de las esporas de *M. lusitanicus*, lo que contrasta con la literatura revisada en la que se demuestra que esta molécula inhibió la germinación de las esporas de algunas especies de hongos (de Lucca, 2006; Yang et al., 2023). Lo único que concuerda es la morfología de las células al crecer en presencia de esta molécula, tal y como se describió para especies de *Neurospora spp.* (Saavedra-Molina et al., 1990), *Fusarium spp.* (Robson et al., 1991) y *Saprolegnia spp.* (Jackson & Heath, 1989), en las que sus hifas mostraron una marcada reducción en su tasa de extensión caracterizada por ser anormal, resultando en una morfogénesis irregular de las hifas como en nuestro caso.

Nuestros datos también concuerdan con lo reportado por el grupo de trabajo del Dr. Volha Shapaval en los últimos años, en los que han mostrado que la naturaleza del nitrógeno presente en el medio y la concentración de fósforo inorgánico modulan en primera instancia el crecimiento de diferentes especies de hongos pertenecientes al filum *Mucoromycota*, resaltando que una fuente de nitrógeno inorgánica como el sulfato de amonio y altas concentraciones de fósforo inorgánico aumentaron significativamente la producción de biomasa en estos hongos (Dzurendova et al., 2020a; Dzurendova et al., 2020b), recordando que el medio Vogel que usamos fue suplementado con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y altas concentraciones de fósforo inorgánico, y que además mostraron que metales como el Mg y el Zn son iones esenciales para el crecimiento y la actividad metabólica de este Mucoral, que un aumento en las concentraciones de Fe inhibieron su



crecimiento, que la concentración de calcio en el medio es importante para la acumulación de lípidos y polifosfatos, y que un incremento significativo en la producción de biomasa se observó a altas concentraciones de calcio en el medio (Dzurendova et al., 2020c; Dzurendova et al., 2021) en concordancia con nuestros resultados. Nuestros resultados sugieren que el crecimiento de tipo hifal de este Mucoral está mediado por un metabolismo de tipo oxidativo, que incrementa al estar presente el calcio en altas concentraciones, siendo esencial la presencia de las subunidades Gpb1 y Gpg1, reflejándose en un aumento en la producción de biomasa al usar glicerol como única fuente de carbono en presencia de calcio.

El crecimiento de *C. albicans* bajo condiciones limitantes de oxígeno puede regular la morfogénesis (Setiadi et al., 2006). Valle-Maldonado et al. (2020) describieron que la concentración disuelta de oxígeno en el medio condiciona la morfogénesis de *M. lusitanicus*, encontraron que una concentración de 7.3 ± 0.56 % de oxígeno genera una mezcla de morfologías de este Mucoral, siendo aproximadamente un 80 % hifas y 20 % de levaduras, cuando a condiciones estándar de oxígeno disuelto en el medio se genera un 100 % de hifas. Además, describieron que Gpb1 es un regulador positivo del crecimiento filamentoso de *M. lusitanicus* a bajas concentraciones de oxígeno. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que el calcio es un regulador de la morfogénesis a bajas concentraciones de oxígeno, estimulando significativamente ($*p < 0.05$) la morfología de tipo hifal en presencia de altas concentraciones de calcio, además de que a la par de Gpb1, Gpg1 igualmente es necesaria para poder percibir el estímulo por calcio a bajas condiciones de oxígeno. Estos datos son relevantes, dado que las infecciones mediadas por hongos patógenos de humanos y la eficacia de los fármacos antifúngicos se ven significativamente afectados por el microambiente dinámico de la infección, en el que el oxígeno suele ser limitante e induce una respuesta de hipoxia tanto en el hongo patógeno como en las células del hospedero, contribuyendo a la patogénesis, la virulencia, la susceptibilidad a fármacos y en última instancia, el desenlace de la infección (Puerner et al., 2023). Sería interesante en el futuro, estudiar cómo el calcio a bajas concentraciones de oxígeno puede modular la infección en especies de Mucorales causantes de mucormicosis.



Especies de *Mucor spp.* como *M. lusitanicus*, *M. circinelloides*, *M. rouxii*, *M. racemosus*, entre otros, exhiben dimorfismo, lo que significa que pueden crecer en dos formas morfológicas, la de tipo hifal y la de tipo levaduriforme. La morfología de tipo hifal de *M. lusitanicus* se ha asociado a un metabolismo de tipo oxidativo, en el que la concentración y la naturaleza de la fuente carbono (azúcares fermentables o no fermentables) (Bartnicki-Garcia & Nickerson, 1962), el oxígeno y la respiración celular son indispensables para el desarrollo de esta morfología (Orlowski, 1991). Lee et al. (2013) a través de la mutación del gen que codifica a la subunidad regulatoria B de la calcineurina (*cnbR*) encontraron que existe una correlación entre la morfología y la virulencia de este Mucoral, ya que las mutantes en el gen *cnbR* exhibieron exclusivamente la morfología de crecimiento de tipo levaduriforme, las cuales también fueron menos virulentas que la cepa WT en el modelo de *G. mellonella*. Sus resultados también mostraron que la vía de la calcineurina tiene un rol importante en las transiciones dimórficas y que existe una relación entre esta vía y la respiración de este Mucoral. El oxígeno es el sustrato más utilizado en las reacciones metabólicas y es fundamental para la biosíntesis de distintos metabolitos (Raymond & Segrè, 2006). También es un aceptor terminal de electrones termodinámicamente eficiente que se utiliza para generar energía química. Al igual que la mayoría de los organismos eucariotas, los hongos filamentosos usan la cadena transportadora de electrones convencional para la generación de energía, la cual es la vía más eficiente para producir energía en forma de ATP (Grahl et al., 2012).

Los resultados que obtuvimos de evaluar el efecto que tuvo el calcio e inhibidores de la cadena transportadora de electrones convencional sobre la tasa de consumo de oxígeno de *M. lusitanicus* mostraron que el calcio desde la concentración 0.5 mM tuvo un efecto positivo y significativo ($*p < 0.05$) sobre este parámetro, aumentando la respiración en comparación al control, siendo este aumento mucho más evidente a la concentración de calcio más alta evaluada (4 mM). Así mismo, también se observó que el calcio tuvo un efecto aún mayor en los medios que estimulan el metabolismo oxidativo mitocondrial (YNB-0.1 %, VG-0.1 % y VG-111 mM), en comparación de aquellos que estimulan tanto el metabolismo oxidativo como el

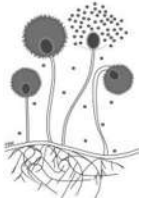


fermentativo (YPG-2 %) o el metabolismo fermentativo (YPG-6 %). Los inhibidores de la cadena respiratoria, el KCN y la AA, mostraron que comprometen la respiración de este Mucoral, y la adición de calcio en presencia del inhibidor restableció sólo parcialmente este parámetro. Por otro lado, se observó que las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ respiran mucho menos que la cepa WT y que la presencia de calcio no aumentó su respiración al permanecer insensibles. La mutante $\Delta gpg3$ mostro una tasa de consumo de oxígeno mayor a la cepa WT, pero en presencia de calcio disminuyó drásticamente. El resto de las mutantes se comportaron de manera similar a la cepa WT. Nuestros datos son concluyentes con los descrito por Balcavage et al. (1974), quienes describieron que altas concentraciones de calcio extracelular, en el rango de 1-10 mM fueron suficientes para estimular la respiración de mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae* y de *C. utilis*, y que la respiración se vio afectada por la presencia de AA.

Vilas-Boas et al. (2023) demostraron que el calcio basal dentro de las mitocondrias de hepatocitos debe permanecer en cierta concentración para no dañar la célula y al mismo tiempo debe ser suficientemente alta para maximizar la eficiencia de la cadena transportadora de electrones. Si bien en *Mucor spp.* desconocemos hasta el momento cual es la concentración óptima de calcio que mejora la eficiencia de la cadena transportadora de electrones, nuestros resultados indicaron que la concentración de 4 mM de calcio fue la que tuvo el mayor aumento significativo (* $p < 0.05$) en la respiración sin un daño aparente en la célula. Además, nuestros datos sugieren la posible existencia de sistemas alternativos de respiración en este Mucoral. Diversas especies de plantas y hongos filamentosos poseen sistemas de respiración alternativos a la cadena de transporte de electrones, incluyendo NADH: ubiquinonas oxidorreductasas alternativas, que actúan en paralelo con el complejo I, la proteína desacopladora (UCP) y una oxidasa alternativa catalizando la transferencia de electrones desde la ubiquinona reducida directamente al oxígeno, evitando la vía respiratoria principal del citocromo (Johnson et al., 2003). La oxidasa alternativa (AOX) es una enzima localizada en la membrana interna de la mitocondria (Joseph-Horne et al., 1998). Esta vía alternativa es insensible al KCN, la AA y al mixotiazol y permite la respiración cuando la vía clásica se encuentra

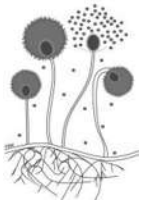


inhibida (Akhter et al., 2003; Huh & Kang, 2001). En los Mucorales se ha descrito a *P. blakesleeanus* como un hongo filamentoso estrictamente aerobio, en el que la oxidasa alternativa le permite sobrevivir y generar energía para su metabolismo esencial bajo condiciones de hipoxia o anoxia en condiciones de cultivo en presencia de inhibidores de la cadena transportadora de electrones a largos periodos de tiempo (Stanić et al., 2013). Se ha racionalizado que el mecanismo por el cual la AOX de este organismo le permite sobrevivir bajo esa deficiencia de oxígeno probablemente se da mediante la protección contra las ERO, permitiendo la redirección del flujo de electrones provenientes de fosas de ubiquinona, previniendo de esta forma la muerte de la célula, como se ha estudiado en células de soya (Amora et al., 2000). En *M. rouxii*, un hongo dimórfico estrechamente relacionado con *M. lusitanicus* y con *P. blakesleeanus*, se demostró que la respiración del micelio cultivado en condiciones de aerobiosis fue sensible al KCN, mientras que en condiciones de anaerobiosis la respiración fue sensible parcialmente. Además, las células cultivadas en condiciones de anaerobiosis mostraron niveles más bajos de los citocromos b y c, y ninguna de citocromos aa3 (Cano-Canchola et al., 1988; Salcedo-Hernández et al., 1994), lo que indicó un mayor uso de la vía alternativa bajo estas condiciones de crecimiento. Nuestros datos y la información presentada sugieren la posible existencia de una oxidasa alternativa en *M. lusitanicus*, que de ser posible, explicaría por qué este Mucoral sigue respirando aún en presencia de los inhibidores KCN y AA. Es necesario probar esta hipótesis, aunque se haya reportado que la AOX se encuentra ausente en la mayoría de los hongos filamentosos que pueden hacer fermentación aerobia (organismos Crabtree-positivos) tal es el caso de este Mucoral (Homa et al., 2022; Lübbehüsen et al., 2004; Rangel-Porras et al., 2019.), aunque existen excepciones (Veiga et al., 2000). Nuestros datos también sugieren que las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ probablemente tienen algún defecto en algún punto de su metabolismo oxidativo, principalmente aquellos que están involucrados con la respiración celular, ya que fueron insensibles al estímulo por el calcio extracelular, lo que se vio reflejado como una menor tasa de consumo de oxígeno y sin un cambio aparente al recibir dicha señal extracelular.



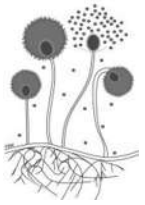
Estos datos son relevantes, ya que si se demuestra que *M. lusitanicus* u otra de las especies clínicas causantes de mucormicosis poseen una o varias oxidasas alternativas se podría desarrollar más investigación para el desarrollo de tratamientos farmacológicos dirigidos a este posible blanco molecular y hacer frente a esta infección fúngica, tomando ventaja en el hecho de que los humanos no poseen oxidasas alternativas (Akhter et al., 2003).

La señalización por calcio interactúa con otros sistemas de señalización, tal es el caso de las ERO. Estas moléculas actúan como moléculas de señalización involucradas en varios procesos celulares como el crecimiento y la muerte celular. Se generan durante el metabolismo celular por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, por NADPH oxidasas, mieloperoxidasas, citocromo P450 y otros, que interesantemente también son regulados por calcio (Richter et al., 1988). Se cree que los dos sitios de producción de ERO están en el complejo I y III (Poyton et al., 2009). Las interacciones entre el calcio y las ERO pueden considerarse de tipo bidireccional, dado que las ERO pueden regular la señalización celular por calcio, mientras que la señalización por calcio es esencial para la producción de ERO y la fosforilación oxidativa en la mitocondria, se ha sugerido que el aumento en la tasa metabólica consumiría más oxígeno, lo que resultaría en una fuga de electrones de la cadena respiratoria y los niveles de ERO (Brookes et al., 2003; Gordeeva et al., 2003; Zhang et al., 2013). En este sentido, se evaluó el efecto que tuvo el calcio sobre la producción de ERO en las cepas mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas y en la cepa WT de *M. lusitanicus* en los medios que estimulan el metabolismo oxidativo. Los resultados mostraron que solo la concentración de 4 mM de calcio fue capaz de incrementar significativamente (* $p < 0.05$) el radical $\text{OH}\cdot$, teniendo en cuenta que este fue el único radical evaluado. En cuanto a las mutantes, $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ presentaron niveles de $\text{OH}\cdot$ mucho más bajos que el de la cepa WT y no respondieron al calcio, por otra parte, la mutante $\Delta gpg3$ mostró una mayor producción de $\text{OH}\cdot$ en comparación a la cepa WT, pero disminuyó drásticamente tras el tratamiento con calcio. El resto de las mutantes se comportó de forma similar a la cepa WT. Nuestros datos sugieren que solo concentraciones altas de calcio reflejaron un efecto sobre el parámetro evaluado.



Así también, como se comentó en la sección de resultados, sería interesante medir otras ERO para tener un panorama más completo, ya que la detección del radical $\text{OH}\cdot$ depende también de la concentración libre de Fe^{2+} involucrado en la reacción de Fenton para catalizar la reducción del H_2O_2 (Sies & Jones, 2020), y no se sabe con exactitud si cada cepa evaluada tuvo diferencias en sus concentraciones libres de hierro.

Patiño-Medina et al. (2018; 2019a) describieron que las proteínas Arf (ADP-ribosylation factor, por su nombre en inglés) y Arl (Arf-like, por su nombre en inglés) podrían actuar como reguladores del dimorfismo y que la virulencia de este *Mucoral* por parte de estas proteínas probablemente se daría a través de la regulación de la secreción de moléculas encerradas en vesículas para alcanzar el exterior de la célula, acumulándose en el medio y produciendo su efecto tóxico, además de que la naturaleza de las mismas podría ser proteica. Los hongos pueden producir metabolitos secundarios secretables como las micotoxinas, los cuales son sintetizados por enzimas presentes en grupos de genes biosintéticos cuya primera enzima es una policétido sintasa o una péptido sintetasa no ribosomal (o una mezcla de ambas), ejemplos incluyen a la gliotoxina, a la aflatoxina, la ocratoxina, entre otros, y toxinas proteicas como la candidalislina y la mucoricina (Brown et al., 2021). Además, otros factores de virulencia de tipo proteico secretables descritos incluyen a hidrolasas como las proteasas y las hialuronidasas (Patiño-Medina et al., 2018). Alejandre-Castañeda et al. (2022) describieron que la delección del gen *rfs*, que codifica a la enzima responsable de la biosíntesis de rizoferrina, un sideróforo, en *M. lusitanicus*, condujo a una menor virulencia en ratones diabéticos y nematodos. Mientras que la regulación positiva de *rfs* se correlacionó con un aumento de la toxicidad de los sobrenadantes libres de células del caldo de cultivo obtenidos en condiciones de crecimiento que favorecen el metabolismo oxidativo, como bajos niveles de glucosa (YNB-0.1 %) o la presencia de H_2O_2 en el cultivo, lo que sugiere que el metabolismo oxidativo aumenta la virulencia a través de la producción de rizoferrina, la cual a su vez está regulada por la vía de la AMPc-PKA (Alejandre-Castañeda et al., 2022).



Nuestros resultados respecto a la toxicidad de los sobrenadantes libres de células obtenidos en presencia de altas concentraciones de calcio de la cepa WT y de las mutantes en subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas probados contra *C. elegans*, mostraron que el calcio incrementó significativamente (* $p < 0.05$) la toxicidad de los sobrenadantes a excepción de las mutantes $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$, los cuales se mantuvieron no tóxicos sin importar el tratamiento con calcio e interesantemente, el sobrenadante de la mutante $\Delta gpg3$ en presencia de calcio disminuyó significativamente (* $p < 0.05$) su toxicidad. Podríamos sugerir varios escenarios que pudieron causar que el calcio aumentara la toxicidad de los sobrenadantes. Uno de estos podría ser que el calcio aumente el metabolismo oxidativo mitocondrial mediante la estimulación de diversas enzimas involucradas en este tipo de metabolismo y que, como subproductos de este aumento, exista una sobre acumulación en el sobrenadante de ciertas moléculas que podrían ser tóxicas para el nematodo como la rizoferrina. En el caso de los iones de calcio, se ha reportado que en células de mamífero juegan un rol importante en la mitocondria al regular el metabolismo aerobio mediante la estimulación de la síntesis de ATP a través de la regulación alostérica de dos enzimas deshidrogenasas del ciclo de Krebs ubicadas en la matriz mitocondrial, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa (Carafoli, 2010; McCormack, Halestrap & Denton, 1990) respondiendo a concentraciones de calcio en el rango de 1-20 mM (Romero-García & Prado-García, 2019), y mediante la activación de la piruvato deshidrogenasa a través de un paso de desfosforilación dependiente de calcio, por lo que la operación del ciclo de Krebs y la síntesis de ATP dependen de la adecuada regulación de estas enzimas por calcio, algo similar podría estar pasando en las cepas de *M. lusitanicus* al ser tratadas con calcio, recordando también que en teoría, una mayor síntesis de ATP y de otros metabolitos generados a través del ciclo de Krebs generarían un mayor crecimiento de las células de tipo hifal de este Mucoral y ello generaría una mayor virulencia. Posiblemente el calcio a través de la regulación de estas proteínas podría generar un aumento de la síntesis de los precursores necesarios (ácido cítrico, ácido oxalacético y ácido 1,2,3-tricarboxílico) para la biosíntesis de rizoferrina que además dicha reacción enzimática mediada

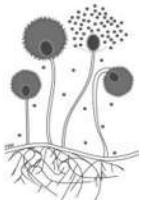


por la enzima Rfs es dependiente de ATP (Carroll et al., 2017), generando la acumulación de rizoferrina en el medio y siendo perjudicial para *C. elegans*.

La posibilidad de que la alta concentración de calcio usado en los experimentos de toxicidad pudiera ser perjudicial para el nematodo se descartó, ya que como control se evaluó la concentración de 4 mM de calcio en los medios usados sin células fúngicas resultando en un 100 % de supervivencia de los nematodos.

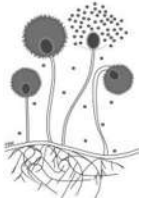
En cuanto a la nula toxicidad de los sobrenadantes de las mutantes en $\Delta gpb1$ y $\Delta gpg1$ aún en presencia de calcio, se puede inferir nuevamente, que dichas subunidades son necesarias para la percepción de señales extracelulares de calcio, y por otro lado, es posible que dichas subunidades pudiesen estar involucradas en la síntesis de un factor tóxico, ya que por sí solas las mutaciones en estas subunidades no mostraron toxicidad alguna en los sobrenadantes probados contra *C. elegans*. Esto se puede relacionar a lo descrito en *A. fumigatus*, en el que se demostró que la ausencia de la subunidad SfaD ($G\beta$) y la subunidad GpgA ($G\gamma$) resultó en la ausencia de gliotoxina (una toxina péptido no ribosomal) en los sobrenadantes del crecimiento en comparación a los obtenidos para la cepa WT de este hongo, los cuales si tuvieron la presencia de dicha micotoxina. Concluyendo que ambas subunidades son necesarias para la producción normal de gliotoxina (Shin et al., 2009). Alejandre-Castañeda et al. (2022) sugirieron que el metabolismo oxidativo de *M. lusitanicus* aumenta la virulencia a través de la producción de rizoferrina, la cual a su vez está regulada por la vía de la AMPc-PKA. Las proteínas G heterotriméricas son reguladores de la vía PKA, y sus funciones canónicas están involucradas en el control de la actividad de varios efectores; por ejemplo, la adenilato ciclasa, enzimas modificadoras de lípidos como la fosfolipasa C y canales iónicos (Syrovatkina et al., 2016; Tesmer, 2010). Puede ser que las subunidades Gpb1 y Gpg1 de proteínas G heterotriméricas regulen la síntesis de rizoferrina en este Mucoral a través de la regulación de alguno de los elementos de la vía AMPc-PKA.

De forma general, nuestros resultados mostraron que las subunidades Gpb1 y Gpg1 de *M. lusitanicus* son necesarias para percibir el estímulo por calcio extracelular



para poder generar la cascada de señalización correspondiente y generar un efecto sobre procesos biológicos importantes relacionados con el metabolismo oxidativo mitocondrial como fueron la velocidad de germinación, la producción de biomasa, en la respiración celular, en la producción de ERO y en la virulencia. Estos resultados son concluyentes con lo reportado por Patiño-Medina et al. (2025), quienes recientemente sugirieron que existe la posibilidad de que la subunidad Gpb1 y la subunidad Gpg1 de *M. lusitanicus* interactúen para la formación del dímero G β 1- γ 1, el cual a través de la represión de la vía PKA estaría regulando el metabolismo oxidativo mitocondrial de este Mucoral. Lo que explicaría en nuestro caso, que ambas mutantes tuvieron un fenotipo muy similar. Por otro lado, también describieron que ambas mutantes mostraron una capacidad oxidativa reducida, correlacionando con la disminución de los niveles de ARNm de *atp9* durante el crecimiento micelial comparado con los valores de la cepa WT, lo que indicó que su metabolismo oxidativo mitocondrial estaba disminuido. Además, también sugirieron que Gpb1 y Gpg1 podrían estar controlando positivamente el metabolismo oxidativo a través de la mitofagia. El análisis *in silico* de las secuencias primarias de aminoácidos de las subunidades beta y gama de proteínas G heterotriméricas de *M. lusitanicus* sugirió que ninguna de ellas posee péptidos señales para su direccionalidad a la mitocondria, pero si poseen motivos de direccionalidad mitocondrial, siendo la subunidad beta 3 seguida de la subunidad gama 1, las proteínas con mayor probabilidad de ser exportadas a la mitocondria. Estos datos sugieren que estas subunidades podrían tener funciones biológicas por sí mismas, como lo reportado por Zhang et al. (2010), en el que describieron que la subunidad G β 2 de células de mamífero puede interactuar con la mitofusina 1 (Mfn1) para regular la fusión mitocondrial. Interesantemente, todas las subunidades beta presentaron posibles sitios de fosforilación por PKA, lo que sugiere que probablemente dichas subunidades pueden ser susceptibles de cierta regulación postraducciona por esta vía.

A la fecha no se sabe si *M. lusitanicus* posee la infraestructura proteica necesaria para permitir la entrada de calcio extracelular hacia el interior de la célula. Por lo que se realizó un análisis *in silico* con el propósito de averiguar si su genoma posee



probables genes que codifiquen a las dos proteínas principales descritas que forman canales de calcio de alta afinidad en otros hongos filamentosos. Nuestros resultados mostraron que el genoma de este *Mucor* alberga 1 única posible copia del gen que codifica a la proteína Mid1 y 4 probables copias del gen que codifica a la proteína Cch1. A pesar de que el porcentaje de identidad y similitud entre las secuencias primarias de aminoácidos de cada una de estas proteínas en comparación con la de otras especies de hongos filamentosos fue baja, pudimos demostrar que estas probables proteínas poseen ciertos residuos, motivos y/o dominios funcionales que poseen otras especies de hongos ya descritas (Hayashi et al., 2020; Prole & Taylor, 2012; Vu et al., 2015). Además del análisis *in silico*, también se evaluaron los efectos que tuvieron los fármacos bloqueadores de canales de calcio, nifedipino y verapamilo (Teng et al., 2008; Yu et al., 2014) sobre la velocidad de germinación de las esporas y la tasa de consumo de oxígeno en este *Mucor*. Los resultados mostraron que las células de *M. lusitanicus* fueron sensibles a ambos fármacos causando la disminución significativa ($*p < 0.05$) de ambos parámetros fisiológicos, observando que dicha disminución era más pronunciada al incrementar la concentración del fármaco, de igual manera, el nifedipino fue el que tuvo una mayor potencia en comparación con el verapamilo. Estos resultados respaldan la probabilidad de que *Mucor spp.* posea canales de calcio de alta afinidad.

Con lo revisado en las referencias y con los resultados de este proyecto, propongo a modo de resumen el siguiente modelo (figura 50).

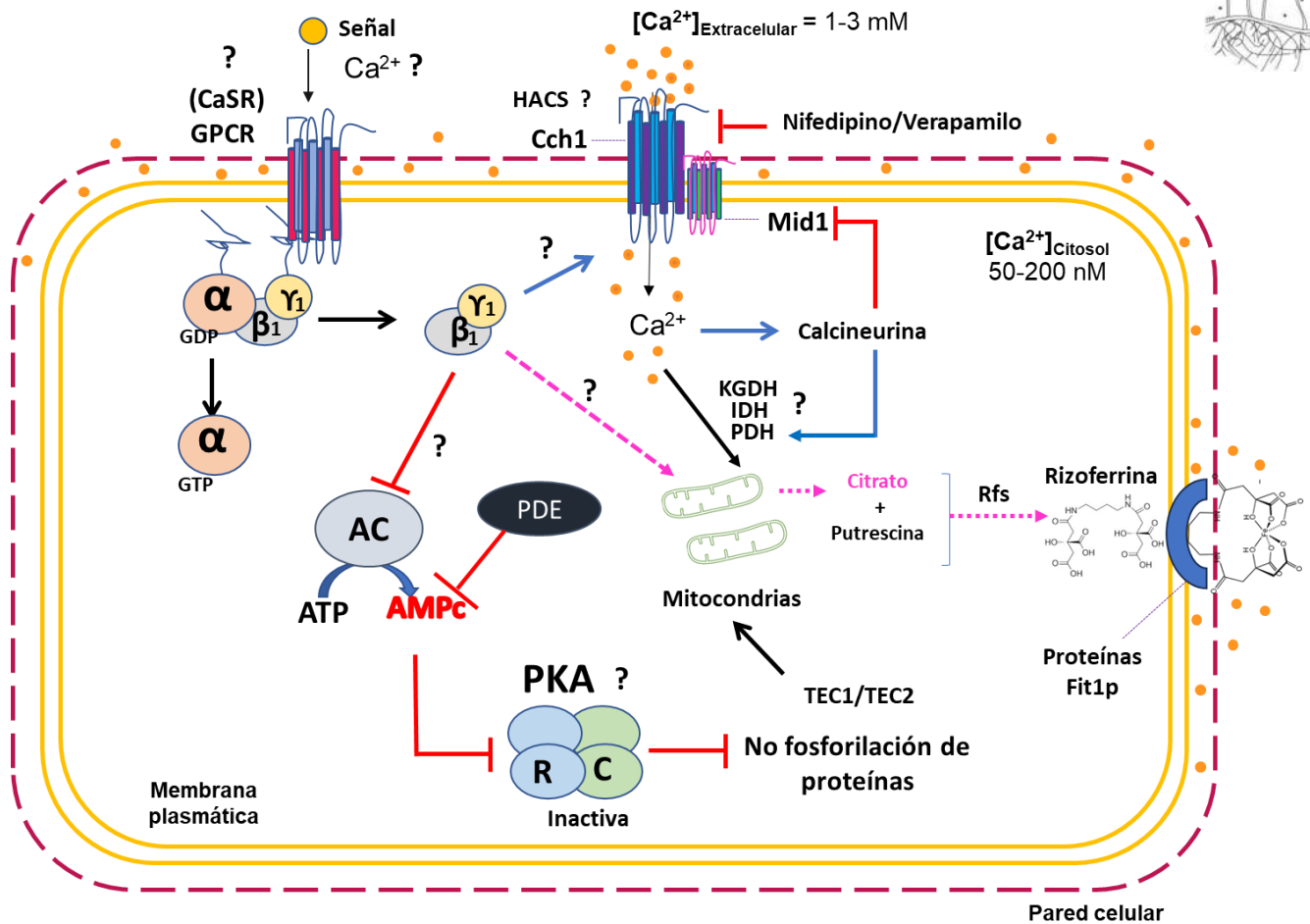
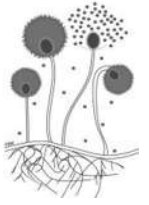


Figura 50. Modelo propuesto de la participación de las subunidades Gpb1 y Gpg1 en el metabolismo oxidativo mitocondrial mediado por calcio en *M. lusitanicus*. La célula para la mayoría de sus procesos biológicos necesita iones, que pueden actuar como sustratos rédox o como cofactores de enzimas cruciales para su funcionamiento, por lo que a través de la evolución ha ideado sistemas para la captación de estos (Gerwien et al., 2018). El ion calcio es considerado el segundo mensajero universal, ya que prácticamente tiene un rol esencial en la mayoría de los procesos biológicos (Shemarova & Nesterov, 2005). Este ion puede alcanzar concentraciones extracelulares en el rango milimolar, dependiendo del sustrato y las condiciones ambientales, y dichas concentraciones pueden generar cascadas de señalización en las células fúngicas a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Nestler & Duman., 1999) uno de los receptores propuestos de este tipo es el homólogo a CaSR (receptor sensor de calcio) (Spurr, 2003). En este Mucoral,



hasta la fecha se desconoce cuál o qué tipo de GPCR podría estar percibiendo las señales extracelulares por calcio, lo que sabemos con este trabajo de investigación es que algún posible GPCR podría percibir calcio extracelular generando un cambio conformacional en su estructura, generando la disociación del heterotrímero asociado al mismo, en nuestro caso, liberando el dímero formado probablemente por las subunidades $G\beta 1$ y $G\gamma 1$, las cuales a su vez podrían estar reprimiendo a la adenilato ciclasa ($Cyr1$), lo que provocaría la disminución importante de las concentraciones de AMPc, evitando la activación de la vía PKA, causando la no fosforilación de proteínas blanco, entre ellas los factores de transcripción TEC1 y TEC2, promoviendo el contenido y la actividad mitocondrial, que a su vez promovería la síntesis de factores tóxicos como la rizoferrina, el crecimiento de tipo hifal y en última instancia la virulencia (Patiño-Medina et al., 2025). Uno de los escenarios que además podría estar sucediendo, es que el dímero $G\beta 1$ - $G\gamma 1$ pueda estar involucrado de alguna manera en la regulación positiva de la síntesis de rizoferrina, algo similar a lo que se ha descrito para *A. fumigatus*, para el cual se ha demostrado que un dímero de tipo $G\beta$ - $G\gamma$ es necesario para la síntesis de gliotoxina (Shin et al., 2009). Además de la percepción de señales extracelulares de calcio a través de GPCR acoplados a proteínas G heterotriméricas, *M. lusitanicus* podría estar regulando la homeostasis de calcio a través de canales de calcio de alta afinidad (HACS), lo cual podría ser posible, ya que encontramos que su genoma cuenta con los genes necesarios para la expresión de las proteínas Cch1 y Mid1 necesarias para la formación de estos canales, que a su vez, permitirían la entrada de calcio extracelular, el cual una vez en el citoplasma y alcanzando las concentraciones suficientes por ejemplo, podría estar activando a la calcineurina (Liu et al., 2015a) para regular a sus proteínas blanco, una de las cuales a su vez podría ser la represión de los mismos HACS, para evitar el ingreso en exceso de este ion que podría ser perjudicial para la célula (Zhao et al., 2013). Por otro lado, tampoco descartamos la posibilidad de que el dímero $G\beta 1$ - $G\gamma 1$ pueda estar regulando positivamente la entrada de calcio a través de su unión directa con canales de calcio de alta afinidad (HACS) en la membrana plasmática (Currie, 2010). Así mismo, el calcio extracelular podría estar estimulando directamente a



enzimas ubicadas en la matriz mitocondrial como la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH) y/o a la α -isocitrato deshidrogenasa, así como indirectamente a la piruvato deshidrogenasa (PDH) a través de la calcineurina para estimular el ciclo de Krebs, lo cual a su vez promovería un aumento en la actividad mitocondrial (Carafoli, 2010), generando más ATP aprovechado en el crecimiento micelial y la síntesis de rizoferina. A la fecha también se desconoce la forma en que la rizoferina puede almacenar y transportar hierro dentro y fuera de la célula, lo que podría ser explicado con algo similar a lo que se ha descrito para *S. cerevisiae*, en el que las manoproteínas Fit1p, Fit2p y Fit3p de la pared celular unen cantidades importantes de sideróforos (Philpott, 2006), si *Mucor spp.* posee estas proteínas podría tener un mecanismo similar, y posiblemente la extracción física de estas moléculas mediante soluciones acuosas de CaCl_2 (Rai et al., 2020) pueda explicar el porqué del aumento de la toxicidad de los sobrenadantes tratados con calcio.



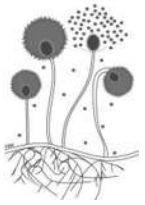
XI. CONCLUSIÓN

Las subunidades Gpb1 y Gpg1 de *M. lusitanicus* son indispensables en la respuesta a las señales extracelulares de calcio. A su vez, este ion demostró ser esencial en procesos biológicos relacionados con el metabolismo oxidativo mitocondrial como el crecimiento, la respiración celular y la virulencia, aumentándolos a concentraciones en el rango milimolar. Es probable que ambas subunidades puedan formar un dímero $G\beta\gamma$ para la regulación de estos procesos biológicos probablemente a través de la represión de la vía AMPc-PKA. Nuestros resultados muestran la importancia de seguir investigando a los elementos implicados en la homeostasis de calcio en este mucoral, entre los que se encuentran la generación de mutantes en canales de calcio de alta afinidad (HACS), así como la investigación y el desarrollo de terapias farmacológicas dirigidas a estos elementos.

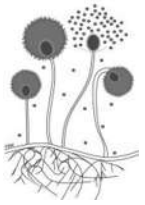


XII. REFERENCIAS

1. Ajith Karunaratne, W. K., O'Neill, P. R., Martinez-Espinosa, P. L., Kalyanaraman, V., & Gautam, N. (2012). All G protein $\beta\gamma$ complexes are capable of translocation on receptor activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 421(3), 605–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.054>
2. Ajmal, M., Hussain, A., Ali, A., Chen, H., & Lin, H. (2022). Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.3390/jof9010010>
3. Akhter, S., McDade, H. C., Gorlach, J. M., Heinrich, G., Cox, G. M., & Perfect, J. R. (2003). Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 71(10), 5794–5802. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5794-5802.2003>
4. Alejandro-Castañeda, V., Patiño-Medina, J.A., Valle-Maldonado, M.I. *et al.* (2022). Secretion of the siderophore rhizoferrin is regulated by the cAMP-PKA pathway and is involved in the virulence of *Mucor lusitanicus*. *Sci Rep* 12, 10649. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14515-0>
5. Alejandro-Castañeda, V., Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., García, A., Ortiz-Alvarado, R., Ruíz-Herrera, L. F., Castro-Cerritos, K. V., Ramírez-Emiliano, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., Lee, S. C., & Meza-Carmen, V. (2023). Transcription Factors Tec1 and Tec2 Play Key Roles in the Hyphal Growth and Virulence of *Mucor lusitanicus* Through Increased Mitochondrial Oxidative Metabolism. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 61(12), 1043–1062. <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00096-8>
6. Alqarihi, A., Gebremariam, T., Gu, Y., Swidergall, M., Alkhazraji, S., Soliman, S. S. M., Bruno, V. M., Edwards, J. E., Jr, Filler, S. G., Uppuluri, P., & Ibrahim, A. S. (2020). GRP78 and Integrins Play Different Roles in Host Cell Invasion during Mucormycosis. *mBio*, 11(3), e01087-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01087-20>
7. Amora, Y., Chevionb, M., & Levinea, A. (2000). Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS letters*, 477(3), 175–180. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01797-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01797-x)
8. Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2008). G alpha12 is targeted to the mitochondria and affects mitochondrial morphology and motility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

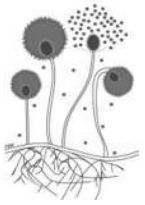


9. Balcavage, W. X., Lloyd, J. L., Mattoon, J. R., Ohnishi, T., & Scarpa, A. (1973). Cation movements and respiratory response in yeast mitochondria treated with high Ca²⁺ concentrations. *Biochimica et biophysica acta*, 305(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90229-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90229-6)
10. BARTNICKI-GARCIA, S., & NICKERSON, W. J. (1962). Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology*, 84(4), 829–840. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.829-840.1962>
11. Bartnicki-Garcia S. (1968). Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 96(5), 1586–1594. <https://doi.org/10.1128/jb.96.5.1586-1594.1968>
12. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. (2018). Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. *Clin Infect Dis* ciy776. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy776>
13. Benny, G.L., Humber, R.A., Voigt, K. (2014). Zygomycetous Fungi: Phylum Entomophthoromycota and Subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: McLaughlin, D., Spatafora, J. (eds) Systematics and Evolution. The Mycota, vol 7A. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_8
14. Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
15. Biggs A. R. (2004). Effect of Inoculum Concentration and Calcium Salts on Infection of Apple Fruit by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant disease*, 88(2), 147–151. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.147>
16. Biggs, A. R., El-Kholi, M. M., El-Neshawy, S., & Nickerson, R. (1997). Effects of Calcium Salts on Growth, Polygalacturonase Activity, and Infection of Peach Fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant disease*, 81(4), 399–403. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.4.399>
17. Boelaert JR, de Locht M, Van Cutsem J, Kerrels V, Cantinieaux B, Verdonck A, Van Landuyt HW, Schneider YJ. (1993). Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *In vitro and in*

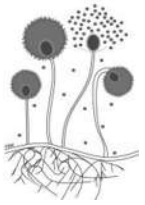


vivo animal studies. *J Clin Invest* 91:1979–1986 <https://doi.org/10.1172/JCI116419>

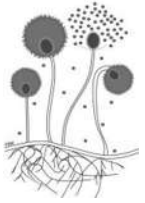
18. Boonruang, P., & Lerkkasemsan, N. (2023). Study of kinetic model for fungal spore germination under dynamic conditions: Case study on germination of *Penicillium expansum* spores. *Heliyon*, 9(12), e21928. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21928>
19. Bormann, J., & Tudzynski, P. (2009). Deletion of Mid1, a putative stretch-activated calcium channel in *Claviceps purpurea*, affects vegetative growth, cell wall synthesis and virulence. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 12), 3922–3933. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030825-0>
20. Boumaaza, B., Benkhelifa, M., & Belkhoudja, M. (2015). Effects of Two Salts Compounds on Mycelial Growth, Sporulation, and Spore Germination of Six Isolates of *Botrytis cinerea* in the Western North of Algeria. *International journal of microbiology*, 2015, 572626. <https://doi.org/10.1155/2015/572626>
21. 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 (Chichester, England)*, 27(10), 849–860. <https://doi.org/10.1002/yea.1793>
22. Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71-94.
23. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell Physiology*, 287(4), C817–C833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
24. Brown, R., Priest, E., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). Fungal Toxins and Host Immune Responses. *Frontiers in microbiology*, 12, 643639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643639>
25. Buss, J. E., Mumby, S. M., Casey, P. J., Gilman, A. G., & Sefton, B. M. (1987). Myristoylated alpha subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7493–7497. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7493>
26. Cai, X., & Clapham, D. E. (2012). Ancestral Ca²⁺ signaling machinery in early animal and fungal evolution. *Molecular biology and evolution*, 29(1), 91–100. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr149>



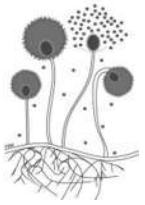
27. Cano-Canchola, C., Escamilla, E., & Ruiz-Herrera, J. (1988). Environmental Control of the Respiratory System in the Dimorphic Fungus *Mucor rouxii*. *Microbiology*, 134(11), 2993-3000. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2993>
28. Cánovas-Márquez, J. T., Lax, C., Tahiri, G., Navarro, E., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2023). Advances in understanding infections caused by the basal fungus *Mucor*. *PLoS pathogens*, 19(6), e1011394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011394>
29. Carafoli E. (2010). The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen?. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.024>
30. Carroll, C. S., Grieve, C. L., Murugathasan, I., Bennet, A. J., Czekster, C. M., Liu, H., Naismith, J., & Moore, M. M. (2017). The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the NIS gene family. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 89, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.005>
31. Chakraborty, T., Tóth, Z., Tóth, R., Vágvölgyi, C., & Gácsér, A. (2020). Iron Metabolism, Pseudohypha Production, and Biofilm Formation through a Multicopper Oxidase in the Human-Pathogenic Fungus *Candida parapsilosis*. *mSphere*, 5(3), e00227-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00227-20>
32. Chi, M., Kim, H. J., Basham, R., Yoon, M. K., Vagefi, R., & Kersten, R. C. (2015). Temporal Artery Calciphylaxis Presenting as Temporal Arteritis in a Case of Rhinoorbitocerebral Mucormycosis. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery*, 31(5), e132–e135. <https://doi.org/10.1097/IOP.0000000000000181>
33. Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology*, 10(8), 322–328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)
34. Choi, Y. H., Lee, N. Y., Kim, S. S., Park, H. S., & Shin, K. S. (2020). Comparative Characterization of G Protein α Subunits in *Aspergillus fumigatus*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(4), 272. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040272>
35. Conway W. S., Sams C. E., McGuire R. M., and Kelman A. (1992). Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay, *Plant Disease*. 76, no. 4, 329–334, <https://doi.org/10.1094/pd-76-0329>.



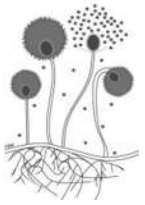
36. Cornelius G. & Nakashima, H. (1987). Vacuoles play a decisive role in calcium homeostasis *Neurospora crassa*. *Microbio.* 133(8):2341–2347. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-8-2341>
37. Coutinho, E. C., & Correa, L. C. (1999). The induction of sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* is dependent on extracellular calcium. *FEMS microbiology letters*, 179(2), 353–359. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08749.x>
38. Cunningham K. W. (2011). Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell calcium*, 50(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.010>
39. Currie K. P. (2010). G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin, Tex.)*, 4(6), 497–509. <https://doi.org/10.4161/chan.4.6.12871>
40. de Castro, P. A., Chiaratto, J., Winkelströter, L. K., Bom, V. L., Ramalho, L. N., Goldman, M. H., Brown, N. A., & Goldman, G. H. (2014). The involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 calcium channels in *Aspergillus fumigatus* virulence. *PloS one*, 9(8), e103957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103957>
41. de Lucca, A. (2006). In vitro inhibitory and fungicidal properties of EDTA for *Aspergillus* and *Fusarium*. In vitro inhibitory and fungicidal properties of EDTA for *Aspergillus* and *Fusarium*. in: Proceedings of Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy, September 27-30, 2006, San Francisco, CA. Abstract M-1780. p. 439. <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=198423>
42. de Lucena, L. A., de Oliveira, F. G., de Andrade, M. M. P., de Paula, K. C., Praxedes, M. R. G., & de Oliveira, R. A. (2024). Mucormycosis-induced hypercalcemia: a case report. *CEN case reports*, 13(1), 66–71. <https://doi.org/10.1007/s13730-023-00800-y>
43. Díaz-Pérez S.P., Patiño-Medina J.A., Valle-Maldonado M.I., López-Torres A., Jácome-Galarza I.E., Anaya-Martínez V., et al. (2020). Alteration of fermentative metabolism enhances *Mucor circinelloides* virulence. *Infect Immun* 88: e00434–19. pmid:31685547
44. Dikicioglu, D., Pir, P., & Oliver, S. G. (2013). Predicting complex phenotype-genotype interactions to enable yeast engineering: *Saccharomyces*



- cerevisiae as a model organism and a cell factory. *Biotechnology journal*, 8(9), 1017–1034. <https://doi.org/10.1002/biot.201300138>
45. Divakaruni, A. S., & Jastroch, M. (2022). A practical guide for the analysis, standardization and interpretation of oxygen consumption measurements. *Nature metabolism*, 4(8), 978–994. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00619-4>
46. Drechsel, H., Metzger, J., Freund, S. *et al.* (1991). Rhizoferrin — a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Biol Metals* 4, 238–243. <https://doi.org/10.1007/BF01141187>
47. Duvenage, L., Munro, C.A. & Gourlay, C.W. (2019). The potential of respiration inhibition as a new approach to combat human fungal pathogens. *Curr Genet* 65, 1347–1353. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01001-w>
48. Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Tafintseva, V., Slany, O., Certik, M., & Shapaval, V. (2020a). Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced co-production of high-value metabolites in oleaginous Mucoromycota fungi. *PloS one*, 15(6), e0234870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>
49. Dzurendova, S., Zimmermann, B., Tafintseva, V. *et al.* (2020b). The influence of phosphorus source and the nature of nitrogen substrate on the biomass production and lipid accumulation in oleaginous *Mucoromycota* fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8065–8076. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10821-7>
50. Dzurendova, S., Zimmermann, B., Tafintseva, V., Kohler, A., Horn, S. J., & Shapaval, V. (2020c). Metal and Phosphate Ions Show Remarkable Influence on the Biomass Production and Lipid Accumulation in Oleaginous *Mucor circinelloides*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 260. <https://doi.org/10.3390/jof6040260>
51. Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Reitzel, K., Nielsen, U. G., Dupuy-Galet, B. X., Leivers, S., Horn, S. J., & Shapaval, V. (2021). Calcium Affects Polyphosphate and Lipid Accumulation in Mucoromycota Fungi. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(4), 300. <https://doi.org/10.3390/jof7040300>
52. El-Defrawy, M.M.H., Hesham, A.EL. (2020). G-protein-coupled Receptors in Fungi. In: Hesham, AL., Upadhyay, R., Sharma, G., Manoharachary, C., Gupta, V. (eds) *Fungal Biotechnology and Bioengineering*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41870-0_3



53. Fazili, A. B. A., Shah, A. M., Zan, X., Naz, T., Nosheen, S., Nazir, Y., Ullah, S., Zhang, H., & Song, Y. (2022). *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microbial cell factories*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01758-9>
54. Fischer, M., Schnell, N., Chattaway, J., Davies, P., Dixon, G., & Sanders, D. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* CCH1 gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS letters*, 419(2-3), 259–262. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01466-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01466-x)
55. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, Schoenfeld D, Nomicos E, Park M, NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program, Kong HH, Segre JA. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 498:367–370. doi: [10.1038/nature12171](https://doi.org/10.1038/nature12171).
56. Fonseca-Peralta, H.M., Pineda-Hidalgo, K.V., Castro-Martínez, C., Contreras-Andrade, I. (2022). Effect of Zinc-Calcium on Xylose Consumption by *Mucor circinelloides* (MN128960): Xylitol and Ethanol Yield Optimization. *Energies* 15, 906. <https://doi.org/10.3390/en15030906>
57. Fraser, P.D., Ruiz-Hidalgo, M.J., López-Matas, M.A., Alvarez, M.I., Eslava, A.P. & Bramley, P.M. (1996) Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strain of *Mucor circinelloides*. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 203–208.
58. Funtikova, N. S., Mysiakina, I. S., & Konova, I. V. (2002). Sintez biologicheskii aktivnykh lipidov gribom *Mucor lusitanicus* 306D na sredakh raznogo sostava [Synthesis of biologically active lipids by fungus *Mucor lusitanicus* 306D grown on media with various composition]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 38(6), 644–648. <https://doi.org/10.1023/A:1020726611283>
59. Garre, V., Barredo, J.L., Iturriaga, E.A. (2015). Transformation of *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* Protoplasts. In: van den Berg, M., Maruthachalam, K. (eds) Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_4
60. Gebremariam, T., Liu, M., Luo, G., Bruno, V., Phan, Q. T., Waring, A. J., Edwards, J. E., Jr, Filler, S. G., Yeaman, M. R., & Ibrahim, A. S. (2014). CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(1), 237–250. <https://doi.org/10.1172/JCI71349>
61. Gerwien, F., Skrahina, V., Kasper, L., Hube, B., & Brunke, S. (2018). Metals in fungal virulence. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux050. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux050>

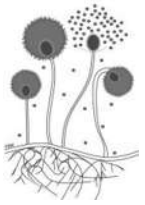


62. Giammarino, A., Bellucci, N., & Angiolella, L. (2024). *Galleria mellonella* as a Model for the Study of Fungal Pathogens: Advantages and Disadvantages. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(3), 233. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030233>
- Gómez-Gaviria M., Lozoya-Pérez N.E., Staniszewska M., Franco B., Niño-Vega G.A., Mora-Montes H.M. (2020). Loss of Kex2 Affects the *Candida albicans* Cell Wall and Interaction with Innate Immune Cells. *Journal of Fungi*, 6(2):57: 1-20. <https://doi.org/10.3390/jof6020057>
63. Goranov, A. I., & Madhani, H. D. (2014). Functional profiling of human fungal pathogen genomes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(3), a019596. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019596>
64. Gordeeva, A. V., Zvyagil'skaya, R. A., & Labas, Y. A. (2003). Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry. Biokhimiia*, 68(10), 1077–1080. <https://doi.org/10.1023/a:1026398310003>
65. Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H., & Cramer, R. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology*, 84(2), 383–399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x>
66. Gronover, C. S., Kasulke, D., Tudzynski, P., & Tudzynski, B. (2001). The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 14(11), 1293–1302. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.11.1293>
67. Groppi, S., Belotti, F., Brandão, R. L., Martegani, E., & Tisi, R. (2011). Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. *Cell calcium*, 49(6), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.006>
68. Hadley, G., & Harrold, C. E. (1958). The Sporulation of *Penicillium notatum* Westling in Submerged Liquid Culture: II. THE INITIAL SPORULATION PHASE, *Journal of Experimental Botany*, Volume 9, Issue 3, Pages 418–425, <https://doi.org/10.1093/jxb/9.3.418>
69. Halachmi, D., & Eilam, Y. (1989). Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1. *FEBS letters*, 256(1-2), 55–61. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81717-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81717-x)
70. Halachmi, D., & Eilam, Y. (1993). Calcium homeostasis in yeast cells exposed to high concentrations of calcium. Roles of vacuolar H(+)-ATPase and cellular

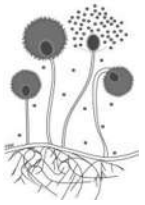


ATP. *FEBS letters*, 316(1), 73–78. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81739-m](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81739-m)

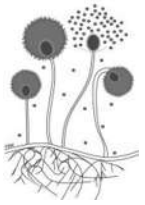
71. Hayashi, T., Oishi, K., Kimura, M., Lida, K., Lida, H. (2020). Highly conserved extracellular residues mediate interactions between pore-forming and regulatory subunits of the yeast Ca²⁺ channel related to the animal VGCC/NALCN family. *J. Biol. Chem.*, 295(37) 13008-13022. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014378>
72. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F. Blackwell. M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorff, S., James, T., Kirk, P., Lücking, R., Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L. Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtward, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., D. Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.L., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111(5): 509-547.
73. Homa, M., Ibragimova, S., Szebenyi, C., Nagy, G., Zsindely, N., Bodai, L., Vágvolgyi, C., Nagy, G., & Papp, T. (2022). Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(4), 404. <https://doi.org/10.3390/jof8040404>
74. Howard D. H. (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 394–404. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.394>
75. Huh, W. K., & Kang, S. O. (2001). Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *The Biochemical journal*, 356(Pt 2), 595–604. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560595>
76. Hurdeal VG, Gentekaki E, Hyde KD, Nguyen TTT, Lee, HB. (2021). Novel *Mucor* species (Mucoromycetes, Mucoraceae) from northern Thailand. *MycologyKeys* 84: 57-78. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.84.71530>
77. Hynes, T. R., Tang, L., Mervine, S. M., Sabo, J. L., Yost, E. A., Devreotes, P. N., & Berlot, C. H. (2004). Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *The Journal of biological chemistry*, 279(29), 30279–30286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401432200>



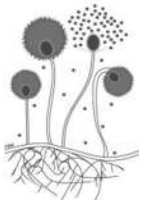
78. Ibrahim, A. S., Gebremariam, T., Lin, L., Luo, G., Hussein, M. I., Skory, C. D., Fu, Y., French, S. W., Edwards, J. E., Jr, & Spellberg, B. (2010). The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Molecular microbiology*, 77(3), 587–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07234.x>
79. Iida, H., Yagawa, Y., & Anraku, Y. (1990). Essential role for induced Ca^{2+} influx followed by $[Ca^{2+}]_i$ rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of $[Ca^{2+}]_i$ in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *The Journal of biological chemistry*, 265(22), 13391–13399.
80. Iturriaga, EA., Velayos, A., Eslava, AP., Álvarez, MI. (2001). The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res Dev Genet* 1:79–92
81. Jackson, S. L., and I. B. Heath. (1989). Effects of exogenous calcium ions on tip growth, intracellular Ca^{2+} concentration, and actin arrays in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax*. *Exp. Mycol.* 13:1-12. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(89\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90002-9)
82. Jackson, S. L., & Heath, I. B. (1993). Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiological reviews*, 57(2), 367–382. <https://doi.org/10.1128/mr.57.2.367-382.1993>
83. Jäger, O., Szabenyi, C., AbuSaleem, TKS., Molnár, A., Kovács, V., Kiss, K., Homa, M., Vágó, B., Kiss, Vetráb, S., Varga, M., Sinka, R., Vágvölgyi, C., Nagy, G., Papp, T. (2024). Functional characterization of two survival factor 1 genes in *Mucor lusitanicus*. *Microbiol Spectr* 12:e01103-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01103-24>
84. Johnson, C. H., Prigge, J. T., Warren, A. D., & McEwen, J. E. (2003). Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast (Chichester, England)*, 20(5), 381–388. <https://doi.org/10.1002/yea.968>
85. Joseph-Horne, T., Wood, P. M., Wood, C. K., Moore, A. L., Headrick, J., & Hollomon, D. (1998). Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *The Journal of biological chemistry*, 273(18), 11127–11133. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11127>
86. Knape, M. J., Wallbott, M., Burghardt, N. C. G., Bertinetti, D., Hornung, J., Schmidt, S. H., Lorenz, R., & Herberg, F. W. (2020). Molecular Basis for Ser/Thr Specificity in PKA Signaling. *Cells*, 9(6), 1548. <https://doi.org/10.3390/cells9061548>



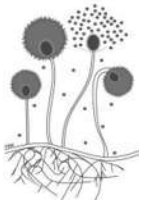
87. Konopka, J., Casadevall, A., Taylor, J., Heitman, J. & Cowen, L. (2019). *One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals, and Plants* (American Academy of Microbiology). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549988/>
88. Köhler, J.R., Casadevall, A., Perfect, J. (2017). Fungi that Infect Humans. *Microbiology spectrum*. (American society for Microbiology). 5(3): 1-29.
89. Lafon, A., Seo, J. A., Han, K. H., Yu, J. H., & d'Enfert, C. (2005). The heterotrimeric G-protein GanB(alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171(1), 71–80. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.040584>
90. Lange, M., & Peiter, E. (2020). Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 3100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03100>
91. Lasker B.A., Borgia P.T. (1980). High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* 141(2):565-569.
92. Lee, S. C., Li, A., Calo, S., & Heitman, J. (2013). Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003625. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>
93. Lee, S.C., Heirman J. (2014). Sex in the Mucoralean Fungi. *Mycoses* 57: 18-24.
94. Lee, S. C., Li, A., Calo, S., Inoue, M., Tonthat, N. K., Bain, J. M., Louw, J., Shinohara, M. L., Erwig, L. P., Schumacher, M. A., Ko, D. C., & Heitman, J. (2015). Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular microbiology*, 97(5), 844–865. <https://doi.org/10.1111/mmi.13071>
95. Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, et al. (2011). Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. *PLOS Pathogens* 7(6): e1002086. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002086>
96. Li, L., Shen, G., Zhang, Z. G., Wang, Y. L., Thompson, J. K., & Wang, P. (2007a). Canonical heterotrimeric G proteins regulating mating and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular biology of the cell*, 18(11), 4201–4209. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-02-0136>



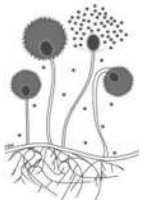
97. Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G., & Borkovich, K. A. (2007b). Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annual review of microbiology*, *61*, 423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093432>
98. Li, Y., Que, Y., Liu, Y., Yue, X., Meng, X., Zhang, Z., & Wang, Z. (2015). The putative G γ subunit gene MGG1 is required for conidiation, appressorium formation, mating and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Current genetics*, *61*(4), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0490-1>
99. Liu, S., & Dean, R. A. (1997). G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, *10*(9), 1075–1086. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.9.1075>
100. Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., & Sun, S. (2015a). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryotic cell*, *14*(4), 324–334. <https://doi.org/10.1128/EC.00271-14>
101. Liu, M., Lin, L., Gebremariam, T., Luo, G., Skory, C. D., French, S. W., Chou, T. F., Edwards, J. E., Jr, & Ibrahim, A. S. (2015b). Fob1 and Fob2 Proteins Are Virulence Determinants of *Rhizopus oryzae* via Facilitating Iron Uptake from Ferrioxamine. *PLoS pathogens*, *11*(5), e1004842. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004842>
102. Liu, P., Cai, Y., Wang, R., Li, B., & Weng, Q. (2022). Effect of Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on perillaldehyde-mediated regulation of postharvest *Aspergillus flavus* growth on peanuts. *LWT Food Sci. Technol.* *154*:112826. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112826.
103. 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.
104. Lübbehüsen T.L., Nielsen J., McIntyre M. (2003). Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of applied Microbiology* *95*: 1152-1160.
105. Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J., & McIntyre, M. (2004). Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth. *Applied microbiology and biotechnology*, *63*(5), 543–548. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1394-4>



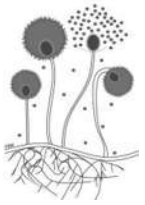
106. Madiwale, C., Murlidharan, P., & Hase, N. K. (2008). Recurrence of primary hyperoxaluria: an avoidable catastrophe following kidney transplant. *Journal of postgraduate medicine*, 54(3), 206–208. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.41803>
107. Maouni A., Lamarti A., Aidoun A., Khaddor M., and Badoc A. (2007). Effect of benzimidazole fungicides and calcium chloride on *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* rot during storage of pears, *African Journal of Biotechnology*. 6, no. 11, 1289–1292, 2-s2.0-34250713399.
108. Masangkay R.F., Paulitz T.C., Hallett S.G., Watson A.K. (2000). Characterization of sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. sphenocleae. *Biocontrol Sci Technol*, 10(4):385–397, <https://doi.org/10.1080/09583150050114981>
109. McCormack, J. G., Halestrap, A. P., & Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological reviews*, 70(2), 391–425. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.391>
110. [Metzenberg, R.L. \(2003\).](#) "Vogel's Medium N salts: avoiding the need for ammonium nitrate," *Fungal Genetics Reports*: Vol. 50, Article 6. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1152>
111. Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S46–S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>
112. Mohanta, T. K., & Bae, H. (2015). The diversity of fungal genome. *Biological procedures online*, 17, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-015-0020-z>
113. Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Artemenko K.S., Bondar V.S. (2017) Morphological properties and levels of extracellular peroxidase activity and light emission of the basidiomycete *Armillaria borealis* treated with β -glucosidase and chitinase. *Mycosphere* 8(4): 649–659. Doi 10.5943/mycosphere/8/4/11
114. Money P. Nicholas. (2021). Action and inertia in the study of hyphal growth. *Fungal biology reviews*, (41): 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.09.001>
115. Moreau R. A. (1987). Calcium-binding proteins in fungi and higher plants. *Journal of dairy science*, 70(7), 1504–1512. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80174-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80174-1)



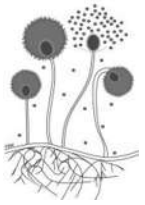
116. Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., Jany, J.L. (2017). Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31 (1), pp.12-32
117. Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.L. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on Mucor spp. Growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56, 69-79.
118. Muller, P., Leibbrandt, A., Teunissen, H., Cubasch, S., Aichinger, C., & Kahmann, R. (2004). The Gbeta-subunit-encoding gene *bpp1* controls cyclic-AMP signaling in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell*, 3(3), 806–814. <https://doi.org/10.1128/EC.3.3.806-814.2004>
119. Navarro, E., Sandmann, G. & Torres-Martínez, S. (1995) Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Exp. Mycol.* 19, 186–190. DOI: [10.1006/emyc.1995.1023](https://doi.org/10.1006/emyc.1995.1023)
120. Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific reports*, 8(1), 7660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26051-x>
121. Navarro-Olmos, R., Kawasaki, L., Domínguez-Ramírez, L., Ongay-Larios, L., Pérez-Molina, R., & Coria, R. (2010). The beta subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the gamma subunit. *Molecular biology of the cell*, 21(3), 489–498. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0472>
122. Nestler E.J. & Duman RS. (1999). Heterotrimeric G Proteins. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28116/>
123. 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 : FG & B*, 44(6), 504–516. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.003>
124. Nishimura, M., Park, G., & Xu, J. R. (2003). The G-beta subunit MGB1 is involved in regulating multiple steps of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Molecular microbiology*, 50(1), 231–243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03676.x>



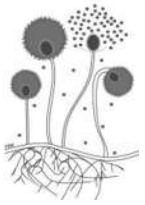
125. O'Neill, P. R., Karunaratne, W. K., Kalyanaraman, V., Silviu, J. R., & Gautam, N. (2012). G-protein signaling leverages subunit-dependent membrane affinity to differentially control $\beta\gamma$ translocation to intracellular membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(51), E3568–E3577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205345109>
126. Orlowski. (1991). Mucor dimorphism. *Microbiological reviews*, *55*(2):234-258. <https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991>
127. Paidhungat, M., & Garrett, S. (1997). A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediate yeast pheromone-stimulated Ca^{2+} uptake and exacerbates the *cdc1(Ts)* growth defect. *Molecular and cellular biology*, *17*(11), 6339–6347. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6339>
128. Papp, T., Velayos, A., Bartók, T., Eslava, A. P., Vágvölgyi, C., & Iturriaga, E. A. (2006). Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Applied microbiology and biotechnology*, *69*(5), 526–531. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0026-6>
129. Patil, A., Mohanty, H. S., Kumar, S., Nandikoor, S., & Meganathan, P. (2016). Angioinvasive rhinocerebral mucormycosis with complete unilateral thrombosis of internal carotid artery-case report and review of literature. *BJR case reports*, *2*(2), 20150448. <https://doi.org/10.1259/bjrcr.20150448>
130. Patiño-Medina, J. A., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Alexandre-Castañeda, V., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Campos-García, J., Ortiz-Alvarado, R., Jácome-Galarza, I. E., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2018). Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Current genetics*, *64*(4), 853–869. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0798-0>
131. Patiño-Medina, J. A., Valle-Maldonado, M. I., Maldonado-Herrera, G., Pérez-Arques, C., Jácome-Galarza, I. E., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Araiza-Cervantes, C. A., Villagomez-Castro, J. C., Campos-García, J., Ramírez-Díaz, M. I., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2019a). Role of Arf-like proteins (Arl1 and Arl2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal genetics and biology : FG & B*, *129*, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.04.011>
132. Patiño-Medina, J. A., Reyes-Mares, N. Y., Valle-Maldonado, M. I., Jácome-Galarza, I. E., Pérez-Arques, C., Nuñez-Anita, R. E., Campos-García, J., Anaya-Martínez, V., Ortiz-Alvarado, R., Ramírez-Díaz, M. I., Chan Lee, S., Garre, V., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226682>



133. Patiño-Medina, J. A., Vargas-Tejeda, D., Reyes-Mares, N. Y., Alejandro-Castañeda, V., Torres-Cortes, C. J., Pérez-Arques, C., Ruiz-Herrera, L. F., Ramírez-Emiliano, J., Vellanki, S., Valle-Maldonado, M. I., Castro-Cerritos, K. V., Ramirez-Diaz, M. I., Lee, S. C., Garre, V., & Meza-Carmen, V. (2025). Heterotrimeric G-gamma 1 (Gpg1) participates with G-beta 1 (Gpb1) in the induction of hyphal growth and virulence via the PKA pathway in *Mucor lusitanicus*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, *178*, 103974. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2025.103974>
134. Payne, C. L., Dark, M. J., Conway, J. A., & Farina, L. L. (2017). A retrospective study of the prevalence of calcium oxalate crystals in veterinary *Aspergillus* cases. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *29*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1177/1040638716672254>
135. Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M. I., Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2019). *Mucor circinelloides* Thrives inside the Phagosome through an Atf-Mediated Germination Pathway. *mBio*, *10*(1), e02765-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02765-18>
136. Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. (2012). Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 54 Suppl 1:S23-34. doi: 10.1093/cid/cir866. PMID: 22247442.
137. Pham, D., Howard-Jones, A. R., Sparks, R., Stefani, M., Sivalingam, V., Halliday, C. L., Beardsley, J., & Chen, S. C. (2023). Epidemiology, Modern Diagnostics, and the Management of Mucorales Infections. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, *9*(6), 659. <https://doi.org/10.3390/jof9060659>
138. Philpott C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochimica et biophysica acta*, *1763*(7), 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.008>
139. Pittman J. K. (2011). Vacuolar Ca(2+) uptake. *Cell calcium*, *50*(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.01.004>
140. Plattner, H., & Verkhatsky, A. (2013). Ca²⁺ signalling early in evolution--all but primitive. *Journal of cell science*, *126*(Pt 10), 2141–2150. <https://doi.org/10.1242/jcs.127449>
141. Poyton, R. O., Castello, P. R., Ball, K. A., Woo, D. K., & Pan, N. (2009). Mitochondria and hypoxic signaling: a new view. *Annals of the New York*



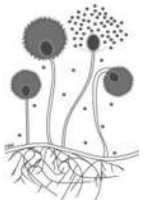
- Academy of Sciences*, 1177, 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05046.x>
142. Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2012). Identification and analysis of cation channel homologues in human pathogenic fungi. *PLoS one*, 7(8), e42404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042404>
143. Puerner, C., Vellanki, S., Strauch, J. L., & Cramer, R. A. (2023). Recent Advances in Understanding the Human Fungal Pathogen Hypoxia Response in Disease Progression. *Annual review of microbiology*, 77, 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032521-021745>
144. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. (2001). G-Proteins and Their Molecular Targets. editors. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10832/>
145. Rai, V., Fisher, N., Duckworth, O. W., & Baars, O. (2020). Extraction and Detection of Structurally Diverse Siderophores in Soil. *Frontiers in microbiology*, 11, 581508. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581508>
146. Rangel-Porras, R. A., Díaz-Pérez, S. P., Mendoza-Hernández, J. M., Romo-Rodríguez, P., Alejandre-Castañeda, V., Valle-Maldonado, M. I., Torres-Guzmán, J. C., González-Hernández, G. A., Campos-García, J., Arnau, J., Meza-Carmen, V., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2019). Alcohol dehydrogenase 1 participates in the Crabtree effect and connects fermentative and oxidative metabolism in the Zygomycete *Mucor circinelloides*. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 57(7), 606–617. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8680-z>
147. Rassaei, N., Shilo, K., Lewin-Smith, M. R., Kalasinsky, V. F., Klassen-Fischer, M. K., & Franks, T. J. (2009). Deposition of calcium salts in a case of pulmonary zygomycosis: histopathologic and chemical findings. *Human pathology*, 40(9), 1353–1357. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.01.022>
148. Raymond, J., & Segrè, D. (2006). The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5768), 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1118439>
149. Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M., & Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *The EMBO journal*, 16(8), 1934–1942. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1934>
150. Reiner DJ & Lundquist EA. (2005). Small GTPases. In: WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. Pasadena (CA):



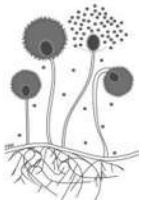
151. Reyes, C. V., & Rippon, J. W. (1984). Localized oxalosis associated with simultaneous *Aspergillus* and *Mucor* infection in diabetic foot gangrene. *Human pathology*, 15(1), 89–91. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(84\)80337-8](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(84)80337-8)
152. Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(17), 6465–6467. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
153. Riquelme M., & Martínez-Núñez L. (2016). Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: a model organism for all seasons [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev):2801 <https://doi.org/10.12688/f1000research.9679.1>
154. Robson, G. D., M. G. Weibe, and A. P. J. Trinci. (1991). Low calcium concentrations induce increased branching in *Fusarium graminearum*. *Mycol. Res.* 95:561-565. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80069-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80069-5)
155. Rokas, A. (2022). Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nat Microbiol* 7, 607–619. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0>
156. Romero-Garcia, S., & Prado-Garcia, H. (2019). Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *International journal of oncology*, 54(4), 1155–1167. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4696>
157. Roncero, M. (1984). Enrichment method for the isolation of auxotrophic mutants of *Mucor* using the polyene antibiotic N-glycosyl-polifungin. *Carlsberg Research Communications*, 49, 685-690.
158. Roncero M., 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
159. Rosén, S., Yu, J. H., & Adams, T. H. (1999). The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *The EMBO journal*, 18(20), 5592–5600. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5592>



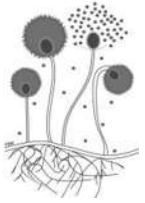
160. Roy, A., Kumar, A., Baruah, D., & Tamuli, R. (2020). Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. *Mycology*, 12(1), 10–24. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1785962>
161. Saavedra-Molina, A., Uribe, S., & Devlin, T. M. (1990). Control of mitochondrial matrix calcium: studies using fluo-3 as a fluorescent calcium indicator. *Biochemical and biophysical research communications*, 167(1), 148–153. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91743-c](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91743-c)
162. Saini, D. K., Chisari, M., & Gautam, N. (2009). Shuttling and translocation of heterotrimeric G proteins and Ras. *Trends in pharmacological sciences*, 30(6), 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.001>
163. Saini, D. K., Kalyanaraman, V., Chisari, M., & Gautam, N. (2007). A family of G protein $\beta\gamma$ subunits translocate reversibly from the plasma membrane to endomembranes on receptor activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(33), 24099–24108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701191200>
164. Salcedo-Hernández, R., Ruiz-Herrera, J. (1993). Isolation and Characterization of a Mycelial cytochrome aa₃-Deficient Mutant and the role of Mitochondria in Dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* 17(2): 142-154.
165. Salcedo-Hernández, R., Escamilla, E., & Ruiz-Herrera, J. (1994). Organization and regulation of the mitochondrial oxidative pathway in *Mucor rouxii*. *Microbiology*, 140(2), 399–407. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-399>
166. Schwartze VU, Winter S, Shelest E, Marcet-Houben M, Horn F, Wehner S, Linde J, Valiante V, Sammeth M, Riege K, Nowrousian M, Kaerger K, Jacobsen ID, Marz M, Brakhage AA, Gabaldón T, Böcker S, Voigt K. (2014). Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: an evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial mucorales (Mucoromycotina). *PLoS Genet* 10:e1004496 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004496>
167. Seo, J. A., Han, K. H., & Yu, J. H. (2005). Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171(1), 81–89. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.042796>
168. Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., & Ernst, J. F. (2006). Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *Journal of molecular biology*, 361(3), 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.040>



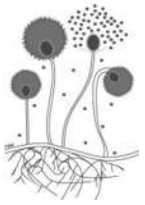
169. Shahin E.A. & Shepard J.F. (1979). An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*. 69:618–620, <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-618>
170. Shemarova, I. V., & Nesterov, V. P. (2005). *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 41(1), 12–17. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0029-z>
171. Shin, K. S., Kwon, N. J., & Yu, J. H. (2009). Gbetagamma-mediated growth and developmental control in *Aspergillus fumigatus*. *Current genetics*, 55(6), 631–641. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0276-4>
172. Sies, H & Jones, D.P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
173. Song, S., Cong, W., Zhou, S., Shi, Y., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., He, B., & Zhang, Q. (2019). Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 14(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.06.004>
174. Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S. G., Cyert, M., Hughes, T. R., Boone, C., & Andrews, B. (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Molecular cell*, 21(3), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.011>
175. Spatafora, J.W., Ying Chang, Gerald L. Benny, Katy Lazarus, Matthew E. Smith, Mary L. Berbee, Gregory Bonito, Nicolas Corradi, Igor Grigoriev, Andrii Gryganskyi, Timothy Y. James, Kerry O'Donnell, Robert W. Roberson, Thomas N. Taylor, Jessie Uehling, Rytas Vilgalys, Merlin M. White & Jason E. Stajich (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data, *Mycologia*, 108:5, 1028-1046, DOI: [10.3852/16-042](https://doi.org/10.3852/16-042)
176. Spatafora, J. W., Aime, M. C., Grigoriev, I. V., Martin, F., Stajich, J. E., & Blackwell, M. (2017). The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiology spectrum*, 5(5), 10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>
177. Spatafora, W., Ying Chang, Gerald L. Benny, Katy Lazarus, Matthew E. Smith, Mary L. Berbee, Gregory Bonito, Nicolas Corradi, Igor Grigoriev, Andrii Gryganskyi, Timothy Y. James, Kerry O'Donnell, Robert W. Roberson, Thomas N. Taylor, Jessie Uehling, Rytas Vilgalys, Merlin M. White & Jason E. Stajich (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete



- fungi based on genome-scale data, *Mycologia*, 108:5, 1028-1046, DOI: [10.3852/16-042](https://doi.org/10.3852/16-042)
178. Spurr N. K. (2003). Genetics of calcium-sensing--regulation of calcium levels in the body. *Current opinion in pharmacology*, 3(3), 291–294. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(03)00034-1)
179. Stanić, M., Zakrzewska, J., Hadžibrahimović, M., Zičić, M., Marković, Z., Vučinić, Z., & Zivić, M. (2013). Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism. *Research in microbiology*, 164(7), 770–778. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.002>
180. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
181. Szebenyi, C., Gu, Y., Gebremariam, T., Kocsubé, S., Kiss-Vetráb, S., Jáger, O., Patai, R., Spisák, K., Sinka, R., Binder, U., Homa, M., Vágvölgyi, C., Ibrahim, A. S., Nagy, G., & Papp, T. (2023). *cotH* Genes Are Necessary for Normal Spore Formation and Virulence in *Mucor lusitanicus*. *mBio*, 14(1), e0338622. <https://doi.org/10.1128/mbio.03386-22>
182. Tahiri, G., Lax, C., Cánovas-Márquez, J.T., Carrillo-Marín, P., Sanchis, M., Navarro, E., Garre, V., Nicolás, F.E. (2023). *Mucorales* and Mucormycosis: Recent Insights and Future Prospects. *J. Fungi* 9, 335. <https://doi.org/10.3390/jof9030335>
183. Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., & Oumar, A.A.B. (2015). Effect of organic and inorganic salts as alternative strategy for the control of postharvest citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Acta Horticulturae*, 1065 (2015),pp. 1577-1583. [10.17660/ActaHortic.2015.1065.201](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.201)
184. Teng, J., R. Goto, K. Iida, I. Kojima, and H. Iida, 2008 Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154: 3775– 3781.
185. Terk, M. R., Underwood, D. J., Zee, C. S., & Colletti, P. M. (1992). MR imaging in rhinocerebral and intracranial mucormycosis with CT and pathologic correlation. *Magnetic resonance imaging*, 10(1), 81–87. [https://doi.org/10.1016/0730-725x\(92\)90376-b](https://doi.org/10.1016/0730-725x(92)90376-b)
186. Tesmer J. J. (2010). The quest to understand heterotrimeric G protein signaling. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 650–652. <https://doi.org/10.1038/nsmb0610-650>



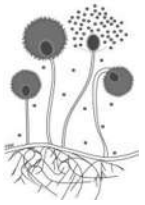
187. Tian S. P., Fan Q., Xu Y., & Jiang A. L. (2002). Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*, *Plant Pathology*. (2002) **51**, no. 3, 352–358, 2-s2.0-0036270320. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00711.x>
188. Tisi R., Rigamonti M., Groppi S. & Belotti F. (2016). Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. *AIMS Mol Sci.* 3(4):505–549. doi: 10.3934/molsci.2016.4.505.
189. Ugalde U.O. & Pitt D. (1986). Calcium uptake kinetics in relation to conidiation in submerged cultures of *Penicillium cyclopium*. *Trans Br Mycol Soc.* 87:199–203. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80021-3)
190. Ugalde, U. O., Virto, M. D., & Pitt, D. (1990). Calcium binding and induction of conidiation in protoplasts of *Penicillium cyclopium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF00400335>
191. Ukoha, C. D., Jr, & Nguyen, N. (2021). Pulmonary Mucormycosis: An Interesting Case of *Rhizopus* Mucormycosis. *Cureus*, 13(7), e16210. <https://doi.org/10.7759/cureus.16210>
192. van Heeswijck R. & Roncero M. (1984). High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res Commun* 49:691–702
193. van der Helm D. & Winkelmann G. (1994). Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. *Metal ions in fungi*. Vol. 11. New York, N.Y: Marcel Dekker, Inc.; pp. 39–98.
194. 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(12), 1179–1193. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.009>
195. Valle-Maldonado, M.I.; Patiño-Medina, J.A.; Pérez-Arques, C.; Reyes-Mares, N.Y.; Jácome-Galarza, I.E.; Ortíz-Alvarado, R.; Vellanki, S.; Ramírez-Díaz, M.I.; Lee, S.C.; Garre, V. (2020). The heterotrimeric G-protein beta subunit Gpb1 controls hyphal growth under low oxygen conditions through the protein kinase A pathway and is essential for virulence in the fungus *Mucor circinelloides*. *Cell Microbiol.* 22, e13236.
196. Veiga, A., Arrabaça, J. D., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic



- fermentation. *FEMS microbiology letters*, 190(1), 93–97.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09268.x>
197. Verkhatsky, A., & Parpura, V. (2014). Calcium signalling and calcium channels: evolution and general principles. *European journal of pharmacology*, 739, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.013>
198. Vilas-Boas, E. A., Cabral-Costa, J. V., Ramos, V. M., Caldeira da Silva, C. C., & Kowaltowski, A. J. (2023). Goldilocks calcium concentrations and the regulation of oxidative phosphorylation: Too much, too little, or just right. *The Journal of biological chemistry*, 299(3), 102904. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102904>
199. Vu, K., Bautos, J. M., & Gelli, A. (2015). The Cch1-Mid1 High-Affinity Calcium Channel Contributes to the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Mitigating Oxidative Stress. *Eukaryotic cell*, 14(11), 1135–1143. <https://doi.org/10.1128/EC.00100-15>
200. Wagner, L.; de Hoog, S.; Alastruey-Izquierdo, A.; Voigt, K.; Kurzai, O.; Walther, G. (2019). A revised species concept for opportunistic *Mucor* species reveals species-specific antifungal susceptibility profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 63, e00653-19 <https://doi.org/10.1128/aac.00653-19>
201. Walther G, Wagner L, Kurzai O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*. <https://doi.org/10.3390/jof5040106>
202. Wang, P., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2000). The G-protein beta subunit GPB1 is required for mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular and cellular biology*, 20(1), 352–362. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.352-362.2000>
203. Wang, S., Cao, J., Liu, X., Hu, H., Shi, J., Zhang, S., Keller, N. P., & Lu, L. (2012). Putative calcium channels CchA and MidA play the important roles in conidiation, hyphal polarity and cell wall components in *Aspergillus nidulans*. *PLoS one*, 7(10), e46564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046564>
204. Webster, J., & Weber R.W.S. (2007). *Introduction to fungi*, third edition, Cambridge University Press, 2007, pp. 1-13.
205. Wei, H., Wang, W., Yarbrough, J. M., Baker, J. O., Laurens, L., Van Wychen, S., Chen, X., Taylor, L. E., 2nd, Xu, Q., Himmel, M. E., & Zhang, M. (2013). Genomic, proteomic, and biochemical analyses of oleaginous *Mucor*



- circinelloides: evaluating its capability in utilizing cellulolytic substrates for lipid production. *PLoS one*, 8(9), e71068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071068>
206. White M.M., James T.Y., O'Donnell K. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* (98)6: 872-884.
207. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
208. Wolfe, D. M., & Pearce, D. A. (2006). Channeling studies in yeast: yeast as a model for channelopathies? *Neuromolecular medicine*, 8(3), 279–306. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:3:279>
209. Wolff, A.M. & Arnau, J. (2002). Cloning of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology* 35, 21–29.
210. Wolff, A., Appel, K., Petersen, J., Poulsen, U., Arnau, J. (2002). Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*), *FEMS Yeast Research*, Volume 2, Issue 2, Pages 203–213, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00085.x>
211. Xiao, R., Chun, L., Ronan, E. A., Friedman, D. I., Liu, J., & Xu, X. Z. (2015). RNAi Interrogation of Dietary Modulation of Development, Metabolism, Behavior, and Aging in *C. elegans*. *Cell reports*, 11(7), 1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.024> Xu, J. W., Zhao, W., Xu, Y. N., & Zhong, J. J. (2012). Isolation and analysis of differentially expressed genes during asexual sporulation in liquid static culture of *Ganoderma lucidum* by suppression subtractive hybridization. *Molecular biology reports*, 39(4), 3603–3610. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1134-2>
212. Xue C, Hsueh YP, Heitman J. (2008). Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev* 32:1010-1032.
213. Yadav N., Yadav A. (2018b). Biodiversity and biotechnological applications of novel plant growth promoting mycorrhizal fungi. *J. Appl Biotechnol Bioeng* 5:342–34.
214. Yang, D., Shi, H., Zhang, K., Liu, X., & Ma L. (2023). The antifungal potential of the chelating agent EDTA against postharvest plant pathogen



- Botrytis cinerea. International Journal of Food Microbiology. 388: 110089. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110089>
215. Yee, J. (2007). Hypercalcemia. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, Pages 1-6, <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60633-6>.
216. Yu Q, Ding X, Zhang B, Xu N, Jia C, et al. (2014) Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. FEMS Yeast Res (in press).
217. Yu, Q., Wang, H., Cheng, X. *et al.* (2012). Roles of Cch1 and Mid1 in Morphogenesis, Oxidative Stress Response and Virulence in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 174: 359–369 <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9569-0>
218. Zhang, J., Liu, W., Liu, J., Xiao, W., Liu, L., Jiang, C., Sun, X., Liu, P., Zhu, Y., Zhang, C., & Chen, Q. (2010). G-protein β 2 subunit interacts with mitofusin 1 to regulate mitochondrial fusion. *Nature communications*, 1, 101. <https://doi.org/10.1038/ncomms1099>
219. Zhang, L., Kang, P. T., Chen, C. L., Green, K. B., & Chen, Y. R. (2013). Oxidative modifications of mitochondria complex II. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1005, 143–156. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-386-2_12
220. Zhang, Y., Navarro, E., Cánovas-Márquez, J. T., Almagro, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Zhang, H., Torres-Martínez, S., Chen, W., & Garre, V. (2016). A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate β -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microbial cell factories*, 15, 99. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0493-8>
221. Zhao, Y., Du, J., Zhao, G., & Jiang, L. (2013). Activation of calcineurin is mainly responsible for the calcium sensitivity of gene deletion mutations in the genome of budding yeast. *Genomics*, 101(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.09.005>
222. Ziaee A, Zia M, Bayat M, Hashemi J. (2016). Molecular Identification of *Mucor* and *Lichtheimia* Species in Pure Cultures of Zygomycetes. *Jundishapur J Microbiol.* Apr 9;9(4):e35237. doi: 10.5812/jjm.35237. PMID: 27284399; PMCID: PMC4898167.

Francisco Ríos Míreles

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Gpb1 (SUBUNIDAD BETA 1) Y Gpg1 (SUBUNIDAD GAMA 1) EN LA

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:470859195

Fecha de entrega

30 jun 2025, 12:03 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

30 jun 2025, 12:08 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Gpb1 (SUBUNIDAD BETA 1) Y Gpg1 (SUBUNI....pdf

Tamaño de archivo

4.3 MB

190 Páginas

52.676 Palabras

287.274 Caracteres

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL	
Título del trabajo	"FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS Gpb1 (SUBUNIDAD BETA 1) Y Gpg1 (SUBUNIDAD GAMA 1) EN LA SEÑALIZACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL Y VIRULENCIA MEDIADA POR CALCIO EN <i>Mucor lusitanicus</i> "	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	FRANCISCO RÍOS MÍRELES	2224480c@umich.mx
Director	VÍCTOR MEZA CARMEN	victor.meza@umich.mx
Codirector	-----	-----
Coordinador del programa	MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO	mauro.martinez.pacheco@umich.mx

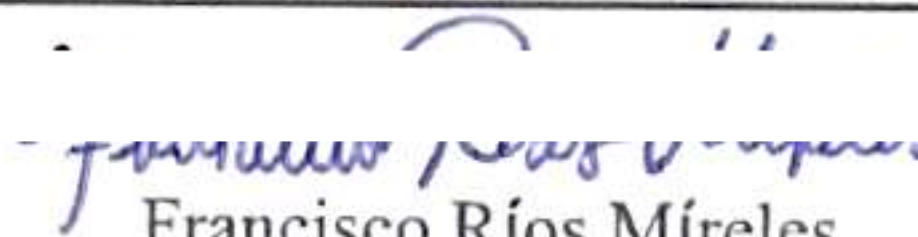
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	-----

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	SÍ	Uso del traductor de Google para la traducción de texto de inglés a español
Traducción a otra lengua	NO	-----
Revisión y corrección de estilo	NO	-----
Análisis de datos	NO	-----
Búsqueda y organización de información	NO	-----
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	-----
Generación de contenido multimedia	NO	-----
Otro	NO	-----

Datos del solicitante	
Nombre y firma	 Francisco Ríos Míreles
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 30 de Junio de 2025