



UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

“Caracterización de la MAPK MpkB en *Aspergillus terreus*; efecto en la producción de lovastatina en medio sólido y líquido”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

GUZMÁN GUZMÁN DIANA ESTELA

Matrícula: 2223801869

dianaegg0309@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER BARRIOS GONZÁLEZ

ASESORAS: DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

DRA. AILED PÉREZ SÁNCHEZ

JURADO

PRESIDENTE: ULISES CARRASCO NAVARRO

SECRETARIA: AILED PÉREZ SÁNCHEZ

VOCAL: ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL: MARÍA DE LOURDES VILLA TANACA

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 28 DE NOVIEMBRE, 2025



El presente proyecto se realizó en el **Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios** del Departamento de Biotecnología de División de Ciencias Biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Javier Barrios González.

Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP) del SECIHTI.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Barrios por darme la oportunidad, una persona a la cual respeto demasiado por toda su trayectoria, agradezco la paciencia y asesoramiento en mi desarrollo académico.

Agradezco a mis padres por todo el esfuerzo que han hecho por mí y motivarme todos los días, son mi fortaleza e inspiración.

A mis hermanas por todo su cariño, respaldo, compañía y por brindarme una familia unida.

Edgar y Jazmín por todo su cariño y apoyo, gracias por estar a mi lado, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por celebrar conmigo cada pequeño logro, han sido mi refugio y mi fuerza a lo largo de este viaje académico.

A Montserratt por su tiempo, paciencia y todas las lecciones que me brindó.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por los consejos y convivencias.

Agradezco a los doctores que atendieron mis dudas y admiro mucho Ulises, Ailed, Wyl y Fer.

A mis amigos de otras áreas que me escucharon y animaron cuando más lo necesitaba.

A la UAM por brindarme un espacio para poder cumplir este proyecto.

Un agradecimiento especial a SECIHTI por su financiamiento para los investigadores y para todos los estudiantes que, como yo, buscan aportar al avance del conocimiento y del país.

Finalmente, mis mascotas porque sin ellos no podría conocer el cariño sincero, fueron mi compañía y apoyo emocional en este proceso.

Avanzar no significa correr; a veces, significa resistir con dignidad, persistir con alegría y sembrar curiosidad incluso en los terrenos más áridos. -JF

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 Hongos filamentosos	5
2.2 Metabolitos secundarios.....	5
2.2.1 Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios.....	6
2.3 Estatinas.....	6
2.4 Lovastatina	9
2.4.1 Biosíntesis	10
2.4.2 Producción industrial de lovastatina.....	11
2.5 Fermentación sólida.....	11
2.6 Vías MAPK	13
2.7 Papel de <i>mpkB</i> en otros hongos	14
2.7.1 Levadura.....	14
2.7.2 Hongos fitopatógenos.....	15
2.7.3 Otros hongos filamentosos	16
2.8 ARN de interferencia (ARNi)	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	22

5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
6. Materiales y Métodos	23
6.1 Aparatos y equipos	23
6.2 Microorganismos	24
6.2.1 Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514	24
6.2.2 Cepa bacteriana: <i>Escherichia coli</i> DH5 α	24
6.3 Antibióticos	24
6.3.1 Ampicilina	24
6.3.2 Fleomicina	24
6.4 Medios de cultivo y amortiguadores	25
6.4.1 Medio para <i>Escherichia coli</i> DH5 α	25
6.4.2 Medio para <i>A. terreus</i>	25
6.4.3 Amortiguadores	29
6.5 Vector de silenciamiento	30
6.6 Condiciones de cultivo	31
6.6.1 Esporulación de <i>Aspergillus terreus</i>	31
6.6.2 Conteo de esporas	31
6.6.3 Obtención de micelio joven de <i>A. terreus</i>	31
6.6.4 Crecimiento de esporas y micelio en medio PDA de <i>A. terreus</i>	31
6.6.5 Crecimiento <i>Escherichia coli</i> DH5 α	32
6.7 Técnicas microbiológicas	32
6.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>A. terreus</i> por fleomicina.....	32
6.7.2 Siembra por cobertera para la obtención de transformantes de <i>A. terreus</i>	32
6.7.3 Obtención de transformantes de <i>A. terreus</i> con núcleo completamente transformado	32
6.8 Producción de lovastatina en fermentación líquida y sólida	33
6.9 Técnicas analíticas.....	33
6.9.1 Fermentación sólida.....	33

6.9.2 Fermentación líquida	34
6.9.3 Cuantificación de lovastatina	34
6.9.4 Curva Patrón a partir de la conversión de la lovastatina a su forma β -hidroxiácida	34
6.9.5 Determinación de biomasa y humedad	34
6.9.6 pH	35
6.9.7 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs)	35
6.10 Técnicas moleculares	35
6.10.1 Extracción de ADN genómico de <i>A. terreus</i>	35
6.10.2 Extracción de ARN	36
6.10.3 Síntesis de ADNc	36
6.10.4 Identificación de <i>mpkB</i> en <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514	36
6.10.5 PCR	36
6.10.6 RT-qPCR	38
6.10.7 Células ultracompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α	39
6.10.8 Transformación bacteriana	39
6.10.9 Extracción de ADN plasmídico por minipreps.	39
6.10.10 Purificación a gran escala de ADN plasmídico por midipreps.	40
6.10.11 Digestión de ADN plasmídico.	40
6.10.12 Desfosforilación de ADN plasmídico digerido	41
6.10.13 Construcción del vector de silenciamiento pGdpki-ARNi- <i>mpkB</i>	41
6.10.14 Transformación de <i>A. terreus</i> por protoplastos	45
6.11 Caracterización de las transformantes	47
6.11.1 Crecimiento radial	47
6.11.2 Esporulación	47
6.11.3 Hidrofobicidad de la célula	48
6.11.4 Sensibilidad a estrés oxidante	48
6.11.4.1 Micelio	48
6.11.4.2 Esporas	48
6.11.5 Sensibilidad a estrés osmótico	48
6.11.5.1 Micelio	48
6.11.5.2 Esporas	49
6.11.6 Sensibilidad a estrés de pared	49
6.11.6.1 Micelio	49
6.11.7 Formación de biofilm (capacidad de adherencia)	49

6.12 Herramienta bioinformática	50
7. Resultados	51
7.1 Identificación de <i>mpkB</i> en <i>A. terreus</i> NIH2624	51
7.2 Análisis bioinformático de <i>mpkB</i>	52
7.2.1. Dominios catalíticos	52
7.2.2 NLS (señal de localización nuclear) identificada	52
7.2.3 Análisis de las interacciones de la proteína MpkB	53
7.2.4 Modelo 3D de la proteína SWISSMODEL	54
7.3 Perfil de expresión de <i>mpkB</i>	55
7.4 Identificación y amplificación del fragmento de gen <i>mpkB</i> en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514.....	56
7.4.1 Gradiente de temperatura para encontrar Tm	56
7.5 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi- <i>mpkB</i>	57
7.6 Transformación de <i>A. terreus</i> con el vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi- <i>mpkB</i>	60
7.6.1 Obtención de transformantes <i>A. terreus</i> con pGpdPki-ARNi- <i>mpkB</i> por protoplastos.....	60
7.7 Pruebas de sensibilidad a estrés oxidante, osmótico y de pared	62
7.7.1 Estrés oxidante.....	62
7.7.2 Estrés osmótico	63
7.7.3 Estrés de pared	64
7.8 Evaluación de otras características fenotípicas importantes para el medio sólido.....	66
7.8.1 Crecimiento radial.....	66
7.8.2 Esporulación.....	67
7.8.3 Formación de Biofilm	68
7.8.4 Hidrofobicidad	69
7.9 Producción de lovastatina.....	70
7.10 Comprobación del silenciamiento por RT-qPCR	71
7.11 Cinética de producción de lovastatina de las transformantes seleccionadas.	71
7.12 Especies reactivas de oxígeno (EROs)	72
8. Discusión.....	73

8.1 Análisis bioinformático	73
8.2 Perfil de expresión	74
8.3 Sensibilidad de estrés oxidante, osmótico y de pared de las <i>SimpkB</i>	74
8.4 Crecimiento y esporulación	75
8.5 Formación de biofilm e hirofobicidad.....	75
8.6 Producción de lovastatina.....	76
8.7 Comprobación del silenciamiento	77
8.8 Especies reactivas de oxígeno.....	77
9. Conclusiones.....	79
10. Perspectivas.....	80
11. Bibliografía.....	81
ANEXOS	89
Anexo I. Análisis bioinformático <i>mpkB</i>	89
Anexo II. Diseño de primers	93
Anexo III. Secuenciación	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de diferentes estatinas.....	7
Figura 2. Modelo que describe la gran diversidad de efectos biológicos de las estatinas.	8
Figura 3. Estructura molecular de la lovastatina.....	9
Figura 4. Ruta biosintética de la lovastatina.	10
Figura 5. Vía biosintética de lovastatina	11
Figura 6. Vía de señalización MAPK generalizada.....	13
Figura 7. Tres vías MAPK en levadura	15
Figura 8. H ₂ O ₂ induce al estrés y activación de las vías de señalización MAPK.....	17
Figura 9. Representación de la expresión genética que conduce a la síntesis de proteínas.....	19
Figura 10. Vector pGpdPki-ARNi, diseñado en BENCHLING (benchling.com).....	30
Figura 11. Mapa de inserción de mpkB en el vector de silenciamiento	42
Figura 12. Secuencia para el aislamiento de las transformantes.....	47
Figura 13. Interactoma in silico utilizando el servidor STRING 12.0 MpkB en color rojo.....	53
Figura 14. Simulación de la proteína MpkB en 3D.	54
Figura 15. Simulación proteína MpkB en 3D, sitios de posible fosforilación	54
Figura 16. Perfil de expresión de mpkB (RT-qPCR) FL.....	55
Figura 17. Perfil de expresión de mpkB (RT-qPCR) FS.....	55
Figura 18. Gel de agarosa 1% PCR, gradiente de temperatura para amplificar mpkB	56
Figura 19. mapa para de construcción del vector pGpdPki-ARNi-mpkB	57
Figura 20. Controles para construcción del vector pGpdPki-ARNi-mpkB	58
Figura 21. Gel de agarosa 1% construcción del vector de silenciamiento.....	59
Figura 22. Gel de agarosa al 1% PCR de colonia	59
Figura 23. Controles de transformación.....	60
Figura 24. Transformantes de A. terreus con el vector de silenciamiento pGdpki-ARNi-mpkB.....	61
Figura 25. Sensibilidad a estrés oxidante en micelio	62
Figura 26. Sensibilidad a estrés oxidante en esporas	63
Figura 27. Sensibilidad a estrés osmótico en micelio	63
Figura 28. Sensibilidad a estrés osmótico en esporas	64
Figura 29. Sensibilidad a estrés de pared	65
Figura 30. Resumen gráfico de la sensibilidad de micelio a distintos tipos de estrés.....	65
Figura 31. Crecimiento radial en medio PDA.....	66
Figura 32. Transformantes con el vector de silenciamiento.....	67
Figura 33. Esporulación 48 h y 96 h.....	67

Figura 34. Formación de biofilm a las 24 h	68
Figura 35. Porcentaje de formación de biofilm a las 48 h	69
Figura 36. Hidrofobicidad	69
Figura 37. Tamaño de pellet.....	70
Figura 38. Producción de lovastatina a las 96 h.....	70
Figura 39. RT-qPCR P Transformantes con el vector de silenciamiento72 h	71
Figura 40. Cinética de producción de lovastatina de las SimpKB elegidas	72
Figura 41. EROs a las 48 horas	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener el fragmento de <i>mpkB</i>	37
Tabla 2. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener el fragmento de <i>mpkB</i>	37
Tabla 3. Condiciones PCR para amplificar <i>mpkB</i>	37
Tabla 4. Reacción de PCR con HIFI Polimerasa de alta fidelidad para obtener fragmento de <i>mpkB</i>	38
Tabla 5. Oligonucleotidos qPCR.....	38
Tabla 6. Reacción de qPCR para la expresión relativa.....	38
Tabla 7. Condiciones de de RT-qPCR.....	39
Tabla 8. Condiciones de digestión de ADN.....	41
Tabla 9. Condiciones de desfosforilación de ADN plasmídico	41
Tabla 10. Construcción del vector <i>pGpdPki-ARNi-mpkB</i>	42
Tabla 11. Controles positivos y negativos para la transformación de las células de <i>E. coli</i> con las construcciones de silenciamiento.....	43
Tabla 12. Análisis BLAST de proteínas de los ortólogos de <i>mpkB</i> y la secuencia putativa en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 (taxid 341663).	51
Tabla 13. Análisis BLAST de proteínas de la secuencia putativa <i>mpkB</i> en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 (taxid 341663) en otros organismos.	51
Tabla 14. Localización subcelular de <i>MpkB</i> obtenido de DeepLoc-2.0	53

ABREVIATURAS

ARNi: ARN de interferencia

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FS: Fermentación sólida

FL: Fermentación líquida

MAPK: Proteínas cinasa activadas por mitógeno

MS: Metabolitos secundarios

PUF: Poliuretano

SimpkB: Transformantes de *Aspergillus terreus* con el gen *mpkB* silenciado

RESUMEN

Las estatinas son un grupo de fármacos altamente efectivo que reducen los niveles de colesterol en sangre, disminuyendo así el riesgo de sufrir un ataque cardíaco o un derrame cerebral. La simvastatina, la segunda estatina más importante del mercado, es un derivado semisintético de la lovastatina, producida industrialmente por cepas de *Aspergillus terreus*, generalmente por fermentación líquida (FL), aunque también se puede obtener por fermentación sólida (FS).

La FS presenta muchas ventajas, como una mayor producción y la baja actividad de agua requerida, lo que resulta en una menor cantidad de efluentes, esto se ha relacionado con una fisiología diferente y especial, llamada fisiología del medio sólido. Debido a estas ventajas este tipo de cultivo se ha vuelto cada vez más atractivo para la investigación y la industria. Sin embargo, aún se trabajará en su caracterización y en comprender su relación con los estímulos que los organismos perciben al estar en un sistema o en otro.

Los organismos son capaces de detectar y responder a una amplia variedad de estímulos del entorno. Entre las vías clave de la percepción de estas señales se encuentran las vías de las MAPK cinasas conocidas como casadas de señalización activadas por mitógenos (MAPK). Estas vías implican activaciones de varias moléculas de señalización membranal seguidas de una estimulación secuencial de varias proteínas cinasas citoplasmáticas que generan una respuesta a su entorno.

MpkB es una MAP cinasa de la vía de señalización de crecimiento filamentoso que ha sido relacionada con el metabolismo secundario en la síntesis de aflatoxinas en *Aspergillus flavus*, por lo que se ha considerado su posible relación con la producción de lovastatina y un papel importante en la fisiología del medio sólido.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el papel de *mpkB* en *A. terreus*. Se silenció el gen con un vector de ARN de interferencia (ARNi), y se comparó la producción de lovastatina en ambos sistemas, FL y FS, así como otros parámetros relacionados, para analizar su interacción con otras vías MAPK. Las mutantes *simpkB* de *A. terreus* mostraron una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, osmótico y de pared celular, presentaron una disminución en la producción de lovastatina, tanto en FL como en FS. Además, exhibieron una menor esporulación y formación tardía del biofilm. En este proyecto se determinó que MpkB está relacionado con el metabolismo secundario, como la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus*, así como con funciones asociadas con la fisiología del medio sólido (formación de biofilm y esporulación).

ABSTRACT

Statins are a group of highly effective drugs that lower blood cholesterol levels, thereby decreasing the risk of heart attack and stroke. Simvastatin, the second most important statin on the market, is a semi-synthetic derivative of lovastatin, industrially produced by strains of *Aspergillus terreus*, usually by liquid fermentation (LF), although it can also be obtained by solid fermentation (SF).

SF has many advantages, such as higher production and low water activity required, resulting in a lower amount of effluents. This has been linked to a different and special physiology, called physiology of solid medium. Due to these advantages, this type of cultivation has become increasingly attractive for research and industry. However, work is still being done to characterize it and to understand how it relates to the stimuli that organisms perceive when in one system or another.

Organisms can detect and respond to a wide variety of stimuli from the environment. Among the key pathways in the perceptions of these signals are MAPK kinase pathways, known as mitogen-activated protein kinase (MAPKs) cascades. That involves the activation of several membrane signaling molecules followed by a sequential stimulation of several cytoplasmic protein kinases, that generate a response to the environment.

MpkB is a MAPKinase of the filamentous growth signaling pathway that has been linked to secondary metabolism in aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus*. Therefore, it is considered for its potential connection with lovastatin production and its important role physiology of solid medium.

The objective of the present work was to characterize the role of *mpkB* in *A. terreus*. The gene was silenced using an ARN interference (ARNi) vector, and lovastatin production was compared in both systems, LF and SF, along with other related parameters to analyze its interaction with other MAPK pathways. The *simpkB* mutants of *A. terreus* showed increased sensitivity to oxidative, osmotic, and cell wall stress, and exhibited a decrease in lovastatin production in both LF and SF. In addition, they showed lower sporulation and delayed biofilm formation. In this project, it was determined that MpkB is related to secondary metabolism, such as the biosynthesis of lovastatin in *A. terreus*, as well as to functions associated with physiology of solid medium (biofilm formation and sporulation).

1. Introducción

Los hongos filamentosos son organismos que producen distintos metabolitos secundarios (MS) sintetizados a partir de intermediarios del metabolismo primario (aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos). Los MS no juegan un papel fisiológico durante la primera fase de crecimiento rápido llamada trofófase, sino que son producidos en la fase de producción subsecuente en la que el microorganismo crece lentamente o no crece, pero sigue metabólicamente activo en una etapa llamada idiofase, la cual inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de algún nutriente clave como el carbono, nitrógeno, fosfato etc. Los MS tiene numerosas aplicaciones a nivel industrial y ambiental (Barrios-González et al., 2003).

Aspergillus terreus es un hongo filamentoso que se utiliza a nivel industrial para la obtención de lovastatina, compuesto precursor utilizado para sintetizar la simvastatina que tiene una mayor eficiencia; esta forma parte del grupo de los fármacos llamados estatinas. Las estatinas son utilizadas en personas con los niveles altos de colesterol en sangre, un padecimiento que causa enfermedades coronarias y ataques al corazón, que son la principal causa de muerte en México y el mundo. Del colesterol total del cuerpo, solo una tercera parte se origina de la alimentación, mientras que las otras dos terceras partes son producidas por el hígado (Alberts et al. 1980).

La lovastatina actúa como un inhibidor competitivo de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la cual es una enzima clave en la regulación de la biosíntesis del colesterol en humanos y animales (Hajjaj et al., 2001).

La producción de lovastatina a gran escala se realiza convencionalmente por fermentación líquida (FL). No obstante, en la actualidad se tiene un gran interés en la fermentación sólida (FS) debido a que presenta ciertas ventajas como: utilizar sustratos económicos, generar una menor cantidad de efluentes y, sobre todo, se tiene alta productividad. La fermentación sólida es un tipo de proceso de fermentación que se lleva a cabo en sustratos sólidos, por ejemplo, residuos agroindustriales, pulpa de frutas, cáscaras de cereales, entre otros. Este proceso se caracteriza porque los microorganismos se adhieren a la superficie del sustrato y producen enzimas que degradan los componentes de este.

Para conocer la fisiología en medio sólido se han realizado diversos estudios bioquímicos y moleculares que muestran que existen estímulos ambientales que el hongo detecta y traduce para generar una respuesta. Los principales estímulos ambientales detectados por el micelio en FS han sido identificados como estímulos que inducen la fisiología en medio sólido, los más importantes son: el contacto directo

con el aire y el estímulo del soporte principalmente en la producción de lovastatina en *A. terreus* (Ávila Cisneros, 2009).

Se ha descubierto que las vías MAPK están involucradas en la transferencia de la información recibida de estímulos extracelulares a la célula, que ofrecen como resultado final la activación de diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de genes en respuesta a aquellos. En todas las especies de hongos, las vías MAPK tienen importantes funciones en su fisiología y desarrollo, por ejemplo, el control del ciclo celular, el apareamiento, la morfogénesis, la respuesta a diferentes tipos de estrés, la resistencia a la luz UV y a los cambios de temperatura, la formación e integridad de la pared celular, la degradación de los orgánulos, la virulencia, la señalización célula-célula. (Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017).

Las intervenciones genéticas o técnicas de mejoramiento genético han facilitado la modificación de las cepas fúngicas de acuerdo con nuestras demandas, ya sea para incrementar la producción o las características del producto (Patel et al., 2023).

En la actualidad se han comenzado a estudiar los genes involucrados en las vías MAPK, desde su ubicación hasta su relación en la producción de MS así como su interacción entre los estímulos que percibe. En el grupo de trabajo se estudió la influencia de la aireación, ya que ésta es necesaria para el crecimiento y desarrollo de muchos hongos en la producción de metabolitos secundarios, se encontró que la aireación genera especies reactivas de oxígeno.

Se ha identificado que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs) aumenta justo antes de iniciar la biosíntesis de lovastatina. La concentración de EROs en idiofase es mayor en FL que en FS, no obstante, en FS las EROs, mantienen un nivel mucho más estable. Estas distinciones fisiológicas están relacionadas a la alta producción de lovastatina en FS (Miranda et al. 2013).

En esta tesis se realizó el estudio del gen *mpkB* con el objetivo de analizar su papel en la vía de señalización celular, así como su relación con la producción de lovastatina, a través de la construcción del vector de silenciamiento y la obtención de transformantes. Finalmente se caracterizó a diferentes tipos de estrés y se midió la producción de lovastatina.

2. Antecedentes

2.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se encuentran en una variedad de hábitats, incluyendo suelos, agua, plantas, animales y materia orgánica en descomposición y repercuten en el ser humano de manera positiva y negativa.

Como organismos saprófitos poseen un potente sistema secretor para hacer que los nutrientes sean biodisponibles. Esto ha demostrado ser una ventaja del cultivo de hongos, ya que el producto se libera en el medio circundante, lo que facilita la recuperación del producto y el paso posterior del procesamiento (Conesa et al. 2001).

Su sistema secretor no es la única ventaja, ya que previene la formación de cuerpos de inclusión y tienen capacidad de modificación de proteínas de forma postraducciona. (Gerngross, 2004; Punt et al. 2002).

Por sus diversas características permiten que sean ampliamente explotados como fábricas celulares en la producción de metabolitos, sustancias bioactivas, proteínas nativas y heterólogas. Los hongos filamentosos tienen su intervención en casi todas las aplicaciones industriales de los bioproductos. Su morfología juega un papel extremadamente importante en la producción de metabolitos a escala industrial (Patel et al., 2023).

2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas que no participan en el crecimiento normal y desarrollo de un organismo. Las diferentes clases de estos compuestos a menudo se asocian a un conjunto reducido de especies dentro de un grupo filogenético y constituyen el compuesto bioactivo en varios medicamentos, moléculas aromáticas, colorantes y especias y/o alimentos funcionales (Costa et al., 2012).

El organismo productor puede crecer en ausencia de sus síntesis, lo que sugiere que el metabolismo secundario no es esencial. Una segunda visión propone que los genes involucrados en el metabolismo secundario proporcionan un "campo de juego genético" que permite que la mutación y la selección natural fijen nuevos rasgos beneficiosos a través de la evolución. Una tercera visión caracteriza el metabolismo secundario como una parte integral del metabolismo y biología celular; depende del

metabolismo primario para suministrar la cantidad necesaria de enzimas, energía, sustratos y maquinaria celular que contribuye al largo plazo supervivencia del productor (Roze et al., 2011).

2.2.1 Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios

Se ha demostrado que los metabolitos secundarios se forman a través de rutas alternativas al metabolismo primario y se originan de un número pequeño de puntos de ramificación, constituyendo unas pocas familias biosintéticas (Miranda 2013; Barrios-González et al., 2003; Keller et al., 2005):

A. *Metabolitos derivados del ácido shikímico (aminoácidos aromáticos)*. Ejemplos son los alcaloides ergotamina y los antibióticos candidicina y cloramfenicol.

B. *Metabolitos derivados de aminoácidos*. Esta familia abarca los antibióticos β -lactámicos (penicilina, cefalosporinas y cefamicinas) así como antibióticos ciclopeptídicos como la gramicidina, ciclosporina utilizada como agente inmunosupresivo.

C. *Metabolitos derivados del Acetil-CoA (y compuestos relacionados, incluyendo los intermediarios del ciclo de Krebs)*. Esta familia puede subdividirse en policétidos y terpenos. En el grupo de los policétidos encontramos la lovastatina, la eritromicina (antibiótico), la avermectina (compuesto insecticida-antiparasitario) y la doxorubicina (agente antitumoral). En el grupo de los terpenos se encuentra el ácido giberélico (hormona vegetal).

D. *Metabolitos derivados de azúcares*. a este grupo pertenece la estreptomycin y la kanamicina.

Considerando que las rutas biosintéticas secundarias están vinculadas a las rutas metabólicas primarias y utilizan los mismos intermediarios, los mecanismos de regulación como: inducción, regulación por catabolito y/o regulación por retroalimentación, controlan su biosíntesis. Estos mecanismos regulatorios específicos de las rutas funcionan en conjunto con un control general que está vinculado a la velocidad de crecimiento (Barrios-González & Mejía, 2007).

2.3 Estatinas

El colesterol es un componente importante de las membranas celulares y un precursor de diversas hormonas, sales biliares y vitaminas, sin embargo, su presencia en cantidades elevadas provoca un incremento en los riesgos de padecer enfermedades coronarias (Chegwin-Angarita et al., 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2008, alrededor de 17.9 millones de personas murieron

a causa de enfermedades cardiovasculares, lo que representa el 32% del total de muertes mundiales. La mayoría de las enfermedades cardiovasculares pueden evitarse tratando los factores de riesgo comportamentales como el uso de tabaco, una alimentación poco saludable y la obesidad, la falta de actividad física y el consumo perjudicial de alcohol. Es crucial identificar las enfermedades cardiovasculares lo más pronto posible para iniciar el tratamiento con asesoramiento y medicamentos (World Health Organization: WHO, 2021).

Las estatinas son policétidos que forman parte de un grupo de fármacos que inhiben de manera selecta la HMG-CoA reductasa, la enzima que regula y limita la velocidad la velocidad de la biosíntesis de colesterol. De esta forma, estos compuestos reducen los niveles de colesterol; particularmente lipoproteína de baja densidad (LDL) ("colesterol malo"); mientras que incrementa ligeramente el colesterol (HDL) de lipoproteínas de alta densidad ("colesterol bueno"), evitando así la formación de placa dentro de las arterias (Barrios-González y Miranda, 2009).

La característica estructural común de las estatinas es una cadena lateral que existe como una lactona inactiva o como un ácido es su forma activa. La lactona es activada in vivo por carboxiestereasas en el hígado y en el plasma sanguíneo (Prieto-Macías et al., 2015).

En el ámbito clínico hay cinco estatinas utilizadas divididas en tres grupos: dentro del primer grupo encontramos las naturales (lovastatina y compactina), en el segundo grupo las semisintéticas (simvastatina y pravastatina) y finalmente en el tercer grupo las sintéticas (atorvastatina y fluvastatina) (Barrios-González y Miranda 2010).

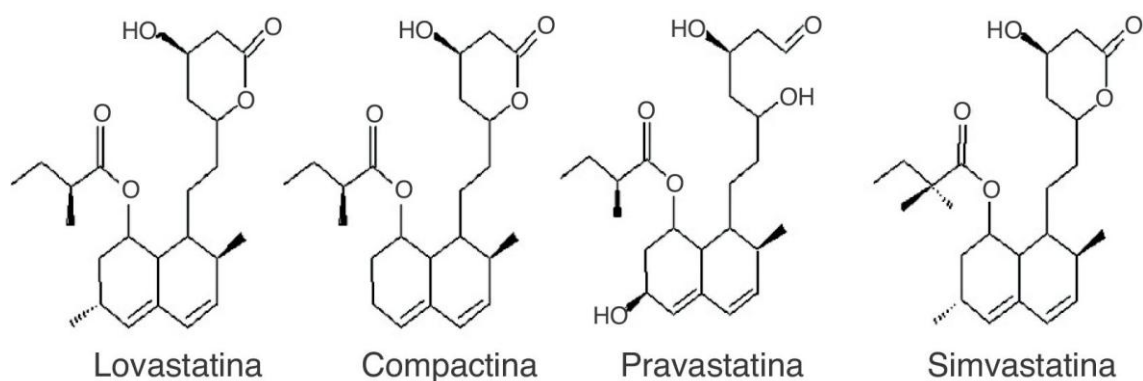


Figura 1. Estructura molecular de diferentes estatinas.

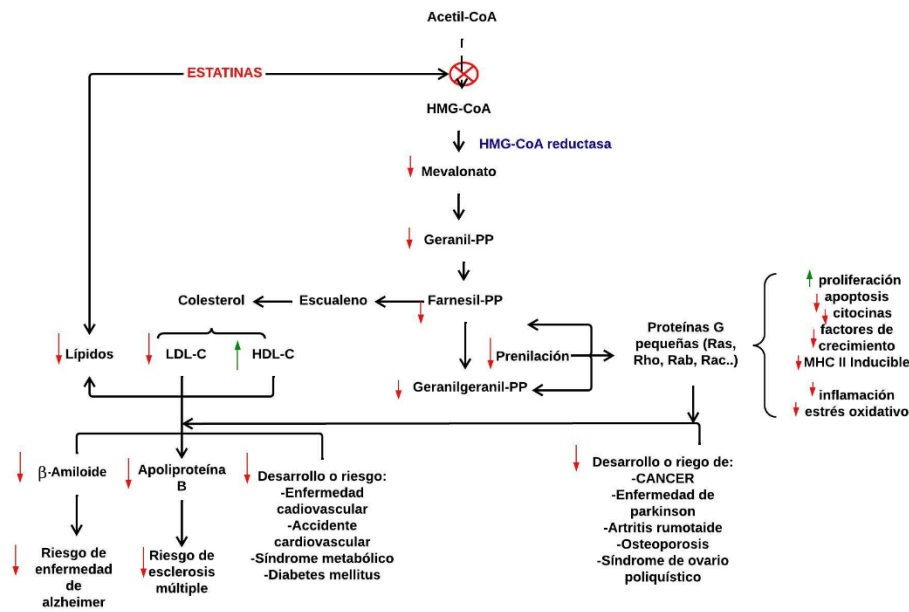


Figura 2. Modelo que describe la gran diversidad de efectos biológicos de las estatinas; y, por tanto, los usos actuales y potenciales. La inhibición de la HGM-CoA, no sólo ayuda a reducir los niveles de colesterol, también los intermediarios isoprenoides, afectando la prenilación de las proteínas G (i.e., Ras). Esto puede derivar en la modulación de la transducción de señales de los receptores hacia la expresión de los genes, que directa o indirectamente afectan el balance proliferación/apoptosis, quimiosinas inflamatorias, y mensajeros citogenéticos, todos mediados por proteínas G (Barrios- González y Miranda 2010).

Investigaciones clínicas han demostrado que las estatinas también pueden tener un efecto beneficioso en diversos órganos y en distintos estados de ciertas enfermedades, independientemente de la reducción en los niveles de colesterol (Soubrier, 2006). Este comportamiento permitió introducir el concepto de "efecto pleiotrópico". Las estatinas no inhiben solamente la síntesis de colesterol sino también un número importante de intermediarios isoprenoides como es el caso del farnesilpirofosfato y el geranilgeranilpirofosfato, los cuales son intermediarios importantes de los lípidos para la producción de moléculas de señalización intramoleculares (Barrios-González y Miranda, 2010).

Un conjunto diferente de estudios ha evidenciado que la terapia con estatinas posee efectos biológicos que trascienden el nivel de colesterol LDL. Estos nuevos estudios han identificado múltiples actividades biológicas (farmacológicas) novedosas de las estatinas; lo que supone una posible utilización en patologías como el cáncer, la demencia de Alzheimer y la pérdida ósea asociada con la edad (Barrios-González y Miranda, 2009).

2.4 Lovastatina

La historia de las estatinas inició en 1987 cuando la lovastatina recibió la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) en EE. UU. (Manzoni and Rollini, 2002).

La lovastatina (mevinolina o monacolina K y ácido mevinolínico cuando está en su forma ácida) cuya fórmula molecular es $C_{24}H_{36}O_5$, teniendo un peso molecular de $404.54 \text{ g mol}^{-1}$ y su estructura se presenta en la Figura 3.

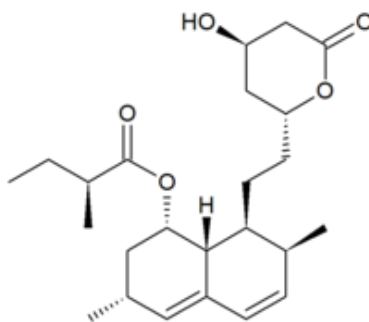


Figura 3. Estructura molecular de la lovastatina.

El mevalonato es un componente necesario para la biosíntesis del colesterol, la lovastatina interfiere con su producción al actuar como un agente reversible inhibidor competitivo de la HMG-CoA que se une a la HMG-CoA reductasa (Goswami, et al., 2013).

La simvastatina es la segunda estatina líder en el mercado, es un derivado semisintético de la lovastatina. Se sabe que la simvastatina es más potente que la pravastatina y la lovastatina (Veillard y Mach 2002).

2.4.1 Biosíntesis

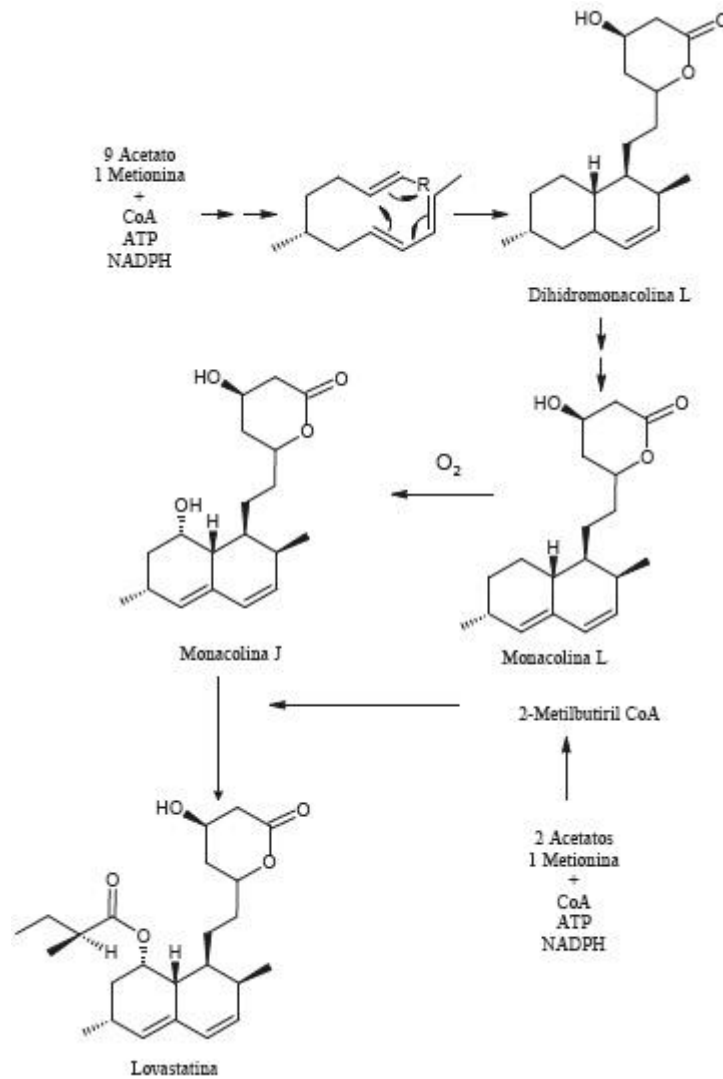


Figura 4. Ruta biosintética de la lovastatina.

Los genes biosintéticos de lovastatina están organizados en 64- grupo kb cláster, formado por 18 genes (Figura 5) (Kennedy et al. 1999). Destacan dos policétido sintasas, codificadas por genes *lovB* y *lovF*. La enzima multifuncional LovB también conocida como lovastatina nonacétido sintasa, ya que incorpora 9 moléculas de acetato (Moore et al. 1985; Wagschal et al. 1996), mientras que LovF se conoce como lovastatina dicétido sintasa, ya que incorpora 2 moléculas de acetato al policétido. De esta forma, la molécula de lovastatina se forma mediante la fusión de estos dos policétidos.

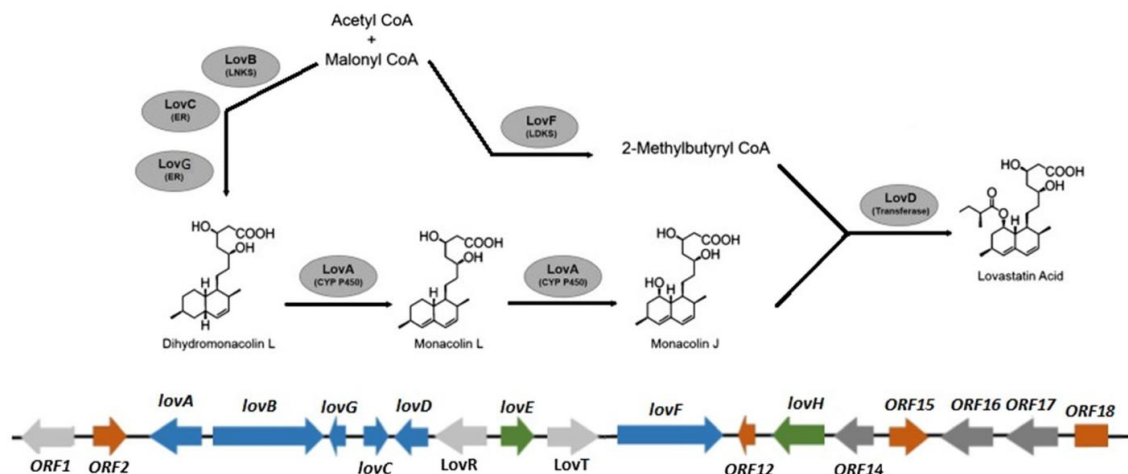


Figura 5. Vía biosintética de lovastatina (parte superior) y grupo de genes biosintéticos en *Aspergillus terreus* (parte inferior). *lovB* codifica la lovastatina nonacétida sintasa (LNKS) que sintetiza dehidromonacolina L con la participación de los productos de *lovC* y *lovD*. El producto de LovA transforma la monacolina L en monacolina J. En la otra rama, el producto de LovF (lovastatina dicétida sintasa) (LDKS)) sintetiza la cadena lateral 2-metilbutiril-S. *lovD* codifica una esterasa que une ambos policétidos para formar lovastatina. *lovE* y *lovH* son genes regulares, mientras que los productos de *lovT* y *lovR* están involucrados en transporte y resistencia (Barrios-González et al., 2020).

La producción de estatinas obtenida en la fermentación en estado sólido fue relacionada con una transcripción más intensa de los genes *lovE* y *lovF* (Barrios-González et al. 2008).

Además de los estímulos nutricionales, investigaciones recientes han identificado diversos factores inesperados, señales ambientales que inducen el metabolismo secundario. Asimismo, investigaciones han identificado procesos mediante los cuales estas señales son detectadas y transmitidas para poner en marcha las redes regulatorias (Barrios-González 2018).

2.4.2 Producción industrial de lovastatina

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante fermentación líquida. Sin embargo, en la actualidad, los investigadores han mostrado un reciente interés por la fermentación sólida, considerándola una alternativa potencial a la FL dado que puede emplear sustratos económicos (como residuos agrícolas), se requiere poco procesamiento y las etapas de transmisión continua (como la agitación) utilizan menos potencia y genera menos efluentes. Además, la FS posee una alta productividad y ofrece una mejor estabilidad de producto (Rollini 2002).

2.5 Fermentación sólida

La evolución de los hongos superiores y los actinomicetos se produjo sobre sustratos sólidos. En otras palabras, estos organismos pasaron su historia evolutiva como terrestres. Estos organismos produjeron productos fúngicos de interés biotecnológico, es decir, enzimas, metabolitos secundarios y esporas.

Fueron desarrollados para su uso en sustratos sólidos húmedos, pero no en líquidos. En consecuencia, el cultivo de microorganismos en suspensiones acuosas puede más bien perjudicar su eficiencia metabólica. (Barrios-González, 2012).

Se define cultivo en estado sólido o fermentación en estado sólido como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida y en ausencia de agua libre (Lonsane et al., 1985).

Para la industria farmacéutica, la fermentación en medio sólido hay un interés en estos procesos ya que ahora son conscientes de muchos casos en los que nuevas moléculas bioactivas importantes solo pueden ser obtenidos a través del medio sólido, pero no por la fermentación convencional (Barrios-González, 2012).

La fermentación en estado sólido es un proceso en el que se puede utilizar una amplia gama de residuos agrícolas y polímeros para cultivar muchas especies de hongos. Debido a la facilidad de los parámetros de optimización, la máxima utilización del sustrato y los sencillos pasos de procesamiento posteriores, se eligió la fermentación en estado sólido para el crecimiento de bacterias y hongos (Pandey et al., 2001).

Biocon es la primera empresa hindú que produjo un compuesto farmacéutico a partir de fermentación. Biocon había recibido la aprobación adecuada de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) para la producción de lovastatina, que fue patentada en el año 2001. Se utilizó un plafactor (biorreactor) a gran escala como matriz sólida para la producción de lovastatina (Vk, 2012). Esto tiene algunas ventajas notables al operar tanto en el proceso de fermentación sólida como sumergido y, a su vez, reduce los problemas de procesamiento posteriores (Radha & Lakshmanan, 2013).

Las cepas de hongos que producen lovastatina tienen la capacidad de crecer en una amplia gama de sustratos sólidos en condiciones óptimas. La producción máxima de lovastatina se observó cuando *A. terreus* se cultivó en salvado de trigo (982.3 µg/g). Tiene la capacidad de crecer y producir en diversos sustratos como sorgo, salvado de arroz y paja de arroz, que también mostraron actividad (Jaivel & Marimuthu, 2010).

Monascus sp. se ha demostrado que produce lovastatina mediante un proceso de fermentación en estado sólido, en el que se analizaron varios sustratos para la producción y se encontró que el salvado de arroz daba un mayor rendimiento al optimizar varios sustratos (Panda et al., 2009).

2.6 Vías MAPK

En los microorganismos eucariotas, las vías de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) desempeñan un rol fundamental en la regulación de la fisiología celular. En hongos, las vías MAPK tienen funciones establecidas en las respuestas de apareamiento a través de feromonas, manteniendo la integridad de la pared celular, respondiendo a los cambios en la osmolaridad y la detección de nutrientes. (May et al., 2005).

Las MAP cinasas son proteínas cinasa terminales en una cascada de cinasas que regula las respuestas celulares a cambio medioambiental. Estas cascadas de cinasas consisten en tres proteínas cinasas que funcionan de manera secuencial. Las cinasas son una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK) y una MAPK (Figura 6). Cuando se activa una cascada MAPK, el MAPKKK fosforila la MAPKK, que a su vez fosforila la MAPK. Esta activación secuencial de cinasas en la cascada da como resultado una amplificación de la señal iniciadora. En muchas rutas MAPK, los objetivos posteriores son factores de transcripción que conducen a cambios en la expresión genética (Gustin et al., 1998) (Millar, 1999).

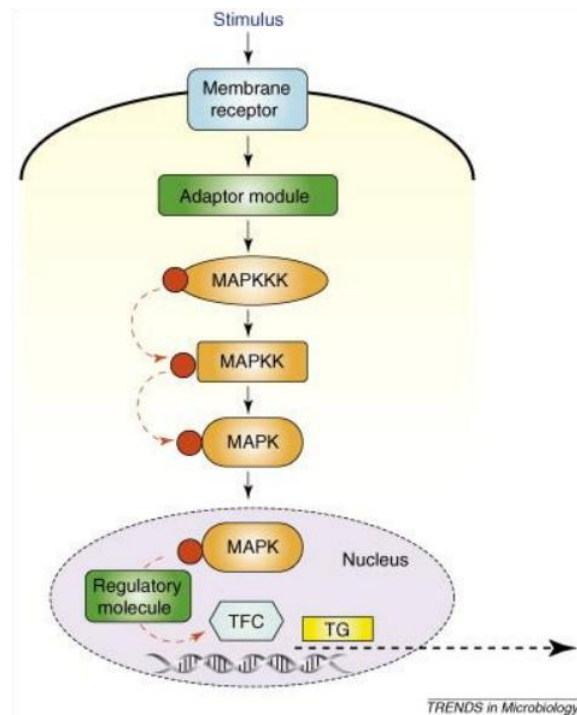


Figura 6. Vía de señalización MAPK generalizada. Señalización MAPK las vías consisten en un sistema sensor cuya señal se transduce a través de una proteína cinasa que conduce a la activación del módulo MAP cinasa, lo que resulta en la fosforilación de sustratos MAPK (Román et al., 2007).

2.7 Papel de *mpkB* en otros hongos

El gen *mpkB* y como proteína MpkB, ha sido estudiado en otros hongos (ortólogos) principalmente en los organismos modelo como levadura y en otros hongos filamentosos.

2.7.1 Levadura

Las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son excelentes sistemas modelo que han ayudado a definir las vías de señalización MAPK conservadas evolutivamente en hongos, así como los eventos bioquímicos clave de estas vías. Si bien existe una conservación considerable de esta transducción de señales MAPK entre las levaduras y los hongos filamentosos, existen diferencias significativas que reflejan la diversidad de este amplio grupo de microorganismos. Debido a esta diversidad, es importante también investigar cómo las vías de señalización de MAPK contribuyen al crecimiento y la biología de los hongos filamentosos (May, 2007).

El crecimiento filamentosos es un comportamiento de diferenciación fúngica que ocurre en respuesta a estímulos extracelulares. Un estímulo que desencadena el crecimiento filamentosos es la limitación de nutrientes, y se cree que representa una respuesta de eliminación de otros hongos. Muchas especies diferentes experimentan un crecimiento filamentosos, incluidos patógenos de plantas, animales y levaduras como las levaduras de panadería (o de cerveza) *Saccharomyces cerevisiae*. Dos MAP cinasas (Fus3 y Kss1) se descubrieron casi al mismo tiempo en búsquedas genéticas para reguladores de la ruta de apareamiento. La proteína cinasa Fus3 se estableció desde el principio como un regulador de la ruta de apareamiento, porque se requería para detener el crecimiento inducido por feromonas y porque su sobreexpresión resultó en una mayor sensibilidad a las feromonas (Elion et al. 1990). Los estudios realizados indican que Fus3 es la MAPK para la ruta de apareamiento, mientras que Kss1 es la MAPK para la ruta de crecimiento filamentosos en levadura (Cullen & Sprague, 2012).

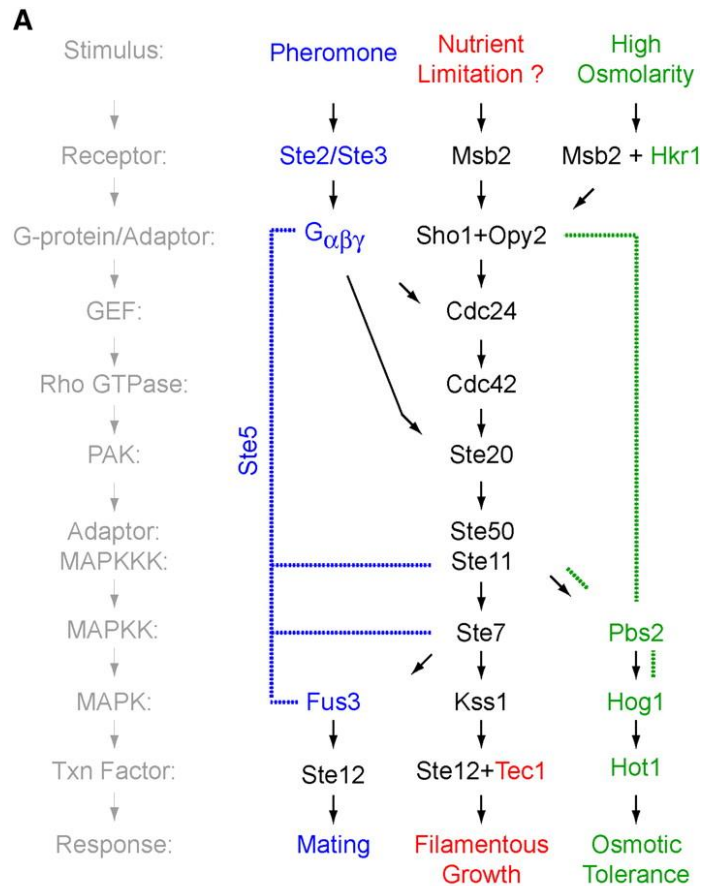


Figura 7. Tres vías MAPK en levadura comparten componentes comunes y también contienen factores específicos de la vía (Cullen & Sprague, 2012).

2.7.2 Hongos fitopatógenos

Se ha demostrado que las cinasas (MAP) desempeñan un papel esencial en las etapas tempranas de infección en varios hongos fitopatógenos (Xu, 2000).

a) *Magnaporthe grisea*

Muchos patógenos fúngicos invaden las plantas utilizando estructuras de infección especializadas llamadas “appressoria” que se diferencian de las puntas de hifas fúngicas que entran en contacto con la superficie de la planta. El gen PMK1 de *M. grisea* es homólogo a las cinasas MAP FUS3/KSS1 de *Saccharomyces cerevisiae*, y una proteína de fusión GST-Pmk1 tiene cinasa actividad in vitro. Xu y Hamer (1996) obtuvieron mutantes *pmk1* de *M. grisea* y encontraron que no logran formar appressoria y no crecen de forma invasiva en las plantas de arroz, y sugieren que PMK1 no es esencial para el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual y asexual en cultivo (Xu & Hamer, 1996).

b) Alternaria brassicicola

Este hongo es un agente causal de la enfermedad de la mancha negra de Brassicas cultivadas y también ha sido ampliamente utilizado como patógeno necrotrófico de *Arabidopsis*.

En un estudio realizado por Cho et al. (2007) interrumpieron el gen por knock-out de la cinasa Amk1 MAP, un homólogo de las cinasas Fus3/Kss1 MAP en *Saccharomyces cerevisiae*. Las mutantes *amk1* incluyen conidiación incompleta, desarrollo incompleto del appressorium, retraso en la germinación, crecimiento vegetativo lento y pérdida casi completa de patogenicidad.

c) Claviceps purpurea

Es un patógeno común de una amplia gama de gramíneas y cereales que es capaz de establecer una interacción estable y equilibrada con su planta hospedera. Para estudiar los procesos de señalización implicados en esta especial interacción hospedero-patógeno Mey et al. (2002) interrumpieron el gen *cpmk1*, que codifica una proteína cinasa activada por mitógenos (MAP) que muestra una homología significativa con Fus3 de *Saccharomyces cerevisiae* y con *pmk1* de *Magnaporthe grisea*. Las pruebas de infección en el centeno mostraron que el mutante es incapaz de colonizar el tejido del centeno, es decir, parece ser completamente no patógeno.

2.7.3 Otros hongos filamentosos

a) Aspergillus nidulans

La MAPK comprende un sistema de transducción de señales que podría detectar y reaccionar ante el estrés o señal de ambientes en células vivas (Johnson & Lapadat, 2002). Se sabía que la MAP cinasa MpkB de *A. nidulans* tenía un papel en anastomosis durante el desarrollo sexual y se especuló que tiene muchas otras funciones desconocidas. El gen *mpkB* de *Aspergillus nidulans* codifica una MAP cinasa homóloga a Fus3 de *Saccharomyces cerevisiae* que interviene en el proceso de conjugación. En un estudio realizado en *A. nidulans* donde realizaron la delección de *mpkB* por Kang (2013) menciona que se requiere MpkB para completar el desarrollo sexual. Encontraron que la delección de *mpkB* provocó una precoz germinación de conidios y reducción de la viabilidad de las esporas. Esto sugieren que MpkB debe tener múltiples funciones en la germinación y viabilidad de los conidios, la conidiación y la autólisis a través de la regulación la expresión de *vosA* y *brlA* (Kang et al., 2013).

El módulo de feromonas en el hongo modelo *A. nidulans* es una cascada MAPK que se activa en respuesta a la señalización de feromonas, que ocurre entre hifas vecinas y es fundamental para iniciar eventos de

fusión hifal. En esta vía, actúan tres cinasas SteC, MkkB y MpkB están unidas a la membrana y las puntas de las hifas a través de interacciones del adaptador SteD. MkkB y MpkB están unidas por la proteína de andamiaje HamE y esto permite una fosforilación eficiente de la cinasa en respuesta a un estímulo detectado. La fosforilación y translocación de MpkB al núcleo da como resultado la activación de varios factores de transcripción, así como la interacción del complejo velvet (VeA-VelB-LaeA) que ha sido relacionado con el metabolismo secundario. En consecuencia, el módulo de feromonas está involucrado en la regulación del desarrollo asexual y sexual, así como en el metabolismo secundario (Bayram et al., 2012; Frawley et al., 2018).

Carrasco-Navarro y Aguirre (2021) en *A. nidulans* utilizando anticuerpos fosfoespecíficos indican que el H₂O₂ tiene profundos efectos reguladores en la fisiología celular al afectar la transducción de señales, el metabolismo del nitrógeno y el carbono y la expresión genética.

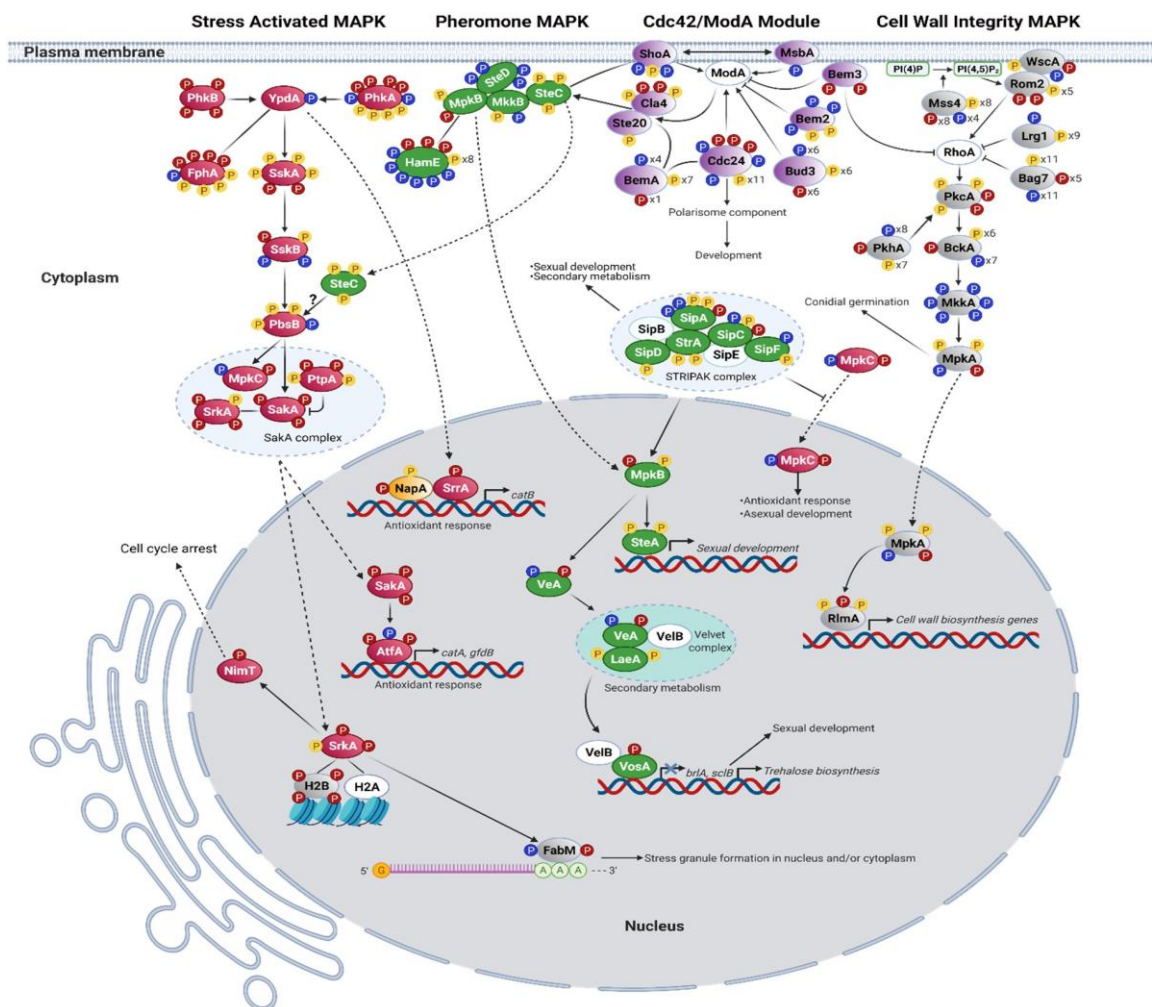


Figura 8. H₂O₂ induce al estrés y activación de las vías de señalización MAPK. (Carrasco-Navarro & Aguirre, 2021).

b) Aspergillus flavus

Jun et al. (2020) realizaron un estudio donde eliminaron el gen *mpkB* y observaron que está asociado con la conidiación, la morfogénesis de conidióforos, la esclerotiogénesis y la biosíntesis de aflatoxinas, sugiriendo que la señalización de MpkB MAP cinasa regula la conidiación de *A. flavus* a través de la represión de la expresión de *brlA*, aunque la regulación de la expresión de *brlA* no es tan consistente y fuerte como la de *A. nidulans*. La morfogénesis de conidióforos también requiere MpkB. También se ha demostrado que la MAP cinasa MpkB es esencial para la producción de esclerocios. Sugieren que la señalización de MpkB MAP cinasa está directa o indirectamente involucrada en el desarrollo y regulación del metabolismo secundario en *A. flavus*. (Jun et al., 2020).

Recientemente se han identificado un módulo de feromonas homólogo en el patógeno vegetal y humano *A. flavus*. Este complejo consta de las tres cinasas SteC, MkkB y MpkB, así como del adaptador SteD. Demostraron que esta vía es fundamental para la regulación de la esporulación asexual, el desarrollo de esclerocios y la producción de aflatoxina B1 (Frawley, Greco, et al., 2020).

c) Aspergillus fumigatus

Aspergillus fumigatus es un hongo saprófito que es ubicuo en el medio ambiente y es un patógeno humano oportunista. Frawley et al. (2020) identificaron los homólogos de las proteínas del módulo de feromonas (SteC, MkkB, SteD, MpkB y HamE) en *A. fumigatus*. Utilizando un enfoque genético y proteómico, detectaron interacciones físicas entre estas proteínas. Sugieren que estas proteínas forman un módulo de feromonas cinasas MAP en el citoplasma y que MpkB entra en el núcleo, de forma similar a lo que se observa en *A. nidulans* y *A. flavus*. Mencionan que el módulo de feromonas es crítico para la regulación de la esporulación asexual, las respuestas al estrés celular y el metabolismo secundario. Sugieren que el módulo de feromonas es una vía de señalización altamente conservada que es crítica para la regulación del desarrollo y el metabolismo secundario en las especies de *Aspergillus* (Frawley et al., 2020).

2.8 ARN de interferencia (ARNi)

El ARN de interferencia es un mecanismo evolutivamente conservado, de regulación a nivel postranscripcional es decir, después que el ARN mensajero ha sido sintetizado, permite silenciar genes por reconocimiento de la secuencia nucleotídica específica y que está presente en múltiples organismos. Aunque han surgido muchas clases de ARN pequeños, varios aspectos de sus orígenes, estructuras, proteínas efectoras asociadas, y roles biológicos han llevado al reconocimiento general de tres categorías

principales: ARN de interferencia cortos (ARNsi), microARN (miARN) y ARN que interactúan con piwi (piARN). Estos ARN sólo están presente en eucariotas, aunque las proteínas Argonaute que funcionan en el silenciamiento eucariótico también se pueden encontrar en especies bacterianas y arqueas dispersas (Carthew & Sontheimer, 2009).

El silenciamiento de genes pos-transcripcional o knock-down génico, se ha vuelto una de las mejores herramientas biotecnológicas para examinar la funcionalidad de los genes. El silenciamiento se produce a partir de una doble hebra de ARN (dsARN) que es cortado por la enzima Dicer y segmenta en fragmentos más pequeños, usualmente de 20 a 25 nucleótidos de longitud, una de sus cadenas (cadena guía) se integra a un complejo proteico denominado RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN). La otra cadena (cadena "pasajera") es degradada. El siARN, en el complejo RISC, busca un ARN mensajero (mARN) específico que tenga una secuencia complementaria a la secuencia guía del siARN. Cuando este ARN mensajero es identificado, el complejo RISC se acopla a él y se empareja con la secuencia complementaria, se pone en marcha una enzima conocida como Argonauta (integrante del complejo RISC) que segmenta el ARN mensajero en lugares determinados. Esta degradación impide la transformación del mARN en proteína, lo que conlleva a la disminución o "silenciamiento" de la expresión del gen.

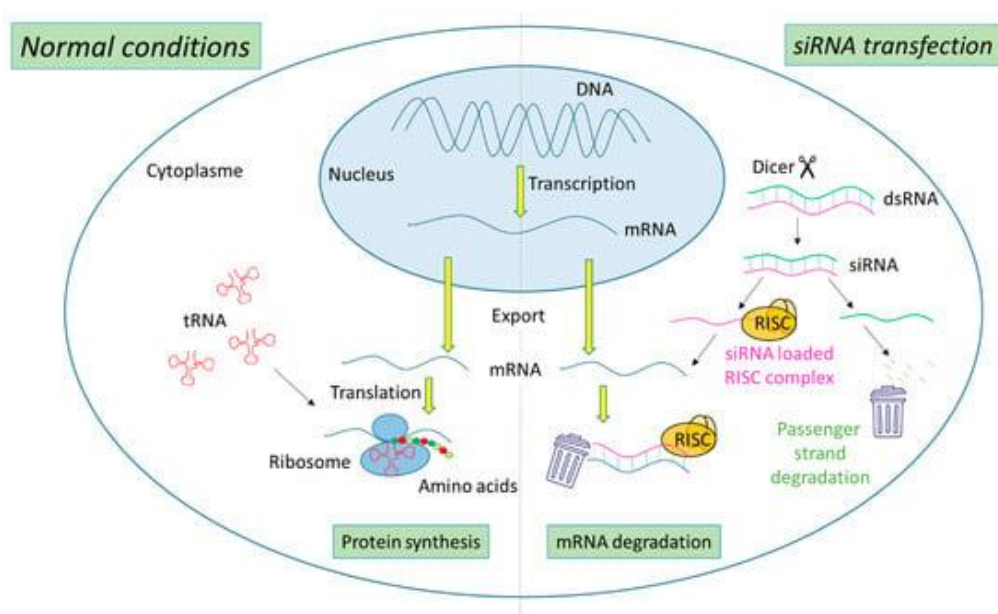


Figura 9. Representación de la expresión génica que conduce a la síntesis de proteínas en "condiciones normales" en comparación con el mecanismo que conduce a la degradación del ARNm antes de la síntesis de proteínas en presencia de siARN. (Ali et al., 2022).

3. Justificación

Los hongos son organismos eucariotas de gran interés biotecnológico. *A. terreus* es un hongo filamentoso que por sus estudios en el medio sólido y líquido se ha convertido en un modelo fisiológico para el estudio de los factores involucrados en el metabolismo secundario.

Se conoce poco sobre los estímulos que el hongo percibe en condiciones de un medio sólido, y que inducen una fisiología diferente: fisiología del medio sólido, la cual suele reflejarse en una mayor producción de metabolitos secundarios y enzimas (Barrios-González, 2012).

En nuestro grupo de trabajo se han encontrado que los principales estímulos que el hongo reconoce en medio sólido, y que inducen la fisiología en medio sólido, es el contacto directo con el aire y el estímulo del soporte (Ávila Cisneros, 2009).

Baños y col. (2007) demostraron que los estímulos oxidantes en medio sólido tienen un papel importante sobre la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Los investigadores lograron aislar mutantes resistentes a este tipo de estímulo, observaron que un alto porcentaje de éstas eran sobreproductoras de lovastatina en fermentación sólida. Posteriormente, Miranda y col. (2013) encontraron una acumulación de EROs durante la idiofase, en fermentación sólida y líquida, sugiriendo una posible regulación de la biosíntesis por las EROs, demostrado en 2014. (Miranda y col 2014).

El segundo estímulo principal del medio sólido es el “estímulo del soporte”. Se han desarrollado cultivos modelo para estudiar el efecto, sobre la producción de lovastatina, donde el micelio obligado a fijarse (adhesión), explorar y colonizar un medio sólido (con incremento de producción específica). Hasta ahora solo se tienen algunos indicios de su funcionamiento, en consecuencia, se requiere, investigar los procesos por los cuales estos estímulos son interpretados y cómo influyen en la fisiología del hongo.

Por lo tanto, en el grupo de trabajo se ha trabajado principalmente con el estrés oxidante, no obstante, se busca analizar otros tipos de estímulos como el estrés osmótico y de pared, además de los genes involucrados en la respuesta a estos, buscando el nexo entre estos y el metabolismo secundario.

En este proyecto se analiza la participación del gen *mpkB* en el metabolismo secundario y principalmente la producción de lovastatina. Una vez que se encuentre silenciado el gen *mpkB* se podrá entender el papel de MpkB en el metabolismo secundario y en procesos como la adhesión, exploración y esporulación. También su posible papel en la resistencia a estrés.

Con estos resultados permitirá una comprensión más amplia, integrada y profunda de la fisiología del medio sólido, así como ciertos aspectos de la fisiología y mecanismos moleculares en medio líquido que aún no se comprenden. Estos hallazgos aclararían e integraría el vínculo entre los estímulos del medio sólido con los cambios fisiológicos y genéticos que llevan a la fisiología del medio sólido, y por ende a una mayor producción de lovastatina. Muy posiblemente estos principios también se apliquen en la producción de otros metabolitos secundarios por este y otros sistemas de fermentación sólida, así como en algunos otros hongos filamentosos de relevancia biotecnológico.

4. Hipótesis

El gen *mpkB* está involucrado como un activador en el metabolismo secundario de *A. terreus*, por lo tanto, las cepas silenciadas del gen *mpkB* presentarán disminución en la producción de lovastatina con respecto a la cepa parental en FL y FS, presentará menor esporulación y las mutantes obtenidas serán sensibles a estrés de pared y otro tipo de estreses. Las mutantes también mostraran cambios en la formación de biofilm e hidrofobicidad.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Establecer el papel de *mpkB* con el estímulo de soporte y su efecto en la producción de lovastatina, así como evaluar su fisiología en medio sólido y líquido en *A. terreus*.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar y clonar el gen *mpkB* en *A. terreus* TUBF-514.
- Diseñar y construir el vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi-*mpkB* y obtener las transformantes de *A. terreus*.
- Evaluar la producción de lovastatina en medio sólido y líquido.
- Realizar pruebas para caracterizar las transformantes, con relación a su resistencia a estrés y capacidades propias del medio sólido.

6. Materiales y Métodos

6.1 Aparatos y equipos

- Autoclave Lorma Electrónico Digital AV28L, LORMA
- Balanza analítica Explorer OHAUS
- Balanza granataria ADP
- BioPhotometer, eppendorf
- Cámaras de electroforesis: Mini-Sub-Cell GT, BIO-RAD.
- Campana de flujo laminar, VECO
- Centrífuga refrigerada Pro-Research By Centurion Scientific Ltd.
- DTX 8800 Multimode Detector
- Estufa 50, 80°C, Proveedor Científico S.A.
- Fuente de alimentación para electroforesis Power-PAC 300, BIO-RAD
- Gel DOC EZ Imager BIO-RAD
- HPLC Waters™ 600.
- Incubadora SI-600R
- Microcentrifuga 5415 C, Eppendorf
- Microcentrifuga Sorvall Legend Micro 17, AccasoLab
- Microscopio Olympus CH30.
- NanoDrop2000 Thermo Scientific
- Potenciómetro Conductronic pH120.
- Sonicador Branson 120
- Termoblock myBLOCK Mini Dry Bath, Benchmark
- Termociclador T100™, BIORAD.
- Termociclador Real Time, Tianlong
- Thermomixer, Eppendorf
- Transiluminador de luz UV, UVP.
- Ultracongelador -86°C Thermo Scientific.
- UV Crosslinker UVC 500, Arnet Sham
- Vortex Thermo Scientific

6.2 Microorganismos

6.2.1 Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUBF-514

Esta cepa se obtuvo del suelo, fue aislada en el desierto de Irak por el Dr. György Szakács y corresponde a la colección de la Technical University of Budapest en Hungría. Aunque se trata de una cepa silvestre se considera que tiene alta producción de lovastatina. Las cepas se conservarán en glicerol al 40% a -20°C. (Szakács et al., 1998).

6.2.2 Cepa bacteriana: *Escherichia.coli* DH5α.

Esta cepa obtenida por Douglas Hanahan se utiliza en experimentos de transformación bacteriana, ya que posee una alta eficiencia de transformación hasta 5×10^8 transformantes/ μg de ADN. Se utilizó para la clonación de las construcciones plasmídicas. Su crecimiento se realizará a través de medio sólido y líquido en Luria Bertani (LB) a 37°C durante 12 h. La cepa se caracteriza por una delección en el gen Z del operón lacZ, teniendo así una manera de seleccionar por medio de color que resulta fácilmente identificar las células transformantes que contengan un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación. Las cepas transformadas se conservarán en glicerol al 40% a -20°C (Sambrook & Russell, 2001).

6.3 Antibióticos

6.3.1 Ampicilina

Para la selección de transformante en medio y mantenimiento del plásmido, se utilizó ampicilina de la marca Sigma®. Se preparó una solución stock de 100 mg/mL con agua inyectable, una vez disuelta se esterilizó por filtración con jeringa a través de una membrana Millipore™ de 0.22 μm de diámetro de poro, se guardó en alícuotas de 500 mL a -20°C hasta su uso. El medio LB fue suplementado con ampicilina en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.3.2 Fleomicina

Para seleccionar las transformantes que contenían el vector de silenciamiento, se preparó una solución stock de 20 mg/mL a partir de Fleomicina Powder invivoGen® se esterilizó por filtración con jeringa a través de una membrana Millipore™ de 0.22 μm de diámetro de poro y se mantuvo a -20°C hasta su uso. Será empleada durante la selección de transformantes de *A. terreus* a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.4 Medios de cultivo y amortiguadores

6.4.1 Medio para *Escherichia coli* DH5α

Medio Luria-Bertani

Bacto-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1 L

Agar al 2% para medio sólido

Los componentes se disolvieron en agua destilada, se ajustó pH 7.5 con NaOH al 10 % y se añadió agua destilada hasta 1L, se esterilizó en autoclave 120°C por 15 min.

6.4.2 Medio para *A. terreus*

Para propagación de esporas y mantenimiento de la cepa:

Medio Power	g/L
Sacarosa	15
Lactosa	2.5
Bacto peptona	2.5
Sólidos de maceración de maíz	0.5
NaCl	2
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.28
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.275
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0015
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0005
Agar bacteriológico	15

Los componentes se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 N, se llevó hasta 1L y se esterilizó en autoclave 120°C por 20 min (Baños, 2005).

Obtención de micelio:

Medio completo	Para 100 mL
SS20X	5 mL
SET	100 µL
Glucosa	1 g
Bacto peptona	1 g
Extracto de levadura	0.05 g

Los componentes se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 6-5 con KOH al 10% se llevó a 100 mL de volumen. Se esterilizó en autoclave 120°C durante 15 min.

Solución de sales SS20X	g/L
NaNO ₃	120
KCl	10.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.4
K ₂ HPO ₄	30.4

Solución de elementos traza (SET)	g/100 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
H ₂ BO ₃	1.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CoCl ₂ ·5H ₂ O	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	0.11
Na ₄ EDTA	5

Se fueron adicionando los sólidos en orden, a 80 mL de agua destilada, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 100 mL.

Solución para la regeneración de los protoplastos:

Czapek/Sorbitol:	g/L
Sacarosa	30
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Agar	10 (para 1%) o 20 (para 2%)
Sorbitol	182.17

Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH 6.5 con NaOH 2 N, se llevó hasta 1 L y se esterilizó en autoclave a 120°C por 20 min.

Soluciones para protoplastos:

PCM	g/L	KCM	g/L	SP2X	g/L
CaCl ₂	5.55	KCl (0.7M)	52.2	KCl (1.1 M)	82.005
MES	1.952	CaCl ₂ (50mM)	5.55	Ác.cítrico (0.1)	10.4
PEG 6000	30%	MES (10mM)	1.952		

Medio PDA

Fue utilizado el medio PDA Bioxon^{MR} 39 g de polvo por cada litro de medio. Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 N y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

Medio de producción	FS (2X)	FL (1X)
	g/L	g/L
Glucosa	6	15
Lactosa	34	85
Harina de soya	3	7.5
KNO ₃	2	5
K ₂ HPO ₄	3	7.5
NaCl	0.5	1.25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	1.25
SET-P (mL)	1.25	3.125

Para la FL se utilizó medio 1 x y para FS 2.5X (Baños et al, 2005)

Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 N y se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 min.

Solución de elementos traza para medio de producción (SET-P)	g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.4
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5
MnSO ₄	1.6
CaCl ₂ ·6H ₂ O	2

Se incorporaron secuencialmente, disolviendo cada uno por completo. Se calentó a ebullición, se ajustó el volumen, posteriormente se dejó enfriar. Se debe guardar a 4°C (Baños et al., 2005).

6.4.3 Amortiguadores

Buffer TB	g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10.88
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.22
KCl	18.65
PIPES 0.5 M pH 6.7	20

Se esterilizó por filtración en 0.45 µm

PIPES 0.5 M pH 6.7	g/100mL
Piperazina-N, N'-bis(2-ácido etanosulfónico)	15.1

Ajustar pH con KOH 5 M y esterilizar por filtración 0.45 µm

6.5 Vector de silenciamiento

El vector pGpdPki-ARNi (Fig. 10) fue obtenido del plásmido pJL43-ARNi (Ullán et al. 2008) y modificado por Marcial et al. 2011. El vector pGdpPki-ARNi contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdh*) de *Aspergillus nidulans* así como un terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyc1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). Este vector se caracteriza por contener los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato cinasa), en direcciones contrarias y enfrentados, con un sitio de restricción NcoI entre ellos, donde se insertó el fragmento de ADN (298 pb gen *mpkB*).

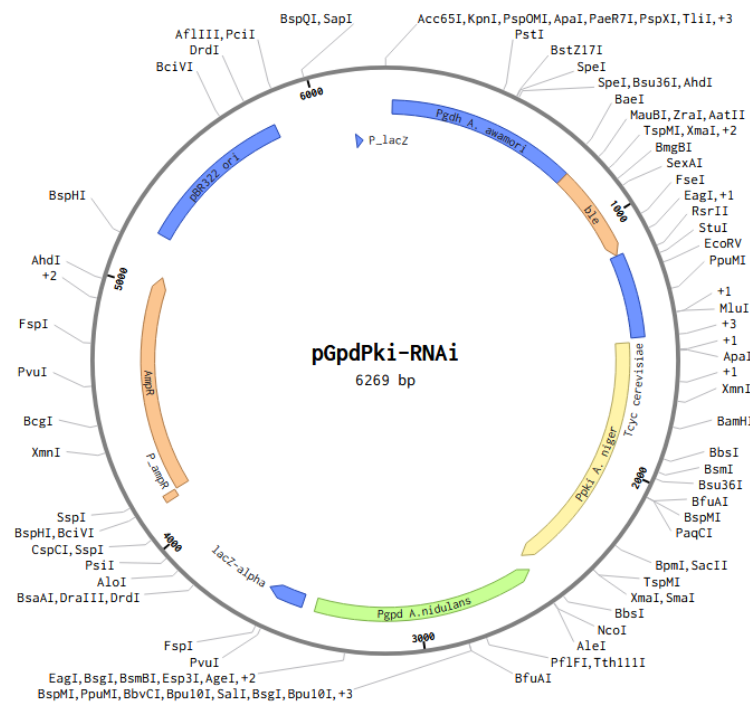


Figura 10. Vector pGpdPki-ARNi, diseñado en BENCHLING (benchling.com)

6.6 Condiciones de cultivo

6.6.1 Esporulación de *Aspergillus terreus*.

En un matraz de 125 mL se agregaron 20 mL de medio Power, Se inocularon 10 µL de la suspensión de esporas en glicerol de *A. terreus* de primera generación. Previamente se humedeció el medio para conseguir una distribución homogéneo sobre toda la superficie. Finalmente, la incubación se realizó 30°C por 5 días hasta observar las esporas de color café característico (Baños et al, 2005).

6.6.2 Conteo de esporas

Mediante el raspado con el uso de perlas de vidrio se recolectaron las esporas del matraz con medio Power. Se colocó en el matraz 5 g de perlas de vidrio estériles más 5 mL de Tween 80 al 0.02%. Posteriormente se agitó sutilmente con movimientos circulares hasta lograr que se desprendieron las esporas y de esta manera coleccionarlas en un tubo estéril. Se realizó una dilución 1:1000 para colocar 200 µL de la suspensión en la cámara de Neubauer y proceder al cálculo del número de esporas por mL aplicando la siguiente fórmula derivada de las especificaciones de la cámara (Sambrook & Russell, 2001).

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \bar{x} \times 10000 \times 25 \times FD$$

$\bar{x}$: Promedio del conteo en 5 cuadros representativos

FD : factor de dilución

6.6.3 Obtención de micelio joven de *A. terreus*

En 30mL de medio completo se inocularon esporas frescas de *A. terreus* en matraces Erlenmeyer estériles con tapón de algodón. Las condiciones de incubación se realizaron sin agitación a 30°C durante 20h (Baños et al, 2005).

6.6.4 Crecimiento de esporas y micelio en medio PDA de *A. terreus*

Para realizar conteo de colonias y/o crecimiento de micelio en ciertas condiciones se realizó en cajas Petri con medio PDA. La inoculación para el conteo de colonias se realizó distribuyendo masivamente 100 µL de la suspensión de 1×10^3 esporas/mL usando una varilla de vidrio estéril. Para el desarrollo de micelio se inoculó una alícuota de 10 µL de la concentración de esporas correspondiente sobre el centro de la superficie del medio solidificado, se esperó hasta que la gota haya sido impregnada para conservar la forma y se trasladó con cuidado a la incubadora a 30°C por 24h.

6.6.5 Crecimiento *Escherichia coli* DH5α

Las placas Petri con medio sólido inoculadas con la cepa correspondiente se incubaron a 37°C por 16 h. En los cultivos líquidos se utilizaron matraces con las mismas condiciones de tiempo, temperatura y con una agitación de 250 rpm.

6.7 Técnicas microbiológicas

6.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *A. terreus* por fleomicina

Utilizando placas Petri de 60x15 mm con medio Czapek 1% agar, se inocularon 10 µL de esporas frescas de *A. terreus* de las diluciones 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 recolectadas anteriormente, en dos puntos diferentes de la placa. Cada unidad experimental contó con una concentración de fleomicina específica entre 40 y 130 µg/mL, se realizó por duplicado. La unidad control sin fleomicina contenía la misma siembra de esporas. Se incubó por cuatro días a 30°C (Baños, 2010).

6.7.2 Siembra por cobertera para la obtención de transformantes de *A. terreus*

Utilizando medio Czapek/Sorbitol con agar 2% preparado anteriormente con su correspondiente concentración de fleomicina, se midió empleando tubos falcón estériles de 50 mL, para verter 5 mL en placas Petri chicas de 60 mm, cuando se encontró a 50°C. De forma similar, en otros tubos se agregó el medio Czapek/Sorbitol con agar 1% preparado anteriormente con su concentración de fleomicina más 300 µL de mezcla de transformantes por cada 5 mL de medio. El preparado se vació sobre la capa de medio ya solidificado en la base de las cajas hechas anteriormente y de la misma manera se dejó solidificar. La incubación se realizó a 30°C por 5 días, monitoreando crecimiento diariamente.

6.7.3 Obtención de transformantes de *A. terreus* con núcleo completamente transformado

Según Bibián-León (2015), el propósito fue obtener transformantes estables, impidiendo que las transformantes finales tuvieran heterocarión es decir, con dos diferentes tipos de núcleos. Las transformantes inicialmente muestran núcleo transformado y no transformado, en cuanto estos protoplastos se fusionan unos con otros resultan dicariones. El micelio de las transformantes se picó con un palillo estéril y se sembró en medio Power por picadura, las cajas se incubaron a 30°C por 3-4 días. De este modo se realizó el primer pase, eliminando el micelio dicarión en el cual las esporas que se formen sólo llevarán un núcleo. Con este paso se tienen esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo

no transformado. El segundo pase se realizó inoculando las esporas en medio de selección de fleomicina (Czapek) por estría abierta con incubación a 30°C. Una vez que se observó el desarrollo de una colonia aislada, ésta se lavó con solución isotónica de NaCl 0.9% estéril y se sembró en medio de esporulación (Power) para posteriormente realizar la cosecha de las esporas y su conservación en glicerol. Las pruebas de fermentación y caracterización de las transformantes se llevaron a cabo con la tercera generación (las esporas conservadas en glicerol) se propagaron las esporas en el medio correspondiente, se recolectaron y finalmente se sembraron en los respectivos medios para cada análisis requerido.

6.8 Producción de lovastatina en fermentación líquida y sólida

Utilizando medios de cultivo y las condiciones de crecimiento de la cepa *Aspergillus terreus* TUB F-514, correspondiente a la colección de cepas de la Technical University of Budapest, se inculó sobre medio POWER durante 6 días a 30°C para obtener esporas, estas fueron colectadas con una solución de Tween 80 al 0.05% y posteriormente utilizadas para inocular las fermentaciones de lovastatina. Para FL se utilizó 50 mL de medio de producción de lovastatina 1x (Szackács et al., 1998), y modificado (Baños et al., 2005), fueron distribuidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL estériles sellados con tapones de algodón. Los cultivos se inocularon con una concentración de 2×10^6 esporas/mL y se incubados a 30°C, con agitación constante de 200 r.p.m. hasta llegar a las 96 horas.

Para el cultivo en medio sólido (FS), se empleó una concentración de 2.5x del medio de producción de lovastatina, el cual fue inoculado con esporas de *A. terreus* con una concentración 2×10^6 esporas/mL, utilizado para impregnar el soporte sólido inerte a un contenido de humedad del 85%. Se utilizó espuma de poliuretano de alta densidad, la cual fue previamente tratada con una solución de NaOH al 40% y HCl al 10%. Los cubos de 1 cm³, fueron impregnados con el medio inoculado y 6 g de este medio sólido fue distribuido en cada matraz Erlenmeyer de 250 mL, estos fueron sellados con papel aluminio y Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA) como lo describió Baños et al. (2005). Es decir, 0.21 g de cubos de poliuretano impregnados uniformemente con 6 mL de medio 2.5X inoculado.

6.9 Técnicas analíticas

6.9.1 Fermentación sólida

Se utilizó 1 g de soporte húmedo y se le agregó 10 mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker®) al 50% con agua destilada, se colocó en agitación durante 30 min a 250 rpm y posteriormente 30 min en el sonicador (Branson 120), con una membrana de 0.45 µm se filtró la muestra. Finalmente, todas las muestras se colocaron en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta que se cuantificaron.

6.9.2 Fermentación líquida

Se recolectó dos tipos de muestra: una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo y se agregaron 2 mL de acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker® al 50 %; la otra recolectada del micelio. Se tomó 1 g de micelio húmedo y se transfirió a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo al 50 % (grado HPLC J.T. Baker®), posteriormente se agitó en el vortex durante 2 min. Los tubos fueron sometidos a sonicación durante 30 min, la muestra se filtró a través de una membrana Millipore® de 0.45 μ m de poro. Todas las muestras fueron almacenadas en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta que se cuantificaron.

6.9.3 Cuantificación de lovastatina

Se llevó a cabo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), empleando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4 mm), se utilizó acetonitrilo: ácido fosfórico 0.1 % 70:30 como fase móvil, con un flujo de velocidad de 1.2 mL/min, la forma β -hidroxiácida de la lovastatina se determinó a 238 nm.

6.9.4 Curva Patrón a partir de la conversión de la lovastatina a su forma β -hidroxiácida

Se tomaron 20 mg de lovastatina (Fermic S.A. de C.V.) se disolvieron en 50 mL de NaOH 0.1N que fue preparado con 25% de acetonitrilo. La solución se ajustó a pH 7.7 con HCl 0.1 N (en acetonitrilo), y se incubó a 45 °C durante 1 hora. Posteriormente se ajustó el volumen a 100 mL y finalmente se almacenó en alícuotas de 1 mL a -20°C. Según Yang & Hwang (2006), este proceso asegura un 98% de conversión de la forma lactona a la forma β -hidroxiácida. Sin embargo, fue necesario confirmarlo mediante HPLC, para obtener una curva patrón con las concentraciones reales de la forma β -hidroxiácida, de esta manera realizar una curva patrón a partir de la concentración conocida de las alícuotas y analizar en HPLC.

6.9.5 Determinación de biomasa y humedad

En FL, tanto la biomasa como la humedad se determinaron por peso seco, se filtró todo el contenido de un matraz a través de un papel filtro de 90mm WhatmanTM (seco por 48 h hasta peso constante y conocido).

En FS la humedad se midió por peso seco dejando secar 1 g de soporte húmedo a 80°C durante 48 h, hasta obtener peso constante.

6.9.6 pH

En FS, se tomó 1 g de soporte húmedo en 10 mL de agua destilada. La mezcla se agitó en vortex durante 2 min, el pH fue medido directamente en el líquido residual.

En FL, se midió directamente del caldo de fermentación después de haber filtrado el micelio.

6.9.7 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

La oxidación de la sonda H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich) por las EROs, se evaluó a las 48 horas. Se preparó una solución de una concentración de 20 mM H₂DCF-DA en 10 mL de PBS, se le agregaron a 100 mg de micelio de FL y 1 g de cultivo sólido de en el caso de la FS. La reacción se incubó en condiciones de oscuridad y sobre hielo durante 30 min. Posteriormente cada muestra se filtró, se congeló y se molió con N₂ líquido (con ayuda de mortero y pistilo). Con aproximadamente 500 mg del polvo (micelio molido y congelado), se colocaron en un microtubo de 1.5 mL negro (o ámbar) y se le agregó 1 mL de PBS frío. Los tubos se agitaron en vortex durante 20 segundos y centrifugado a 12000 x g a 4 °C por 15 min, a 200 µL del sobrenadante se distribuyó sobre una placa de 96 pozos para fluorescencia, la cual se registró en el lector multimodal DTX 880 Multimode Detector (Beckman-Coulter, Inc, Brea, CA, USA), empleando 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Se siguió el mismo procedimiento, omitiendo la sonda H₂DCF-DA (control negativo), al final a la fluorescencia emitida en las muestras tratadas con la sonda, se les restó la fluorescencia del control negativo. La normalización de la fluorescencia expresada en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) se calculó dividiendo este resultado entre el contenido de biomasa peso seco. (Miranda, 2013).

6.10 Técnicas moleculares

6.10.1 Extracción de ADN genómico de *A. terreus*

El micelio joven obtenido según las condiciones descritas en el apartado 6.6.3 se recolectó con ayuda de una espátula, se secó con papel absorbente, se trituró hasta obtener un polvo usando nitrógeno líquido y se conservó en microtubos a -70°C hasta su procesamiento. A un microtubo con micelio pulverizado se añadieron 800 µL de Buffer de extracción (EDTA 50mM y SDA 0.2%) y la mezcla se incubó a 68°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregaron 100 µL de acetato de potasio 2.5M pH 4.2, se mezcló cuidadosamente y la muestra se mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugó 5min. Del sobrenadante se tomaron 700 µL y se le agregó 700 µL de isopropanol. Se centrifugó a 14000 rpm 5 min desechando el sobrenadante y se

resuspendió el pellet en 400 µL de TE pH 8 (EDTA 1 mM-Tris-HCl 10 mM, 1:1), se añadieron 40 µL de acetato de sodio 3M pH 7 y la mezcla se sometió a una temperatura de 68°C por 60 min con agitación a 300 rpm. Para favorecer la solubilización, se mezcló por agitación en vortex. A continuación, se agregó 1 mL de etanol al 95% frío y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. La mezcla se lavó dos veces con 800 µL de etanol al 70% frío. El ADN se resuspendió en 100 µL de TE pH 8 con 1 µL de solución ARNsa 100 mg/mL. La mezcla se incubó a 37°C durante 1.5h. Posteriormente, se añadieron a 300 µL adicionales de TE pH 8 y la muestra se sometió a extracción con un volumen de (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1). Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, tomando la fase que se encontraba en la parte superior. Se añadió 10% del volumen total de acetato de sodio 3 M pH 5.2, más 700 µL de etanol absoluto frío (2.5 vol.). Se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm a 4°C. El precipitado de ADN se lavó con etanol al 70% frío, se secó sobre una superficie de papel absorbente y se resuspendió en 30 µL de H₂O grado biología molecular y finalmente se almacenó a -20°C (Miranda Labra, 2008).

6.10.2 Extracción de ARN

Se realizó siguiendo el protocolo de Trizol Reagent (Invitrogen, Catálogo: 15596018). Para la ruptura celular se siguieron los mismos pasos establecidos para la extracción de ADN genómico.

6.10.3 Síntesis de ADNc

Se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del protocolo del producto SuperScript™ IV Reverse Transcriptase. (Invitrogen, Catálogo: 18090050)

6.10.4 Identificación de *mpkB* en *Aspergillus terreus* TUBF-514

A partir de "*Aspergillus terreus* NIH2624 mitogen-activated protein kinase (ATEG_03316) se diseñaron un juego de primers con cortes *NcoI*. Los detalles se pueden encontrar en el Anexo I.

6.10.5 PCR

Para obtener del fragmento *mpkB*, se realizó un PCR utilizando un gradiente de temperatura con los primers diseñados y de esta manera determinar la temperatura óptima de obtención del fragmento del gen *mpkB* de *A. terreus* en el termociclador (T100TM Thermo Cyclor de Biorad), con las siguientes condiciones:

Tabla 1. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener el fragmento de *mpkB*

	Volumen (μL)
H ₂ O grado biología molecular	56.5
5x GoTaq Flexi Buffer	20
MgCl ₂ 25mM	10
dNTPs 10 μM	2
<i>mpkB</i> Primer forward 10μM	5
<i>mpkB</i> Primer Reverse 10μM	5
ADNg <i>A. terreus</i>	1
GoTaq Flexi ADN polimerasa (Promega) 5u/L	0.5

Tabla 2. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener el fragmento de *mpkB*.

Desnaturalización inicial	95°C; 1 min
Desnaturalización	95 °C; 30 s
Alineamiento	Gradiente 55-68°C; 30 s (63.5 tm óptimo)
Extensión	72°C; 1 min
Go to	Paso 2 por 30 ciclos
Extensión final	72 °C 5 min
Guardar	4 °C

Tabla 3. Condiciones PCR para amplificar *mpkB*.

CloneAmp Hifi PCR Premix	12.5 μL
Primer Forward	0.5 μL
Primer Reverse	0.5 μL
DNAg <i>Aspergillus terreus</i>	1 μL
H ₂ O biología molecular	10.5 μL

Tabla 4. Reacción de PCR con HIFI Polimerasa de alta fidelidad para obtener fragmento de *mpkB*.

98°C; 10s
55°C; 30s
72°C; 15 s

6.10.6 RT-qPCR

Una vez que se obtuvo el ARN se sintetizó ADNc para realizar una PCR en tiempo real, a continuación, se muestran los oligonucleótidos utilizados, así como las reacciones utilizadas:

Tabla 5. Oligonucleotidos qPCR

Oligonucleótido	Secuencia
Actina-F	5'-CGAGCCTGAAGACCATTACTT -3'
Actina-R	5'-TTGGACCGCAATGTAGAGAC -3'
<i>mpkB</i> -F	5'-CTGAGCGGAAAGCCCTTATT-3'
<i>mpkB</i> -R	5'-GGACTTGATGCCGTAGTAGTC-3'

Tabla 6. Reacción de qPCR para la expresión relativa.

	Volumen (μL)
H ₂ O grado biología molecular	3.5
SYBR green PCR Master Mix	5.0
<i>qmpkB</i> Primer forward 10μM	0.5
<i>qmpkB</i> Primer Reverse 10μM	0.5
CDNA (100ng)	0.5

Tabla 7. Condiciones de de RT-qPCR

Preincubación	95°C; 30 s	1 ciclo
Amplificación paso 1	95°C; 10 s	40 ciclos
Amplificación paso 2	62°C; 30s	
Curva Melt paso 1	95°C 1 min	1 ciclo
Curva Melt paso 2	60°C; 15s	
Curva Melt paso 3	98°C; 0.05 s	

6.10.7 Células ultracompetentes de *E. coli* DH5α

Se preparó un preinóculo con 25 mL de medio LB y 12 colonias de células DH5α el cual, se incubó a 37°C durante 8–10 h. Se inocularon 250 mL de medio LB con 2.5 mL del preinóculo. Los cultivos se incubaron con agitación constante (180–250 rpm) a 18°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.55 a 600 nm. Posteriormente el matraz se colocó en un baño de hielo y se mantuvo durante 10 min. El medio se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 80 mL de Buffer TB frío, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Seguida de una segunda centrifugación a 5000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 20 mL de TB y 1.4 mL de DMSO, se dejó en hielo durante 10 min. El volumen final se distribuyó en alícuotas de 100 µL en microtubos de 1.5 mL, sumergiéndose en el fondo del nitrógeno líquido. Finalmente se almacenaron a -70°C para su posterior uso (Sambrook & Russell, 2001).

6.10.8 Transformación bacteriana

Se coloraron 50 µL de células ultracompetentes en un microtubo de 1.5 mL y se le adicionaron 5 µL de plásmido. La mezcla se resuspendió ligeramente y se dejó en hielo durante 30 min. Posteriormente se colocó a 42°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo (choque térmico) para inducir a las células la toma de ADN exógeno. Se agregaron 800 µL de medio LB previamente calentado a 30-37 °C, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 h. Se sembró una alícuota de 100 µL en la superficie de una placa LB-Agar más ampicilina a una concentración final de 100µg/mL. Finalmente, se incubó a 37°C por 12-16 horas (Sambrook & Russell, 2001).

6.10.9 Extracción de ADN plasmídico por minipreps.

Se eligieron 10 colonias del centro de la placa obtenida en el punto 6.10.8 y se analizó el ADN plasmídico obtenido de minipreps por método boiling. Las colonias elegidas se hicieron cultivos en 2 mL de medio LB

adicionado con Amp por 12-16 h a 37 °C y 220 rpm. Posteriormente se tomaron 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 5000 rpm por cinco min. Se añadieron 350 µL de solución STET (10 mL de EDTA 50 mM pH8, 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH8, 8 g de sacarosa, 500 µL de Tritón X-100 y H₂O hasta 100 mL) y 20 µL de lisozima 10 mg/mL al pellet seco. La mezcla se homogeneizó en vórtex hasta lograr la resuspensión de las células. Posteriormente las muestras sometieron a ebullición por un minuto e inmediatamente se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min. Al sobrenadante se le agregó 45 µL de acetato de sodio 3M y 600 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min y se lavó el pellet con etanol 70% frío, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 µL de H₂O y se conservó a -20°C.

6.10.10 Purificación a gran escala de ADN plasmídico por midipreps.

Se utilizó el kit Plasmid Midi de QIAGEN®, siguiendo el protocolo que a continuación se describe. La colonia elegida se incubó en 100 mL de medio LB + Amp a 37°C, 220 rpm por 12-16 h. Luego, se recolectó el cultivo por centrifugación a 6000xg por 15 min a 4°C. Se resuspendió el pellet en 4 mL del buffer P1 (ARNsa). Se agregaron 4 mL del buffer P2, se homogeneizó por inversión 4-6 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 4 mL del buffer P3 frío se homogeneizó por inversión y se colocó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 20000x g por 30 min a 4°C y después por 15 min. La columna (100 QIAGEN-tip) se equilibró aplicando 4 mL del buffer QBT permitiendo que se vacíe por gravedad. El sobrenadante del centrifugado se aplicó a la columna, dejando que entre a la resina por gravedad. En seguida se lavó la columna con 10 mL del buffer QC dos veces. Posteriormente se eluyó con 5 mL del buffer QF en otro tubo. Se precipitó el ADN agregando 0.7 volumen de isopropanol y se centrifugó a 15000x g por 30 min a 4°C. Después se lavó el pellet de ADN plasmídico con 2 mL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 15000 g por 10 min. Finalmente, el pellet se secó y se disolvió en un volumen adecuado.

6.10.11 Digestión de ADN plasmídico.

Se llevó a cabo la digestión al fragmento de *mpkB* con la enzima de restricción *NcoI* Thermo Scientific™ y del vector de silenciamiento, incubando por 3 h a 37°C bajo las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones de digestión de ADN.

	Volumen μL
H ₂ O libre de nucleasas	14.7
10x Buffer Tango	2
ARNsa	0.2
<i>NcoI</i>	0.1
ADN plasmídico	3
Total	20

6.10.12 Desfosforilación de ADN plasmídico digerido

Con la finalidad de impedir la ligación espontánea (reversible) del vector PGpdPki-ARNi fueron desfosforilados los extremos del vector linearizado con las siguientes condiciones de reacción. Se incubó 10 min a 37°C, se detuvo la reacción calentando a 75°C por 5 min.

Tabla 9. Condiciones de desfosforilación de ADN plasmídico

	Volumen μL
ADN lineal	1
10x Buffer FasAP	2
FastAP Fosfatasa termosensible alcalina (Thermo Scientific™) 1U/ μL	1
H ₂ O grado biología molecular	0.1

6.10.13 Construcción del vector de silenciamiento pGdpki-ARNi-*mpkB*

El del vector de silenciamiento se construyó siguiendo un protocolo establecido. Primero, se obtuvo un midiprep (6.10.10) del vector pGpdPki, posteriormente, se digirió con la enzima de restricción *NcoI* (6.10.11), se desfosforiló (6.10.12) y, finalmente se colocaron las reacciones de ligación utilizando una proporción vector-inserto de 5:1.

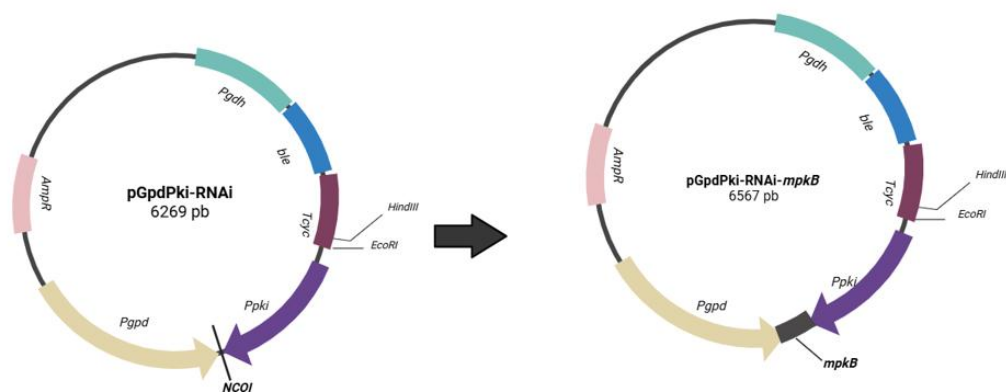


Figura 11. Mapa de inserción de *mpkB* en el vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi, diseñado en BIORENDER (biorender.com)

Tabla 10. Construcción del vector pGpdPki-ARNi-*mpkB*.

I. Digestión (apertura del vector)	Volumen (μL)
H ₂ O grado biología molecular	14.7
10X Buffer Tango	2
ARNsa (10mmg/mL)	0.2
<i>NcoI</i> (10 U/ μL)	0.1
Midiprep de pGpdPki	3
Total	20

La reacción se incubó durante 3 h a 37°C, posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% para corte de banda y se purificó con el kit Wizard[®] de Promega.

II. Desfosforilacion	Volumen (μL)
ADN lineal de la digestión	1
10X Buffer FastAP	2
FastAP Fosfatasa termosensible alcalina (Thermo Scientific) 1 U/ μL	1
H ₂ O grado biología molecular	16
Total	20

La reacción se incubó por 10 min a 37°C, se detuvo la reacción calentando a 75°C por 5 min

III. Ligación con el inserto <i>mpkB</i> con extremos <i>NcoI</i>	Volumen (μL)
Vector pGpdPki abierto y desfosforilado	3
Inserto de <i>mpkB</i> (<i>NcoI</i>)	2
Buffer 10X	2
T4 ADN ligasa 1u/ μL (Promega)	1
H ₂ O grado biología molecular	12
Total	20

La reacción se incubó 4°C durante toda la noche.

Se obtuvo la transformación bacteriana en *E. coli* DH5α (6.10.8) con la construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi-*mpkB* empleando controles específicos para verificar cada una de las etapas.

Tabla 11. Controles positivos y negativos para la transformación de las células de *E. coli* con las construcciones de silenciamiento.

Tratamiento	Objetivo	Observaciones
I. <i>E.coli</i> DH5α medio LB	Verificar el funcionamiento correcto de las células	-Si crece, significa que las células son viables -Si no hay crecimiento, las células no están funcionando y es necesario producir nuevas.
II. <i>E. coli</i> DH5α en medio LB + ampicilina	Verificar el medio de cultivo y funcionamiento de la ampicilina.	-Si no crece, indica que el medio contiene la ampicilina necesaria para inhibir el crecimiento de células sin transformar. - Si crece, sugiere que el medio carece de la concentración adecuada de ampicilina para detener el crecimiento, que la ampicilina se ha degradado y ya no es efectiva, o que las células ya contienen resistencia a la ampicilina.
III. <i>E.coli</i> + pGpdPki sin digerir en medio LB + ampicilina	Verificar transformación y vector	-Si hay crecimiento verifica la viabilidad del vector así como que la transformación se llevó a cabo correctamente. -Si no hay crecimiento se puede llevar a cabo la prueba con otro vector o en otras condiciones la transformación para verificar cuál de estos factores está fallando.

IV. <i>E.coli</i> + pGpdPki digerido en medio LB + ampicilina	Verificar la digestión	-Si no hay crecimiento, significa que todo el vector esta lineal, esto implica que la digestión del vector se llevó a cabo correctamente. El número de colonias que crezcan nos indica la cantidad de vector circular ya sea por recircularizacion o no fue digerido. -Si hay crecimiento, significa que el vector no se digirió correctamente o que se está recircularizando.
V. <i>E. coli</i> + pGpdPki digerido y ligado en medio LB + ampicilina	Verificar la ligación	-Si hay crecimiento, significa que la ligasa funciona correctamente, se tiene que observar la misma cantidad de colonias que en la caja del vector sin digerir. -Si no hay crecimiento puede deberse a que el vector no sea viable, se haya degenerado o que la reacción de la ligasa sea deficiente. Esto puede incluir un Buffer sin ATP, una reacción con el tiempo insuficiente, una temperatura inadecuada o que la ligasa ya no tenga actividad
VI. <i>E.coli</i> + pGpdPki digerido, desfosforilado en medio LB + ampicilina	Verificar la desfosforilación y fondo de la ligación con vector desfosforilado	-Si no hay crecimiento, indica que la desfosforilación fue óptima y que no hubo recircularización del vector. -Si hay crecimiento, significa que el vector se recircula, Para este caso se debe mejorar las condiciones de la reacción como la temperatura, tiempo de incubación y concentración.
VII. <i>E.coli</i> + pGpdPki digerido, desfosforilado y ligado en meidio LB + ampicilina	Verificar desfosforilación y ligación vector-inserto	-Si no hay crecimiento, significa que la desfosforilación fue efectiva y no se religa el vector consigo mismo. Una menor cantidad de colonias nos indica mejores condiciones para la ligación vector-inserto.

6.10.14 Transformación de *A. terreus* por protoplastos

Protoplastos:

Se realizaron cultivos de *A. terreus* en tres matraces de 250 mL con 20 mL de medio completo, se inocularon con esporas frescas a una concentración final de 1×10^8 esporas/mL y se incubaron a 30°C a 200 rpm. En un tubo Falcon de 15 mL se agregaron 10 mL de SP2X y se dejó en hielo, después se mezcló con 150 mg de enzimas líticas (Sigma-Aldrich®). Se mezclaron mediante vortex hasta homogenizar y se dejó reposar por 5 min, se esterilizó por filtración por medio de una membrana Milipore® de 0.22 µm. El cultivo de micelio en medio completo se monitoreó a las 18 horas, hasta observarse en el microscopio escasa ramificación que indica un micelio joven, posteriormente se juntó todo el micelio en un solo matraz para después filtrarlo en un embudo estéril con Nylal®. Se lavó con 100 mL de NaCl 0.9%. Una vez lavado el micelio se movió del filtro al papel absorbente para secarlo colocando en contacto el papel por encima y por debajo del micelio. Se tomó 1.5 g del micelio, se depositaron en un matraz de 250 mL y se adicionaron 10 mL de la solución SP2X/Enzimas líticas preparada anteriormente.

La reacción fue incubado a 30°C con agitación a 80 rpm y se monitoreó cada hora en el microscopio para observar la formación de protoplastos. La reacción duró aproximadamente 3 horas: cuando se observaron protoplastos aislados el igual que conglomerados sin pared celular. Posteriormente, se filtró nuevamente el micelio, en el filtrado se encuentran a los protoplastos. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante dejando 5mL con el pellet del fondo que contiene los protoplastos. Luego, se resuspendió por inversión y se distribuyó 1mL por cada microtubo; estos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Al pellet se le añadió 500 µL de SP2X, se resuspendió por inversión y centrifugó a 6000rpm por 7 min a 4°C, se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregó nuevamente 500µL de SP2X, se resuspendió por inversión y se centrifugó a 6000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavó el pellet agregando 1 mL de KCM, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante dejando entre 100 a 200 µL para resuspender por inversión nuevamente el pellet y agregar 20 µL de PCM (Bibián León, 2015).

Transformación de *Aspergillus terreus*:

Sobre hielo, se colocaron 20 µL de DNAp (construcciones de silenciamiento o vector sin inserto purificados), en microtubos de 1.5 mL y 100 µL de protoplastos. Se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min en hielo. Como control se dejó uno sin ADN. A cada tubo, se agregó 600 µL de PCM, se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 600 µL de KCM, se

mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente hasta la extensión de la placa. Para confirmar la transformación del hongo con el vector de silenciamiento sin inserto, esto para garantizar que no confiriera ningún tipo de actividad diferente a la cepa parental en el fenotipo que se obtuvo, se realizó el mismo procedimiento y restricción de paso del heterocarión con el vector pGpdPki-ARNi sin inserto (Bibián León, 2015).

Extensión en placa:

Se prepararon 45 placas Petri de 60x15 mm cada una con 5 mL de medio Czapek/Sorbitol con agar 2% y fleomicina a una concentración final de 50 µg/mL. Posteriormente se realizó la simbra por cobertera (6.7.2) las reacciones de transformación, es decir, se agregaron las reacciones de transformación al medio Czapek/Sorbitol con agar 1% y fleomicina, se vertió en las placas anteriormente preparadas. Las transformantes fueron incubadas a 30°C por 5 días y se monitoreó el crecimiento cada día hasta observar crecimiento.

De acuerdo con Bibián-León (2015), La finalidad fue obtener transformantes estables, evitando que las transformantes finales tuvieran heterocarión es decir, dos diferentes tipos de núcleos. Las transformantes en un inicio muestran núcleo transformado y no transformado, en cuanto estos protoplastos se fusionan unos con otros resultan dicariones. El micelio de las transformantes se tomó con un palillo estéril y se sembró en medio Power mediante picadura, incubado a 30°C por 3-4 día. De esta manera se realizó el primer pase, eliminando el micelio dicarión de modo que las esporas que se formen sólo llevarán un núcleo. En este punto se obtuvieron esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. El segundo pase se llevó a cabo inoculando las esporas en medio de selección de fleomicina y Czapek a través de estría abierta, incubado a 30°C. Cuando se observó el desarrollo de una colonia aislada, ésta fue lavada con solución isotónica de NaCl 0.9% estéril y se sembró en medio power para luego realizar la recolección de las esporas y almacenar en glicerol a -20°C como se muestra en la Figura 12.

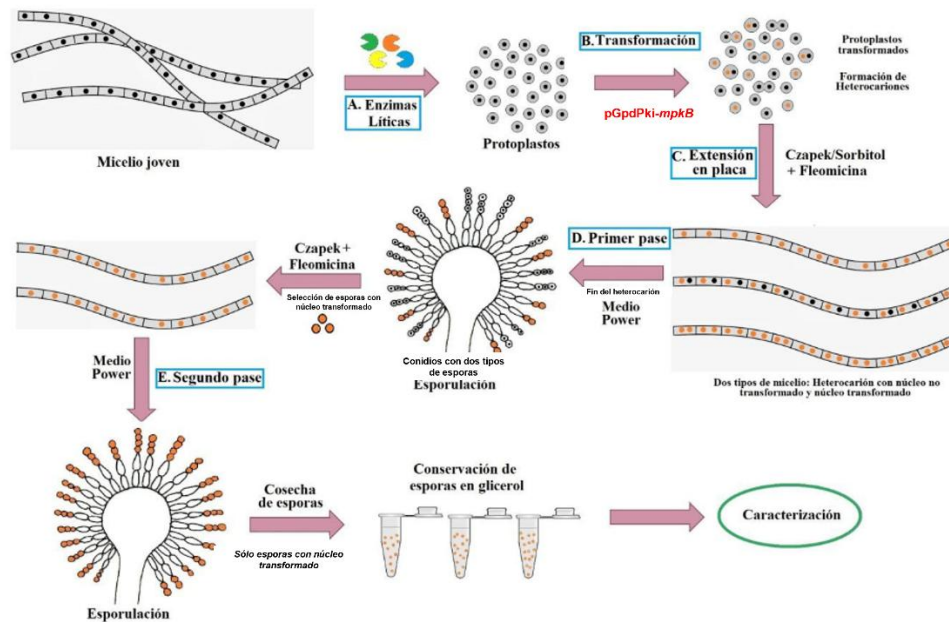


Figura 12. Secuencia para el aislamiento de las transformantes (Bibián-León, 2015).

6.11 Caracterización de las transformantes

6.11.1 Crecimiento radial

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri con 20mL de medio PDA, se inocularon con 10 μ L de una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^8 esporas/mL, esta suspensión se preparó con esporas frescas y solución isotónica NaCl 0.9%. Se monitoreó el crecimiento en centímetros cada 24 horas.

6.11.2 Esporulación

Se obtuvieron esporas frescas usando medio power de las transformantes a analizar, la cepa parental y el control. Las esporas obtenidas se cuantifican usando la cámara de Neubauer. Se utilizó medio de producción de lovastatina (2.5X) fue inoculado con esporas de *A. terreus* (2×10^6 esporas/mL), y empleado para impregnar el soporte sólido inerte a un contenido de humedad del 85%. Se empleó espuma de poliuretano de alta densidad, el cual fue pretratado con una solución de NaOH al 40% y HCl al 10%. Los cubos de 1 cm³, 0.21 g de cubos de poliuretano impregnados en toda la superficie con 6 mL de medio 2.5X inoculado. Se tomó 1 cubo de PUF y se le adicionaron 1 mL NaCl al 0.9% y tween 80 al 0.02%, se suspendió con ayuda de vortex para suspender las esporas, finalmente se contaron en la cámara de Neubauer a las 48 y 96h.

6.11.3 Hidrofobicidad de la célula

Se obtuvieron esporas frescas usando medio power, estas se cuantifican usando cámara de Neubauer, se procede a sembrar 30 μL de 10^8 esporas/mL en agar PDA e incubar a 30°C por 72 h, posteriormente se colocaron 100 μL de azul de bromofenol 0.01% en agua a una distancia de 5 mm de la colonia, se incubó por 2-4 h a temperatura ambiente sin movimiento (si la colonia es hidrofóbica, la gota conservaría su forma) (Pérez-Nadales & Di Pietro, 2011).

6.11.4 Sensibilidad a estrés oxidante

6.11.4.1 Micelio

Con ligeras modificaciones descrito por Sakamoto *et al.* (2008), se evaluó la sensibilidad del micelio de las cepas fúngicas a estrés oxidante inducido por peróxido de hidrógeno en placas de bioensayo estériles que contenían medio PDA a diferentes concentraciones (1, 2, 3 y 4 mM). Se inocularon con 10 μL de suspensiones de esporas con concentraciones 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL realizado por duplicado. El efecto se analizó a las 72 horas de incubación a 30°C , comparando el fenotipo de las transformantes, la cepa control (transformante con el vector de silenciamiento sin inserto) y la cepa parental. Se utilizó una placa control inoculada en las mismas condiciones sin H_2O_2 .

6.11.4.2 Esporas

Con el uso de H_2O_2 en una concentración de 100 mM se analizó la sensibilidad de las transformantes al estrés oxidante en conidios a una concentración de 1×10^3 esporas/mL, mediante una reacción de 15 min. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero con solución salina isotónica en lugar del peróxido de hidrógeno. Pasado el tiempo de reacción, se tomaron 100 μL y se sembraron en una caja Petri con 30 mL de medio PDA por triplicado. Las colonias resultantes se contaron a las 48 h de incubación a 30°C (Baños, 2010).

6.11.5 Sensibilidad a estrés osmótico

6.11.5.1 Micelio

Con ligeras modificaciones del protocolo descrito por Sakamoto *et al.* (2008), se analizó la sensibilidad del micelio de las cepas fúngicas a estrés en presencia de NaCl en una concentración de 1 mM en placas de bioensayo estériles con medio PDA. Fueron inoculadas con 10 μL de una suspensión con concentración de esporas 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL realizado por duplicado. El efecto se analizó a las 72 horas de incubación a 30°C , comparando el fenotipo de las transformantes, la cepa control (transformante

con el vector de silenciamiento sin inserto) y la cepa parental. Se utilizó la misma placa control, inoculada solo con medio PDA.

6.11.5.2 Esporas

Se evaluó la sensibilidad de las transformantes al estrés osmótico mediante la presencia de NaCl 100 mM en conidios a una concentración de 1×10^3 esporas/mL, durante 15 min. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento utilizando una solución salina isotónica en lugar de NaCl. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se tomaron 100 μ L y se sembraron en una caja Petri con 30 mL de medio PDA por triplicado. Las colonias resultantes se contaron a las 48 h de incubación a 30°C (Baños, 2010).

6.11.6 Sensibilidad a estrés de pared

6.11.6.1 Micelio

Con pequeñas modificaciones del protocolo descrito por Sakamoto et al. (2008), se evaluó la sensibilidad del micelio de las cepas fúngicas a estrés con exposición de rojo Congo 200 μ g/mL en placas de bioensayo estériles con medio PDA. Se inocularon con 10 μ L de suspensión de esporas de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL por duplicado. En efecto se analizó a las 72 horas de incubación a 30°C, comparando el fenotipo de las transformantes, la cepa control (transformante con el vector de silenciamiento sin inserto) y la cepa parental. Se empleó la misma placa control, inoculada en las mismas condiciones, pero sin rojo Congo.

6.11.7 Formación de biofilm (capacidad de adherencia)

Utilizando microplaca de 96 pozos con medio mínimo líquido Czapek se inocularon 130 μ L de 10^6 , 10^5 , 10^4 (cada una por triplicado) esporas/mL y se incubaron a 30°C por 24h y 48h. Posteriormente se realizaron lavados con el micelio adherido tres veces con PBS. Luego se tiñó el biofilm con 130 μ L de cristal violeta 0.1% en agua durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS y después el biofilm teñido se solubilizó en etanol absoluto. Finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en el BioPhotometer, Eppendorf (Silva et al., 2020).

6.12 Herramienta bioinformática

a) Análisis de la secuencia de proteína dominios. SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) es una base de datos en línea y un servidor web diseñado para la identificación y análisis de dominios de proteínas. Proporciona herramientas para la anotación funcional de secuencias de proteínas y permite la identificación de dominios conservados y la predicción de estructuras y funciones basadas en datos secuenciales. <http://smart.embl-heidelberg.de/#>

b) Predicción de localización subcelular:

Predicción de sitios de unión de importinas α -dependientes de NLS con el software cNLS Mapper El software cNLS Mapper basado en Kosugi et al. (2009) permite la predicción de importinas α -dependientes de NLS, este método predictivo permite resultados precisos, sensibles y específicos por sobre cualquier otro método al identificar la secuencia correspondiente al sitio de unión de importinas en la secuencia de aminoácidos de la proteína a analizar. https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi

DeepLoc 2.0 predice la(s) localización(es) subcelular de las proteínas eucariotas. [DeepLoc 2.0](#)

c) Modelo de interacción de proteínas del software STRING El modelo de interacción de una proteína de interés asociada a otras proteínas se basa en datos experimentales disponibles en las bases de datos. Los métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones del software STRING analizan los dominios presentes en cada proteína de la red de interacción. <https://string-db.org/>

d) Modelo 3D e la proteína

Para la comprensión más profunda de la proteína se realiza el modelado *in silico* a través de SWISS-MODEL un servidor web utiliza el modelado por homología a través de métodos comparativos haciendo uso de estructuras de proteínas experimentales (plantillas) para construir modelos de proteínas relacionadas evolutivamente. <https://swissmodel.expasy.org/>

7. Resultados

7.1 Identificación de *mpkB* en *A. terreus* NIH2624

En NCBI (National Center for Biotechnology Information), se realizó la búsqueda del gen *mpkB* anotado, se encontró “Af293 MAP kinase *MpkB*” de *Aspergillus fumigatus*, posteriormente a través de un BLASTp utilizando como referencia dicho gen se identificó la secuencia XM_001212494.1 "mitogen-activated protein kinase", en *A. terreus* NIH2624 como *mpkB*, con un porcentaje de identidad del 98.87% y una cobertura del 100%.

Tabla 12. Análisis BLAST de proteínas de los ortólogos de *mpkB* y la secuencia putativa en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 (taxid 341663).

Organismo	Acceso	Identidad	Aminoácidos	Cobertura
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_751160.1	98.87%	354	100%
<i>Aspergillus mulundensis</i>	XP_026609229.1	98.87%	353	100%
<i>Aspergillus niger</i>	XP_001393171.1	98.59%	354	100%
<i>Aspergillus oryzae</i>	XP_001819586.1	99.15%	354	100%
<i>Aspergillus flavus</i>	XP_041142854.1	99.15%	371	100%
<i>Aspergillus vadensis</i>	XP_025564490.1	98.84%	347	97%
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_661323.2	98.87%	354	100%

La secuencia del gen *mpkB* en el género *Aspergillus* está altamente conservado lo que llevó a la comparación de la identidad de *mpkB* en otras especies.

Tabla 13. Análisis BLAST de proteínas de la secuencia putativa *mpkB* en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 (taxid 341663) en otros organismos.

Nombre	organismo	Acceso	Identidad	Aminoácidos	Cobertura
FUS3 protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAA34613.1	61.32%	353	96%
uncharacterized protein	<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_0565652	96.33%	354	100%
N7489_011829		00.1			
serine/threonine protein kinase	<i>Claviceps purpurea</i>	KAG613222	34.54%	394	83%
		9.1			
MAP kinase	<i>Alternaria brassicicola</i>	AAU11317.1	56.07%	416	89%

CMGC/MAPK/ERK protein kinase	<i>Pyricularia oryzae</i>	XP_0037121	91.29%	356	100%
		75.1			
CMGC/MAPK protein kinase	<i>Fusarium Oxysporum</i>	XP_0182441	93.12%	355	99%
		17.1			
CMGC/MAPK/ERK protein kinase	<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_0037121	91.29%	356	100%
		75.1			
Mitogen-activated serine/threonine-protein kinase	<i>Mycosarcoma maydis</i>	XP_0113897	74.14%	354	98%
		11.1			
Mitogen-activated protein kinase 2	<i>Candida albicans</i>	KAF6071657	78.39%	406	98%
		.1			

7.2 Análisis bioinformático de *mpkB*

Con la finalidad de analizar la secuencia de la proteína MpkB de *A. terreus*, se emplearon diversas técnicas y herramientas bioinformáticas para obtener información de su estructura y función.

7.2.1. Dominios catalíticos

Utilizando SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) se analizó *mpkB* y se identificó un dominio catalítico de las proteínas cinasas Serina/treonina, lo que indica que MpkB puede estar fosforilado o desfosforilado. Este proceso puede activar o desactivar las proteínas, afectando una variedad de aspectos celulares, como su ubicación dentro de la célula, su crecimiento, división, desarrollo y la activación de la transcripción genética (detalles en el Anexo I).

7.2.2 NLS (señal de localización nuclear) identificada

Se analizó la ubicación subcelular *in silico* por cNLS Mapper (https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) y DeepLoc ([DeepLoc 2.0](#)) donde se encontraron predicciones que indican que MpkB se puede encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Tabla 14) (detalles en el Anexo I).

Tabla 14. Localización subcelular de MpkB obtenido de DeepLoc-2.0

Secuencia

Localizaciones predichas: Citoplasma, Núcleo

Señales predichas: Señal de localización nuclear, Señal de exportación nuclear

Localización	Citoplasma	Núcleo	Extracelular	Membrana celular	Mitocondria	Plasto	Reticulo endoplasmático	Lisosoma/Vacuola	Aparato de Golgi	Peroxisoma
Probabilidad	0.6270	0.7738	0.0274	0.1097	0.1194	0.0118	0.1659	0.0630	0.0971	0.0394

7.2.3 Análisis de las interacciones de la proteína MpkB

Utilizando el software STRING (<https://string-db.org/>) se encontró que la MAPK de *A. terreus mpkB* tiene interacciones teóricas con distintas proteínas como SteA, SteC, SepA, MkkB, PbsA, SfaD así como otras proteínas que podrían participar en las cascadas de señalización celular como las vías de crecimiento filamentoso de osmotolerancia y en metabolismo secundario. Muchas de las proteínas con las que interactúa no se han caracterizado aún en la cepa de referencia de *A. terreus*, por lo que se identificaron a través de un BLASTp en cepas donde ya han sido caracterizadas y comparando con sus dominios se pudieron determinar su posible nombre y función de algunas de estas proteínas que se analizan más adelante (detalle en el Anexo I).

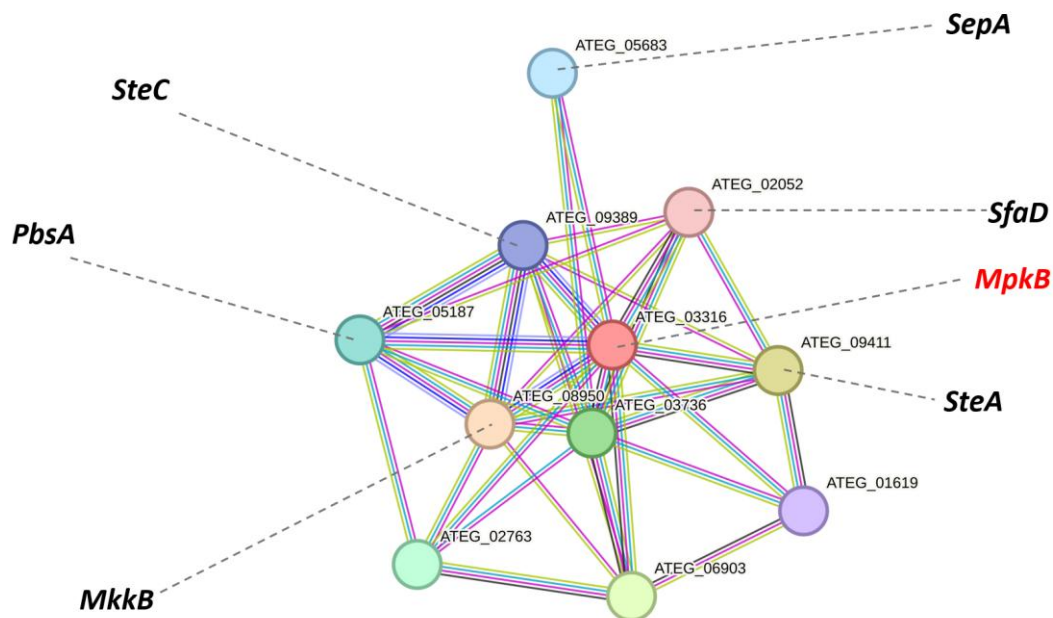


Figura 13. Interactoma *in silico* utilizando el servidor STRING 12.0 MpkB en color rojo

7.2.4 Modelo 3D de la proteína SWISSMODEL

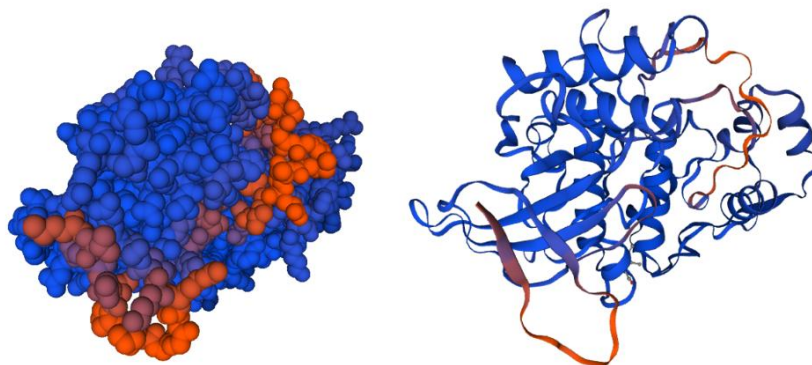


Figura 14. Simulación de la proteína MpkB en 3D. Modelo de base de datos AlphaFold DB de proteína cinasa activada por mitógeno de A0A5N7AFU6_9EURO (gen: A05N7AFU6_9EURO, organismo: *Aspergillus caelatus*) identidad: 99.15%

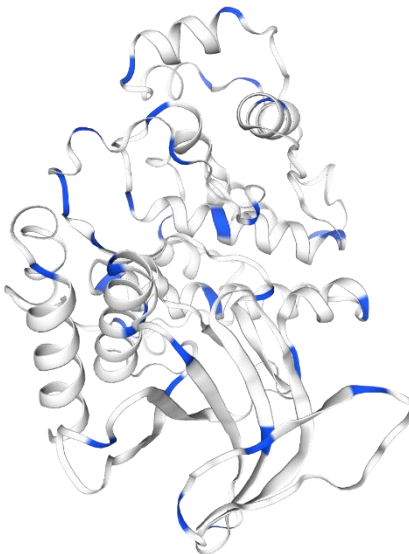


Figura 15. Simulación proteína MpkB en 3D, sitios de posible fosforilación en aminoácidos Serina/ Treonina marcados en azul. Modelo de base de datos AlphaFold DB de proteína cinasa activada por mitógeno de A0A5N7AFU6_9EURO (gen: A05N7AFU6_9EURO, organismo: *Aspergillus caelatus*) identidad: 99.15%

7.3 Perfil de expresión de *mpkB*

Se obtuvo el perfil de expresión por RT-qPCR del gen *mpkB* en *A. terreus*, durante la fermentación líquida de lovastatina (FL) y durante la fermentación sólida de lovastatina (FS), donde la expresión de este gen se comparó con la biosíntesis de lovastatina Figura 16 y 17.

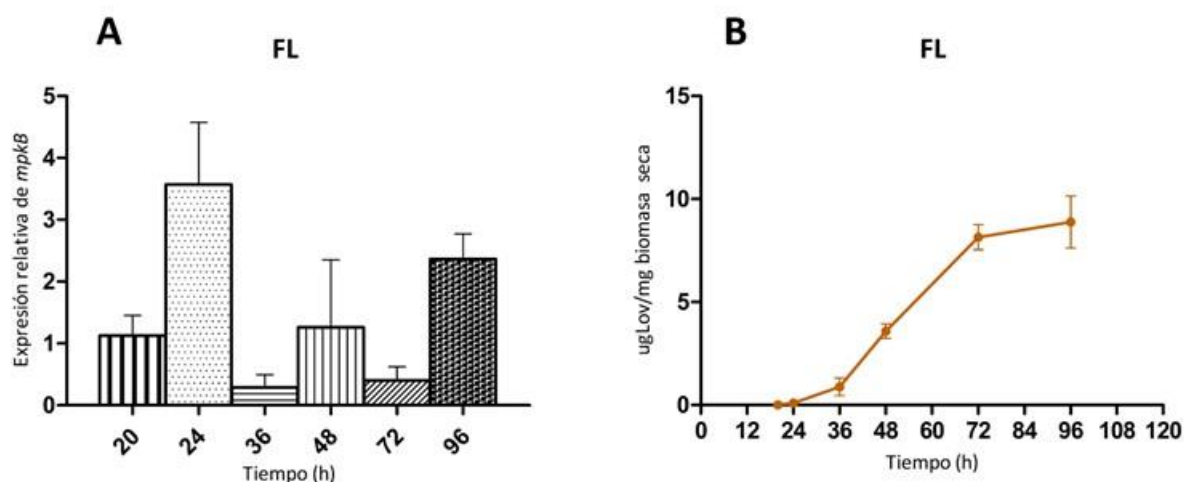


Figura 16. A: Perfil de expresión de *mpkB* (RT-qPCR) B: producción específica de lovastatina en fermentación líquida

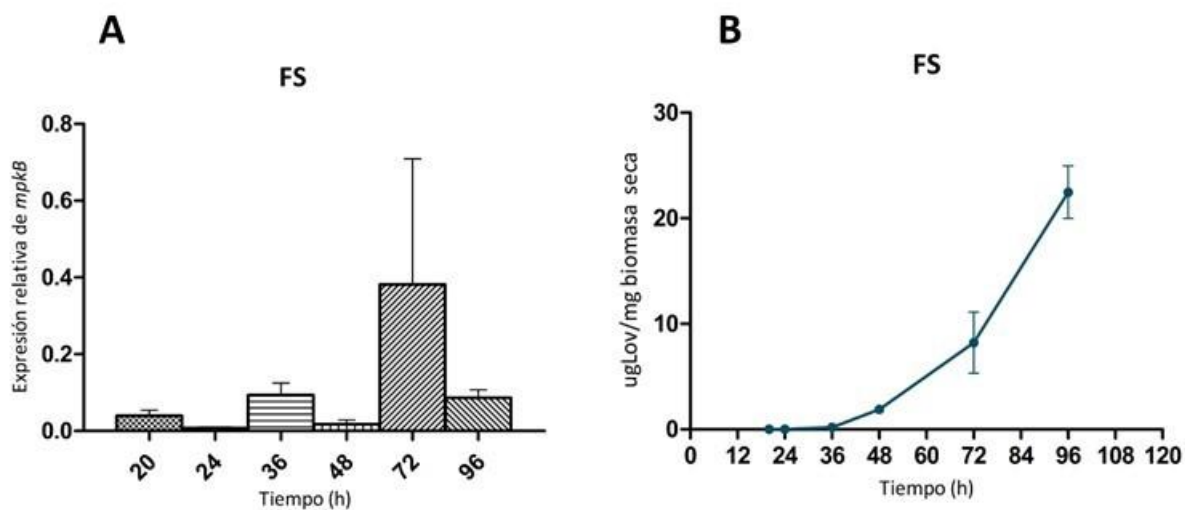


Figura 17. A: Perfil de expresión de *mpkB* (RT-qPCR) B: producción específica de lovastatina en fermentación sólida

Las figuras 16 y 17 se puede observar que, la expresión de *mpkB* es más alta en FL. Aun así, se observa que incrementa al inicio de la idiofase (24h) en FL, pero también al inicio de la idiofase en FS (36 h). En FS hay una mayor expresión durante la idiofase (aún con valores bajos), mientras que en FL hay expresión relativamente alta en trofofase e idiofase. Por otro lado, se consideró el tiempo de 48 y 72 horas para futuros experimentos (de un tiempo), donde se tenga certeza de la expresión de *mpkB* durante la FL y FS.

7.4 Identificación y amplificación del fragmento de gen *mpkB* en el genoma de *Aspergillus terreus* TUBF-514

Se identificó el gen *mpkB* en la cepa TUBF-514, a partir de la secuencia en la cepa de referencia, se diseñó un par de primers con el sitio de corte NcoI (C|CATGG), basado en la secuencia de ADN de “*Aspergillus terreus* NIH2624 predicted protein (ATEG_03316) partial mRNA (XM_001211156.1)” (detalles en el Anexo II). La estructura final y se muestran a continuación:

Forward 5'-----3' TACCATGGCGTGATTCGTACCCAA

Reverse 5'-----3' CGTCCATGGCTTTGGTGTAT

7.4.1 Gradiente de temperatura para encontrar Tm

Se determinó la temperatura de hibridación (Tm) óptima de los primers diseñados a través de una PCR con gradiente de temperatura. Se eligió la temperatura óptima de 63.5°C, puesto que es más cercana a la teórica y en todo el gradiente se obtuvo solo un amplicon específico, como se muestra en la Figura 18.

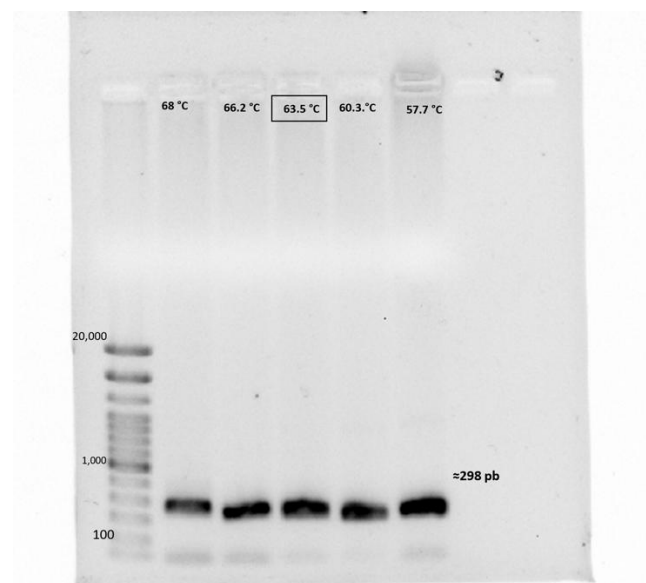


Figura 18. Gel de agarosa 1% PCR, gradiente de temperatura para amplificar *mpkB*, Tm 63.5°C

7.5 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi-*mpkB*

Con la finalidad de obtener el fragmento de *mpkB* con los extremos *NcoI* se realizó una PCR. El producto de la PCR se purificó con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System posteriormente el fragmento obtenido se digirió con la enzima *NcoI*.

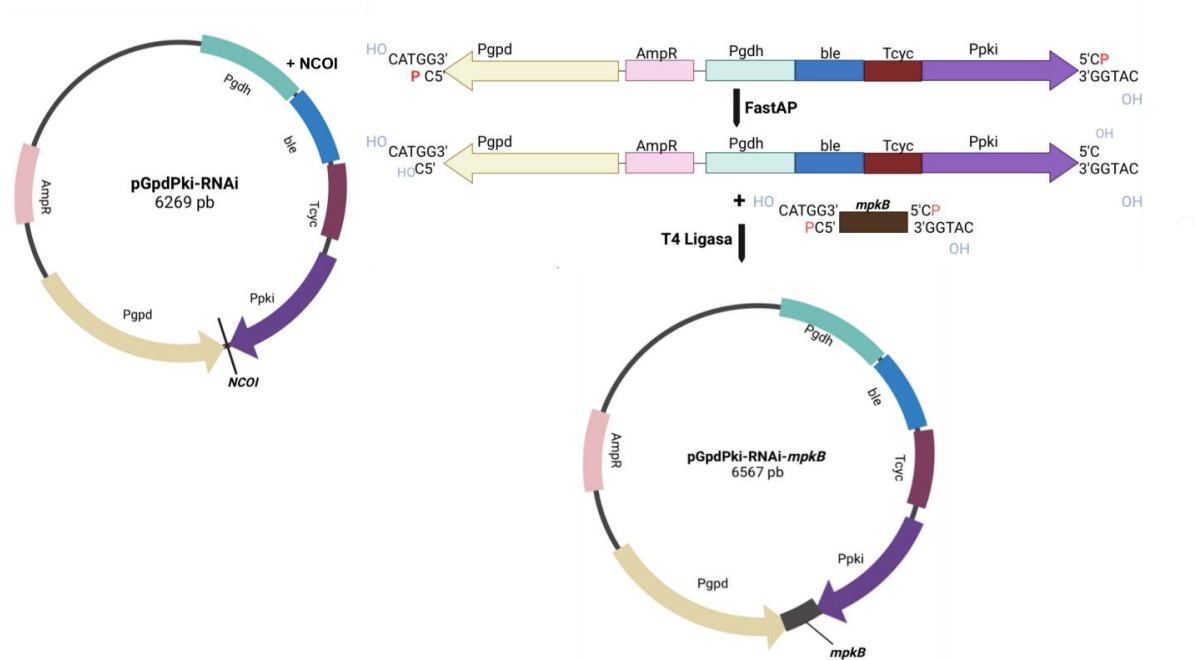


Figura 19. mapa para de construcción del vector pGpdPki-ARNi-*mpkB*. Digestión del vector con la endonucleasa *NcoI*, desfosforilación y ligación del inserto *mpkB* con cortes *NcoI*

La construcción del vector de silenciamiento se realizó siguiendo el esquema de la Figura 19. En primer lugar, el vector pGpdPki se purificó a gran escala (midiprep), posteriormente se digirió con la enzima *NcoI* para abrir el vector en el sitio entre los promotores encontrados *Pgpd* y *Ppki*, se desfosforiló para evitar su recircularización. Finalmente se realizó la ligación con el fragmento de *mpkB* de *A. terreus* en las condiciones de la Tabla 10.

Una vez que se construyó el vector pGpdPki-ARNi-*mpkB*, se transformó *E.coli* DH5α ultracompetentes (6.10.8) empleando los controles de la (Tabla 11), para la clonación del plásmido.

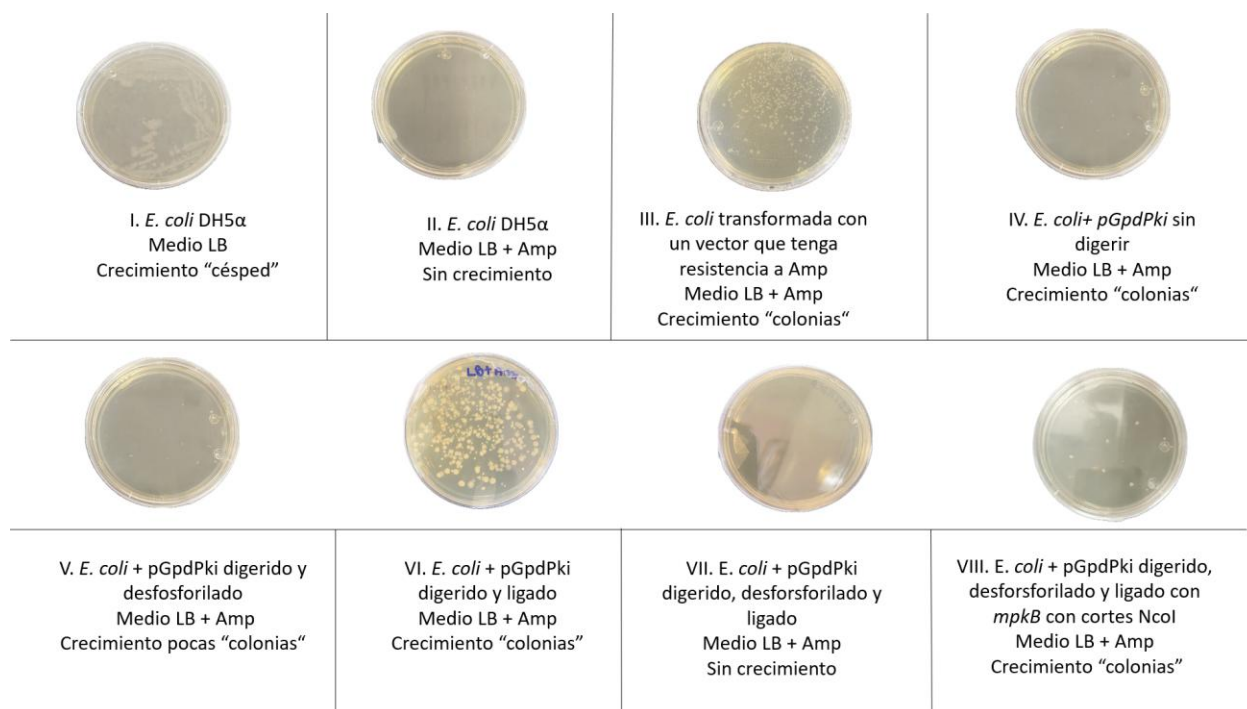


Figura 20. Controles para construcción del vector pGdpPki-ARNi-*mpkB* validando cada elemento transformando *E. coli* ultracompetentes. I: Se verificó la viabilidad de las células ultracompetentes; II: no presentan resistencia a ampicilina; III: aptas para transformar; IV: buen estado del vector y ampicilina V: fondo de recircularización bajo; VI: ligasa funcional; VII: fosfatasa funcional (sin recircularización) VII: construcción correcta

A continuación, en la Figura 20, en el carril 1 y 2 se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb y 100 pb respectivamente. En el carril 3 se observa la integridad y limpieza del ADN plasmídico, así como las 2 formas del plásmido: super-enrollada y circular abierto. En el carril 4 se observa el vector pGdpki-ARNi linearizado con la enzima NcoI. En el carril 5 el vector pGdpki-ARNi-*mpkB*. En el carril 6 el producto de PCR para confirmar que el vector contuviera el fragmento. Finalmente, en el carril 7 fragmento de *mpkB* para corroborar el tamaño del fragmento del carril 6.

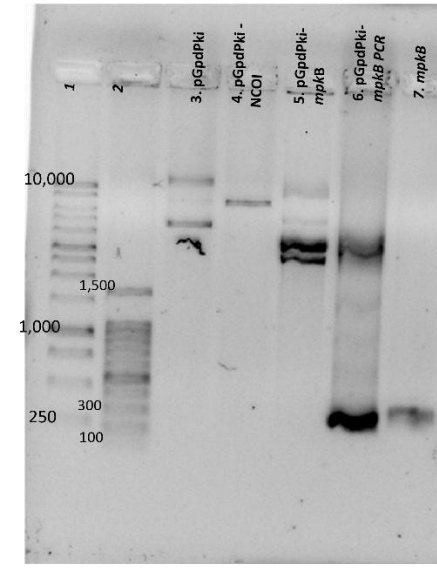


Figura 21. Gel de agarosa 1%. 3: pGdpPki 4: pGdpPki-NcoI 5: pGdpPki-ARNi-*mpkB* 6: pGdpPki-ARNi-*mpkB* PCR 7: *mpkB*

Posteriormente para verificar que las colonias de *E.coli* contenían el vector de la ligación pGdpki-ARNi-*mpkB*, se analizaron colonias aisladas y se comprobó por PCR de colonia que tuvieran el inserto *mpkB*. Después se purificó una colonia a gran escala (midiprep) 6.10.9 y se analizó en un gel de electroforesis (Figura 22), donde se observó el tamaño de banda esperado (298pb).

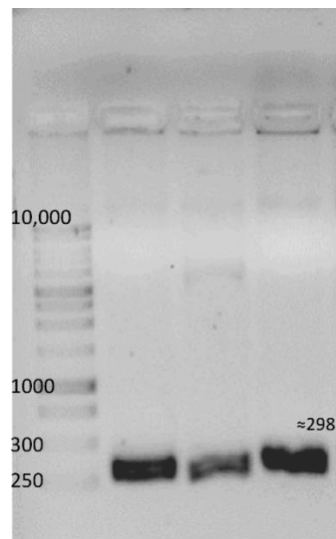


Figura 22. Gel de agarosa al 1% PCR de colonia

El fragmento que se obtuvo producto de la PCR se secuenció con el objetivo de corroborar que los fragmentos amplificados correspondientes al gen *mpkB*. Se realizó un BLAST en NCBI con la secuencia obtenida el Instituto de Biotecnología de la UNAM, resultando que el fragmento de *mpkB* coincidió con el gen *mpkB* de *A. terreus* NIH2624 con un porcentaje de identidad del 92.00%. La secuencia obtenida de *mpkB* y el Blastn se encuentra en el Anexo III.

7.6 Transformación de *A. terreus* con el vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi-*mpkB*

Se transformó nuestra cepa de *A. terreus* TUBF-514 por la técnica de protoplastos, utilizando fleomicina como marcador de selección.

7.6.1 Obtención de transformantes *A. terreus* con pGpdPki-ARNi-*mpkB* por protoplastos

Después de verificar las condiciones de la generación de protoplastos, en donde se confirmó que son viables y no cuentan con resistencia a fleomicina (Figura 23), se transformó con el vector de silenciamiento. Se logró observar un crecimiento de las transformantes en medio con fleomicina entre el cuarto y quinto día. En total se obtuvieron 10 transformantes resistentes a fleomicina (Figura 24).

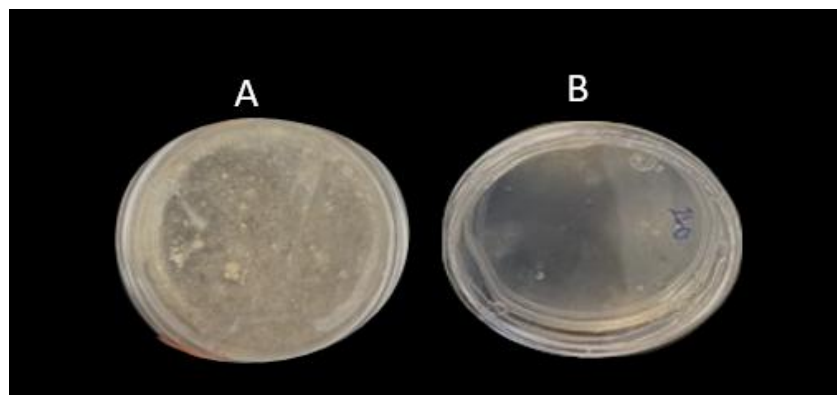


Figura 23. Controles de transformación. A: protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol sin fleomicina. B: Protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol con 50 µg/mL de fleomicina

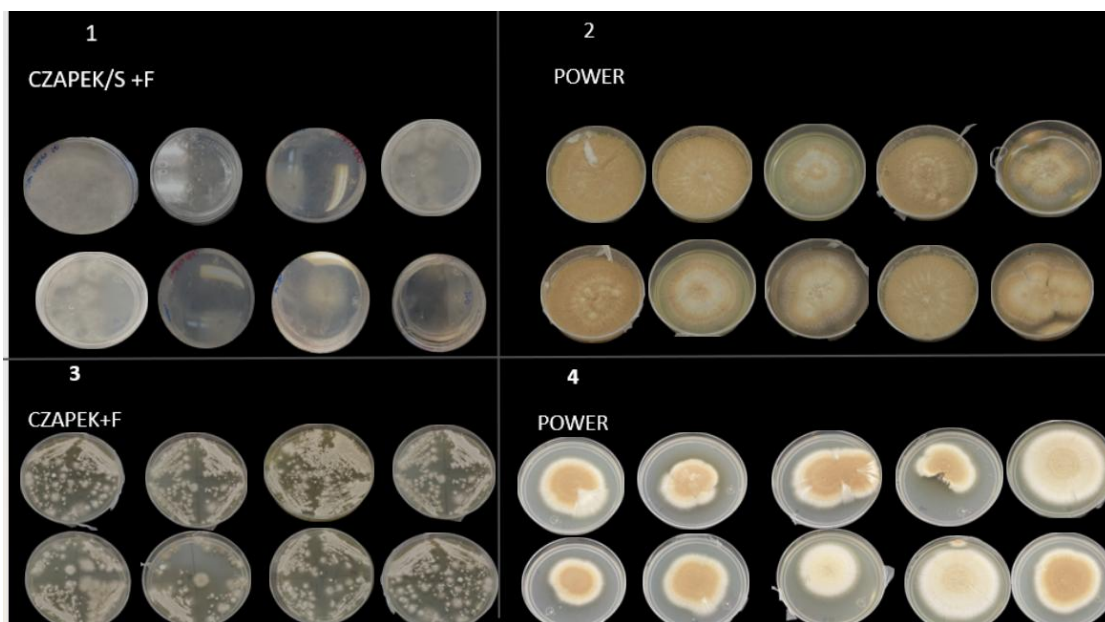


Figura 24. Transformantes de *A. terreus* con el vector de silenciamiento pGdpki-ARNi-*mpkB*, 1: medio Czapek/sorbitol con 50 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina; 2: Medio power; 3: medio Czapek con 50 $\mu\text{g/mL}$ de fleomicina; 4: medio power.

De acuerdo con Bibián-León (2015), el objetivo es obtener transformantes estables, es decir, evitar que las transformantes finales fueran heterocariones (con dos diferentes tipos de núcleos). Las transformantes inicialmente muestran un núcleo transformado y no transformado, en cuando estos protoplastos se fusionan entre sí, resultan dicariones. Como se observa en la Figura 24 se muestra que, con el primer pase, se limitó el paso de micelio dicarión, las esporas que se formen a partir de este llevarán un solo tipo de núcleo. En este paso se obtienen esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. Con el segundo pase se obtuvieron solamente las esporas con núcleo transformado y con ellas se realizó la cosecha para conservarlas en glicerol.

7.7 Pruebas de sensibilidad a estrés oxidante, osmótico y de pared

7.7.1 Estrés oxidante

A) Micelio

Se analizó la sensibilidad de las transformantes obtenidas a estrés oxidante causado por el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), a continuación, se muestra una alta sensibilidad de las transformantes en micelio (Figura 25).

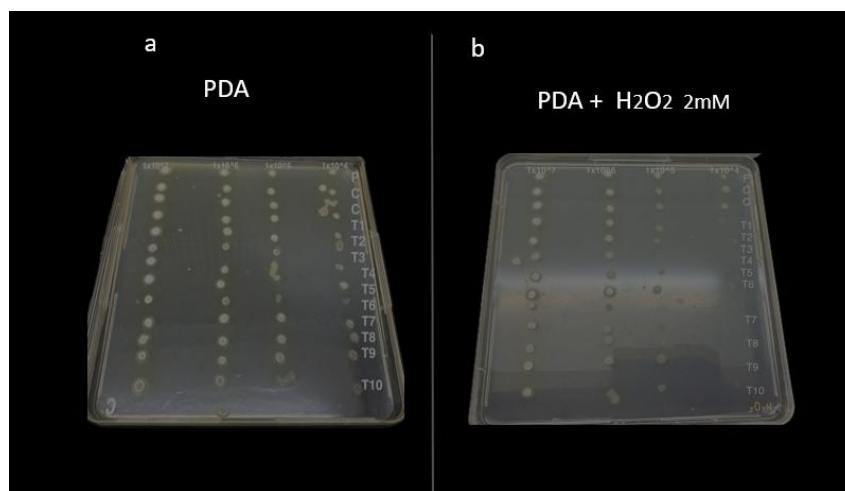


Figura 25. Sensibilidad a estrés oxidante en micelio. a: PDA b: PDA + H_2O_2 2mM. concentración de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL P: Parental C: transformante con el vector sin el inserto. T1-10: transformantes obtenidas

B) Esporas

En el análisis de la sensibilidad de las esporas, a continuación, se muestra el efecto del H_2O_2 , en las transformantes obteniendo una disminución entre un 20-30% de esporas/caja con respecto a la cepa parental (Figura 26). Es decir, las transformantes mostraron sensibilidad a estrés oxidativo, en esporas.



Figura 26. Sensibilidad a estrés oxidante en esporas; medio PDA: esporas sin estrés y medio PDA+ H_2O_2 : esporas con estrés

7.7.2 Estrés osmótico

A) Micelio

Se analizó la sensibilidad de las transformantes obtenidas a estrés osmótico causando por el NaCl, a continuación, se muestra una ligera sensibilidad de las transformantes (Figura 27).

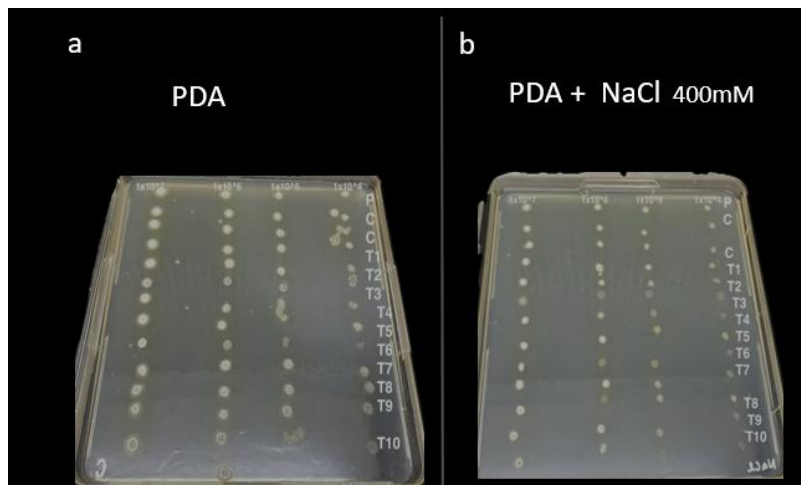


Figura 27. Sensibilidad a estrés osmótico a: PDA b: PDA + NaCl 400mM. concentración de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL
P: Parental C: transformante con el vector sin el inserto. T1-10: transformantes obtenidas

B) Esporas

En el análisis de la sensibilidad de las esporas, a continuación, se muestra el efecto del NaCl, en las transformantes, obteniendo una disminución entre un 10-15% de esporas/caja con respecto a la cepa parental (Figura 28). Es decir, las transformantes mostraron sensibilidad a estrés osmótico en esporas.



Figura 28. Sensibilidad a estrés osmótico en esporas; medio PDA: esporas sin estrés y medio PDA+ NaCl: esporas con estrés

7.7.3 Estrés de pared

Se analizó la sensibilidad de las transformantes obtenidas a estrés de pared causando por el rojo Congo, a continuación, se muestra las transformantes, se observa que son sensibles a este tipo de estrés. (Figura 29).

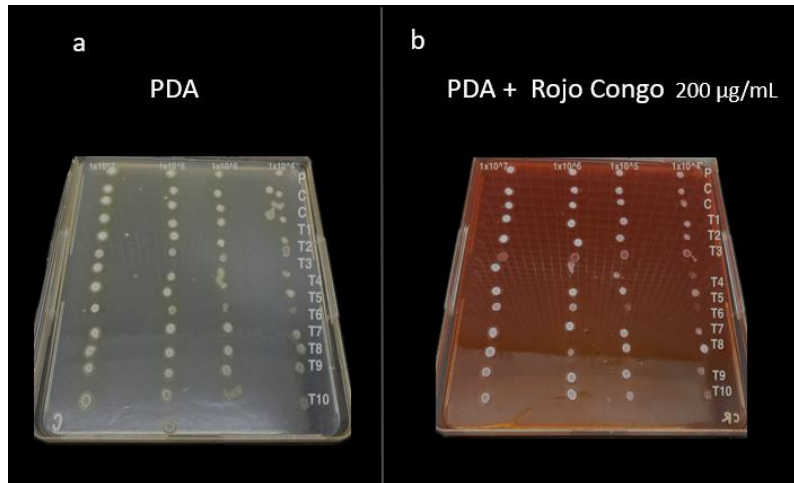


Figura 29. Sensibilidad a estrés de pared a: PDA b: PDA + Rojo Congo 200 µg/mL concentración de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 esporas/mL P: Parental C: transformante con el vector sin el inserto. T1-10: transformantes obtenidas

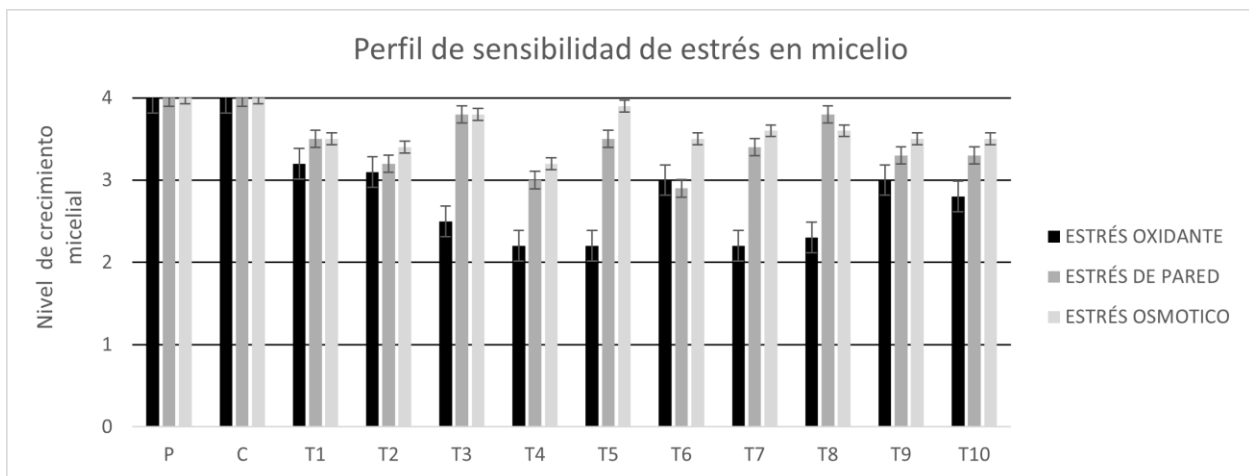


Figura 30. Resumen gráfico de la sensibilidad de micelio a distintos tipos de estrés. A cada cepa se le asignó un valor en una escala de 0 a 4, donde: 4 indica el mayor crecimiento micelial (menor sensibilidad al estrés), 0 indica ausencia de crecimiento (alta sensibilidad al estrés). La cepa Parental (P) y control (C) mostraron los valores máximos de crecimiento, las transformantes (T1 a T10) mostraron distintos niveles de tolerancia. Los valores reflejan una estimación semicuantitativa.

En la Figura 30 se observa que las transformantes que muestran una mayor sensibilidad a los distintos tipos de estrés (micelio) son T1, T2, T4, T6, T9, T10.

7.8 Evaluación de otras características fenotípicas importantes para el medio sólido

Se analizaron otros posibles efectos del silenciamiento del gen *mpkB* en función del micelio relacionadas al crecimiento en medio sólido: crecimiento radial, esporulación, formación de biofilm e hidrofobicidad.

7.8.1 Crecimiento radial

Se midió el crecimiento radial en medio PDA. No se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento radial entre las transformantes analizadas, la cepa parental y control (vector sin inserto) (Figura 31).

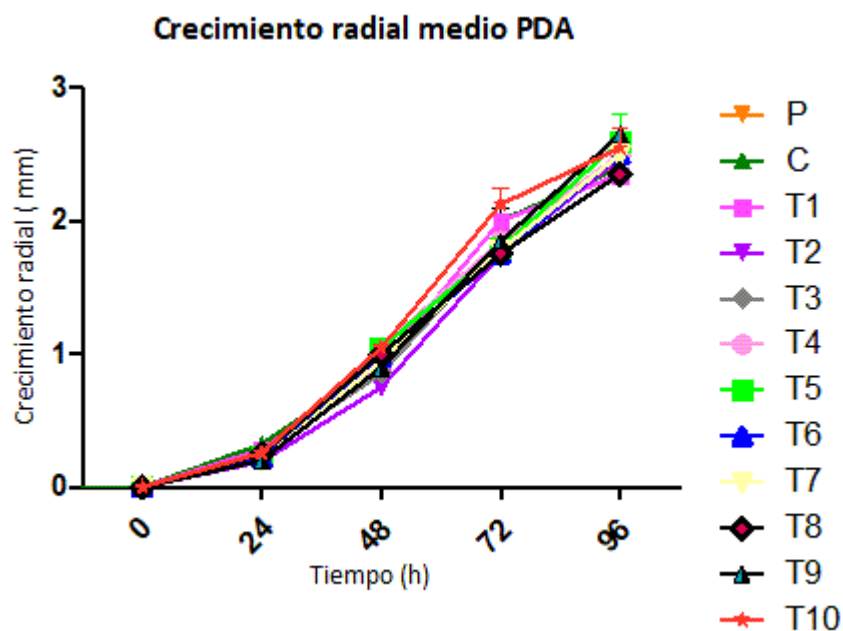


Figura 31. Crecimiento radial en medio PDA P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 transformantes con el vector de silenciamiento

Sin significativas con respecto a la cepa parental

Como se observa en la figura 31 no hay diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de las cepas analizadas en medio PDA.

7.8.2 Esporulaci3n

Se midi3 la esporulaci3n a las 48 y 96 horas, observ3ndose una disminuci3n de concentraci3n de esporas en las transformantes (Figuras 32 y 33).

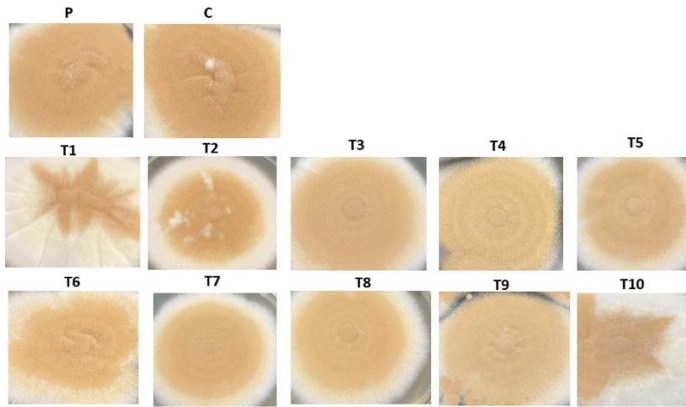


Figura 32. Medio Power P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 Transformantes con el vector de silenciamiento

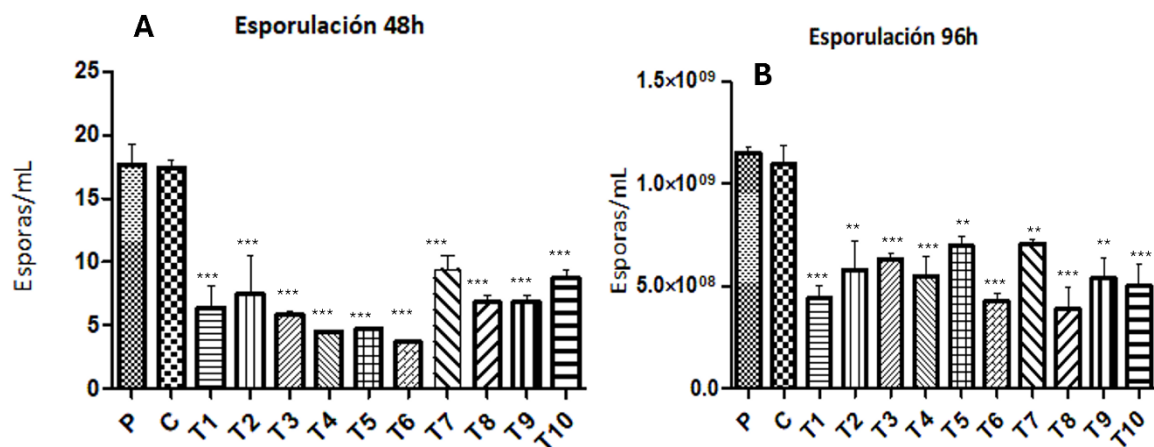


Figura 33. Esporulaci3n A: 48 horas B: 96 horas: P cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 Transformantes con el vector de silenciamiento

*Diferencias significativas con respecto a la cepa parental. One way ANOVA asumiendo distribuci3n normal e igualdad de varianza en una prueba POST-HOC de Tukey con $p < 0.05$

7.8.3 Formación de Biofilm

Se midió la formación de biofilm en medio mínimo líquido Czapek por tinción de cristal violeta, se observó que, a las 24 horas, en las transformantes hay una menor formación de biofilm en comparación con la cepa parental y control. Sin embargo, a las 48 horas, se observa que llegan (tardíamente) a formar el biofilm comparando la cepa parental y control (Figuras 34 y 35).

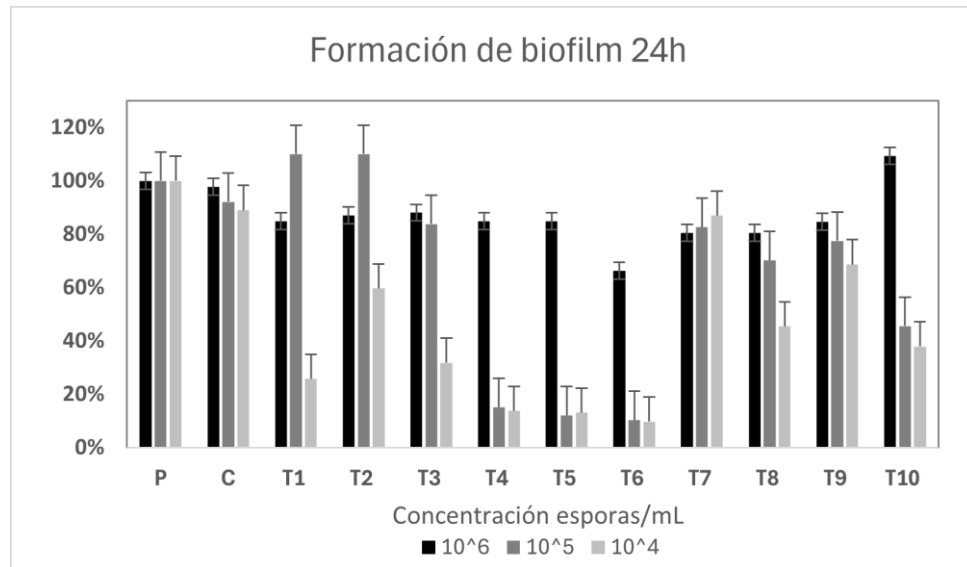


Figura 34. Porcentaje de formación de biofilm a las 24 horas P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 Transformantes con el vector de silenciamiento

Las transformantes que muestran una menor formación de biofilm a las 24 horas son: T1, T3, T4, T5, T6, T8, T10.

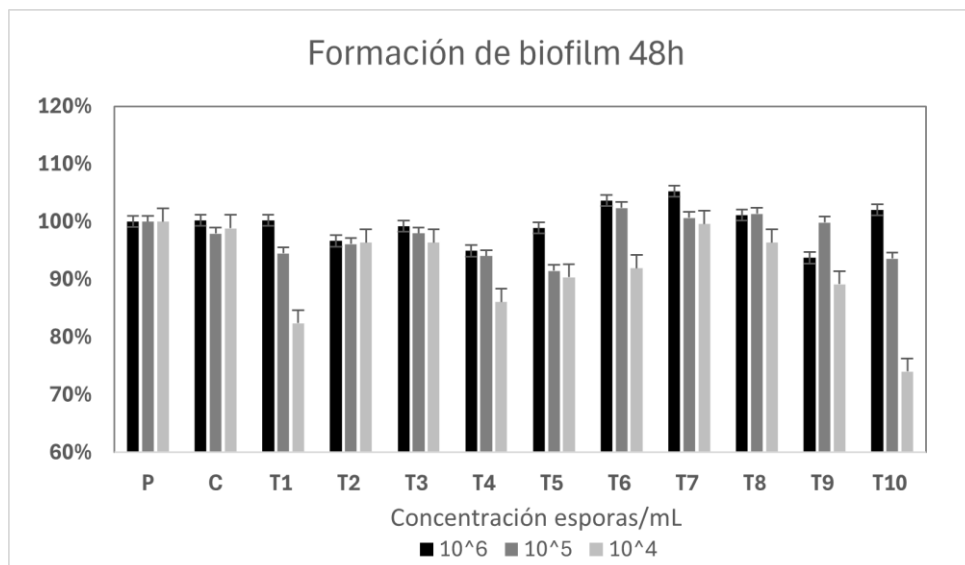


Figura 35. Porcentaje de formación de biofilm a las 48 horas P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 Transformantes con el vector de silenciamiento

7.8.4 Hidrofobicidad

Se midió la hidrofobicidad en las transformantes y se observó que no pierden su hidrofobicidad es decir la gota no se absorbió ni perdió su forma, lo cual nos indica que las transformantes mantienen su hidrofobicidad (Figura 36).

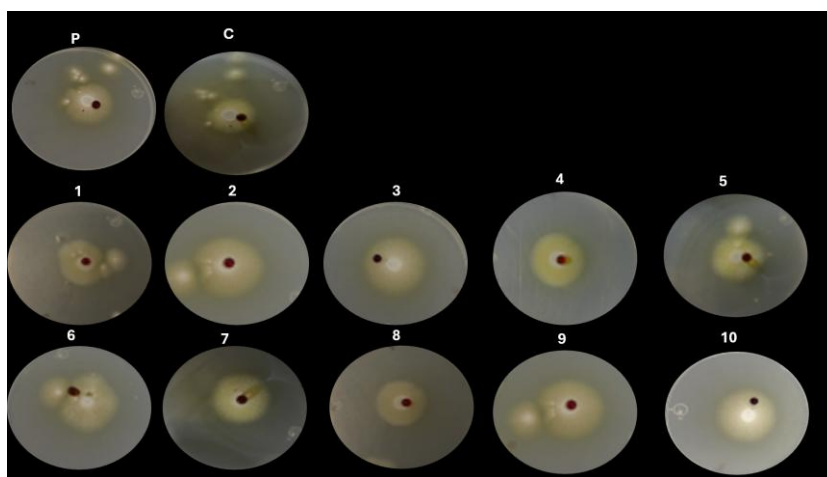


Figura 36. Hidrofobicidad P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 transformantes con el vector de silenciamiento

7.9 Producción de lovastatina

Para conocer el efecto del silenciamiento de *mpkB* en el metabolismo secundario, se analizó la producción de lovastatina (a las 96 horas), en la cual, se observó una disminución en medio líquido y sólido (Figura 38). Además, en FL se encontraron diferencias morfológicas como disminución en el tamaño de pellet y cambio de coloración (Figura 37).

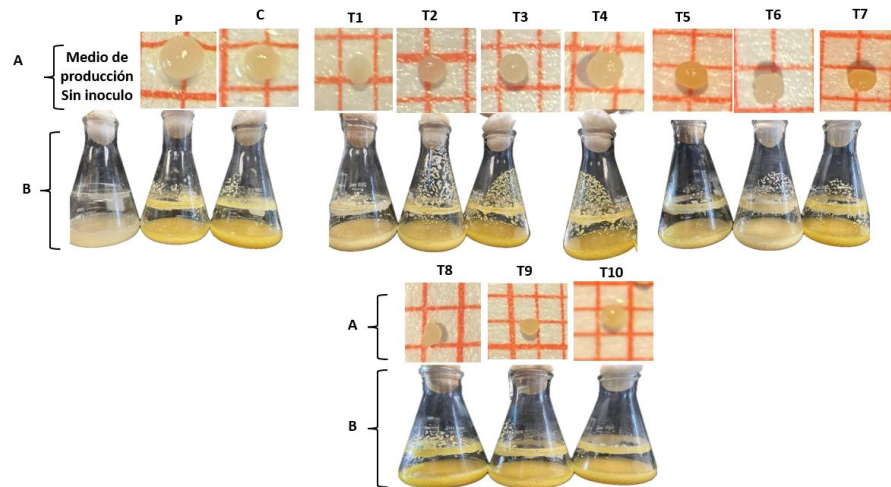


Figura 37. Tamaño de pellet; A: pellet en cuadro de 1mm de hoja milimétrica. Matracas de fermentación en medio líquido, P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 transformantes con el vector de silenciamiento

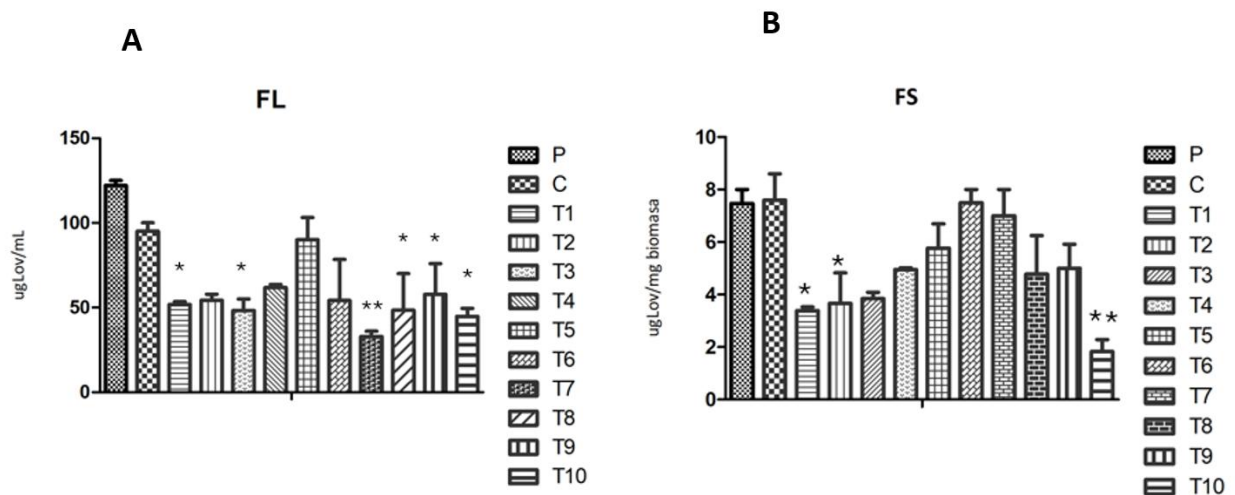


Figura 38. Producción de lovastatina a las 96 horas A: medio líquido B: Medio sólido P: cepa parental C: cepa con el vector sin inserto T1-10 transformantes con el vector de silenciamiento

*Diferencias significativas con respecto a la cepa parental. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianza en una prueba POST-HOC de Tukey con $p < 0.05$

7.10 Comprobación del silenciamiento por RT-qPCR

Considerando la sensibilidad de las transformantes, esporulación y formación de biofilm se seleccionaron 4 transformantes que mostraron los cambios esperados en el fenotipo debido al silenciamiento de *mpkB*, a las cuales se midió la expresión relativa del gen *mpkB* (72 h) para comprobar el silenciamiento (Figura 39).

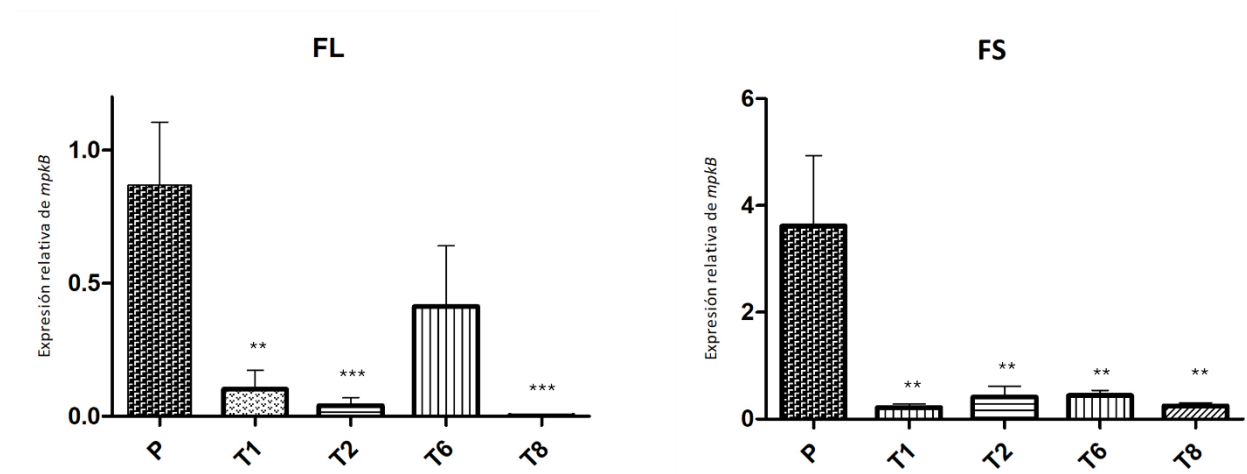


Figura 39. RT-qPCR P: Cepa parental T1, T2, T6, T8: transformantes con el vector de silenciamiento A: Fermentación líquida B: Fermentación sólida a las 72h en *A. terreus*

*Diferencias significativas con respecto a la cepa parental. One way ANOVA asumiendo distribución normal e igualdad de varianza en una prueba POST-HOC de Tukey con $p < 0.05$

Se observa que las transformantes seleccionadas tienen un alto grado de silenciamiento del gen en ambos medios.

7.11 Cinética de producción de lovastatina de las transformantes seleccionadas.

Tanto en FL como en FS a las 20,24,48 y 72 horas no se observan cambios significativos en la producción de lovastatina, en cambio, a las 96 horas cuando se observan cambios significativos ($P < 0.05$) entre la cepa parental y las transformantes donde se observa una disminución de lovastatina en ambos sistemas de fermentación en comparación con la cepa parental y el control (Figura 40).

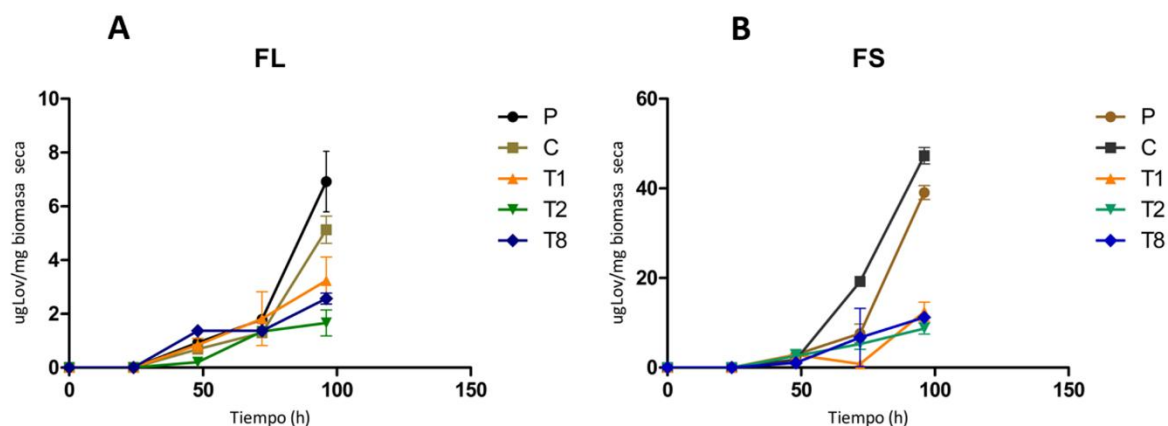


Figura 40. Cinética de producción de lovastatina de las *SimpkB* elegidas P: Cepa parental T1, T2, T8: transformantes con el vector de silenciamiento A: Fermentación líquida B: Fermentación sólida en *A. terreus*

7.12 Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Con el objetivo de analizar la relación de *mpkB* con la acumulación de EROS característica del metabolismo secundario, se cuantificaron las EROS a las 48 horas, utilizando una sonda fluorogénica no fluorescente ($H_2DCF-DA$), la cual es oxidada por las EROS, y de esta manera, detectada a los 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

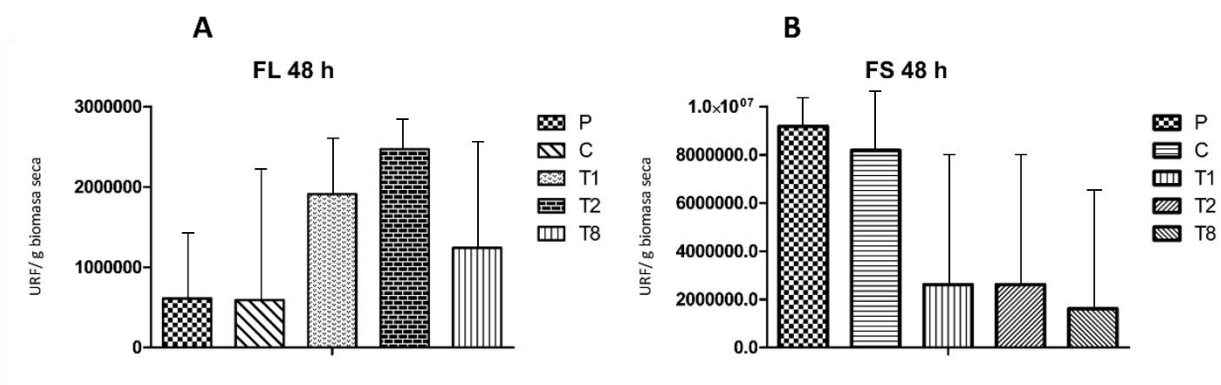


Figura 41. EROS a las 48 horas P: Cepa parental C: Control (vector sin inserto) T1, T2, T8: transformantes con el vector de silenciamiento A: Fermentación líquida B: Fermentación sólida en *A. terreus*

Se observa en la Figura 41, que en FL las EROS aumentan, mientras que, en caso contrario en FS, disminuyen en comparación con la cepa parental y el control.

8. Discusión

8.1 Análisis bioinformático

Como se observa en los BLAST en la Tabla 12 y 13, el gen *mpkB* está conservado en varios organismos, lo que sugieren una función esencial a lo largo de la evolución, esto destaca la importancia de investigar su homología. Por otro lado, en cuanto a su localización subcelular, en la Tabla 14 sugiere que se encuentra tanto en el núcleo (fosforilado) como el citoplasma (desfosforilado) esto debido a que MpkB es una MAPK que pertenece a las vías de transducción de señales, la fosforilación juega un papel clave en la activación e inactivación de ciertas proteínas que en conjunto generan una respuesta celular.

Para que una célula pueda desencadenar una respuesta celular, implica la activación de varias moléculas de señalización de membrana seguida de una estimulación secuencial de diversas proteínas cinasas citoplasmáticas, conocidas colectivamente como cascada de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Hasta seis niveles en esta cascada participan en la amplificación y especificidad de las señales transmitidas que al final activan varias moléculas reguladoras en el citoplasma y en el núcleo para iniciar procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y el desarrollo (Seger & Krebs, 1995).

En el interactoma in silico (Figura 13), se indica que MpkB puede interactuar con varias proteínas, de acuerdo con las predicciones computacionales de secuencia en bases de datos e investigaciones registradas. Algunas de las proteínas que arroja no se han caracterizado aún, aparecen proteínas como SteC, MkkB, SteA (Ste11, Ste7 y Ste12 en levadura). Lo cual sugiere que la secuencia de *mpkB* está relacionada con la cascada de señalización de la vía de crecimiento filamentoso que incluye a SteC (MAPKKK) fosforila a MkkB (MAPKK) posteriormente MkkB, MpkB (MAPK) para que, finalmente se fosforile el factor de transcripción SteA.

Originalmente, se descubrió que la proteína Ste12 en *Saccharomyces cerevisiae*, era un objetivo de la cascada de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) Fus3 que regula el apareamiento (Errede & Ammerer, 1989). Ste12 también se identificó como un importante regulador del crecimiento invasivo de levaduras y el desarrollo de pseudohifas, como objetivo de la cascada Kss1 MAPK.

Sin embargo, en Hongos filamentosos, existen pocos estudios sobre la relación de SteA en la cascada de señalización celular. En el caso del organismo modelo *A. nidulans* Se han identificado homólogos de los componentes centrales del módulo Fus3 como SteC (Ste11), MkkB (Ste7), MpkB (Fus3), SteD (Ste50) y

SteA (Ste12). Se ha demostrado que estas proteínas desempeñan funciones en la regulación del desarrollo asexual y sexual, así como su relación con la expresión de los genes del complejo velvet y los genes de la producción de esterigmatocistina y otros metabolitos secundarios. (Frawley et al., 2018).

Adicionalmente, en el interactoma también se encuentra la proteína PsbA (Pbs2 en *Saccharomyces*) que es una MAPKKK que fosforila a HogA una MAPK de la vía de defensa a estrés osmótico.

Por otro lado, SepA se requiere para el mantenimiento de la polaridad celular durante el crecimiento de las hifas y la morfogénesis asexual (Harris, 1997).

También nos sugiere que MpkB interacciona con SfaD que se ha encontrado es la subunidad β de una proteína G heterotrimérica que pueden activar distintas vías de señalización como la osmotoleta, crecimiento filamentoso e integridad de pared.

8.2 Perfil de expresión

Como se observó en las figuras 16 y 17, el gen *mpkB* se expresa tanto en medio sólido como el líquido. En el caso de la FL con mayor intensidad en la fase de crecimiento o trofofase y con menor intensidad en la idiofase o fase de producción. En el caso contrario en FS se expresa con menor intensidad en la trofofase y con mayor intensidad en la idiofase, se debe considerar que MpkB para que esté en su estado activo y transducir la señal, necesita estar fosforilado. Esto podría indicar que en FS *mpkB* participa principalmente en la producción de metabolitos secundarios, mientras que en FL tiene un papel en el crecimiento y desarrollo principalmente.

8.3 Sensibilidad de estrés oxidante, osmótico y de pared de las

SimpkB

Se ha observado que en organismos patógenos la eliminación de ortólogos de *mpkB* da como resultado hipersensibilidad a agentes que dañan la pared celular, como el rojo Congo (CR) o el blanco de calcoflúor (CFW), así como a compuestos de defensa de las plantas, como quitinasas, glucanasas, péptidos antimicrobianos o fitoalexinas (Hou et al., 2002; Joubert et al., 2011; Mehrabi et al., 2006; Mey et al., 2002a; Ramamoorthy et al., 2007; Valiante et al., 2015; Xu et al., 1998).

Los resultados obtenidos de las *SimpkB* de la prueba de sensibilidad a estrés (micelio) indicaron que las transformantes fueron hipersensibles a estrés oxidante, sensibles a estrés de pared y ligeramente sensibles a estrés osmótico.

En cuanto al estrés en esporas con H₂O₂ se observó una disminución del 20-30% y en el caso del estrés osmótico con NaCl del 10-15%. Esto puede indicar señales compartida, llamadas comúnmente como “entrecruzamiento” o “Crosstalk” con otras vías principalmente con la vía de defensa a estrés de pared (MpkA) y alta osmolaridad (HogA). Aunque cada vía MAPK tiene funciones celulares distintas, cada vez hay más evidencia que sugiere que la comunicación cruzada entre diferentes MAPK es esencial para la generación de una respuesta orquestada de manera óptima (Fey et al., 2012; Frei et al., 2014; Igbaria et al., 2008; Niba et al., 2013; Saito, 2010).

Por otro lado, se han establecido que Fmk1, la MAPK de *F. oxysporum* ortóloga a Fus3/Kss1 de *S. cerevisiae*, así como su factor de transcripción Ste12, son esenciales para el crecimiento invasivo de hifas y la infección de las plantas, funciones que nos recuerdan a las que se desarrolla en un micelio en medio sólido. (Di Pietro et al., 2001; Rispaill y DiPietro, 2009).

8.4 Crecimiento y esporulación

En el caso del crecimiento radial no se observa diferencias significativas, sin embargo, se debe considerar que se llevó únicamente en medio PDA, posiblemente se requiera otros medios para descartar que no se tiene relación con el crecimiento radial, por otro lado, también puede influir la cantidad de esporas utilizadas para la inoculación y la duración de la incubación.

Jun et al. (2020) sugieren que la señalización de MpkB MAP cinasa que regula la conidiación de *A. flavus* a través de la represión de la expresión de *brlA*.

En el caso de las *SimpkB* se encontró una disminución entre el 40-60% en la esporulación, esto es observable desde su fenotipo, lo cual nos indicaría que *mpkB* en *A. terreus* podría estar actuando como regulador positivo de la esporulación y, por lo tanto, estar estrechamente relacionado con el factor de transcripción *brlA*.

8.5 Formación de biofilm e hirofobicidad

Muchos tipos de células producen biofilm una matriz extracelular que proporciona integridad estructural y protección.

En un estudio elaborado por Manfiolli et al. (2019) se realizó la delección del gen *mpkB* y *mpkA* de manera individual y posteriormente ambos genes en *Aspergillus fumigatus* con el objetivo de encontrar su función en la producción de DHN-melanina un tipo de metabolito secundario, se observó que la eliminación de *mpkB* aumentó la sensibilidad al inhibidor de glucano caspofungina inhibidor de glucano, lo que sugiere

un papel en la biosíntesis de la pared celular. Además, se observó un incremento de pigmentos oscuros durante el crecimiento de medio líquido que estaba relacionado con la producción de DHN-melanina. Las melaninas son una clase de pigmentos marrón oscuros a menudo asociados con la pared celular. Su papel principal es proteger a los organismos de los estresantes exógenos, contribuyendo así a la primera línea de defensa contra los peligros externos. Sugieren que MpkA regula positivamente la biosíntesis de DHN-melanina mientras que MpkB afecta negativamente su producción (Manfiolli et al., 2019).

En el caso de *SimpkB* se observó que hay una disminución de la formación de biofilm en las 10 transformantes a las 24 horas, con respecto a la cepa parental. Sin embargo, a las 48 horas no hay diferencia con la cepa parental lo cual nos indicaría que, hay una disminución en la velocidad de producción de biofilm, con estos resultados se considera que posiblemente *mpkB* tiene un entrecruzamiento de señal con la vía de integridad de pared (MpkA) en *A. terreus*, la cual juega un papel importante en la defensa a estrés ya que sirve como protección y soporte.

En el caso de la hidrofobicidad no se observó que las transformantes perdieran su capacidad de repeler el agua esto se observa porque al colocar la gota de azul de bromofenol no se absorbe ni se deforma, pasando el tiempo del análisis en algunas transformantes se observa una ligera deformación, pero en general las colonias repelen la gota. Los hongos el género *Aspergilli* la hidrofobicidad es una característica de vital importancia para su supervivencia y propagación.

8.6 Producción de lovastatina

Con los resultados obtenidos se determinó que *mpkB* participa en la regulación de la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus* debido a que las cepas silenciadas presentan una disminución de lovastatina tanto en FL como en FS.

Se observó que la cepa con el vector sin el inserto, denominada como cepa control (C), se comportaba como la cepa parental. Esto indica que el vector no le confiere características especiales y, por lo tanto, los efectos mostrados en las transformantes se deben al silenciamiento del gen *mpkB* por ARN de interferencia.

A las 20, 24, 48 y 72 horas no hay diferencia significativa en la producción de lovastatina entre las transformantes elegidas con respecto a la cepa parental y el control (vector vacío) es hasta las 96 horas donde se observa una disminución en la producción de lovastatina.

Al estar relacionado con la producción de lovastatina se considera que la MAP cinasa *mpkB* es un regulador positivo el metabolismo secundario en *A. terreus* tanto en medio líquido como el sólido.

8.7 Comprobación del silenciamiento

Las transformantes de *SimpkB* que fueron más sensibles a los distintos tipos de estrés fueron T1, T2, T4, T6, T9, T10.

En las transformantes T1, T6, T8 de *SimpkB* se observa una notable disminución en la esporulación. Además de una Menor formación de biofilm en T1, T3, T4, T5, T6, T8, T10. A partir de estos resultados para fines prácticos se eligieron las transformantes T1, T2, T6, T8 para comprobar el silenciamiento por RT-qPCR. Las transformantes elegidas se comprobó el silenciamiento, en FL la T8 se observa un mayor silenciamiento y T6 un menor silenciamiento en el caso de FS el grado silenciamiento entre las transformantes es similar.

El grado de silenciamiento es variable entre las transformantes debido a que el vector de silenciamiento no es específico al integrarse al genoma, puede integrarse en lugares distintos donde afecta en la expresión del gen de distinta manera y en diferente grado, no obstante, con los resultados obtenidos se puede asegurar que los cambios de las transformantes con respecto a la cepa parental se deben a la disminución de la expresión de *mpkB*.

8.8 Especies reactivas de oxígeno

Las vías Fmk1 y Mpk1 regulan la producción de ROS al controlar la expresión de los genes de la NADPH oxidasa (Nox) en el hongo filamentoso *Fusarium Oxysporum* (Dirschnebel et al., 2014; Lalucque et al., 2012; Segmüller et al., 2008).

Como se observa en la Figura 40. La cepa parental y el control (vector vacío) tienen un mismo comportamiento, pero en FL y FS existe un comportamiento contrario en las transformantes seleccionadas y comprobadas. Las especies reactivas de oxígeno aumentan en la fermentación líquida lo cual nos podría indicar que puede existir una relación en la producción de lovastatina y las EROs. En FS hay una disminución de las EROs que podría estar relacionado con la baja producción de lovastatina, en futuros experimentos se tendría que normalizar las EROs durante la fermentación para poder analizar de manera más completa la participación de *mpkB* con la producción de MS ya que las EROs se ha demostrado que tienen un papel como segundos mensajeros en la transducción de señales y que las cepas de *A.terreus* resistentes a este estrés son superproductoras, esto nos podría sugerir que el efecto de la

disminución de lovastatina ambos medios se debe al silenciamiento de *mpkB* pero que existe una relación con la regulación de las EROs.

Por otro lado, en FL el aumento podría estar relacionado a la ausencia de *mpkB* y su papel en la defensa a estrés oxidativo a través de un entrecruzamiento de señales.

En el caso de FS hay una disminución de las EROs, el hongo podría activar vías alternas para regular la presencia de estas, un comportamiento característico de la fisiología en medio sólido, influyendo también una disminución en la producción, incluso debido a que en FS *mpkB* está relacionado con la esporulación, por lo tanto, en la diferenciación celular, podría implicar que exista una menor producción de EROs.

9. Conclusiones

Se consiguió realizar la identificación y amplificación mediante PCR del fragmento codificante del gen *mpkB* en *Aspergillus terreus*, con un 92 % de identidad, lo que confirma su conservación funcional. Después, se construyó exitosamente el vector de silenciamiento pGpdPki-ARNi-*mpkB*, el cual fue utilizado para obtener transformantes estables. Posteriormente, se verificó el silenciamiento efectivo del gen *mpkB* en las cepas transformadas, lo que valida la funcionalidad del sistema de ARNi empleado y establece una base sólida para estudios posteriores sobre el papel de esta cinasa MAPK en *A. terreus*.

Finalmente se logró caracterizar el fenotipo de las *SimpkB* obtenidas que mostraron:

- Sensibilidad a estrés oxidante (alto), de pared (medio) y osmótico (bajo) en micelio, además de sensibilidad a estrés oxidante y osmótico en esporas, lo que indicaría un posible entrecruzamiento de señales con las vías de defensa a estrés oxidante (HogA) y de pared (MpkA).
- Presentaron una disminución en la esporulación, lo que indica una relación del este factor con el metabolismo secundario y la biosíntesis de esporas.
- Presentaron una disminución en la formación de biofilm que, indicaría un posible entrecruzamiento con la vía de MpkA.
- Disminución en la producción de lovastatina lo que indica que *mpkB* es un regulador positivo en la producción de lovastatina tanto en FL y FS.

El presente trabajo arroja evidencia suficiente para afirmar que *mpkB* participa en la cascada de señalización del metabolismo secundario en respuesta al estrés oxidante, osmótico y de pared, así como su participación en la esporulación y la biosíntesis de lovastatina en medio líquido y sólido, la información obtenida, además de ser un aporte científico, servirá para poder diseñar en un futuro, mejores y novedosos sistemas de producción tanto en FS y FL esperando contribuir con las nuevas problemáticas medio ambientales que se enfrenta la sociedad actual y las futuras generaciones.

10. Perspectivas

Para seguir el estudio de *mpkB* se propone realizar un Western blot y un pull-down, el primero para analizar su fosforilación ya que juega un papel importante en la activación e interacción con otras proteínas. La técnica de pull-down serviría para obtener las proteínas con las que *mpkB* interactúa de manera experimental, de esta manera se tendría un panorama más claro de su participación en las vías de defensa a estrés y la fisiología del medio sólido.

Por otro lado, con la cepa silenciada, sería interesante estudiar el rol de otras MAP cinasa como HogA y MpkA, así como otros factores de transcripción como BrlA, SteA, HotA. Además, la proteína de membrana MsbA, implicada en la transducción de señal a respuesta estrés, podría tener relación directa o indirecta con MpkB. Analizar estas interacciones permitiría descubrir el nexo en la transducción de señales y la producción de metabolitos secundarios en *A. terreus*. Estos conocimientos podrían aplicarse para conocer y mejorar el proceso de producción industrial de metabolitos secundarios, por mejoramiento genético, como la expresión y fosforilación constitutiva de MpkB ya que es un regulador positivo el metabolismo secundario. Esto también podría ser aplicado a múltiples microorganismos de interés industrial ya que estas vías están presentes e intervendrían en el metabolismo secundario. En cuanto al silenciamiento genes por ARNi, ha sido una herramienta muy valiosa en el estudio molecular de distintos organismos, no obstante, actualmente con ayuda de los avances tecnológicos y el uso bioinformático se pueden diseñar nuevas técnicas y estrategias para el estudio de las vías de transducción de señales, por ejemplo, el uso de la herramienta CRISPR-Cas9 para modificar ADN de una manera precisa y específica para descubrir los genes y mecanismo que regulan la producción de metabolitos secundarios.

11. Bibliografía

- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., & Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3957-3961. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.3957>
- Ali, L. M. A., & Gary-Bobo, M. (2022). Photochemical Internalization of siARN for Cancer Therapy. *Cancers*, 14(15), 3597. <https://doi.org/10.3390/cancers14153597>
- Astudillo-Echeverría, A., Pazmiño-Centeno, D., & Naranjo-Briceño, L. (2021). Uso de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición de genomas en hongos filamentosos: una revisión del estado actual y últimas tendencias. *Genética Médica y Genómica*, 5, 45-69. https://genotipia.com/revista_gm/gmg-revision-crispr-hongos/
- Ávila Cisneros Nayeli, "Efecto del contacto con el aire, estrés osmótico y el estímulo de exploración del micelio sobre la producción de lovastatina en *A. terreus*" Dirección: Barrios-González Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. 2009.
- Baños, J. G. (2010) Producción de lovastatina en fermentación sólida sobre soporte inerte artificial, por una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* (TUB f-514) y por sus mutantes resistentes a estrés osmótico y a estrés oxidante. Tesis (Doctorado en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
- Baños, J. G., Tomasini, A., Szakács, G., & Barrios-González, J. (2005). Fisiología y producción de lovastatina de *A. terreus* en fermentación sólida de dos fases. Morelia, Michoacán, México: VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos.
- Baños, J. G., Mejía, A., Garay, A., & Barrios-González, J. (2007). Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidativo. In XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería June (Vol. 25).
- Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, F. J., & Tomasini, A. (2003). Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian journal of Biotechnology*, 2(3), 322-333.
- Barrios-González, J., & Miranda, R. U. (2009). Biotechnological production and applications of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 869-883. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2239-6>
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Barrios-González, J., Pérez-Sánchez, A., & Bibián, M. E. (2020). New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 104(21), 8979-8998. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10871-x>

- Barrios-González, J., & Mejía, A. (2007). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. En A. Pandey, C. Larroche, C. R. Soccol, & J. A. Rodríguez-León (Eds.), *Current Developments in Solid-State Fermentation* (págs. 262-296). New Delhi: Asiatech Publishers Inc.
- Barrios-González J, Mejía A (2008) Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Soccol CR, Larroche C (eds) *Current developments in solid-state fermentation*, 1st edn. Springer, New York, pp 302–336.
- Barrios-González J (2018) Chapter 13-Secondary metabolites production: physiological advantages in solid-state fermentation. In: Pandey A, Larroche C, Soccol CR (eds) *Current developments in biotechnology and bioengineering: current advances in solid-state fermentation*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 257–283
- Bayram, Ö., Bayram, Ö. S., Ahmed, Y. L., Maruyama, J., Valerius, O., Rizzoli, S. O., Ficner, R., Irniger, S., & Braus, G. H. (2012b). The *Aspergillus nidulans* MAPK Module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 Controls Development and Secondary Metabolism. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002816.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002816>
- Briesemeister, S., Rahnenführer, J., & Kohlbacher, O. (2010). Going from where to why interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics*, 26(9), 1232-1238
- Bibián-León, M. E. (2015). Papel de los genes *srrA* y *msnA* en la biosíntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Tesis (Maestría en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
- Carrasco-Navarro, U., & Aguirre, J. (2021). H₂O₂ Induces Major Phosphorylation Changes in Critical Regulators of Signal Transduction, Gene Expression, Metabolism and Developmental Networks in *Aspergillus nidulans*. *Journal Of Fungi*, 7(8), 624. <https://doi.org/10.3390/jof7080624>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Chegwin-Angarita, Carolina, Nieto-Ramírez, Ivonne J., Atehortúa, Lucia, & Sepúlveda A., Liuda J (2012). Las estatinas: Actividad biológica y producción biotecnológica. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 157-178.
- Cho, Y., Cramer, R. A., Kim, K., Davis, J., Mitchell, T. K., Figuli, P., Pryor, B. M., Lemasters, E., & Lawrence, C. B. (2007). The Fus3/Kss1 MAP kinase homolog Amk1 regulates the expression of genes encoding hydrolytic enzymes in *Alternaria brassicicola*. *Fungal Genetics And Biology*, 44(6), 543-553. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.11.015>
- Conesa, A., Punt, P. J., Van Lwijk, N., & Van Den Hondel, C. A. (2001). The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genetics And Biology*, 33(3), 155-171.
<https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1276>
- Correa de Adjounian, Maria Fernanda, Adjounian, Haroution, & Adjounian, Sarkis Horacio. (2008). Silenciamiento de genes mediante ARN interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 27(1), 22-25. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100006&lng=es&tlng=es
- Costa, T. D. S. A., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites.
- Cullen, P., & Sprague, G. F. (2012). The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics*, 190(1), 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>

- De Nadal, E., Casadomé, L., & Posas, F. (2002). Targeting the MEF2-Like Transcription Factor Smp1 by the Stress-Activated Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular And Cellular Biology*, 23(1), 229-237. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.1.229-237.2003>
- Di Pietro, A., Garcia-Maceira, F. I., Megleck, E., & Roncero, M. I. G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140-1152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02307.x>
- Dirschnabel, D. E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., & Kück, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore Germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics*, 196(3), 729-744. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159368>
- Errede, B., & Ammerer, G. (1989). STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-ADN complexes. *Genes & Development*, 3(9), 1349-1361. <https://doi.org/10.1101/gad.3.9.1349>
- Fey, D., Croucher, D. R., Kolch, W., & Kholodenko, B. N. (2012). Crosstalk and Signaling Switches in Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades. *Frontiers In Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00355>
- Frawley, D., Karahoda, B., & Bayram, Ö. (2018). The HamE scaffold positively regulates MpkB phosphorylation to promote development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34895-6>
- Frawley, D., Stroe, M. C., Oakley, B. R., Heinekamp, T., Straßburger, M., Fleming, A. B., Brakhage, A. A., & Bayram, Ö. (2020). The Pheromone Module SteC-MkkB-MpkB-SteD-HamE Regulates Development, Stress Responses and Secondary Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00811>
- Frawley, D., Greco, C., Oakley, B., Alhussain, M. M., Fleming, A. B., Keller, N. P., & Bayram, Ö. (2020). The tetrameric pheromone module SteC-MkkB-MpkB-SteD regulates asexual sporulation, sclerotia formation and aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Cellular Microbiology*, 22(6). <https://doi.org/10.1111/cmi.13192>
- Frey, N. F. D., Garcia, A., Bigeard, J., Zaag, R., Bueso, E., Garmier, M., Pateyron, S., De Tauzia-Moreau, M., Brunaud, V., Balzergue, S., Colcombet, J., Aubourg, S., Martin-Magniette, M., & Hirt, H. (2014). Functional analysis of Arabidopsis immune-related MAPKs uncovers a role for MPK3 as negative regulator of inducible defences. *Genome Biology*, 15(6), R87. <https://doi.org/10.1186/gb-201415-6-r87>
- Furberg, C. D. (1999). Natural Statins and Stroke Risk. *Circulation*, 99(2), 185-188. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.2.185>
- Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1409-1414. <https://doi.org/10.1038/nbt1028>
- Goswami, S., Vidyarthi, A. S., Bhunia, B., & Mandal, T. (2013). A review on lovastatin and its production. *Journal of biochemical technology*, 4(1), 581-587.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., & Davenport, K. (1998b). MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1264-1300. <https://doi.org/10.1128/mmb.62.4.1264-1300.1998>

- Hajjaj, H., Niederberger, P., & Duboc, P. (2001). Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(6), 2596-2602. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2596-2602.2001>
- Harris, S. D. (1997b). The *Aspergillus nidulans* *sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *The EMBO Journal*, 16(12), 3474-3483. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3474>
- Herrera-Martell M., "Papel del gen *atfB* en la biosíntesis de lovastatina por *A. terreus*" Dirección: Barrios-González Tesis Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 2019.
- Hoi, J. W. S., & Dumas, B. (2010). Ste12 and Ste12-Like Proteins, Fungal Transcription Factors Regulating Development and Pathogenicity. *Eukaryotic Cell*, 9(4), 480-485. <https://doi.org/10.1128/ec.00333-09>
- Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H. C., & Xu, J. (2002). A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1119-1127. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.11.1119>
- Igbaria, A., Lev, S., Rose, M. S., Lee, B. N., Hadar, R., Degani, O., & Horwitz, B. A. (2008). Distinct and Combined Roles of the MAP Kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in Virulence and Stress Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 769-780. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-6-0769>
- Jaivel N & Marimuthu P. Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. *Int J Eng Sci Technol*.2010; 2: 2730-2733.
- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>
- Joubert, A., Bataille-Simoneau, N., Champion, C., Guillemette, T., Hudhomme, P., Iacomini-Vasilescu, B., Leroy, T., Pochon, S., Poupard, P., & Simoneau, P. (2010). Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cellular Microbiology*, 13(1), 62-80. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01520.x>
- Jun, S., Kim, J., & Han, K. (2020). The Conserved MAP Kinase MpkB Regulates Development and Sporulation without Affecting Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of Fungi*, 6(4), 289. <https://doi.org/10.3390/jof6040289>
- Kang, J. Y., Chun, J., Jun, S., Han, D., Chae, K., & Jahng, K. Y. (2013). The MpkB MAP kinase plays a role in autolysis and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 61, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.09.010>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature reviews microbiology*, 3(12), 937-947.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C., & Hutchinson, C. R. (1999). Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis. *Science*, 284(5418), 1368-1372. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1368>

- KV, R., & Lakshmanan, D. (2013). A review: Lovastatin production and applications. *Asian J Pharm Clinical Research*, 6(3), 21-26.
- Lalucque, H., Malagnac, F., Brun, S., Kicka, S., & Silar, P. (2012). A Non-Mendelian MAPK-Generated Hereditary Unit Controlled by a Second MAPK Pathway in *Podospira anserina*. *Genetics*, 191(2), 419-433. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.139469>
- Lonsane, B., Ghildyal, N., Budiatman, S., & Ramakrishna, S. (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), 258-265. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3)
- Manfiolli, A. O., Siqueira, F. S., Reis, T. F. D., Van Dijck, P., Schrevens, S., Hoefgen, S., Föge, M. Straßburger, M., De Assis, L. J., Heinekamp, T., Rocha, M. C., Janevska, S., Brakhage, A. A., Malavazi, I., Goldman, G. H., & Valiante, V. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinase Cross-Talk Interaction Modulates the Production of Melanins in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00215-19>
- Manzoni M., & Rollini M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnology*. 58 (5), 555-564. . <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0932-9>
- Martínez-Soto, D., & Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>
- May, G. S., Xue, T., Kontoyiannis, D. P., & Gustin, M. C. (2005). Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 43(s1), 83-86. <https://doi.org/10.1080/13693780400024784>
- May, G. S. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways in Aspergilli. In *The aspergilli* (pp. 141-148). CRC Press
- Mehrabi, R., Van Der Lee, T., Waalwijk, C., & Kema, G. H. J. (2006). MgSl2, a Cellular Integrity MAP Kinase Gene of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*, Is Dispensable for Penetration but Essential for Invasive Growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(4), 389-398. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0389>
- Mey, G., Oeser, B., Lebrun, M., & Tudzynski, P. (2002). The Biotrophic, Non-Appressorium-Forming Grass Pathogen *Claviceps purpurea* Needs a Fus3/Pmk1 Homologous Mitogen-Activated Protein Kinase for Colonization of Rye Ovarian Tissue. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 15(4), 303-312. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.4.303>
- Millar, J. B. (1999). 4. Stress-activated MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) pathways of budding and fission yeasts. En *Princeton University Press eBooks* (pp. 49-62). <https://doi.org/10.1515/9781400865048.49>
- Miranda Labra, R. U. (2008, enero 31). Expresión del gen *sod1* durante la trofofase e idiofase de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida para la producción de lovastatina. Universidad Autónoma Metropolitana. <https://doi.org/10.24275/uami.4q77fr56x>
- Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mejía, A., & Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: Differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, 117(2), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.001>

- Niba, E. T. E., Nagaya, H., Kanno, T., Tsuchiya, A., Gotoh, A., Tabata, C., Kuribayashi, K., Nakano, T., & Nishizaki, T. (2013). Crosstalk between PI3 Kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK Pathways Downstream PDGF Receptor. *Cellular Physiology And Biochemistry*, 31(6), 905-913. <https://doi.org/10.1159/000350108>
- Panda, B. P., Javed, S., & Ali, M. (2009). Engineering rice based medium for production of lovastatin with *Monascus* species. *Czech Journal Of Food Sciences*, 27(5), 352-360. <https://doi.org/10.17221/47/2008-cjfs>
- Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon and Nigam P. (2001). Solid state fermentation in biotechnology- Fundamentals and Applications 1st ed. New Delhi India: Asiatech Publications
- Patel, A. K., Agrawal, R., Dong, C., Chen, C., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2023). Filamentous fungal morphology in industrial aspects. En *Elsevier eBooks* (pp. 197-217). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91872-5.00015-6>
- Pérez-Nadales, E., & Di Pietro, A. (2011). The Membrane Mucin Msb2 Regulates Invasive Growth and Plant Infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*, 23(3), 1171-1185. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075093>
- Prieto-Macías, J., Dávila-Ramírez, J. A., Fierro-Rosales, V. A., Flores-Ávila, F. A., García-Diosdado, A., Hernández-González, F., Martínez-Gutiérrez, J. A., Rivera-Sánchez, G. R., & Sandoval-Valdez, D. A. (2015). Estatinas. *Lux Médica*, 10(29), 31-39. <https://doi.org/10.33064/29lm2015766>
- Punt, P. J., Van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., & Van Den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends In Biotechnology*, 20(5), 200-206. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)01933-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)01933-9)
- Ramamoorthy, V., Zhao, X., Snyder, A. K., Xu, J., & Shah, D. M. (2007). Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Cellular Microbiology*, 9(6), 1491-1506. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00887.x>
- Rispail, N., & Di Pietro, A. (2009). *Fusarium oxysporum* Ste12 Controls Invasive Growth and Virulence Downstream of the Fmk1 MAPK Cascade. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 830-839. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-7-0830>
- Rollini, M. M. M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 58(5), 555-564. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0932-9>
- Román, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends In Microbiology*, 15(4), 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.001>
- Roze, L. V., Chanda, A., & Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics And Biology*, 48(1), 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.006>
- Saito, H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Current Opinion In Microbiology*, 13(6), 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.001>

- Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., Kobayashi, K., Mizuno, A., Akita, O., Mikami, S., Shimoi, H., & Gomi, K. (2009). *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genetics And Biology*, 46(12), 887-897. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.004>
- Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Schaeffer, H., & Weber, M. A. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2435-2444. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.2435>
- Seger, R., & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9), 726-735. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601337>
- Silva, L. P., Frawley, D., Assis, L. J. de, Tierney, C., Fleming, A. B., Bayram, O., & Goldman, G. H. (2020). Putative Membrane Receptors Contribute to Activation and Efficient Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades during Adaptation of *Aspergillus fumigatus* to Different Stressors and Carbon Sources. *mSphere*, 5(5), e00818-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00818-20>
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., Van Kan, J., & Tudzynski, P. (2008). NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 808-819. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-6-0808>
- Soubrier, M., & Roux, C. (2006). Statins in rheumatology. *Joint Bone Spine*, 73(2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.04.008>
- Szakács, G., G. Morovján Y R.P. Tengerdy. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*, 20(4), 411-415.
- Ullán, R. V., Godio, R. P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltre, R., Kosalkova, K. & Martín, J. F. (2008). ARN-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using β -lactam genes expression. *Journal of microbiological methods*, 75(2), 209-218
- Valiante, V., Macheleidt, J., Föge, M., & Brakhage, A. A. (2015). The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Frontiers In Microbiology*, 06. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00325>
- Veillard, N. R., & Mach, F. (2002). Statins: the new aspirin? *Cellular And Molecular Life Sciences*, 59(11), 1771-1786. <https://doi.org/10.1007/pl00012505>
- Vk, P. (2012b). Solid State Fermentation: An Effective Method for Lovastatin Production by Fungi – A Mini Review. *The Open Tropical Medicine Journal*, 5(1), 1-5. <https://doi.org/10.2174/1874315301205010001>
- World Health Organization: WHO. (2021, 11 junio). *Cardiovascular diseases(CVDs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Xu, J. (2000). MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 31(3), 137-152. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1237>
- Xu, J., & Hamer, J. (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & Development*, 10(21), 2696-2706. <https://doi.org/10.1101/gad.10.21.2696>

- Xu, J., Staiger, C. J., & Hamer, J. E. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 95(21), 12713-12718.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12713>
- Yang, D., & Hwang, L. S. (2006). Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *Journal Chromatography A/Journal Of Chromatography*, 1119(1-2), 277-284.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.031>

ANEXOS

Anexo I. Análisis bioinformático *mpkB*

- SMART

>XP_001212494.1 mitogen-activated protein kinase [Aspergillus terreus NIH2624]
MVQQLPPQGGSRKISFNVSDQYEIQDVIGEGAYGVVCSAIIHKPSGQKVAIKKITPFDHSMFCLRTLREMK
LLRYFNHENIISILDIQRPRNYESFNEVYLIQELMETDMHRVIRTQDLSDHCQYFIYQTLRALKAMHSA
NVLHRDLKPSNLLLNANCDLKVCDFGLARSAASTDDNSGFMTEYVATRWRAPFIMLTFFKEYTKAIDVWS
VGCILAEMLSGKPLFPKGKDYHHQLTLILDVLGTPTMEDYYGIKSRREYIRSLPFKKKIPFKALFPKSN
ELALDLLERLLAFNPAKRITVEEALRHPYLEPYHDPDDEPTAPPIPEGFFDFDKNKDALSKEQLKILIYE
EIMR

Dominio S-TKc

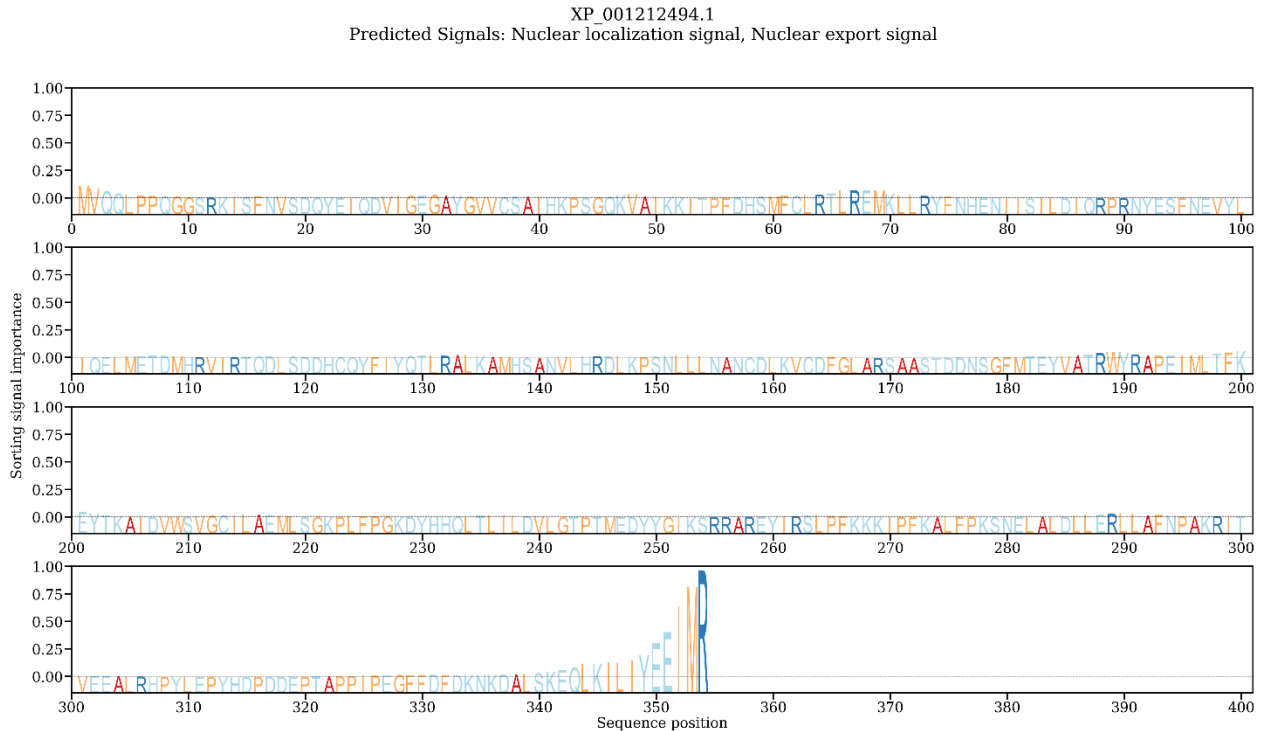
Este es un dominio SMART **S-TKc** ([anotación completa](#)).

Posición: 22 a 310

Valor E: 3.40448815256868e-99 ([HMMER2](#)[HMMER2](#))



- Predicción de localización subcelular por DeepLoc 2.0



- Predicción de sitios de unión a importinas Score 4

Un score de 8, 9 o 10 habla de localización exclusivamente en el núcleo, un score de 7 u 8 es localización parcial en el núcleo, mientras que un score de 3 a 6 se refiere a localización tanto en el núcleo como en el citoplasma, y aquellos con un score de 1 o 2 es localización exclusiva en el citoplasma.

cNLS Mapper Result

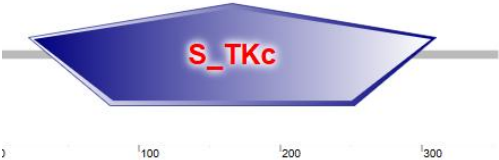
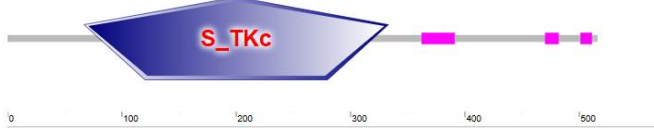
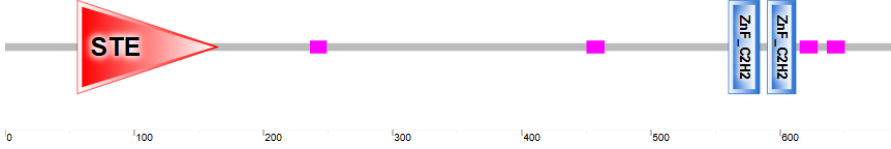
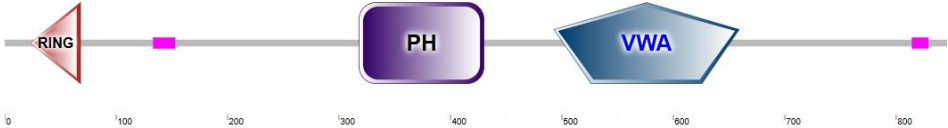
Predicted NLSs in query sequence	
MVQQLPQGGSRKISFNVSDQYEIQDVIGEGAYGVVCSAIHKPSGQKVAI	50
KKITPFDHSMFCLRTLREMKLLRYFNHENIISILDIQRPRNYESFNEVYL	100
IQELMETDMHRVIRTQDLSDDHCQYFIYQTLRALKAMHSANVLHRDLKPS	150
NLLLNANCDLKVCDFGLARSAASTDDNSGFMTEYVATRWYRAPEIMLTFK	200
EYTKAIDVWSVGCILAEMLSGKPLFPGKDYHHQLTLILDVLGTPTMEDYY	250
GIKSRRAREYIRSLPFKK KIPFKALFPKSNEALDLLERLLAFNPAKRIT	300
VEEALRHPYLEPYHDPDDEPTAPPIEGFFDFDKNKDALSKEQLKILIYE	350
EIMR	354

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
269	KIPFKALFPKSNEALDLLERLLAFNPAKRIT	4.2

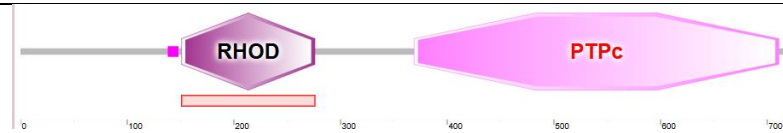
- STRING

Dominios proteínas que interaccionan con *mpkB* obtenido de STRING

Código	Dominios
ATEG_03316 Mitogen-activated protein kinase. 354 aa	 Dominio Serina/treonina fosfotransferasa
ATEG_08950 Protein kinase domain-containing protein. 516 aa	 Dominio Serina/treonina fosfotransferasa
ATEG_09411 Factor de transcripción SteA. 690 a. a	 Factor de transcripción
ATEG_06903 Uncharacterized protein. 703 a	 DSPc desfosforilación de proteínas
ATEG_03736 Uncharacterized protein. 1013 a. a	 RING Los dominios de dedos de zinc (Znf) son motivos proteicos relativamente pequeños que contienen múltiples protuberancias en forma de dedos que hacen contactos en tándem con su molécula objetivo. PH Los dominios de homología de Pleckstrin (PH) son pequeños dominios modulares que se encuentran en una gran variedad de proteínas. Los dominios pueden unirse al fosfatidilinositol dentro de membranas biológicas y proteínas como las subunidades beta/gamma de las proteínas G heterotriméricas y la proteína cinasa C. A través de estas interacciones, los dominios PH desempeñan un papel en el reclutamiento de proteínas a diferentes membranas, dirigiéndolas así a los compartimentos celulares apropiados o permitiéndoles interactuar con otros componentes de las vías de transducción de señales.

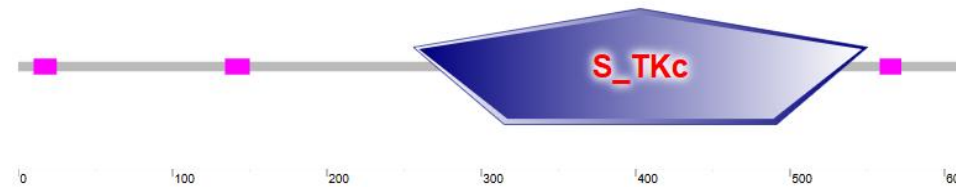
VWA En las proteínas eucariotas extracelulares median la adhesión a través de sitios de adhesión dependientes de iones metálicos (MIDAS).

ATEG_02763
Uncharacterized
protein. 722 a. a



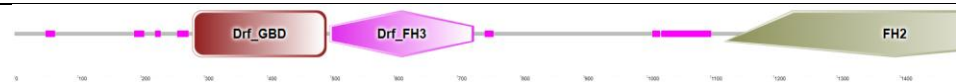
Rhodanese una sulforrtransferasa implicada en la desintoxicación del cianuro
PTPc desfosforilación de proteínas

ATEG_05187
Dual specificity
mitogen-activated
protein kinase
kinase dSOR1. 625
aa



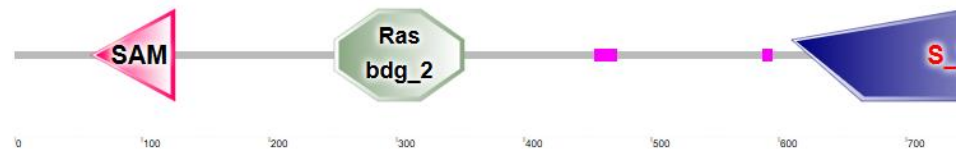
Serina/treonina fosfotransferasa

ATEG_05683
Cytokinesis protein
sepA. 1795 a.a



Drf_GBD organización del citoesqueleto de actina
Drf_FH3 organización de componentes celulares
FH2 Desempeña un papel crucial en la reorganización del citoesqueleto de actina, que media varias funciones de la corteza celular, incluida la motilidad, la adhesión y la citocinesis.

ATEG_09389
Uncharacterized
protein. 891 a.a

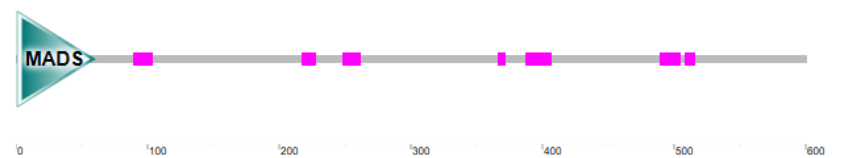


SAM Módulo de interacción proteico putativo presente en una amplia variedad de proteínas

RAS es una proteína cinasa específica de Ser/Thr que actúa como mediadora de señales para la diferenciación sexual en *S. pombe* iniciando un módulo MAPK, que es un elemento altamente conservado en eucariotas.

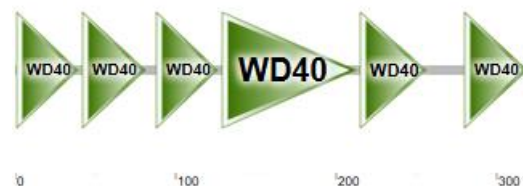
Serina/treonina fosfotransferasa

ATEG_01619
MADS-box domain-
containing protein.
601 aa



Actividad de dimerización de proteínas

ATEG_02052
Guanine nucleotide-
binding protein beta
subunit.



Las repeticiones WD-40 UNION DE PROTEINAS

Anexo II. Diseño de primers

El diseño de los primers se hizo sobre el exón de mayor longitud

>XM_001212494.1 Aspergillus terreus NIH2624 mitogen-activated protein kinase (ATEG_03316) partial mARN

ATGGTGCAACAGCTACCTCCTCAGGGGGGCTCGCGCAAGATCTCCTTCAACGTCTCCGACCAATATGAAA
TCCAGGATGTCATCGGCGAGGGCGCCTACGGGGTTGTCTGCTCTGCCATCCACAAACCGTCCGGCCAGAA
GGTCGCCATCAAGAAGATCACTCCCTTCGACCACTCCATGTTCTGCCTGCGAACGCTGCGGGAGATGAAG
CTGCTCCGATACTTCAACCACGAGAACATTATTTCCATCCTAGATATCCAGCGGCCCCGCAACTACGAGA
GCTTCAACGAAGTGTATCTGATTTCAGGAATTGATGGAAACCGACATGCATCGCGTGATTTCGTACCCAAGA
CCTGTCCGACGACCACTGCCAATACTTCATCTACCAGACTCTGCGGGGCGCTGAAAGCCATGCATTCCGCC
AACGTTCTTCACCGTGATCTCAAGCCATCCAACCTTCTTCTCAACGCCAACTGCGACCTGAAAGTCTGCG
ACTTTGGTCTCGCCCGCTCGGCCGCGTCGACCGACGACAACCTCGGGCTTCATGACGGAATACGTGGCGAC
TCGGTGGTACCGTGCCCCGGAGATCATGCTGACCTTCAAGGAATACACCAAAGCCATCGACGTGTGGAGC
GTGGGCTGCATTCTGGCCGAGATGCTGAGCGGAAAGCCCTTATTTCTGGGAAAGACTACCACCATCAAT
TGACCTGATTCTGGACGTTCTGGGCACCCCGACCATGGAGGACTACTACGGCATCAAGTCCCGCCGCGC
GCGGAATACATCCGGTCCCTCCCGTTCAAGAAGAAGATCCCGTTCAAGGCGCTGTTCCCGAAGAGCAAC
GAGCTGGCATTGGATCTCCTGGAGAGACTGCTGGCGTTCAACCCAGCTAAGCGCATCACCGTCGAGGAGG
CGCTGCGCCATCCGTACCTGGAGCCGTACCACGACCCGGACGATGAGCCACGGCGCCGCGATCCCGGA
GGGCTTCTTCGACTTTGACAAGAACAAGGATGCGCTCAGCAAGGAGCAGTTGAAGATCCTGATCTACGAG
GAGATCATGCGGTAA

Se diseñaron sobre el exón más amplio y se agregaron los sitios de corte *NcoI*

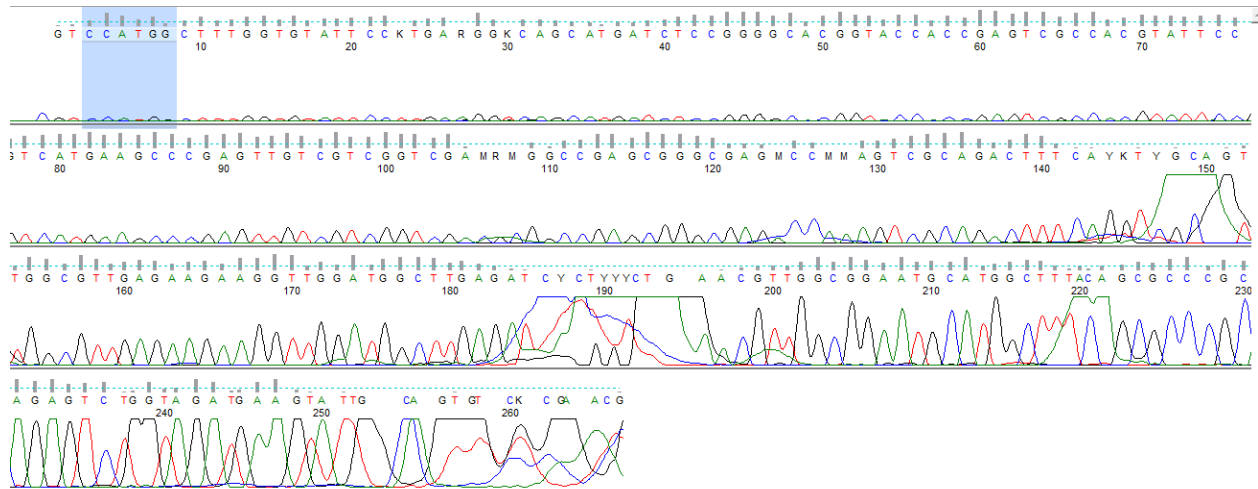
GAATTGATGGAAACCGACATGCATCT**TACCATGGCGTGATTTCGTACCCAA**GACCTGTCCGACGACCACTGC
CAATACTTCATCTACCAGACTCTGCGGGGCGCTGAAAGCCATGCATTCCGCCAACGTTCTTCACCGTGATC
TCAAGCCATCCAACCTTCTTCTCAACGCCAACTGCGACCTGAAAGTCTGCGACTTTGGTCTCGCCCGCTC
GGCCGCGTCGACCGACGACAACCTCGGGCTTCATGACGGAATACGTGGCGACTCGGTGGTACCGTGCCCCG
GAGATCATGCTGACCTTCAAGGA**ATACACCAAAGCCATgGACGT**GTGGAGCGTGGGCTGCATTCTGGCCG
AGATGCTGAGCGGAAAGCCCTTATTTCTGGGAAAGACT

EI

fragmento amplificado es de ≈298pb

	Forward 5'-----3'	Reverse 5'-----3'
Silencing <i>NcoI</i>	taccatg GCGTGATTTCGTACCCAA	CGT Cc ATGGCTTTGGTGTAT
C▼CATG G		
GGTAC▲C		

Anexo III. Secuenciación



BLAST

Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Aspergillus terreus NIH2624 mitogen-activated protein kinase (ATEG_033...	Aspergillus...	377	377	96%	3e-100	91.51%	1065	XM_001212494.1
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand					
377 bits(204)	3e-100	237/259(92%)	2/259(0%)	Plus/Plus					
Query	10	CACTG - CAATACTTCATCTACCAGACTCTGCGGGCGCTGTAAAGCCATGCATTCCGCCAA	68						
Sbjct	364	CACTGCCAATACTTCATCTACCAGACTCTGCGGGCGCTG-AAAGCCATGCATTCCGCCAA	422						
Query	69	CGTTCAAGRRRAGRGATCTCAAGCCATCCAACCTTCTTCTCAACGCCAACTGCRAMRTGAA	128						
Sbjct	423	CGTTCTTACCGTGATCTCAAGCCATCCAACCTTCTTCTCAACGCCAACTGCGACCTGAA	482						
Query	129	AGTCTGCGACTKKGGKCTCGCCCGCTCGGCCCKYKTCGACCGACGACAACTCGGGCTTCAT	188						
Sbjct	483	AGTCTGCGACTTTGGTCTCGCCCGCTCGGCCCGCTCGACCGACGACAACTCGGGCTTCAT	542						
Query	189	GACGGAATACGTGGCGACTCGGTGGTACCGTGCCCCGGAGATCATGCTGMCCYTAMGGA	248						
Sbjct	543	GACGGAATACGTGGCGACTCGGTGGTACCGTGCCCCGGAGATCATGCTGACCTTCAAGGA	602						
Query	249	ATACACCAAAGCCATGGAC	267						
Sbjct	603	ATACACCAAAGCCATCGAC	621						



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00333

Matricula: 2223801869

Caracterización de la MAPK MpkB en *Aspergillus terreus*; efecto en la producción de lovastatina en medio sólido y líquido.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA
DRA. AILED PEREZ SANCHEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: DIANA ESTELA GUZMAN GUZMAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA BERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

SECRETARIO

DRA. AILED PEREZ SANCHEZ