



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**“Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno en la biosíntesis de
Penicilina G, Cefalosporina C y Lovastatina”**

TESIS

para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

PRESENTA:

M. en B. María Esmeralda Bibián León

COMITÉ TUTORAL

Director de tesis:

Dr. Javier Barrios González

Asesores:

Dr. Armando Mejía Álvarez Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Ciudad de México

Febrero de 2021

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001466.

Así mismo, se contó con una beca para Estudios Doctorales No. 300611, otorgada por parte de CONACyT.



Agradecimientos

Quiero iniciar agradeciendo a Dios por indicarme el camino que debía seguir, por darme fortaleza y poner en mi camino a las personas indicadas.

A mi familia, mi mamá Socorro, mis hermanos Paty, Carlos, Vero y Miriam, les agradezco su apoyo incondicional, su comprensión, su cariño, y aunque he tenido que estar lejos de ustedes tanto tiempo, no ha sido en vano, por fin acabé otra etapa en mi formación académica.

A mi novio, Fernando, que después de tantos años sigue apoyándome, y aunque no haz estado de acuerdo conmigo en varias cosas, siempre terminaste ayudándome cuando lo necesité. Gracias también por todo el apoyo académico, moral y de suministros, fueron muy importantes para que pudiera terminar esta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Javier Barrios, pues sin su apoyo nunca habría terminado el doctorado. Gracias por su paciencia, por su tiempo, por sus consejos y por todas sus enseñanzas, aprendí muchísimo de usted. No sabe cómo le agradezco que nunca dejara de creer en mí.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco su ayuda, sus consejos, su compañía. Especialmente a Montse, Fer y Gera, me hubiese gustado haber convivido mucho más con ustedes. Quiero agradecerle especialmente a Ailed, por su apoyo en la realización de muchos experimentos, consejos y guía.

Al Dr. Armando Mejía por siempre brindarme palabras de aliento, y sus charlas tan interesantes, además de sus preguntas ingeniosas que nos llegaron a meter en apuros en algunos seminarios, pero que siempre nos hacían reflexionar. Gracias Dr. Armando.

Al Dr. Luis Enrique Gómez y a la Dra. Roxana Miranda, por siempre estar dispuestos a ayudarnos, siempre poner a nuestra disposición su laboratorio, y tenernos paciencia en los momentos difíciles.

A la Dra. Tomasini por sus consejos, al Dr. Fierro y al Dr. Paco Pepe por siempre estar dispuestos a ayudar y resolver dudas.

La UAM por darme la oportunidad de tener una educación superior y posgrados. A CONACyT por otorgarme las becas para cursar los posgrados.

El camino para lograr esta tesis fue muy difícil, pero hubiera sido imposible si no hubieran estado a mi lado. INFINITAS GRACIAS A TODOS USTEDES.

“El carácter no puede ser desarrollado en tranquilidad y quietud. Sólo a través de la experiencia, las pruebas y el sufrimiento el alma puede ser fortalecida, la ambición inspirada, y el éxito alcanzado”

Helen Keller

ÍNDICE

Índice de Figuras y Tablas	7
Abreviaciones.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Generalidades de los hongos trabajados	19
2.1.1 <i>Aspergillus terreus</i>	19
2.1.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	19
2.1.3 <i>Acremonium chrysogenum</i>	19
2.2 Metabolitos secundarios	20
2.2.1 Clasificación.....	20
2.2.2 Regulación.....	21
2.3 Lovastatina	23
2.3.1 Actividad biológica	23
2.3.2 Relevancia farmacéutica y económica	24
2.3.3 Ruta biosintética.....	24
2.3.4 Regulación.....	27
2.3.5 Producción en FS vs FL: fisiología del medio sólido.....	28
2.4 Antibióticos β-lactámicos	29
2.4.1 Actividad biológica	29
2.4.2 Relevancia farmacéutica y económica	30
2.4.3 Ruta biosintética.....	31
2.4.4 Regulación.....	36
2.6 Especies Reactivas de Oxígeno	39
2.6.1 Potencial redox, estrés oxidante y daño celular.....	42
2.6.2 Sistema de respuesta antioxidante.....	44
2.6.3 Generación de EROs en hongos	47
2.6.4 Respuestas fúngicas a las EROs.....	47
2.6.5 EROs como moléculas señalizadoras.....	48
2.6.6 MAPKs como vías de señalización de las EROs en hongos	49

2.6.6 Regulación transcripcional de genes involucrados en la maquinaria antioxidante fúngica	53
2.6.7 EROs y metabolismo secundario	66
3. JUSTIFICACIÓN	69
4. OBJETIVOS	72
4.1 General	72
4.2 Particulares	72
5. HIPÓTESIS	72
6. METODOLOGÍA	73
6.1 Microorganismos utilizados	73
6.2 Condiciones de cultivo	73
6.2.1 <i>Aspergillus terreus</i>	73
6.2.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	74
6.2.3 <i>Acremonium chrysogenum</i>	74
6.2.4 Adición de antioxidantes y oxidantes exógenos.....	75
6.3 Medios de cultivo	75
6.3.1 Medio de propagación de esporas (Power)	75
6.3.2 Producción de Lovastatina	75
6.3.3 Medio semilla para <i>P. chrysogenum</i>	76
6.3.4 Medio de producción de Penicilina G	76
6.3.5 Medio completo CCM (<i>Cephalosporium</i> Complete Medium)	76
6.3.6 Medio semilla modificado.....	77
6.3.7 Medio complejo de producción de cefalosporina C	77
6.4 Técnicas Analíticas	77
6.4.1 Determinación de la biomasa y pH	77
6.4.2 Determinación de metabolitos secundarios	77
6.4.3 Cuantificación de EROs	78
6.4.4 Ensayo Antioxidante	78
6.4.5 Extracción de RNA y Northern blot.....	79
6.5 Silenciamiento de <i>AtsrrA</i> y <i>AtmsnA</i>	80
6.5.1 Obtención de mutantes silenciadas.....	80
6.5.2 Ensayos de sensibilidad a diferentes tipos de estrés.....	80
6.5.3 Validación de mutantes silenciadas.....	81
7. RESULTADOS	82
7.1 Penicilina y cefalosporina también son regulados por EROs a nivel transcripcional	82

7.1.1 Pruebas de capacidad antioxidante en Lovastatina, Penicilina G y Cefalosporina C.....	82
7.1.2 Perfil de acumulación de EROs en cinéticas de producción de Penicilina G y Cefalosporina C.....	83
7.1.3 Efecto de la adición de antioxidantes	85
7.1.4 Efecto de EROs exógenas	86
7.1.5 Análisis transcripcional sobre la manipulación de EROs en cultivos de penicilina G y cefalosporina C.....	88
7.2 Perfil de EROs en cepas de alta y baja producción.....	89
7.2.1 <i>Aspergillus terreus</i>	90
7.2.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	91
7.2.3 <i>Acremonium chrysogenum</i>	91
7.3 SrrA y MsnA como nexos entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina.....	94
7.3.1 Obtención de mutantes silenciadas.....	94
7.3.2 Caracterización de mutantes <i>SisrrA</i> y <i>SimsnA</i>	94
7.3.3 Validación de mutantes <i>SisrrA</i> y <i>SimsnA</i>	95
7.3.5 Producción de lovastatina por las mutantes <i>SisrrA</i> y <i>SimsnA</i> : FL vs. FS	98
8. DISCUSIÓN	101
8.1 Penicilina y cefalosporina también son reguladas por EROs a nivel transcripcional...	101
8.2 SrrA y MsnA como nexos entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina.....	106
8.2.1 <i>SisrrA</i>	107
8.2.2 <i>SimsnA</i>	110
9. CONCLUSIONES	113
10. PERSPECTIVAS	114
11. REFERENCIAS	116

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. (A) Estructura base común de las estatinas naturales, basado en un sistema hexahidro-naftaleno y una β -hidroxilactona, las diferencias entre ellas están en las cadenas (R1) y grupos metilo (R2) alrededor del anillo. B) Cadena lateral metilbutírico (R1) y un grupo metilo 6- α (R2) específicos de la lovastatina (imagen modificada de Barrios-González & Miranda, 2010).....	23
Figura 2. Cluster de los genes biosintéticos de lovastatina. Los genes en azul codifican enzimas que operan en la ruta biosintética; los genes en verde codifican moléculas regulatorias; los genes en rojo codifican enzimas citocromo 450 monooxigenasas; los genes en gris oscuro codifican transportadores; los genes en gris claro codifican proteínas de resistencia y los genes en color naranja son de función desconocida (imagen modificada de Mulder et al., 2015).....	26

Figura 3. Ruta biosintética de lovastatina (imagen modificada de Barrios-González & Miranda, 2010)....	26
Figura 4. Estructura química del anillo β -lactámico, penicilinas (núcleo penam) y cefalosporinas (núcleo cefem). Diferentes penicilinas contienen distintas cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas (R). Los grupos R1 y R2 de cefalosporinas o cefamicinas se indican debajo de la estructura de cefalosporinas (imagen tomada de Martín et al., 2010).	30
Figura 5. Clusters biosintéticos de penicilina en <i>P. chrysogenum</i> (A) y cefalosporina en <i>A. chrysogenum</i> (B) (imagen modificada de Martín et al., 2010).	32
Figura 6. Ruta biosintética de penicilina G y cefalosporina C. L- α -AAA es un intermediario de la ruta biosintética de L-lisina, pero también puede proporcionarse por degradación catabólica de L-lisina. Abreviaturas: ACV, d- (L- α -aminoadipil) -L-cisteína-D-valina; DA , deacetylcefalosporina C; DAOC, deacetoxicefalosporina C; IPN, isopenicilina N; L- α -AAA, ácido L- α -aminoadípico (imagen modificada de Brakhage et al., 2004).	35
Figura 7. Mecanismos de producción de EROs. Las EROs se producen por excitación (O , O_3 , 1O_2) o por reducción (O_2^- , H_2O_2 , HO^*). Las especies en rojo son las más reactivas. El O_2 es generado por el fotosistema II (PSII) y es reducido por la citocromo oxidada de la cadena respiratoria (COX). El superóxido reacciona sólo consigo mismo, con óxido nítrico y otros radicales. El peróxido de hidrógeno reacciona con los centros de azufre de hierro y las cisteínas de ciertas proteínas. Sin embargo, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden formar espontáneamente oxígeno individual y radicales hidroxilos, que son mucho más reactivos. Se muestran las principales reacciones para el oxígeno singlete y el radical hidroxilo (Esquema tomado de Aguirre et al., 2005).	39
Figura 8. Disposición del H_2O_2 y O_2^- . El superóxido se dismuta por superóxido dismutasas (SOD). El peróxido de hidrógeno se descompone por catalasas (CAT), peroxidasas, como la glutatión peroxidasa (GPx), y por peroxirredoxinas (Prx). El tiol de una cisteína sensible en Prx se oxida a un ácido Cys-sulfénico (Prx _{ox}) y se reduce por tiorredoxina reducida (Trx _{red}). El ácido Cys-sulfénico en Prx _{ox} puede ser oxidado adicionalmente por peróxido de hidrógeno a ácido Cys-sulfínico; se reduce de nuevo a ácido Cys-sulfénico por la sulfiredoxina reducida (Srx _{red}) y ATP (Esquema tomado de Aguirre et al., 2005).....	46
Figura 9. Representación general dl mecanismo de señalización por las vías MAPK en hongos. Se incluyen todas las posibles señales detectadas y respuestas celulares a estas señales. También el sistema de transducción de señal de dos componentes (TCS), receptores acoplados a proteínas G, receptores de tirosina quinasas (RTK) y la interacción de MAPK con otras vías de señalización, por ejemplo, se representan las rutas de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA). La proteína Scaffold generalmente está presente en la ruta MAPK involucrada en el apareamiento. MAPKKK, MAP quinasa quinasa quinasa; MAPKK, MAP quinasa quinasa; MAPK, MAP quinasa; TF, factores de transcripción; HK, histidina quinasa; RR, regulador de respuesta; HPt, transmisor de fosfatos que contiene histidina (Esquema tomado de Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017)....	51
Figura 10. Vías de señalización activadas por estrés en <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> y <i>A. nidulans</i> . En <i>S. pombe</i> y <i>A. nidulans</i> , Sty1/Spc1 (HogA/SakA) se activa por el estrés ambiental, como el estrés oxidante y osmótico, e induce factores de transcripción como Atf1 (AtfA) para la expresión de genes diana. Por otro lado, la activación de Hog1 para Sko1 en <i>S. cerevisiae</i> depende del estrés osmótico. Las quinasas del sensor TcsA/TcsB/NikA transmiten señales de estrés oxidante a la cascada HogA/SakA SAPK/MAPK a través de YpdA y SskA en <i>A. nidulans</i> , mientras que la quinasa del sensor Sln1 transmite señales de estrés osmótico a la cascada Hog1 SAPK/MAPK a través de Ypd1 y Ssk1 en <i>S. cerevisiae</i> . El regulador de respuesta Skn7 también se encuentra bajo la transducción de señal Sln1-Ypd1, pero el estrés oxidante parece activar Skn7 independientemente de este sistema. Las flechas con líneas continuas indican la transducción de señales entre dos proteínas y las flechas punteadas indican la transducción de señales del estrés oxidante y/o osmótico. Las flechas gruesas alineadas indican la unión de los factores de transcripción a los promotores de genes objetivo. Los círculos alrededor de las proteínas indican factores de transcripción. La transducción de señal desconocida entre dos proteínas y factores de transcripción no identificados se muestran con signos de interrogación (Esquema tomado de Hong et al., 2013).	52
Figura 11. Modelo de activación transcripcional de genes biosintéticos de antioxidantes y aflatoxinas por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidante. El modelo propone que niveles altos de EROs intracelulares regulan negativamente la vía de señalización de cAMP-PKA. Esto promueve la unión de MsnA a sitios STRE en promotores de genes antioxidantes para su activación. Simultáneamente, EROs regula en exceso las cascadas de señalización SAPK/MAPK a través del sistema de fosforilación multipaso. La activación de la cascada SAPK/MAPK promueve la unión de AtfB y SrrA (SrrA recluta AP-1) a los correspondientes sitios CRE, SRRA y AP1 en promotores de los genes antioxidantes para su inducción. Luego, MsnA, AtfB y SrrA se unen (SrrA recluta AP-1) a los sitios STRE, CRE, SRRA y AP1	

correspondientes en promotores de genes de aflatoxinas para su activación debido a niveles excesivos de EROs. AflR ayuda a la inducción de genes biosintéticos de aflatoxinas mediante la unión a sitios AFLR en los promotores de genes de aflatoxinas. Las flechas punteadas indican la transducción de señales desde EROs y las flechas con líneas continuas indican las rutas de transducción de señales. Las flechas curvas designan la entrada de factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo y unión de los factores de transcripción a los motivos de reconocimiento correspondientes. Un signo de interrogación muestra la transducción de señal indefinida (imagen tomada de Hong et al., 2013). 54

Figura 12. Diagrama esquemático del sistema de señalización de dos componentes. (A) El sistema prototípico de dos componentes que se caracteriza por la reacción conservada de fosfotransferencia entre un residuo de histidina y un residuo de aspartato. (B) La fosforilación de múltiples pasos Sln1-Ypd1-Ssk1. SHK, sensor histidina quinasa; RR, regulador de respuesta; Dominio de histidina quinasa HK; REC, dominio del receptor; HPT, proteína de fosfotransferencia que contiene histidina; TM, segmento transmembrana; P, grupo fosforilo (diagrama tomado de Saito & Posas, 2012). 56

Figura 13. Funciones de Skn7 en *S. cerevisiae*. Se muestra esquemáticamente el flujo de fosforilación a través de la ruta Sln1. La quinasa Sln1 asociada a la membrana plasmática se autofosforila en condiciones normales de crecimiento. La hiperosmolaridad y otras condiciones que causan una reducción en la turgencia conducen a una reducción en la actividad quinasa de Sln1 y a la acumulación de su forma desfosforilada. La hiperactivación ocurre bajo condiciones que causan debilitamiento/remodelación de la pared celular (estrés de pared), fosforilando a Ypd1, y finalmente a Ssk1 y Skn7 (nuclear), respectivamente. La forma no fosforilada de Ssk1 interactúa y estimula la actividad de las MAPKKK Ssk2 y Ssk22 de la vía Hog1, mientras que la forma fosforilada de Ssk1 la deja inactiva. La fosforilación de Skn7 conduce a la activación de un subconjunto de genes dependientes. Por otro lado, la activación de genes dependientes de SKN7 que responden al estrés oxidante es independiente de la vía Sln1 y no requiere de activación por fosforilación (esquema tomado de Fassler & West, 2011). 57

Figura 14. Regulación de Msn2/4 y Hsf1 por las proteínas de control de crecimiento Snf1 y PkA y el estrés oxidante. El H₂O₂ desencadena la oxidación de las proteínas citoplasmáticas de tiorredoxina (Trx^{ox}) desde su estado normalmente reducido (Trx^{red}), esto induce el reclutamiento de Msn2 al núcleo donde puede interactuar con su sitio de unión STRE y activar los genes diana. Hsf1 es constitutivamente nuclear y se une previamente a muchos genes diana que contienen elementos de choque térmico (HSE) en sus promotores (esquema tomado de Morano et al., 2012). 62

Figura 15. Modelo propuesto de la vía de señalización de tiorredoxina. En el curso de la desintoxicación de H₂O₂ por la tiorredoxina peroxidasa Tsa1, la tiorredoxina citoplasmática Trx2 se oxida (Trx2^{ox}), y al hacerlo, desencadenan la localización nuclear de Msn2/4 y Maf1, efectores de la respuesta general al estrés. "X" es una fosfatasa desconocida, que se requiere para la desfosforilación de Msn2 / 4 y la acumulación nuclear (Esquema tomado de Boisnard et al., 2009). 64

Figura 16. Ensayos antioxidantes para lovastatina, penicilina y cefalosporina. Las EROs fueron cuantificadas en: a) en solución, con 50 mM de H₂O₂ y diferentes cantidades de metabolito secundario o de antioxidantes conocidos (0 a 30 mM). b) con micelio, en un ensayo similar, pero incluyendo el micelio correspondiente (10 mg). NAC (●), Vitamina E (Δ), Lovastatina (○), Penicilina G (●) y Cefalosporina C (○). RFU= unidades relativas de fluorescencia. 83

Figura 17. Cinética de acumulación de EROs y producción de Penicilina G por *P. chrysogenum*. 84

Figura 18. Cinética de acumulación de EROs y producción de Cefalosporina C por *A. chrysogenum*. 85

Figura 19. Efecto del NAC (panel a) y H₂O₂ (panel b) sobre la biosíntesis de penicilina G (□) y sobre el contenido intracelular de EROs (◆), en cultivos de 72 h. Cultivos con 30 y 50 mM de H₂O₂ en panel b, así como cultivos con 0, 1, 2 y 3 mM de NAC en panel a, presentaron diferencia significativa en la concentración de EROs y la producción específica de penicilina, en relación con el control, esto de acuerdo a las pruebas de ANOVA y Dunnett`s post hoc (p>0.05). 87

Figura 20. Efecto del TMTU (panel a) y H₂O₂ (panel b) sobre la biosíntesis de cefalosporina C (□) y sobre el contenido intracelular de EROs (◆), en cultivos de 72 h. En los paneles a y b, todos los cultivos mostraron diferencia significativa en la concentración de EROs y la producción específica de cefalosporina en relación con el control, esto de acuerdo con las pruebas de ANOVA y Dunnett`s post hoc (p>0.05). 88

Figura 21. Análisis transcripcional (Northern blot) de los genes *pcbAB* de *A.* y *P. chrysogenum* en cultivos líquidos de 72 h. En el panel A, se observa el efecto del antioxidante TMTU y del oxidante H₂O₂ sobre la expresión de *pcbAB* de *A. chrysogenum* en comparación con el control (sin tratamiento); en el panel B, se observa el efecto del antioxidante NAC y del oxidante H₂O₂ sobre la expresión de *pcbAB* de *P. chrysogenum* en comparación con el control. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (software de

imagen, NIH) y los valores resultantes se normalizaron con los obtenidos para la señal de rRNA. Los valores normalizados se expresan como una fracción del valor del control, al cual se le asignó un valor de uno.....	89
Figura 22. Perfil de acumulación de EROs, lovastatina, biomasa y pH en <i>Aspergillus terreus</i> en una cepa de alta producción (TUB F-514) y otra de baja producción (NIH2624). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).	90
Figura 23. Perfil de acumulación de EROs, penicilina G, biomasa y pH en <i>Penicillium chrysogenum</i> en una cepa de alta producción (WIS 14-1255) y otra de baja producción (NRRL 1951), nótese la escala de producción de penicilina G por la cepa NRRL 1951 (gráfico derecho). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).	92
Figura 24. Perfil de acumulación de EROs, β -lactámicos, biomasa y pH en <i>Acremonium chrysogenum</i> en una cepa de alta producción (C10) y otra de baja producción (WT), nótese la escala de producción de β -lactámicos por la cepa WT (gráfico derecho). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).	93
Figura 25. Crecimiento de las mutantes silenciadas <i>SisrrA</i> T3 y T6, y T4 y T25 de <i>SimsnA</i> a las 72 h. CTL se refiere al cultivo sin tratamiento, EOX es el cultivo con 2.5 mM de H ₂ O ₂ y EP corresponde al cultivo con 7 g/mL de rojo Congo.	95
Figura 26. Perfiles de expresión de los genes <i>AtsrrA</i> y <i>AtmsnA</i> en FL y FS en cepa parental. Los números 19, 24, 48, 72 y 96 indican las horas de los cultivos.	96
Figura 27. Electroforesis con la prueba de inserción para las transformantes 3 y 6 de <i>SisrrA</i> , y 4 y 25 de <i>SimsnA</i> . Los controles positivos fueron las construcciones de silenciamiento purificadas (<i>c-srrA</i> y <i>c-msnA</i>) y el vector de silenciamiento sin inserto (VSI); como control negativo sólo se usó el DNAg de la parental (P). Gel de agarosa al 1 %.	97
Figura 28. Análisis de expresión de los genes <i>AtsrrA</i> y <i>AtmsnA</i> a las 24 h en FL y FS en cepa parental y en las cepas <i>SisrrA</i> -3, <i>SisrrA</i> -6, <i>SimsnA</i> -4 y <i>SimsnA</i> -25.	98
Figura 29. Perfil de acumulación de EROs, lovastatina, biomasa y pH en cepas silenciadas de <i>A. terreus</i> . Las mutantes con el gen <i>AtsrrA</i> silenciado (<i>SisrrA</i>) se distinguen en color amarillo, mientras que las mutantes con el gen <i>AtmsnA</i> silenciado (<i>SimsnA</i>) se indican en color azul. Los controles son la parental (color negro) y la cepa VSI (color gris). El panel A corresponde a FL y el B a FS.	100
Tabla 1. Microorganismos y cepas utilizadas en este trabajo.	73
Tabla 2. Composición del medio Power, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH (Fierro et al., 1996).	75
Tabla 3. Composición del medio de producción para lovastatina IX, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH.	75
Tabla 4. Composición de la solución de Elementos Traza para el medio de producción de lovastatina.	76
Tabla 5. Composición del medio semilla para <i>P. chrysogenum</i> , se ajusta el pH a 6 con NaOH (Somerson et al., 1961).	76
Tabla 6. Composición del medio de producción de penicilina G, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH (Somerson et al., 1961).	76
Tabla 7. Composición del medio completo CCM, se ajusta el pH a 7 con NaOH (Minut et al., 1982).	76
Tabla 8. Composición del medio semilla modificado, se ajusta el pH a 7 con NaOH (Adinarayana et al., 2003).	77
Tabla 9. Composición del medio complejo de producción de cefalosporina C IX, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH (López-Calleja et al., 2012).	77
Tabla 10. Oligos utilizados para los análisis de expresión por Northern blot.	80
Tabla 11. Oligos utilizados para el análisis de integración del inserto en el vector de silenciamiento.	81
Tabla 12. Concentraciones exógenas de H ₂ O ₂ en los cultivos que muestran la producción máxima de los metabolitos, y los niveles internos de EROs.	88
Tabla 13. Comparación de producción de lovastatina y acumulación de EROs a las 72 h en FL y FS, para las mutantes silenciadas; también se reporta el porcentaje de aumento en la producción para algunas mutantes. Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).	99

Abreviaciones

AA	Aminoácidos
C	Carbono
Ceph	Cefalosporina C
EOS	Estrés osmótico
EOX	Estrés oxidante
EP	Estrés de pared
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FL	Fermentación líquida
FS	Fermentación sólida
Lov	Lovastatina
MS	Metabolitos Secundarios o Metabolismo Secundario
NAC	N-acetil-L-cisteína
Pen	Penicilina G
TMTU	1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea

RESUMEN

En un trabajo anterior sobre la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*, encontramos que la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROs) aumentó a niveles altos precisamente al inicio de la fase de producción (idiofase) y además estos niveles se mantuvieron durante toda la idiofase. Además, se demostró que las EROs regulan la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional.

La regulación por EROs también se ha reportado para aflatoxinas. Se ha sugerido que, debido a su actividad antioxidante, las aflatoxinas se regulan y sintetizan como una segunda línea de defensa contra el estrés oxidante. Para estudiar la posible regulación de EROs de otros metabolitos secundarios de importancia industrial, analizamos la relación entre EROs y la biosíntesis de penicilina G por *Penicillium chrysogenum* y la biosíntesis de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*. Inicialmente se demostró que ni la lovastatina ni la penicilina ni la cefalosporina C muestran una actividad antioxidante.

Los resultados revelaron una acumulación similar de EROs en la idiofase en las fermentaciones de penicilina y cefalosporina. Además, cuando las concentraciones intracelulares de EROs disminuyeron mediante la adición de antioxidantes a los cultivos, la producción de penicilina y cefalosporina se redujo drásticamente. Cuando se aumentaron las EROs intracelulares mediante la adición de EROs exógenas (H₂O₂) a los cultivos, se obtuvieron incrementos proporcionales en las biosíntesis de penicilina y cefalosporina. Finalmente, demostramos que este aumento y disminución en la producción inducida por la manipulación de EROs se debía a que el gen biosintético *pcbAB* se sobre expresaba o reprimía, en *A. chrysogenum* y *P. chrysogenum*. Demostrando así, que las EROs también regulan la biosíntesis de penicilina y cefalosporina a nivel transcripcional.

Además, analizamos si los niveles de EROs naturales determinaban la capacidad de producción de metabolitos secundarios en diferentes cepas de una misma especie; y encontramos que el perfil y los niveles de EROs son los mismos entre cepas de alta y baja producción, pero los niveles naturales de EROs sí varían entre especies.

Por otro lado, en el modelo de lovastatina, también se evaluó si los factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante SrrA y MsnA, jugaban un papel en la regulación de la

biosíntesis de lovastatina, inducida por la acumulación de EROs; esto se evaluó a través de silenciamientos de estos genes en *A. terreus*.

Se encontró que las mutantes silenciadas en el gen *srrA* (*SisrrA*) sólo mostraron un efecto en fermentación en medio líquido (FL), donde produjeron más lovastatina, y hubo una mayor acumulación de EROs en idiofase. Mientras que las *SimsnA*, mostraron sobreproducción en FL y fermentación sólida (FS), siendo en ésta última donde el aumento fue muy grande. Es interesante destacar que la atenuación de *msnA* no afectó los niveles de EROs.

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la regulación por EROs es un mecanismo general que controla el metabolismo secundario en hongos. En el modelo de lovastatina, *SrrA* y *MsnA* forman parte del circuito de regulación, fungiendo como reguladores negativos, y en el caso de *SrrA*, su regulación es específica de la FL.

ABSTRACT

In previous work on the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*, we found that the concentration of reactive oxygen species (ROS) increased to high levels precisely at the beginning of the production phase (idiophase) and that these levels were maintained throughout the idiophase. Furthermore, ROS were shown to regulate lovastatin biosynthesis.

Regulation by ROS has also been reported for aflatoxins. It has been suggested that, due to their antioxidant activity, aflatoxins are regulated and synthesized as a second line of defence against oxidative stress. To study the possible regulation of ROS of other secondary metabolites of industrial importance, we analysed the relationship between ROS and penicillin G biosynthesis by *Penicillium chrysogenum* and cephalosporin C biosynthesis by *Acremonium chrysogenum*.

The results revealed a similar accumulation of ROS in the idiophase in the penicillin and cephalosporin fermentations. Furthermore, when the intracellular concentrations of ROS were decreased by adding antioxidants to the cultures, the production of penicillin and cephalosporin was drastically reduced. When intracellular ROS were increased by adding exogenous ROS (H₂O₂) to the cultures, proportional increases in penicillin and cephalosporin biosynthesis were obtained. Finally, we demonstrate that this increase and decrease in the production induced by the manipulation of ROS was due to the biosynthetic gene *pcbAB* being over-expressed or repressed, in *A. chrysogenum* and *P. chrysogenum*. Thus, demonstrating that ROS regulate penicillin and cephalosporin biosynthesis at the transcriptional level.

Furthermore, we analysed whether the levels of natural ROS determined the production capacity of secondary metabolites in different strains of the same species; and we found that the profile and levels of ROS are the same between high and low production strains, but the natural levels of ROS do vary between species.

On the other hand, in the lovastatin model, it was also evaluated whether the transcription factors of oxidative-stress response SrrA and MsnA played a role in the regulation of lovastatin biosynthesis, induced by the accumulation of ROS; this was evaluated through silencing of these genes in *A. terreus*.

The *SisrrA* mutants were found to have an effect only in submerged fermentation (SmF), where they produced more lovastatin, and there was a greater accumulation of ROS in idiophase. While the *SimsnA*, showed overproduction in SmF and SSF (Solid-State Fermentation), being in the latter where the increase was very large; however, the attenuation of *msnA* did not affect ROS levels.

Our results provide evidence that regulation by ROS is a general mechanism that controls secondary metabolism in fungi. And, in the lovastatin model, SrrA and MsnA are part of the regulatory circuit, acting as negative regulators, and in the case of SrrA, their regulation is specific to SmF.

1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios (MS) microbianos tienen estructuras químicas muy diversas que muestran una enorme gama de actividades biológicas, por lo que adquieren importancia industrial real o potencial en diferentes campos industriales. Los ejemplos son antibióticos, medicamentos que reducen el colesterol en la sangre y compuestos antitumorales o anticancerígenos. Por otro lado, algunos metabolitos secundarios tienen actividades no deseadas, como las micotoxinas, algunas de las cuales son carcinógenos muy potentes (Barrios-González, 2018; Keller et al., 2005).

Generalmente, los MS se producen después de la fase de crecimiento rápido (trofofase), durante una etapa de producción posterior o idiofase. El metabolismo secundario comienza cuando el crecimiento está limitado por el agotamiento de un nutriente clave: fuente de carbono (glucosa), nitrógeno o fosfato, iniciando una etapa con una tasa de crecimiento baja o nula, pero alta tasa de producción (Barrios-Gonzalez et al., 2003). Los genes de las enzimas biosintéticas se rigen por mecanismos reguladores complejos, tales como: inducción por diferentes estímulos nutricionales, regulación del catabolito de carbono y regulación por retroalimentación (Brakhage, 1998; Brakhage et al., 2009).

La lovastatina es producida industrialmente por *Aspergillus terreus* y es un metabolito secundario comercialmente importante, ya que reduce el colesterol en la sangre, al igual que su derivado semisintético simvastatina (Barrios-González & Miranda, 2010; Endo, 1992; Endo, 2004). Forman parte del grupo de medicamentos para reducir el colesterol llamados estatinas. El hecho de que las enfermedades cardiovasculares estén relacionadas con altos niveles de colesterol en plasma y que sean la principal causa de muerte, explica el gran éxito de la lovastatina, la simvastatina y otras estatinas en el campo médico y comercial (Barrios-González & Miranda, 2010).

Por otro lado, las penicilinas y las cefalosporinas son los metabolitos secundarios con actividad antibiótica más importantes, tanto en valor como en cantidad producida, debido a su alta eficiencia, baja toxicidad y una amplia variedad de formas de convertirlos en derivados lactámicos semisintéticos. Se calcula que del consumo mundial total de antibióticos, las penicilinas y cefalosporinas ocupan alrededor del 30% de un mercado global

de antibióticos que se valoró en 45.31 billones de dólares en 2018 (Grand View Research, 2019).

Aunque se sabe que la biosíntesis de MS está regulada por estímulos nutricionales, recientemente se han descubierto otros estímulos ambientales que inducen el metabolismo secundario. Se está acumulando evidencia de que, a bajas concentraciones, las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) también proporcionan funciones de señalización vitales para diversos procesos celulares (Veal et al., 2007). En los últimos años, muchos autores han encontrado evidencia de una estrecha asociación entre EROs y el desarrollo y la diferenciación en hongos; por ejemplo, también se han detectado niveles elevados de EROs durante la diferenciación celular *en A. nidulans* (Aguirre et al., 2005, 2006).

Algo similar se ha reportado para la producción de aflatoxinas, y esto se ha convertido en un modelo y se ha estudiado con cierta profundidad. Sin embargo, los investigadores en ese campo consideran que dado que las aflatoxinas tienen actividad antioxidante, es lógico que la biosíntesis de este compuesto (metabolitos secundarios con actividad antioxidante) esté regulada por EROs y que debido a esto, su producción es parte del sistema de defensa general contra el estrés oxidante. Además, sugieren, que factores de respuesta a estrés oxidante (Yap1, SrrA, MsnA, AtfA y AtfB, entre otros) activan genes de enzimas antioxidante, pero también, genes del metabolismo secundario en hongos filamentosos (Fountain et al., 2016; Hong et al., 2013; Kenne et al., 2018; Reverberi et al., 2010; Roze et al., 2013).

Recientemente, nuestro grupo mostró un vínculo entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina en fermentación líquida (FL) y en fermentación sólida (FS). Se demostró que el gen *sod1* (enzima de defensa del estrés oxidativo) se expresó intensamente durante la fase de crecimiento rápido (o trofofase), pero paradójicamente, se redujo drásticamente en la fase de producción o idiofase, donde la concentración de EROs aumentó rápidamente a niveles altos que se mantuvieron durante fase de producción de lovastatina (Miranda et al., 2013). En un trabajo posterior, demostramos que tipo de EROs regulaba positivamente la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional, y encontramos evidencia de que los factores transcripcionales SrrA, MsnA, AtfA y AtfB pudieran participar en la regulación de los genes biosintéticos de lovastatina (Miranda et al., 2014).

Por lo tanto, hemos propuesto que EROs regula todos o la mayoría de los MS, con o sin propiedades antioxidantes. En el presente trabajo, probamos esta hipótesis, estudiando los hongos de importancia industrial *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum*, y la posible participación de EROs en la regulación de las biosíntesis de penicilina y cefalosporina. Además, estudiamos el papel que juegan los factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidante, SrrA y MsnA, sobre la regulación de lovastatina en *Aspergillus terreus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los hongos trabajados

2.1.1 *Aspergillus terreus*

Es un hongo ascomiceto filamentoso y saprófito que se encuentra comúnmente en el suelo de climas cálidos. Fue usado industrialmente para producir lovastatina (medicamento para reducir el colesterol en sangre), y también se usa comúnmente en la industria para producir ácidos orgánicos importantes, como el ácido itacónico (monómero) y el ácido cis-aconítico, y enzimas como la xilanasa. También produce ácido asterrico y 6-hidroximelleína (inhibidores del desarrollo del polen en *Arabidopsis thaliana*). Además, este hongo puede producir las toxinas patulina y citrinina, entre otros muchos metabolitos secundarios con diversas funciones (Broad Institute, 2006; EnsemblFungi, 2020).

A. terreus puede causar infecciones oportunistas (aspergilosis) en personas con sistemas inmunes deficientes; de las especies de *Aspergillus* patógenas más comunes, ocupa el tercer lugar. La aspergilosis invasiva causada por *A. terreus* tiene una mortalidad mucho más alta que cualquier otra especie (Birren et al., 2004).

2.1.2 *Penicillium chrysogenum*

Es un hongo asexual filamentoso que se encuentra en regiones templadas y subtropicales. Es reconocido como una fuente de varios antibióticos betalactámicos importantes. Se ha utilizado durante más de 60 años para la producción industrial de penicilina, un antibiótico comúnmente utilizado para tratar infecciones bacterianas. Actualmente es la principal fuente comercial de penicilina V y penicilina G (MycoCosms, 2020; UniProt, 2020).

2.1.3 *Acremonium chrysogenum*

Anteriormente llamado *Cephalosporium acremonium*, es un hongo filamentoso y productor industrial del antibiótico β -lactámico cefalosporina C muy relevante en industria farmacéutica. Fue aislado del agua de mar cerca de un área de desagüe de aguas residuales en Cagliari (Cerdeña, Italia) en 1945 por Giuseppe Brotzu (Brotzu, 1948), y se encontró que produce, entre otros antibióticos, un compuesto β -lactámico designado como cefalosporina C, que es estructuralmente relacionado con la penicilina (Pöggeler et al., 2008).

2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos de estructura química muy variada y sofisticada; son producidos principalmente por microorganismos en la fase tardía de crecimiento. Estos compuestos no son esenciales para su crecimiento, en contraste con los metabolitos primarios (como son aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos) (Barrios-Gonzalez et al., 2003).

En las últimas décadas ha habido un rápido descubrimiento de nuevas actividades de los MS y desarrollo de los principales compuestos, con uso en diferentes campos industriales, especialmente farmacéuticos y cosméticos. Además, se están utilizando nuevos metabolitos microbianos en campos no médicos, como la agricultura (herbicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento en plantas y pesticidas ecológicos), así como otros productos industriales como pigmentos y tensoactivos (Javier Barrios-González, 2018).

2.2.1 Clasificación

La clasificación se basa en el precursor del metabolismo primario y del cual se deriva la biosíntesis del MS (Barrios-Gonzalez et al., 2003; Keller et al., 2005):

- a) MS derivados de aminoácidos: aquí están incluidos los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas), así como los péptidos cíclicos como la gramicidina o el agente inmunosupresor ciclosporina. Son formados por enzimas multidominio llamadas péptido sintetasa no ribosomales (NRPSs).
- b) MS derivados de aminoácidos aromáticos (ácido shikimico): como son los alcaloides ergot (vasoconstrictor) y los antibióticos candicidina y cloranfenicol. En sus rutas biosintéticas también están presentes enzimas NRPSs, entre otras.
- c) MS derivados de Acetil-CoA (y compuestos relacionados, como los intermediarios del ciclo de Krebs): aquí se dividen en policétidos y terpenos. Ejemplos del primer grupo son el antibiótico eritromicina y el anticolesterolémico lovastatina; del segundo grupo es el agente antitumoral taxol. Los policétidos son sintetizados por policétido sintasa tipo I (PKSs), las cuales son proteínas multidominio; condensan cadenas cortas de aminoácidos (usualmente Acetil-CoA y malonil CoA) para formar cadenas de carbono de longitud variada. Los terpenos están compuestos por muchas unidades de isopreno, que pueden ser lineales o cíclicas, saturadas o insaturadas, y que pueden

ser modificadas en diferentes formas; la enzima característica de este grupo es la terpeno ciclasa.

d) MS derivados de azúcares: como lo son los antibióticos estreptomicina y kanamicina.

2.2.2 Regulación

Se sabe la producción de MS inicia cuando el crecimiento se ve limitado por el agotamiento de un nutriente clave: carbono, nitrógeno o fosfato; pero hay otros estímulos ambientales que inducen la síntesis de MS, como son la luz, pH y el estado redox (más adelante se explicará a profundidad). Además, se ha encontrado que pequeñas moléculas, que permiten la comunicación inter especies, pueden inducir el MS (Javier Barrios-González, 2018).

Los mecanismos clásicos de regulación del metabolismo primario son los mismos para el MS: inducción (proceso por el cual ciertas moléculas inducen la biosíntesis del MS), la represión catabólica por carbono (es cuando una fuente de carbono ejerce un efecto negativo en la síntesis del MS), regulación por nitrógeno, regulación por fosfato y retroalimentación (proceso por el cual un MS regula su propia biosíntesis, generalmente, a través de un metabolito primario) (Barrios-González, 2018; Barrios-González & Mejía, 2008).

La regulación por nitrógeno se refiere a que ciertos tipos de compuestos de nitrógeno (principalmente amonio) ejercen un efecto negativo sobre la biosíntesis de los MS; generalmente se evita limitando la concentración de la fuente represiva de nitrógeno en el medio de fermentación, o bien, utilizando un aminoácido de asimilación lenta o fuentes complejas de nitrógeno orgánico. La regulación por fosfato se refiere a que algunos MS son regulados negativamente por fosfato, en consecuencia, la producción de estos compuestos ocurre sólo bajo condiciones nutricionales de limitación de fosfato (Barrios-González, 2018; Sanchez & Demain, 2002).

Los hallazgos recientes han dado una visión más complicada, donde los mecanismos clásicos son parte de redes reguladoras complejas con diferentes niveles jerárquicos de regulación. Por lo tanto, estos mecanismos reguladores están mediados por vías de transducción de señales que generalmente activan factores de transcripción. Estos mecanismo de regulación incluyen la regulación epigenética, los reguladores globales y los reguladores específicos de la ruta (Barrios-González, 2018).

Los genes de las rutas biosintéticas de los MS están agrupados en el genoma de hongos y actinomicetos. Estos grupos (clusters) contienen genes para la enzima biosintética principal (que cataliza la estructura principal del esqueleto), que son enzimas grandes, multidominio y multimodulares tales como policétido sintasas y péptido sintasas no ribosomales. Además, los grupos codifican oxidasas, hidrolasas y transportadores, y pueden incluir genes de resistencia (contra su propio metabolito). Curiosamente, estos clusters generalmente incluyen genes reguladores específicos de la ruta, representados en hongos por un factor de transcripción específico del grupo (Barrios-González, 2018).

La regulación global se logra mediante factores de transcripción de acción global, que son importantes para integrar las respuestas celulares a parámetros ambientales como las fuentes de carbono y nitrógeno, la temperatura, pH, etc., por lo tanto, también actúan sobre el metabolismo primario; por ejemplo, factores de transcripción globales que media la señal ambiental del carbono es CreA, del nitrógeno es AreA y del pH es PacC (Barrios-González, 2018; Brakhage, 2013; Keller et al., 2005).

La regulación epigenética representa un nivel jerárquico superior y es una regulación basada en cromatina de los clusters de genes del MS. En los eucariotas, los cromosomas están formados por cromatina que está compuesta de DNA envuelto alrededor de un octámero de histonas. La mayor parte de la cromatina existe en una forma condensada, transcripcionalmente silenciada llamada heterocromatina. Cuando la cromatina se transforma en eucromatina (forma menos condensada), los genes están disponibles y se transcriben activamente (Strauss & Reyes-Dominguez, 2011).

Estos cambios son provocados por modificaciones químicas en las histonas finamente coordinadas (metilación y más a menudo acetilación), y del DNA (desmetilación) con marcadores epigenéticos. La proteína nuclear LaeA es un regulador maestro del metabolismo secundario en *Aspergillus* y otros hongos, controla varios grupos de genes del MS y se cree que actúa a través de la remodelación de la cromatina (debido a la similitud de la secuencia de LaeA con las metiltransferasas involucradas en la modificación de histonas, entre otros hallazgos) (Bayram et al., 2008; Keller et al., 2006).

2.3 Lovastatina

2.3.1 Actividad biológica

La lovastatina (también conocida como mevilonina) es un metabolito secundario producido principalmente por *Monascus ruber* y *Aspergillus terreus* (hongo que se utilizó para su producción industrial); pertenece a un grupo de fármacos llamado estatinas, las cuales son inhibidores competitivos de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (mevalonato: NADP1 oxidoreductasa, EC 1.1.1.34), esta enzima cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato durante la síntesis de colesterol. Cuando el anillo de lactona de lovastatina está en su forma abierta, como lo estaría en el hígado humano, la estructura tiene una fuerte similitud con HMG-CoA, por lo que reducen los niveles de colesterol en suero al bloquear la biosíntesis de colesterol (Seenivasan et al., 2008).

Las estatinas se pueden dividir en estatinas naturales con sus derivados semisintéticos y estatinas de origen sintético. Las estatinas naturales, poseen una estructura base común, un sistema hexahidro-naftaleno y una β -hidroxilactona, las diferencias entre ellas están en las cadenas (R1) y grupos metilo (R2) alrededor del anillo, por ejemplo, la lovastatina contiene una cadena lateral metilbutírica (R1) y un grupo metilo 6- α (R2) (Figura 1). Las estructuras de las estatinas sintéticas son diferentes, lo único común que conservan es el anillo tipo HMG CoA, responsable de la inhibición de la HMG CoA reductasa (Javier Barrios-González & Miranda, 2010).

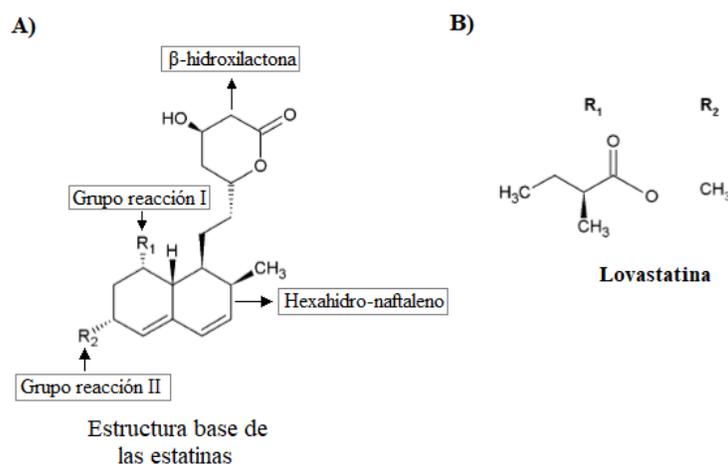


Figura 1. (A) Estructura base común de las estatinas naturales, basado en un sistema hexahidro-naftaleno y una β -hidroxilactona, las diferencias entre ellas están en las cadenas (R1) y grupos metilo (R2) alrededor del anillo. (B) Cadena lateral metilbutírico (R1) y un grupo metilo 6- α (R2) específicos de la lovastatina (imagen modificada de Barrios-González & Miranda, 2010).

2.3.2 Relevancia farmacéutica y económica

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calculó que en 2015 murieron por esta causa 17,7 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2015). Estas enfermedades están relacionadas con altos niveles de colesterol en plasma (hipercolesterolemia), que es el factor de riesgo primario de aterosclerosis y enfermedad de la arteria coronaria (Sanz & Fayad, 2008).

Por esta razón, el control del colesterol mediante la inhibición de su biosíntesis ha sido una estrategia importante, y de aquí que las estatinas han tenido una extraordinaria importancia médica y económica. El éxito de las estatinas se refleja en su inmenso potencial de mercado con una venta promedio de \$20 mil millones de dólares (Mulder et al., 2015). Tan sólo en el año 2010, se reportó que la estatina atorvastatina ocupó el primer lugar en ventas en Estados Unidos, generando 7.2 billones de dólares (Forbes, 2011).

Se ha demostrado que la terapia con estatinas tiene efectos biológicos (además de la disminución del colesterol en plasma), representando una posible aplicación en enfermedades como el cáncer, osteoporosis, Alzheimer, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y el mal de Parkinson (Barrios-González & Miranda, 2010). También se demostró que el pretratamiento con estatinas atenúa la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina (terapia contra el cáncer) a través de efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Riad et al., 2009).

2.3.3 Ruta biosintética

La ruta biosintética de lovastatina deriva de acetil-coA. Los genes biosintéticos están organizados en un cluster de 64 kb, formado por 18 genes (Figura 2) (Kennedy et al., 1999).

El primer paso comienza con la síntesis de dihidromonacolina L a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y S-adenosilmetionina por LovB y LovC (Kennedy et al., 1999; Ma et al., 2009). LovB es una proteína multidominio lovastatina nonacetido sintasa (LNKS), ejerce más de una función catalítica, contiene siete sitios activos (en orden: KS = cetosintasa; MAT = malonil-CoA: aciltransferasa ACP; DH = deshidratasa; MT = metiltransferasa; KR = ketoreductasa; ACP = proteína portadora de acilo; CON = dominio de condensación) y un

dominio inactivo (ER = enoil reductasa), debido a esto, se requiere una enzima ER, la cual es LovC (Kennedy et al., 1999; Ma & Tang, 2007). LovC es una enol reductasa que reduce específicamente tres de los ocho posibles intermediarios de policétidos durante el primer paso de la biosíntesis de lovastatina (Auclair et al., 2001). Juntos, LovB y LovC, catalizan alrededor de 35 reacciones para formar dihidromonacolina L (Figura 3) (Ma et al., 2009).

Por otro lado, LovF incorpora 2 moléculas de acetato para formar el policétido 2-metilbutiril coA. LovF es conocida como lovastatina dicétido sintasa (LKS), que tiene siete dominios catalíticos (en orden: KS, MAT, DH, MT, ER, KR y ACP) (Kennedy et al., 1999).

El segundo y tercer paso en la ruta biosintética de la lovastatina se llevan a cabo mediante una enzima única. LovA es una monooxigenasa del citocromo P450, cataliza la conversión del ácido dihidromonacolina L en ácido monacolina L y ácido monacolina J (Barriuso et al., 2011; Kennedy et al., 1999).

Finalmente, una transferasa codificada por LovD conecta la monacolina J y 2 metilbutiril-CoA (formada anteriormente por LovF) para producir la forma ácida de lovastatina (Figura 3) (Hendrickson et al., 1999; Xie et al., 2006).

LovE y LovH son factores de transcripción, contienen secuencias que codifican motivos de dedos de zinc de unión al DNA. Su manipulación se ha relacionado con el aumento o la disminución de la producción de lovastatina (Kennedy et al., 1999). Nuestro grupo de trabajo descubrió que la mayor producción de lovastatina en FS está relacionada con una transcripción más intensa de *lovE* y *lovF*, lo que respalda la participación de LovE en la biosíntesis de lovastatina (Barrios-González & Mejía, 2008).

LovG es una esterasa multifuncional (inicialmente asignada como ORF5), participa en la liberación del producto correcto (ácido dihidromonacolina L) de LovB y desempeña un papel en la eliminación de intermediarios aberrantes de LovB (Xu et al., 2013).

El resto de los genes del *cluster* son ORF1 y ORF10 codifican genes de resistencia; ORF2 y ORF17 codifican citocromo 450 monooxigenasas; ORF14 y ORF16 codifican genes transportadores; aún se desconoce la función de ORF8, ORF12, ORF15 y ORF18 (Kennedy et al., 1999).

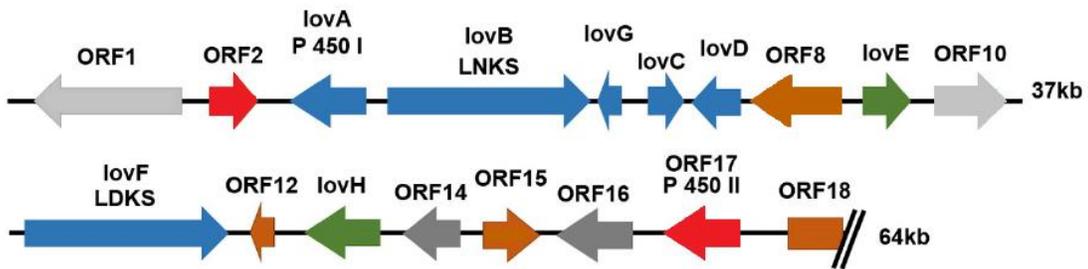


Figura 2. Cluster de los genes biosintéticos de lovastatina. Los genes en azul codifican enzimas que operan en la ruta biosintética; los genes en verde codifican moléculas regulatorias; los genes en rojo codifican enzimas citocromo 450 monooxigenasas; los genes en gris oscuro codifican transportadores; los genes en gris claro codifican proteínas de resistencia y los genes en color naranja son de función desconocida (imagen modificada de Mulder et al., 2015).

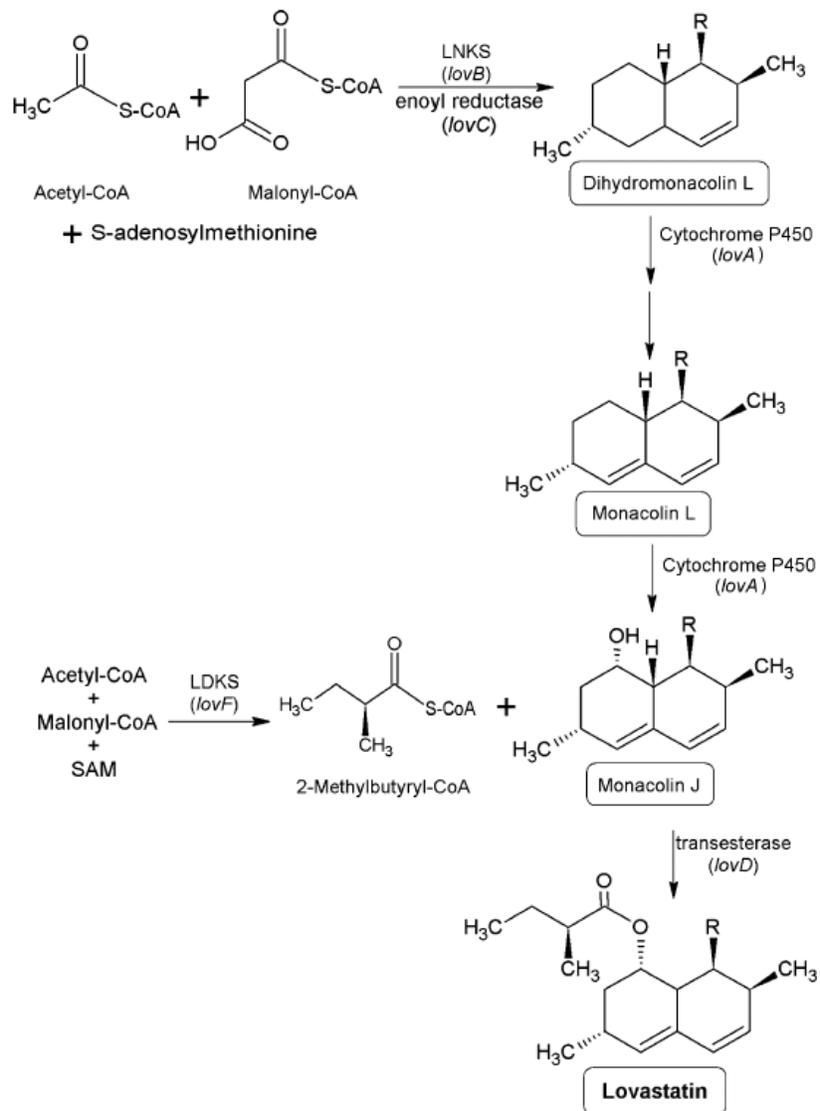


Figura 3. Ruta biosintética de lovastatina (imagen modificada de Barrios-González & Miranda, 2010).

2.3.4 Regulación

La lovastatina es regulada por represión catabólica de carbono, pues se ha demostrado que altos niveles de glucosa reducen la producción de lovastatina, mientras que la lactosa (fuente de carbono de consumo lento) aumenta la producción, también se demostró que la lactosa sólo es consumida hasta que la glucosa se agota, y esto coincide con el inicio de producción de lovastatina (idiofase). Algunos estudios sugieren que la biosíntesis de lovastatina también es regulada por nitrógeno, probando únicamente que las sales de amonio afectan su producción, por lo que el uso de fuentes de nitrógeno orgánicas (como harina de soya) mostraron altos rendimientos (Hajjaj et al., 2001; Lai et al., 2003).

La retroalimentación es otro mecanismo de regulación en la biosíntesis de lovastatina, pues demostraron que la adición de este metabolito a la fermentación resultó en un decremento en la producción final (Casas López et al., 2004; Jia et al., 2010).

En cuanto a la regulación a nivel molecular, se demostró que la biosíntesis de lovastatina también está regulada a nivel epigenético, pues al interrumpir el gen *laeA* en *A. terreus*, que codifica un regulador global clave de la biosíntesis de metabolitos secundarios que interactúa con otros componentes del complejo Velvet (VelA, VelB, VelC, VosA), bloqueó la expresión de los genes biosintéticos del cluster; por otro lado, al sobreexpresar esta proteína nuclear disparó la transcripción de los genes de biosíntesis y, como consecuencia, la producción de lovastatina (Bok & Keller, 2004).

“Quorum sensing” es un fenómeno de comunicación microbiana y regulación de genes; está mediado por pequeñas moléculas difusibles que se producen a lo largo del crecimiento microbiano, reflejando así la densidad celular de la población. A medida que la densidad celular alcanza un valor umbral, el autoinductor acumulado desencadena la respuesta “quorum sensing”, permitiendo que la población microbiana actúe de manera coordinada y se adapte a las condiciones ambientales (Palonen et al., 2014). Poliaminas (DAP 1,3-diaminopropano y espermidina), oxilipinas, butirolactona I y II son moléculas de “Quorum sensing” que se encontraron en cultivos de *A. terreus*, y, además, se demostró que están regulando la biosíntesis de lovastatina. En el caso de las poliaminas, se cree que la regulación es a través de *LaeA*, pues al añadirlas a los cultivos no sólo resultó en un aumento en la

expresión de los genes biosintéticos de lovastatina, sino también de *laeA* (Raina et al., 2012; Sorrentino et al., 2010; Zhgun et al., 2019).

La regulación de la lovastatina por las Especies Reactivas de Oxígeno ha sido uno de los más notables descubrimientos que ha hecho nuestro grupo de trabajo. El descubrimiento inició buscando los estímulos ambientales específicos para FS (que inducen una mayor producción de Lov), y se identificó el contacto directo con el aire como un estímulo importante del medio sólido (Ávila et al., 2017); al evaluar si esto fue mediado por EROs, descubrimos que, en la fermentación de Lov con *Aspergillus terreus*, hubo una repentina acumulación de EROs, precisamente cuando comenzó la idiofase. Esta concentración de EROs relativamente alta continuó durante toda la fase de producción; además, este aumento coincidió con la activación de los genes biosintéticos de Lov, incluido el factor de transcripción específico *lovE*. Esto sucedió en FS y también en FL (Miranda et al., 2013). Sorprendentemente, cuando comenzó la idiofase y comenzó la acumulación de EROs, la expresión del gen *sod1* (una defensa de estrés oxidante) se redujo y se mantuvo así durante el resto de la idiofase.

En un trabajo posterior demostramos que las EROs no sólo eran necesarias para la producción de lovastatina, sino que de hecho regulaban positivamente su biosíntesis a nivel transcripcional. También se demostró que el gen *yap1* (*Atyap1*), uno de los principales reguladores de la respuesta antioxidante en los hongos, se expresó mucho durante la trofofase, pero se redujo durante la idiofase, lo que sugiere que no sólo Yap1 regula a *sod1* sino que, de alguna manera, ambos fueron regulados negativamente para contribuir a la acumulación de EROs en la fase de producción (Miranda et al., 2014).

2.3.5 Producción en FS vs FL: fisiología del medio sólido

La fermentación en medio sólido (FS) se define como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida y en ausencia de agua libre; es un método de cultivo alternativo que presenta muchas ventajas sobre el cultivo tradicional (FL), como lo son los altos rendimientos de productos de valor comercial, además, ciertas enzimas y MS solamente pueden ser producidos mediante FS, y a esto se le ha denominado “fisiología especial del medio sólido” (Barrios-González et al., 2008).

En nuestro grupo de trabajo se desarrolló un sistema de FS utilizando un soporte inerte, y se alcanzó producciones de lovastatina 30 veces mayores con respecto a la FL (Baños et al., 2009).

Con objeto de entender los mecanismos o eventos responsables de estas diferencias en el nivel de producción, se realizaron estudios a nivel molecular. Los resultados mostraron que la alta producción de lovastatina en FS está relacionada a una mayor intensidad en la transcripción del gen regulador *lovE* y los genes biosintéticos (Barrios-González et al., 2008).

Estos estudios indicaron que existen ciertos estímulos ambientales que hacen notar al hongo que se encuentra en medio sólido. Estos estímulos deben ser detectados y entonces transducidos, disparando un número de eventos a nivel molecular. Además, se han identificado algunos estímulos ambientales en cultivo sólido (señales) (Barrios-González, 2012) que pueden ser detectadas por el micelio en FS, entre los estímulos más importantes se encuentran el contacto directo con el aire y el estímulo del soporte (Ávila et al., 2017).

2.4 Antibióticos β -lactámicos

2.4.1 Actividad biológica

Las penicilinas y las cefalosporinas pertenecen químicamente al grupo de antibióticos β -lactámicos. Estos compuestos β -lactámicos, como muchos otros metabolitos secundarios, tienen estructuras químicas inusuales; todos se caracterizan por tener un anillo β -lactámico de cuatro miembros cerrado por un enlace amida (Figura 4) (Brakhage et al., 2004).

Las penicilinas contienen un núcleo bicíclico "penam" formado por anillos fusionados de β -lactámico y tiazolidina, además de una cadena lateral de acilo unida al grupo amino en C-6. Son producidos principalmente por algunas especies de *Penicillium* y *Aspergillus*. Por otro lado, la cefalosporina C es producida principalmente por los hongos *Acremonium chrysogenum*, *Paecilomyces persicinus* y *Kallichroma tethys*. Contiene un núcleo "cephem" (un anillo de dihidrotiazina de seis miembros fusionado al anillo β -lactámico) (Figura 4), además de una cadena lateral D-a-aminoadipilo unida al grupo amino C-7, que es idéntica a la de la penicilina N hidrófila, pero difiere de las penicilinas hidrófobas (Martín et al., 2010).

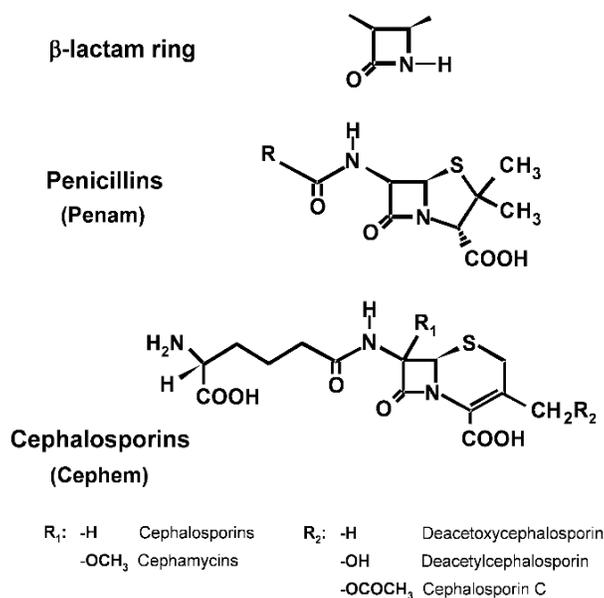


Figura 4. Estructura química del anillo β-lactámico, penicilinas (núcleo penam) y cefalosporinas (núcleo cefem). Diferentes penicilinas contienen distintas cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas (R). Los grupos R1 y R2 de cefalosporinas o cefamicinas se indican debajo de la estructura de cefalosporinas (imagen tomada de Martín et al., 2010).

El mecanismo de acción de los antibióticos β-lactámicos se basa en la inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias. La pared celular se forma cuando los monómeros de peptidoglucano (PG) se polimerizan en largas cadenas a través de enlaces glucosídicos. La síntesis de PG es catalizada por proteínas de unión a penicilina (PBP) que presentan actividad glucosiltransferasa y transpeptidasa, para polimerizar y reticular cadenas de PG. El PG lineal se sintetiza una unidad a la vez, y finaliza en el carboxil terminal de la cadena pentapéptida con acil-D-ala-D-ala. La penicilina es un análogo estructural de acyl-D-ala-D-ala, y debido a esta similitud estructural, se une preferentemente en el sitio activo de la transpeptidasa PG que cataliza el paso final de la reacción de reticulación (Canzani & Aldeek, 2017).

2.4.2 Relevancia farmacéutica y económica

El descubrimiento de antibióticos es quizás el descubrimiento más importante en la historia de la medicina terapéutica. La penicilina, el primer antibiótico de amplio espectro, es el metabolito secundario fúngico más famoso; transformó la práctica de la medicina, cambió la trayectoria de la investigación farmacéutica, influyó en el curso de la Segunda Guerra Mundial y salvó innumerables vidas.

La terapia antibiótica moderna comenzó con el descubrimiento de un antibiótico β -lactámico en 1929, cuando Alexander Fleming publicó su observación sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en una placa de agar contaminada con *Penicillium notatum* (Fleming, 1929). Este descubrimiento condujo al desarrollo de la penicilina β -lactámica, el primer antibiótico utilizado clínicamente.

A finales de la década de 1940, el hongo *Cephalosporium acremonium* (rebautizado como *Acremonium chrysogenum*) fue aislado del mar en Cagliari (Italia) por Guiseppi Brotzu (Brotzu, 1948). El descubrimiento de la cefalosporina C generó un grupo completamente nuevo de β -lactámicos clínicamente significativos.

El éxito de los β -lactámicos en el tratamiento de enfermedades infecciosas se debe a su alta especificidad y su baja toxicidad. A pesar de un número creciente de antibióticos y la incidencia de aislamientos resistentes a la penicilina, los β -lactámicos siguen siendo de los antibióticos más utilizados (Elander, 2003); se calcula que del consumo mundial total de antibióticos, las penicilinas y cefalosporinas ocupan alrededor del 30%, de un mercado global de antibióticos que se valoró en 45.31 billones de dólares en 2018 (Grand View Research, 2019).

2.4.3 Ruta biosintética

El cluster con los genes de biosíntesis de penicilina G en *P. chrysogenum* está constituido por los genes *pcbAB* (penicillin cephalosporin biosynthesis), *pcbC* y *penDE*, todos ellos formando un sólo cluster dentro del cromosoma I. Para la biosíntesis de cefalosporina C en *A. chrysogenum* corresponden dos clusters, el primero que es conocido como “cluster temprano” (ubicado en el cromosoma VII) contiene los genes *pcbAB* y *pcbC* (igual que para penicilina), *cefD1*, *cefD2*, *cefT*, *cefM* y *ORF3*; el segundo cluster que es conocido como “cluster tardío” se encuentra en el cromosoma I, y está formado por los genes *cefEF* y *cefG* (Figura 5) (Martín et al., 2010).

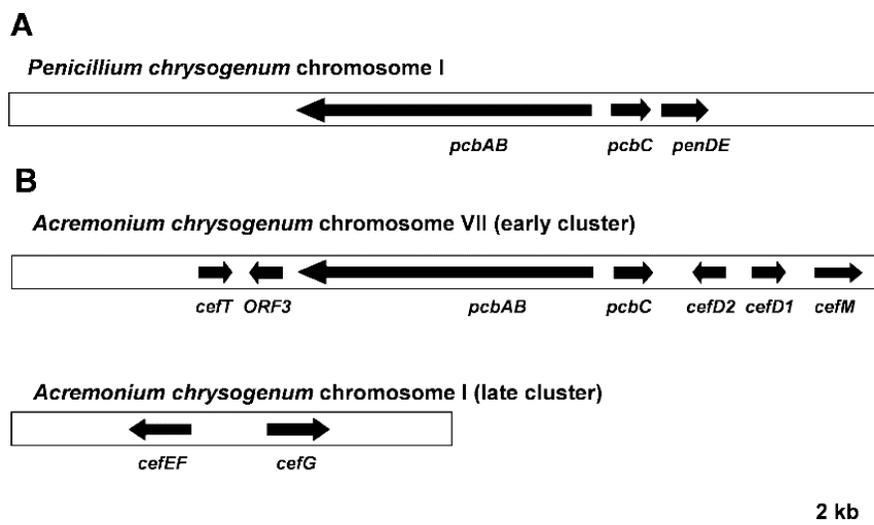


Figura 5. Clusters biosintéticos de penicilina en *P. chrysogenum* (A) y cefalosporina en *A. chrysogenum* (B) (imagen modificada de Martín et al., 2010).

Todas las penicilinas y cefalosporinas naturales producidas por microorganismos eucariotas o procariotas se sintetizan a partir de los mismos tres aminoácidos, ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), L-cisteína y L-valina, por lo que, tienen en común los dos primeros pasos de la ruta biosintética. En los hongos, el aminoácido no proteinógeno L- α -AAA se deriva de la vía del aminoadipato (específica de hongos) que conduce a la formación de L-lisina. También puede proporcionarse mediante la degradación catabólica de lisina (Brakhage et al., 2004).

2.4.3.1 Penicilina G

En la primera reacción de la vía de biosíntesis de cefalosporina y penicilina, los aminoácidos precursores se condensan en el tripéptido L- δ - (L- α -aminoadipil)-L-cisteína-D-valina (ACV). Esta reacción es catalizada por una sola enzima, δ - (L- α -aminoadipil) -L-cisteína-D-valina sintetasa (ACVS) codificada por el gen *pcbAB* (también denominado *acvA*), esta reacción la lleva a cabo con ayuda de ATP (Figura 6).

En el segundo paso, el cierre oxidante del anillo del tripéptido lineal conduce a la formación de un anillo bicíclico (el anillo β -lactámico) de cuatro miembros fusionado con el anillo de tiazolidina de cinco miembros que es característico de todas las penicilinas. El compuesto resultante es isopenicilina N (IPN) que posee una actividad antibiótica débil y, por lo tanto, es el primer intermediario bioactivo de las vías de penicilina y cefalosporina. Esta reacción es catalizada por la isopenicilina N sintasa (IPNS) (codificada por el gen *ipnA* en *A. nidulans* y *pcbC* en *P. chrysogenum*), y la cual requieren Fe^{2+} , oxígeno molecular y ascorbato para

catalizar la reacción. IPN es el punto de ramificación de las biosíntesis de penicilina y cefalosporina.

En el tercer y último paso de la biosíntesis de penicilina G, la cadena lateral hidrofílica L- α -AAA de IPN se intercambia por un grupo acilo hidrófobo catalizado por la acil coenzima A: isopenicilina N aciltransferasa (IAT). El gen correspondiente se designó *penDE* (*aatA*) (Figura 6) (Brakhage et al., 2004).

Además de estas enzimas clave, también se requieren otras enzimas para la biosíntesis de penicilina, como las aril-CoA ligasas, que activan el ácido aromático de cadena lateral y la fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), que activa la tripéptido sintasa ACV no ribosómica (la primera enzima de la vía) (Martín et al., 2010).

En hábitats naturales se sintetizan penicilinas como la penicilina F y K (que contienen ácido D3-hexenoico y ácido octenoico como cadenas laterales, respectivamente). Al suministrar al medio de cultivo ácido fenilacético o fenoxiacético la síntesis puede dirigirse, principalmente, hacia la penicilina G y V, respectivamente (Brakhage et al., 1999). La formación de penicilinas hidrófobas se ha identificado sólo en hongos, especialmente *P. chrysogenum* y *A. nidulans*, mientras que las cefalosporinas hidrófilas son producidas por hongos y bacterias, principalmente *A. chrysogenum* y *Streptomyces clavuligerus*, respectivamente.

Las enzimas ACV e IPN se localizan en el citosol, donde llevan a cabo sus respectivas reacciones, mientras que las últimas dos reacciones para formar la penicilina G llevadas a cabo por la fenilacetil-CoA ligasa (involucrada en la activación del ácido fenilacético) e isopenicilina N aciltransferasa se encuentran en microcuerpos (peroxisomas) (Martín et al., 2010).

2.4.3.2 Cefalosporina C

Como se mencionó antes, en el segundo paso biosintético (formación de isopenicilina) se desprende la biosíntesis de cefalosporina C.

El primer paso establece la ruta específica para la síntesis de cefalosporinas; consiste en la formación de penicilina N por medio de una reacción de epimerización, la cual se lleva a cabo en *A. chrysogenum* por dos componentes: la enzima acil-coA sintetasa (codificada por el gen *cefD1*) y la enzima α -metilacil-CoA racemasa (codificada por el gen *cefD2*). La reacción comienza con la activación del sustrato isopenicilina N a su tioéster de CoA por la acil-CoA-sintetasa, posteriormente, α -metilacil-CoA racemasa cataliza la epimerización de isopenicilil-CoA a D-enantiómero penicilil-CoA. Finalmente, la hidrólisis requerida de los tioésteres de CoA parece ocurrir de manera no estereoselectiva por diferentes tioesterasas (Esther K. Schmitt et al., 2004). El producto resultante, la penicilina N, es el precursor directo de todas las cefalosporinas y cefamicinas (Figura 6).

El siguiente paso conduce a la conversión de la penicilina N en deacetoxicefalosporina C (DAOC) al expandir el anillo de tiazolidina de cinco miembros al anillo de dihidrotiazina de seis miembros característico de la clase de cefalosporinas. Esta reacción es catalizada por la DAOC sintetasa (codificada por el gen *cefEF*), y requiere Fe^{2+} , oxígeno molecular y acetoglutarato para llevar a cabo la reacción (Kohsaka & Demain, 1976).

En la siguiente reacción, la DAOC hidroxilasa, también designada deacetilcefalosporina C sintetasa (también codificada por el gen *cefEF*), cataliza la incorporación de un átomo de oxígeno desde O_2 al metilo exocíclico en el átomo C-3 de DAOC, formando así desacetilcefalosporina C (DAC) (Dotzlaw & Yeh, 1987).

En la última reacción ocurre la transferencia de un acetilo de la acetil coenzima A al grupo hidroxilo en el anillo de desacetilcefalosporina C que contiene azufre, conduciendo a la formación del producto final: cefalosporina C, la cual posee una alta actividad antibiótica (Felix et al., 1980). Esta reacción de acetilación es catalizada por la acetil-coenzima (CoA) o DAC acetiltransferasa (codificada por el gen *cefG*) (Figura 6).

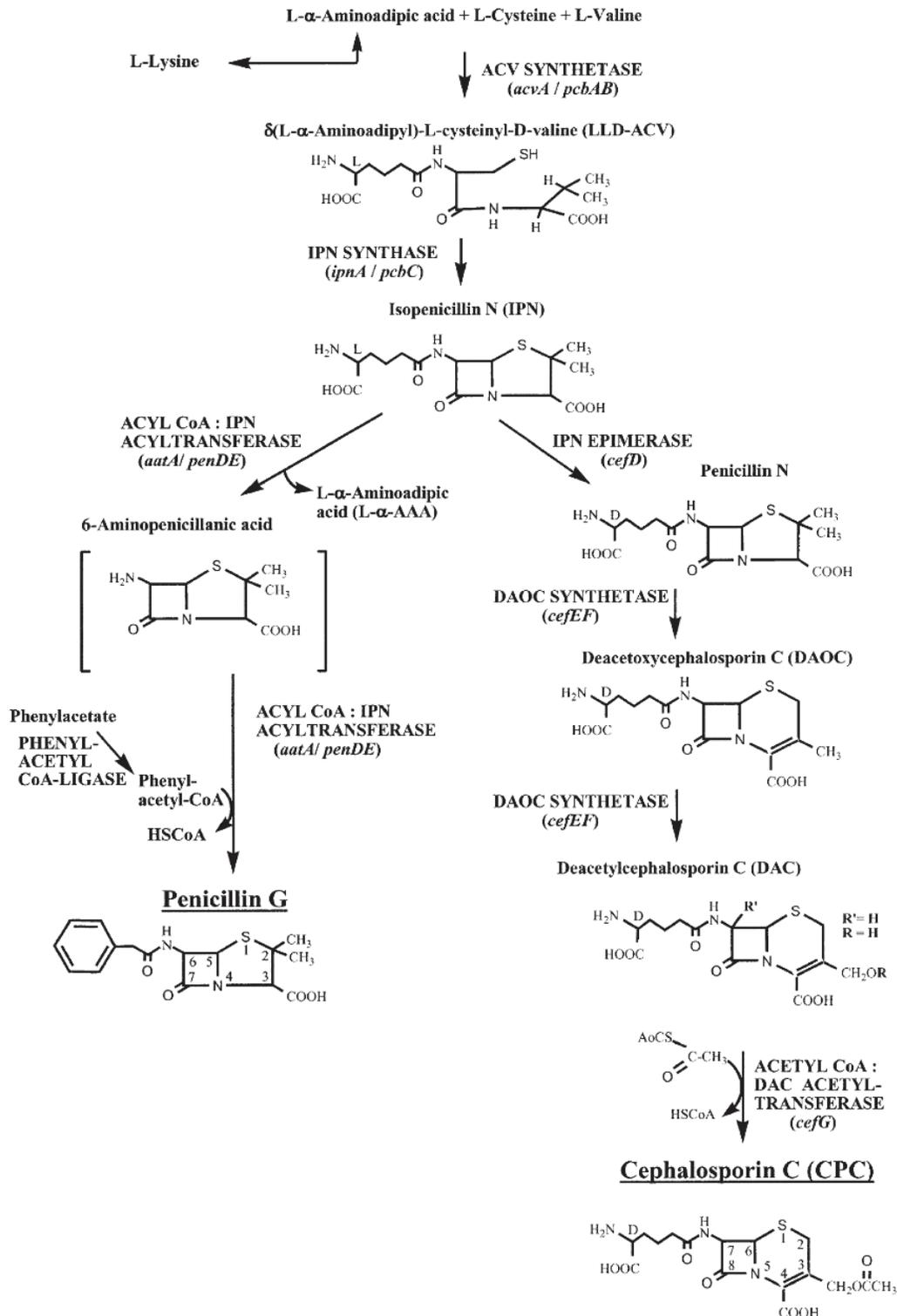


Figura 6. Ruta biosintética de penicilina G y cefalosporina C. L- α -AAA es un intermediario de la ruta biosintética de L-lisina, pero también puede proporcionarse por degradación catabólica de L-lisina. Abreviaturas: ACV, δ - (L- α -aminoadipil) -L-cisteína-D-valina; DA, deacetylcefalosporina C; DAOC, deacetocefalosporina C; IPN, isopenicilina N; L- α -AAA, ácido L- α -aminoadípico (imagen modificada de Brakhage et al., 2004).

La reacción de acetilación de DAC a cefalosporina C parece ser muy ineficiente en la mayoría de las cepas de *A. chrysogenum*. El gen *cefG* se expresa muy mal en comparación con otros genes de la vía y es bien sabido que se acumulan altos niveles de DAC en muchas cepas productoras de cefalosporina C. En consecuencia, la conversión de DAC a cefalosporina C parece ser el paso limitante en la vía (Gutierrez et al., 1992; Mathison et al., 1993).

La vía biosintética de la cefalosporina C en *A. chrysogenum* está compartimentada y tiene lugar en el citosol (ACV, IPNS y DAOCS) y los peroxisomas (IPNE), como la vía biosintética de la penicilina en *P. chrysogenum*. La proteína CefM parece actuar como un transportador entre la membrana peroxisomal y el citosol, mientras que la proteína CefT parece fungir como un transportador membranal desde el citosol al espacio extracelular, se sugiere que están involucrados en el transporte de intermediarios y/o secreción de cefalosporinas (Martín et al., 2010).

2.4.4 Regulación

2.4.4.1 Penicilina

La biosíntesis de penicilina está regulada por represión catabólica de carbono; la glucosa reduce drásticamente la producción, mientras que la lactosa (fuente de carbono de asimilación lenta) dio los mejores rendimientos (Soltero & Johnson, 1953). La regulación de la fuente C actúa en varios puntos de la biosíntesis de penicilina en *P. chrysogenum*: en el flujo de L- α -AAA a la enzima ACV (Honlinger & Kubicek, 1989), tanto en la regulación transcripcional como la postranscripcional de los genes biosintéticos (Brakhage et al., 1999) y en la activación de precursores de la cadena lateral, pues se descubrió que la glucosa causa la inactivación de la acetil-CoA sintetasa tiene la capacidad de catalizar la activación (a sus tioésteres de CoA) de algunos de los precursores de la cadena lateral necesarios para la producción de varias penicilinas (Martinez-Blanco et al., 1992).

La penicilina también está sujeta a regulación por nitrógeno, se ha reportado inhibición de la biosíntesis en *P. chrysogenum* por altos niveles de amonio, influyendo directamente en la expresión de los genes biosintéticos (Feng et al., 1994); además se demostró que el regulador general NRE (factor transcripcional de la familia AREA), además de participar en la regulación por nitrógeno, se une a los promotores de los genes de biosíntesis de penicilina (Haas & Marzluf, 1995).

La producción de penicilina está sujeta a regulación por pH ambiental, siendo el factor transcripcional PacC el jugador clave de esta regulación; en *P. chrysogenum* se encontró que los niveles de transcripción de *pacC* son más altos en condiciones alcalinas que en condiciones de crecimiento ácido y se elevan en las últimas etapas de crecimiento, teniendo posible relación con la presencia de siete sitios de unión de PacC en la región intergénica *pcbAB-pcbC* y sugirieron que *pcbC* está bajo control directo de PacC (Suárez & Peñalva, 1996).

Los aminoácidos desempeñan un papel en la regulación de la biosíntesis de penicilina y cefalosporina, debido a que se sintetizan a partir de los precursores de los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina. Esta regulación está basada en retroalimentación a nivel de metabolismo primario, pues encontraron que al adicionar L-lisina a la fermentación reducía la producción de penicilina, esto debido a que L-lisina inhibía varias enzimas de la ruta de biosíntesis de lisina, lo que podría dar como resultado un grupo reducido de L- α -aminoadípico disponible para la producción de penicilina (Brakhage et al., 1999; Demain, 1957); el mismo efecto se encontró con valina (Goulden & Chattaway, 1969).

El regulador global LaeA, que interactúa con el complejo velvet (VelA, VelB, VelC, VosA), regulan la expresión de genes biosintéticos de penicilina en *P. chrysogenum*. Tanto LaeA como VelA son reguladores positivos de la biosíntesis de penicilina, mientras que VelB actúa como antagonista del efecto de LaeA y VelA (Martín, 2017).

No se han encontrado genes reguladores específicos de la ruta de penicilina en la región amplificada que contiene los tres genes biosintéticos, lo que indica que la biosíntesis de penicilina podría ser controlada directamente por reguladores globales (por ejemplo: CreA, PacC, LaeA) (Martín et al., 2010).

2.4.4.2 Cefalosporina

Al igual que las penicilinas, la cefalosporina C también se regula por represión catabólica de carbono. Se demostró los genes *pcbC* y *cefEF* son reprimidos transcripcionalmente en presencia de glucosa, además, las actividades enzimáticas de PcbAB, PcbC y CefEF también disminuyeron en presencia de glucosa (Schmitt et al., 2004). El factor transcripcional CRE1 actúa como un represor catabólico de carbono en los genes biosintéticos de cefalosporina,

pues se reportó que los promotores de los genes *pcbC* y *cefEF* contienen varios sitios putativos de unión para CRE1 (Jekosch & Kuck, 2000).

Estudios moleculares revelaron que el factor general transcripcional AcAreA juega un papel importante tanto en la regulación del metabolismo del nitrógeno así como en la producción de cefalosporina en *A. chrysogenum* (Li et al., 2013).

El regulador general PacC (factor transcripcional dedos de zinc) también juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis de cefalosporina C. En *A. chrysogenum* se identificaron dos sitios de unión para PacC en la región promotora *pcbAB-pcbC* y dos más entre los genes *cefEF-cefG*, estos sitios de unión fueron demostrados ser reconocidos eficientemente por PacC in vitro. Se sugiere también, que la proteína PacC funciona en la regulación de la expresión de los genes de cefalosporina de una manera dependiente del pH, pues en las cepas parentales de *A. chrysogenum*, la expresión de los genes de biosíntesis de cefalosporina es más fuerte en condiciones alcalinas, lo que probablemente sea el resultado de una proteína PacC activa (Schmitt et al., 2001).

Como se mencionó antes, al ser también los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina los precursores de la biosíntesis de cefalosporina C, su disponibilidad intracelular es un parámetro importante en la regulación. La L-lisina reduce la producción de β -lactámicos mediante la inhibición por retroalimentación (Luengo et al., 1980). Los altos niveles de L-valina dan como resultado una inhibición por retroalimentación de la primera etapa de reacción catalizada por la acetohidroxiácido sintasa (Matsumura & Suzuki, 1986). La D-metionina presumiblemente tiene un doble efecto en la biosíntesis de cefalosporina C; por un lado, parece ser el principal proveedor de L-cisteína a través de la vía de transulfuración inversa y, por otro lado, tiene un efecto de inducción sobre los genes de biosíntesis de cefalosporina (Martín & Demain, 2002).

Se encontró que el gen *velvet* (*veA*) de *A. chrysogenum* controla la biosíntesis de cefalosporina y la formación de artrosporas; las mutantes interrumpidas con este gen mostraron una reducción del 80% en la producción de cefalosporina C. Encontraron que el efecto principal de la mutación *veA* se dio sobre expresión del gen *cefEF* (85% menos expresión) que codifica la enzima DAOC sintasa / hidroxilasa (Dreyer et al., 2007).

Se ha demostrado que una buena aireación del micelio es un pre requisito para altos rendimientos de β -lactámicos. Dado que varias enzimas requieren oxígeno para su actividad, como IPNS y DAOC sintetasa / DAC hidroxilasa, es concebible que esta sea la razón del requerimiento de oxígeno principalmente, para la biosíntesis de cefalosporina C (Hilgendorf et al., 1987).

2.6 Especies Reactivas de Oxígeno

Tanto los organismos eucariotas como los procariotas generan especies reactivas de oxígeno (EROs) como subproductos de su metabolismo, principalmente a través de la respiración aeróbica; estas especies son derivados del oxígeno molecular (O_2). Las principales EROs son las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , o sea, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Figura 7) (Hansberg, 2002).

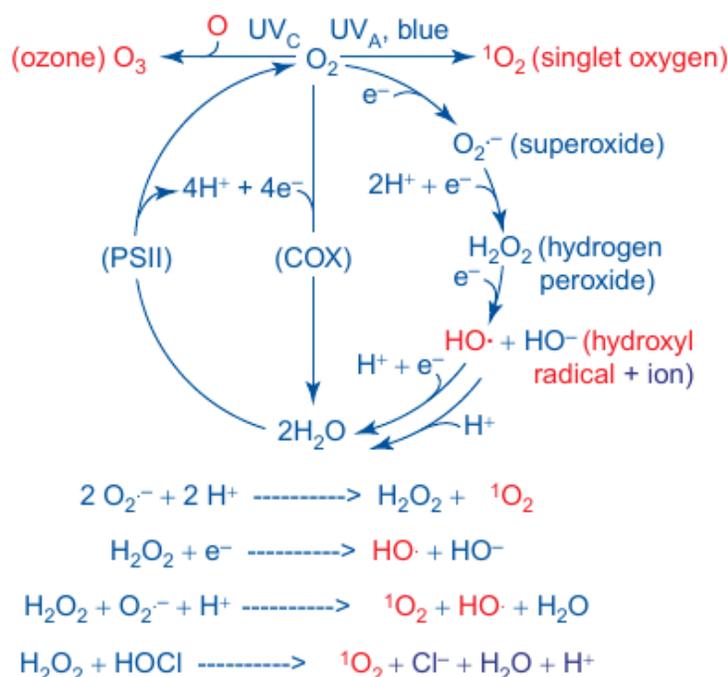


Figura 7. Mecanismos de producción de EROs. Las EROs se producen por excitación (O , O_3 , 1O_2) o por reducción (O_2^{-} , H_2O_2 , $HO\cdot$). Las especies en rojo son las más reactivas. El O_2 es generado por el fotosistema II (PSII) y es reducido por la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (COX). El superóxido reacciona sólo consigo mismo, con óxido nítrico y otros radicales. El peróxido de hidrógeno reacciona con los centros de azufre de hierro y las cisteínas de ciertas proteínas. Sin embargo, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden formar espontáneamente oxígeno individual y radicales hidroxilos, que son mucho más reactivos. Se muestran las principales reacciones para el oxígeno singlete y el radical hidroxilo (Esquema tomado de Aguirre et al., 2005).

El oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$) se forma cuando uno de los dos electrones libres del O_2 capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre, dando opción a que se puedan formar dos tipos de oxígeno en singulet: el $^1\Sigma_g^+$, que tiene los dos electrones desapareados pero con giros opuestos (el cual decae muy rápido), y el $^1\Delta_g$, en el que estos electrones se han apareado; biológicamente, sólo tiene relevancia la forma $^1\Delta_g$ ya que es capaz de reaccionar porque tiene dos electrones desapareados, o bien, puede decaer al estado basal, emitiendo un fotón a 1,268 nm. Dentro de la célula, el $^1\text{O}_2$ se puede formar en el proceso de fotosíntesis, en la dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$, de los ácidos hipohalogenosos, o también los lipoperóxidos (generados por algunos radicales). El $^1\text{O}_2$ es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares cerca de donde se produzca (Lledias & Hansberg, 2000).

El ion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se forma cuando el O_2 capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el O_2 . Además de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar $\text{O}_2^{\bullet-}$. Otra fuente importante son los citocromos P450, algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidasas inespecíficas (Winterbourn, 2008).

El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es poco reactivo, sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, con el hierro libre o unido a algunas proteínas (por ejemplo, los centros Fe-S) y también con otros radicales (como el óxido nítrico, los radicales fenoxi o consigo mismo). La dismutación espontánea del superóxido ocurre sólo cuando uno de los $\text{O}_2^{\bullet-}$ se protona para formar el radical hidropéroxilo (HO_2^{\bullet}), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio. Inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del NAD^+ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la deshidratasa dihidroxiácido, la reductasa de ribonucleótido que genera los difosfato de desoxiribonucleósidos para la síntesis del ADN, y una fosfatasa de proteína, la calcineurina, importante en la transducción de señales. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ no reacciona con el NAD(P)H, con el DNA, con los lípidos, ni con los aminoácidos de las proteínas (Hansberg, 2002).

El agua oxigenada o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se forma principalmente por la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, aunque también se forma por algunas oxidasas como xantina, las oxidasas de aminoácidos, oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. El H_2O_2 es poco reactivo y se puede difundir a través de los compartimentos celulares, reacciona poco con el ascorbato y lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el α -cetoglutarato; no reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el DNA, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares. Algunas enzimas, como la gliceraldehido 3-fosfodeshidrogenasa o la fosfatasa 1,6-difosfato fructosa del cloroplasto, sí se inactivan con el H_2O_2 .

Tanto el $\text{O}_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan $^1\text{O}_2$ y HO^{\cdot} .

El radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el ión hidroxilo HO^- se forman cuando el H_2O_2 se fragmenta al aceptar un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ (reacción de Fenton); el HO^- es inocuo, se protona para formar agua, en cambio, el HO^{\cdot} es uno de los compuestos más reactivos que existen, de hecho, casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce. La toxicidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 depende, en gran medida, de la disponibilidad y la distribución de los metales de transición (Winterbourn, 2008).

Al grupo de las EROs suelen añadirse las especies reactivas de nitrógeno que están combinadas con las de oxígeno, y que son importantes biológicamente, tal es el caso del monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO^{\cdot}). Éste se forma como producto de la óxido nítrico sintasa a partir del grupo guanidino de la arginina.

El NO^{\cdot} es un radical porque tiene un electrón desapareado, sin embargo, igual que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, al cual se parece mucho, el NO^{\cdot} no es muy reactivo y se puede difundir. Reacciona lentamente con los tioles formando tionitritos (nitrosotioles) o con los sulfhidrilos de algunas enzimas. En cambio, reacciona rápidamente con otros radicales, como con el O_2 , generando NO_2^{\cdot} , o con $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando peroxinitrito (ONOO^-), ambos productos son más oxidantes que el óxido nítrico. También reacciona con radicales de aminoácidos, como el radical tirosina, que se encuentra, por ejemplo, en el sitio activo de la reductasa de ribonucleótido. El NO^{\cdot} se une a varios metales de transición como al hierro de las hemoproteínas o los centros $[\text{Fe-S}]$ de las

enzimas mitocondriales. La inhibición de la oxidasa del citocromo C por el NO[•] puede tener un efecto metabólico importante (Hansberg, 2002).

2.6.1 Potencial redox, estrés oxidante y daño celular

Las células están aisladas química y osmóticamente de su entorno creando un gradiente de potencial electroquímico a través de su membrana plasmática, que es necesario para la vida. La distribución de metabolitos oxidantes y reductores en la célula y en el medio crea un potencial redox interno, el cual está controlado homeostáticamente por un elaborado sistema. Cuando ocurre una desviación del valor normal de este potencial redox se tolera sólo por un tiempo muy corto, y si se mantienen durante más tiempo, se genera un estrés oxidante, lo que puede desencadenar en muerte celular por apoptosis y otros procesos de muerte celular programada como la necrosis (Breitenbach et al., 2015).

La homeostasis oxidación-reducción (estado redox) es primordial para la vida. Los procesos redox impregnan prácticamente todos los procesos fundamentales en la célula, desde la bioenergética hasta el metabolismo. Al igual que en la regulación ácido-base, el control espacio-tiempo opera en diferentes puntos, es decir, no existe un estado redox general, sino que son específicos en cada compartimento dentro y fuera de la célula, o de una situación fisiológica o fisiopatológica dada. Las perturbaciones que conducen a un aumento repentino en los niveles intracelulares de EROs, que se traduce en una pérdida del estado redox, causarían estrés oxidante y desencadenarían mecanismos de defensa antioxidante (Montibus et al., 2015; Sies et al., 2017).

El estrés oxidante se define pues como un desequilibrio entre la generación de EROs y las defensas antioxidantes que conduce a una interrupción de la señalización redox y el control y/o daño molecular (Sies et al., 2017).

Las EROs que se producen en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al DNA, a las proteínas y a los lípidos, sin embargo, el daño más profundo se percibe cuando las células entran en estrés oxidante.

En el DNA ocurre la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina y la ruptura de una o las dos hebras del DNA. Otra modificación importante son los aductos de guanina, formador por la oxidación de la guanina comúnmente

por $^1\text{O}_2$, esta oxidación genera 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina que forma puentes de hidrógeno con la adenina en lugar de con la citosina y, por lo tanto, genera mutaciones de transversión después de la replicación (Freudenthal et al., 2015); la acumulación de guanina oxidada causa disfunción mitocondrial (pues del DNA mitocondrial es más afectado que el genómico) y puede conducir a muerte celular. También se ha reportado oxidación de microRNAs en células de mamíferos, que terminan en apoptosis (Sies et al., 2017).

La mayoría de los daños en las proteínas son ocasionados por el HO^\bullet ya que reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. El $^1\text{O}_2$ es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína. Algunas enzimas se inactivan o se activan con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 cuando interactúan con metioninas o cisteínas susceptibles; estas reacciones son reversibles y por ello tienen importancia en la regulación de algunas actividades enzimáticas. Muchas proteínas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función (Hansberg, 2002).

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varios dobles enlaces. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las EROs que pueden robar estos hidrógenos son el HO^\bullet y el HO_2^\bullet , una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O_2 para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción. Así una iniciación puede generar muchos lipoperóxidos. El $^1\text{O}_2$ genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de hierro formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación (Niki, 2014).

Los daños en los carbohidratos durante el estrés oxidante son múltiples, el más importante es el daño al esqueleto de azúcar de los ácidos nucleicos, el cual provoca la ruptura de las hebras. Los carbohidratos libres generan oxidantes como los carbonilos reactivos, que a su vez pueden desencadenar más daños celulares (Robertson, 2004).

2.6.2 Sistema de respuesta antioxidante

Las células poseen sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos para mantener bajos los niveles intracelulares de EROs, juntos constituyen una batería de respuesta antioxidante. Los sistemas no enzimáticos consisten principalmente en pequeñas moléculas que actúan como eliminadores de radicales (los más importantes son glutatión y tiorredoxina). En el lado enzimático, los sistemas de defensa más estudiados son las catalasas, las superóxido dismutasas, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas (Figura 8).

2.6.2.1 Sistema no enzimático

Sistema Glutatión

El glutatión es el sistema no enzimático central y más conocido que protege a las células del estrés oxidante. El glutatión (GSH) es un tripéptido γ -L-glutamyl-L-cis-teinilglicina que posee un grupo sulfhidrilo redox-activo que reacciona con diversas moléculas oxidantes produciendo un glutatión reducido (GSSG). Además, en la célula, el equilibrio entre GSH y GSSG se mantiene debido a la actividad de glutatión reductasa, codificada por *glr1*, que reduce GSH a GSSG (Collinson & Dawes, 1995).

El glutatión actúa como una molécula captadora y se usa como sustrato para una gran cantidad de reacciones celulares. Por ejemplo, el H_2O_2 se reduce por una glutatión peroxidasa usando GSH como reductor (Figura 8). Además, el glutatión se puede conjugar con muchos compuestos xenobióticos para reducir su toxicidad, catalizado por una glutatión-S-transferasa (GST). Por lo tanto, una gran variedad de moléculas dañinas, como zinc, cadmio o mercurio, se pueden conjugar con glutatión, lo que lleva a compuestos menos reactivos y más solubles (Montibus et al., 2015).

Se han identificado varias isoformas de glutatión reductasa en numerosas levaduras y hongos filamentosos. En *Acremonium chrysogenum*, Long et al., (2012) describieron la participación de una glutatión reductasa codificada por *glrA* en la respuesta al estrés oxidante e indirectamente en la producción de cefalosporina. La función del sistema GSH parece estar conservada entre los hongos filamentosos y este sistema tiene un papel muy importante en respuesta a los xenobióticos (Montibus et al., 2015).

Sistema Tiorredoxina

El segundo sistema antioxidante no enzimático que participa significativamente en la respuesta al estrés oxidante en hongos filamentosos y levaduras se centra en la pequeña proteína tiorredoxina rica en sulfhidrilos. La tiorredoxina tiene un sitio activo redox y funciona como un eliminador de EROs. En la célula, las tiorredoxinas se reducen mediante tiorredoxina reductasas en una reacción dependiente de NADPH, y pueden ser oxidadas por tiorredoxina peroxidases en presencia de H_2O_2 (Jamieson, 1998) (Figura 8).

2.6.2.2 Sistema enzimático

Superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SOD) son metalo-enzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 (Figura 8). En la célula puede haber varias SOD en diferentes ubicaciones y con propósitos específicos, por ejemplo, *S. cerevisiae* posee dos SOD: la mitocondrial manganeso-SOD (MnSOD), codificada por *sod2*, y la cobre citoplasmática zinc-SOD (Cu/ZnSOD), codificada por *sod1* (Birmingham-McDonogh et al., 1988; Jamieson, 1998). Un papel central en la eliminación de superóxido del citoplasma se atribuye al Cu/ZnSOD, mientras que el MnSOD está más involucrado en la protección de las mitocondrias contra los daños causados por los peróxidos resultantes de la respiración. Aunque hay mucha evidencia de la fuerte participación de la actividad SOD en respuesta al estrés, los roles individuales de Cu/ZnSOD y MnSOD siguen sin estar claros en hongos filamentosos (Montibus et al., 2015).

Catalasas

Las catalasas juegan un papel central en la defensa contra el estrés oxidante. Catalizan la descomposición de H_2O_2 en O_2 y H_2O (Figura 8); al igual que las SOD, dentro de la célula puede haber varias catalasas en diferentes ubicaciones y propósitos, por ejemplo, en *S. cerevisiae* la catalasa A se encuentra en el peroxisoma y elimina el H_2O_2 producido por la β -oxidación, y la catalasa T es citosólica y participa en las respuestas al estrés oxidante y osmótico (Jamieson, 1998). Desde el punto de vista filogenético, el número de catalasas encontradas en un genoma varía entre las especies, que van desde dos para *S. cerevisiae* hasta cinco para *P. anserina*, esto puede reflejar la adaptación de estos hongos a su entorno específico (Montibus et al., 2015).

Glutación peroxidadas

Las glutatión peroxidadas (GPx) catalizan la reducción de H₂O₂ usando GSH como reductor (Figura 8). De igual manera, cada especie puede tener varias GPx, por ejemplo, *S. cerevisiae* presenta tres de estas enzimas Gpx1p, Gpx2p, y Gpx3p (Inoue et al., 1999).

Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx) son una superfamilia de proteínas antioxidantes que dependen de un grupo tiol para su función. A diferencia de las otras enzimas antioxidantes mencionadas, las peroxirredoxinas no requieren de cofactores redox tales como metales o grupos prostéticos. También conocidas como tiorredoxina peroxidadas (Tpx) o alquilo hidroperóxido reductasas, estas enzimas protegen contra el H₂O₂, hidroperóxidos orgánicos o peroxinitritos (Figura 8). *S. cerevisiae* tiene al menos cinco peroxirredoxinas que se localizan en distintos compartimientos celulares donde realizan diferentes funciones. Además de su papel como antioxidantes algunas Prxs están implicadas en la regulación de cascadas de señalización (Garrido & Grant, 2002).

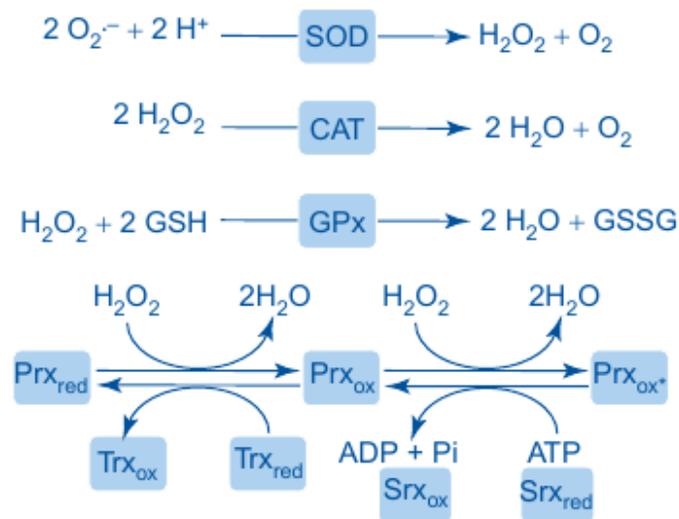


Figura 8. Disposición del H₂O₂ y O₂^{·-}. El superóxido se dismuta por superóxido dismutasas (SOD). El peróxido de hidrógeno se descompone por catalasas (CAT), peroxidadas, como la glutatión peroxidada (GPx), y por peroxirredoxinas (Prx). El tiol de una cisteína sensible en Prx se oxida a un ácido Cys-sulfénico (Prx_{ox}) y se reduce por tiorredoxina reducida (Trx_{red}). El ácido Cys-sulfénico en Prx_{ox} puede ser oxidado adicionalmente por peróxido de hidrógeno a ácido Cys-sulfínico; se reduce de nuevo a ácido Cys-sulfénico por la sulfiredoxina reducida (Sr_x_{red}) y ATP (Esquema tomado de Aguirre et al., 2005).

2.6.3 Generación de EROs en hongos

Tradicionalmente se pensaba que los procesos de transferencia de electrones que ocurren en la cadena respiratoria mitocondrial son la principal o única fuente intracelular de EROs, sin embargo, se ha demostrado que algunas de ellas ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) se forman "a propósito" en las células, por NADPH oxidasas, cuyo producto primario es el superóxido y con la estricta compartimentación, así como la regulación de la actividad enzimática y la "canalización" de este radical a través de la interacción inmediata con SOD, han llevado a la imagen de las NADPH oxidasas involucradas en la señalización (Breitenbach et al., 2015).

La síntesis regulada de EROs por NADPH oxidasas fúngicas específicas (Nox) juega un papel clave en la diferenciación y desarrollo celular fúngico.

Se han identificado tres isoformas de Nox diferentes en hongos, NoxA, B y C. Se ha encontrado que NoxA tiene un papel clave en el desarrollo del cuerpo fructífero en varias especies sexuales, mientras que NoxB juega un papel clave en la germinación de ascosporas; la función de NoxC se desconoce. Se demostró que se requiere NoxA y NoxB para el desarrollo de estructuras de infección por hongos fitopatógenos, la producción de EROs por NoxA es crítica para mantener la relación fúngica-vegetal. La síntesis localizada de EROs también es importante en el crecimiento y mantenimiento de hifas polarizadas. La activación de NoxA / NoxB requiere de la subunidad de regulación NoxR y la pequeña GTPasa RacA (Scott & Eaton, 2008).

2.6.4 Respuestas fúngicas a las EROs

Las primeras formas de vida evolucionaron en un entorno altamente reductor. Cuando el oxígeno se convirtió abundante en la Tierra, debido a la evolución de la fotosíntesis, las formas de vida tuvieron que adaptarse o extinguirse; cuando los organismos vivos se adaptaron al oxígeno y sus intermedios de reducción, proliferaron y se produjo una explosión de nuevas formas de vida, utilizando EROs para impulsar su evolución, pero también, en la evolución simultánea de defensas antioxidantes, cuidadosamente reguladas, para permitir que las EROs desempeñen sus funciones como sustancias de señalización y para reacciones metabólicas basadas en la química radical que son necesarias para la vida y no son perjudiciales en sí mismas (Gutteridge & Halliwell, 2018).

En el reino de los hongos, como en los animales y las plantas, el estrés oxidante es un desafío sustancial para la supervivencia celular que debe ser superado por los sistemas de defensa apropiados, pero también es algo que se puede utilizar con fines de supervivencia en situaciones específicas de las células fúngicas.

Un mecanismo que surgió de esta evolución frente a las EROs, fue desarrollar formas de producirlos de manera regulada, como parte de un mecanismo de defensa contra todo tipo de patógenos; asimismo, varias enzimas antioxidantes han sido implicadas en la defensa de los patógenos fúngicos contra las EROs producidas por los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares, pues las EROs también son actores clave en la interacción de hongos con los hospedantes de las plantas y en la degradación de los materiales vegetales muertos en el suelo, como la lignocelulosa. Además, también desarrollaron la capacidad de producir metabolitos secundarios con función antioxidante (se explicará más adelante) (Aguirre et al., 2006; Breitenbach et al., 2015).

2.6.5 EROs como moléculas señalizadoras

Los mejores ejemplos para explicar cómo las EROs funcionan como moléculas señalizadoras han sido la interacción hongo-planta de los hongos fitopatógenos, entre la amplia gama de respuestas de defensa de las plantas, la generación de EROs es uno de los primeros eventos. Esta producción rápida y transitoria de cantidades importantes de EROs, llamada explosión oxidante, puede restringir el crecimiento de patógenos y limitar el establecimiento de infección, y es una señal para activar otras reacciones de defensa de la planta (Heller & Tudzynski, 2011; Montibus et al., 2015).

Del mismo modo, durante las infecciones de tejidos de mamíferos, los hongos patógenos deben hacer frente a las EROs generadas por los fagocitos para evadir parcialmente el sistema inmune innato. Esto se ha ilustrado para *Aspergilli* durante la aspergilosis y también para diferentes especies de levadura (Brakhage et al., 2010; Montibus et al., 2015).

La respuesta celular al estrés oxidante ocurre a nivel transcripcional y postranscripcional. La respuesta transcripcional en hongos filamentosos está mediada por dos modos: la regulación puede ocurrir mediante el secuestro nuclear de factores de transcripción específicos y por las

vías de señalización de fosforilación de proteínas (se explicará a profundidad en el siguiente subtema). En cuanto a la regulación postranscripcional, se ha encontrado que los grupos que contienen azufre, como los residuos de cisteína encontrados en las proteínas tirosina fosfatasas y las regiones ricas en cisteína de los factores de transcripción, son los objetivos bien establecidos para la oxidación por EROs, particularmente por H₂O₂. Las EROs también puede alterar la síntesis de proteínas a través de tiorredoxina, que puede apuntar a factores de iniciación de la traducción, factores de elongación y proteínas de unión a RNA (Montibus et al., 2015; Scott & Eaton, 2008).

Diferentes trabajos han enfatizado que las EROs desempeñan múltiples funciones en la fisiología de los hongos filamentosos, sirven tanto como fuentes de estrés oxidante, con fines de defensa (por ejemplo, en la interacción con las plantas) y como señalización para inducir el desarrollo fúngico; para éste último proceso, las concentraciones de EROs y las fluctuaciones en el potencial redox son mediadores importantes de los procesos de señalización que desencadenan en diferenciación celular y desarrollo (Heller & Tudzynski, 2011; Montibus et al., 2015).

2.6.6 MAPKs como vías de señalización de las EROs en hongos

Las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPKs) son uno de los mecanismos de señalización celular más importantes y evolutivamente conservados que existen en los organismos eucariotas, incluidos animales, plantas y hongos (Montibus et al., 2015).

Los procesos de transducción de señales en los que participan las MAPKs comienzan con la detección de estímulos ambientales por receptores y proteínas anclados a la membrana celular, como los sistemas de transducción de señales de dos componentes (HK), receptores de tirosina quinasas (RTK) o estructuras multiproteicas como los eisosomas, que a su vez están unidos a proteínas G heterotriméricas o monoméricas acoplado a los receptores. Estos pueden interactuar con proteínas adaptadoras o activar directamente una MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa) que a su vez activa una MAPKK (MAP quinasa quinasa) mediante la fosforilación de residuos serina/treonina. Esta última proteína fosforila una o varias MAPK (MAP quinasas) en residuos de serina/treonina/tirosina, que finalmente dan lugar a la activación de factores de transcripción que inducen o reprimen genes involucrados en la

adaptación celular o la respuesta a los estímulos detectados (Figura 9). En algunas de estas vías, una proteína de andamio (ancla) se mantiene asociada con las diferentes MAPK (Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017).

La señalización de EROs en hongos se puede incorporar en la ruta de señalización de MAPKs a diferentes niveles. Por ejemplo, las EROs intra o extracelulares pueden ser percibidas por sensores histidina quinasa de membrana o citosólicas; se ha sugerido que los dominios PAS/PAC y GAF adyacentes al dominio de histidina quinasa probablemente estén involucrados en la detección de EROs. Otro nivel de detección es a nivel de factores de transcripción, como los homólogos de AP-1 y factores de transcripción de unión a CCAAT, los cuales pueden participar directamente en la señalización mediante estímulo redox o mediante la modulación de la actividad de AP-1 con la participación del sistema de tiorredoxina. Esta red reguladora altamente conservada que incluye módulos de señalización, factores de transcripción y genes objetivo proporciona un sistema de defensa robusto contra el estrés oxidante en levaduras y hongos filamentosos (Figura 10) (Hong et al., 2013).

A pesar de la conservación de los principales módulos de señalización, los hongos filamentosos, en contraste con la levadura, tienen mecanismos adicionales para hacer frente a EROs, como la presencia de un mayor número de histidina quinasa, enzimas antioxidantes y la producción de metabolitos secundarios con función antioxidante (Fassler & West, 2011; Montibus et al., 2015).

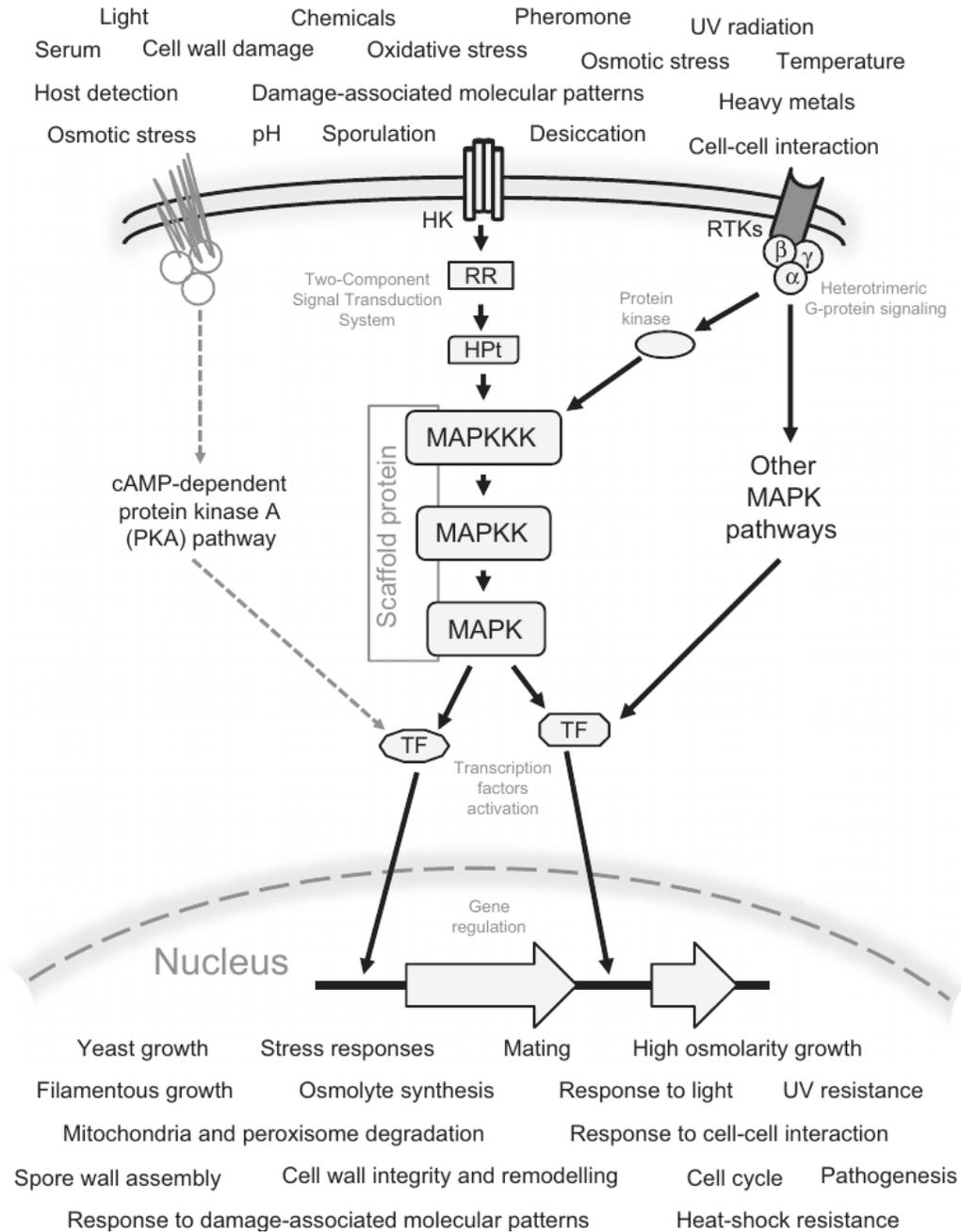


Figura 9. Representación general del mecanismo de señalización por las vías MAPK en hongos. Se incluyen todas las posibles señales detectadas y respuestas celulares a estas señales. También el sistema de transducción de señal de dos componentes (TCS), receptores acoplados a proteínas G, receptores de tirosina quinasa (RTK) y la interacción de MAPK con otras vías de señalización, por ejemplo, se representan las rutas de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA). La proteína Scaffold generalmente está presente en la ruta MAPK involucrada en el apareamiento. MAPKKK, MAP quinasa quinasa quinasa; MAPKK, MAP quinasa quinasa; MAPK, MAP quinasa; TF, factores de transcripción; HK, histidina quinasa; RR, regulador de respuesta; HPT, transmisor de fosfatos que contiene histidina (Esquema tomado de Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017).

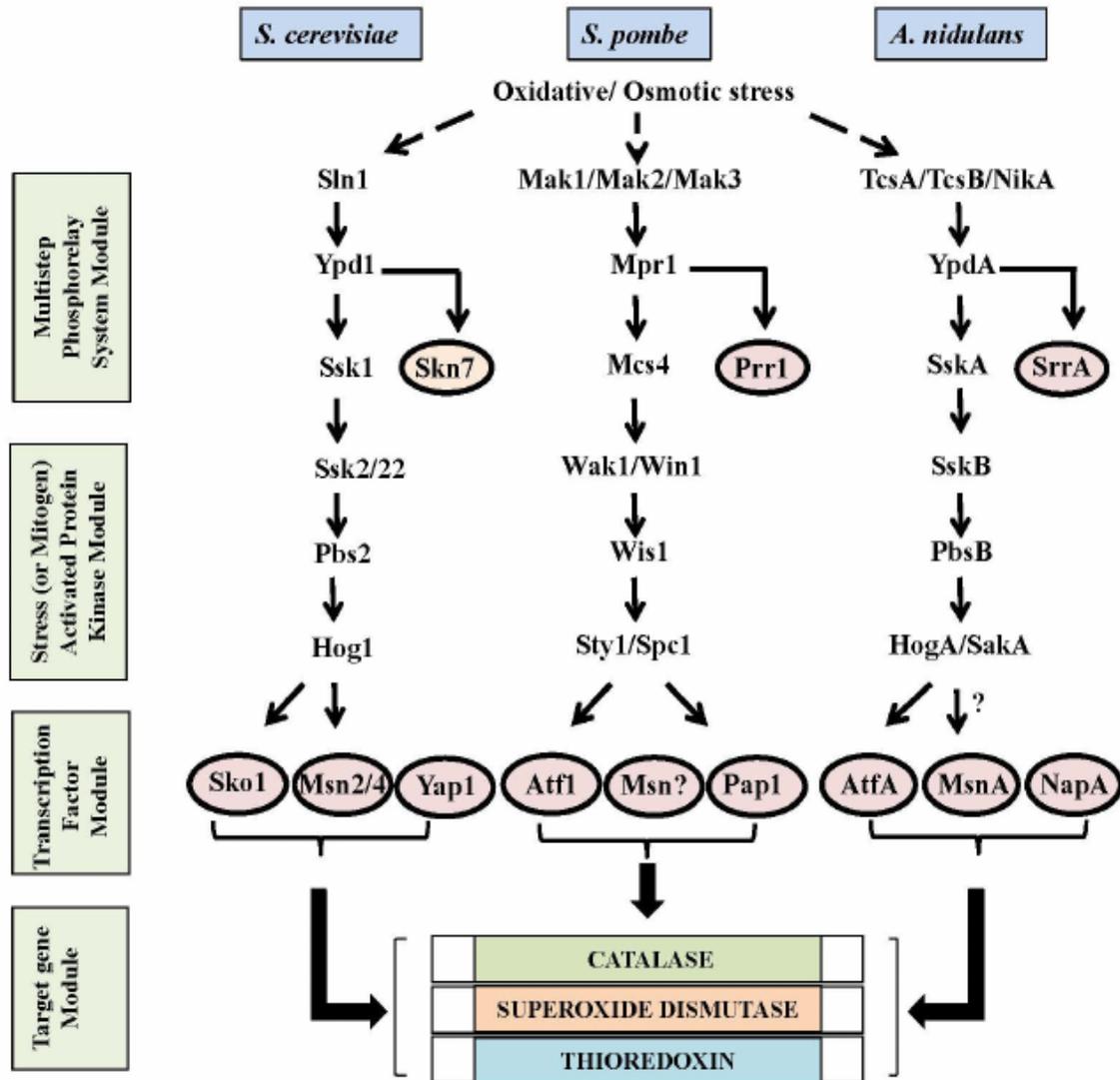


Figura 10. Vías de señalización activadas por estrés en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *A. nidulans*. En *S. pombe* y *A. nidulans*, Sty1/Spc1 (HogA/SakA) se activa por el estrés ambiental, como el estrés oxidante y osmótico, e induce factores de transcripción como Atf1 (AtfA) para la expresión de genes diana. Por otro lado, la activación de Hog1 para Sko1 en *S. cerevisiae* depende del estrés osmótico. Las quinasas del sensor TcsA/TcsB/NikA transmiten señales de estrés oxidante a la cascada HogA/SakA SAPK/MAPK a través de YpdA y SskA en *A. nidulans*, mientras que la quinasa del sensor Sln1 transmite señales de estrés osmótico a la cascada Hog1 SAPK/MAPK a través de Ypd1 y Ssk1 en *S. cerevisiae*. El regulador de respuesta Skn7 también se encuentra bajo la transducción de señal Sln1-Ypd1, pero el estrés oxidante parece activar Skn7 independientemente de este sistema. Las flechas con líneas continuas indican la transducción de señales entre dos proteínas y las flechas punteadas indican la transducción de señales del estrés oxidante y/o osmótico. Las flechas gruesas alineadas indican la unión de los factores de transcripción a los promotores de genes objetivo. Los círculos alrededor de las proteínas indican factores de transcripción. La transducción de señal desconocida entre dos proteínas y factores de transcripción no identificados se muestran con signos de interrogación (Esquema tomado de Hong et al., 2013).

2.6.6 Regulación transcripcional de genes involucrados en la maquinaria antioxidante fúngica

Como ya se mencionó, las células fúngicas responden al estrés oxidante mediante la activación de factores de transcripción específicos que controlan la expresión de genes involucrados en la desintoxicación (regulación a nivel transcripcional). Se ha sugerido que hay un vínculo directo entre la respuesta al estrés oxidante y el metabolismo secundario, que involucra, precisamente, estas regulaciones transcripcionales.

Particularmente, el grupo de investigación del Dr. J. E. Linz generó la hipótesis de que la biosíntesis de aflatoxinas está asociado con el estrés oxidante, y que los factores de transcripción relacionados con la respuesta al estrés oxidante también participan en el control del metabolismo secundario.

Sus hipótesis se basaron en el modelo de aflatoxinas (micotoxina), pues demostraron que la biosíntesis de este MS se induce e intensifica por la acumulación de EROs, además de que el factor transcripcional AtfB (relacionado con el estrés oxidante) es un jugador clave en la expresión coordinada de genes antioxidantes y genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas. Ellos proponen el modelo de una red reguladora compuesta por al menos cuatro factores de transcripción que se unen no sólo a los genes diana (para la respuesta antioxidante) sino que, a su vez, de forma oportuna y coordinada, a los genes de biosíntesis de aflatoxinas (Figura 11) (Hong et al., 2013).

Nuestro grupo de trabajo también encontró cierta evidencia de que factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante pudieran estar regulando la biosíntesis de lovastatina, pues tienen sitios putativos de unión a los promotores del gen biosintético *lovF* y del regulador transcripcional *lovE*. Curiosamente, entre estos factores de transcripción destacan AP1, AtfA, AtfB, SrrA y MsnA, los cuales Figuran dentro del modelo de regulación propuesto por Hong et al., 2013. Por lo tanto, nosotros también decidimos estudiar a estos reguladores dentro del modelo de lovastatina. En esta tesis se estudió el papel de MsnA y SrrA.

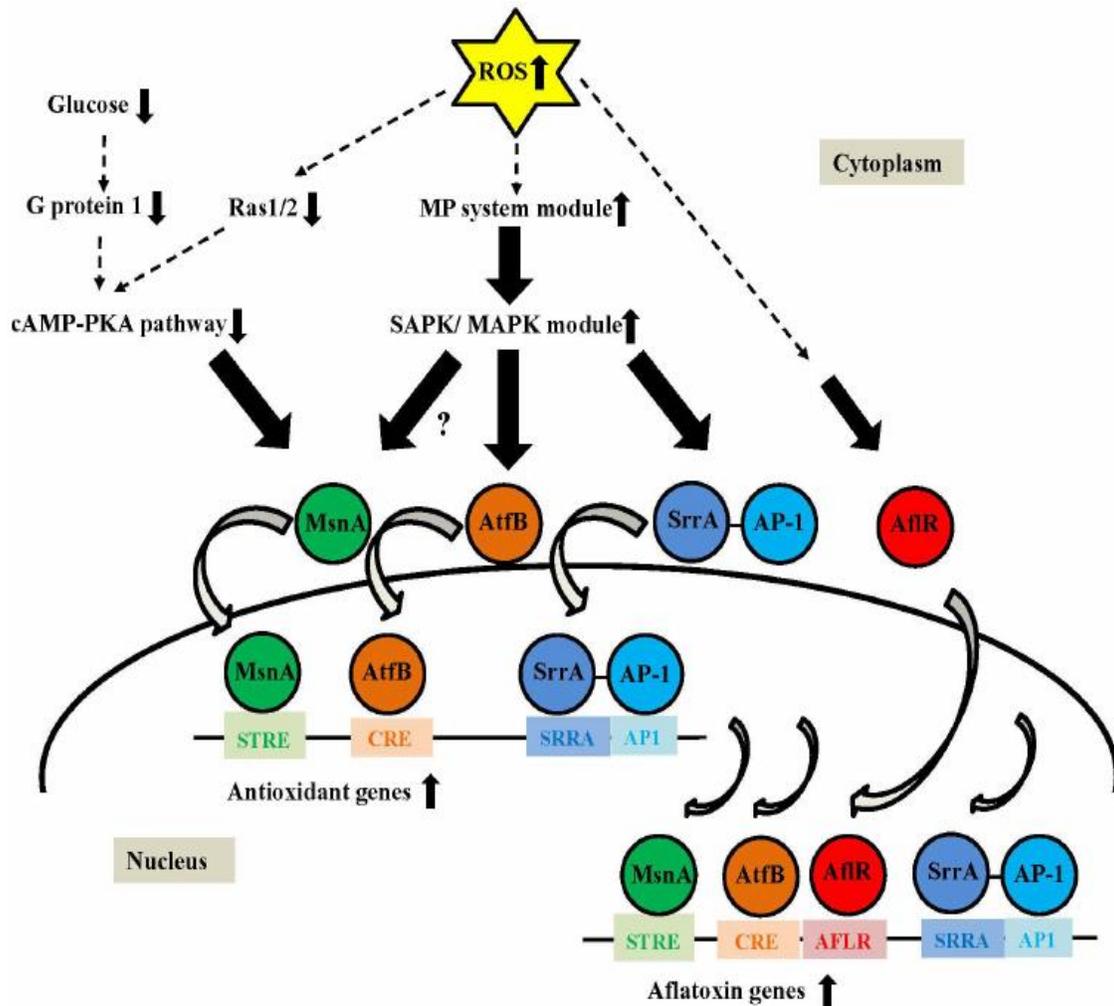


Figura 11. Modelo de activación transcripcional de genes biosintéticos de antioxidantes y aflatoxinas por factores de transcripción relacionados con el estrés oxidante. El modelo propone que niveles altos de EROs intracelulares regulan negativamente la vía de señalización de cAMP-PKA. Esto promueve la unión de MsnA a sitios STRE en promotores de genes antioxidantes para su activación. Simultáneamente, EROs regula en exceso las cascadas de señalización SAPK/MAPK a través del sistema de fosforilación multipaso. La activación de la cascada SAPK/MAPK promueve la unión de AtfB y SrrA (SrrA recluta AP-1) a los correspondientes sitios CRE, SRRRA y API en promotores de los genes antioxidantes para su inducción. Luego, MsnA, AtfB y SrrA se unen (SrrA recluta AP-1) a los sitios STRE, CRE, SRRRA y API correspondientes en promotores de genes de aflatoxinas para su activación debido a niveles excesivos de EROs. AfIR ayuda a la inducción de genes biosintéticos de aflatoxinas mediante la unión a sitios AFLR en los promotores de genes de aflatoxinas. Las flechas punteadas indican la transducción de señales desde EROs y las flechas con líneas continuas indican las rutas de transducción de señales. Las flechas curvas designan la entrada de factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo y unión de los factores de transcripción a los motivos de reconocimiento correspondientes. Un signo de interrogación muestra la transducción de señal indefinida (imagen tomada de Hong et al., 2013).

2.6.6.1 *Skn7*

Skn7 en levadura (conocido como *SrrA* en *Aspergillus*) es un factor de transcripción de tipo “winged helix-turn-helix”, miembro del sistema multicomponente de fosforilación Histidina-Aspartato (análogo al sistema de fosforilación de dos componentes en procariontes), forma parte de una ruta de transducción de señales de respuesta celular (como ensamblaje de la pared celular, progresión del ciclo celular y las respuestas al estrés osmótico y oxidante) a los estímulos ambientales.

Skn7 se une al elemento de respuesta al estrés oxidante (OSRE) (5'GGCNGGC3', 5'GGCNGGC3', 5'GGCNAGA3', 5'GGCANNAGA3' ó 5'CCGAAA3') en los promotores de los genes *trx2* (tioredoxina), *ctl1* (catalasa citosólica), *ccp1* (citocromo citocromo peroxidasa), *tsal* (tioredoxina peroxidasa citosólica), *ahp1* (hidroperóxido reductasa de alquilo), induciendo su expresión en respuesta a H₂O₂ (He & Fassler, 2005a; Morgan et al., 1997). *Skn7* también se une al elemento de choque térmico (HSE) en los genes de choque térmico mediante la cooperación con el factor de transcripción Hsf1 (Raitt et al., 2000).

2.6.6.1.1 Sistema de dos componentes HK

La capacidad de responder a una gran variedad de señales ambientales es vital para el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. En las células procariontes, la detección y el procesamiento de estas señales dependen en gran medida de las vías de transducción de señales de dos componentes que dependen de los residuos de histidina y aspartato como donantes y aceptores del grupo fosforilo (fosforilaciones). La ruta prototípica de transducción de señales de dos componentes comprende dos componentes proteicos: un sensor de histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) (Saito & Posas, 2012).

Un HK típico consiste en un dominio de detección de señal (o entrada) y un dominio transmisor que tiene un núcleo de quinasa conservado con un residuo invariante de histidina (His); mientras que un RR típico consiste en un dominio receptor N-terminal que tiene un residuo invariante de aspartato (Asp) y un dominio de salida C-terminal (Figura 12).

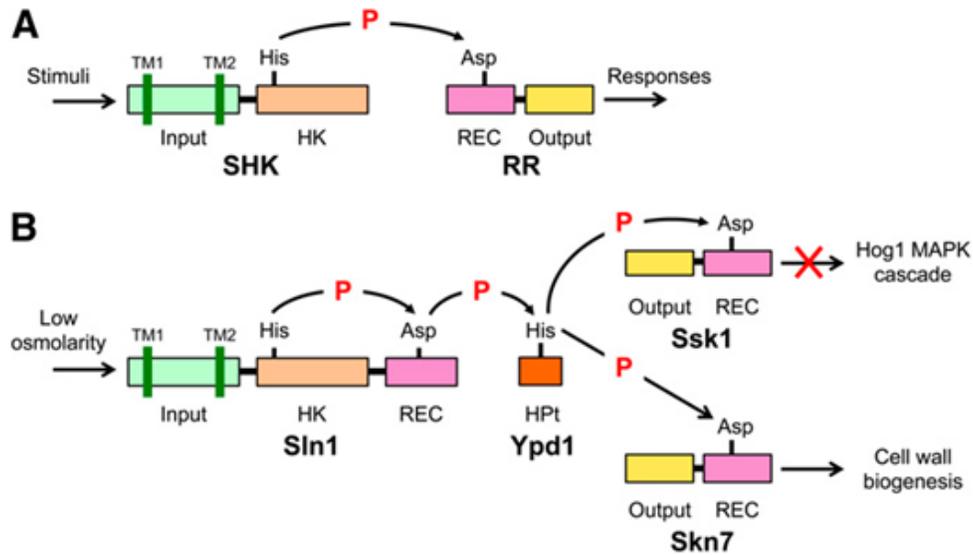


Figura 12. Diagrama esquemático del sistema de señalización de dos componentes. (A) El sistema prototípico de dos componentes que se caracteriza por la reacción conservada de fosfotransferencia entre un residuo de histidina y un residuo de aspartato. (B) La fosforilación de múltiples pasos Sln1-Ypd1-Ssk1. SHK, sensor histidina quinasa; RR, regulador de respuesta; Dominio de histidina quinasa HK; REC, dominio del receptor; HPt, proteína de fosfotransferencia que contiene histidina; TM, segmento transmembrana; P, grupo fosforilo (diagrama tomado de Saito & Posas, 2012).

La recepción de señal por el HK estimula la autofosforilación dependiente de ATP en el residuo de His conservado en su dominio transmisor. La fosfoquinasa luego dona el grupo fosforilo al residuo Asp conservado en el dominio receptor del RR afín, lo que lo hace funcional, generalmente como un regulador transcripcional. Sin embargo, en eucariotas los sistemas de dos componentes son más elaborados. Por ejemplo, la transmisión de señal puede involucrar HK híbridos que contienen dominios transmisores y receptores, y proteínas adicionales como componentes de fosfororelay (Stock et al., 2000; Zschiedrich et al., 2016). Los sistemas de fosforilación fúngica consisten en uno o varios HK híbridos, una proteína de fosfotransferencia (HPt) que contiene histidina y dos RR acordes.

Skn7 forma parte de uno de estos sistemas de fosforilación en hongos como un regulador de respuesta; se ha estudiado a profundidad el sistema en *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene una sola HK asociada a membrana, Sln1; una proteína HPt, Ypd1; y dos RR, Ssk1 y Skn7. En condiciones osmóticas normales, Sln1 es una quinasa activa que se autofosforila en la histidina conservada del dominio transmisor. El grupo fosforilo se transfiere sucesivamente al aspartato conservado del dominio receptor Sln1, a la histidina conservada de Ypd1, y

finalmente, a los aspartatos conservados de Ssk1 y Skn7 (Posas et al., 1996). La fosforilación de Ssk1 previene la activación de las proteínas quinasas mitogénicas parcialmente redundantes (MAPK) quinasas quinasas Ssk2 y Ssk22. Las condiciones de alta osmolaridad promueven la desfosforilación de Sln1 fosforilada, lo que resulta en la acumulación de Ssk1 no fosforilada. Ssk1 sin fosforilar interactúa físicamente con Ssk2 y Ssk22, lo que lleva a su activación y a la posterior fosforilación de Pbs2 y Hog1. Hog1 fosforilado, a su vez, activa varios factores de transcripción, responsables de la inducción de genes necesarios para la supervivencia en un entorno hiperosmótico (Figura 13) (Hohmann, 2002; Loomis et al., 1998; Santos & Shiozaki, 2001).

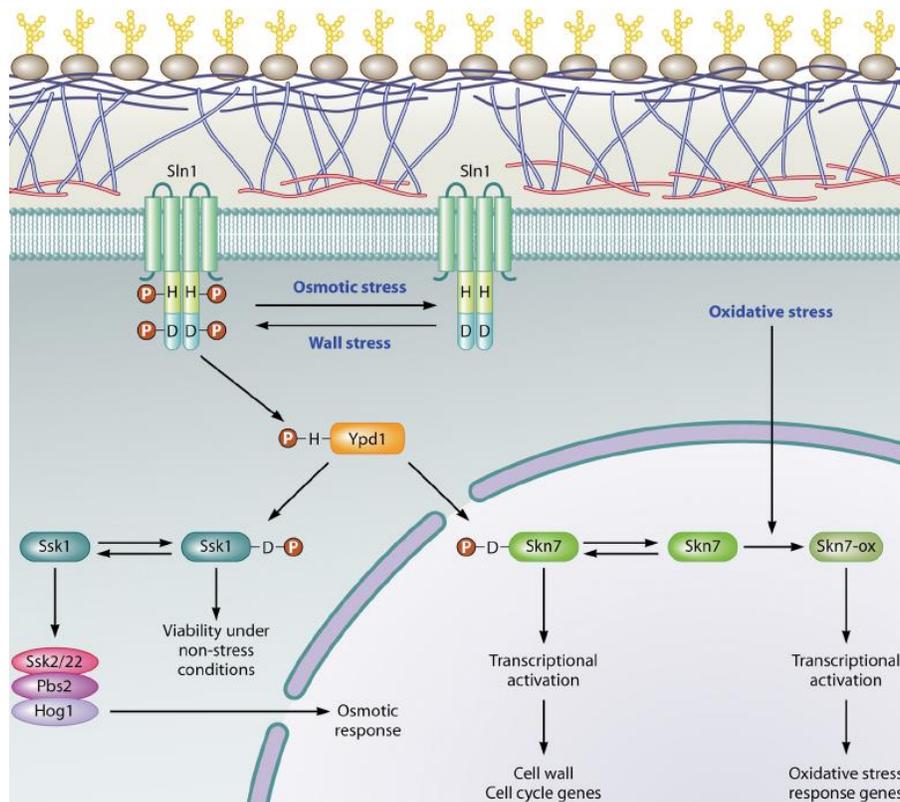


Figura 13. Funciones de Skn7 en *S. cerevisiae*. Se muestra esquemáticamente el flujo de fosforilación a través de la ruta Sln1. La quinasa Sln1 asociada a la membrana plasmática se autofosforila en condiciones normales de crecimiento. La hiperosmolaridad y otras condiciones que causan una reducción en la turgencia conducen a una reducción en la actividad quinasa de Sln1 y a la acumulación de su forma desfosforilada. La hiperactivación ocurre bajo condiciones que causan debilitamiento/remodelación de la pared celular (estrés de pared), fosforilando a Ypd1, y finalmente a Ssk1 y Skn7 (nuclear), respectivamente. La forma no fosforilada de Ssk1 interactúa y estimula la actividad de las MAPKKK Ssk2 y Ssk22 de la vía Hog1, mientras que la forma fosforilada de Ssk1 la deja inactiva. La fosforilación de Skn7 conduce a la activación de un subconjunto de genes dependientes. Por otro lado, la activación de genes dependientes de SKN7 que responden al estrés oxidante es independiente de la vía Sln1 y no requiere de activación por fosforilación (esquema tomado de Fassler & West, 2011).

2.6.6.1.2 Estructura y dominios de Skn7

ScSkn7 (Skn7 en *S. cerevisiae*) y sus ortólogos se caracterizan por dos dominios altamente conservados: un dominio de unión a DNA similar a HSF (Heat Shock Factor) N-terminal y un dominio receptor C-terminal. El dominio HSF abarca una región de 135 residuos, dentro de los cuales se encuentra el motivo de unión al DNA de hélice-giro-hélice altamente conservados; el dominio receptor o regulador de respuesta (RR) también está altamente conservado (Fassler & West, 2011).

Una característica adicional de ScSkn7 es el dominio predicho “coiled-coil” o de bobina en espiral (CC), ubicado de 40 a 80 aa aguas abajo del dominio HSF. El dominio CC se superpone al motivo "HR" (H1227–R1228) que media las interacciones con algunas de las proteínas que interactúan con Skn7, como Rho1 y Mbp1 (factor transcripcional de ciclo celular) (Alberts et al., 1998; Bouquin et al., 1999).

El tamaño de las proteínas Skn7 varía de 478 aa en *Candida lusitaniae* a 1,039 ó 1,040 en *C. neoformans*, en comparación con 620 aa para la proteína ScSkn7; las principales diferencias se encuentran en el extremo N (delante del dominio HSF) y entre los dominios HSF/CC y RR. El tamaño del dominio N-terminal de ScSkn7 es de 83 aa, el cual es más largo que las regiones comparables en las proteínas Skn7 de la mayoría de los patógenos fúngicos (*A. fumigatus*, *C. lusitaniae*, *Candida albicans*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Magnaporthe oryzae*, *Penicillium marneffei*, etc.), cuyos tamaños varían de 1 a 24 aa. Se desconocen las ramificaciones funcionales de estas diferencias en el espacio entre dominios y la longitud total de las proteínas Skn7 (Fassler & West, 2011).

La proteína ScSkn7 se ha localizado en el núcleo en una variedad de condiciones ambientales, incluido el estrés osmótico, oxidante (inducido por H₂O₂) y térmico. La localización ScSkn7 parece depender de la GTPasa transportadora nuclear Ran (RAs-related Nuclear protein); sin embargo, a diferencia de ScSkn7, en hongos no se ha identificado claramente secuencias de localización nuclear clásicas, sugieren que la importación al núcleo es probable que sea una interacción directa con uno de varios miembros de la familia β -importina, aunque hay evidencia que sustenta que Skn7 es constitutivamente nuclear en levadura (Fassler & West, 2011; Lu et al., 2004; Roetzer et al., 2011).

2.6.6.1.3 Genes regulados por Skn7

La respuesta al estrés oxidante mediada por ScSkn7 se superpone con la de Yap1. Yap1 es un factor de transcripción de cremallera de leucinas (bZIP) de respuesta al estrés oxidante, su mecanismo de acción se basa en su localización, la cual se modula por oxidación directa en residuos de cisteína; esta oxidación de Yap1 es mediada por Gpx3, la cual conduce a un enlace disulfuro Cys303Cys598 que enmascara la señal de exportación nuclear Yap1 y permite que la proteína se acumule en el núcleo, donde participa activando genes OXR (de respuesta a estrés oxidante). Skn7 y Yap1 están involucrados con la activación de muchos genes OXR, incluidos, por ejemplo, *trx2*, *gpx2*, *ctt1*, *sod1* o *sod2*. Sin embargo, sólo la mitad de los genes controlados por Yap1 también requieren la presencia de Skn7 para su inducción dependiente de H₂O₂ (He & Fassler, 2005b; Kuge et al., 2001).

Se ha demostrado la asociación directa de las proteínas Skn7 y Yap1, individualmente, con el DNA en muchos promotores OXR. Sin embargo, se ha encontrado que en estos promotores contienen sitios de unión tanto para Skn7 como para Yap1, además, múltiples líneas de investigación apoyan una interacción entre las dos proteínas. Incluso se ha encontrado evidencia de que la capacidad de Skn7 para responder y actuar en diferentes condiciones de estrés reside en su capacidad de formar interacciones específicas con proteínas auxiliares (como Yap1) (Figura 13) (Mulford & Fassler, 2011; Tsuzi et al., 2004).

2.6.6.1.4 Skn7 en hongos filamentosos: fenotipos de mutantes $\Delta skn7$

La mayoría de los genomas fúngicos incluyen un ortólogo Ssk1 y un ortólogo Skn7, que están altamente conservados. Se han llevado a cabo muchos estudios de la caracterización de Skn7 en diferentes tipos de hongos, muchos de ellos patógenos, pues se ha encontrado evidencia de que Skn7 participa en la virulencia. A continuación, se menciona de manera general, los fenotipos que se encontraron en mutantes interrumpidas con el gen *skn7* en diferentes especies.

En el patógeno humano *C. albicans*, se demostró que una mutante $\Delta skn7$ es altamente sensible al H₂O₂ y T-BOOH (peróxido orgánico) pero no a la menadiona (fuente de O₂⁻), para lo cual sólo se obtuvo una respuesta levemente atenuada (Singh et al., 2004). En *C. glabrata*, la eliminación de *skn7* produce una mayor susceptibilidad al H₂O₂ y T-BOOH, además de una virulencia reducida; también encontraron que juega un papel importante en la

regulación de genes antioxidantes como *trx2*, *trr1*, *tsa1* (implicados en el metabolismo de la tiorredoxina) y el gen que codifica la catalasa *cta1* (Saijo et al., 2010). Por otro lado, también se demostró que CgSkn7, al igual que ScSkn7, es constitutivamente nuclear y actúa en conjunto con Yap1 (Roetzer et al., 2011).

En *A. nidulans* Skn7 se le renombró como SrrA (Stress Response Regulator), y se demostró que participa en la producción de conidios (a través de la regulación del factor transcripcional *brlA*), así como en la respuesta al estrés de pared celular, estrés osmótico y estrés oxidante (sólo la respuesta a H₂O₂), además, participa en la regulación de *catB* (Hagiwara et al., 2011; Vargas-Pérez et al., 2007). En *A. fumigatus*, la eliminación de *skn7* no tiene ningún efecto sobre la virulencia, pero aumenta la sensibilidad al H₂O₂ y T-BOOH sin ningún cambio en la sensibilidad a la menadiona y la diamida (Lamarre et al., 2007).

En *M. oryzae*, Skn7 no participa ni en la respuesta al estrés oxidante ni a la patogenicidad, pero juega un papel importante en la respuesta al estrés osmótico (Motoyama et al., 2008). Por otro lado, en *C. neoformans*, la eliminación de *skn7* produce cepas menos virulentas, afecta ligeramente la sensibilidad a T-BOOH pero demuestra la implicación de Skn7 en la activación mediada por T-BOOH de la expresión de *sod1* y *trr1* (Coenjaerts et al., 2006).

En *Schizosaccharomyces pombe*, Skn7 fue nombrado Prr1 (*pombe* Response Regulator), y la inactivación de este gen resultó en mutantes defectuosas en la respuesta al estrés oxidante, la temperatura fría y la toxicidad por metales pesados; también se demostró que Prr1 es necesario para la transcripción de los genes *trr1* y *ctt1* (codifica la única catalasa que tiene el hongo) (Ohmiya et al., 1999).

Por otro lado, en el hongo entomopatógeno *Metarhizium robertsii* las mutantes $\Delta Mrskn7$ pierden la capacidad de esporular, tienen defectos en la biosíntesis de la pared celular, pero no son sensibles al estrés oxidante ni osmótico; además, mostraron que la virulencia de las mutantes disminuyó, por afectaciones en la formación del *apresorium* y mecanismos para evadir la inmunidad del huésped; finalmente, la eliminación de *Mrskn7* desencadenó en autólisis celular (Shang et al., 2015).

Skn7 identificado en *Penicillium marneffeii* está involucrado en la respuesta al estrés oxidante, y se utilizó con éxito para complementar una cepa $\Delta skn7$ de *S. cerevisiae*, lo que

indica que la función Skn7 entre estos dos organismos está altamente conservada (Cao et al., 2009).

En el hongo endoparasitario nematodo *Hirsutella minnesotensis*, la interrupción del gen *Himskn7* lleva a una reducción en la conidiación, mayor sensibilidad a altas temperaturas, H₂O₂, manitol y etanol, y una menor resistencia al farnesol (fungicida); además, se encontró disminuída la capacidad endoparasitaria (virulencia) (Hussain et al., 2016).

En *Botrytis cinérea*, un hongo patógeno vegetal necrotrófico, encontraron un ortólogo de Skn7, BcSkn7, el cual pudo restaurar, en parte, los defectos de crecimiento de las mutantes $\Delta skn7$ en *S. cerevisiae* y viceversa. El mutante $\Delta BcSkn7$ reveló una mayor sensibilidad al estrés osmótico y oxidante iónico y a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol. Además, en esta mutante, también se vio afectado drásticamente la conidiación y formación esclerótica. También encontraron que BcSkn7 regula positivamente la fosforilación de BcSak1 (el ortólogo de *S. cerevisiae* Hog1) bajo estrés osmótico, pero no participa en la regulación de la virulencia (Yang et al., 2015).

Wang et al., (2018) obtuvieron cepas silenciadas con el gen *skn7* en *Ganoderma lucidum* las cuales mostraron hipersensibilidad al estrés oxidante y de pared celular; el contenido intracelular de EROs y la biosíntesis de ácido ganodérico aumentaron significativamente. Además, encontraron que las cepas silenciadas mostraron los principales genes antioxidantes atenuados (*sod1*, *sod2*, *cat1*, *cat2*, *gpx*, *apx*, *trr1* y *trx2*).

2.6.6.1.5 Skn7 y metabolismo secundario

Como ya se mencionó en el subtema anterior, la hipótesis de que Skn7 (SrrA en *Aspergillus*) participa en la regulación del metabolismo secundario, se basa en evidencia obtenida por Hong et al., (2013); la hipótesis se fundamenta en que la interacción de Skn7 con los ortólogos AP-1 lo involucra, aunque indirectamente, en la regulación del metabolismo secundario. La evidencia que encontraron fue un motivo conservado de 5 pb (5' AAGCC 3'), un sitio de reconocimiento para SrrA, en los promotores de los genes antioxidantes *cat1* y *Mnsod*, así como en los promotores de los genes biosintéticos de aflatoxinas, *fas-1* y *ver-1* en *A. parasiticus*. Sugiere que la ubicación de este sitio cerca del codón de iniciación ATG y de los sitios de unión a AP -1 en el promotor, es una posible prueba de la interacción física

entre SrrA y AP-1, y su participación en la regulación de la expresión de estos genes, en especial, la de aflatoxinas.

El estudio más reciente de Skn7 en hongos es el que se llevó a cabo en *Ganoderma lucidum*, en donde se evaluó su papel a través de la obtención de mutantes silenciadas, las cuales mostraron hipersensibilidad al estrés oxidante y de pared celular; además el contenido intracelular de EROs y la biosíntesis de ácido ganodérico aumentaron significativamente. Ellos encontraron que el aumento de MS se debía a que las EROs aumentaron, y esto lo demostraron cuando al disminuir los niveles de EROs intracelulares con NAC en las cepas silenciadas, el ácido ganodérico también disminuyó. Por lo que concluyen que GISkn7 podría regular la biosíntesis de ácido ganodérico a través de la regulación del nivel intracelular de EROs (Wang et al., 2018).

2.6.6.2 Msn2

Msn2 y Msn4 en *S. cerevisiae* (Msn2/4) son factores de transcripción de dedos de zinc Cys2His2 que se inducen como parte de la respuesta celular al estrés oxidante, así como a otros tipos de estrés, como el agotamiento de carbono, el choque térmico y el estrés osmótico. Msn2 y Msn4 son factores de transcripción redundantes, sin embargo, se sabe que Msn2 es el factor dominante de los dos (Martínez-Pastor et al., 1996; Montibus et al., 2015; Morano et al., 2012). Msn2/4 es conocido como MsnA en *Aspergillus*.

2.6.6.2.1 Activación de Msn2/4: vía AMPc/PKA

Msn2/4 tienen tres dominios funcionales separados, una señal de localización nuclear N-terminal (NLS), una señal de exportación nuclear C-terminal (NES) y un dominio de unión al DNA dedo de zinc también en el extremo C de la proteína. Estos dominios son esenciales para el reconocimiento de secuencias de elementos de respuesta al estrés (STRE, STress Response Elements). En ausencia de estrés, el dominio NLS en Msn2/4 es fosforilado por una proteína quinasa A dependiente de AMPc, o PKA, lo que hace que Msn2/4 permanezca secuestrado en el citoplasma. Ante el estrés nutricional por agotamiento de carbono, la actividad de la PKA se reduce, el NLS ya no se fosforila, y Msn2/4 se acumula rápidamente en el núcleo (Görner et al., 1998, 2002).

Los Msn2/4 fosforilados nucleares finalmente activan genes sensibles al estrés mediante la unión a secuencias STRE (consenso 5`-AGGGG-3`) ubicadas en las regiones promotoras, como se muestra en la Figura 14 (Kandror et al., 2004; Martínez-Pastor et al., 1996).

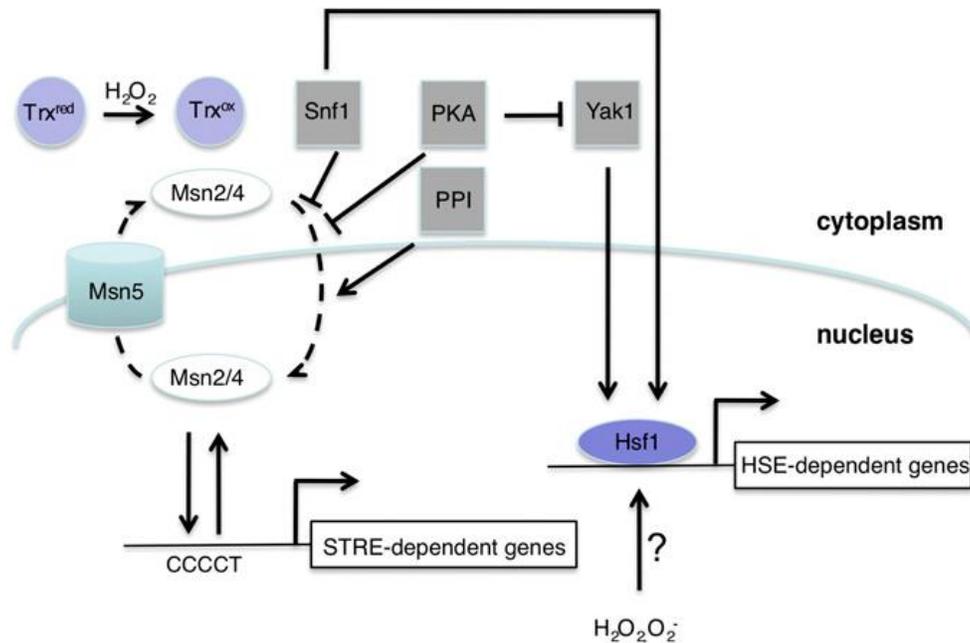


Figura 14. Regulación de Msn2/4 y Hsf1 por las proteínas de control de crecimiento Snf1 y PkA y el estrés oxidante. El H₂O₂ desencadena la oxidación de las proteínas citoplasmáticas de tiorredoxina (Trx^{ox}) desde su estado normalmente reducido (Trx^{red}), esto induce el reclutamiento de Msn2 al núcleo donde puede interactuar con su sitio de unión STRE y activar los genes diana. Hsf1 es constitutivamente nuclear y se une previamente a muchos genes diana que contienen elementos de choque térmico (HSE) en sus promotores (esquema tomado de Morano et al., 2012).

Como se acaba de mencionar, el control transcripcional (respuesta) al agotamiento de la fuente de carbono está mediada por la vía de señalización de la proteína quinasa A cíclica sensible a la glucosa (AMPC/PKA) que fosforila Msn2/4 en condiciones sin estrés para bloquear su importación nuclear, inhibiendo así la activación de los genes objetivo (Görner et al., 1998). Sin embargo, hay otras vías de transducción de señales que modulan la actividad de estos factores de transcripción, como la proteína quinasa dependiente de AMPC Snf1, la cual también fosforila y regula a la baja a Msn2/4 (De Wever et al., 2005).

Por otro lado, se ha encontrado evidencia de que la proteína fosfatasa PP1 parece desfosforilar directamente a Msn2/4 para desactivarla; también influye negativamente en la

actividad de Snf1, proporcionando así dos rutas diferentes de control para la actividad de Msn2/4 (c; Mayordomo et al., 2002).

La relación específica entre Msn2/4 y el estrés oxidante no está bien descrita, se piensa que estos factores transcripcionales responden a un desafío oxidante porque se encontró que activan genes de respuesta a estrés oxidante, sin embargo, se desconoce el mecanismo de regulación (Hasan et al., 2002).

Hay un trabajo llevado a cabo por Boisnard et al., (2009), en el que sugieren que la respuesta de Msn2/4 a estrés oxidante depende de las dos tiorredoxinas citoplasmáticas, Trx1 y Trx2; encontraron que la oxidación de estas tiorredoxinas es esencial para la acumulación nuclear de Msn2/4 y Maf1 (represor transcripcional), específicamente bajo tratamiento con H₂O₂. Además, demostraron que la acumulación nuclear inducida por H₂O₂ de Msn2 y Maf1 no se correlaciona con la regulación negativa de la actividad de la quinasa PKA (Figura 15).

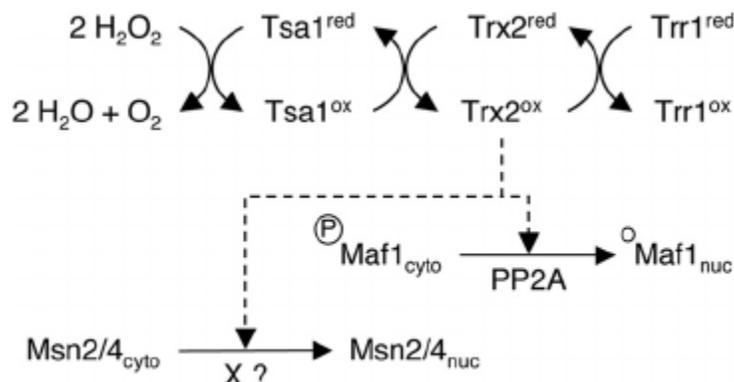


Figura 15. Modelo propuesto de la vía de señalización de tiorredoxina. En el curso de la desintoxicación de H₂O₂ por la tiorredoxina peroxidasa Tsa1, la tiorredoxina citoplasmática Trx2 se oxida (Trx2^{ox}), y al hacerlo, desencadenan la localización nuclear de Msn2/4 y Maf1, efectores de la respuesta general al estrés. "X" es una fosfatasa desconocida, que se requiere para la desfosforilación de Msn2/4 y la acumulación nuclear (Esquema tomado de Boisnard et al., 2009).

Los mecanismo de activación de Msn2/4 por estrés térmico y otros tipos de estrés, como el de pared, u osmótico, no están establecidos, sin embargo, hay evidencia de que la respuesta al estrés térmico por Msn2/4 no está mediada por AMPc/PKA (Morano et al., 2012).

2.6.6.2. Msn2/4 en hongos: fenotipo de mutantes $\Delta msn2/4$

En la levadura *C. glabrata*, se identificaron homólogos de *msn2* y *msn4* y se denominan *Cgmsn2* y *Cgmsn4*. *Cgmsn2* está regulado por el estrés ambiental, incluido el estrés osmótico, el choque térmico y el estrés oxidante provocado por el H_2O_2 ; se encontró que el modo de acción de *msn2* está bien conservado entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* (Roetzer et al., 2011).

En *C. albicans* se identificó un gen homólogo a *msn2*, al cual nombraron *mn11*, sin embargo, parece no desempeñar ningún papel en la resistencia a muchos estreses, incluido el choque térmico, el estrés osmótico por NaCl y el estrés oxidante por H_2O_2 , y no contribuyen a la respuesta transcripcional global del patógeno. No obstante, se requiere a *Mn11* para la adaptación de *C. albicans* a una respuesta de estrés por ácido débil (Ramsdale et al., 2008).

En *A. parasiticus* y *A. flavus*, el gen *msnA*, ortólogo a *msn2*, parece ser necesario para mantener un estado redox normal, pues encontraron que, en las cepas interrumpidas con este gen, la expresión de genes que codifican enzimas de defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa y citocromo c oxidasa en *A. parasiticus* y la catalasa A en *A. flavus*), estaban sobreexpresadas en ambas cepas. Además, la eliminación de *msnA* en *A. parasiticus* y en *A. flavus* resultó en una inhibición del crecimiento, pero aumentó la producción de conidios, EROs, aflatoxinas y ácido kójico (metabolitos secundarios) (Chang et al., 2011).

En los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* se encontró que la regulación transcripcional de los ortólogos de *Msn2* es vital para la conidiación, virulencia y respuesta a múltiples tipos de estrés; en el caso de la conidiación encontraron en las cepas $\Delta msnA$ una disminución del 40% y en virulencia 25%. Para ambos hongos, las mutantes interrumpidas perdieron del 20 al 65% de sus tolerancias a la hiperosmolaridad, la oxidación, la perturbación de la pared celular y la alta temperatura. Además, varios genes asociados a conidiación y virulencia fueron reprimidos (Liu et al., 2013).

En *Metarhizium rileyi*, las cepas $\Delta Mrmsn2$ (homólogo de *Msn2*), presentaron un aumento en la conidiación, sensibilidad al estrés, produjeron clones morfológicamente anormales, redujeron significativamente la formación de metabolitos secundarios y disminuyeron los niveles de virulencia (Song et al., 2018).

2.6.7 EROs y metabolismo secundario

Algunos estudios describen la modulación del metabolismo secundario por estrés oxidante, la mayoría se dedican a la biosíntesis de micotoxinas, y el modelo más estudiado son las aflatoxinas.

Se ha demostrado que la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Jayashree & Subramanyam, 2000; Reverberi et al., 2008) y *A. flavus* (Fountain et al., 2016), de ocratoxina A en *A. ochraceus* (Reverberi et al., 2012) y de tricotecenos B en *F. graminearum* (Ponts et al., 2007) es estimulada por EROs. Sin embargo, este vínculo ha sido explicado como un mecanismo de defensa antioxidante, es decir, que las micotoxinas antes mencionadas son moléculas antioxidantes, y por lo tanto son sintetizadas por los hongos como una respuesta ante el estrés oxidante. También está demostrado que la regulación por EROs de aflatoxinas es a nivel transcripcional (Kim et al., 2008).

Se ha encontrado que los compuestos antioxidantes con propiedades antifúngicas bien conocidas, como los fenólicos, son potentes inhibidores de la biosíntesis de micotoxinas en *Aspergillus spp.* (Kim et al., 2006; Mahoney & Molyneux, 2004). Por ejemplo, los componentes fenólicos antioxidantes de nueces, hongos shiitake o maíz pueden inhibir la biosíntesis de aflatoxinas por especies de *Aspergillus* (Mahoney & Molyneux, 2004; Nesci & Etcheverry, 2006; Reverberi et al., 2005). También se informó que los antioxidantes fenólicos como el ácido cafeico o el ácido clorogénico son inhibidores potentes de la producción de ocratoxina A por varias especies de *Aspergillus* (Palumbo et al., 2007). Se reportaron conclusiones similares para la producción de tricotecenos tipo B por *F. graminearum* que disminuyó significativamente en presencia de compuestos fenólicos, especialmente ácido ferúlico (Bakan et al., 2003; Boutigny et al., 2009).

Las evidencias de la regulación de metabolitos secundarios no sólo se limitan a micotoxinas, sino a otros metabolitos, como riboflavina (considerada como un pseudo MS) producida por *Ashbya gossypii*, en donde encontró que al adicionar H₂O₂ al medio aumenta la producción de riboflavina y al agregar vitamina E (antioxidante), la producción disminuye (Kavitha & Chandra, 2009; Walther & Wendland, 2012), y también en este modelo, sugieren que la

relación entre la riboflavina y el EOX es por un mecanismo de defensa del hongo filamentoso.

En el modelo de lovastatina en *A. terreus*, nuestro grupo mostró un vínculo entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina en FL y en FS. Se demostró que el gen *sod1* (enzima de defensa del estrés oxidativo) se expresó intensamente durante la fase de crecimiento rápido (o trofofase), pero paradójicamente, se redujo drásticamente en la fase de producción o idiofase, donde la concentración de EROs aumentó rápidamente a niveles altos que se mantuvieron durante fase de producción de lovastatina (Miranda et al., 2013). En un trabajo posterior, demostramos que EROs regula positivamente la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional (Miranda et al., 2014).

El ácido ganodérico es un MS bioactivo utilizado en la medicina tradicional China y es producido por el cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*, y su relación por EROs se ha demostrado claramente, además, ha sido reportado que la regulación por EROs es también a nivel transcripcional (Gao et al., 2018; W. X. Zhang & Zhong, 2010).

Shiraia bambusicola es un hongo parásito del bambú que produce hipocrelina A (pigmento fotosensibilizador), cuya biosíntesis también ha sido relacionada con EROs; mostraron que el cambio de luz / oscuridad (24: 24 h) no solo aumentó el contenido del metabolito en micelio en un 65%, sino que también estimuló su liberación al medio y que esto está mediado por EROs (Sun et al., 2018).

Además de los hongos, también se ha informado sobre *Streptomyces* cierta evidencia de que EROs regula MS. Se utilizó H₂O₂ para inducir la producción de validamicina A en *Streptomyces hygroscopicus* (Wei et al., 2011), mientras que Beites et al., (2011) informaron que las mutantes de *Streptomyces natalensis*, defectuosos en las enzimas desintoxicantes de H₂O₂, mostraban un fenotipo sobreproductor de pimaricina.

Como ya se mencionó en un subtema anterior, la regulación del metabolismo secundario fúngico en respuesta al estrés oxidante (obviamente, basado en la hipótesis de la regulación sólo para MS con actividad antioxidante) se ha atribuido previamente a la acción de varios de los factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante. Se ha sugerido que, en *Aspergillus spp.*, esta regulación está mediada por *srrA*, *apl1*, *msnA* o *atfB* (Hong et al., 2013;

Reverberi et al., 2008; Roze et al., 2011). Según Walther & Wendland, (2012), Ap1 juega un papel clave en la regulación de la biosíntesis de riboflavina por *A. gossypii*, y en la producción de tricotecenos por *F. graminearum* (Montibus et al., 2016). Atf1 parece estar involucrado en la producción de tricotecenos tipo B en *F. graminearum* (Van Nguyen et al., 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Los MS microbianos son compuestos con una variedad en estructuras químicas complejas, producidos principalmente por hongos y actinomicetos (Barrios-Gonzalez et al., 2003).

Los antibióticos penicilina y cefalosporina son los MS que más impacto mundial han tenido, hasta la fecha, tienen una gran importancia en la industria farmacéutica, pues siguen siendo de los antibióticos más utilizados (Elander, 2003); se calcula que del consumo mundial total de antibióticos, las penicilinas y cefalosporinas ocupan alrededor del 30%, de un mercado global de antibióticos que se valoró en 45.31 billones de dólares en 2018 (Grand View Research, 2019).

Por otro lado, la lovastatina es un MS que pertenece al grupo de las estatinas, moléculas capaces de reducir el colesterol en plasma (Seenivasan et al., 2008). Las enfermedades cardiovasculares están precisamente relacionadas con altos niveles de colesterol en plasma (hipercolesterolemia), y son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calculó que en 2015 murieron por esta causa 17,7 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Por esta razón, el control del colesterol mediante la inhibición de su biosíntesis ha sido una estrategia importante, y de aquí que las estatinas han tenido una extraordinaria importancia médica y económica. El éxito de las estatinas se refleja en su inmenso potencial de mercado con una venta promedio de US \$ 20 mil millones (Mulder et al., 2015). Tan sólo en el año 2010, se reportó que la estatina atorvastatina ocupó el primer lugar en ventas en Estados Unidos, generando 7.2 billones de dólares (Forbes, 2011). Aunado a esto, se ha demostrado que la terapia con estatinas tiene efectos biológicos positivos (además de la disminución del colesterol en plasma), representando una posible aplicación en enfermedades como el cáncer, osteoporosis, Alzheimer, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y el mal de Parkinson (Barrios-González & Miranda, 2010).

Debido a que los MS tienen gran importancia para el ser humano, cada vez se ha ampliado más el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan su biosíntesis (Brakhage et al., 2004; Keller et al., 2005). Uno de los modelos más estudiados es el de aflatoxinas, MS cancerígeno que es sintetizado por varias especies de *Aspergillus*. Se ha demostrado que este

MS es regulado por EROs a nivel transcripcional. Además, esta regulación ha sido justificada argumentando que, dado que las aflatoxinas tienen actividad antioxidante, es lógico que la biosíntesis de este compuesto (metabolitos secundarios con actividad antioxidante) esté regulada por EROs, por lo que su producción es parte del sistema de defensa general contra el estrés oxidante (Fountain et al., 2016; Hong et al., 2013; Kenne et al., 2018; Reverberi et al., 2010; Roze et al., 2013).

Los investigadores del modelo de aflatoxinas no sólo demostraron que la biosíntesis de este MS se induce e intensifica por la acumulación de EROs, además encontraron que el factor transcripcional AtfB (relacionado con el estrés oxidante) es un jugador clave en la expresión coordinada de genes antioxidantes y genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas. Proponen una red reguladora compuesta por al menos cuatro factores de transcripción (Yap1, AtfA, AtfB, SrrA y MsnA) que se unen no sólo a los genes diana (para la respuesta antioxidante) sino que, a su vez, de forma oportuna y coordinada, a los genes de biosíntesis de aflatoxinas, o en general, del metabolismo secundario (Hong et al., 2013).

Nuestro grupo de trabajo también encontró cierta evidencia de que factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante pudieran estar regulando la biosíntesis de lovastatina, pues tienen sitios putativos de unión a los promotores del gen biosintético *lovF* y del regulador transcripcional *lovE* (Miranda et al., 2014). Curiosamente, entre estos factores de transcripción destacan Yap1, AtfA, AtfB, SrrA y MsnA, los cuales Figuran dentro del modelo de regulación propuesto por Hong et al., (2013).

Además, recientemente, nuestro grupo mostró un vínculo entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina en FL y FS. Se demostró que el gen *sod1* (enzima de defensa del estrés oxidante) se expresó intensamente durante la fase de crecimiento rápido (o trofofase), pero paradójicamente, se redujo drásticamente en la fase de producción o idiofase, donde la concentración de EROs aumentó rápidamente a niveles altos que se mantuvieron durante fase de producción de lovastatina (Miranda et al., 2013). En un trabajo posterior, demostramos que las EROs regulaban positivamente la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional (Miranda et al., 2014).

Nosotros consideramos que las EROs regulan el MS fúngico, a nivel transcripcional, sin embargo, no creemos que esta regulación esté sujeta o sea exclusiva de MS con actividad

antioxidante, es decir, que la razón de ser de la regulación por EROs sobre el MS no es porque la célula utilice a los MS como parte de la defensa antioxidante.

En este sentido, el mecanismo de regulación por EROs no ha sido estudiado en *A. chrysogenum* ni en *P. chrysogenum*, cuyos MS, al igual que la lovastatina, son de gran importancia industrial.

Y en cuanto al modelo de lovastatina, es interesante establecer si los factores de transcripción SrrA y MsnA (los cuales no han sido caracterizados hasta ahora) participan en el circuito de regulación de la lovastatina en *A. terreus*.

De esta manera, la importancia de la presente investigación consiste en profundizar el conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la síntesis de MS, cuya información puede ser crucial para el desarrollo de procesos de producción más eficientes, o para mejoramiento genético de cepas industriales. Además, el aportar conocimiento acerca de la regulación de MS con importancia industrial, en este caso lovastatina, cefalosporina y penicilina, también puede ampliar el panorama de regulación para otros MS con actividades nocivas, cuyo objetivo es evitar su biosíntesis.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el papel de las Especies Reactivas de Oxígeno en la biosíntesis de penicilina G, cefalosporina C y lovastatina.

4.2 Particulares

- 1) Establecer si los MS penicilina G, cefalosporina C y lovastatina tienen actividad antioxidante.
- 2) Confirmar que las EROs son necesarias para la biosíntesis de penicilina G y cefalosporina C, mediante el empleo de oxidantes/antioxidantes exógenos.
- 3) Demostrar que las EROs inciden sobre la expresión del gen biosintético *pcbAB* en la biosíntesis de penicilina G y cefalosporina C.
- 4) Analizar el papel de los genes *AtsrrA* y *AtmsnA* sobre la biosíntesis de lovastatina y acumulación de EROs en FL y FS.

5. HIPÓTESIS

- La biosíntesis de penicilina G y cefalosporina C es regulada por EROs a nivel transcripcional.
- El factor transcripcional SrrA está implicado en la regulación positiva de la biosíntesis de lovastatina, por lo que las cepas silenciadas presentarán una disminución en la producción en fermentación sólida y líquida.
- El factor transcripcional MsnA también regula la biosíntesis de lovastatina, pero negativamente, por lo que las cepas silenciadas presentarán un aumento en la producción en fermentación sólida y líquida.

6. METODOLOGÍA

6.1 Microorganismos utilizados

Tabla 1. Microorganismos y cepas utilizadas en este trabajo.

Microorganismo	Cepa	Descripción
<i>Aspergillus terreus</i>	TUB F-514	Fue amablemente proporcionada por el Dr. G. Szakács, la cual fue aislada del suelo en el desierto de Irak, pertenece a la colección de la Technical University of Budapest, Hungría. Esta cepa fue la mejor productora de lovastatina en FL, y es considerada de alta producción (Szakács et al., 1998). Para los resultados de los genes silenciados, se va a referir a esta cepa como “Parental”.
	NIH2624	Aislada de un paciente por el Laboratorio de Pruebas de Hongos en San Antonio, Texas; fue secuenciada por el Broad Institute como parte de Broad Fungal Genome Initiative (iniciativa para ampliar los genomas fúngicos)(Birren et al., 2004).
<i>Penicillium chrysogenum</i>	NRRL 1951	Cepa que se aisló de un melón podrido en Peoria, Illinois, USA. Es la parental de la mayoría de las cepas productoras de penicilina de alto rendimiento (Backus & Stauffer, 1955).
	Wisconsin 54 12-55 (ATCC 28089)	Es una cepa de producción industrial que se derivó de la NRRL 1951 (Backus & Stauffer, 1955).
<i>Acremonium chrysogenum</i>	WT (ATCC 11550)	Es la cepa parental, aislada originalmente en 1945 de una muestra de agua de mar tomada cerca del alcantarillado (Brotzu G, 1948).
	C10 (ATCC 48272)	Una cepa que produce altos niveles de cefalosporina C, proveniente de la cepa CW-19, producida por PanLabs (Demain AL, 1983).
<i>Escherichia coli</i>	ESS 22-35	Cepa supersensible a antibióticos β -lactámicos.

6.2 Condiciones de cultivo

6.2.1 *Aspergillus terreus*

6.2.1.1 Propagación de esporas

Las esporas se generaron inoculando 30 μ L de un stock de esporas (guardadas en glicerol al 40% p/v a -20°C), sobre 30 mL de medio Power (Tabla 2) en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se incubó a 30°C durante 4-5 días; después, las esporas se colectaron con una solución de NaCl 0.9% p/v + Tween 80 al 0.02% v/v y fueron contadas con ayuda de la cámara de Newbawer. Estas esporas frescas son las que se usaron para inocular la FL y FS.

6.2.1.2 Fermentación Líquida

Se siguió tal cual el protocolo descrito por Miranda et al., (2013), sólo que la agitación de los cultivos fue a 230 rpm, el medio utilizado se describe en la Tabla 3.

6.2.1.3 Fermentación Sólida

Se siguió tal cual el protocolo descrito por Miranda et al., (2013), el medio utilizado se describe en la Tabla 3, pero a una concentración de 2.5X.

6.2.2 *Penicillium chrysogenum*

6.2.2.1 Propagación de esporas

Las esporas se generaron inoculando 100 µL de un stock de esporas (guardadas en glicerol al 40% p/v a -20°C), sobre 30 mL de medio Power (Tabla 2) en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se incubó a temperatura ambiente durante 7-9 días; después, las esporas se colectaron con una solución de NaCl 0.9% p/v + Tween 80 al 0.02% v/v y fueron contadas con ayuda de la cámara de Newbawer. Estas esporas frescas son las que se usaron para inocular la FL.

6.2.2.2 Cultivo semilla

Se inoculó 100 mL de medio semilla (Tabla 5) con 2×10^6 esporas/mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se cultivó a 28°C y 250 rpm por 28 h.

6.2.2.3 Fermentación líquida para producción de Penicilina

Se inoculó 50 mL de medio de producción (Tabla 6) con 10% v/v del cultivo semilla. Se incubó a 28°C, 250 rpm y diferentes tiempos.

6.2.3 *Acremonium chrysogenum*

6.2.3.1 Propagación del inóculo y Cultivo semilla

Se inocularon placas de 20 mL de medio CCM (Tabla 7) con 200µL de un conservado de suspensión celular (conidios + micelio) preparado en NaCl 0.9% p/v y resguardado a 4°C. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 días. Pasado este tiempo, se rasparon las placas con ayuda de una espátula, se pesó 0.7 g de este cultivo (micelio + conidios) y se maceró con 2 g de perlas de vidrio y un poco del medio semilla (Tabla 8) en vórtex por 1 min; finalmente, este macerado se añadió a matraces Erlenmeyer de 250 mL de tres baffles con 50 mL como volumen final de medio semilla (Tabla 8), se incubó a 28°C, 230 rpm por 28 h.

6.2.3.2 Fermentación líquida para producción de Cefalosporina C

Se inoculó 50 mL de medio complejo de producción 1X (Tabla 9) con 10% v/v de suspensión de cultivo semilla. Se incubó a 28°C, 230 rpm y diferentes tiempos.

6.2.4 Adición de antioxidantes y oxidantes exógenos

Los cultivos con antioxidante y oxidante se realizaron de igual como los describe Miranda et al., (2014). 1,1,3,3-tetrametil-2-tiourea (TMTU) (Sigma-Aldrich®) se empleó para los cultivos de *A. chrysogenum* y N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich®) para los cultivos de *A. terreus* y *P. chrysogenum*. Se empleó H₂O₂ (Sigma-Aldrich®) para todos ellos. Se añadieron antioxidantes y oxidantes al comienzo de la fermentación (idiofase). Se tomaron muestras de micelio a las 72 h para cuantificar EROs y MS.

6.3 Medios de cultivo

6.3.1 Medio de propagación de esporas (Power)

Tabla 2. Composición del medio Power, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH (Fierro et al., 1996).

Compuesto	g/L
Sacarosa	15
Lactosa	2.5
Bactopeptona	2.5
Sólidos de maceración	0.5
NaCl	2
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.28
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.275
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.0015
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0005
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005
Agar bacteriológico	20

6.3.2 Producción de Lovastatina

Tabla 3. Composición del medio de producción para lovastatina 1X, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH.

Compuesto	g/L
Lactosa	34
Glucosa	6
Harina de soya	3
KNO ₃	2
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
Solución de Elementos traza	1.25 mL

Tabla 4. Composición de la solución de Elementos Traza para el medio de producción de lovastatina.

Elemento	g/L
MnSO ₄	1.6
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.4
CaCl ₂ · 6H ₂ O	2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5

6.3.3 Medio semilla para *P. chrysogenum*

Tabla 5. Composición del medio semilla para *P. chrysogenum*, se ajusta el pH a 6 con NaOH (Somerson et al., 1961).

Compuesto	g/L
Sacarosa	20
Sólidos de maceración	20
Extracto de levadura	10
CaCO ₃	5

6.3.4 Medio de producción de Penicilina G

Tabla 6. Composición del medio de producción de penicilina G, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH (Somerson et al., 1961).

Compuesto	g/L
Lactosa	55
Sólidos de maceración	35
CaCO ₃	10
KH ₂ PO ₄	7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3
Fenilacetato potásico 40% p/v*	10 mL

*La solución de fenilacetato potásico al 40% p/v se prepara disolviendo el ácido fenilacético en KOH al 40% p/v, se ajusta el pH entre 8 y 8.2.

6.3.5 Medio completo CCM (*Cephalosporium* Complete Medium)

Tabla 7. Composición del medio completo CCM, se ajusta el pH a 7 con NaOH (Minut et al., 1982).

Compuesto	g/L
Caldo de soya tripticaseina Bioxon®	5
Glucosa	15
Sacarosa	3
Extracto de levadura	1
Extracto de Carne	1
NaCl	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
FeSO ₄	0.018
Agar bacteriológico	20

6.3.6 Medio semilla modificado

Tabla 8. Composición del medio semilla modificado, se ajusta el pH a 7 con NaOH (Adinarayana et al., 2003).

Compuesto	g/L
Glucosa	10
Almidón soluble de papa	15
Sólidos de maceración	5
Extractos de levadura	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
CaCO ₃	1

6.3.7 Medio complejo de producción de cefalosporina C

Tabla 9. Composición del medio complejo de producción de cefalosporina C 1X, se ajusta el pH a 6.5 con NaOH (López-Calleja et al., 2012).

Compuesto	g/L
Melaza de caña	30
Extracto de carne	30
Sólidos de maceración	5
CaCO ₂	1,5
KH ₂ PO ₄	5.105
K ₂ HPO ₄	6.13

6.4 Técnicas Analíticas

6.4.1 Determinación de la biomasa y pH

Para FL, la biomasa se determinó filtrando todo el contenido del cultivo (matraz) a través de toallas Magitel[®], después se pusieron a secar a 80°C a peso constante y se registró el peso seco. El pH se determinó midiéndolo directamente del caldo del cultivo.

Para FS, la biomasa no se pudo determinar con exactitud, sólo se midió el peso seco del cultivo (soporte + biomasa), haciéndolo del mismo modo que para FL. Para el pH, se tomó aproximadamente 1 g de cultivo y se sumergió en 10 mL de agua destilada, posteriormente, el pH se determinó midiéndolo directamente de esta suspensión.

6.4.2 Determinación de metabolitos secundarios

6.4.2.1 Lovastatina

Para las condiciones de extracción del MS de FL y FS, así como la determinación de lovastatina se siguió el protocolo previamente descrito por Miranda et al., (2013).

6.4.2.2 Penicilina G y Cefalosporina C

Fueron cuantificados por HPLC usando una variación del método descrito por Signs et al., (1984), se usó el sistema de análisis Waters® 600 de cromatografía líquida (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Los antibióticos fueron separados con una columna de fase reversa 5- μ M Waters Symmetry Shield TM RP-18 (4.6 x 250 mm) y con una precolumna 5- μ M Waters Symmetry Shield TM RP-18 (3.9 x 20 mm 2 pk). La fase móvil acuosa-orgánica fue 91-9% v/v, la cual consistió en 0.01 M de acetato de sodio pH 5.2 (JT Baker® 3470) / acetonitrilo:metanol (96:4% v/v) (JT Baker® grado HPLC 9012-9093), en modo isocrático a un flujo de 1 mL/min, usando un detector de arreglo de diodos (Waters 996). La cefalosporina C se determinó a 3.7 min a 254 nm y la Penicilina G a 5.5 min a 220 nm.

6.4.2.3 Antibióticos β -lactámicos

Se determinó por medio de bioensayos con *E. coli* ESS 22-35, se siguió tal cual el protocolo descrito por Liras & Martín, 2005. Se utilizó Cefalosporina C (Sigma-Aldrich®) como curva estándar.

6.4.3 Cuantificación de EROs

Se siguió el método montado previamente por Miranda et al., (2014), con la modificación de que sólo se tomaron 10 mg de biomasa y la reacción se llevó a cabo en 1 mL de buffer PBS¹.

6.4.4 Ensayo Antioxidante

Se realizó de dos maneras: sin micelio (en solución) y con micelio (en solución con células):

En solución, se llevó a cabo la siguiente mezcla en una placa negra de fondo claro de 96 pocillos (Sigma-Aldrich®) con volumen final de 200 μ L en buffer PBS¹: 50 mM de H₂O₂ (Sigma-Aldrich®) + antioxidante o MS a concentraciones finales de 5, 10, 20 ó 30 mM + 10 μ M H₂DFC-DA (Sigma-Aldrich®). Las reacciones fueron incubadas a 4°C en oscuridad por 15 min, después se cuantificaron las EROs en el lector de placas multimodal DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter®), a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Los antioxidantes probados fueron NAC (Sigma-Aldrich®) y Vitamina E (E-fertoc Vitae®). Los

¹PBS (g/L) = 8.01 NaCl, 0.1 KCl, 1.78 Na₂HPO₄, 0.27 KH₂PO₄; pH 7.4.

metabolitos secundarios fueron lovastatina β -hidroxiácida (proporcionada por Fermic SA de CV), cefalosporina C (Sigma-Aldrich[®]) y Penicilina G (Amsa[®]).

Con células: se añadieron 10 mg de micelio de 48 h de fermentación a 1 mL de buffer PBS¹ frío, posteriormente, se tomaron 150 μ L de esta suspensión y se colocaron en una placa negra de fondo claro de 96 pocillos (Sigma-Aldrich[®]), se mezcló con 50 mM de H₂O₂ (Sigma-Aldrich[®]) + antioxidante o MS a concentraciones finales de 5, 10, 20 ó 30 mM + 10 μ M H₂DFC-DA (Sigma-Aldrich[®]); la mezcla se llevó hasta volumen final de 200 μ L con PBS. El resto de los pasos se llevaron tal cual que “En solución”.

6.4.5 Extracción de RNA y Northern blot

Se siguieron los mismos protocolos montados por Barrios-González et al., (2008), con las siguientes modificaciones:

Para la extracción de RNA: después de obtener el RNA total por el método de Trizol[®], se purificó con el kit “SV Total RNA Isolation System” de Promega[®], siguiendo las instrucciones del proveedor, además, las membranas se cargaron con 20 μ g de RNA total.

Para el Northern blot: se utilizó el kit de marcaje “Random Primer DNA Labeling Kit” de Takara[®], y se siguió el protocolo del proveedor. Una vez marcadas las sondas, éstas se purificaron a través de columnas empacadas con Sephadex[®] G-25.

6.4.5.1 Sondas

Las sondas se amplificaron a partir de DNAg de los hongos (*P. chrysogegum*, *A. chrysogenum* y *A. terreus*) utilizando los oligos correspondientes descritos en la Tabla 10.

El DNAg se purificó siguiendo el protocolo de Barrios-González et al., (2008). Las sondas se amplificaron utilizando GoTaq Flexi DNA polimerasa de Promega[®], se siguió las instrucciones del proveedor. Una vez sintetizadas se purificaron con “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” Promega[®]; finalmente se cuantificaron en NanoDrop 2000 ThermoScientific[®].

Tabla 10. Oligos utilizados para los análisis de expresión por Northern blot.

Nombre	Oligo	Secuencia 5' → 3'	Tm óptima (°C)
<i>pcbAB</i>	F	ATACTGTGCTGCTAGTGACGG	64
<i>P. chrysogenum</i>	R	GCGTACTTGGTCGAGATACAT	
<i>pcbAB</i>	F	TGGAACAGTGGAAAGACTACGG	64
<i>A. chrysogenum</i>	R	CCCTTTTCGACACCATGGTCA	
<i>AtsrrA</i>	F	TGGATGATGTGCTTCCCAAACC	66
	R	GCCAGATCTCGGAAATGTCCAG	
<i>AtmsnA</i>	F	TCTCGACCAACAGTTCCTGCC	66
	R	CCTCGTCTTCGGACAGCGAAT	

6.5 Silenciamiento de *AtsrrA* y *AtmsnA*

6.5.1 Obtención de mutantes silenciadas

Para la transformación se partió de las construcciones (pGpdPpki-*srrA* y pGpdPpki-*msnA*) obtenidas en maestría (Bibián, 2015), y se siguió el mismo protocolo de transformación de transformación genética en *A. terreus*, partiendo de la cepa TUB-F514 (parental). También se siguió el mismo protocolo de aislamiento de mutantes, sólo que con 120 µg/mL de fleomicina para el primer pase, y 140 µg/mL para el segundo.

6.5.2 Ensayos de sensibilidad a diferentes tipos de estrés

Pruebas de estrés en micelio: estos ensayos se realizaron en cajas para bioensayo con 200 mL de medio papa dextrosa (PDA) Bioxon®. Para inducir EOX se añadió al medio 2.5 mM de H₂O₂ Sigma-Aldrich®; para estrés osmótico se añadió 1 M de NaCl J.T. Baker; para estrés de pared se añadió 7 g/mL de rojo Congo Sigma-Aldrich®. Las placas se inocularon con 10 µL de una suspensión de esporas a diferentes concentraciones (1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶ y 1x10⁷ esporas/mL), las cuales fueron obtenidas como se indicó en 6.2.1.1. Se analizaron las mutantes silenciadas y los controles (cepa parental y cepa VSI). Se cultivaron a 30°C durante 72 h.

6.5.3 Validación de mutantes silenciadas

6.5.3.1 Prueba de integración

El DNAg de las mutantes y los controles se purificaron siguiendo el protocolo de Barrios-González et al., (2008). Se diseñaron oligos que hibridaran en los promotores constitutivos (pki, piruvato quinasa y gpdA, gliceraldehído3-fosfo-deshidrogenasa) del vector de silenciamiento (Tabla 11), con el objetivo de amplificar el inserto completo (fragmento del gen diana). Estos fragmentos se amplificaron utilizando GoTaq Flexi DNA polimerasa de Promega[®], se siguió las instrucciones del proveedor. Una vez sintetizadas se purificaron con “Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System” Promega[®], y se dispusieron para un análisis de secuenciación.

Tabla 11. Oligos utilizados para el análisis de integración del inserto en el vector de silenciamiento.

Nombre	Oligo	Secuencia 5' → 3'	Tm óptima (°C)
pki	F	GTGAATTGCTTTTGGTCTTCCC	64
gpdA	R	GCTGTTAGTCAAGCTGCGATG	

6.5.3.2 Prueba de silenciamiento

Se realizó un Northern blot tal como se describió en el apartado 6.4.5, utilizando los oligos *AtsrrA* y *AtmsnA*.

7. RESULTADOS

7.1 Penicilina y cefalosporina también son regulados por EROs a nivel transcripcional

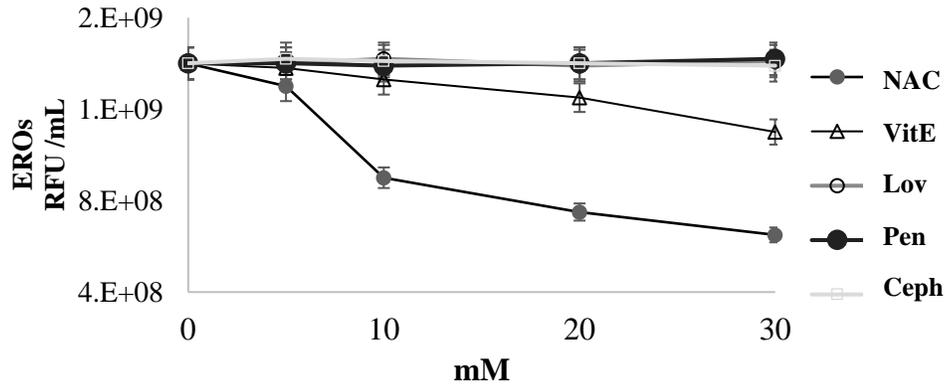
7.1.1 Pruebas de capacidad antioxidante en Lovastatina, Penicilina G y Cefalosporina C

Para evaluar si los MS de estudio (Lov, Pen y Ceph) poseen actividad antioxidante, se cuantificaron las EROs en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con concentraciones ascendentes de Lov, Pen o Ceph. El efecto sobre la concentración de las EROs fue comparado con experimentos donde los antioxidantes NAC (N-acetil-L-cisteína) o vitamina E fueron añadidos también en concentraciones ascendentes.

Como se observa en la Figura 16-A, ninguno de los MS probados mostró ninguna actividad antioxidante. Los niveles de EROs no bajaron en las muestras cuando se añadieron diferentes concentraciones de Lov (hasta 30 mM). El mismo perfil fue obtenido cuando Pen o Ceph fueron añadidos en lugar de Lov. Por el contrario, la concentración de las EROs rápidamente bajó cuando, el bien conocido antioxidante NAC, fue añadido en lugar de los MS. Y aunque en menor medida, las EROs también decrecieron con la adición de vitamina E.

Para evaluar la posible actividad antioxidante de los MS de estudio en un ambiente de contacto con contenido celular de cada respectivo hongo, se tomó micelio de cultivos de 48 h de Lov, Pen y Ceph, los cuales se incluyeron en los experimentos. Y como se hizo en el caso previo, las EROs se cuantificaron en muestras con cantidades ascendentes de Lov, Pen y Ceph. Se obtuvieron perfiles similares en estas soluciones con micelio, por ejemplo, no se detectó decremento en las EROs cuando Lov, Pen o Ceph fueron añadidas, en ninguna de las concentraciones usadas. Estos resultados refuerzan los obtenidos en el experimento previo (Figura 16-B).

A) En solución



B) Con células

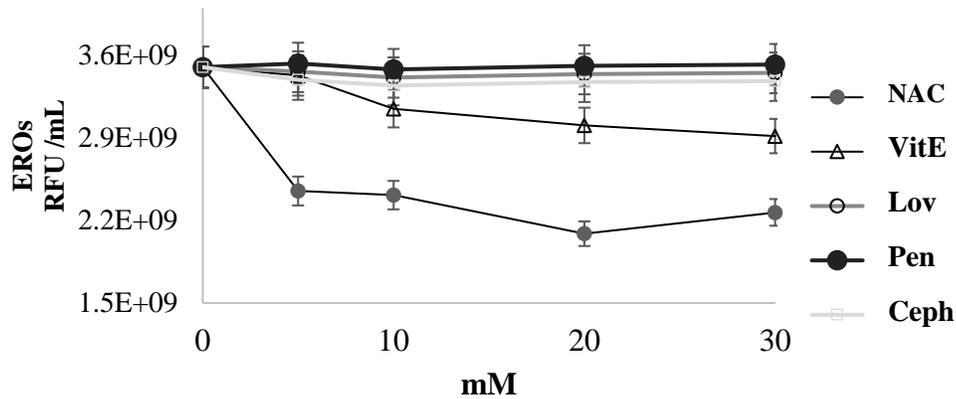


Figura 16. Ensayos antioxidantes para lovastatina, penicilina y cefalosporina. Las EROs fueron cuantificadas en: a) en solución, con 50 mM de H₂O₂ y diferentes cantidades de metabolito secundario o de antioxidantes conocidos (0 a 30 mM). b) con micelio, en un ensayo similar, pero incluyendo el micelio correspondiente (10 mg). NAC (●), Vitamina E (Δ), Lovastatina (○), Penicilina G (●) y Cefalosporina C (○). RFU= unidades relativas de fluorescencia.

7.1.2 Perfil de acumulación de EROs en cinéticas de producción de Penicilina G y Cefalosporina C

Las EROs fueron cuantificadas en el micelio de *Penicillium chrysogenum* durante la fermentación de penicilina. Y como fue hipotetizado, las EROs también se acumularon en idiofase en este hongo. Como se puede observar en la Figura 17, se detectó un leve incremento a las 46 h, seguido de uno fuerte a las 51 h. La biosíntesis de penicilina inicia a las 46 h y fue detectado en el medio a las 51 h. Una concentración relativamente alta de EROs fue observada durante el resto de la idiofase, mientras que la producción de Pen continuó en una tasa relativamente alta hasta las 96 h (Figura 17).

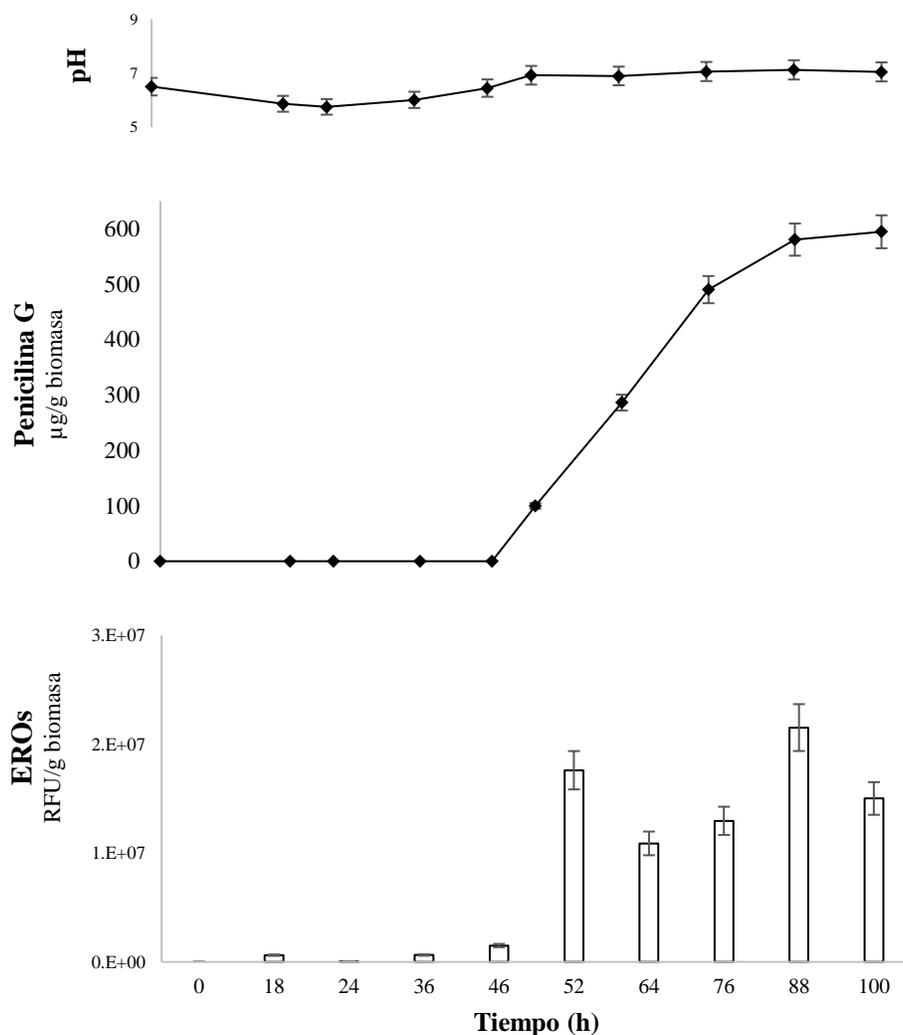


Figura 17. Cinética de acumulación de EROs y producción de Penicilina G por *P. chrysogenum*.

Resultó interesante que la acumulación de EROs en idiofase también se observó en la fermentación de Ceph. Bajo las condiciones usadas, *Acremonium chrysogenum*, inició la producción de Ceph a las 46 h y continúa, a una tasa rápida, hasta las 75 h (Figura 18). A pesar de que hubo un incremento leve de EROs a las 36 h, se detectó una importante acumulación a las 46 h, aumentando suavemente para alcanzar su valor más alto a las 75 h.

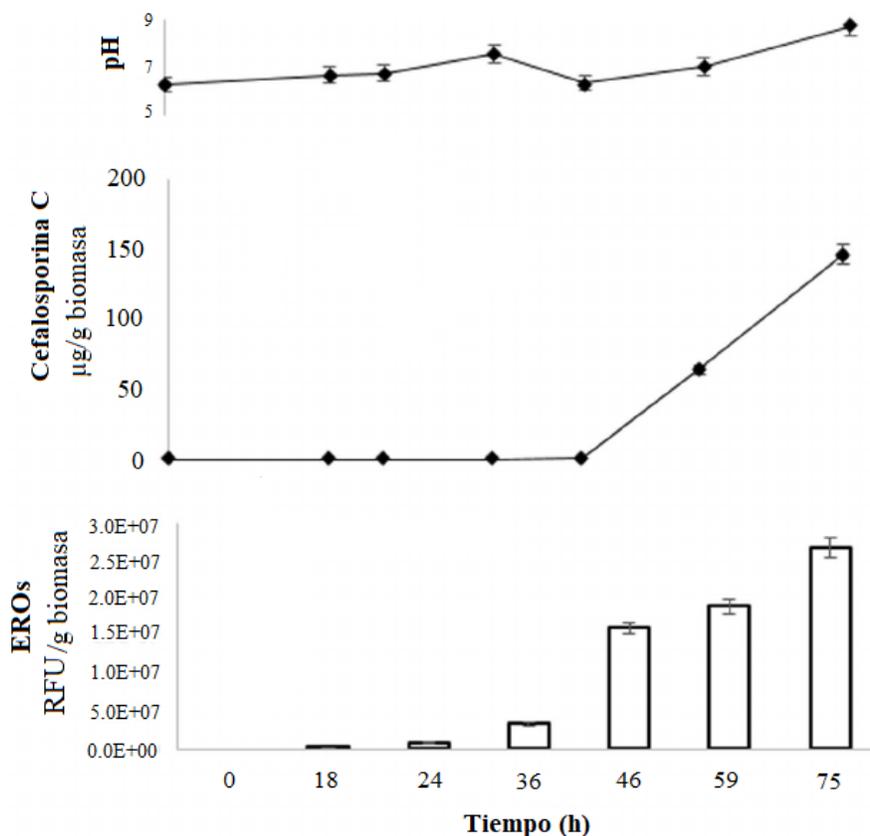


Figura 18. Cinética de acumulación de EROs y producción de Cefalosporina C por *A. chrysogenum*.

7.1.3 Efecto de la adición de antioxidantes

Para estudiar la función de las EROs sobre los MS, la concentración de éstas en idiofase fueron atenuadas por medio de la adición de antioxidantes exógenos a los cultivos, al inicio de la idiofase en los cultivos de producción.

Las fermentaciones de Pen y Ceph con concentraciones ascendentes (0 a 50 mM) del antioxidante NAC, fueron analizadas a las 72 h. Así como se encontró previamente con Lov (cuyo modelo se usó como control en todos estos experimentos), la reducción del contenido de las EROs en idiofase trajo consigo una disminución en la producción específica de Pen en *P. chrysogenum*, también de manera proporcional (Figura 19-A). En este caso, la producción de penicilina disminuye alrededor del 50% cuando las EROs fueron reducidas un 52.6% en los cultivos con 2 mM de NAC. No se encontraron diferencias significativas en la biomasa o el pH en los cultivos.

Por razones desconocidas, el decremento de EROs con NAC fue muy difícil en los cultivos con *A. chrysogenum*. Incluso con la concentración máxima de NAC usada (100 mM), los niveles de EROs sólo bajaron levemente. Consecuentemente, la producción de Ceph no decreció en ninguna concentración de NAC probada (datos no mostrados).

7.1.3.1 Uso de otro antioxidante: TMTU

Considerando el extraño comportamiento de *Acremonium* con NAC, se usó otro antioxidante: TMTU. Este antioxidante fue probado también en cultivos de Lov y Pen, obteniendo comportamientos similares en producción y EROs (datos no mostrados).

Curiosamente, usando este antioxidante en *A. chrysogenum*, los cultivos sí disminuyeron la concentración de EROs. Y como se puede observar en la Figura 20-A, 20 mM de TMTU disminuyó casi a la mitad las EROs, causando una reducción del 57% en la producción de Ceph. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de la biomasa o el pH casi en todos los cultivos, a excepción del cultivo con 40 mM de TMTU, el cual tuvo una pequeña diferencia significativa.

7.1.4 Efecto de EROs exógenas

En una siguiente etapa, se evaluó el efecto de las EROs exógenas sobre la biosíntesis de los MS. Se analizaron cultivos de Pen con concentraciones ascendentes de H₂O₂ exógeno. Y como se puede ver en la Figura 19-B, la adición de H₂O₂ causa un incremento proporcional en la concentración de las EROs intracelulares en el micelio de idiofase. Por lo tanto, cultivos con concentraciones elevadas de EROs causa una mayor producción específica de Pen, alcanzando el máximo en cultivos con 70 mM de H₂O₂ (incremento del 53.3% en la producción específica). Cultivos con altas concentraciones (75 mM y 100 mM) provocan un decremento significativo en la producción. Sorprendentemente, la concentración de las EROs intracelulares no aumentó más en estos dos cultivos.

Es importante notar que no se detectaron diferencias en la concentración de la biomasa o el pH final (excepto un ligero decremento en 75 mM y 100 mM), y la producción volumétrica incrementa en el mismo porcentaje.

El mismo efecto de las EROs exógenas en el incremento de las EROs intracelulares, y por lo tanto sobre la producción específica fue obtenida en la fermentación de Ceph. Sin embargo,

en este caso, el incremento de la producción específica fue incluso más pronunciada (Figura 20-B). La producción específica del antibiótico alcanzó el máximo en cultivos con 100 mM de H₂O₂ (643 mg de Ceph/gb), representando un aumento del 145.7% en relación con el control. Después de esta concentración de H₂O₂, la producción se estanca. Cultivos con 130 mM de H₂O₂ sólo produce hasta 402 mg/gb (Tabla 12).

Curiosamente, no se encontraron diferencias en las EROs intracelulares en los cultivos de 100 mM e incluso más altos, a pesar de que hubo una importante y significativa disminución en la biomasa, además de un incremento en el pH (datos no mostrados).

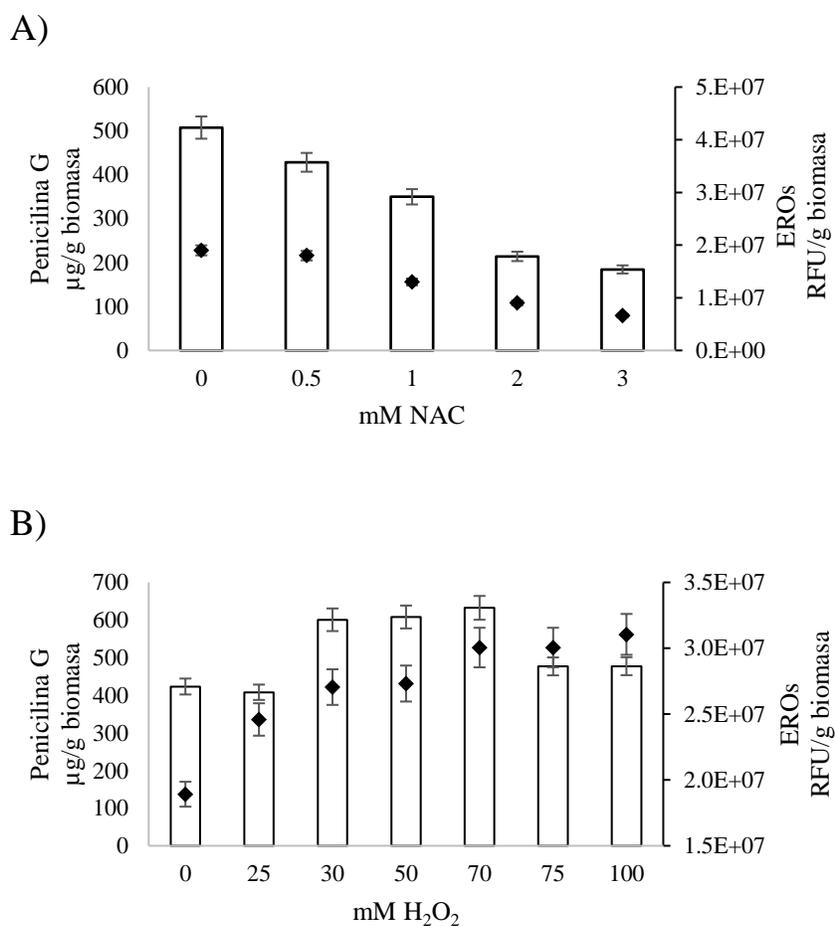


Figura 19. Efecto del NAC (panel a) y H₂O₂ (panel b) sobre la biosíntesis de penicilina G (□) y sobre el contenido intracelular de EROs (♦), en cultivos de 72 h. Cultivos con 30 y 50 mM de H₂O₂ en panel b, así como cultivos con 0, 1, 2 y 3 mM de NAC en panel a, presentaron diferencia significativa en la concentración de EROs y la producción específica de penicilina, en relación con el control, esto de acuerdo a las pruebas de ANOVA y Dunnett's post hoc (p>0.05).

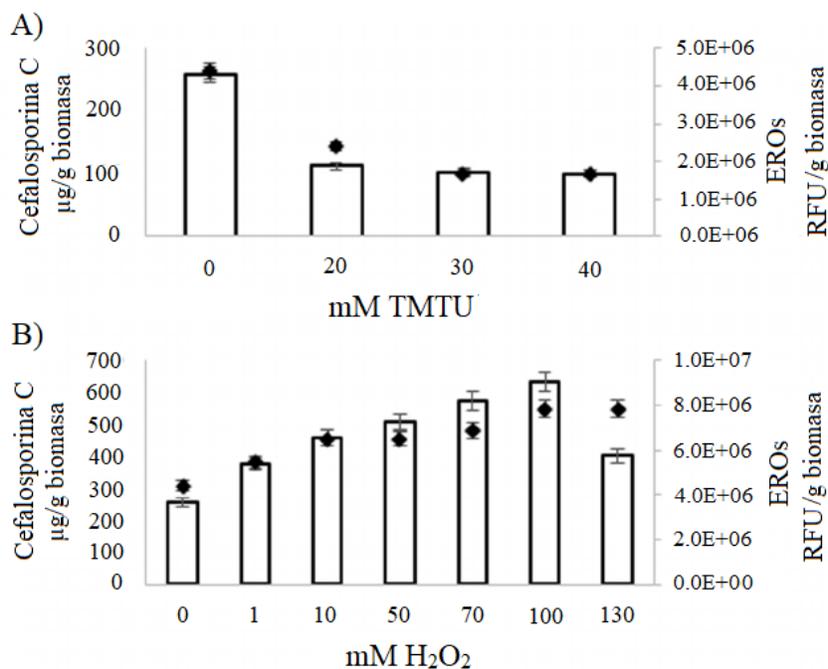


Figura 20. Efecto del TMTU (panel a) y H₂O₂ (panel b) sobre la biosíntesis de cefalosporina C (□) y sobre el contenido intracelular de EROs (◆), en cultivos de 72 h. En los paneles a y b, todos los cultivos mostraron diferencia significativa en la concentración de EROs y la producción específica de cefalosporina en relación con el control, esto de acuerdo con las pruebas de ANOVA y Dunnett`s post hoc (p>0.05).

Tabla 12. Concentraciones exógenas de H₂O₂ en los cultivos que muestran la producción máxima de los metabolitos, y los niveles internos de EROs.

	EROs en idiofase * (RFU/g biomasa)	H ₂ O ₂ en máxima producción**(mM)	EROs en máxima producción (RFU/g biomasa)	Incremento de producción (%)
Lov	$3.4 \times 10^8 \pm 0.137 \times 10^8$	100	$3.82 \times 10^8 \pm 0.183 \times 10^8$	18.8
Pen	$1.8 \times 10^7 \pm 0.081 \times 10^7$	70	$2.71 \times 10^7 \pm 0.109 \times 10^7$	48
Ceph	$4.2 \times 10^6 \pm 0.16 \times 10^6$	100	$7.9 \times 10^6 \pm 0.387 \times 10^6$	142

*Concentración de EROs naturales en el control, cultivos de 72.

**Concentración de H₂O₂ en cultivos con producción alta de metabolito.

7.1.5 Análisis transcripcional sobre la manipulación de EROs en cultivos de penicilina G y cefalosporina C

La última etapa fue evaluar si la regulación por EROs de Pen y Ceph es, al igual que Lov, a nivel transcripcional.

Se realizó un análisis transcripcional por Northern blot de los genes *pcbAB* de *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*. Se extrajo RNA del micelio de cultivos de 72 h con antioxidante (atenuación de EROs) u oxidante (estimulación de EROs), cuyas concentraciones fueron en los cultivos de penicilina 70 mM de H₂O₂ y 2 mM de NAC; para los cultivos de cefalosporina, los tratamientos fueron 70 mM de H₂O₂ y 20 mM de TMTU.

Y, como ya se había demostrado, la producción de Pen disminuyó cuando las EROs fueron atenuadas, y aumentó cuando éstas se estimularon con H₂O₂, pero además, esta manipulación de las EROs tuvo un efecto directo sobre la transcripción del gen biosintético *pcbAB*, el cual se reprimió por completo cuando el NAC se añadió al cultivo (atenuación de EROs) y aumentó su expresión 52% cuando los niveles de EROs aumentaron con el oxidante exógeno (Figura 21-B).

La expresión del gen *pcbAB* de *A. chrysogenum* también se vio afectada directamente por la manipulación de las EROs, atenuándose 35% en presencia de TMTU, y aumentando 89% su expresión cuando el H₂O₂ fue añadido al medio de cultivo (Figura 21-A).

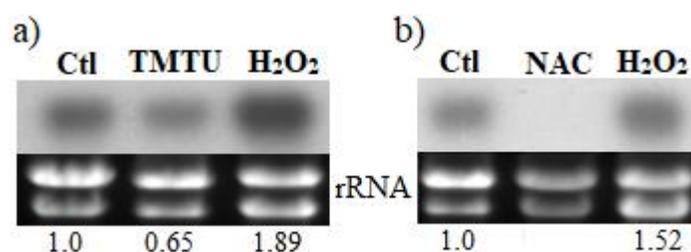


Figura 21. Análisis transcripcional (Northern blot) de los genes *pcbAB* de *A. chrysogenum* y de *P. chrysogenum* en cultivos líquidos de 72 h. En el panel A, se observa el efecto del antioxidante TMTU y del oxidante H₂O₂ sobre la expresión de *pcbAB* de *A. chrysogenum* en comparación con el control (sin tratamiento); en el panel B, se observa el efecto del antioxidante NAC y del oxidante H₂O₂ sobre la expresión de *pcbAB* de *P. chrysogenum* en comparación con el control. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (software de imagen, NIH) y los valores resultantes se normalizaron con los obtenidos para la señal de rRNA. Los valores normalizados se expresan como una fracción del valor del control, al cual se le asignó un valor de uno.

7.2 Perfil de EROs en cepas de alta y baja producción

Una vez que se demostró que las EROs también regulan la biosíntesis de Pen y Ceph a nivel transcripcional, el siguiente paso fue evaluar si el nivel de acumulación de EROs prevalecía entre cepas con diferente grado de producción, por lo que se obtuvo el perfil de EROs en dos tipos de cepas: una de alta y otra de baja producción del metabolito secundario, esto para *A. terreus*, *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*.

7.2.1 *Aspergillus terreus*

Como se puede observar en la Figura 22, el perfil de EROs en las cepas de *A. terreus* resultó ser similar (bajo en trofofase y alto en idiofase), independientemente de que la cepa TUB F-514 produce 3 veces más que la cepa NIH2624, ambas cepas arrancan la idiofase a las 24 h. No hubo diferencia en biomasa, ni en pH, a excepción del cultivo de 72 h de la cepa NIH2624, donde el pH bajó hasta 4.87, mientras que la TUB F-514 se mantuvo en 6.3.

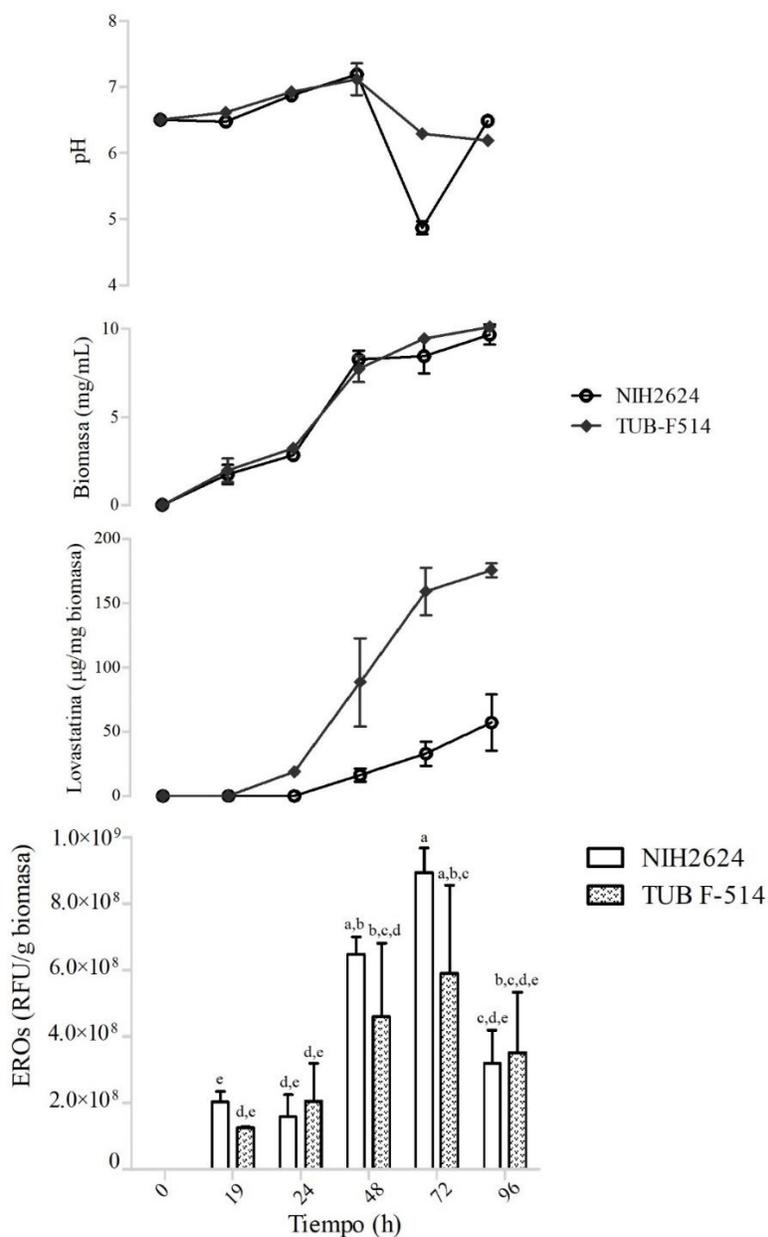


Figura 22. Perfil de acumulación de EROs, lovastatina, biomasa y pH en *Aspergillus terreus* en una cepa de alta producción (TUB F-514) y otra de baja producción (NIH2624). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).

7.2.2 *Penicillium chrysogenum*

Para la producción de penicilina G, como ya era conocido, la cepa NRL1951 produce muy poco, a penas y se logró detectar (5.09 ± 0.928 $\mu\text{g/g}$ biomasa), además de que la producción empieza a decaer desde las 92 h, en cambio, la cepa Wis 14-1255 produce 100 veces más y la producción se mantiene hasta las 112 h (908.67 ± 50.37 $\mu\text{g/g}$ biomasa). Por otro lado, y al igual que en *A. terreus*, las EROs tuvieron el mismo perfil en ambas cepas; aunque a las 20 y 68 h, sí hay diferencia significativa en los valores de EROs entre cepas, el comportamiento del perfil de acumulación es el mismo: altos-bajos y bajos-altos (Figura 23).

En cuanto a la biomasa, el punto de las 92 h de WIS 14-1255 sí es significativamente diferente con la otra cepa; los valores de pH se encontraron más elevados significativamente en la cepa de baja producción a los tiempos de 68, 92 y 112 h.

7.2.3 *Acremonium chrysogenum*

Y como se planeó, la diferencia en la producción de β -lactámicos entre las cepas de alta y baja producción en *A. chrysogenum* fue muy marcada: 0.777 ± 0.0936 vs. 28.6 ± 1.4 mg/g biomasa. Pero también se observó que el perfil de producción estuvo desfasado por 24 h entre cepas, pues la cepa de alta producción llega al máximo a las 68 h, mientras que la WT alcanza el máximo hasta las 92 h (Figura 24).

Siguiendo el mismo patrón obtenido para los otros hongos, el perfil de EROs en *A. chrysogenum* fue el mismo para ambas cepas. Como se puede observar en la Figura 24, en todos los tiempos, la acumulación de EROs es similar en ambas cepas, a excepción de las 92 h, donde sí hay diferencia significativa, sin embargo, y al igual que en Pen, el perfil se mantiene: bajas-altas-bajas. No hubo diferencia significativa en biomasa, pero sí en pH en idiofase, donde la cepa C10 alcanzó valores de hasta 8.5.

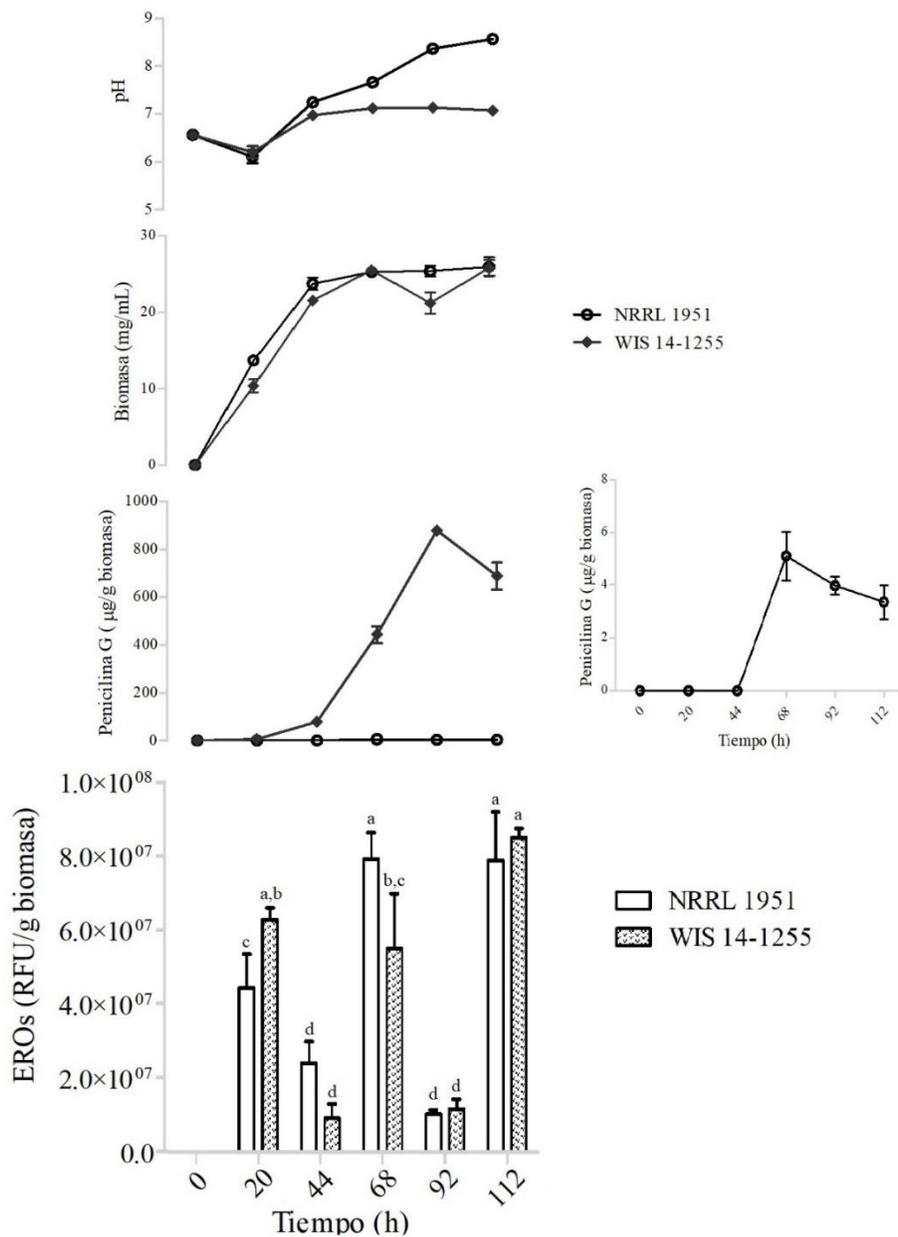


Figura 23. Perfil de acumulación de EROs, penicilina G, biomasa y pH en *Penicillium chrysogenum* en una cepa de alta producción (WIS 14-1255) y otra de baja producción (NRRL 1951), nótese la escala de producción de penicilina G por la cepa NRRL 1951 (gráfico derecho). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).

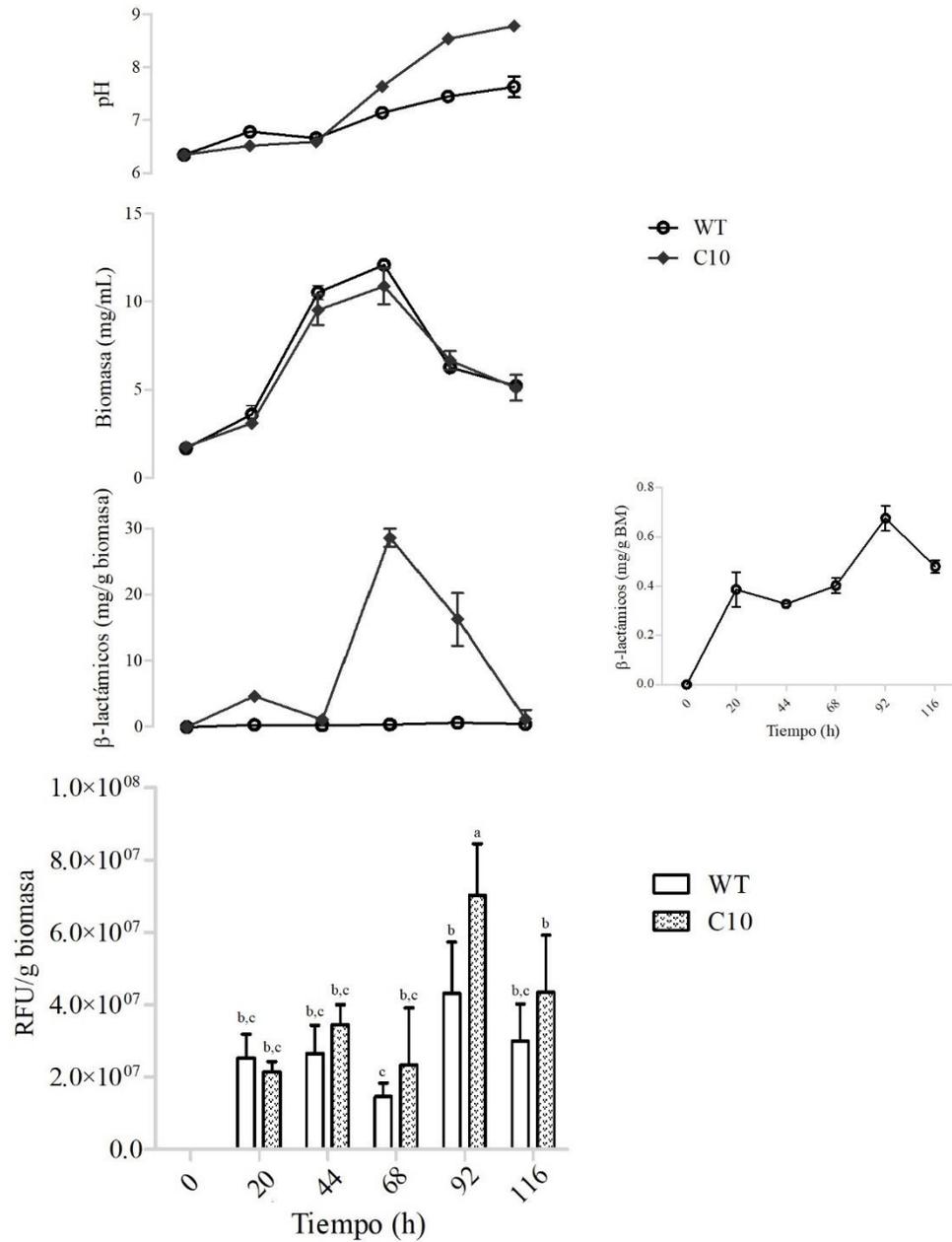


Figura 24. Perfil de acumulación de EROs, β -lactámicos, biomasa y pH en *Acremonium chrysogenum* en una cepa de alta producción (C10) y otra de baja producción (WT), nótese la escala de producción de β -lactámicos por la cepa WT (gráfico derecho). Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).

7.3 *SrrA* y *MsnA* como nexos entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina

7.3.1 Obtención de mutantes silenciadas

Partiendo de las construcciones de silenciamiento (obtenidas en un trabajo previo) se realizaron dos lotes de transformación para el gen *AtsrrA* y uno para *AtmsnA*.

Se obtuvieron 35 transformantes *SisrrA*, sin embargo, 15 de ellas no fueron capaces de crecer en una concentración de fleomicina más elevada (140 µg/mL, equivale al segundo pase).

De las *SimsnA* se obtuvieron 45, y todas ellas crecieron sin problema a 140 µg/mL de fleomicina.

7.3.2 Caracterización de mutantes *SisrrA* y *SimsnA*

Debido a que era inviable someter a las 80 transformantes a las pruebas de validación, se decidió hacer un filtro previo, sometiéndolas a pruebas de respuesta a diferentes tipos de estrés, esperando obtener fenotipos de hipersensibilidad, y de esta manera, poder descartar aquellas mutantes que no entraran dentro de este perfil hipotético.

Se pusieron a crecer a las mutantes en presencia de estrés oxidante (inducido por H₂O₂) y osmótico (inducido por NaCl); debido a la alta variabilidad de las *SisrrA*, se realizó un tercer análisis para ellas, que fue estrés de pared (inducido por rojo Congo).

Se obtuvieron resultados inesperados, pues no hubo fenotipos de hipersensibilidad, sino sólo de sensibilidad y en menos del 70% de la población.

Para las *SisrrA*, el panorama estaba más complicado aún, pues se tenían dos grupos de transformantes, las que no crecieron en concentración alta de fleomicina (R120) y las que sí resistieron (R140). Lo que se obtuvo fue que en el grupo R120 el 67% eran sensibles a EOX, pero en el grupo R140 sólo el 37%. Y sólo unas cuantas presentaron cierta sensibilidad a estrés de pared, en su mayoría pertenecían al grupo R120 (Figura 25); ninguna mostró sensibilidad a EOS. Estos análisis se repitieron, y se obtuvo que las R140 tenían comportamientos extraños, pues algunas ya no presentaban la sensibilidad a EOX, e incluso, parecían resistentes, por lo que se decidió sólo continuar con las mutantes R120 para la validación.

En cuanto a las *SimsnA*, la sensibilidad a EOX sólo se encontró en el 33% de la población (Figura 25). Y se eligieron algunas de este grupo para las pruebas de validación.

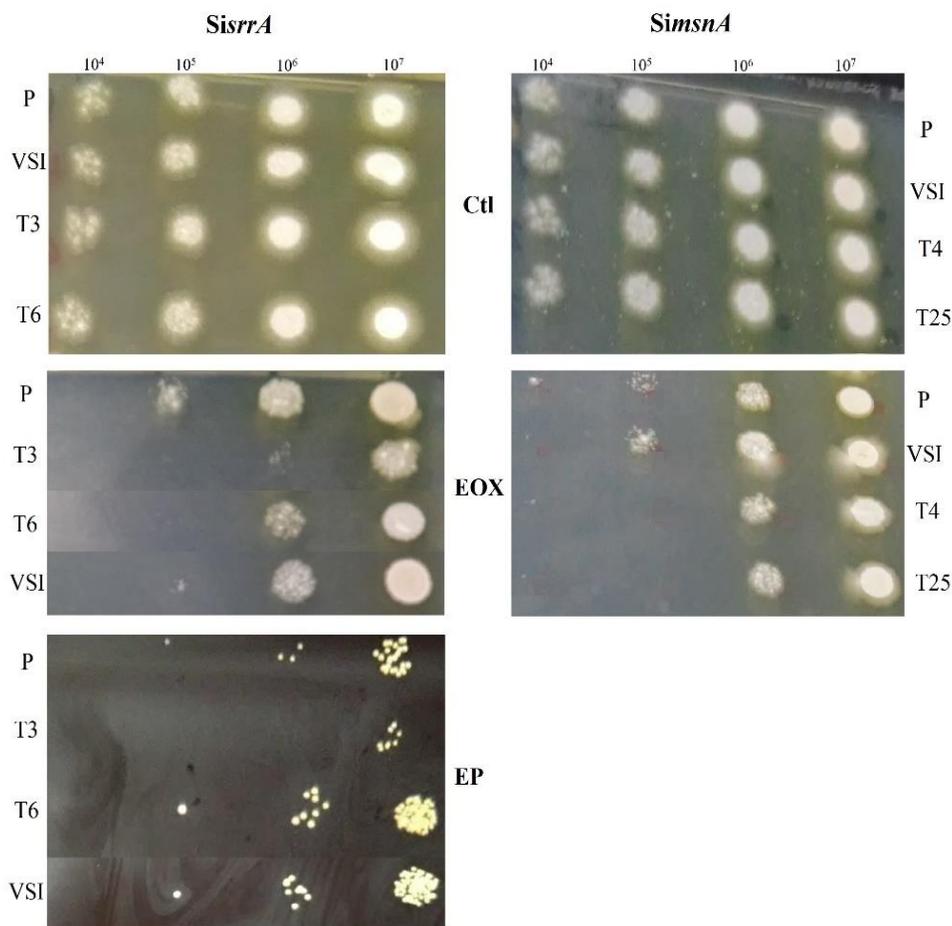


Figura 25. Crecimiento de las mutantes silenciadas *SisrrA* T3 y T6, y T4 y T25 de *SimsnA* a las 72 h. CTL se refiere al cultivo sin tratamiento, EOX es el cultivo con 2.5 mM de H₂O₂ y EP corresponde al cultivo con 7 g/mL de rojo Congo.

7.3.3 Validación de mutantes *SisrrA* y *SimsnA*

7.3.3.1 Perfiles de expresión de *AtsrrA* y *AtmsnA* en FL y FS

Como parte de la validación del silenciamiento en las mutantes obtenidas, se requería conocer el perfil de expresión de los genes diana, pues habría que elegir una condición fisiológica donde éstos se expresen con seguridad, y poder detectar su atenuación en las mutantes silenciadas.

Por lo anterior, se realizó un análisis de expresión por Northern blot para los genes *AtsrrA* y *AtmsnA* en cinéticas de producción de lovastatina en FL y FS con la cepa parental de *A. terreus* (TUB-F514).

Como se puede apreciar en la Figura 26, *AtmsnA* se expresa fuertemente en trofofase (19 h) en FL, y se mantiene así hasta el inicio de la idiofase (24 h), después, deja de transcribirse. En FS, se repite este patrón, pero expresándose muy suavemente, y se logra detectar su presencia a las 48 y 96 h.

Para el gen *AtsrrA* el perfil de expresión es muy curioso, pues está completamente ausente en FS, mientras que en FL se expresa justo al inicio de la idiofase, y manteniéndose a lo largo de esta. Además, se logra apreciar que la expresión a las 24 (inicio de idiofase) es más fuerte que en el resto de los tiempos (Figura 26).

Es importante mencionar que estos análisis de expresión se repitieron dos veces en experimentos independientes (para *AtmsnA* fueron 3), obteniéndose los mismos perfiles de expresión.

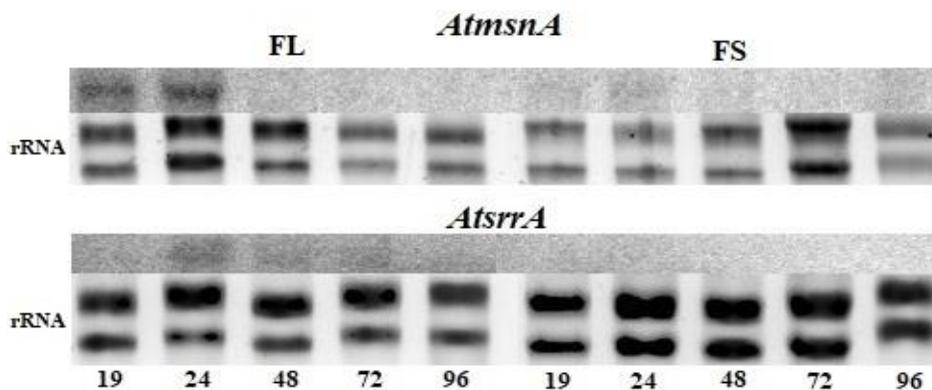


Figura 26. Perfiles de expresión de los genes *AtsrrA* y *AtmsnA* en FL y FS en cepa parental. Los números 19, 24, 48, 72 y 96 indican las horas de los cultivos.

7.3.3.2 Selección de las mutantes silenciadas

Una vez que se conoció el perfil de expresión de los genes diana, se eligió la condición fisiológica de 24 h de FL y FS para ambos, y se realizó el análisis de expresión por Northern blot para probar su silenciamiento. Se eligieron 10 transformantes *SisrrA* y 10 transformantes *SimsnA*, del fenotipo sensible a EOX y algunas que no tuvieron sensibilidad.

Es importante mencionar que las cepas seleccionadas para el análisis de expresión fueron previamente seleccionadas por la prueba de inserción, la cual consistió en verificar que las mutantes poseyeran la construcción de silenciamiento insertada en su genoma; la selección de las 20 cepas positivas en la prueba de inserción y que se analizarían para verificar su silenciamiento se hizo con el criterio de elegir aquellas que encajaran más en el perfil fenotípico esperado, y esto fue sensibilidad a EOX y efecto en producción.

De las 10 cepas analizadas todas tuvieron cierto grado de silenciamiento (datos no mostrados), pero finalmente se eligió la T3 y T6 para *SisrrA* y las T4 y T25 como representantes de las *SimsnA*.

En la Figura 27 se puede observar el resultado de la prueba de integración sólo para las mutantes silenciadas elegidas, donde se compara como las mutantes *SisrrA*-3, *SisrrA*-6, *SimsnA*-4 y *SimsnA*-25 dan positivo a la prueba, es decir, amplifican parte de la construcción de silenciamiento, al igual que los controles positivos (construcciones de silenciamiento purificadas), y a diferencia de la parental que no amplifica nada en la PCR.

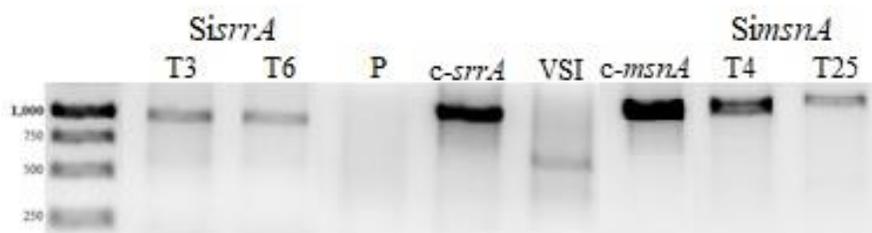


Figura 27. Electroforesis con la prueba de inserción para las transformantes 3 y 6 de *SisrrA*, y 4 y 25 de *SimsnA*. Los controles positivos fueron las construcciones de silenciamiento purificadas (*c-srrA* y *c-msnA*) y el vector de silenciamiento sin inserto (VSI); como control negativo sólo se usó el DNAg de la parental (P).
Gel de agarosa al 1 % p/v.

Y en la Figura 28, se muestra el resultado de la prueba de silenciamiento (sólo de las mutantes seleccionadas); para las *SisrrA*, puede observarse como la T3 está completamente atenuada (no se observa transcripción por lo menos en esta condición fisiológica) en comparación con la parental, sin embargo, la T6 sí está silenciada pero el gen sólo se atenuó el 25%, y como ya se había obtenido en el perfil de expresión, en FS no se detectó expresión de *AtsrrA* ni en la parental, ni en las transformantes.

En el caso de las *SimsnA*, se puede ver como en FL la T4 sí está silenciada al 90%, pero la T25 está atenuada por completo. Y en FS, no se logró detectar expresión en ninguna de las mutantes (Figura 28) pero en sí en la parental.

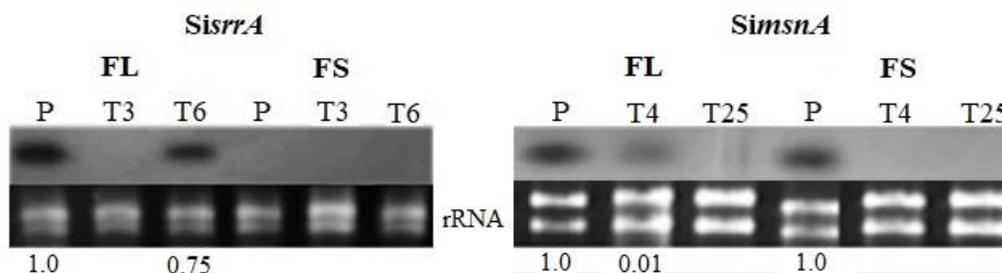


Figura 28. Análisis de expresión de los genes *AtsrrA* y *AtmsnA* a las 24 h en FL y FS en cepa parental y en las cepas *SisrrA*-3, *SisrrA*-6, *SimsnA*-4 y *SimsnA*-25.

Es importante mencionar que las 4 cepas silenciadas seleccionadas presentaron sensibilidad a EOX, y en el caso de T3 *SisrrA*, también a EP (Figura 25).

7.3.5 Producción de lovastatina por las mutantes *SisrrA* y *SimsnA*: FL vs. FS

Una vez que se seleccionaron las cepas silenciadas, se procedió a evaluar la participación de SrrA y MsnA en la biosíntesis de lovastatina; para ello, se realizaron cinéticas de producción de lovastatina, acumulación de EROs, biomasa y pH, para las mutantes silenciadas, comparándolas con los controles, que fueron la parental y la cepa con el vector sin inserto.

El comportamiento de las *SisrrA* fue muy interesante. Como se puede observar en la Figura 29-A, las mutantes producen más lovastatina en FL, T3 50% más y T6 37% (Tabla 13) pero, además, la acumulación de EROs es mucho más alta en las mutantes que en los controles, pero sólo a las 24 h (T3=57.6% y T6=40% de aumento) y a las 48 h (T3=63.4% y T6=37% de aumento). También se observaron niveles más altos que los controles a las 72 y 96 h, pero no fueron significativamente diferentes.

En FS no hubo ningún cambio ni en producción ni en los niveles de EROs (Figura 29-B). No hubo cambios significativos en biomasa para ninguno de los cultivos, y en pH la T6 aumentó a 7 a las 24 h, y este cambio se dio para FL y FS, pero no estuvo relacionado con contaminación.

Las *SimsnA* presentaron un comportamiento inesperado; tanto T4 como T25 produjeron más lovastatina en ambos sistemas de cultivo. La diferencia significativa más alta se percibió a las 72 h (Tabla 13), donde en FL T4 produjo 61.3% más y la T25 74% más, sin embargo, en la producción final (96 h) apenas hubo diferencias significativas con los controles (Figura 29-A). En FS, la diferencia de producción fue muy alta, pero al igual que FL a las 72 h, donde T4 produjo 276.4 % más y T25 produjo hasta 320% más, sin embargo, en la producción final no hay diferencia significativa (Figura 29-B). Un aspecto interesante es que los niveles de EROs no se modificaron en las cepas mutantes, tampoco hubo cambios significativos en biomasa ni pH.

Tabla 13. Comparación de producción de lovastatina y acumulación de EROs a las 72 h en FL y FS, para las mutantes silenciadas; también se reporta el porcentaje de aumento en la producción para algunas mutantes. Letras iguales indica que no hay diferencia significativa (Prueba t-Student's, $\alpha=0.05$).

Cepa	FL (72 h)			FS (72 h)		
	EROs (RFU/mg biomasa)	Lovastatina ($\mu\text{g/mL}$)	% de aumento	EROs (RFU/mg MS)	Lovastatina (mg/g MS)	% de aumento
P	8.8×10^9 $\pm 2.1 \times 10^8; e$	204 $\pm 9.5; i$	-	9.3×10^8 $\pm 1 \times 10^7; a, b$	5 $\pm 0.29; f, g$	-
VSI	1×10^{10} $\pm 1.6 \times 10^8; c$	215.7 $\pm 17.3; i$	-	9.7×10^8 $\pm 5.9 \times 10^7; a$	5.9 $\pm 0.45; f$	-
<i>SisrrA-3</i>	1×10^{10} $\pm 2 \times 10^8; b$	306 $\pm 17.9; g$	50	8.1×10^8 $\pm 2.6 \times 10^7; f, g, h$	4.6 $\pm 0.13; g, h$	-
<i>SisrrA-6</i>	9.9×10^9 $\pm 1 \times 10^8; c$	280.4 $\pm 21.6; h$	37.4	8.2×10^8 $\pm 4.6 \times 10^7; f, g, h$	4.5 $\pm 0.03; g, h$	-
<i>SimsnA-4</i>	8.9×10^9 $\pm 9.8 \times 10^7; d, e$	329.1 $\pm 2.5; f$	61.3	8.6×10^8 $\pm 3.1 \times 10^6; e, f$	18.8 $\pm 1; e$	276.4
<i>SimsnA-25</i>	9.3×10^9 $\pm 2 \times 10^8; d$	355 $\pm 15.2; e$	74	8.7×10^8 $\pm 2.3 \times 10^7; c, d, e$	21 $\pm 0.45; d$	320

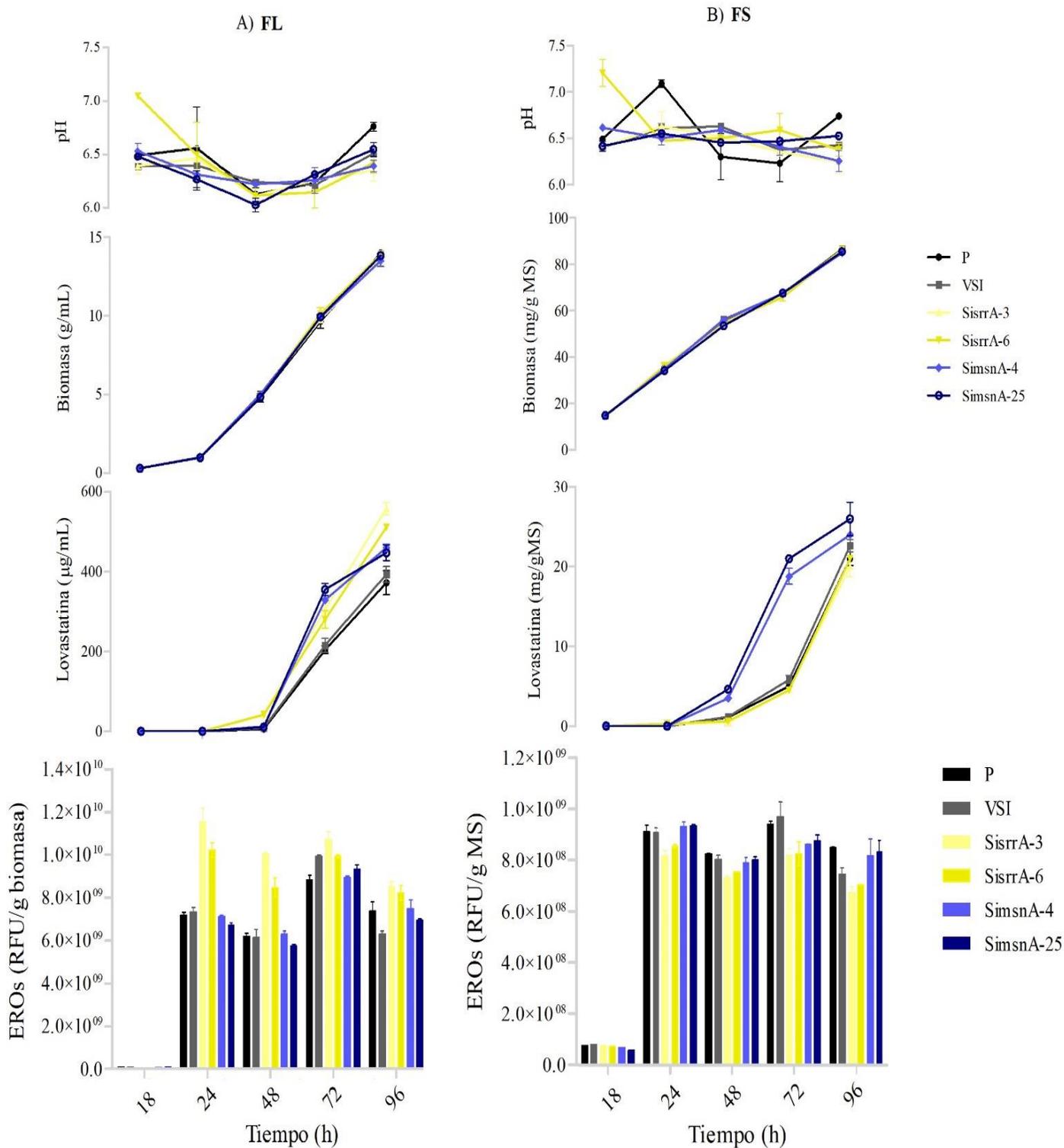


Figura 29. Perfil de acumulación de EROs, lovastatina, biomasa y pH en cepas silenciadas de *A. terreus*. Las mutantes con el gen *AtsrrA* silenciado (*SisrrA*) se distinguen en color amarillo, mientras que las mutantes con el gen *AtmsnA* silenciado (*SimsnA*) se indican en color azul. Los controles son la parental (color negro) y la cepa VSI (color gris). El panel A corresponde a FL y el B a FS.

8. DISCUSIÓN

8.1 Penicilina y cefalosporina también son reguladas por EROs a nivel transcripcional

En un trabajo previo, nuestro grupo de trabajo demostró que, en la fermentación de lovastatina con *Aspergillus terreus*, había una acumulación de EROs precisamente cuando la idiofase iniciaba. Esta concentración de EROs relativamente alta continuaba durante toda la fase de producción. Además, el incremento de las EROs coincidía con el “encendido” de los genes biosintéticos de lovastatina, incluyendo el factor transcripcional específico del clúster *lovE*. Sorprendentemente, en este mismo punto, el gen *sod1* (defensa antioxidante) se reguló a la baja y se mantuvo así durante toda la idiofase (Miranda et al., 2013). En un trabajo posterior, nuestro grupo mostró que las EROs no sólo eran necesarias en la producción de lovastatina, sino que además estaban regulando positivamente los genes biosintéticos. Adicionalmente, un análisis de transcripción reveló que el gen *yap1* (*Atyap1*), el principal regulador de la respuesta antioxidante en hongos, se expresó altamente durante la trofofase, pero regulándose a la baja en idiofase, sugiriendo que Yap1 no sólo regula *sod1* sino que también, de alguna manera, ambos se regulan a la baja para contribuir a la acumulación de las EROs (Miranda et al., 2014).

Además de la lovastatina, se ha reportado que las EROs regulan otros dos metabolitos secundarios. La acumulación de las EROs durante la idiofase ha sido reportada durante la producción de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* (Jayashree & Subramanyam, 2000; Narasaiah et al., 2006) y en *Aspergillus flavus* (Fountain et al., 2016; Hong et al., 2013). Adicionalmente, hay evidencia de que las EROs regulan la biosíntesis de ocratoxina A en *Aspergillus ochraceus* (Reverberi et al., 2012). El modelo de aflatoxinas ha sido estudiado a cierta profundidad, y se ha sugerido que, debido a una actividad antioxidante, las aflatoxinas (y la ocratoxina A) son reguladas por las EROs y sintetizadas como una segunda línea de defensa contra el estrés oxidante (Aguirre et al., 2006; Fountain et al., 2016; Hong et al., 2013; Kenne et al., 2018; Reverberi et al., 2010; Roze et al., 2013). Por lo tanto, su regulación podría estar relacionada con la regulación general de la defensa antioxidante.

Nuestro estudio de Lov fue el primer informe de un metabolito secundario de importancia industrial que está regulado por EROs, además de aflatoxinas y ocratoxina, lo que abre la posibilidad de que esto sea un mecanismo general. En el presente trabajo, estudiamos la

posibilidad de que las EROs estén involucradas en la regulación de otros dos metabolitos de importancia industrial: penicilina y cefalosporina, comparando sus particularidades con el modelo bien conocido de Lov.

En esta tesis, inicialmente mostramos que Lov, así como Pen y Ceph, no tienen capacidad antioxidante. Esto demuestra que su regulación por EROs no forma parte de la respuesta general antioxidante de la célula.

Resulta muy interesante que nuestros resultados mostraron que las EROs también se acumulan durante la idiofase en la fermentación de Pen con *P. chrysogenum*, y en la fermentación de Ceph con *A. chrysogenum*. Esto es el mismo fenómeno que se describió en Lov y aflatoxinas. Es importante notar que Pen y Ceph son formados originalmente por aminoácidos y son sintetizados por péptido sintetasas no ribosomales, es decir, tienen diferente origen biosintético que lovastatina y aflatoxinas, pues éstas se clasifican como policétidos y su formación parte de Acetil-CoA).

Después de esto, se demostró que el incremento de las EROs coincidía con la síntesis de Pen y Ceph, por lo que se pensó que también eran necesarias para la producción de estos metabolitos secundarios. Para probar esto, se manipuló la acumulación de las EROs en los cultivos de producción de Pen y Ceph.

En la fermentación de Pen, la adición del antioxidante (NAC) generó una disminución proporcional en la acumulación de las EROs en idiofase, lo que trajo una consecuente reducción en la producción de Pen. Comparando este efecto con el modelo de Lov, se puede observar que es muy similar, sólo que una menor cantidad de NAC fue necesaria para reducir los niveles de EROs en la fermentación de Pen. Esto podría atribuirse, a que hay mayor contenido de EROs en el micelio de *A. terreus*.

Un efecto similar fue observado en la producción de Ceph por *A. chrysogenum*. La adición de otro antioxidante (TMTU) generó un decremento proporcional en el contenido de las EROs en la célula, lo que permitió una disminución proporcionada en la producción de Ceph. En este caso, se requirió de una concentración más alta de TMTU para bajar las EROs en *A. chrysogenum*, en comparación con la fermentación de Lov.

A. chrysogenum es un hongo intrigante, pues, por razones desconocidas, la adición de NAC a la fermentación de Ceph no bajó los niveles internos de EROs y como consecuencia, no se afectó la producción de Ceph, incluso, en algunas concentraciones hubo mayor crecimiento y más producción. Es posible que este compuesto estimulara la biosíntesis de Ceph al ser metabolizado para proveer L-cisteína (uno de los aminoácidos precursores), o bien, no entró a la célula, o fue rápidamente transformado.

Como se demostró para *A. terreus* en un trabajo previo, la adición de EROs exógenas (H_2O_2) incrementan el contenido de las EROs internas en *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*. Además, como en Lov, la adición de H_2O_2 indujo un incremento proporcional en la producción de Pen; el mismo efecto fue observado en la fermentación de Ceph.

El hecho de que bajando las EROs proporcionalmente en los respectivos cultivos decrece la producción de Pen y Ceph, y que, al incrementar artificialmente la concentración de las EROs en idiofase, traiga consigo un incremento correspondiente en la biosíntesis del metabolito, respalda la conclusión de que las EROs también regulan la biosíntesis de Pen y Ceph. Pero, además, también demostramos que esta regulación es a nivel transcripcional, pues la manipulación de las EROs tuvo un efecto directo sobre la expresión del gen biosintético *pcbAB* de Pen y Ceph.

Anteriormente, nuestro grupo también demostró que la regulación por EROs en la biosíntesis de lovastatina es a nivel transcripcional (Miranda et al., 2014), y lo mismo ha sido demostrado para aflatoxinas (Kim et al., 2008). Además, ha sido reportado que la regulación del ácido ganodérico por EROs es también a nivel transcripcional, esto en el hongo con relación distante *G. lucidum* (W. X. Zhang & Zhong, 2010).

Esto significa, que la producción de estos tres metabolitos secundarios de importancia industrial (Lov, Pen y Ceph) es regulada por las EROs a nivel transcripcional, y esta regulación no está relacionada a actividad antioxidante de los metabolitos.

Aunque se encontraron perfiles similares de acumulación de EROs (patrones) en los cultivos de Lov, Pen y Ceph, se identificaron ciertas diferencias importantes, que son atribuidas a la diferencia entre especies/metabolito. Analizar estas diferencias, junto con los datos de los experimentos con la adición de H_2O_2 , representa una oportunidad de explorar la relación ente

el comportamiento de la concentración de EROs y el nivel de producción del metabolito secundario. La más notoria fue la diferencia en la concentración de EROs en la idiofase, que fue más alta para la fermentación de Lov con *A. terreus*. Los niveles observados en la fermentación de Lov fueron aproximadamente un orden de magnitud mayor que los de las fermentaciones Pen y Ceph. La acumulación de EROs en Ceph fue ligeramente menor que en los cultivos de Pen. Esto sugería que había diferentes “concentraciones de EROs naturales” en diferentes organismos, y que posiblemente pudiera estar ligado a la capacidad de producción de las cepas de una misma especie.

Para demostrar esta hipótesis medimos la acumulación de EROs en cepas de alta y baja producción en una misma especie, es decir, en *A. terreus*, *P. chrysogenum*, y *A. chrysogenum*, y lo que encontramos nuevamente, fue que los niveles de EROs en *A. terreus* son los más elevados (una orden de magnitud más), y los niveles en *A. chrysogenum* son ligeramente más bajos que en *P. chrysogenum*; pero lo inesperado fue que los niveles de EROs resultaron ser los mismos en ambas cepas, independientemente de su capacidad de producción; o a una señal más fuerte o importante) y a la consecuente respuesta de mayor producción; esto nos hace pensar que el sistema de regulación por EROs activa el MS, pero no determina el grado de producción, sino que éste depende de otros mecanismos, sin embargo, creemos que cuando se estimula con EROs exógenas, la producción aumenta porque la regulación por éstas es de mayor jerarquía, y por tanto, lleva a una mayor señalización (y lo mismo sucede cuando se atenúan artificialmente las EROs, baja la señal, lo que hace que los otros mecanismos de regulación disminuyan).

Experimentos con la adición exógena de EROs mostró que hay una concentración óptima de H₂O₂ exógeno para la producción de cada metabolito. Curiosamente, la magnitud del aumento de producción obtenido al agregar EROs exógenos fue muy diferente en cada especie (metabolito), siendo mayor para Ceph y más baja para Lov. Además, este aumento fue inversamente proporcional a los niveles naturales de EROs de la cepa (Tabla 12). Es decir, que las especies con niveles de EROs naturales más bajos, en este caso *Acremonium*, mostraron el mayor aumento de producción mediante la adición óptima de EROs. De esta manera, la fermentación de Ceph con H₂O₂ mostró un aumento de producción específico del 142%, seguido por el cultivo de Pen con un aumento del 62%, y el cultivo de Lov sólo mostró

un aumento de producción del 18.8%. Aparentemente, las cepas con niveles de EROs naturales más bajos (en idiofase) tendrían más margen de maniobra para aumentar la producción al aumentar la concentración de EROs en idiofase.

Usando la información de estos experimentos, se intentó encontrar la concentración óptima de EROs para la producción de cada metabolito. Sin embargo, cuando la concentración de H₂O₂ se elevó por encima del nivel que indujo el mayor aumento de producción, las EROs no aumentaron más, y la producción disminuyó. Además, una disminución en la biomasa y pH más alto, indicaron que estos niveles estaban empezando a dañar las células, probablemente activando mecanismos de defensa. Esto señala el interés en probar otras formas de introducir o inducir la acumulación interna de EROs como radiación ionizante de baja dosis o algunos agentes químicos.

Como se mencionó anteriormente, ahora está claro que las aflatoxinas son reguladas positivamente por EROs; la ocratoxina A es otra toxina fúngica, con actividad antioxidante, y existe una fuerte evidencia de que EROs también regula la biosíntesis de ocratoxina en *Aspergillus ochraceus*. Además, la regulación del ácido ganodérico por EROs se ha demostrado claramente; este es un metabolito bioactivo utilizado en la medicina tradicional China y es producido por el cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*, un Basidiomiceto, obviamente, un hongo filogenéticamente muy distante de los hongos estudiados en este trabajo (Gao et al., 2018). *Shiraia bambusicola* es un hongo parásito del bambú que produce hipocrelina A. Sun et al., (2018) mostraron que el cambio de luz / oscuridad (24: 24 h) no solo aumentó el contenido del metabolito en micelios en un 65%, sino que también estimuló su liberación al medio y que esto está mediado por EROs. Más allá de los hongos, también se ha informado sobre *Streptomyces* cierta evidencia de que EROs regula MS. Se utilizó H₂O₂ para inducir la producción de validamicina A en *Streptomyces hygroscopicus* (Wei et al., 2011), mientras que Beites et al., (2011) informaron que las mutantes de *Streptomyces natalensis*, defectuosos en las enzimas desintoxicantes de H₂O₂, mostraban un fenotipo sobreproductor de pimaricina.

Teniendo en cuenta que Lov, Pen y Ceph no tienen actividad antioxidante y que representan metabolitos con diferentes orígenes biosintéticos, estos hallazgos respaldan firmemente la hipótesis de que la regulación de EROs es un mecanismo general que regula el metabolismo

secundario en hongos, y quizás más allá. Esto está también respaldado por informes de otros MS, producidos por hongos filogenéticamente distantes e incluso actinomicetos, que están regulados por EROs, o al menos han mostrado evidencia que sugiere fuertemente la regulación de EROs.

8.2 SrrA y MsnA como nexos entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina

No se ha estudiado a fondo el mecanismo por el cual las EROs controlan la biosíntesis de los MS a nivel transcripcional. Los investigadores del campo de aflatoxinas (principalmente el grupo del Dr. John Linz) han propuesto que las EROs inducen factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidante, y éstos, o algunos de ellos, pueden también actuar sobre la biosíntesis de aflatoxinas. La evidencia que apoya esto consiste principalmente en sitios putativos de unión en los promotores de estos genes; por lo que se considera que hay algunos factores de respuesta a estrés, asociados con ruta de señalización SAPK/MAPK, como son Yap1, AtfB y SrrA, junto con MsnA (ligado a la ruta de señalización cAMP-PKA), que también contribuyen a la regulación de la biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Hong et al., 2013). Nuestro grupo ha encontrado evidencia similar en los genes biosintéticos de lovastatina en *A. terreus* (Miranda et al., 2014). Sin embargo, sólo hay pruebas sólidas, es decir, la unión a elementos promotores en condiciones de producción, para el factor de transcripción bZIP AtfB en la biosíntesis de aflatoxinas (Roze et al., 2011).

Este mecanismo de regulación está dentro de la lógica de que las aflatoxinas sean parte de las defensas antioxidantes. Sin embargo, otros mecanismos podrían estar involucrados en el caso de MS sin características antioxidantes. Nuestro grupo está investigando el antes mencionado mecanismo hipotético, y para este trabajo en específico se estudió la participación de SrrA y MsnA en la biosíntesis de lovastatina.

El perfil de expresión obtenido para *AtsrrA* y *AtmsnA* mostró que estos genes tienen una expresión diferencial en FL y FS, siendo FL el sistema en donde ambos se expresan en mayor intensidad, e incluso, *AtsrrA* es exclusivo de este sistema de cultivo, pues no se detectó su expresión en FS.

AtmsnA parece tener una participación más importante en trofofase en ambos sistemas de cultivo, y se apaga al inicio de la idiofase; esto podría concordar con los roles que juega Msn2/4 en levadura, pues se sabe que esta proteína se encuentra inactiva en el citoplasma por

cAMPC/PKA (cuando hay glucosa disponible), y cuando ocurre el agotamiento de carbono (inicio del MS), es reclutada al núcleo para que active genes diana de respuesta al estrés, y como la hipótesis lo indica, también genes de MS (Hong et al., 2013; Morano et al., 2012).

Por otro lado, *AtsrrA* inicia su expresión fuertemente al inicio de la idiofase en FL, y se mantiene encendido el resto de ella, pero en menor intensidad. Esto sugiere que, al igual que *AtmsnA*, podría jugar un papel importante en la activación del MS, pero posiblemente, también para mantenerlo activo durante la idiofase.

El punto de que *AtsrrA* no se exprese en FS es muy interesante, pues dentro de nuestros estudios como grupo de trabajo siempre estamos en busca de moléculas que sean diferenciales, es decir, que en un sistema (FL o FS) sí esté presente y en el otro no, pues podría indicarnos un camino para entender mejor la Fisiología del Medio Sólido. El perfil de expresión de los ortólogos de *srrA* en otros hongos no ha sido reportado.

Así, con un análisis de expresión pudimos apoyar la hipótesis de que SrrA y MsnA pueden jugar un papel importante en la regulación del MS en *A. terreus*, específicamente, de lovastatina. Por lo que, procedimos a estudiarlos mediante un silenciamiento génico, para comparar las diferencias contra la cepa parental.

8.2.1 *SisrrA*

Las cepas *SisrrA* presentaron una disminución de la expresión de *AtsrrA* desde el 25% hasta nula. Esto podría deberse a un efecto directo al número de construcciones de silenciamiento y al lugar donde se insertaron en el genoma, y puede explicar también, por qué se presentó tanta variabilidad en las transformantes. Sin embargo, las dos cepas que se seleccionaron al final presentaron el mismo fenotipo en producción, independientemente del nivel de silenciamiento. Por supuesto, la cepa que está totalmente silenciada presentó la tasa más alta de producción, EROs y sensibilidad.

Desde la obtención de las transformantes *SisrrA* se tuvieron resultados inesperados. Al realizar los pases de las mutantes, el 43% de ellas presentaron una relativa sensibilidad a fleomicina, es decir, no fueron capaces de crecer en una concentración más elevada (140µg/mL) a la cual habían crecido.

Hay evidencias que indican que SrrA participa en la resistencia a fungicidas, sin embargo, la mayoría de los trabajos indican que las mutantes $\Delta srrA$ (en otros hongos) presentan un fenotipo de resistencia, no de sensibilidad. Pero, curiosamente, en *Cryptococcus neoformans* las mutantes $\Delta CnSk7$ sí presentaron hipersensibilidad a higromicina B, ellos sólo sugieren que puede deberse a que CnSk7 (homólogo a SrrA) participa en la regulación de la biosíntesis de la pared celular fúngica (Fassler & West, 2011). Aunque la fleomicina y la higromicina B son antibióticos con diferentes mecanismos de acción, pudiera ser que SrrA participe en el mecanismo de señalización para contenerlos, y que en *A. terreus*, así como en *C. neoformans*, esta participación es positiva, no negativa. Por lo tanto, podríamos pensar que el fenotipo de sensibilidad presentado por las mutantes *SisrrA* podría ser un efecto directo de la mutación.

Caracterizando a las transformantes en cuanto a la sensibilidad a diferentes tipos de estrés, los resultados de la primera caracterización de las *SisrrA* fueron totalmente inesperados, e incluso, en su momento causó incertidumbre y duda acerca del silenciamiento. Como ya se mencionó, los resultados fueron que las transformantes no eran hipersensibles a EOX, sino que sólo presentaban algunas de ellas (67%) un fenotipo de ligera sensibilidad.

Hay muchos estudios de ortólogos de SrrA en diferentes hongos, y en la mayoría de ellos, la hipersensibilidad a EOX (inducido por peróxidos) es una característica de las mutantes interrumpidas con este gen; incluso sugieren que SrrA está casi universalmente involucrado en la respuesta a ciertas clases de oxidantes (Fassler & West, 2011).

A pesar de que sí hay ortólogos de SrrA cuya interrupción no presentó sensibilidad a EOX, como lo son en *Magnaporthe oryzae* (Motoyama et al., 2008) y *Nerospora crassa* (Zhang et al., 2002); viéndolo en retrospectiva, es probable que la razón por la cual las *SisrrA* no presentaron hipersensibilidad y un mayor porcentaje de mutantes sensibles, es por el tipo de ensayos que se utilizaron para medir la respuesta. Esto debido a que la sensibilidad a los diferentes tipos de estrés (incluido el EOX) se hizo a través de ensayos cualitativos basados en el crecimiento del hongo en presencia del estrés. Estas pruebas, que son las convencionales, se realizaron sobre una superficie sólida (agar), que consideramos como un cultivo intermedio entre FL-FS. Entonces, es probable que, en estas condiciones, SrrA no se activa totalmente en este medio como parte de la respuesta celular al estrés. Como ya se

mencionó antes, en el perfil de expresión, *AtsrrA* no participa en FS (al menos no en el modelo de lovastatina), y al no estar normalmente presente, las mutantes silenciadas no tendrían mayor diferencia con la cepa parental.

Para apoyar la hipótesis anterior, podemos mencionar que, en *Cryptococcus neoformans*, también se reportó que las mutantes $\Delta Cnskn7$ presentaron una respuesta muy sutil a los oxidantes en los ensayos habituales que involucran un fenotipo de crecimiento en medios sólidos que contienen diferentes concentraciones de oxidante (Bahn et al., 2006). Sin embargo, cuando las mutantes se pusieron a crecer en cultivos líquidos con hidroperóxido de t-butilo mostraron deficiencia en el crecimiento, incluso encontraron 100% de letalidad a 0.7 mM contra 1.0 mM que corresponde a la parental (Coenjaerts et al., 2006).

Convendría, en un futuro, repetir los ensayos siguiendo tal vez el método de Coenjaerts et al., (2006) pero adaptado en FL, donde ya tenemos certeza que *srrA* se expresa y por lo tanto, su participación en la respuesta a EOX será notoria en las cepas silenciadas.

Por otro lado, los resultados más interesantes, obtenidos de las *SisrrA*, fueron sin duda las cinéticas de producción de lovastatina en FL y FS. Lo que se encontró fue que, en la FL de las mutantes, las EROs aumentaron por encima de la parental, al inicio de la idiofase (24 h) y se mantuvieron altas hasta las 48 h, pero en el resto de los tiempos no hubo diferencia con los controles. Además, la producción de lovastatina también aumentó, hasta 50% más.

Como era de esperarse el silenciamiento no causó el mismo efecto en el otro sistema de cultivo, pues en FS no hubo ninguna diferencia. Recordemos que ya se había encontrado en el perfil de expresión, que *AtsrrA* no tiene una participación en FS, por lo que es lógico que el silenciamiento no tuviera ninguna relevancia.

Con los resultados anteriores, demostramos que *AtsrrA* sí regula positivamente la producción de lovastatina. El que sea un regulador positivo iría en contra de la hipótesis originalmente planteada en este punto.

Por otro lado, no sabemos con certeza si es un regulador directo de los genes biosintéticos o indirecto. Es decir, si su ausencia (en las cepas silenciadas) sólo indujo una mayor acumulación de EROs, y éstas, desencadenaron mayor biosíntesis de lovastatina (por otros mecanismos independientes de *SrrA*).

Es interesante notar que el mismo fenotipo (EROs y MS regulados al alta) fue obtenido en *Ganoderma lucidum*, cuyos estudios de SrrA (ellos lo llaman Skn7) también los hicieron a través de silenciamiento (RNA de interferencia). Ellos encuentran un aumento aproximadamente del 75% en EROs y 50% en ácido ganodérico, pero además, al atenuar las EROs con NAC, la producción cae, por lo tanto, demuestran que la participación de SrrA sobre el MS de este hongo es indirecta, a través de las EROs (Wang et al., 2018).

El estudio de SrrA en *Cryptococcus neoformans* también los llevó a la observación de que las mutantes interrumpidas presentaban mayor producción de melaninas (moléculas que también son metabolitos secundarios (Toledo et al., 2017)); pero ellos no indagaron en el hecho de que encontraron que SrrA está involucrado en el MS, simplemente hacen la observación de que regula negativamente la biosíntesis de melaninas (Bahn et al., 2006). Para nosotros es un antecedente interesante, pues coincide con lo obtenido en el modelo de lovastatina, donde, al parecer, SrrA participa como un regulador negativo en la biosíntesis de lovastatina. Sin embargo, como ya se mencionó, es importante demostrar si SrrA participa como un regulador negativo, o sólo como un factor transcripcional de respuesta a EOx que ayuda sólo a contener los niveles de EROs.

Los fenotipos obtenidos de las *SisrrA* en *A. terreus* tienen muchas coincidencias con las mutantes $\Delta Cnskn7$ y las mutantes *SiGlskn7*, a pesar de que el porcentaje de identidad entre las proteínas sea sólo del 42.7% y del 56.6 % respectivamente. Además, tanto *C. neoformans* como *G. lucidum* son Basidiomicetos, mientras que *A. terreus* es Ascomiceto, pero este factor de transcripción pareciera tener funciones similares.

8.2.2 *SimsnA*

Las cepas *SimsnA* presentaron diferentes grados de silenciamiento, y las seleccionadas mostraron desde el 90% a un silenciamiento total, y su comportamiento prácticamente fue el mismo.

El fenotipo más notable encontrado en las cepas silenciadas fue sobreproducción en ambos sistemas de cultivo, pero no sólo fue un aumento, sino un adelanto en la producción, es decir, las *SimnsA* alcanzaron los valores de producción final (96 h) de la P desde las 72 h (24 h antes), y este mismo efecto ocurrió en ambos sistemas de cultivo, alcanzando un aumento del 320% en FS y 74% en FL

Es interesante que el incremento de producción fue parecido en ambos sistemas de cultivo, a pesar de que la expresión de *AtmsnA* fue más intensa en FL (ver sección correspondiente).

Todavía más interesante que la sobreproducción fue que las cepas *SimsnA* no presentaron diferencias en el perfil de acumulación de EROs, en ninguno de los sistemas de cultivo, indicando que el efecto es por la ausencia (o menor presencia) de *MsnA*.

Estos resultados demuestran que en *A. terreus*, *MsnA* es un regulador negativo de la biosíntesis de lovastatina.

Aunque esto confirma la hipótesis planteada originalmente, este factor transcripcional no es el nexo entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina, es decir, *MsnA* no es un factor transcripcional que se activa por medio de la acumulación de EROs en idiofase (como parte de la respuesta antioxidante) sino que, directamente regula la biosíntesis de lovastatina, independientemente de los niveles de EROs.

MsnA ha sido poco estudiado en hongos filamentosos, pero las evidencias que hay sirven como un comparativo a nuestros resultados. Chang et al., (2011) reportaron que las cepas $\Delta msnA$ de *A. parasiticus* y *A. flavus* mostraron mayor producción de aflatoxinas y ácido kójico (MS), pero también un aumento en la acumulación de EROs. Ellos sugieren (misma hipótesis que el grupo de Linz) que *MsnA* participa en el sistema antioxidante de estos hongos, y que el aumento de aflatoxinas y ácido kójico (que es un eliminador de radicales libres) en las mutantes es una respuesta para contener a las EROs, aunque los autores ni siquiera consideran la posibilidad de que *MsnA* regule directamente los genes biosintéticos.

Nuestros resultados no se parecen a los de ellos en cuanto al perfil de acumulación de EROs, pues como ya se mencionó, en las cepas *SimsnA* las EROs no se modifican, sugiriendo que tal vez *MsnA* no tiene una participación primordial en la respuesta al EOX en *A. terreus*. Esta hipótesis se refuerza con los resultados obtenidos en la caracterización de las transformantes silenciadas. Sólo el 33% de las transformantes presentaron una ligera sensibilidad a EOX, y ningún efecto en los otros tipos de estrés; esto último difiere por mucho en los reportes hechos en *S. cerevisiae*, donde *Msn2/4* es considerado como un regulador general del estrés, formando parte de la primera línea de defensa al estrés térmico y también oxidante (Morano et al., 2012).

Cabe señalar que el porcentaje de identidad de AtMsnA con Msn2 de *S. cerevisiae* es sólo del 49%, mientras que con *A. parasiticus* es del 79% y con los entomopatógenos de 39%. En levadura Msn2/4 está caracterizado, pero en hongos, sus estudios no son profundos, y tampoco coinciden totalmente con los reportados en levadura.

Sin embargo, es probable que los fenotipos obtenidos en respuesta al estrés de las *SimsnA*, al igual que las *SisrrA* también puede deberse al tipo de pruebas que se realizaron (que son las convencionales).

Liu et al., (2013) encontraron que MsnA en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* tiene una participación muy importante en la respuesta al estrés oxidante, térmico, osmótico y pared celular. Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en pruebas sobre conidios, y cuando lo hacen en crecimiento de colonia, la diferencia no es muy marcada, no al menos para EOX. En futuros estudios, será conveniente realizar estas pruebas en las cepas seleccionadas, prestando especial interés a las pruebas sobre esporas, y también, sobre el micelio (crecimiento) pero sobre cultivos líquidos.

9. CONCLUSIONES

A) Lovastatina, penicilina G y cefalosporina C no son moléculas con actividad antioxidante, por lo que su regulación por EROs no es debido a que forman parte de la respuesta celular fúngica al estrés oxidante.

B) La biosíntesis de Cefalosporina C y Penicilina G también es regulada por EROs a nivel transcripcional.

C) El perfil y los niveles de EROs en cepas de diferente grado de producción de una misma especie son los mismos, pero cada especie tiene niveles específicos de EROs naturales.

D) El factor transcripcional SrrA regula negativamente la biosíntesis de lovastatina en FL. Sin embargo, no juega ningún papel en la biosíntesis de lovastatina en FS. Parece participar en la respuesta celular al estrés oxidante.

E) El factor transcripcional MsnA actúa como un regulador negativo en la biosíntesis de lovastatina, pero independiente de las EROs. No parece tener una participación importante en la respuesta celular al EOX.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis abren un campo extraordinario y amplio de posibilidades de estudio.

En el caso de los modelos de Penicilina G y Cefalosporina C, donde ya demostramos que están regulados por EROs a nivel transcripcional, sería muy interesante conocer a fondo el mecanismo de regulación, iniciando por probar la hipótesis si los factores de transcripción en respuesta a estrés pudieran estar regulando la transcripción de los genes biosintéticos, sobre todo, haciendo la comparación en cultivos sólidos y líquidos. Además, sería interesante aplicar nuevas técnicas de estudio, como CRISPR/Cas9 o bien, otras técnicas más rápidas y sencillas que permitan evaluar la función de un gen sin invertir tanto tiempo y trabajo.

En el caso de lovastatina en *A. terreus*, que es nuestro modelo principal de estudio, el panorama ya está más avanzado, y los resultados obtenidos en esta tesis de la participación de los factores transcripcionales SrrA y MsnA en la regulación de lovastatina permitieron ampliar el conocimiento del mecanismo de regulación por EROs. Sin embargo, el conocimiento a nivel molecular es poco profundo, por lo que considero, que los puntos más interesantes que pudieran continuarse serían encaminados a vislumbrar el mecanismo por el cual las EROs regulan el metabolismo secundario, desde la señalización para que éstas se acumulen en idiofase (regulando a la baja los genes *sod1* y *yap1*), hasta quién las controla para que no causen daños y finalmente, qué participación tienen en la esporulación y muerte celular.

Un primer paso sería redondear los estudios en SrrA y MsnA, los cuales, no están caracterizados en *A. terreus*; entonces iniciar desde la purificación de la proteína, secuenciación, identificación de los dominios característicos, determinar qué genes son los que están regulando y validar su función transcripcional en genes biosintéticos de lovastatina y de respuesta a EOx por medio de un ensayo EMSA (electrophoretic mobility shift assay).

La regulación de SrrA y MsnA está muy poco caracterizada en hongos filamentosos, porque esta línea de investigación también es muy interesante. Se podría verificar las vías de transducción de señales en las que participan, determinar señales que activen o desactiven a estas proteínas (en relación con la fisiología del medio sólido). Sobre SrrA, estudiar la

participación del receptor de membrana SskA que forma parte del sistema de regulación de dos componentes. Para MsnA, determinar si se regula a través de la vía cAMP/PKA.

Estudiar a nivel molecular la participación de SrrA en la fisiología del medio sólido también es muy interesante. Recordemos que está completamente ausente en FS, y entender su mecanismo de regulación nos puede guiar a vislumbrar los mecanismos de señalización por los cuales se activa la fisiología del medio sólido.

Finalmente, las mutantes silenciadas *SimsnA* mostraron una pigmentación de color rojo, lo que nos hace pensar que posiblemente también se indujo la sobreproducción de otro metabolito secundario. Sería interesante analizar por medio de espectrometría de masas, qué metabolito(s) son los que se sintetizaron que dan la coloración roja.

11. REFERENCIAS

- Adinarayana, K., Prabhakar, T., Srinivasulu, V., Anitha Rao, M., Jhansi Lakshmi, P., & Ellaiah, P. (2003). Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, 39(2), 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00049-9)
- Aguirre, J., Hansberg, W., & Navarro, R. (2006). *Fungal responses to reactive oxygen species*. 44, 101–107. <https://doi.org/10.1080/13693780600900080>
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. In *Trends in Microbiology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 111–118). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H., & Treisman, R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein β subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 8616–8622. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8616>
- Auclair, K., Kennedy, J., Hutchinson, C. R., & Vederas, J. C. (2001). Conversion of cyclic nonaketides to lovastatin and compactin by a lovC deficient mutant of *Aspergillus terreus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11(12), 1527–1531. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00290-6](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00290-6)
- Ávila, N., Tarragó-Castellanos, M. R., & Barrios-González, J. (2017). Environmental cues that induce the physiology of solid medium: a study on lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 1029–1038. <https://doi.org/10.1111/jam.13391>
- Backus, M. P., & Stauffer, J. F. (1955). The Production and Selection of a Family of Strains in *Penicillium Chrysogenum*. *Mycologia*, 47(4), 429–463. <https://doi.org/10.1080/00275514.1955.12024468>
- Bahn, Y.-S., Kojima, K., Cox, G. M., & Heitman, J. (2006). A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), 3122–3135. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-02-0113>
- Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogéne, B. J. R., & Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2826–2831. <https://doi.org/10.1021/jf020957g>
- Baños, J. G., Tomasini, A., Szakács, G., & Barrios-González, J. (2009). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.006>
- Barrios-González, J., Baños, J. G., Covarrubias, A. A., & Garay-Arroyo, A. (2008). Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 179–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1409-2>
- Barrios-Gonzalez, J., Fernandez, F. J., & Tomasini, A. (2003). Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. In *Indian Journal of Biotechnology* (Vol. 2).

<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/11326>

- Barrios-González, Javier. (2012). Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. In *Process Biochemistry* (Vol. 47, Issue 2, pp. 175–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.016>
- Barrios-González, Javier. (2018). Secondary Metabolites Production. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 257–283). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00013-x>
- Barrios-González, Javier, & Mejía, A. (2008). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In *Current Developments in Solid-state Fermentation* (pp. 302–336). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_14
- Barrios-González, Javier, & Miranda, R. U. (2010). Biotechnological production and applications of statins. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 4, pp. 869–883). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2239-6>
- Barriuso, J., Nguyen, D. T., Li, J. W. H., Roberts, J. N., MacNevin, G., Chaytor, J. L., Marcus, S. L., Vederas, J. C., & Ro, D. K. (2011). Double oxidation of the cyclic nonaketide dihydromonacolin L to monacolin J by a single cytochrome P450 monooxygenase, LovA. *Journal of the American Chemical Society*, 133(21), 8078–8081. <https://doi.org/10.1021/ja201138v>
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Jin, W. B., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N. J., Keller, N. P., Yu, J. H., & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1155888>
- Beites, T., PiresSí, S. D. S., Santos, C. L., Osório, H., Moradas-Ferreira, P., & Mendes, M. V. (2011). Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in *S. natalensis* atcc 27448: Modulation of pimarin production by intracellular ros. *PLoS ONE*, 6(11), e27472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027472>
- Birmingham-McDonogh, O., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1988). The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(13), 4789–4793. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4789>
- Bibián, M. (2015). *Papel de los genes srrA y msnA en la biosíntesis de lovastatina por Aspergillus terreus*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Birren, B., Denning, D., & Nierman, B. (2004). *Comparative analysis of an emerging fungal pathogen, Aspergillus terreus*. https://web.archive.org/web/20060815183347/http://www.aspergillus.org.uk/secure/sequence_info/Aterreus.pdf
- Boisnard, S., Lagniel, G., Garmendia-Torres, C., Molin, M., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., Toledano, M. B., Labarre, J., & Chédin, S. (2009). H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1429–1438. <https://doi.org/10.1128/EC.00106-09>
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 527–535. <https://doi.org/10.1128/ec.3.2.527-535.2004>
- Bouquin, N., Johnson, A. L., Morgan, B. A., & Johnston, L. H. (1999). Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Molecular Biology*

of the Cell, 10(10), 3389–3400. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3389>

- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L., & Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research*, 113(6–7), 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.02.010>
- Brakhage, A. A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M. A., Tsukagoshi, N., & Hynes, M. J. (1999). HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: Implications for biotechnology. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), 243–252. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1136>
- Brakhage, Axel A. (1998). Molecular Regulation of β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 547.
- Brakhage, Axel A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 21–32). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Brakhage, Axel A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P. F., & Behnsen, J. (2010). Interaction of phagocytes with filamentous fungi. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 409–415). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.04.009>
- Brakhage, Axel A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., & Tüncher, A. (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 88, pp. 45–90). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b99257>
- Brakhage, Axel A., Thön, M., Spröte, P., Scharf, D. H., Al-Abdallah, Q., Wolke, S. M., & Hortschansky, P. (2009). Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. In *Phytochemistry* (Vol. 70, Issues 15–16, pp. 1801–1811). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.011>
- Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T., & Breitenbach-Koller, L. (2015). Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. *Biomolecules*, 5, 318–342. <https://doi.org/10.3390/biom5020318>
- Broad Institute. (2006). *Aspergillus Genome Projects | Broad Institute*. <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/aspergillus-genome-projects>
- Brotzu G. (1948). Ricerche su di un nuovo antibiotico. *Pacs.Unica.It*. <http://pacs.unica.it/pacs/brotzu.pdf>
- Canzani, D., & Aldeek, F. (2017). Penicillin G's function, metabolites, allergy, and resistance. *Journal Nutrition and Human Health*, 1(1), 28–40. <http://www.alliedacademies.org/nutrition-human-health/>
- Cao, C., Liu, W., & Li, R. (2009). *Penicillium marneffei* SKN7, a novel gene, could complement the hypersensitivity of *S. cerevisiae* skn7 disruptant strain to oxidative stress. *Mycopathologia*, 168(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9192-x>
- Casas López, J. L., Rodríguez Porcel, E. M., Vilches Ferrón, M. A., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., & Chisti, Y. (2004). Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 48–50. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0108-y>
- Chang, P. K., Scharfenstein, L. L., Luo, M., Mahoney, N., Molyneux, R. J., Yu, J., Brown, R. L., &

- Campbell, B. C. (2011). Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. *Toxins*, 3(1), 82–104. <https://doi.org/10.3390/toxins3010082>
- Coenjaerts, F. E. J., Hoepelman, A. I. M., Scharringa, J., Aarts, M., Ellerbroek, P. M., Bevaart, L., Van Strijp, J. A. G., & Janbon, G. (2006). The *Skn7* response regulator of *Cryptococcus neoformans* involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 652–661. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00065.x>
- Collinson, L. P., & Dawes, I. W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. *Gene*, 156(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00026-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00026-3)
- De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G., & Brocard, C. (2005). A dual role for PP1 in shaping the *Msn2*-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBO Journal*, 24(23), 4115–4123. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600871>
- Demain, A. L. (1957). Inhibition of penicillin formation by lysine. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 67, Issue 1, pp. 244–246). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90265-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90265-5)
- Demain AL. (1983). *Strain exchange between industry and academia*.
- Dotzlaw, J. E., & Yeh, W. K. (1987). Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *Journal of Bacteriology*, 169(4), 1611–1618. <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1611-1618.1987>
- Dreyer, J., Eichhorn, H., Friedlin, E., Kürnsteiner, H., & Kück, U. (2007). A homologue of the *Aspergillus velvet* gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3412–3422. <https://doi.org/10.1128/AEM.00129-07>
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of β -lactam antibiotics. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 61, Issues 5–6, pp. 385–392). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>
- Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 33, Issue 11, pp. 1569–1582).
- Endo, Akira. (2004). The origin of the statins. *International Congress Series*, 1262, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2003.12.099>
- EnsemblFungi. (2020). *Aspergillus terreus* NIH2624 - Ensembl Genomes 46. http://fungi.ensembl.org/Aspergillus_terreus/Info/Annotation/
- Fassler, J. S., & West, A. H. (2011). Fungal *Skn7* stress responses and their relationship to virulence. In *Eukaryotic Cell* (Vol. 10, Issue 2, pp. 156–167). <https://doi.org/10.1128/EC.00245-10>
- Felix, H. R., NÄ¼esch, J., & Wehrli, W. (1980). Investigation of the two final steps in the biosynthesis of cephalosporin C using permeabilized cells of *Cephalosporium acremonium*. *FEMS Microbiology Letters*, 8(2), 55–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05049.x>
- Feng, B., Friedlin, E., & Marzluf, G. A. (1994). A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4432–4439. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4432-4439.1994>

- Fierro, F., Montenegro, E., Gutiérrez, S., & Martín, J. F. (1996). Mutants blocked in penicillin biosynthesis show a deletion of the entire penicillin gene cluster at a specific site within a conserved hexanucleotide sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *44*(5), 597–604. <https://doi.org/10.1007/BF00172491>
- Fleming, A. (1929). ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZÆ. In *British journal of experimental pathology* (Vol. 10, Issue 3). Wiley-Blackwell.
- Forbes. (2011). *The Best-Selling Drugs In America*. <https://www.forbes.com/sites/matthewherper/2011/04/19/the-best-selling-drugs-in-america/#7be5761d1993>
- Fountain, J. C., Bajaj, P., Pandey, M., Nayak, S. N., Yang, L., Kumar, V., Jayale, A. S., Chitikineni, A., Zhuang, W., Scully, B. T., Lee, R. D., Kemerait, R. C., Varshney, R. K., & Guo, B. (2016). Oxidative stress and carbon metabolism influence *Aspergillus flavus* transcriptome composition and secondary metabolite production. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep38747>
- Freudenthal, B. D., Beard, W. A., Perera, L., Shock, D. D., Kim, T., Schlick, T., & Wilson, S. H. (2015). Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature*, *517*(7536), 635–639. <https://doi.org/10.1038/nature13886>
- Gao, T., Shi, L., Zhang, T., Ren, A., Jiang, A., Yu, H., & Zhao, M. (2018). Cross talk between calcium and reactive oxygen species regulates hyphal branching and ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* under copper stress. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00438-18>
- Garrido, E. O., & Grant, C. M. (2002). Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology*, *43*(4), 993–1003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02795.x>
- Görner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., & Schüller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes and Development*, *12*(4), 586–597. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.586>
- Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., & Schüller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO Journal*, *21*(1–2), 135–144. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.135>
- Goulden, S. A., & Chattaway, F. W. (1969). End-product control of acetohydroxyacid synthetase by valine in *Penicillium chrysogenum* Q 176 and a high penicillin-yielding mutant. *Journal of General Microbiology*, *59*(1), 111–118. <https://doi.org/10.1099/00221287-59-1-111>
- Grand View Research. (2019). *Antibiotics Market Size & Share | Industry Trends Report, 2019-2026*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/antibiotic-market>
- Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F. J., & Martin, J. F. (1992). The cefG gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the cefEF gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *Journal of Bacteriology*, *174*(9), 3056–3064. <https://doi.org/10.1128/jb.174.9.3056-3064.1992>
- Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2018). Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 502, Issue 2, pp.

183–186). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.045>

- Hänlinger, C., & Kubicek, C. P. (1989). Regulation of ϵ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-d-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the α -aminoadipate pool size. *FEMS Microbiology Letters*, 65(1–2), 71–75. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03599.x>
- Haas, H., & Marzluf, G. A. (1995). NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Current Genetics*, 28(2), 177–183. <https://doi.org/10.1007/BF00315785>
- Hagiwara, D., Mizuno, T., & Abe, K. (2011). Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Current Genetics*, 57(2), 103–114. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0330-2>
- 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>
- Hansberg T, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. In R. R. Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP & V.-C. E. H (Eds.), *Mensaje Bioquímico* (XXVI, pp. 19–54). Universidad Nacional Autónoma de México. https://www.researchgate.net/publication/228587421_Biologia_de_las_especies_de_oxigeno_reactivas/citations
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., & Toledano, M. B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 45(1), 233–241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03011.x>
- He, X. J., & Fassler, J. S. (2005a). Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1454–1467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04917.x>
- He, X. J., & Fassler, J. S. (2005b). Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1454–1467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04917.x>
- Heller, J., & Tudzynski, P. (2011). Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 369–390. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355>
- Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C., & Reeves, C. D. (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemistry and Biology*, 6(7), 429–439. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80061-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80061-1)
- Hilgendorf, P., Heiser, V., Diekmann, H., & Thoma, M. (1987). Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: Applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 247–251. <https://doi.org/10.1007/BF00252926>
- Hohmann, S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300–372. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.2.300-372.2002>
- Hong, S.-Y., Roze, L. V., & Linz, J. E. (2013). Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the

- Hong, S. Y., Roze, L. V., Wee, J., & Linz, J. E. (2013). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in *Aspergilli*. *MicrobiologyOpen*, 2(1), 144–160. <https://doi.org/10.1002/mbo3.63>
- Hussain, M., Hamid, M. I., Wang, N., Bin, L., Xiang, M., & Liu, X. (2016). The transcription factor SKN7 regulates conidiation, thermotolerance, apoptotic-like cell death and parasitism in the nematode endoparasitic fungus *Hirsutella minnesotensis*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30047>
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K. I., Izawa, S., & Kimura, A. (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 27002–27009. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27002>
- Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511–1527. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S)
- Jayashree, T., & Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(10), 981–985. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00398-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00398-1)
- Jekosch, K., & Kuck, U. (2000). Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* β -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 556–563. <https://doi.org/10.1007/s002530000422>
- Jia, Z., Zhang, X., Zhao, Y., & Cao, X. (2010). Enhancement of lovastatin production by supplementing polyketide antibiotics to the submerged culture of *Aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), 2014–2025. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8762-1>
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D., & Goldberg, A. L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular Cell*, 13(6), 771–781. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00148-0)
- Kavitha, S., & Chandra, T. S. (2009). Effect of vitamin E and menadione supplementation on riboflavin production and stress parameters in *Ashbya gossypii*. *Process Biochemistry*, 44(8), 934–938. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.001>
- Keller, N., Bok, J., Chung, D., Perrin, R. M., & Keats Shwab, E. (2006). *LaeA*, a global regulator of *Aspergillus* toxins. *Medical Mycology*, 44(SUPPL. 1), 83–85. <https://doi.org/10.1080/13693780600835773>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 3, Issue 12, pp. 937–947). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kenne, G. J., Gummadidala, P. M., Omebeyinje, M. H., Mondal, A. M., Bett, D. K., McFadden, S., Bromfield, S., Banaszek, N., Velez-Martinez, M., Mitra, C., Mikell, I., Chatterjee, S., Wee, J., & Chanda, A. (2018). Activation of aflatoxin biosynthesis alleviates total ROS in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/toxins10020057>
- 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>
- Kim, J. H., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., & Campbell, B. C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 735–739. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0123-6>
- Kim, J. H., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., Varga, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Campbell, B. C. (2008). Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1–2), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.058>
- Kohsaka, M., & Demain, A. L. (1976). Conversion of penicillin N to cephalosporin(s) by cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70(2), 465–473. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)91069-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)91069-X)
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., & Nomoto, A. (2001). Regulation of the Yeast Yap1p Nuclear Export Signal Is Mediated by Redox Signal-Induced Reversible Disulfide Bond Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), 6139–6150. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.18.6139-6150.2001>
- Lai, L. S. T., Pan, C. C., & Tzeng, B. K. (2003). The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, 38(9), 1317–1326. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00330-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00330-8)
- Lamarre, C., Ibrahim-Granet, O., Du, C., Calderone, R., & Latgé, J. P. (2007). Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(7), 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.01.009>
- Li, J., Pan, Y., & Liu, G. (2013). Disruption of the nitrogen regulatory gene *AcareA* in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of cephalosporin production and repression of nitrogen metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 61, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.006>
- Liras, P., & Martín, J. F. (2005). Assay Methods for Detection and Quantification of Antimicrobial Metabolites Produced by *Streptomyces clavuligerus*. In *Microbial Processes and Products* (pp. 149–164). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-847-1:149>
- Liu, Q., Ying, S. H., Li, J. G., Tian, C. G., & Feng, M. G. (2013). Insight into the transcriptional regulation of *Msn2* required for conidiation, multi-stress responses and virulence of two entomopathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.008>
- Lledias, F., & Hansberg, W. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods in Enzymology*, 319, 110–119. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)19013-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)19013-5)
- Long, L. K., Yang, J., An, Y., & Liu, G. (2012). Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. *Fungal Genetics and Biology*, 49(2), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.12.004>
- Loomis, W. F., Kuspa, A., & Shaulsky, G. (1998). Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 1(6), 643–648.

[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80109-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80109-4)

- López-Calleja, A. C., Cuadra, T., Barrios-González, J., Fierro, F., & Fernández, F. J. (2012). Solid-State and Submerged Fermentations Show Different Gene Expression Profiles in Cephalosporin C Production by *Acremonium chrysogenum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *22*(2), 126–134. <https://doi.org/10.1159/000338987>
- Lu, J. M. Y., Deschenes, R. J., & Fassler, J. S. (2004). Role for the ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction. *Eukaryotic Cell*, *3*(6), 1544–1556. <https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1544-1556.2004>
- Luengo, J. M., Revilla, G., Lopez, M. J., Villanueva, J. R., & Martín, J. F. (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Bacteriology*, *144*(3), 869–876. <https://doi.org/10.1128/jb.144.3.869-876.1980>
- Ma, S. M., Li, J. W. H., Choi, J. W., Zhou, H., Lee, K. K. M., Moorthie, V. A., Xie, X., Kealey, J. T., Da Silva, N. A., Vederas, J. C., & Tang, Y. (2009). Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. *Science*, *326*(5952), 589–592. <https://doi.org/10.1126/science.1175602>
- Ma, S. M., & Tang, Y. (2007). Biochemical characterization of the minimal polyketide synthase domains in the lovastatin nonaketide synthase LovB. *FEBS Journal*, *274*(11), 2854–2864. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05818.x>
- Mahoney, N., & Molyneux, R. J. (2004). Phytochemical Inhibition of Aflatoxicity in *Aspergillus flavus* by Constituents of Walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(7), 1882–1889. <https://doi.org/10.1021/jf030812p>
- Martín, J. F. (2017). Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 44, Issues 4–5, pp. 525–535). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1830-y>
- Martín, J. F., & Demain, A. L. (2002). Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 20, Issue 12, pp. 502–507). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02070-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02070-X)
- Martín, J. F., Ullán, R. V., & García-Estrada, C. (2010). Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 285–299). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00123.x>
- Martinez-Blanco, H., Reglero, A., Fernhdez-valverde, M., Ferrero, M. a, Moreno, M. a, Peiialvatll, M. a, & Luengoji, J. M. (1992). Isolation and Characterization of the Acetyl-coA Synthetase from *Penicillium chrysogenum*. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(8), 5474–5481.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., & Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal*, *15*(9), 2227–2235. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00576.x>
- Martínez-Soto, D., & Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. In *Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 34, Issue 4, pp. 192–202). Asociacion Espanola de Micologia. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>
- Mathison, L., Soliday, C., Stepan, T., Aldrich, T., & Rambossek, J. (1993). Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl

- transferase. *Current Genetics*, 23(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/BF00336747>
- Matsumura, S., & Suzuki, M. (1986). Feedback Regulation of Acetohydroxy Acid Synthase in *Cephalosporium acremonium* M8650 and a High Cephalosporin-producing Mutant. In *Biol. Chem* (Vol. 50, Issue 2). https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/50/2/50_2_505/_article/-char/ja/
- Mayordomo, I., Estruch, F., & Sanz, P. (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (stress response element)-regulated genes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35650–35656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204198200>
- Minut, W., Tudzynsk, P., & Esser, K. (1982). Extrachromosomal genetics of *Cephalosporium acremonium* - I. characterization and mapping of mitochondrial DNA. *Current Genetics*, 5(3), 227–231. <https://doi.org/10.1007/BF00391811>
- 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>
- Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mendoza, M., Pérez-Sánchez, A., Fierro, F., & Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, 118(12), 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.002>
- Miranda, Roxana U., Gómez-Quiroz, L. E., Mendoza, M., Pérez-Sánchez, A., Fierro, F., & Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, 118(12), 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.002>
- Miranda, Roxana Uri, 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>
- Montibus, M., Khosravi, C., Zehraoui, E., Verdal-Bonnin, M.-N., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2016). Is the Fgap1 mediated response to oxidative stress chemotype dependent in *Fusarium graminearum*? *FEMS Microbiology Letters*, 363(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv232>
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., & Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 295–308). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829416>
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., & Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 16(5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1035>
- Motoyama, T., Ochiai, N., Morita, M., Iida, Y., Usami, R., & Kudo, T. (2008). Involvement of

- putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. In *Current Genetics* (Vol. 54, Issue 4, pp. 185–195). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0211-0>
- Mulder, K. C. L., Mulinari, F., Franco, O. L., Soares, M. S. F., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2015). Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 648–665). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.001>
- Mulford, K. E., & Fassler, J. S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10(6), 761–769. <https://doi.org/10.1128/EC.00328-10>
- Mycocosms. (2020). *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255. https://mycocosm.jgi.doe.gov/PenchWisc1_1/PenchWisc1_1.home.html
- Narasaiah, K. V., Sashidhar, R. B., & Subramanyam, C. (2006). Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia*, 162(3), 179–189. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0052-7>
- Nesci, A. V., & Etcheverry, M. G. (2006). Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science*, 62(8), 775–784. <https://doi.org/10.1002/ps.1251>
- Niki, E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1840, Issue 2, pp. 809–817). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.020>
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (1999). A fission yeast gene (*prp1+*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *Journal of Biochemistry*, 125(6), 1061–1066. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022387>
- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Palonen, E., Neffling, M.-R., Raina, S., Brandt, A., Keshavarz, T., Meriluoto, J., & Soini, J. (2014). Butyrolactone I Quantification from Lovastatin Producing *Aspergillus terreus* Using Tandem Mass Spectrometry—Evidence of Signalling Functions. *Microorganisms*, 2(2), 111–127. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020111>
- Palumbo, J. D., O’Keeffe, T. L., & Mahoney, N. E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164(5), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9057-0>
- Pöggeler, S., Hoff, B., & Kück, U. (2008). Asexual cephalosporin C producer *Acremonium chrysogenum* carries a functional mating type locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6006–6016. <https://doi.org/10.1128/AEM.01188-08>
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581(3), 443–447. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.003>
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell*, 86(6), 865–875. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80162-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80162-2)

- Raina, S., De Vizio, D., Palonen, E. K., Odell, M., Brandt, A. M., Soini, J. T., & Keshavarz, T. (2012). Is quorum sensing involved in lovastatin production in the filamentous fungus *Aspergillus terreus*? *Process Biochemistry*, *47*(5), 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.021>
- Raitt, D. C., Johnson, A. L., Erkin, A. M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D. S., & Johnston, L. H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(7), 2335–2347. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.7.2335>
- Ramsdale, M., Selway, L., Stead, D., Walker, J., Yin, Z., Nicholls, S. M., Crowe, J., Sheils, E. M., & Brown, A. J. P. (2008). MNL1 regulates weak acid-induced stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(10), 4393–4403. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0946>
- Reverberi, M., Fabbri, A. A., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., & Fanelli, C. (2005). Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1979-1>
- Reverberi, Massimo, Gazzetti, K., Punelli, F., Scarpari, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2012). Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(5), 1293–1304. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3985-4>
- Reverberi, Massimo, Punelli, F., Scarpari, M., Camera, E., Zjalic, S., Ricelli, A., Fanelli, C., & Fabbri, A. A. (2010). Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(6), 1935–1946. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2220-4>
- Reverberi, Massimo, Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C., & Fabbri, A. A. (2008). Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: A role for the ApyapA gene. *Eukaryotic Cell*, *7*(6), 988–1000. <https://doi.org/10.1128/EC.00228-07>
- Riad, A., Bien, S., Westermann, D., Becher, P. M., Loya, K., Landmesser, U., Kroemer, H. K., Schultheiss, H. P., & Tschöpe, C. (2009). *Pretreatment with Statin Attenuates the Cardiotoxicity of Doxorubicin in Mice*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3076>
- Robertson, A. P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 279, Issue 41, pp. 42351–42354). American Society for Biochemistry and Molecular Biology. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400019200>
- Roetzer, A., Klopff, E., Gratz, N., Marcet-Houben, M., Hiller, E., Rupp, S., Gabaldón, T., Kovarik, P., & Schüller, C. (2011). Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Letters*, *585*(2), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006>
- Roze, L. V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D., & Linz, J. E. (2011). Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in aspergilli. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(40), 35137–35148. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253468>
- Roze, L. V., Hong, S.-Y., & Linz, J. E. (2013). Aflatoxin Biosynthesis: Current Frontiers. *Annual Review of Food Science and Technology*, *4*(1), 293–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-083012-123702>

- Saijo, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Mihara, T., Takazono, T., Kosai, K., Imamura, Y., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., & Kohno, S. (2010). Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, *169*(2), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9233-5>
- Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. In *Genetics* (Vol. 192, Issue 2, pp. 289–318). <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. In *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 31, Issue 7, pp. 895–906). [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00172-2)
- Santos, J. L., & Shiozaki, K. (2001). Fungal Histidine Kinases. *Science Signaling*, *2001*(98), re1–re1. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.98.re1>
- Sanz, J., & Fayad, Z. A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. In *Nature* (Vol. 451, Issue 7181, pp. 953–957). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature06803>
- Schmitt, E. K., Kempken, R., & Kück, U. (2001). Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: Specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Molecular and General Genetics*, *265*(3), 508–518. <https://doi.org/10.1007/s004380000439>
- Schmitt, Esther K., Hoff, B., & Kück, U. (2004). Regulation of cephalosporin biosynthesis. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 88, pp. 1–43). <https://doi.org/10.1007/b99256>
- Scott, B., & Eaton, C. J. (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 488–493). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.008>
- Seenivasan, A., Subhagar, S., Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. In *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 70, Issue 6, pp. 701–709). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.49087>
- Shang, Y., Chen, P., Chen, Y., Lu, Y., & Wang, C. (2015). MrSkn7 controls sporulation, cell wall integrity, autolysis, and virulence in *Metarhizium robertsii*. *Eukaryotic Cell*, *14*(4), 396–405. <https://doi.org/10.1128/EC.00266-14>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, *86*(1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Signs, S. A., File, T. M., & Tan, J. S. (1984). High-Pressure Liquid Chromatographic Method for Analysis of Cephalosporins. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 26, Issue 5).
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., & Calderone, R. (2004). SKN7 of *Candida albicans*: Mutant Construction and Phenotype Analysis. *Infection and Immunity*, *72*(4), 2390–2394. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2390-2394.2004>
- SOLTERO, F. V., & JOHNSON, M. J. (1953). The effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. *Applied Microbiology*, *1*(1), 52–57. <https://doi.org/10.1128/aem.1.1.52-57.1953>
- Somerson, N. L., Demain, A. L., & Nunhelmer, T. D. (1961). Reversal of lysine inhibition of

- penicillin production by α -aminoadipic or adipic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93(2), 238–241. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90255-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90255-7)
- Song, Z., Yang, J., Xin, C., Xing, X., Yuan, Q., Yin, Y., & Wang, Z. (2018). A transcription factor, MrMsn2, in the dimorphic fungus *Metarhizium rileyi* is essential for dimorphism transition, aggravated pigmentation, conidiation and microsclerotia formation. *Microbial Biotechnology*, 11(6), 1157–1169. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13302>
- Sorrentino, F., Roy, I., & Keshavarz, T. (2010). Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2722-0>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Strauss, J., & Reyes-Dominguez, Y. (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 62–69). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.07.009>
- Suárez, T., & Peñalva, M. A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Molecular Microbiology*, 20(3), 529–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5421065.x>
- Sun, C. X., Ma, Y. J., & Wang, J. W. (2018). Improved hypocrellin A production in *Shiraia bambusicola* by light-dark shift. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 182, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.004>
- Szakács, G., Morovján, G., & Tengerdy, R. P. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*, 20(4), 411–415. <https://doi.org/10.1023/A:1005391716830>
- Toledo, A. V., Franco, M. E. E., Yanil Lopez, S. M., Troncozo, M. I., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2017). Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. In *Physiological and Molecular Plant Pathology* (Vol. 99, pp. 2–6). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>
- Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S., & Inoue, Y. (2004). Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Letters*, 565(1–3), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.091>
- UniProt. (2020). *Penicillium rubens* (strain ATCC 28089 / DSM 1075 / NRRL 1951 / Wisconsin 54-1255) (*Penicillium chrysogenum*). <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000724>
- Van Nguyen, T., Kröger, C., Bönninghausen, J., Schäfer, W., & Bormann, J. (2013). The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(12), 1379–1394. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-13-0125-R>
- Vargas-Pérez, I., Sánchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., & Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1570–1583. <https://doi.org/10.1128/EC.00085-07>

- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. In *Molecular Cell* (Vol. 26, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>
- Walther, A., & Wendland, J. (2012). Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology*, *49*(9), 697–707. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.006>
- Wang, S., Shi, L., Hu, Y., Liu, R., Ren, A., Zhu, J., & Zhao, M. (2018). Roles of the Skn7 response regulator in stress resistance, cell wall integrity and GA biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*, *114*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.002>
- Wei, Z. H., Bai, L., Deng, Z., & Zhong, J. J. (2011). Enhanced production of validamycin A by H₂O₂-induced reactive oxygen species in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioresource Technology*, *102*(2), 1783–1787. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.114>
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 4, Issue 5, pp. 278–286). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio.85>
- Xie, X., Watanabe, K., Wojcicki, W. A., Wang, C. C. C., & Tang, Y. (2006). Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Acyltransferase. *Chemistry and Biology*, *13*(11), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.008>
- Xu, W., Chooi, Y. H., Choi, J. W., Li, S., Vederas, J. C., Da Silva, N. A., & Tang, Y. (2013). LovG: The thioesterase required for dihydromonacolin L release and lovastatin nonaketide synthase turnover in lovastatin biosynthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *52*(25), 6472–6475. <https://doi.org/10.1002/anie.201302406>
- Yang, Q., Yin, D., Yin, Y., Cao, Y., & Ma, Z. (2015). The response regulator BcSkn7 is required for vegetative differentiation and adaptation to oxidative and osmotic stresses in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, *16*(3), 276–287. <https://doi.org/10.1111/mpp.12181>
- Zhang, W. X., & Zhong, J. J. (2010). Effect of oxygen concentration in gas phase on sporulation and individual ganoderic acids accumulation in liquid static culture of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *109*(1), 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.06.024>
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., & Xu, J.-R. (2002). Osmoregulation and Fungicide Resistance: the *Neurospora crassa* os-2 Gene Encodes a HOG1 Mitogen-Activated Protein Kinase Homologue †. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, *68*(2), 532–538. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.532-538.2002>
- Zhgun, A. A., Nuraeva, G. K., Dumina, M. V., Voinova, T. M., Dzhavakhiya, V. V., & Eldarov, M. A. (2019). 1,3-Diaminopropane and Spermidine Upregulate Lovastatin Production and Expression of Lovastatin Biosynthetic Genes in *Aspergillus terreus* via LaeA Regulation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *55*(3), 243–254. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020170>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 428, Issue 19, pp. 3752–3775). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>



Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno en la biosíntesis de Penicilina G, Cefalosporina C y Lovastatina



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de febrero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Pogrado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DRA. AILED PEREZ SANCHEZ
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA
DE: MARIA ESMERALDA BIBIAN LEON

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

MARIA ESMERALDA BIBIAN LEON
ALUMNA

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 SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL

DRA. AILED PEREZ SANCHEZ

SECRETARIO

DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ