

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR
Acremonium chrysogenum TRAS REMODELACIÓN DE LA
CROMATINA INDUCIDA POR EL USO DE INHIBIDORES DE
HISTONAS DESACETILASAS**

Tesis

Para obtener el grado de maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

Alfonso Barrón Gutiérrez

Director

Dr. Francisco José Fernández Perrino

MÉXICO, D.F., Noviembre del 2015

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

El presente trabajo fue financiado por el CONACYT a través de la beca de maestría con número de registro 300608

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco José Fernández Perrino y con la asesoría del Dr. Francisco Fierro Fierro (Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa) y el Dr. Alberto Mendoza Espinoza (Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Autónoma de la Ciudad de México plantel Casa Libertad).

México, D.F., a 18 de noviembre del 2015

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**“PERFIL DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR
Acremonium chrysogenum TRAS REMODELCIÓN DE LA
CROMATINA INDUCIDA POR EL USO DE INHIBIDORES DE
HISTONAS DESACETILASAS”**

Que presentó
Alfonso Barrón Gutiérrez

Comité tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

Jurado

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dra. Mabel Fragoso Serrano

Vocal: Dr. José Alberto Mendoza Espinoza



The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature above it. The signatures are: 1. A small, stylized signature. 2. A signature that appears to be 'F. Fierro'. 3. A signature that appears to be 'M. Fragoso'. 4. A signature that appears to be 'J. A. Mendoza'.

Errar es humano, perdonar es divino,
rectificar es de sabios (Alexander Pope)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que desde pequeño me enseñaron el amor y la bondad, me enseñaron a ser un hombre de respeto y de lealtad, trabajando de día y noche para conseguir una mejor vida, manter una familia, dos hijos y un hogar.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino (PACO), por darme la oportunidad de estar en el laboratorio de ingeniería genética y metabolismo secundario, la oportunidad de participar en este proyecto tan agradable y en algo que me gusta, tenerme mucha paciencia, mejor aún por estar bajo su dirección.

Al Dr. José Alberto Mendoza Espinoza, por las valiosas y continuas asesorías para la elaboración del presente trabajo y abrirme las puertas al laboratorio de productos naturales en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

A mis amigos (as) Itza, Naerobi, Lucia, Isak, Israel, Tere, Monse, Santiago, Dulce, Omar, Beto he tenido muy bonitas experiencias a lo largo de todo el tiempo que llevo de conocerlos y como dicen; nadie conoce a sus amigos hasta caer en desgracia y con ustedes lo he comprobado en más de una ocasión, en mis diferentes facetas.

A los revisores del presente trabajo Dra. Araceli Tomasini Campocosio, Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano, Dr. José Alberto Mendoza Espinoza y Dr. Francisco Fierro Fierro.

A los compañeros del laboratorio Moi, Gerardo, Mari, Omar, Lalo, Kenia, Will, Hypatia, Ulises, Esmeralda, Vanessa y los que me falten, por los buenos momentos que he tenido a lo largo de este tiempo con ustedes.

GLOSARIO

6-APA Ácido 6-aminopenicilánico

7-ACA Ácido 7-aminocefalosporánico

7-ADAC Ácido 7-aminodesacetilcefalosporánico

ADN Ácido desoxirribonucleico

Alcaloides: Grupo de compuestos que contienen nitrógeno (el nitrógeno generalmente esta intracíclico) de carácter básico y por lo general de origen vegetal.

Antraquinonas Son compuestos aromáticos polihidroxilados, a veces metilados con uno o más grupos cetónicos.

ARN: Ácido ribonucleico

CFC: Cefalosporina C

DMTs: Metil transferasa de ADN

D.O.: Densidad óptica

Epigenética: Estudio de cambio en la expresión génica sin que existan modificaciones en el ADN

HAT: Acetil transferasa

HDAC: Histona desacetilasa

HCT-15: Línea celular correspondiente a cáncer de colon.

HeLa: Línea celular correspondiente a cáncer cérvico uterino.

MCF-7: Línea celular correspondiente a cáncer de mama.

rpm: revoluciones por minuto.

Saponinas: Grupos de glucósidos con polaridad alta, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón.

Taninos: Sustancias de origen vegetal y de estructura polifenólica

VMD: Detector de múltiples longitudes de onda

RESUMEN

Los hongos filamentosos producen una variedad de compuestos bioactivos, tales como agentes antivirales, antibacterianos, antifúngicos y citotóxicos, entre otros. Estudios genómicos y transcriptómicos han puesto de manifiesto que ciertos conjuntos de genes no se expresan en condiciones estándar de laboratorio, por lo tanto habría pocas posibilidades de encontrar nuevos metabolitos en hongos ya estudiados.

Algunos compuestos químicos (como los ácidos hidroxámicos, derivados de benzamidas, péptidos cíclicos, ácidos grasos de cadena corta, entre otros) inducen cambios en el nivel de compactación de la cromatina, modificando la expresión génica y, en consecuencia, el fenotipo. Mediante el uso de estos compuestos es posible impulsar la expresión de conjuntos de genes que comúnmente no se expresan bajo condiciones de laboratorio. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de tres compuestos inhibidores de histonas desacetilasas, que inducen la remodelación de la cromatina, en diferentes concentraciones y distintos tiempos de cultivo en medio líquido de *Acremonium chrysogenum*, y observar el cambio producido en el perfil químico extracelular.

Se probaron veinticuatro condiciones diferentes y los extractos obtenidos fueron analizados por barrido de UV-VIS (las mejores intensidades a estudiar están entre 190 y 450 nm). Al analizar el cambio en el patrón químico obtenido por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), las modificaciones más significativas se encontraron a 215 nm. En dicha longitud de onda se manifestaron tres señales, correspondientes a los picos observados a los 15, 19.5 y 20.5 minutos, que fueron denominados como S, X e Y. El compuesto inhibidor de histonas desacetilasas ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) permitió que se obtuvieran las mezclas de compuestos X e Y, mientras que ácido suberoilo bis-hidroxámico (SBHA) permitió obtener sólo X y la tricostatina A (TSA) permitió que se obtuvieran las mezclas de compuestos S e Y. Se determinó actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) del extracto en el que apareció la señal correspondiente al pico llamado "S", observándose una inhibición total del crecimiento a concentraciones de 4 y 20 µg/ml y 48 horas de incubación. Por análisis fitoquímico se pudo asociar a la condición donde salió "S" con alcaloides, la que contenía "X" con antraquinonas y la que presentó "X" e "Y" con antraquinonas y taninos.

ABSTRACT

Filamentous fungi produce a variety of bioactive compounds, such as antiviral, antibacterial, antifungal and cytotoxic agents, among others. Genomic and transcriptomic studies have revealed that certain sets of genes are not expressed under standard laboratory conditions, and therefore there would be little chance of finding new metabolites in fungi that have been previously studied.

Some chemical compounds (such as hydroxamic acids, benzamide derivatives, cyclic peptides, short chain fatty acids, etc.) Cause changes in the chromatin compaction level, altering gene expression and consequently inducing phenotypic changes. Thus, by using these compounds it is feasible to induce the expression of gene *clusters* that are not commonly expressed under laboratory conditions. The objective of this work was to study the effect of three histone deacetylase inhibitors which induce chromatin remodeling, in different concentrations and different times of liquid culture of *Acremonium chrysogenum*, and analyze the changes in the extracellular chemical profile.

Twenty four different conditions were tested, and the extracts obtained were analyzed by UV-VIS scanning (best wavelengths for the study range from 190 to 450 nm). By analyzing the analysis of the change in the chemical pattern obtained by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), revealed that the more significant modifications were found at 215 nm. With this wavelength, three peaks were clearly detected, at 15, 19.5 and 20.5 minutes, which were named as S, X and Y. Compound inhibitor of histone deacetylases suberohydroxamic acid (SAHA) allowed mixture of compounds X and Y are obtained, while bis-suberohydroxamic acid (SBHA) allowed to obtain only compound X, and trichostatin A (TSA) compounds S and Y. A condition where left corresponding to the peak called "S" signal is determined cytotoxic activity on the cell line MCF-7 (breast cancer), totally inhibiting growth at concentrations of 4 and 20 µg/ml at 48 hours. By phytochemical analysis it could be associated with the condition where out "S" with alkaloids, while out where "X" with anthraquinone and showed where "X" and "Y" with anthraquinones and tannins.

Contenido

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introducción..... | 16 |
| 2. | Metabolitos secundarios en hongos filamentosos..... | 17 |
| 3. | Estructura de la cromatina | 19 |
| 3.1. | Nucleosomas | 20 |
| 3.2. | Modificaciones químicas de histonas..... | 21 |
| 3.2.1. | Acetilación..... | 21 |
| 3.2.2. | Metilación..... | 22 |
| 3.2.3. | Fosforilación..... | 22 |
| 3.2.4. | Ubiquitinación | 22 |
| 3.3. | Histonas desacetilasas..... | 23 |
| 3.4. | Inhibidores de las histonas desacetilasas | 23 |
| 4. | La epigenética y su papel en la regulación del metabolismo secundario..... | 25 |
| 5. | Estrategias de minería genómica en hongos filamentosos | 27 |
| 5.1. | Identificación de metabolitos por bioinformática..... | 27 |
| 5.2. | Producción de metabolitos a través de la simulación del hábitat | 28 |
| 5.3. | Búsqueda de metabolitos usando métodos basados en biología molecular y epigenética | 29 |
| 6. | Justificación..... | 34 |
| 7. | Hipótesis | 35 |
| 8. | Objetivos | 35 |
| 8.1. | Objetivo general | 35 |
| 8.2. | Objetivos particulares..... | 35 |
| 9. | Materiales y métodos | 36 |

| | |
|--|----|
| 9.1. Cepa fúngica | 36 |
| 9.2. Medios de cultivo | 36 |
| 9.3.1. Ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA)..... | 39 |
| 9.3.2. Ácido suberoilo bis-hidroxámico (SBHA)..... | 40 |
| 9.3.3. Tricostatin A (TSA)..... | 41 |
| 9.4.1 Análisis de cambio de perfil metabólico extracelular..... | 42 |
| 9.4.2 Análisis fitoquímico..... | 43 |
| 9.4.3 Ensayo de citotoxicidad..... | 45 |
| 10. Resultados y discusión..... | 46 |
| 10.1. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA, por sus siglas en inglés)..... | 46 |
| 10.1.1. Efecto de la adición del remodelador SAHA en la producción de biomasa y pH..... | 46 |
| 10.1.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a SAHA..... | 46 |
| 10.1.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador de la cromatina SAHA..... | 47 |
| 10.2. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina ácido suberoilo bis-hidroxámico (SBHA, por sus siglas en inglés)..... | 53 |
| 10.2.1. Efecto de la adición del remodelador SBHA en la producción de biomasa y pH..... | 53 |
| 10.2.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a SBHA..... | 53 |
| 10.2.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador SBHA..... | 53 |
| 10.3. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina tricostatina A (TSA, por sus siglas en inglés) | 59 |

| | |
|--|----|
| 10.3.1. Efecto de la adición del remodelador TSA en la producción de biomasa y pH. | 59 |
| 10.3.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a TSA. | 59 |
| 10.3.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador TSA..... | 59 |
| 10.4. Análisis fitoquímico y citotóxico de las familias encontradas empleando los diferentes inhibidores..... | 65 |
| 10.4.1. Análisis fitoquímico..... | 65 |
| 10.4.2. Ensayos de citotoxicidad..... | 66 |
| 11. Conclusiones..... | 70 |
| 12. Perspectivas..... | 71 |
| 13. Bibliografía | 72 |
| 14. ANEXOS | 77 |
| 14.1. Ensayos fitoquímicos para el medio de cultivo..... | 77 |
| 14.2. Ensayos fitoquímicos medio de cultivo mas inóculo | 78 |
| 14.3. Ensayos fitoquímicos para la familia S..... | 80 |
| 14.4. Ensayos fitoquímicos para la familia X..... | 82 |
| 14.5. Ensayos fitoquímicos para la familia Y..... | 83 |
| 14.6. Ensayos fitoquímicos para la familia XY | 85 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios | 18 |
| Figura 2 Niveles de organización de la cromatina | 19 |
| Figura 3 Representación del nucleosoma. | 20 |
| Figura 4 Clasificación de inhibidores de histonas desacetilasas | 24 |
| Figura 5 Confirmación de metabolitos usando bioinformática. | 28 |
| Figura 6 Activación de genes usando la técnica del cocultivo. | 29 |
| Figura 7 Descubrimiento de nuevos (MS) basado en estrategias de biología molecular. | 32 |
| Figura 8 Descubrimiento de (MS) secundarios basados en métodos epigenéticos. | 33 |
| Figura 9 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin SAHA | 48 |
| Figura 10 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por <i>A. chrysogenum</i> en medio con y sin SAHA. | 49 |
| Figura 11 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SAHA. | 51 |
| Figura 12 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SAHA. | 52 |
| Figura 13 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin SBHA | 54 |
| Figura 14 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por <i>A. chrysogenum</i> en medio con y sin SBHA. | 55 |
| Figura 15 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SBHA. | 57 |
| Figura 16 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SBHA. | 58 |
| Figura 17 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin TSA. | 60 |
| Figura 18 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por <i>A. chrysogenum</i> en medio con y sin TSA. | 61 |
| Figura 19 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina TSA. | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina TSA..... | 64 |
| Figura 21 Ensayo de citotoxicidad en células HCT-15. | 67 |
| Figura 22 Ensayo de citotoxicidad en células MCF-7..... | 68 |
| Figura 23 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa. | 68 |
| Figura 24 Ensayo de citotoxicidad en MCF-7 a las 24 y 48 horas..... | 69 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Efectos de modificaciones puntuales en histonas..... | 21 |
| Tabla 2 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SAHA y con SAHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas..... | 50 |
| Tabla 3 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SAHA y con SAHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas..... | 50 |
| Tabla 4 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SBHA y con SBHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas..... | 56 |
| Tabla 5 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SBHA y con SBHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas..... | 56 |
| Tabla 6 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin TSA y con TSA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas..... | 62 |
| Tabla 7 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin TSA y con TSA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas..... | 62 |
| Tabla 8 Análisis fitoquímico asociado al uso de inhibidores de histona desacetilasas | 66 |

1. Introducción

Acremonium chrysogenum ATCC11550 es un hongo filamentoso del grupo de los ascomicetos, que fue descubierto por Giuseppe Brotzu en la biota microbiana del agua marina cercana a salidas de aguas residuales en Cagliari (Italia) en 1948. Actualmente es usado a nivel industrial en la producción de cefalosporina C (CFC), un antibiótico de la familia de los beta-lactámicos. Además, este hongo produce otros metabolitos secundarios, como la crisogenina, penicilina N y la desacetilcefalosporina C.

A. chrysogenum se propaga de manera asexual, mediante la formación de conidiosporas y artrosporas. Pertenece al orden de los hipocreales, hongos con características muy llamativas por sus colores, que van desde amarillo a rojo brillante (Glenn et al., 1996). Está relacionado desde el punto de vista morfológico con especies de otros géneros del mismo orden, como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Nectria*, *Beauveria*, *Gibberella*, *Cordyceps* y *Claviceps* (Summerbell et al., 2011). Sus colonias son de crecimiento lento, compactas y húmedas; con el paso del tiempo se convierten en rugosas. En un inicio las colonias son blancas y con el tiempo se vuelven de distintos colores, debido a los pigmentos que producen (Seidel et al., 2002).

La CFC es usada para combatir bacterias Gram+ y Gram-, normalmente como un sustituto de la penicilina, otro antibiótico beta-lactámico. Los antibióticos beta-lactámicos representan ingresos para la industria de 22,000 millones de dólares anuales, más de la mitad procedentes de derivados de la CFC (Terfehr et al., 2014). La CFC es precursora de todas las cefalosporinas semisintéticas con uso médico. A partir de ésta se obtiene el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que posteriormente es modificado en sus cadenas laterales, dando lugar a las diferentes generaciones de cefalosporinas actuales (Mediavilla y García-Lobo, 2005). Los precursores 7-ACA y 7-ADCA, utilizados para obtener las cefalosporinas semisintéticas, se obtienen en su mayoría a partir de procesos de fermentación de *Acremonium chrysogenum*; sin embargo, hay reportes en los que también ha sido usado *Penicillium chrysogenum* con este objetivo (Nijland et al., 2008).

2. Metabolitos secundarios en hongos filamentosos

Los hongos filamentosos producen durante su desarrollo una diversidad de compuestos químicos con diferentes estructuras y funciones biológicas diversas, llamados metabolitos secundarios (MS). La producción de estos compuestos se correlaciona con el fin de la fase de crecimiento y el principio de la formación de esporas (Calvo et al., 2002). Juegan un papel importante como defensa en condiciones adversas, se suelen producir por rutas anabólicas especializadas (posiblemente por ser prescindibles para el crecimiento y desarrollo normal del hongo) y, a menudo, tienen funciones desconocidas en los organismos productores. Los genes biosintéticos de los MS se encuentran habitualmente agrupados en *clusters*. Este hecho, y las características especiales de muchas de las enzimas que participan en vías biosintéticas de MS, permiten identificar estos genes a partir de la secuencia completa de los genomas. Los MS comprenden una enorme variedad de estructuras químicas, entre las que se incluyen compuestos de tipo:

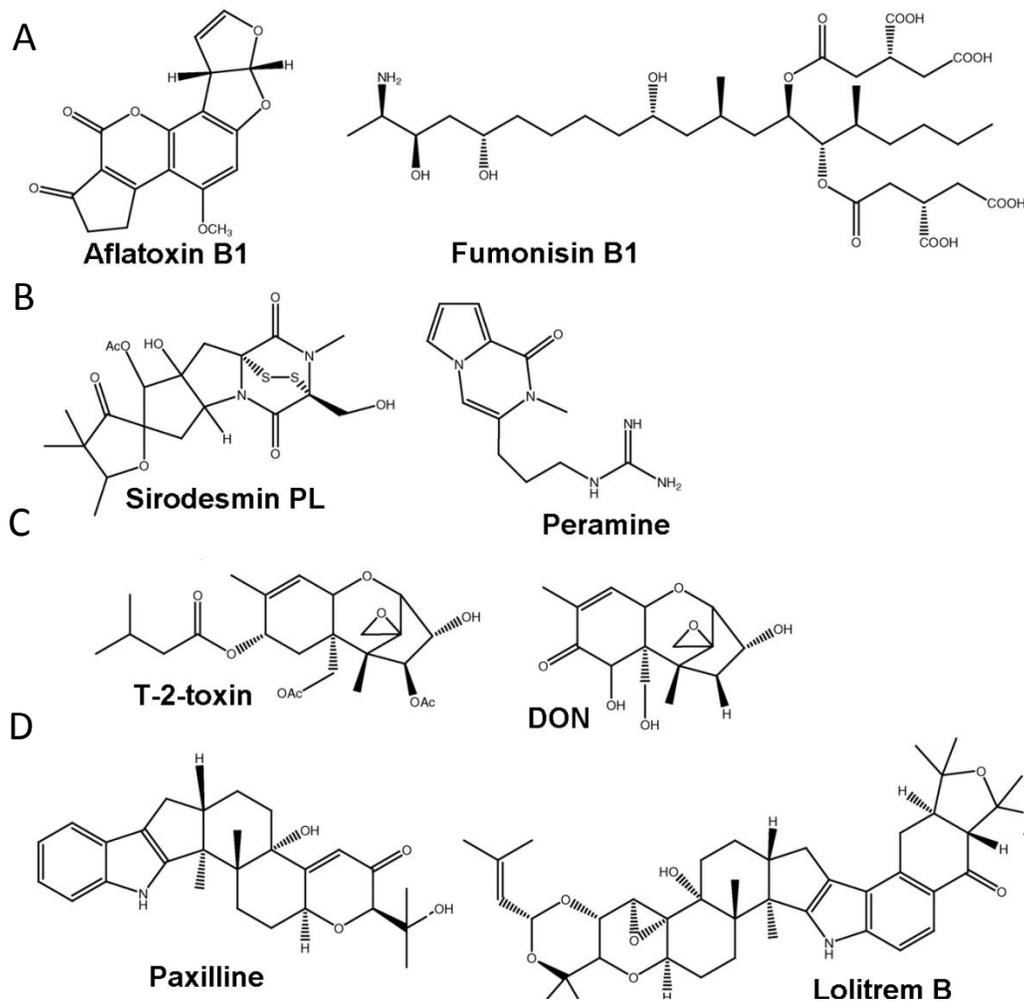
(A) Policétidos por ejemplo: Aflatoxina B1 producida por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, Fumonisin B1 producidas por *Fusarium verticillioides*.

(B) Péptidos no ribosomales, por ejemplo: Sirodesmina PL producida por *Eptosphaeria maculans*, Peramine producida por *Epichloe Neotyphodium spp.*

(C) Terpenos por ejemplo: Toxina T-2 producida por *Fusarium sporotrichioides* y deoxinivalenol (DON) producido por *Fusarium graminearum*.

(D) Terpenos de indol por ejemplo: Indole producido por *Penicillium paxilli*, Paxilline producido por *Penicillium paxilli* y Lolitrem B producido *Neotyphodium spp.*, (ver figura 1, figura tomada de Fox y Howlett 2008).

Figura 1. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios



En eucariotas, es frecuente que los genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios se encuentren agrupados en *clusters*, cuya expresión se encuentra regulada por múltiples vías en respuesta a señales ambientales específicas. Se ha demostrado que la modificación del estado en que se encuentra la cromatina es uno de esos mecanismos de regulación y da como resultado la activación de la expresión de genes del metabolismo secundario. A este tipo de regulación se le conoce como epigenética (Lim et al., 2012).

3. Estructura de la cromatina

En células eucariotas, el ADN se encuentra dentro del núcleo en diferentes grados de condensación. Básicamente puede distinguirse, por un lado, la heterocromatina (regiones de la cromatina densamente empaquetadas, inactivas transcripcionalmente), que es abundante en telómeros y centrómeros e importante para la protección de los extremos de los cromosomas y la separación de las cromátidas en la mitosis. La heterocromatina tiende a ser rica en secuencias repetitivas, se asocia con niveles bajos de acetilación y niveles elevados de metilación en algunos residuos de las histonas como H3K9, H3K27 y H4K20. Por otro lado, está la eucromatina: son regiones relativamente dispersas, poco condensadas, que ocupan la mayor parte del núcleo y presentan mayor flexibilidad funcional que la heterocromatina. Los genes presentes en la eucromatina pueden estar transcripcionalmente activos o permanecer inactivos, ver figura 2 (Smith et al., 2012).

Figura 2 Niveles de organización de la cromatina

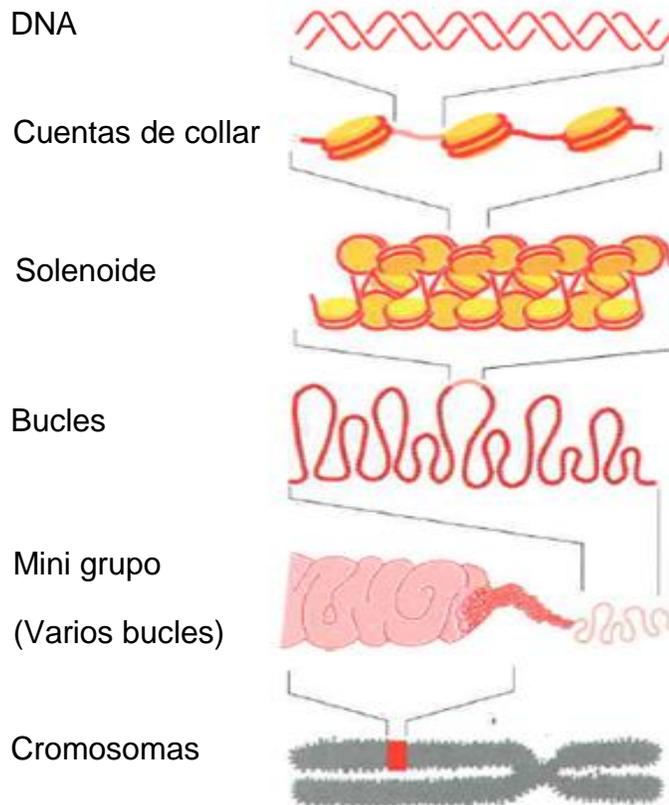


Figura 2. En el nivel más bajo, el ADN se ensambla con las histonas para formar la unidad fundamental de la cromatina, llamada nucleosoma. Estas estructuras se empaquetan en fibras, que se asocian en un nivel mayor de compactación para finalmente formar los cromosomas.

3.1. Nucleosomas

La subunidad de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 147 pb de ADN que se enrollan sobre un octámero de proteínas altamente conservadas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4, dos unidades de cada una por octámero). Las histonas sufren modificaciones postraduccionales (como la acetilación en las lisinas, metilación en las lisinas y argininas, fosforilación en las serinas y treoninas, ubiquitinación en las lisinas, glicolisación, sumoilación, carboxilación, o la adición de biotina o grupos propionilo y butirilo, muchos de ellos en residuos de aminoácidos al azar) que dan como resultado la remodelación de la cromatina, ya sea para pasar de heterocromatina a eucromatina o viceversa, en la figura 3 se observa la representación del nucleosoma en diferentes formas (Angelov et al., 2001; Brosch et al., 2008).

Figura 3 Representación del nucleosoma.

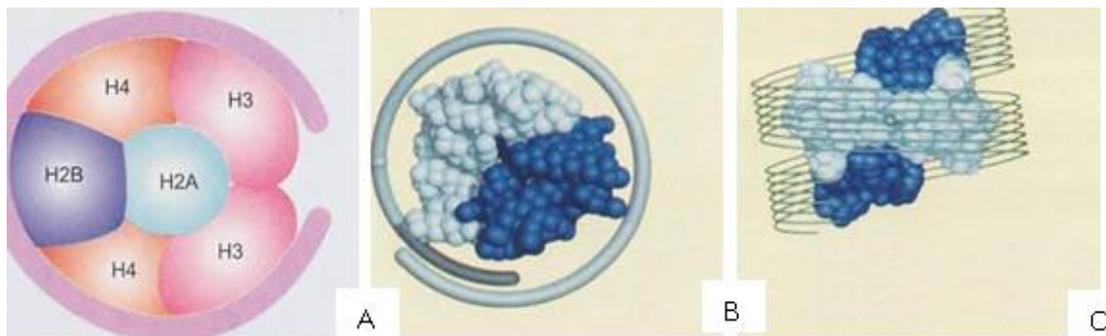


Figura 3. En la figura A se observa la representación clásica del nucleosoma, en B y C se ve el núcleo de histonas representados en su forma de cristal, en azul se representa H2A y H2B, figura tomada de Angelov et al., 2001.

En la tabla 1 pueden observarse algunos ejemplos de modificación química de histonas, con resultados muy específicos en cuanto a la estructura y función de la cromatina (Jenuwein Thomas et al 2001).

Tabla 1 Efectos de modificaciones puntuales en histonas.

| Efectos de la modificación de histonas en la estructura y función de la cromatina | | | |
|---|--------|---------------|--|
| Histona | Sitio | Modificación | Función |
| H3 | Lys-4 | Metilación | Condensación de la cromatina |
| | Lys-9 | Metilación | |
| | Lys-9 | Metilación | |
| | Lys-9 | Acetilación | |
| | Ser-10 | Fosforilación | |
| | Lys-14 | Acetilación | |
| H4 | Lys-79 | Metilación | Previene la metilación en Lys-9 y el silenciamiento en el telomero en el ensamblaje del nucleosoma |
| | Arg-3 | Metilación | |
| | Lys-5 | Acetilación | |
| | Lys-12 | Acetilación | |
| | Lys-16 | Acetilación | |

Tabla 1 Se muestra el efecto de algunas modificaciones postraduccionales conocidas en el estado de la cromatina, tabla tomada de Jenuwein Thomas et al. 2001.

3.2. Modificaciones químicas de histonas

3.2.1. Acetilación

La acetilación de las histonas es una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes, ocurre en aproximadamente el 85% de todas las proteínas eucarióticas. En ella se añade un grupo acetilo que viene del Acetil-CoA, mediante enzimas llamadas histonas acetil transferasas (HATs). Y en las histonas el grupo acetilo puede ser eliminado por medio de las histonas desacetilasas (HDACs). Al incrementarse el número de grupos acetilo se debilita el contacto histonas-ADN, generando una estructura de la cromatina relajada (eucromatina) que facilita el proceso de la transcripción. La acetilación se lleva a cabo sobre el grupo amino de los residuos de lisina de todas las histonas, por lo que esta modificación puede ocurrir en 26 posibles localizaciones (Brosch et al., 2008).

3.2.2. Metilación

Hay dos formas de metilación conocidas. En la primera de ellas se metilan los residuos de lisina con una enzima metil transferasa. Esto ocurre en los residuos K4, K9, K14, K27, K36 y K72 de la histona H3, y los residuos K20 y K59 de la histona H4. En la segunda forma se metilan los residuos de arginina mediante la familia de enzimas arginina metil transferasa (PRMT). Estas modificaciones ocurren en el extremo N-terminal, en los residuos de las argininas R2, R8, R17 y R26 en H3, y R3 en H4. Al igual que la acetilación, éste es un proceso dinámico y la modificación por metilación funciona a veces como marca para activar o desactivar genes. En levaduras, por ejemplo: los diferentes tipos de metilación son muy importantes en los fenómenos de compatibilidad sexual (Brosch et al., 2008).

3.2.3. Fosforilación

Se ha visto que se da por lo general en la histona H1 y sirve como una señal para que la célula entre en mitosis, aunque también se ha observado que a veces este proceso puede señalizarse mediante acetilación en los residuos H3K9 y H3K14 (Brosch et al., 2008).

3.2.4. Ubiquitinación

Las histonas H2A, H2B y H3 tienen una alta probabilidad de ser ubiquitinadas en el grupo ϵ -amino de las lisinas K119 en H2A y K120 en H2B en los eucariotas superiores. H2A es usualmente ubiquitinada en un grado mayor a H2B. La histona H2A ubiquitinada se asocia normalmente con genes transcripcionalmente activos (Selker et al., 2002)

3.3. Histonas desacetilasas

Las histonas desacetilasas (HCDAs) eliminan el grupo acetilo de los residuos de las lisinas en las histonas. Muchas de estas enzimas no son exclusivas de los eucariotas sino que también están presentes en arqueas y eubacterias, por lo que todo parece indicar que provienen de un ancestro común. Hoy en día se clasifican de acuerdo a la similitud filogenética. Las HDACs son dependientes de NAD^+ , con secuencias homólogas a los genes reguladores SIR2 de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta levadura, SIR2 se ha asociado con el complejo RENT (regulador del silenciamiento nuclear y salida de la telofase); la delección de SIR2 reduce la vida útil, mientras que su sobreexpresión la alarga. Además se le ha involucrado con otros genes responsables del silenciamiento de los telómeros en los cromosomas, algo que también ha sido descrito en *A. nidulans* (Shwab et al., 2007).

3.4. Inhibidores de las histonas desacetilasas

Estos compuestos se pueden dividir en cuatro grupos, con base en su estructura (ver figura 4).

- Ácidos hidroxámicos: por ejemplo Tricostatin A (TSA), Vorinostat (SAHA), Belinostat (PDX-101), Panobinostat (LBH-589) y Givinostat (ITF2357), con actividad en concentraciones de nanomolar.
- Péptidos cíclicos, por ejemplo Romidepsina (FK-228), Abexinostat (PCI-24781) y Cyclodepsipeptide (EGM-556), con actividad en concentraciones de nanomolar.
- Ácidos grasos de cadena corta: por ejemplo Acido Valproico, Fenil Butirato, AN-9 y Suberoyl bis-Hydroxamic Acid (SBHA), con actividad en concentraciones de nanomolar.
- Derivados de benzamidas: por ejemplo Entinostat (MS-275) y Mocetinostat (MGCD0103), con actividad en concentraciones de micromolar (Dokmanovic et al., 2007).

Figura 4 Clasificación de inhibidores de histonas desacetilasas

| Clase | Compuesto | Estructura | Potencia |
|---------------------|------------------|------------|----------|
| Ácidos hidroxámicos | TSA | | nmol/L |
| | SAHA | | μmol/L |
| | CBHA | | μmol/L |
| | LAQ-824 | | nmol/L |
| | PDX-101 | | μmol/L |
| | LBH-589 | | nmol/L |
| | ITF-2357 | | nmol/L |
| Péptidos cíclicos | PCI-24781 | No hay | nmol/L |
| | FK-228 | | nmol/L |
| Ácidos alifáticos | Ácido Valprónico | | mmol/L |
| | Fenil butirato | | mmol/L |

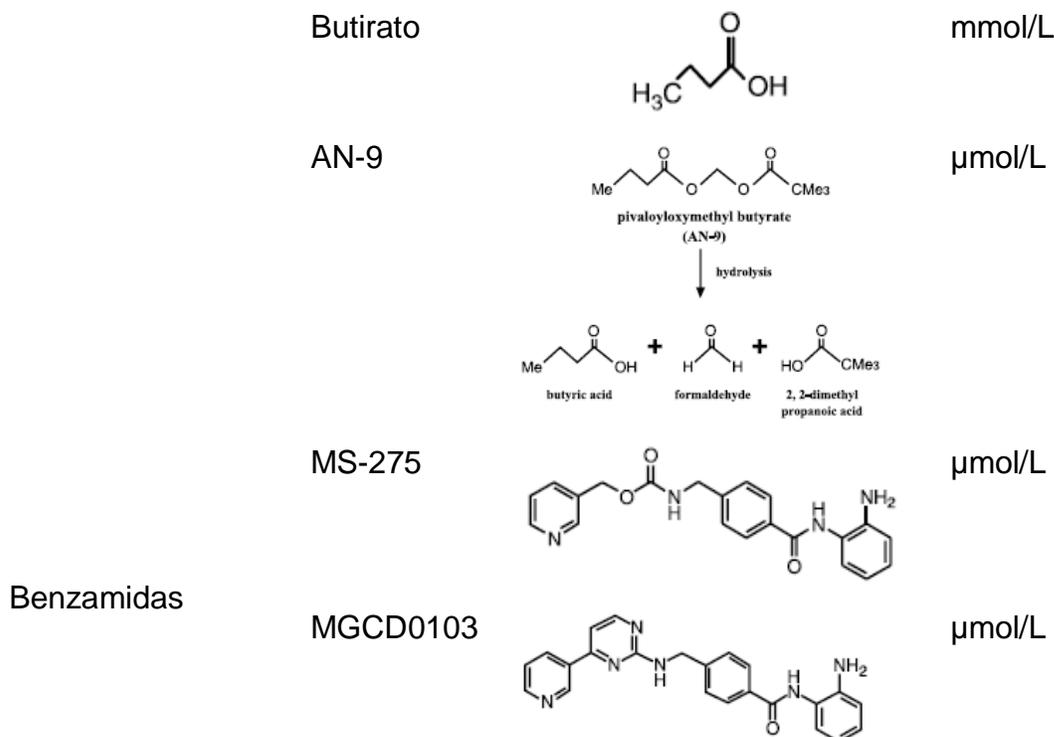


Figura 4 Clasificación de inhibidores de histonas desacetilasas de acuerdo a su estructura química, figura tomada de Dokmanovic et al. 2007.

4. La epigenética y su papel en la regulación del metabolismo secundario

La definición clásica de epigenética es “el estudio de los cambios fenotípicos hereditarios que no implican alteraciones en la secuencia de ADN”, en el sentido de la información transportada por el genoma (por ejemplo, en la cromatina) que no está codificada por el ADN (Bannister y Kouzarides, 2011).

Muchos de los *clusters* de genes del metabolismo secundario presentes en los hongos no se expresan en las condiciones normales de cultivo, por lo que se les denomina *clusters* crípticos o silentes. El número total de *clusters* del metabolismo secundario que se encuentra en un genoma fúngico es por lo general muy superior al número de metabolitos secundarios que se sabe que producen. Se cree que aproximadamente el 70% del genoma no se expresa en condiciones normales (Soukup y Keller, 2012).

Existen dos grupos de estrategias en las que se emplean compuestos químicos con la capacidad de modificar los procesos epigenéticos asociados a la cromatina:

I. El primer grupo consiste en agentes de modificación de las proteínas llamadas histonas, que son responsables de la alteración de las interacciones de unión del ADN y dichas proteínas (por ejemplo, con la inhibición de la desacetilación de las histonas). Un ejemplo bien establecido de una molécula inhibidora de las histonas desacetilasas es el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA). Aunque existen compuestos con efectos similares en mamíferos, hay pocos reportes de estos compuestos aplicados a hongos.

II. El segundo grupo comprende el uso de marcadores de unión covalente al ADN (por ejemplo, metilación de ADN). La 5-azacitidina (análogo de la citidina) representa un inhibidor ampliamente utilizado a este respecto, aunque existen moléculas muy distintas con efectos similares y con pocos reportes de aplicación en hongos (Cichewicz, 2012).

En 2007 se obtuvieron las primeras evidencias directas de la implicación de la cromatina en la regulación del metabolismo secundario, a partir de unas mutantes que carecían de una actividad HDAC (histona desacetilasa) por delección del gen *hdaA* en *Aspergillus nidulans*. Las mutantes $\Delta hdaA$ mostraban una activación específica de los *clusters* próximos a regiones teloméricas y un aumento en la producción de los metabolitos correspondientes: esterigmatocistina (una micotoxina cancerígena), penicilina y un precursor del ácido norsolorínico (Shwab et al., 2007). A la par, Roze et al. (2007) demostraron que la acetilación de la histona H4 ocurre de forma paralela a la activación transcripcional de los genes del *cluster* de aflatoxina.

La acetilación de las histonas está habitualmente relacionada con la formación de eucromatina y, por lo tanto, con una activación de la transcripción, mientras que la desacetilación se relaciona con la formación de heterocromatina y con la represión de la transcripción (Williams et al., 2008).

5. Estrategias de minería genómica en hongos filamentosos

Se conoce como minería genómica (*genome mining*) a un conjunto de técnicas que tienen como objetivo la detección e identificación de nuevos compuestos utilizando la información presente en el genoma de un organismo; dentro de este conjunto de técnicas están las encaminadas a activar aquellos *clusters* que no se expresan bajo condiciones normales de cultivo. La activación de estos *clusters* proporcionará una nueva vía para el aislamiento e identificación de biomoléculas novedosas (Brakhage, 2013).

5.1. Identificación de metabolitos por bioinformática

Esta técnica consiste en que, a partir de un genoma conocido, se usan métodos bioinformáticos para la búsqueda de metabolitos, sugiriendo conjuntos de genes que puede que participen en la síntesis de un producto. Existen dos estrategias para confirmar a estos grupos de genes: uno de ellos es llamado “enfoque genomisotópico” en donde se requiere que los sustratos estén marcados, para después buscar a los metabolitos sugeridos con la marca del sustrato, y una segunda estrategia llamada “enfoque de reconstrucción *in vitro*”, que consiste en la producción *in vitro* de enzimas para la biosíntesis del metabolito propuesto y la obtención del producto tras añadir el sustrato necesario (Ver figura 5).

Figura 5 Confirmación de metabolitos usando bioinformática.

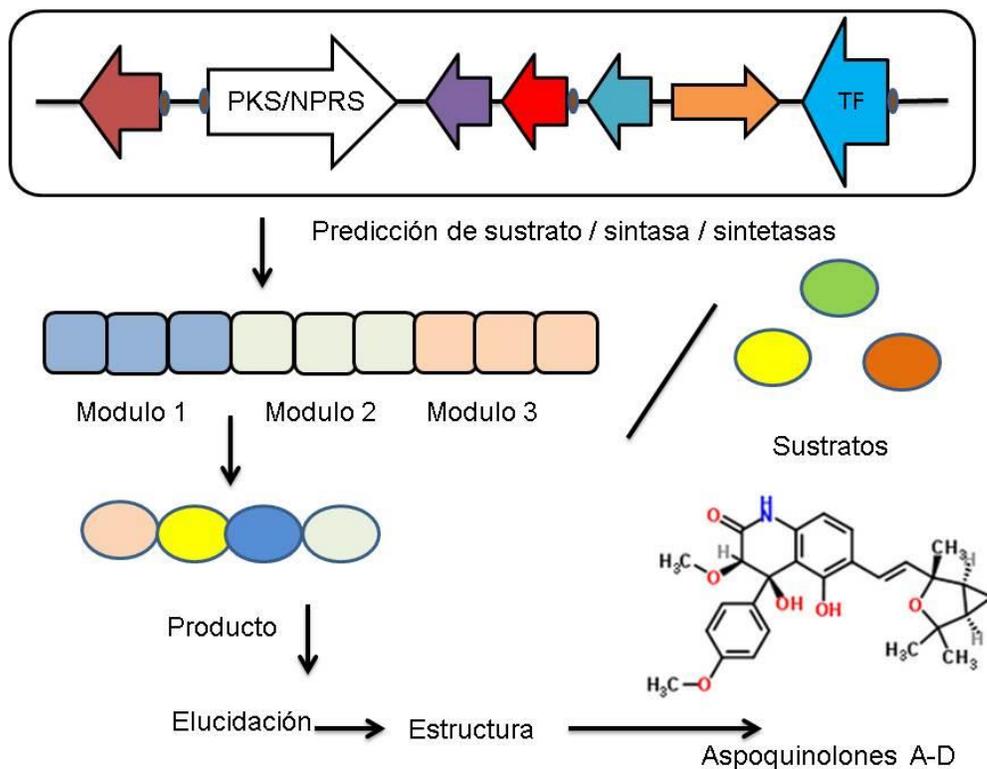


Figura 5. Descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios, a partir de la predicción de los módulos de PKS/NRPS que fueron usados para sugerir los sustratos más probables hasta llegar al descubrimiento de aspoquinolones, figura tomada de Brakhage y Schroeckh 2011.

5.2. Producción de metabolitos a través de la simulación del hábitat

Las bacterias y hongos cohabitan en una amplia variedad de entornos, como el suelo, la rizosfera, plantas, etc., en los que cada metabolito confiere una ventaja al microorganismo. A partir de esta observación y de la suposición de que los microorganismos interactúan unos con otros en su ambiente natural, se puede pensar que estas interacciones promueven la producción de productos naturales. Por lo tanto, la simulación de estos hábitats llevaría a nuevos descubrimientos de MS.

Por ejemplo, en 2009 se cocultivó *A. nidulans* con una colección de 58 actinomicetos. En esas condiciones, *Streptomyces rapamycinicus* activó la expresión de

algunos genes que se encuentran silenciados en condiciones estándar de laboratorio (Ver figura 6).

Figura 6 Activación de genes usando la técnica del cocultivo.

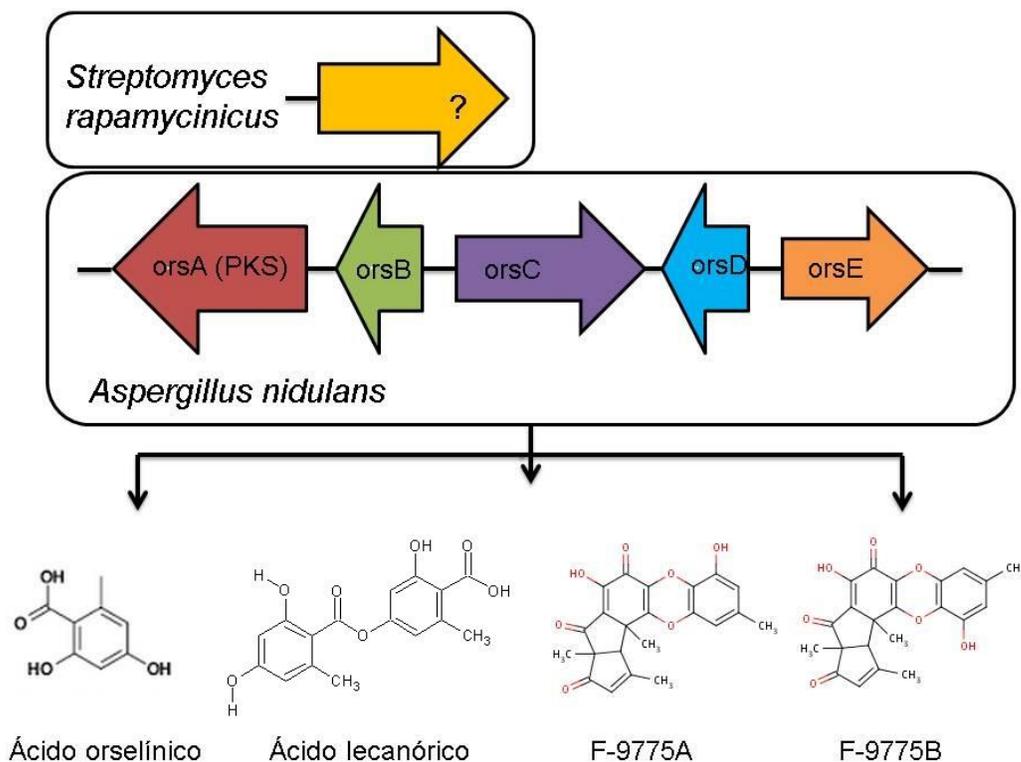


Figura 6. *Streptomyces rapamycinicus* comenzó a producir ácido orselínico, ácido lecanórico (típicamente encontrado en líquenes), y los inhibidores de la catepsina KF-9775A y F-9775B al estar en contacto con *Aspergillus nidulans* figura tomada de Brakhage y Schroeckh 2011.

5.3. Búsqueda de metabolitos usando métodos basados en biología molecular y epigenética

La forma más frecuente de buscar nuevos metabolitos se basa en la inactivación de genes biosintéticos. A continuación, se hace un análisis comparativo del perfil metabólico de la mutante y la silvestre con CLAR o LC-MS. De esta manera se descubrieron los compuestos llamados emericellamidas en *A. nidulans* y posteriormente se elucidó su ruta biosintética (Ver figura 7A).

La mayoría de las veces, los genes necesarios para la biosíntesis de un MS se agrupan en *clusters* y en algunos casos un solo gen regulador controla la expresión de todos los genes. Por ello, otra estrategia consiste en sobreexpresar genes reguladores específicos, como la sobreexpresión en *A. nidulans* del gen *apdR*, que llevó al descubrimiento de dos metabolitos llamados aspyridones A y B (Bergmann et al., 2007, ver figura 7B). De manera similar, el cambio del promotor CTNR-like a uno inducible para una alcohol deshidrogenasa (*alcA*) activó la producción del policétido asperfuranona en *A. nidulans* (Bergmann et al., 2010, ver figura 7C).

La delección del gen *ccaA*, que codifica una de las ocho proteínas del complejo COMPASS en *A. nidulans*, llevó al descubrimiento de monodyctiphenone y emodin (Bok et al., 2009, Fig. 8B). La delección de un gen para sumoilación “*sumO*” en *A. nidulans* llevó a la formación de varios MS, la disminución de la cantidad de austinol y dehydroaustinol y el aumento en la producción de asperthecin (Szewczyk et al., 2008, ver figura 8B).

Otro ejemplo consistió en la delección de *LaeA*, que disminuyó la formación de esterigmatocistina y penicilina en *A. nidulans* y gliotoxina en *A. fumigatus*. Por el contrario, la sobreexpresión de *LaeA* activa positivamente la producción de estos productos (Kamei y Watanabe, 2005). La sobreexpresión dirigida llevó al descubrimiento de la terrequinona A (Bouhired et al., 2007, ver figura 8A), sugiriéndose que *LaeA* actuaba a través de la remodelación de la cromatina. Se ha demostrado la importancia de la actividad de la histona deacetilasa (HDA) en la diversidad química en *Aspergillus*, pues la interrupción del gen de la HDA en *A. nidulans* condujo a la activación transcripcional de grupos de genes para la producción de esterigmatocistina y penicilina (Soukup et al., 2012).

Basándose en lo anteriormente expuesto, la adición de agentes químicos que remodelen el nivel de compactación de la cromatina en hongos puede que permita la expresión de genes que no se expresan en condiciones normales de cultivo. Esta técnica tiene como ventaja no requerir manipulación genética y por lo tanto puede ser aplicada a cualquier cepa fúngica. El uso de compuestos químicos remodeladores de la cromatina ha permitido el descubrimiento de nuevos metabolitos a los que todavía no se les ha

encontrado una función (aunque se cree que sirven como señales entre los habitantes de un ecosistema). En 2009 se descubrió el compuesto llamado neugeron A después de agregar SAHA a un cultivo de *Aspergillus niger* (Fisch et al., 2009, ver figura 8C). (Henrikson et al. 2009) en 2011 encontraron tres compuestos nuevos a los que llamaron luteoride A-C, análogos prenilados de triptófano, después de tratar a *Torrubiella luteorostrata* con tres concentraciones diferentes de SBHA durante 18 días (Asai et al., 2011). En el año siguiente se encontró el compuesto tenuipyrone en *Isaria tenuipes*, usando 500 μM de SBHA (Asai et al., 2012). Posteriormente se encontraron diferentes policétidos aromáticos en *Cordyceps indigotica* usando 1000 μM de SBHA (Asai y Oshima, 2012). En 2013 se obtuvieron estructuras de spiroindicumides A y B en *Chaetomium indicum* con 500 μM de SBHA (Asai et al., 2013). A finales del mismo año se obtuvieron diferentes estructuras de policétidos aromáticos prenilados llamados chaetophenol 1-6 en *Chaetomium indicum* usando 500 μM de SBHA (Asai et al., 2013). En 2013 se obtuvieron prenil-dépsido y cumarinas no reportadas en *Pestalotiopsis acaciae* usando SBHA y 5AZA (Yang et al., 2013). En 2013 se obtuvieron tres nuevos antitumorales de la familia de los ciclodepsipéptidos (desmethylisaridin E, desmethylisaridin C2 e isaridin F) en *Beauveria felina* tras el uso de SAHA a 500 μM de SAHA en 12 días (Chung et al., 2013). En 2007 se obtuvo un aumento de producción de penicilina y esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans* a las 72 horas de añadir TSA al medio de cultivo (Shwab et al., 2007). En 2013 se consiguió aumentar la producción de cytochalasin E y patulin, comparada con el control, a las 72 horas, añadiendo butirato de sodio, TSA, SAHA y 5AZA en diferentes concentraciones en cultivos de *Aspergillus clavatus* (Zutz et al., 2013).

Otro enfoque para descubrir MS y sus vías de biosíntesis se deriva del análisis del proteoma. PRISM (Investigación Proteómica de Metabolitos Secundarios) es un método basado en la espectrometría de masas que permite la identificación simultánea de péptidos y los policétidos producidos por las enzimas PKS/NRPS, respectivamente, y de la agrupación de genes responsable. Aunque el método no ha sido aplicado a hongos, representa una herramienta novedosa para la identificación de nuevos productos.

Es probable que en el futuro los nuevos enfoques para la identificación y el descubrimiento de nuevos compuestos se basen en una combinación sinérgica de la

genómica, la genética, la biología molecular y la bioquímica (metabolómica). La activación de reguladores específicos, así como las técnicas basadas en la modificación de la regulación epigenética, desempeñarán un papel crucial para el descubrimiento de nuevos productos. Pero, por otro lado, también se podrían plantear serios inconvenientes, puesto que la modificación de las histonas podría tener efectos negativos en otros procesos celulares. El desarrollo continuo de nuevas herramientas hará de estos *clusters* crípticos un recurso potencialmente muy valioso para el descubrimiento de nuevos compuestos de aplicación comercial (Lim et al., 2012).

Figura 7 Descubrimiento de nuevos (MS) basado en estrategias de biología molecular.

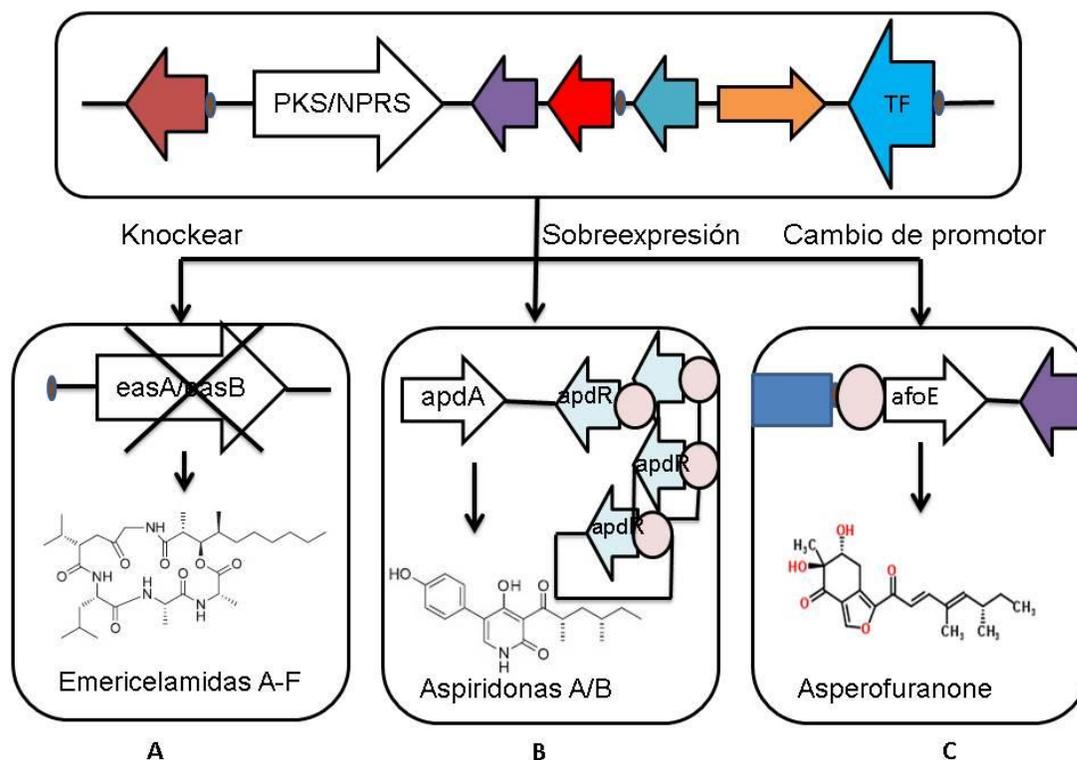


Figura 7. Algunos descubrimientos de MS usando estrategias de biología molecular A) El Knock out a genes putativos PKS o NPRS. Un doble Knock out a los genes *easA* y *easB* que codifican a una NPRS y PKS respectivamente llevaron al descubrimiento de emericellamidas. B) La sobre expresión del gen regulador *apdR* y el promotor *alcA* indujeron la producción de aspiridonas A y B. C) Cambio de promotor putativo NPRS o PKS, la sustitución del gen promotor PKS *afoE* por el promotor *alcA* regulable fuerte conducido a la producción de asperofuranone figura tomada de Brakhage y Schroeckh 2011.

Figura 8 Descubrimiento de (MS) secundarios basados en métodos epigenéticos.

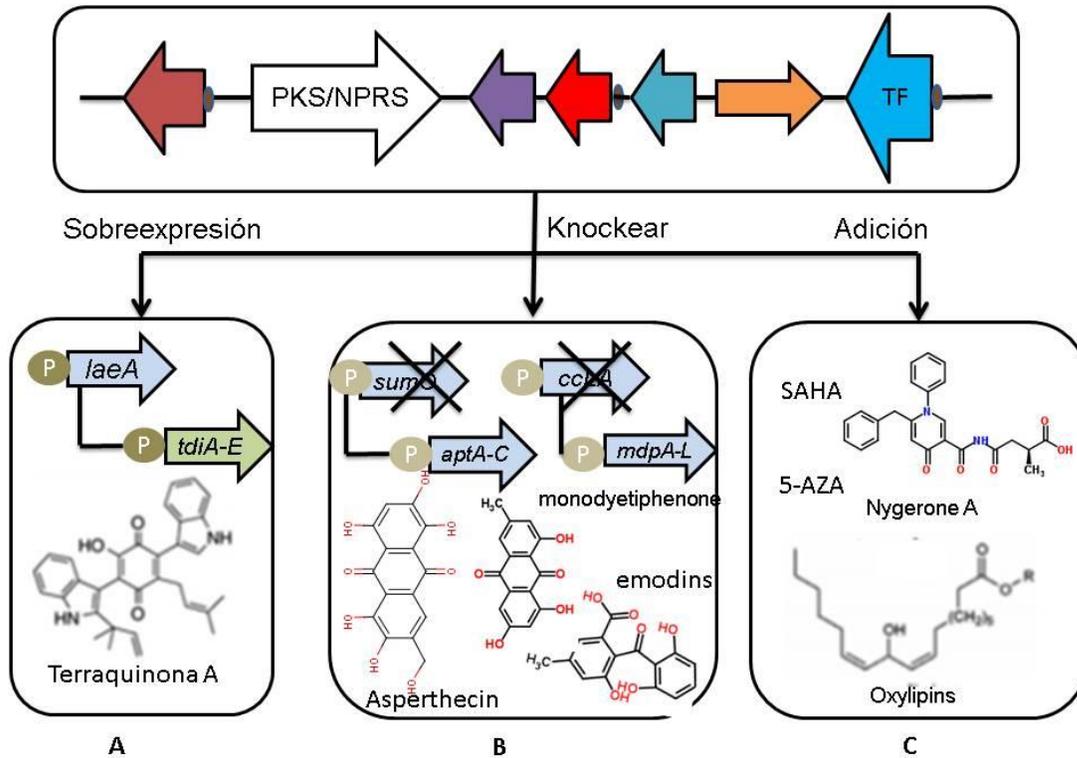


Figura 8. Algunos descubrimientos de MS usando estrategias de biología molecular A) La sobreproducción de un regulador pleiotrópico. La sobreexpresión del gen putativo que codifica *LaeA* una metil transferasa llevó a la formación de terrquinona A. B) La delección de genes implicados en la modificación de las histonas que influyen positivamente a la producción de MS. La delección del gen *cclA*, que codifica uno de las proteínas de ocho COMPASS en *A. nidulans*, condujeron a la identificación de monodyctiphenone y emodins. C) La adición de compuestos que modifican el estado de acetilación de histonas, por ejemplo, de la histona desacetilasa (HDAC) o ADN (DMAT) inhibidores de metiltransferasa. El ácido suberoilánilida hidroxámico inhibidor de HDAC (SAHA) estimuló la producción de nygerone A. Por el contrario, la alimentación del inhibidor de la 5-azacitidina DMAT provocó biosíntesis de oxylipins. Figura tomada de Brakhage y Schroeckh 2011.

6. Justificación

Después de más de 50 años de buscar mejorar la producción de CFC en *Acremonium chrysogenum*, utilizando nuevas estrategias fisiológicas o de mejoramiento genético que permitan alcanzar mayores producciones del antibiótico, se ha descuidado la investigación hacia otros posibles metabolitos activos producidos por este hongo (pues los que se han descubierto lo han sido por estar directamente relacionados con la síntesis de CFC).

Si se supone que el número de *clusters* del metabolismo secundario en un genoma fúngico es muy superior al número de metabolitos secundarios que se producen en condiciones normales, la aplicación de inductores de un estado relajado de la cromatina debería llevar al descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios activos no reportados en *Acremonium chrysogenum*. Esta teoría fue confirmada un año después de haber empezado el presente proyecto: en 2014 mediante el uso de técnicas modernas de biología molecular y el uso de modelamiento como el antiSMASH v2.0, se dió a conocer el genoma de *Acremonium chrysogenum*, identificándose más de 42 *clusters* teóricos de metabolitos secundarios: 14 policétidos sintasas, 10 terpenos sintasas, 7 péptidos sintasas no ribosomales, 8 híbridos y 3 no específicos (Terfehr et al., 2014). Esa información se complementará con los resultados del presente trabajo, pues alguno de los nuevos metabolitos que se obtenga deberá tener relación con los datos genómicos reportados para *Acremonium chrysogenum*.

7. Hipótesis

La biosíntesis de los metabolitos secundarios de *Acremonium chrysogenum* se encuentra regulada a nivel epigenético por la disposición de la cromatina. La utilización de compuestos que provoquen la remodelación de la cromatina tendrá un efecto directo sobre el perfil de metabolitos secundarios producidos por el hongo, al activar la expresión de *clusters* silentes.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de compuestos químicos que inducen la remodelación de la cromatina en la producción de metabolitos secundarios en *A. chrysogenum*.

8.2. Objetivos particulares

1. Aplicar tres inhibidores de histonas desacetilasas, en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos en cultivos en medio líquido de *Acremonium chrysogenum*.

2. Análisis del cambio de perfil de metabolitos producidos en las diferentes condiciones de crecimiento.

9. Materiales y métodos

9.1. Cepa fúngica

Acremonium chrysogenum ATCC 11550 (cepa silvestre encontrada por Brotzu en 1948).

9.2. Medios de cultivo

Medio CCM Medio completo (Minuth et al., 1982).

| Reactivo | g/L |
|--------------------------------------|------|
| Caldo de soya de triptocaseina | 15 |
| Extracto de levadura | 11 |
| Sacarosa | 3 |
| Extracto de carne | 1 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.5 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.5 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.01 |
| Glucosa | 15 |
| NaCl | 0.5 |

Se ajusta a pH 6.8 con NaOH o HCl

Medio LPE Medio de esporulación y mantenimiento (Le Page y Campbell, 1946).

| Reactivo | g/L |
|----------------------|-----|
| Glucosa | 1 |
| Extracto de levadura | 2 |
| NaCl | 1.5 |
| CaCl ₂ | 10 |
| Agar | 20 |

Se ajusta a pH 6.8 con NaOH o HCl

Medio Power de esporulación para *Penicillium chrysogenum* (Fernández, 1997).

| Reactivo | g/L |
|--------------------------------------|--------|
| Sacarosa | 15 |
| Lactosa | 15 |
| NaNO ₃ | 1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.25 |
| CuSO ₄ .7H ₂ O | 0.0005 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0.0015 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.03 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.275 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.005 |
| Bactopeptona | 2.5 |
| Sólidos de maceración de maíz | 0.25 |
| NaCl | 2 |
| Agar bacteriológico | 20 |

Se ajusta a pH 7.0 con NaOH o HCl

MDFA Medio definido de fermentación de *A. chrysogenum* (Shen et al., 1983).

Para evitar la precipitación de los componentes del medio se recomienda preparar soluciones stock y esterilizarlas por separado.

a) Solución de fuente carbonada

| Reactivo | g/L |
|---------------|-----|
| Sacarosa | 36 |
| Glucosa | 27 |
| DL-Metionina | 3.2 |
| L-Asparragina | 12 |

b) Solución de calcio

| Reactivo | g/L |
|--|-------|
| CaCl₂ x 2 H₂O | 0.072 |

c) Amortiguador de pH

| Reactivo | g/L |
|-------------------------------------|------|
| K₂HPO₄ | 13 |
| KH₂PO₄ | 13.1 |

d) Solución de sulfatos

| Reactivo | g/L |
|---|--------|
| Na₂SO₄ x 10 H₂O | 1.656 |
| MgSO₄ x 7 H₂O | 0.3456 |
| ZnSO₄ x 7 H₂O | 0.0288 |
| MnSO₄ x H₂O | 0.0288 |
| CuSO₄ x 5 H₂O | 0.0072 |

e) Solución de hierro (prepararla al momento) y añadir 10 mL solución / L

| Reactivo | g / 125mL |
|---|-----------|
| Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ X 6 H₂O | 2 |

Mezclar cuando se encuentren tibias las soluciones, no es necesario ajustar el pH.

Medio MSMA Medio semilla modificado (Adinarayana et al., 2003).

| Reactivo | g/L |
|---|-----|
| Glucosa | 10 |
| Sólidos de maceración de maíz | 5 |
| Almidón soluble | 15 |
| Extracto de levadura | 4 |
| K₂HPO₄ | 1 |
| MgSO₄.7H₂O | 1 |
| CaCO₃ | 1 |

Se ajusta a pH 7.0 con NaOH o HCl

9.3.1. Ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA).

Se disolvió el SAHA (Sigma-Aldrich) en acetato de etilo al 100%. Ésta fue la solución stock que se usó posteriormente.

Condiciones para la esporulación

Con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada, se sembró *A. chrysogenum* en placas de LPE, durante 6 días a 25°C.

Condiciones para el pre inóculo

Se recogió el micelio proveniente de tres placas de medio LPE y se maceró, con ayuda de perlas de vidrio y vortex, en 5 mL de NaCl 0.9 % (v/v) estéril. Se recuperó el micelio macerado con ayuda de una punta cortada de 1 mL y se inoculó en 45 mL de medio MSMA, incubándose a 25°C y 170 rpm durante 48 horas.

Condiciones para el medio de producción

Se inoculó un matraz Erlenmeyer indentado de 500 mL con 10 mL de MSMA y 90 mL de medio MDFA. Se añadió la solución de SAHA, de modo que la concentración final sea de 0.004, 0.04 y 0.4 mM. Se incubó a 25°C durante 7 días a 170 rpm, tomando muestra cada 48 h para filtrar a través de una capa de algodón en el fondo de un tubo Eppendorf® de 1.5 mL perforado, a peso constante y depositado al mismo tiempo dentro de otro tubo sin perforar para medir pH y biomasa para realizar las cinéticas, después se tomaron 45 mL de sobrenadante a las 96 y 144 horas para hacer los estudios posteriores.

9.3.2. Ácido suberoilo bis-hidroxámico (SBHA).

Se disolvió el SBHA (Sigma-Aldrich) en acetato de etilo al 100% usando un agitador magnético, ésta fue la solución stock que se usó posteriormente.

Condiciones para la esporulación

Con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada, se sembró *A. chrysogenum* en placas de LPE, durante 6 días a 25°C.

Condiciones para el pre inóculo

Se recogió el micelio proveniente de tres placas de medio LPE y se maceró, con ayuda de perlas de vidrio y vortex, en 5 mL de NaCl 0.9 % (v/v) estéril. Se recuperó el micelio macerado con ayuda de una punta cortada de 1 mL y se inoculó en 45 mL de medio MSMA, incubándose a 25°C y 170 rpm durante 48 horas.

Condiciones para el medio de producción

Se inoculó un matraz Erlenmeyer indentado de 500 mL con 10 mL de MSMA y 90 mL de medio MDFA. Se añadió la solución de SBHA, de modo que la concentración final sea de 0.01, 0.1 y 1 mM. Se incubó a 25°C durante 7 días a 170 rpm, tomando muestra cada 48 h para filtrar a través de una capa de algodón en el fondo de un tubo Eppendorf® de 1.5 mL perforado, a peso constante y depositado al mismo tiempo dentro de otro tubo sin perforar para medir pH y biomasa para realizar las cinéticas, después se tomaron 45 mL de sobrenadante a las 96 y 144 horas para hacer los estudios posteriores.

9.3.3. Tricostatin A (TSA).

Se disolvió el TSA (Sigma-Aldrich) en etanol al 98%, hasta que la concentración sea 0.5 mg/mL. Ésta fue la solución concentrada que se usó posteriormente.

Condiciones para la esporulación

Con ayuda de una varilla de vidrio de punta redondeada, se sembró *A. chrysogenum* en placas de LPE, durante 6 días a 25°C.

Condiciones para el pre inóculo

Se recogió el micelio proveniente de tres placas de medio LPE y se maceró, con ayuda de perlas de vidrio y vortex, en 5 mL de NaCl 0.9 % (v/v) estéril. Se recuperó el micelio macerado con ayuda de una punta cortada de 1 mL y se inoculó en 45 mL de medio MSMA, incubándose a 25°C y 170 rpm durante 48 horas.

Condiciones para el medio de producción

Se inoculó un matraz Erlenmeyer indentado de 500 mL con 10 mL de MSMA y 90 mL de medio MDFA. Se añadió la solución de TSA, de modo que la concentración final sea de 0.01, 1 y 10 μ M. Se incubó a 25°C durante 7 días a 170 rpm, tomando muestra cada 48 h para filtrar a través de una capa de algodón en el fondo de un tubo Eppendorf® de 1.5 mL perforado, a peso constante y depositado al mismo tiempo dentro de otro tubo sin perforar para medir pH y biomasa para realizar las cinéticas, después se tomaron 45 mL de sobrenadante a las 96 y 144 horas para hacer los estudios posteriores.

9.4.1 Análisis de cambio de perfil metabólico extracelular.

Se estudió el cambio de perfil metabólico, inducido por la adición de compuestos inhibidores de la actividad histona desacetilasa. Para ello:

- Se cultivó el hongo de la manera apropiada añadiéndose el inhibidor con su testigo correspondiente.

- Después de haber pasado el tiempo de cultivo se separó el micelio del caldo, centrifugando a 4000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavó la biomasa tres veces con agua destilada y estéril, centrifugándose en cada ocasión.

- El caldo de cultivo se extrajo tres veces en un embudo de separación usando la siguiente mezcla 3:2:1 (acetato de etilo: cloroformo: metanol). El extracto se dejó en la campana de extracción a presión reducida. A continuación, se re suspendió en 500 μ L de metanol y se filtró con una membrana de nylon de 25 μ m de diámetro de poro.

- Los extractos fueron analizados en un espectrofotómetro marca Gen Way de 190 a 1100 nm, para evaluar las intensidades de onda más representativas y realizar un análisis más fino de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Los extractos previamente filtrados fueron analizados mediante CLAR en fase reversa, usando como fase móvil agua y acetonitrilo, se inyectaron 20 μ L a una concentración de 1 mg/mL, usando un gradiente. La columna utilizada fue de la marca WATERS de 300 \times 4.6 mm, 5 μ m, con un flujo de 1.0 mL/min, las longitudes de onda fueron 215, 250, 275, 290, 315, 350, 450 y 550 nm. El gradiente utilizado fue el siguiente: agua: acetonitrilo de 0 a 5 min de 80:20, 5–25 min: de 20:80, de 25–30 min de 80:20, 30–40 min de 80:20 y 40-45 min 80:20.

9.4.2 Análisis fitoquímico.

El estudio fitoquímico consistió en determinar la presencia de los principales grupos químicos en los extractos extracelulares del hongo, las cuales incluyen reacciones de coloración y de precipitación que, junto con sus propiedades físicas como la sublimación y la fluorescencia, permiten observar la existencia de determinados conjuntos de metabolitos secundarios (Domínguez, 1973).

- **Alcaloides:** Para la detección de alcaloides se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina; en una placa de sílica gel G-60 cortada para obtener un tamaño de 3 x 5 cm se colocaron en tres ocasiones sucesivas 10 µL del extracto, esperando que se evaporara el metanol. Posteriormente se eluyó con diclorometano-metanol 5:95. Ya eluída, la placa se reveló con el reactivo Dragendorff. La presencia de alcaloides se detectó por aparición de color rojo a naranja.

- **Antraquinonas:** Para la detección de antraquinonas se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina; en una placa de sílica gel G-60 cortada para obtener un tamaño de 3 x 5 cm se colocaron en tres ocasiones sucesivas 10 µL del extracto, esperando que se evaporara el metanol. Posteriormente se eluyó con diclorometano-metanol 5:95. Ya seca la placa, se introdujo a una lámpara UV y se observó si presentaba color amarillo o rojo marrón, para confirmar la presencia de antraquinonas.

- **Cumarinas volátiles:** La identificación de cumarinas volátiles se realizó a partir de la técnica de reacción en tubo: En un tubo de ensayo se colocaron 2 mg de extracto y 10 mL de agua destilada, tapado con un trozo de papel de filtro humedecido con una solución de sosa (1 g) en agua (5 mL). Después de exponer el extracto durante cinco minutos a 100°C, se retiró el papel de filtro y se expuso a la lámpara de luz UV. La fluorescencia amarilla indicaría que el extracto tiene presencia de cumarinas volátiles.

- **Taninos:** Se utilizaron 2 mg de extracto para identificar la presencia de taninos. Para ello se prepararon los reactivos A, B y C. Si en alguno de ellos se observa precipitado o se vuelve turbio es indicativo de la presencia de taninos.

A. Se preparó una solución al 1 % de gelatina en agua destilada; para lo que se utilizó 0.1 g de gelatina en 10 mL de agua destilada.

B. Se utilizó 0.1 g de gnetina, 1 g de cloruro de sodio en 10 mL de agua destilada.

C. Se preparó una solución al 10 % de cloruro de sodio en agua destilada: 1 g de cloruro de sodio en 10 mL de agua destilada.

• **Saponinas:** Se utilizaron 2 mg de extracto. A cada extracto se le agregaron 10 mL de agua destilada y se colocaron en una parrilla durante un periodo aproximado de 25 minutos hasta que alcanzaron la ebullición. Después se dejaron enfriar y posteriormente se agitaron y dejaron reposar. Finalmente se observó si existía la presencia de espuma, pues es el indicador de la existencia de saponinas.

9.4.3 Ensayo de citotoxicidad.

- A. Se prepararon los controles y las muestras.
- B. Se adiciono 190 μL de medio de cultivo por 10 μL de muestra
- C. Se incubo el tiempo que pidió el ensayo
- D. Se fijó, se coloreo y se leyó.

9.4.3.1. Cálculo de porcentaje de crecimiento

- I. En Excel se copiaron los valores por triplicado
- II. Se promediaron los valores registrados al día cero

III. Crecimiento % $\frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ día cero}}{DO \text{ blanco} - DO, \text{ día cero}} * 100$

10. Resultados y discusión

10.1. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA, por sus siglas en inglés).

10.1.1. Efecto de la adición del remodelador SAHA en la producción de biomasa y pH.

En la figura 9 se observa que el pH al inicio es de 6.65, a las 48 horas se acidula, a las 96 horas se comienza a neutralizar y esta es una tendencia que se mantiene hasta las 144 horas, tal como lo reportaron (Shen et al., 1984). Al añadir el inhibidor SAHA no se apreciaron cambios significativos en el comportamiento del pH con respecto al cultivo en ausencia de SAHA.

En cuanto al crecimiento, a las 48 horas el cultivo se encuentra en su fase exponencial en la que hay mayor producción de biomasa. A las 96 horas ya ha llegado a su fase estacionaria y a las 144 horas comienza a perderse biomasa, coincidiendo también con reportes previos (Shen et al., 1984). Al añadir el inhibidor SAHA no se apreciaron cambios significativos en el comportamiento de la producción de biomasa del cultivo con respecto a los cultivos sin SAHA.

10.1.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a SAHA.

Para estudiar el patrón de metabolitos mediante CLAR se realizó un estudio preliminar del patrón de UV-Visible con el objetivo de determinar qué longitud de onda es (o son) la más adecuada para el monitoreo químico. De acuerdo a este estudio, las longitudes de onda más idóneas para observar cambios en el patrón de metabolitos producidos son las que se encuentran en el rango de 200 a 450 nm, en los dos tiempos de fermentación estudiados, 96 y 144 horas (Figura 10).

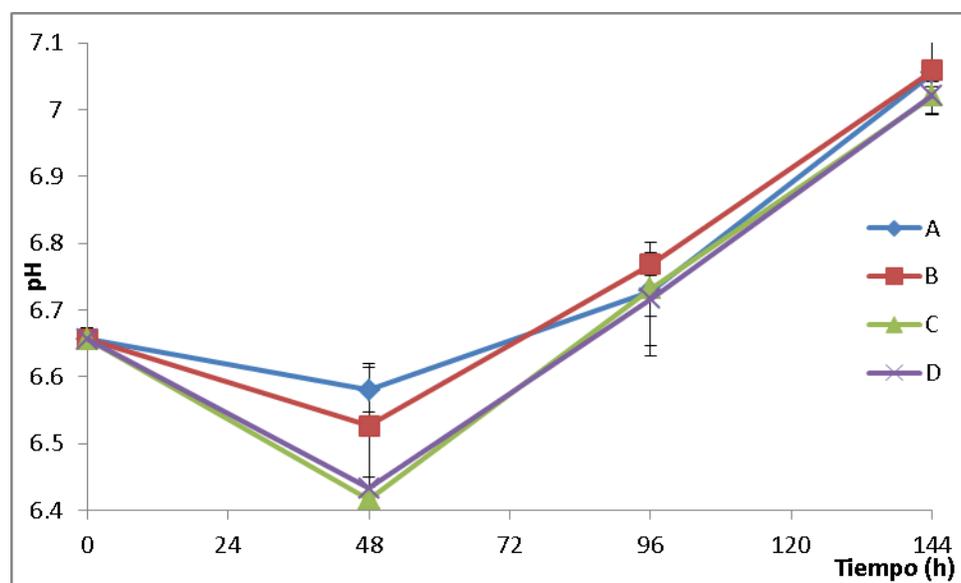
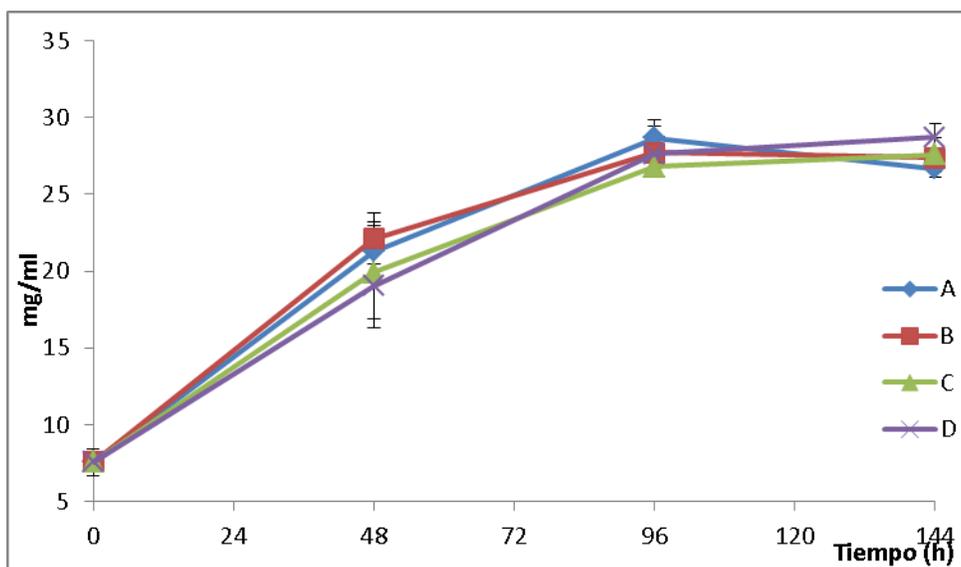
10.1.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador de la cromatina SAHA.

Establecido el rango de longitud de onda en el que se observaban las mayores intensidades, se escogieron ocho longitudes de onda a estudiar (215, 250, 275, 290, 315, 350, 450 y 550 nm) en donde los cambios más significativos ocurrieron a los 215 nm, tanto a las 96 como a las 144 horas. Las muestras fueron preparadas con tres concentraciones de inhibidor más un control (medio de cultivo más inóculo), en dos tiempos distintos de fermentación (96 y 144 horas). Posteriormente fueron inyectadas en un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución marca Agilent 1260 acoplado a un detector VMD, usando una rampa de polaridad que permite separar una amplia gama de compuestos medibles y poder analizar los cambios en el patrón metabólico.

El análisis de los perfiles cromatográficos en los tiempos de fermentación de 96 y 144 horas determinó los cambios en el patrón químico que se muestran en la Tabla 2 y Figura 11. En ellas se puede observar la aparición de dos familias de compuestos para la fermentación de 96 horas en los tiempos de retención 19.5 y 20.5 minutos (que se denominarán a partir de ahora como X e Y, respectivamente). Pareció interesante estudiar una posible asociación de estas familias de compuestos con algún tipo de actividad biológica, así como plantear la purificación del o los compuestos presentes en estas familias. Estos mismos estudios, realizados con el tiempo de fermentación 144 horas, dieron como resultado la detección de las mismas familias X e Y (Tabla 3 y Figura 12), aunque con menores intensidades en la detección.

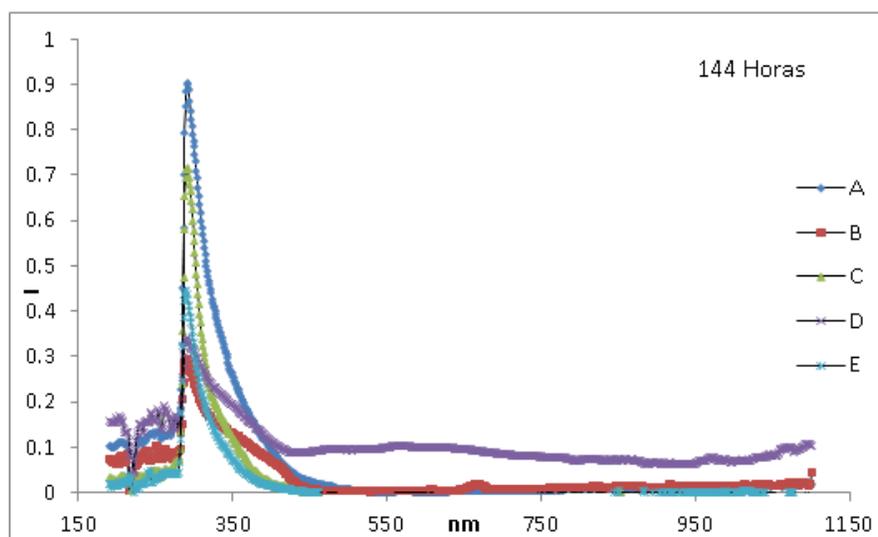
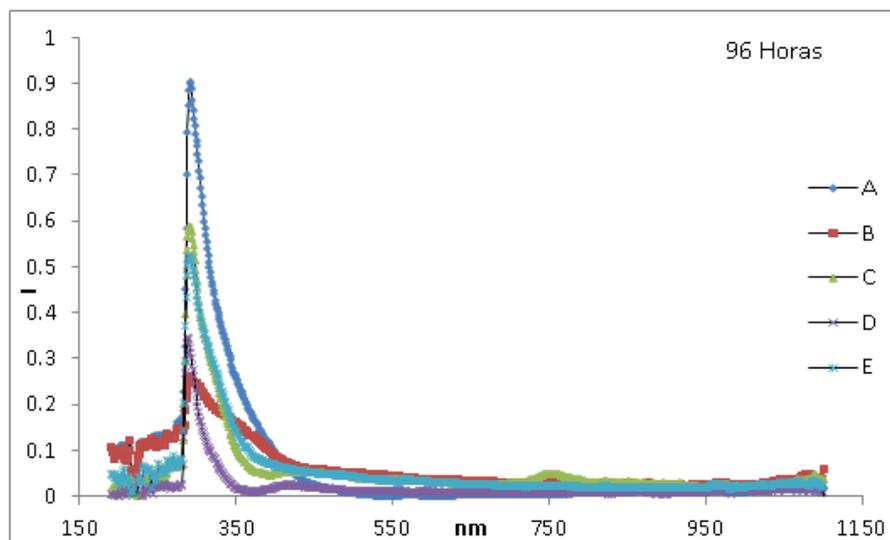
La mayor intensidad de esos nuevos compuestos en un periodo de fermentación de 96 horas pudiera indicar que su producción está relacionada con la fase estacionaria, y tal vez este tiempo podría ser el indicado para obtener estos compuestos en mayor cantidad. Sería interesante saber qué tipo de compuestos aparecen en tiempos más cortos de fermentación, algo que no se hizo en el presente trabajo.

Figura 9 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin SAHA



A) Medio de cultivo + inóculo; B) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM) C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM).

Figura 10 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por *A. chrysogenum* en medio con y sin SAHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM).

Tabla 2 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SAHA y con SAHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de las señales en mV. | | | | |
|---------------------------|----------------------------------|----|------|------|------|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | 5 | | | | |
| 14.0 | 8 | | | | |
| 19.5 | 245 | | | | |
| 20.5 | | 26 | 108* | 280* | 138* |
| 21.0 | 12 | 9 | | | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 19 | | | |

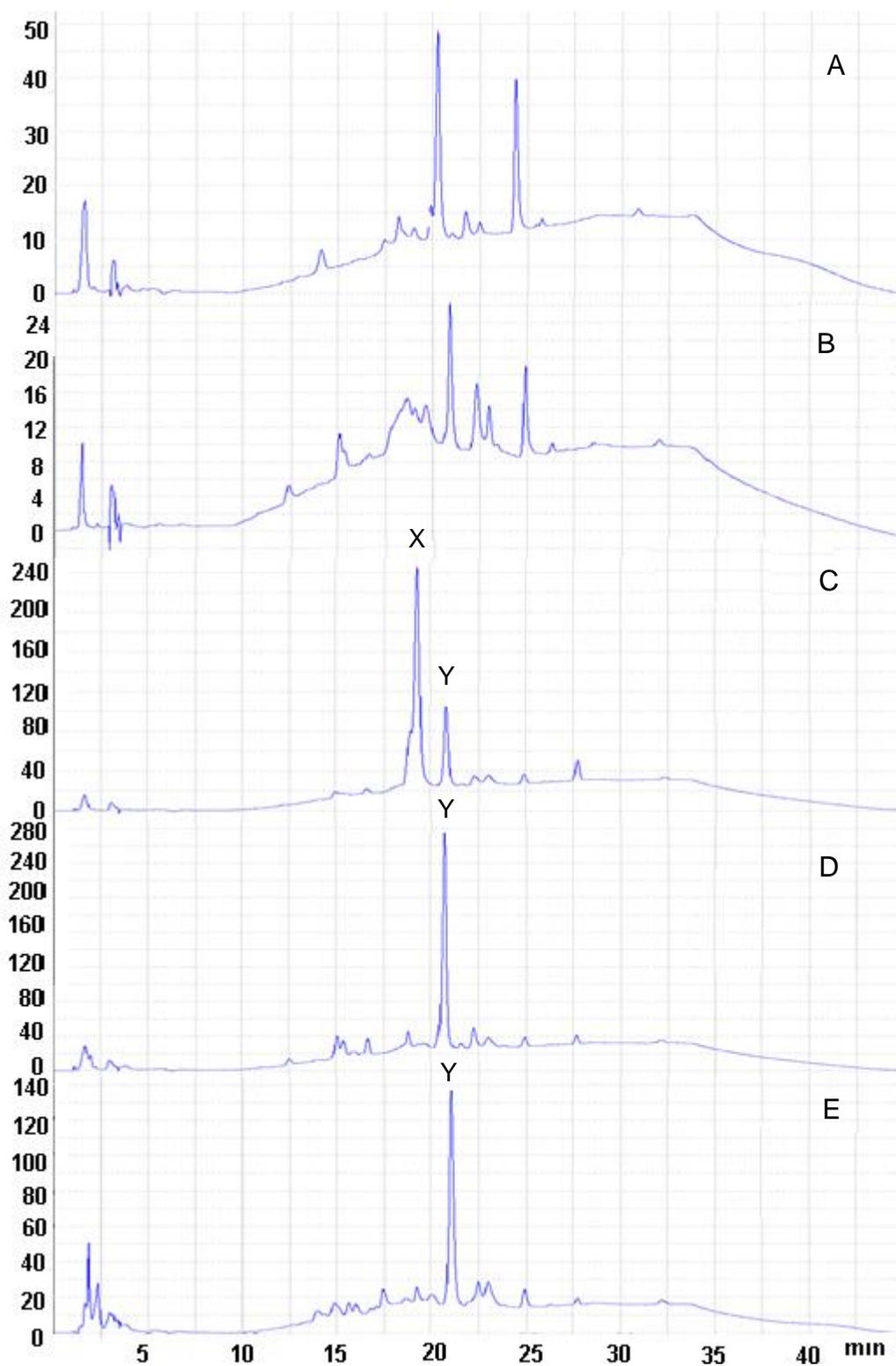
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM). *Se observa en 215 y 250 nm

Tabla 3 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SAHA y con SAHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de las señales en mV | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|----|------|-----|---|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | | | | | |
| 14.0 | 8 | 15 | | | |
| 19.5 | 150 | | | | |
| 20.5 | | 65 | 186* | 15* | |
| 21.0 | 12 | 17 | | | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 27 | | | |

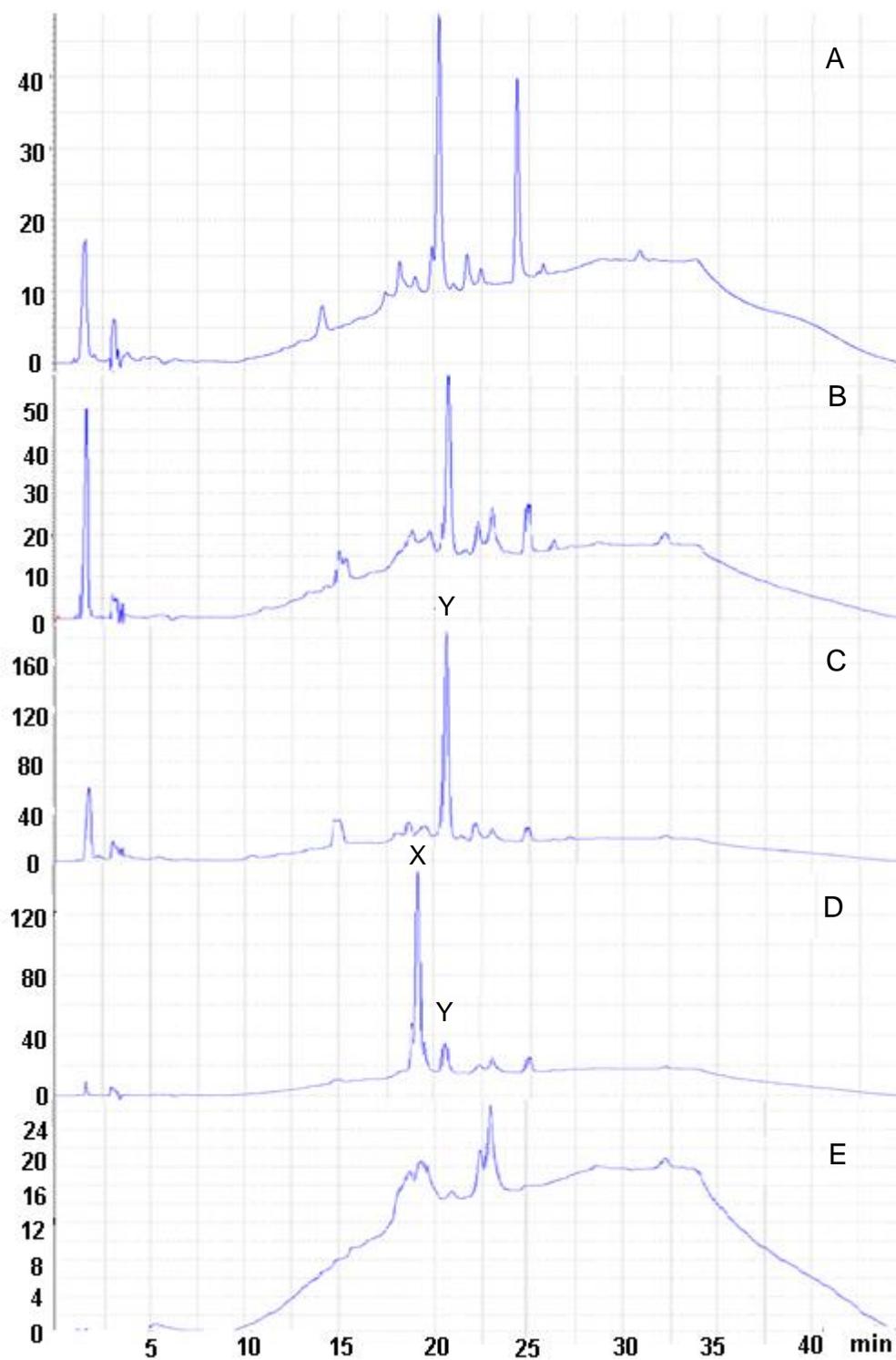
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM). *Se observa en 215 y 250 nm

Figura 11 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SAHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM).

Figura 12 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SAHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.004 mM)
D) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.04 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SAHA (0.4 mM).

10.2. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina ácido suberoilo bis-hidroxámico (SBHA, por sus siglas en inglés).

10.2.1. Efecto de la adición del remodelador SBHA en la producción de biomasa y pH.

En la figura 13 se observa, al igual que se apreciaba en la figura 9, que el pH comienza con un valor de 6.65, a las 48 horas se acidula, a las 96 horas se comienza a neutralizar y esta es una tendencia que se mantiene hasta las 144 horas, tal como lo reportaron (Shen et al., 1984). Al añadir el inhibidor SBHA tampoco se apreciaron cambios significativos en el comportamiento del pH con respecto a los cultivos control. Lo mismo ocurrió con la producción de biomasa del cultivo, no apreciándose cambios significativos en el comportamiento de la misma en presencia del inhibidor SBHA.

10.2.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a SBHA.

Para estudiar el patrón de metabolitos por CLAR se realizó un estudio preliminar del patrón de UV-Visible con el objetivo de determinar qué longitud de onda es (o son) la más adecuada para el monitoreo químico. De acuerdo a este estudio, las longitudes de onda más idóneas para observar cambios en el patrón de metabolitos producidos son las que se encuentran en el rango de 200 a 450 nm, en los dos tiempos de cultivo estudiados, 96 y 144 horas (Figura 14).

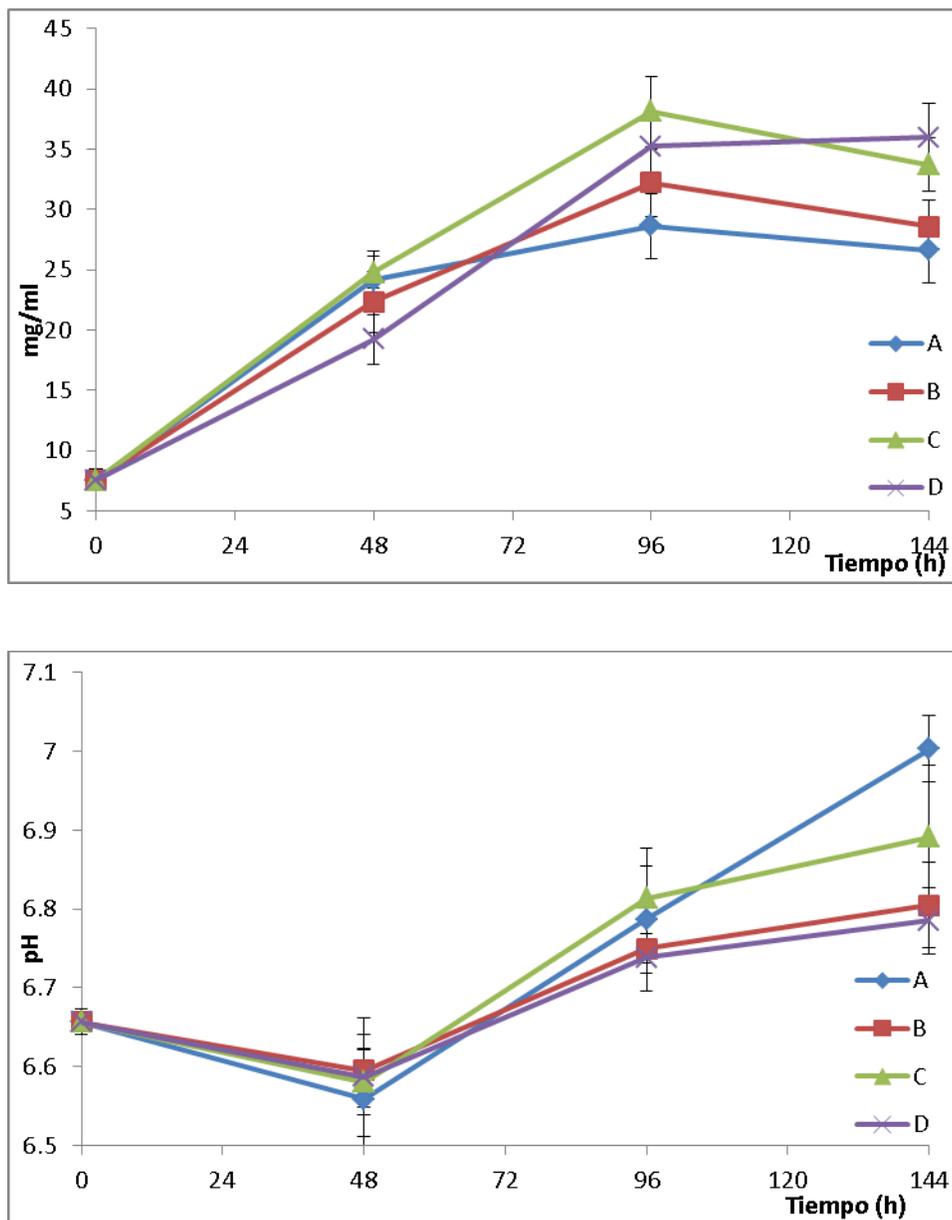
10.2.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador SBHA.

El procedimiento seguido en este caso (Figura 15) fue el mismo descrito para el remodelador SAHA (apartado 10.1.3).

El análisis de los perfiles cromatográficos en los tiempos de cultivo de 96 y 144 horas determinó los cambios en el patrón químico que se muestran en la Tabla 4 y Figura 15. En ellas se puede observar la aparición de una familia de compuestos para la

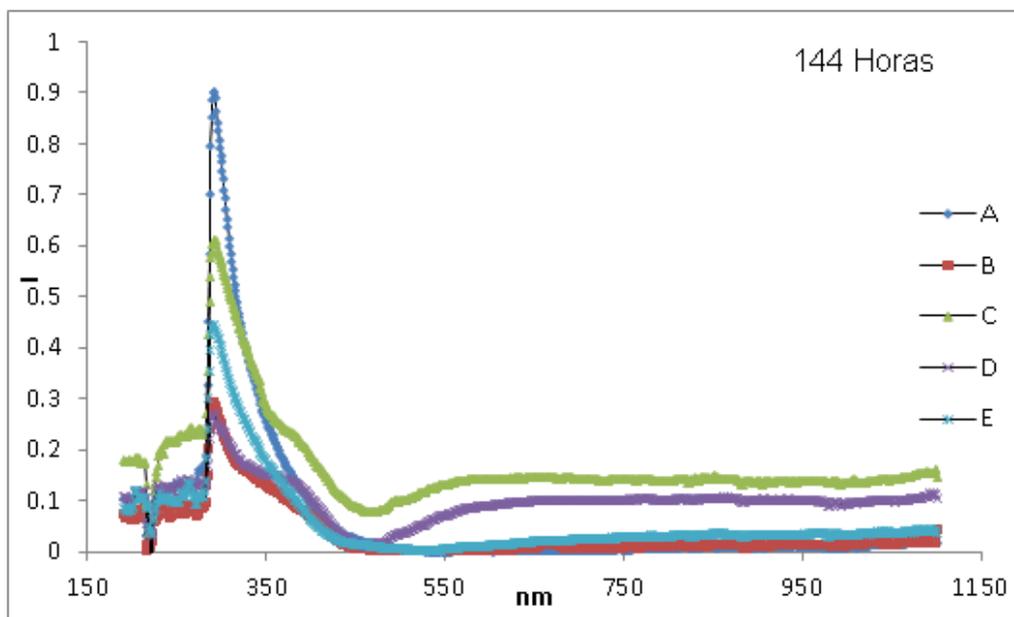
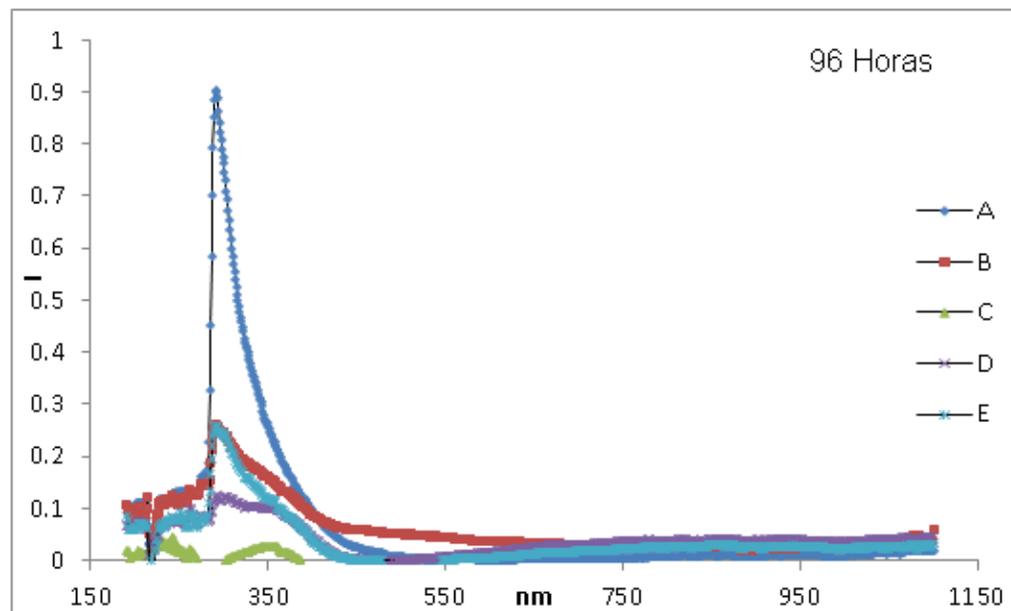
fermentación de 96 horas en el tiempo de retención 20.5 minutos (familia Y). Estos mismos estudios, realizados con el tiempo de fermentación 144 horas, dieron como resultado la misma familia Y (Tabla 5 y Figura 16), aunque con menores intensidades.

Figura 13 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin SBHA



A) Medio de cultivo + inóculo; B) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM); C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.1 mM); D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM).

Figura 14 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por *A. chrysogenum* en medio con y sin SBHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM); D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.1 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM).

Tabla 4 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SBHA y con SBHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de la señal en mV | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----|---|------|---|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | 5 | | | | |
| 14.0 | 8 | | | | |
| 19.5 | | | | | |
| 20.5 | | 26 | | | |
| 21.0 | 12 | 9 | | 145* | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 19 | | | |

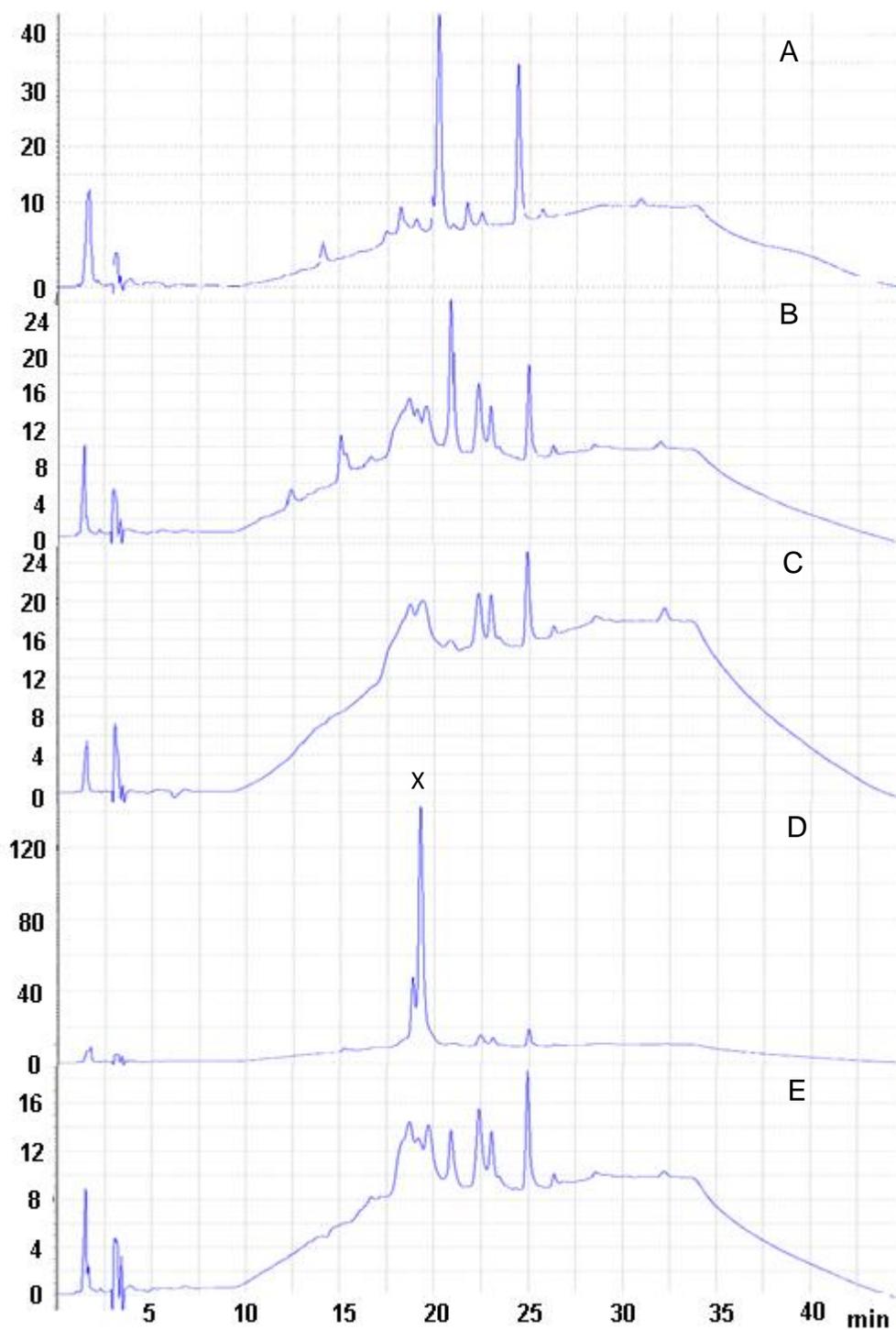
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.1 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM).
*Se observa en 215 y muestran una diferencia a 250 nm

Tabla 5 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin SBHA y con SBHA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de la señal en mV | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----|---|-----|-----|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | | | | | |
| 14.0 | 8 | | | | |
| 15.0 | | 15 | | | |
| 19.5 | | | | | |
| 20.5 | | 65 | | 45* | 35* |
| 21.0 | 12 | 17 | | | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 27 | | | |

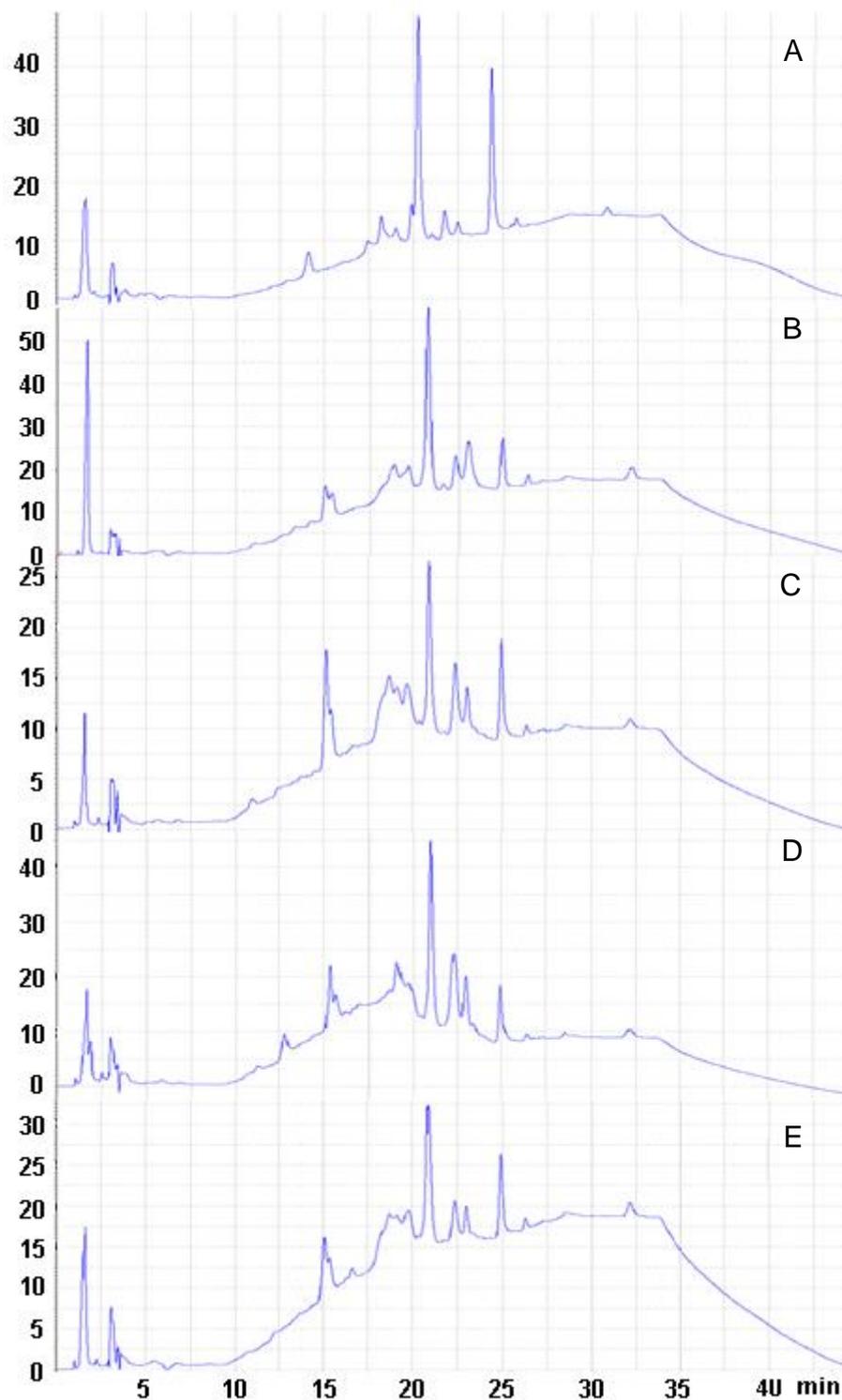
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.1 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM). *Se observa en 215 y 250 nm

Figura 15 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SBHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM).

Figura 16 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina SBHA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM) D) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (0.01 mM); E) Medio de cultivo + inóculo + SBHA (1 mM).

10.3. Estudio del efecto de la adición del remodelador de la cromatina tricostatina A (TSA, por sus siglas en inglés).

10.3.1. Efecto de la adición del remodelador TSA en la producción de biomasa y pH.

En la figura 17 se observa el mismo comportamiento descrito anteriormente para las figuras 9 y 13. La adición de TSA al medio no provocó cambios significativos ni en el pH ni en la producción de biomasa del cultivo.

10.3.2. Selección de las longitudes de onda empleando CLAR, para la detección de los principales cambios en el metaboloma asociados a TSA.

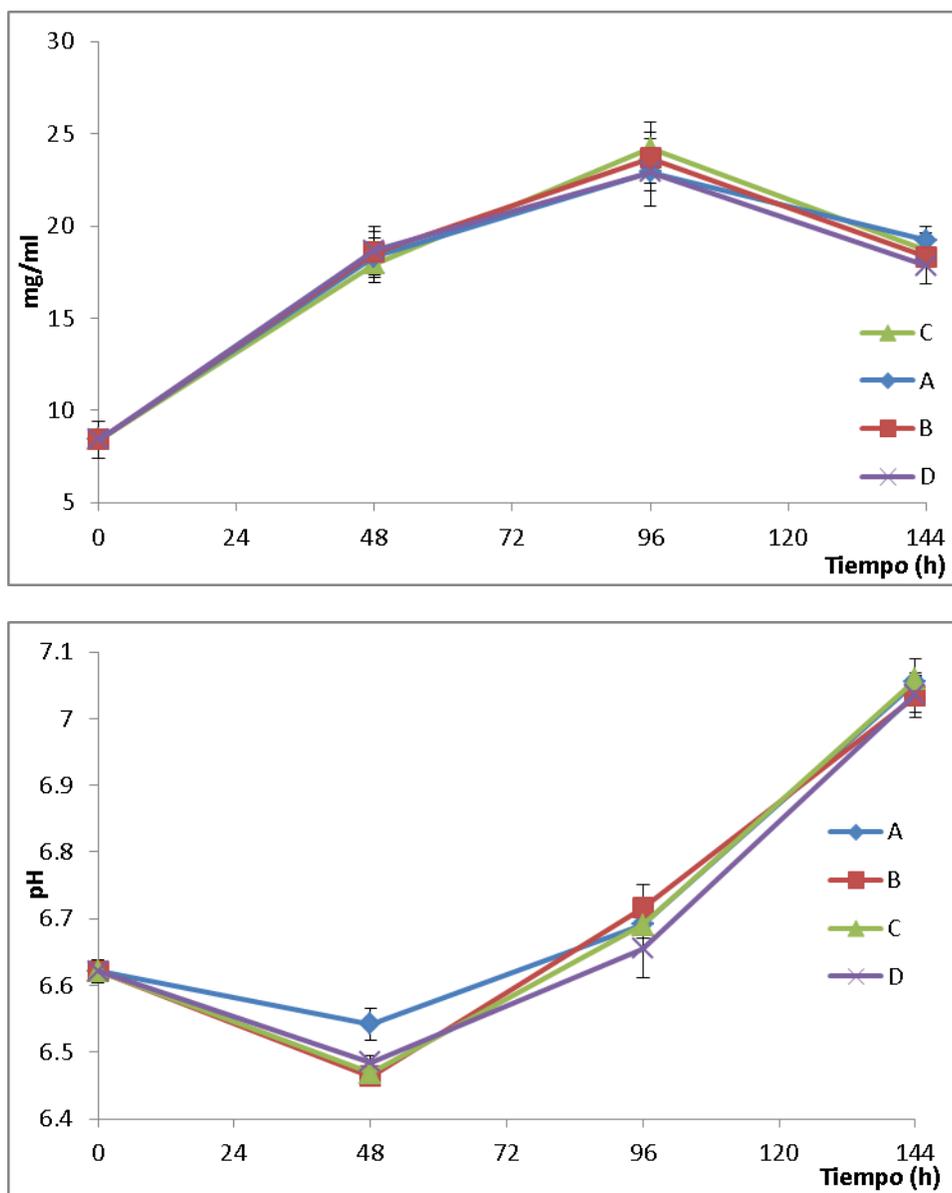
Para estudiar el patrón de metabolitos por CLAR se realizó un estudio preliminar del patrón de UV-Visible con el objetivo de determinar qué longitud de onda es (o son) la más adecuada para el monitoreo químico. De acuerdo a este estudio, las longitudes de onda más idóneas para observar cambios en el patrón de metabolitos producidos son las que se encuentran en el rango de 200 a 450 nm, en los dos tiempos de fermentación estudiados, 96 y 144 horas (Figura 18).

10.3.3. Estudio en el cambio del patrón de metabolitos asociado con el uso del remodelador TSA.

El procedimiento seguido en este caso (Figura 19) fue el mismo descrito para el remodelador SAHA (apartado 10.1.3).

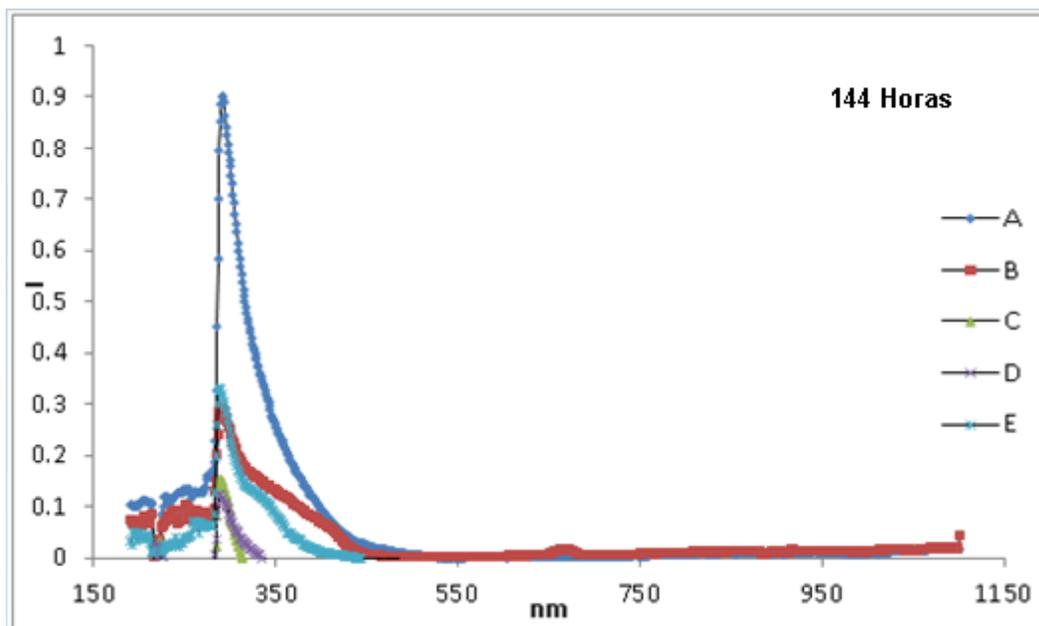
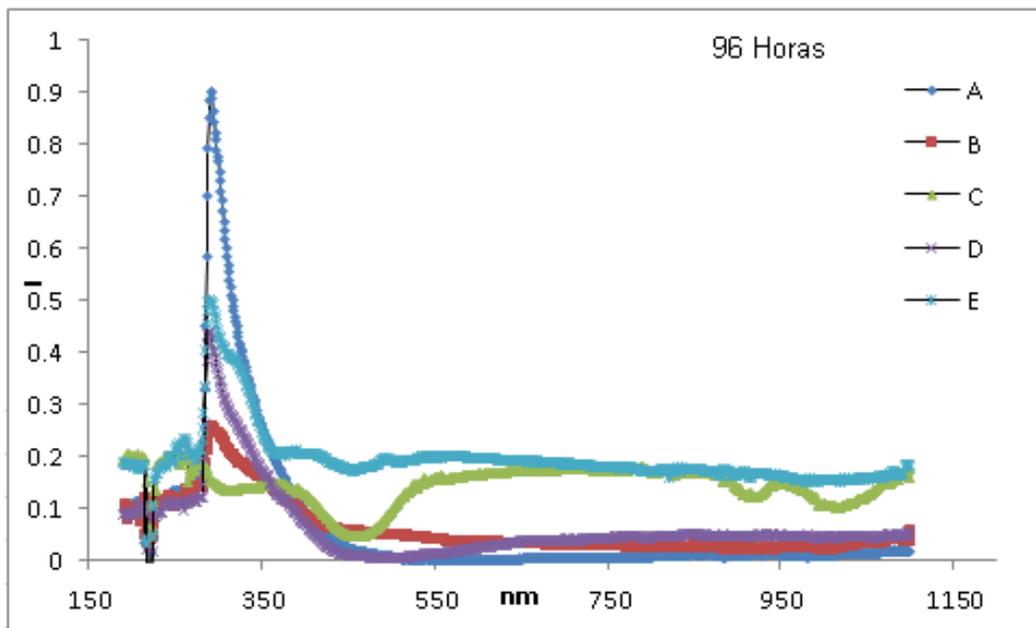
El análisis de los perfiles cromatográficos en los tiempos de fermentación de 96 y 144 horas determinó los cambios en el patrón químico que se muestran en la Tabla 6 y Figura 19. En ellas se puede observar la aparición de una familia de compuestos para la fermentación de 96 horas en el tiempo de retención 20.5 minutos (familia Y). Estos mismos estudios, realizados con el tiempo de fermentación 144 horas, dieron como resultado la aparición de dos familias de compuestos en los tiempos de retención 15 y 20.5 minutos (familia S e Y, respectivamente) (Tabla 7 y Figura 20).

Figura 17 Cambio de biomasa y pH a lo largo del tiempo en cultivos con y sin TSA.



A) Medio de cultivo + inóculo; B) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μ M); D) Medio cultivo + inóculo + TSA (0.1 μ M); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μ M).

Figura 18 Barrido de UV-VIS de 190 a 1100 nm para la detección de metabolitos producidos por *A. chrysogenum* en medio con y sin TSA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μM) D) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.1 μM); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μM).

Tabla 6 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin TSA y con TSA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 96 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de la señal en mV | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----|------|------|------|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | | 5 | 8 | | 30 |
| 14.0 | 8 | | | | |
| 15.0 | | | | 10 | |
| 19.5 | | | | | |
| 20.5 | | 26 | 100* | 160* | 200* |
| 21.0 | 12 | 9 | | | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 19 | | | |

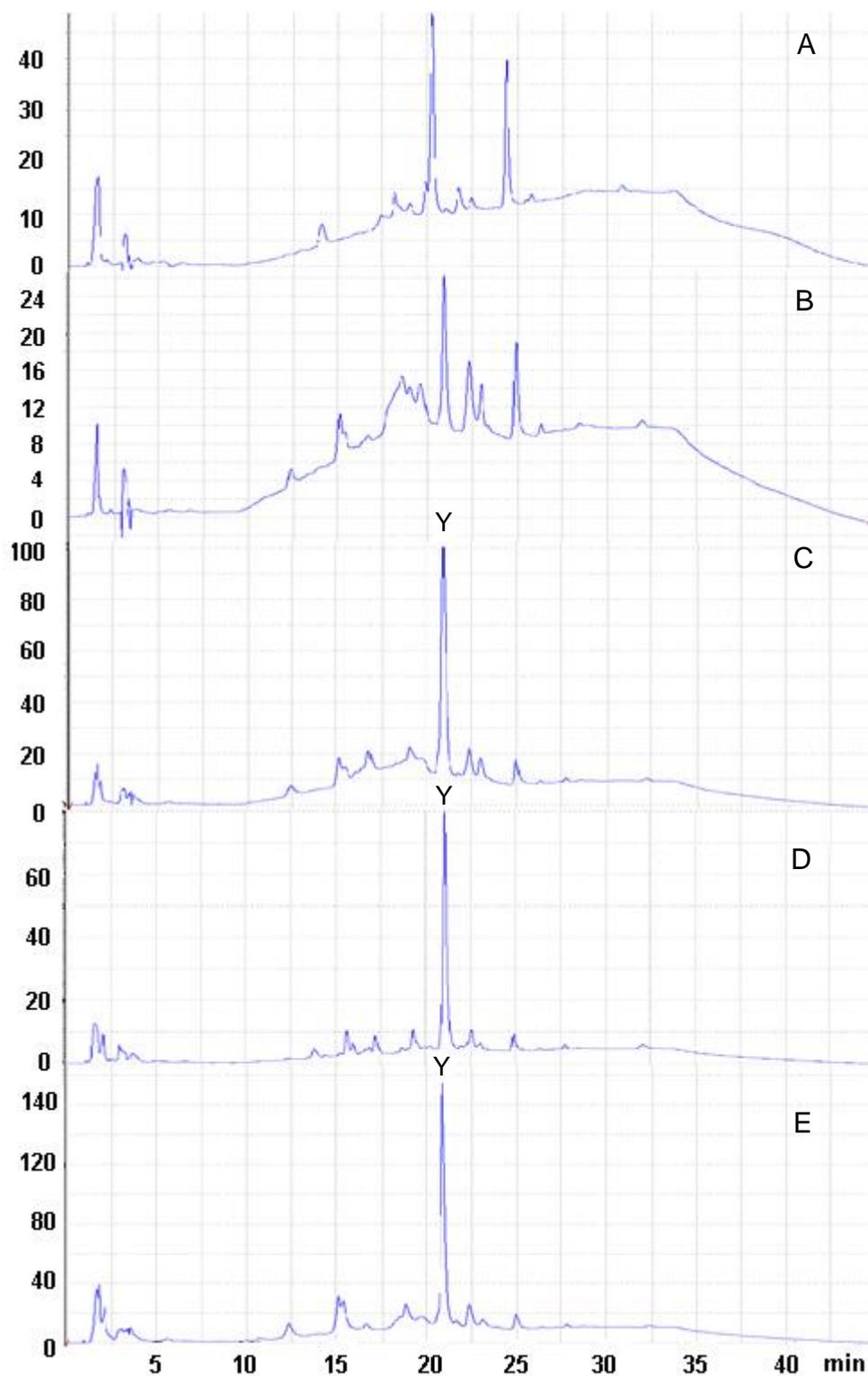
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μ M) D) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.1 μ M); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μ M). *Se observa en 215 y 250 nm

Tabla 7 Cambios en las señales expresadas en mV obtenidas por CLAR y observadas a una longitud de onda de 215 nm, de muestras de cultivos sin TSA y con TSA a diferentes concentraciones, en un tiempo de cultivo de 144 horas.

| Tiempo de retención (min) | Intensidad de la señal en mV | | | | |
|---------------------------|------------------------------|----|------|------|-----|
| | A | B | C | D | E |
| 12.5 | | | | | |
| 14.0 | 8 | | | | |
| 15.0 | | 15 | 23* | 45* | 80* |
| 19.5 | | | | | |
| 20.5 | | 65 | 105* | 180* | 80* |
| 21.0 | 12 | 17 | | | |
| 24.0 | 40 | | | | |
| 25.0 | | 27 | | | |

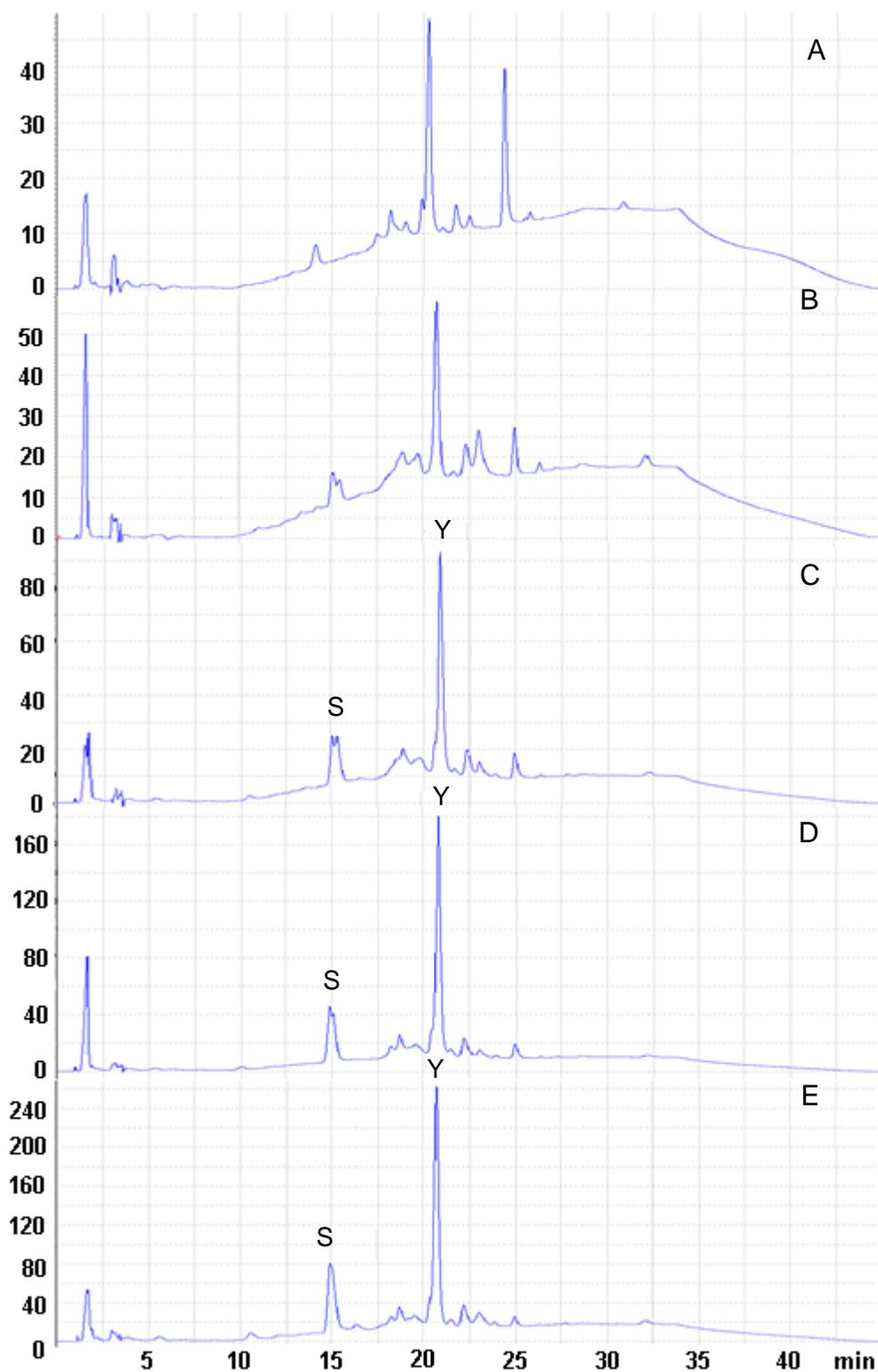
A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μ M) D) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.1 μ M); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μ M). *Se observa en 215 y 250 nm

Figura 19 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 96 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina TSA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μM) D) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.1 μM); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μM).

Figura 20 Cambios en el metaboloma obtenido por CLAR a 215 nm en cultivos de 144 horas en ausencia y presencia del remodelador de la cromatina TSA.



A) Medio de cultivo; B) Medio de cultivo + inóculo; C) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.01 μM) D) Medio de cultivo + inóculo + TSA (0.1 μM); E) Medio de cultivo + inóculo + TSA (1 μM).

10.4. Análisis fitoquímico y citotóxico de las familias encontradas empleando los diferentes inhibidores.

Una vez que se observaron las condiciones en las que aparecieron las diferentes familias, éstas fueron comparadas con un control (medio de cultivo más inóculo) y el medio de cultivo mediante un estudio fitoquímico, para asociar las estructuras con una posible actividad biológica. Sólo se hicieron pruebas cualitativas para determinar alcaloides, antraquinonas, cumarinas, saponinas y taninos.

Por otro lado se realizaron análisis de la actividad de los compuestos sobre tres líneas celulares cancerígenas: HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cérvico-uterino), para observar si había un efecto inhibitorio del crecimiento de ese tipo de células.

10.4.1. Análisis fitoquímico

Se ha visto que algunos alcaloides, como la vinblastina, vincristina, vinorelbina, etc., tienen actividad citotóxica y muchos de ellos son usados como agentes anticancerígenos inhibiendo enzimas o la mitosis. Sólo la familia "S" dio resultado positivo a la presencia de alcaloides, lo que podría estar relacionado con la inhibición del crecimiento en la línea celular MCF-7 durante los ensayos de citotoxicidad.

En la prueba para detectar la presencia de antraquinonas fue positiva para todas las familias de compuestos estudiadas. Las estructuras de las antraquinonas son muy variadas, teniendo en común uno o más grupo cetónicos (al haber ocurrido los cambios más significativos en los perfiles CLAR a los 215 nm era altamente probable que se encontraran estructuras de este tipo).

Ninguna familia de compuestos resultó positiva para la prueba de detección de cumarinas, sin embargo, estaba justificada puesto que se ha reportado la aparición de cumarinas derivada del uso del inhibidor SBHA (Yang et al., 2013).

Al hacer la prueba correspondiente a la presencia de taninos en las muestras, éstos sólo se detectaron en las mezclas X e Y. Los taninos son compuestos fenólicos y en

las figuras 10, 14 y 18 las mayores intensidades se detectan entre 280 y 315 nm. En este rango de absorción se encuentra la familia de los fenoles, por lo que también era de esperarse la presencia de este tipo de compuestos en las muestras, cabe resaltar que este tipo de pruebas es únicamente cualitativo.

Tabla 8 Análisis fitoquímico asociado al uso de inhibidores de histona desacetilasas

| Análisis fitoquímico | Familias | | | | | | |
|----------------------|----------|---|---|---|------|---------|-----|
| | X y Y | X | Y | S | M.C. | Control | |
| Grupos. químicos | | | | | | | |
| Alcaloides | - | - | - | + | - | - | 1/6 |
| Antraquinonas | + | + | + | + | - | - | 4/6 |
| Cumarinas Volátiles | - | - | - | - | - | - | 0/6 |
| Saponinas | + | + | + | + | + | + | 6/6 |
| Taninos | + | - | - | - | - | - | 1/6 |

Tabla 8 Se observa el análisis fitoquímico donde están los grupos químicos con reportes de aparición tras de inhibidores de histona desacetilasa.

10.4.2. Ensayos de citotoxicidad

Algunos reportes en donde se usan inhibidores de histonas desacetilasas e inhibidores de metil transferasas han reportado compuestos antitumorales con posible actividad citotóxica (Chung et al., 2013). Esto motivó la realización de un ensayo de citotoxicidad sobre células tumorales. Se realizó un estudio en tres líneas celulares, HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cérvico-uterino), para observar si alguna familia de compuestos tuviese algún tipo de actividad citotóxica (figuras 21, 22 y 23), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 9.4.3.

Los resultados preliminares sugieren una posible actividad citotóxica en la condición en donde salió la familia "S" sobre la línea celular MCF-7. Se procedió a repetir el experimento aumentando el número de diluciones y probando diferentes tiempos para observar si éste de alguna manera influía en el crecimiento celular (figura 24). Al realizar el

ensayo se puede apreciar que no hay crecimiento celular a las 48 horas a las concentraciones 4 y 20 $\mu\text{g/ml}$, lo que podría sugerir que al comenzar a terminarse los sustratos del medio las células comienzan a consumir fuentes alternas de sustrato y el extracto podría estar actuando como sustituto, provocando algún tipo de inhibición (competitivo, incompetitivo o mixto) y de esta manera provocar que las células dejen de proliferar en estas condiciones. No se pudo obtener el IC_{50} debido a que se usaron pocas concentraciones de controles, estos fueron usados para observar que la línea celular era adecuada para ser usada en ese momento.

Figura 21 Ensayo de citotoxicidad en células HCT-15.

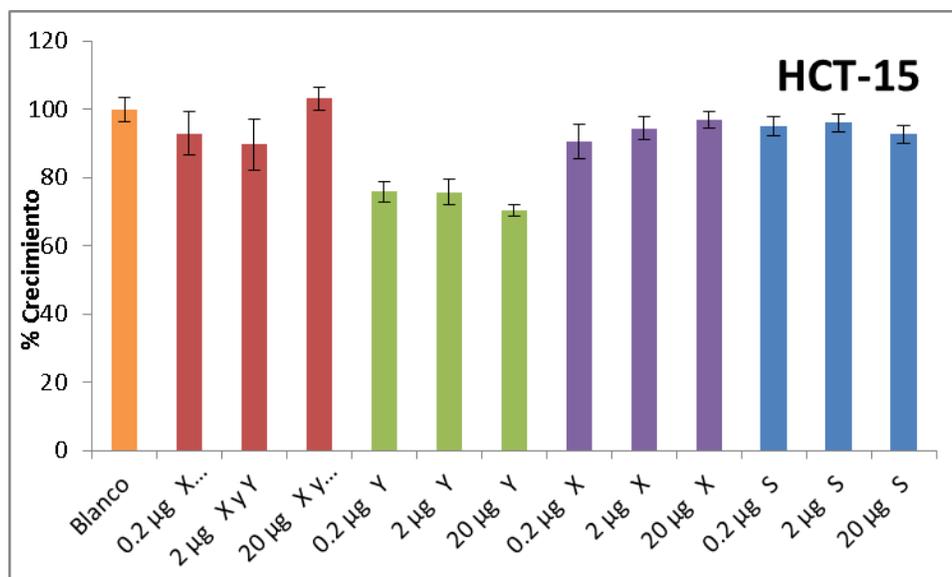


Figura 21. Se muestra el efecto de los diferentes extractos a diferentes concentraciones en el porcentaje de crecimiento de la línea celular HCT-15, correspondiente a cáncer de colon.

Figura 22 Ensayo de citotoxicidad en células MCF-7.

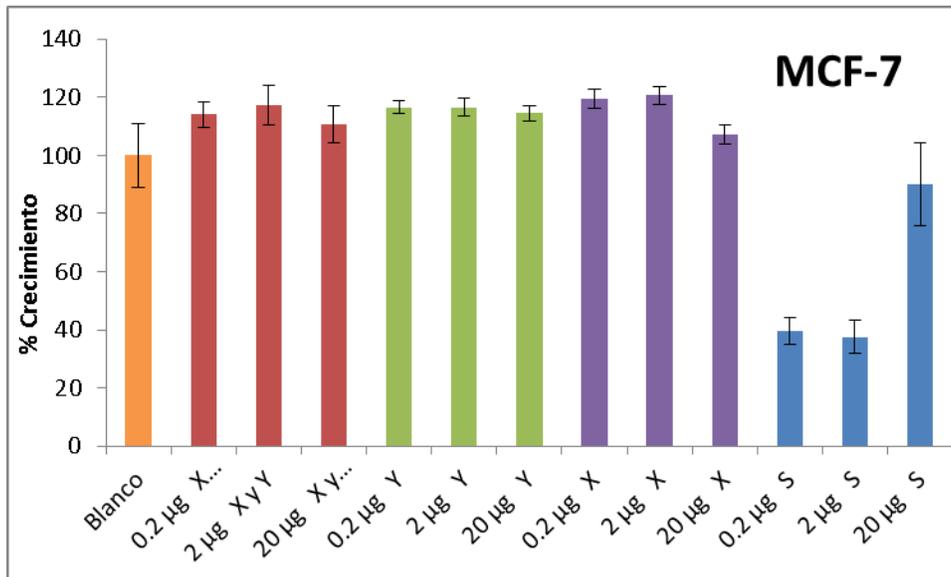


Figura 22. Se muestra el efecto de los diferentes extractos a diferentes concentraciones en el porcentaje de crecimiento de la línea celular MCF-7, correspondiente a cáncer de mama.

Figura 23 Ensayo de citotoxicidad en células HeLa.

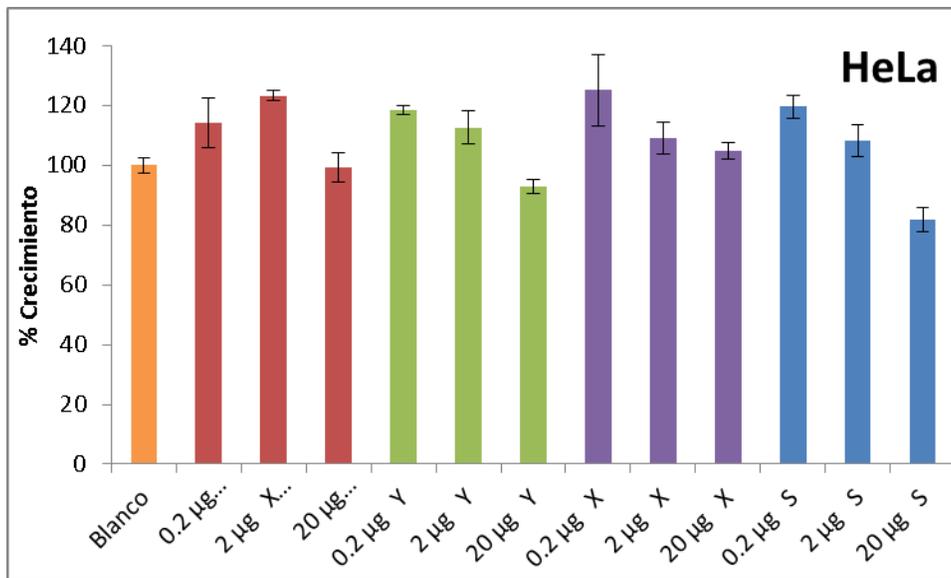


Figura 23. Se muestra el efecto de los diferentes extractos a diferentes concentraciones en el porcentaje de crecimiento de la línea celular HeLa, correspondiente a cáncer cérvico uterino.

Figura 24 Ensayo de citotoxicidad en MCF-7 a las 24 y 48 horas.

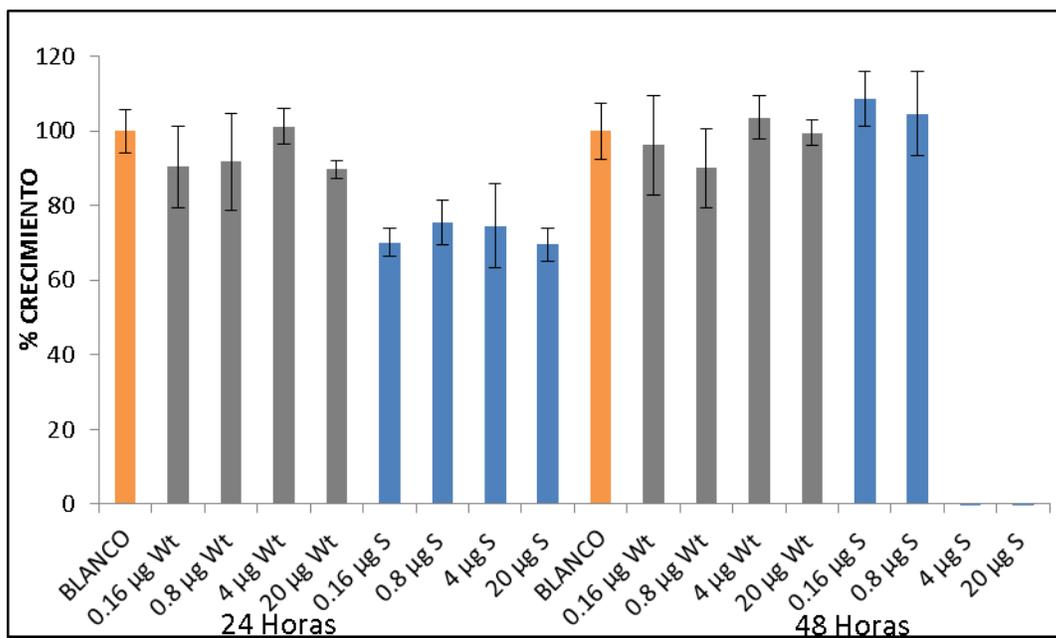


Figura 24 Se muestra el efecto de la familia "S" a diferentes concentraciones y tiempos distintos en el porcentaje de crecimiento de la línea celular MCF-7, correspondiente a cáncer de mama.

11. Conclusiones

- La adición de inhibidores de histonas desacetilasas no provoca un cambio significativo en el comportamiento del pH ni en la producción de biomasa con respecto a cultivos sin adición de inhibidores.
- En presencia del inhibidor SAHA, a las 96 horas aparecen las familias de compuestos X e Y, que no se observan en ausencia del inhibidor.
- Aparentemente, la aparición de la familia X estaría asociada con la fase estacionaria, la familia Y sale en todas las fases y la familia S estaría asociada con la fase de muerte celular.
- En el caso del cultivo en presencia del inhibidor SBHA, a las 144 horas no se favoreció la producción de metabolitos detectable en UV, pero puede que se estén produciendo metabolitos de interés ligados a azúcares o algunos tipos de grasas.
- El inhibidor TSA, en cualquier concentración y tiempo, provoca la aparición de las familias Y, y solo a las 144 horas produce la familia S.
- A la condición donde salió la mezcla de la familia S, presentó actividad citotóxica, inhibiendo el crecimiento de células tumorales (MCF-7) a las 48 horas, en concentraciones de 4 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Esta mezcla fue la única que dio positivo en la prueba para detectar la presencia de alcaloides.
- Los resultados obtenidos sugieren la posible activación de rutas biosintéticas no habituales (y tal vez no reportadas) en *Acremonium chrysogenum*.

12. Perspectivas

- Elucidar las estructuras de los compuestos asociadas a bioactividad.
- Explorar otras formas de separar los compuestos producto de la remodelación de la cromatina, como son los métodos físicos o químicos.
- Como ya se ha mencionado con anterioridad, se sabe que aparecen muchas moléculas nuevas o no reportadas, el problema radica en que no se ha podido establecer cuál es su actividad biológica. Por ello, deben establecerse ensayos en los que se pueda buscar otros tipos de bioactividad, como antihiper glucemia, antivirales, etc.
- Probar otros medios de cultivo.
- Inactivar los genes de HCDA de cepas con genotipos variados (ya previamente estudiados en el laboratorio, como son las *aga1*^{G203R}, *aga1*^{G42R}, *aga1*^{Q204L}, C10, P17, P21, P10, P20, P18, S7, S8 y WT) para estudiar su efecto sobre la producción de cefalosporina C, así como en la morfología y la producción de la familia S.
- Probar el butirato de sodio una vez que se haya logrado inactivar los genes de HCDA, ya que se ha visto que la adición de este compuesto induce la hiperacetilación; en *Aspergillus clavatus*, por ejemplo, se aumentó la producción de pseurotin A (Zutz et al., 2013) por este método. Además, debe buscarse la forma de asociar el cambio del fenotipo con el grado de acetilación en residuos de lisina específicos (Tribus et al., 2010).
- Probar un inhibidor de HCDA como lo es HC-TOXIN, debido a que hay muy pocos reportes en su manera de cambiar el perfil de metabolitos secundarios en hongos, solo hay algunos reportes en actinomicetos (Osborn, 2010).
- Probar inhibidores de las metil transferasas, como el 5-AZA por mencionar un ejemplo: en *Aspergillus sydowii* se encontraron de esta forma antiinflamatorios y antidiabéticos (Chung et al., 2013). Por su parte, sólo hay un reporte del uso del compuesto RG-108, en solo hay un reporte usada en *Isaria tenuipes*, donde se encontraron algunos policétidos, pero aparentemente sin bioactividad (Asai et al., 2012).

13. Bibliografía

- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V, Jhansi Lakshmi P. 2003. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation of *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochem.* 39(2): 171-177.
- Asai Teigo, Chung Yu-Ming, Sakurai Hiroaki, Ozeki Tomoji, Chang Fang-Rong, Yamashita Kouwa and Oshima Yoshiteru. 2012a. Tenuipyronone a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus *Isaria tenuipes* cultivated in the presence of epigenetic modifiers. *Organic Letters.* 14(2): 513–515.
- Asai Teigo, Taniguchi Tohru, Yamamoto Takashi, Monde Kenji and Oshima Yoshiteru. 2013a. Structures of spiroindicumides A and B unprecedented carbon skeletal spirolactones and determination of the absolute configuration by vibrational circular dichroism exciton approach. *Organic Letters.* 15(17): 4320–4323.
- Asai Teigo, Yamamoto Takashi, Taniguchi Tohru and Oshima Yoshiteru. 2011. Histone deacetylase inhibitor induced the production of three novel prenylated tryptophan analogs in the entomopathogenic fungus *Torrubiella luteorostrata*. *Tetrahedron Letters.* 52(52): 7042–7045.
- Asai Teigo, Yamamoto Taniguchi, and Oshima Yoshiteru. 2012b. Aromatic polyketide production in *cordyceps indigotica* an entomopathogenic fungus induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor. *Organic Letters.* 14(8): 2006–2009.
- Asai Teigo, Yamamoto Takashii, Shirata Naoki, Taniguchi Tohru, Monde Kenji, Fujii Isao and Oshima Yoshiteru. 2013b. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. *Organic Letters.* 15(13): 3346–3349.
- Bannister Andrew J. and Kouzarides Tony. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research.* 21(3): 381–395.
- Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA, Hertweck C. 2007. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol.* 3(4): 213-217.
- Bergmann S, Funk AN, Scherlach K, Schroeckh V, Shelest E, Horn U, Hertweck C, Brakhage AA. 2010. Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Appl Environ Microbiol.* 76(24): 8143-8149.
- Bok JW, Chiang YM, Szewczyk E, Reyes-Dominguez Y, Davidson AD, Sanchez JF, Lo HC, Watanabe K, Strauss J, Oakley BR, Wang CC, Keller NP. 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene *clusters*. *Nat Chem Biol.* 5(7): 462-464.

- Bok Jin Woo, Chiang Yi-Ming, Szewczyk Edyta, Reyes-Dominguez Yazmid, Davidson Ashley D., Sanchez James F. and Keller Nancy P. 2010. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene *clusters*. *Chemistry and Biology* 5(7): 462–464.
- Bouhired S, Weber M, Kempf-Sontag A, Keller NP, Hoffmeister D. 2007. Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene *cluster* boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal Genet Biol.*44(11): 1134-1145.
- Brakhage Axel A. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(1): 21–32.
- Brakhage Axel A. and Schroeckh Volker. 2011. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene *clusters*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1): 15–22.
- Brosch Gerald, Loidl Peter, and Graessle Stefan. 2008. Histone modifications and chromatin dynamics: A focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(3): 409–439.
- Calvo Ana M., Wilson Richard A., Bok Jin Woo and Keller Nancy P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3): 447–459.
- Chung Yu-Ming, El-Shazly Mohamed, Chuang Da-Wei, Hwang Tsong-Long, Asai Teigo, Oshima Yoshiteru, Ashour Mohamed-L., Yang-Chang Wu. 2013. Suberoylanilide hydroxamic acid a histone deacetylase inhibitor induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *Journal of Natural Products*. 76 (7): 1260–1266.
- Chung Yu Ming, Wei Chien Kei, Chuang Da Wei, El-Shazly Mohamed, Hsieh Chi Ting, Asai Teigo, Oshima Yoshiteru, Hsieh Tusty Jiuan, Hwang Tsong Long, Wu Yang Chang, Chang Fang Rong. 2013. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 21(13): 3866-3872.
- Cichewicz Robert 2014. Biocommunication of Fungi Chapter 3 Epigenetic Regulation of Secondary Metabolite Biosynthetic Genes in Fungi. 57-70.
- Dimitar Angelov, Joseph M. Vitolo, Vesco Mutskov, Stefan Dimitrov, and Jeffrey J. Hayes. 2011. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 98 (12): 6599–6604.
- Dokmanovic Milos, Clarke Cathy and Marks Paul. 2007. Histone deacetylase inhibitors overview and perspectives. *Journal Molecular cancer research*. 5 (10): 981-989.
- Domínguez, X. A., “Métodos de Investigación Fitoquímica”, Ed.Limusa. México, 1973. Capítulo 3.
- Fernández FJ. 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*penDE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.

- Fisch KM, Gillaspay AF, Gipson M, Henrikson JC, Hoover AR, Jackson L, Najjar FZ, Wägele H, Cichewicz RH. 2009. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(9): 1199-1213.
- Fox Ellen M. and Howlett Barbara J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology.* 11(6): 481–487.
- Glenn Antony E., Bacon Charles W., Price Robert, Hanlin Richard T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia.* 88(03): 369-383.
- Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Joyner, P.M., Cichewicz, R.H., 2009. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org. Biomol. Chem.* 7, 435–438.
- Kamei K, Watanabe A. 2005. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Med Mycol.* 43 Suppl 1: S95-S99.
- Le Page G.A., and Campbell Elizabeth. 1946. Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* 162: 163-171.
- Lim Fang Yun, Sanchez James F., Wang Clay C.C. and Keller Nancy P. 2012. Toward Awakening Cryptic Secondary Metabolite Gene *Clusters* in Filamentous Fungi. *Methods Enzymol.* 517: 303–324.
- Mediavilla A, García-Lobo JM. 2005. Antibióticos beta-lactámicos. En: Flórez J. *Farmacología Humana*, 4ª ed, Ed. Masson. Barcelona, España: 1105-1127.
- Minuth Walter, Tudzynski Paul and Esser Karl. 1982. Extrachromosomal Genetics of *Cephalosporium acremonium*. *Current Genetics.* 5(4): 227–231.
- Nijland Jeroen G., Kovalchuk Andriy, Van den Verg Marco, Bovenberg Roel A.L., Driessen AJM. 2008. Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology* 45:1415-1421.
- Osbourn Anne. 2010 Secondary metabolic gene *clusters*: Evolutionary toolkits for chemical innovation 26(10): 449-457.
- Osada Shigehiro, Sutton Anna, Muster Nemone, Brown Christine E., Yates Jhon R., Sternglanz Rolf, and Workman Jerry L. 2001. The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions chromatin with assembly factor ASF1. *Genes and Development.* 15: 3155-3168.
- Roze Ludmila V., Arthur Anna E., Hong Sung-Yong, Chanda Anindya, Linz John E. 2007. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin *cluster*. *Mol. Microbiol.* 66: 713-726
- Russell B. Williams, Henrikson Jon C., Hoover Ashley R., Lee Andri Lynn E. and Cichewicz Robert H. 2008. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic and Biomolecular Chemistry.* 6(11): 1895–1897.

- Seidel G., Tollnick C., Beyer M, Fahimi Y, Schügerl K. 2002. Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part I. Application of complex media. *Process Biochem.* 38(2): 229-239.
- Selker Eric U., Freitag Michael, Kothe Gregory O., Margolin Brian S., Rountree Michael R., Allis David C., and Tamaru Hisashi 2002. Induction and maintenance of nonsymmetrical DNA methylation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99 (4): 16485–16490.
- Shen Y.-Q, Heim J., Solomon N.A., Wolpe S., Demain A. L. 1983. Repression of β -lactam production in cephalosporium acremonium by nitrogen sources the nitrogen. *Journal of Antibiotics XXXVII.* (5): 503–511.
- Schwab Keats E., Bok Jin Woo, Tribus Martin, Galehr Johannes, Graessle Stefan and Keller Nancy P. 2007. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*, 6(9): 1656–1664.
- Smith Kristina M., Phatale Pallavi A, Bredeweg Erin L. and Connolly Lanelle R. 2012. Chaper 1. Epigenetics of Filamentous Fungi. *Encyclopedia of molecular cell Biology and molecular medicine second edition.* Edited. Meyer Robert A: 1-43
- Soukup Alexandra A., Keller Nancy P. 2012. Chapter 10. Epigenetic approaches to natural product synthesis in fungi. *En Drug Discovery from Natural Products.* Eds. Genilloud O, Vicente F. *The Royal Society of Chemistry:* 198-217.
- Soukup AA, Chiang YM, Bok JW, Reyes-Dominguez Y, Oakley BR, Wang CC, Strauss J, Keller NP. 2012. Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase *EsaA* increases activation of secondary metabolite production. *Mol Microbiol.*86 (2): 314-330.
- Summerbell R.C., Gueidan C, Schroers HJ., Hoog G. S., Starink M, Arocha Y. Rosete, Guarro J., and Scott J A. 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycol.* 68:139-62.
- Szewczyk E, Chiang YM, Oakley CE, Davidson AD, Wang CC, Oakley BR. 2008. Identification and characterization of the asperthecin gene *cluster* of *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol.* 74(24): 7607-7612.
- Terfehr Dominik, Dahlmann Tim, Specht Thomas, Ivo Zadra and Kürnsteiner Hubert. 2014. Genome Sequence and Annotation of *Acremonium chrysogenum*, Producer of the β - Lactam Antibiotic Cephalosporin C. *GenomeA.* 2(5): 578–579.
- Thomas Jenuwein and C. David Allis. 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293 (5532): 1074-1080.
- Tribus Martin, Bauer Ingo, Galehr Johannes, Riesser Gurdrum, Trojer Patrick, Brosch Gerald, Loidl Peter, Haas Humbertus, and Graessle Stefan. 2010. *Molecular Biology of the cell.* 21(22): 345-353

- Xiao-Long Yang, Takayoshi Awakawa, Toshiyuki Wakimoto and Ikuro Abe. 2013. Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae*. *Tetrahedron Letters*. 54(43): 5814–5817.
- Zutz Christoph, Gacek Agnieszka, Sulyok Michael, Wagner Martin, Strauss Joseph and Rychli Kathrin. 2013. Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. *Toxins*. 5(10): 1723–1741.

ANEXOS

13.1. Ensayos fitoquímicos para el medio de cultivo

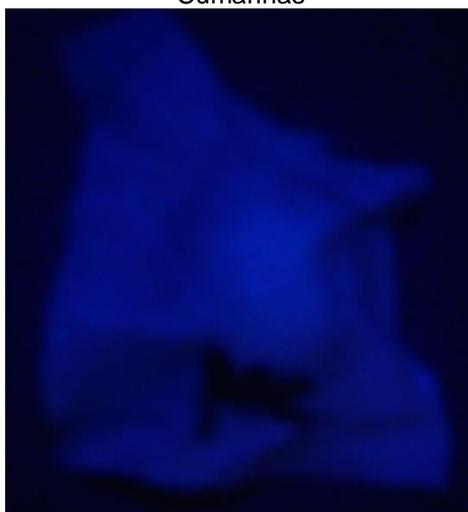
Alcaloides



Antraquinonas



Cumarinas



Saponinas



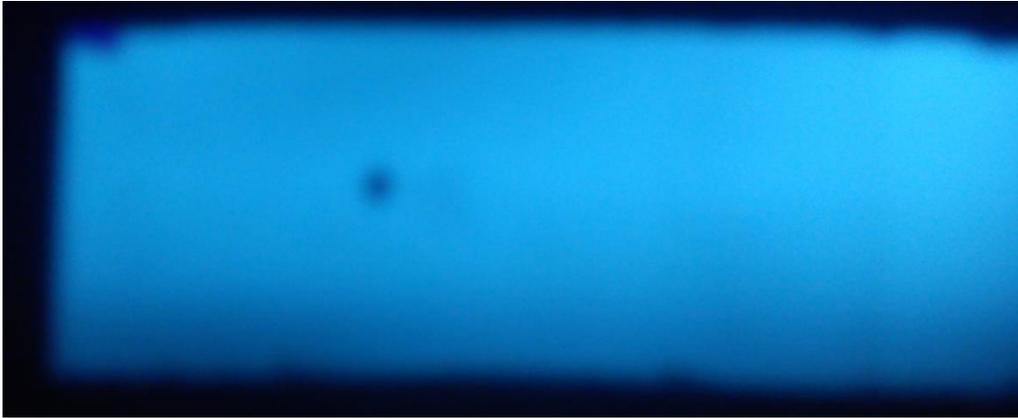
Taninos



13.2. Ensayos fitoquímicos medio de cultivo mas inóculo
Alcaloides



Antraquinonas



Cumarinas



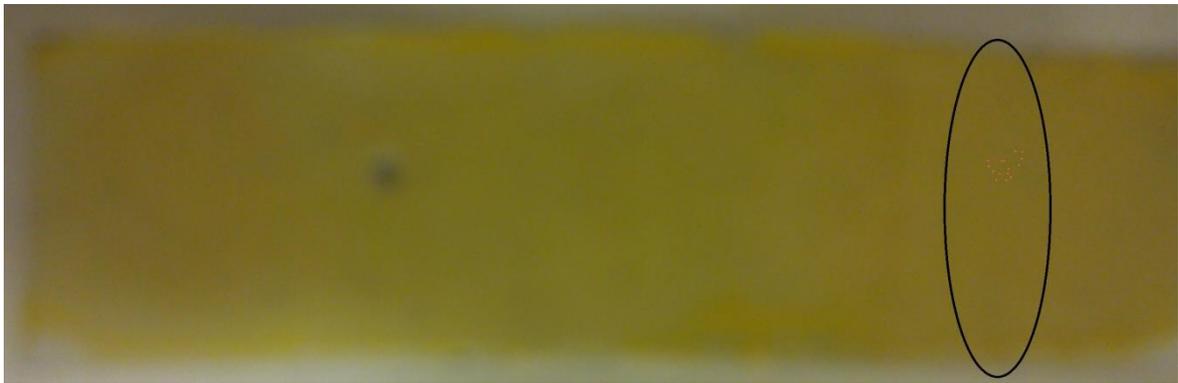
Saponinas



Taninos



13.3. Ensayos fitoquímicos para la familia S
Alcaloides



Antraquinonas



Cumarinas



Saponinas

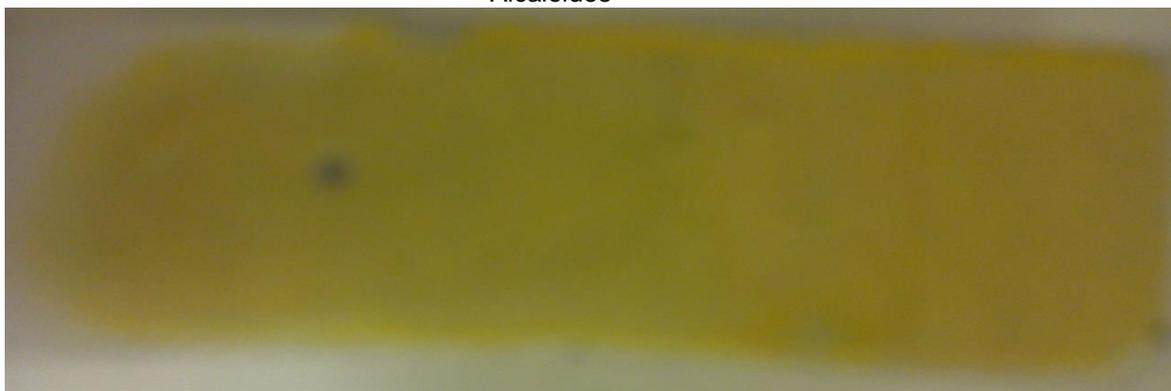


Taninos

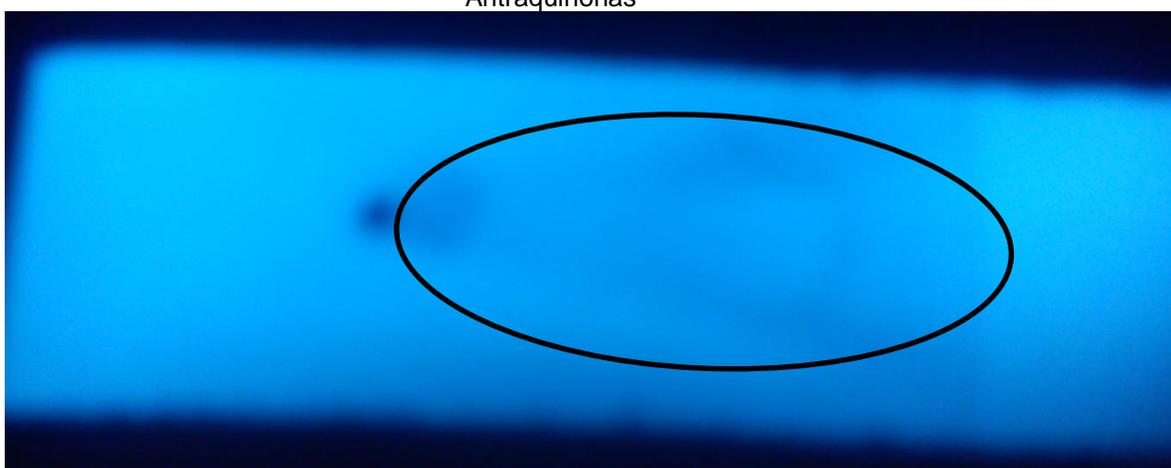


13.4. Ensayos fitoquímicos para la familia X

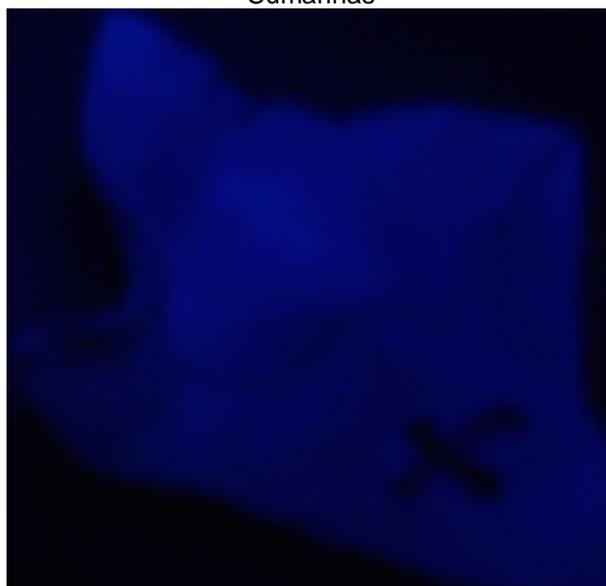
Alcaloides



Antraquinonas



Cumarinas



Saponinas



Taninos



13.5. Ensayos fitoquímicos para la familia Y

Alcaloides



Antraquinonas



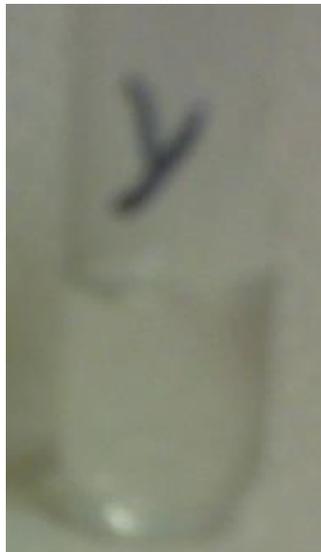
Cumarinas



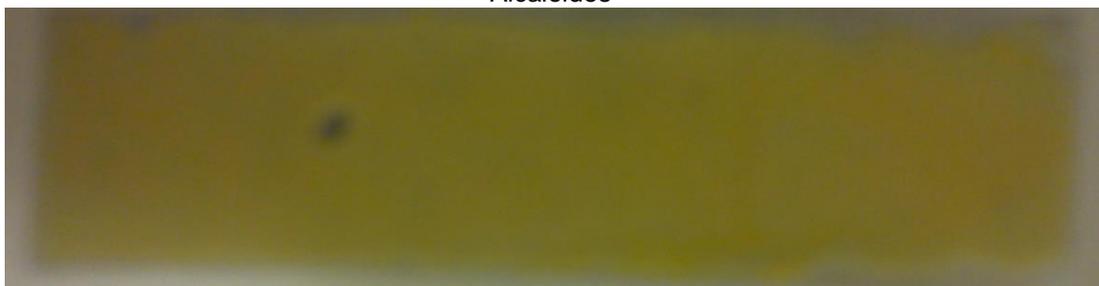
Saponinas



Taninos



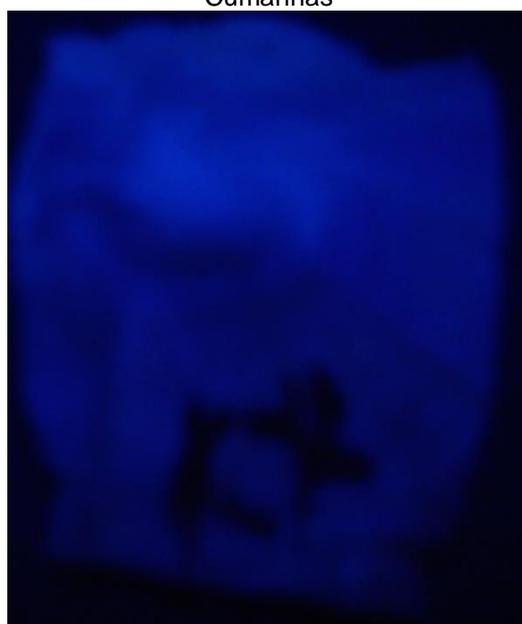
13.6. Ensayos fitoquímicos para la familia XY
Alcaloides



Antraquinonas



Cumarinas



Saponinas



Taninos

