

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Papel del gen *atfB* en la biosíntesis de lovastatina”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.A. Montserratt Herrera Martell

Director de tesis:

Dr. Javier Barrios González

Asesores

Dr. Armando Mejía Álvarez

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Ciudad de México

Noviembre 2019

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



La **Maestría en Biotecnología** de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Así mismo, se contó con el Apoyo de CONACYT, con el otorgamiento de la Beca No. 637714.



Agradecimientos

Esta etapa se ha logrado gracias al apoyo de mis papás Gina y Manuel, que siempre me han apoyado en todas las misiones imposibles en las que me meto. También al apoyo de mi hermana Jessy porque me ha acompañado en casi todas curiosamente. A mis abues, que en su momento les tocó levantarse conmigo todos los días temprano para acompañarme en el desayuno antes de clases.

A Moy, que nos encontramos en el camino sin querer y que ahora lo recorreremos juntos. Gracias por tanto y por acompañarme siempre, por ser la persona que admiro tanto y me da los ánimos y la confianza para alcanzar hasta lo más difícil. Contigo tengo la mejor de las suertes sin duda.

Un agradecimiento enorme a mis compañeros del laboratorio (Esme, Gerardo, Fer, Clara, Mafer, Jess, Ailed), amigos de la generación y los del posgrado de ingeniería química, por las risas, aventuras y sobre todo el conocimiento compartido. Nos tocaron tiempos muy difíciles, la bienvenida nos la dio un gran sismo y cuando todo parecía que estaba de maravilla, nos dieron unas no merecidas vacaciones obligatorias... Ya estamos mejor.

El agradecimiento más grande para el Dr. Javier Barrios González, por darme la oportunidad de introducirme en un nuevo mundo, por no dejarme sola y sobre todo por la paciencia, conocimientos, consejos y pláticas a lo largo de este no tan corto, pero si accidentado tiempo.

También un agradecimiento especial a mis asesores el Dr. Armando Mejía y la Dra. Roxana Miranda por su apoyo para avanzar en cada una de las etapas de este proyecto.

A la UAM que me ha dado tanto y puesto en el mejor camino.

Gracias infinitas a Txus, Ricky, Karin y Molly, espero que mi compañía les sea tan maravillosa para ellos, como lo ha sido desde el primer momento en que me dieron su amistad. Gracias también por desvelarse conmigo, ojalá vivieran para siempre.

...Starlight,
I will be chasing the starlight
Until the end of my life...

Resumen

La lovastatina es un fármaco de gran importancia industrial empleado para reducir los niveles de colesterol en la sangre. Su producción convencional se lleva a cabo en fermentación líquida (FL). Sin embargo, en los últimos años se ha despertado un gran interés en obtenerla mediante fermentación sólida (FS) por sus múltiples ventajas, principalmente por la elevada producción. En la “fisiología del medio sólido” existen ciertos estímulos ambientales que anuncian al hongo productor que se encuentra en medio sólido, estos estímulos deben ser detectados y entonces transducidos, disparando un número de eventos a nivel molecular. Uno de los estímulos de mayor interés es el contacto con el aire, recientemente se ha encontrado mayor evidencia de que el metabolismo secundario, en hongos filamentosos, está asociado con el estrés oxidante. Se ha demostrado que la producción de lovastatina, aflatoxinas y probablemente otros metabolitos secundarios correlaciona con un estado oxidante en la fase de producción (idíofase). De hecho, sus genes de biosíntesis se inducen por la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs). Debido al papel que juegan las EROs en la fisiología de los organismos como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales y los antecedentes de ortólogos del gen *atfB* en otras especies, el presente proyecto tuvo como objetivo demostrar el papel que tiene el factor transcripcional AtfB como nexo entre las EROs y la inducción de los genes de biosíntesis. En otras palabras, buscar la explicación de la relación entre el metabolismo secundario y el estrés oxidante.

Para lograr establecer este vínculo, se identificó y se silenció el gen *atfB* en *A. terreus* mediante RNAi. Para ello se construyó el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*AtatfB* y se obtuvieron transformantes con el gen silenciado. Se evaluaron los efectos en cuanto a crecimiento y esporulación, además de la producción de lovastatina y acumulación de EROs en los sistemas de FL y FS.

Los resultados obtenidos proveen suficiente evidencia para decir que el factor transcripcional AtfB está involucrado en la cascada de señalización de defensa ante el estrés oxidante y

osmótico, porque al estar disminuida su expresión, las transformantes presentaron mayor sensibilidad ante estos estreses. Además, AtfB tiene una doble función, como regulador en el metabolismo secundario en la producción de lovastatina por *A. terreus*. En FS actúa como un regulador positivo de la ruta biosintética debido a que las cepas silenciadas disminuyeron la producción hasta 70%. Mientras que en la FL actúa como un regulador negativo, ya que la producción de lovastatina aumentó hasta 124% en las Si*atfB*. Se demostró que las diferencias en la producción por parte de las transformantes no se deben a una variación en la acumulación de EROs, debido a que no se presentan diferencias importantes entre la cepa parental y las transformantes, lo cual indica que el efecto debe directamente al silenciamiento del factor transcripcional AtfB. Con lo anterior se demostró que este factor de transcripción es un nexo entre las EROs y los genes de biosíntesis, jugando un papel clave en el circuito regulatorio que integra al metabolismo secundario y la respuesta celular al estrés oxidante. Además, este factor transcripcional también juega un papel importante en la fisiología contrastante que muestran los hongos en FS y FL.

Índice

Resumen	4
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas.....	12
Índice de ANEXOS	13
Abreviaturas	13
1. Introducción	14
2. Antecedentes	16
2.1 Metabolismo secundario	16
2.1.1. Clasificación de los metabolitos secundarios de acuerdo con la familia biosintética.	17
2.2 Lovastatina	17
2.3 Fermentación en medio sólido (FS).....	22
2.3.1 Fermentación sólida en soportes inertes	22
2.3.2 Estímulos del medio sólido.	23
2.4 Estrés oxidante	24
2.5 Estrés osmótico	25
2.6 Metabolismo secundario y estrés oxidante	27
2.7 Respuesta celular al estrés oxidante.....	27
2.7.1 Factores transcripcionales en respuesta a EROs.	28
2.7.2 EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.	31
2.8 Silenciamiento génico.....	32
2.9 AtfB.....	33
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos particulares	37
6. Materiales y métodos.....	38
6.1 Equipos.....	38
6.2 Microorganismos	39
6.2.1 Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514	39
6.2.2 Cepa bacteriana: <i>E. coli</i> DH5 α	39
6.3 Vectores empleados	39
6.3.1 Vector de clonación pJET 1.2/Blunt (ThermoScientific®)	39
6.3.2 Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi	40
6.4 Medios de cultivo	41
6.4.1 Medios para <i>Aspergillus terreus</i>	41
6.4.2 Medios para <i>Escherichia coli</i> DH5 α	44

6.5 Antibióticos	44
6.6 Condiciones de cultivo.....	45
6.6.1 Esporulación de <i>A. terreus</i>	45
6.6.2 Conteo de esporas	45
6.6.3 Obtención de micelio joven de <i>A. terreus</i>	45
6.6.4 Crecimiento de esporas y micelio en medio PDA de <i>A. terreus</i>	45
6.6.5 <i>Escherichia coli</i> DH5 α	46
6.7 Técnicas microbiológicas	46
6.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>A. terreus</i> por fleomicina.....	46
6.7.2 Siembra por cobertera para la obtención de transformantes de <i>A. terreus</i>	46
6.7.3 Obtención de transformantes de <i>A. terreus</i> con núcleo completamente transformado	47
6.8 Producción de lovastatina en FL y FS.....	47
6.9 Caracterización de las transformantes	48
6.9.1 Sensibilidad a estrés oxidante	48
6.9.2 Sensibilidad a estrés osmótico.....	48
6.9.3 Esporulación.....	49
6.9.4 Crecimiento radial	49
6.10 Técnicas analíticas.....	50
6.10.1 Extracción de lovastatina	50
6.10.2 Cuantificación de lovastatina.....	50
6.10.3 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	51
6.10.4 Determinación de biomasa y humedad	51
6.10.5 pH.....	51
6.11 Técnicas moleculares	52
6.11.1 Extracción de ADN genómico de <i>A. terreus</i>	52
6.11.2 Identificación del gen <i>atfB</i> en <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514.....	52
6.11.3 PCR.....	53
6.11.4 Clonación del fragmento del gen <i>AtatfB</i> con el vector pJET en células ultracompetentes <i>E. coli</i> DH5 α	56
6.11.5 Extracción de DNA plasmídico por minipreps.	57
6.11.6 Purificación a gran escala de DNA plasmídico por midipreps.	58
6.11.7 Digestión de DNA plasmídico.....	58
6.11.8 Desfosforilación de DNA plasmídico digerido.....	58
6.11.9 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi- <i>atfB</i>	59
6.11.10 Transformación de <i>A. terreus</i> con pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> por protoplastos	61
6.12 Uso de herramientas bioinformáticas	63
7. Resultados.....	64

7.1 Identificación de <i>atfB</i> (ATEG_01978) en <i>A. terreus</i> NIH2624	64
7.1.2 Análisis bioinformático de AtAtfB	65
7.2 Identificación y amplificación del fragmento del gen <i>atfB</i> en el genoma de <i>A. terreus</i> TUBF-514	66
7.3. Gradiente de temperatura para encontrar la Tm	66
7.4 Clonación del fragmento	68
7.4.1 Amplificación y purificación	68
7.4.2 Clonación de <i>AtatfB</i> en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™)	68
7.5 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi- <i>atfB</i>	70
7.6 Transformación de <i>A. terreus</i> con el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i>	73
7.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>A. terreus</i> por fleomicina.....	74
7.6.2 Obtención de transformantes de <i>A. terreus</i> con pGpdPki-RNAi- <i>atfB</i> por protoplastos.....	74
7.7 Preselección de transformantes.....	77
7.7.1 Prueba de sensibilidad a estrés oxidante en micelio	77
7.7.2 Prueba de sensibilidad a estrés oxidante en conidios.....	78
7.7.3 Prueba de sensibilidad a estrés osmótico en micelio	80
7.7.4 Prueba de sensibilidad a estrés osmótico en conidios.....	80
7.8.5 Transformantes preseleccionadas con base en la sensibilidad al estrés.....	81
7.8 Producción de lovastatina por las transformantes en medio sólido y líquido.	82
7.9 Confirmación de la integración del vector de silenciamiento	85
7.10 Cinética de producción de lovastatina de las <i>SiattfB</i> elegidas.....	86
7.11 Cinética de acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs).....	88
7.12 Evaluación de otras características fenotípica de las transformantes elegidas	90
7.12.1 Crecimiento radial	90
7.12.2 Esporulación.....	92
8. Discusión	94
8.1 Sensibilidad de estrés oxidante y osmótico de las <i>SiattfB</i>	94
8.2 Producción de lovastatina de las <i>SiattfB</i> de <i>A. terreus</i>	95
8.3 Acumulación de EROs en la producción de lovastatina por las <i>SiattfB</i> de <i>A. terreus</i>	96
9. Conclusiones.....	99
10. Perspectivas.....	100
11. Referencias.....	101
12. ANEXOS.....	106

Índice de figuras

Fig. 1a Estructura química de la lovastatina	18
Fig. 1b Ruta biosintética de colesterol	19
Fig. 2 Ruta biosintética de la lovastatina por <i>Aspergillus terreus</i>	20
Fig. 3 Clúster de genes biosintéticos de la lovastatina.....	20
Fig. 4 Modelo de activación transcripcional de defensa antioxidante y metabolismo secundario en biosíntesis de aflatoxinas por <i>Aspergillus parasiticus</i>	30
Fig. 5 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales que responden a diferentes tipos de estímulos en el promotor del gen regulador del clúster biosintético de lovastatina <i>lovE</i>	31
Fig. 6 Esquema general del proceso de silenciamiento mediado por RNAi.....	33
Fig. 7 Mapa del vector de clonación pJET1.2/blunt.....	40
Fig. 8 Mapa del vector de silenciamiento pGpdPpki-RNAi con los promotores Pgpd y Ppki, en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción <i>NcoI</i>	40
Fig. 9 Mapa de la inserción de <i>AtatfB</i> en el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi.....	59
Fig. 10 PCRs de <i>AtatfB</i> con las combinaciones de los dos pares de primers diseñados en gradiente de temperatura para amplificar el gen. Gel de agarosa 1% para electroforesis. F1R2 amplifica específicamente un producto del tamaño esperado ≈474pb.	67
Fig. 11 PCR para obtener la temperatura óptima de alineamiento para amplificar <i>AtatfB</i> con F1R2, T _m =61.7°C tiene una sola banda definida e intensa. Gel de agarosa 1% para electroforesis.	67
Fig. 12 Amplificación de alta fidelidad de <i>AtatfB</i> con Phusion High-Fidelity DNA Polimerasa. T _m = 61.7°C. Gel de agarosa al 1%.....	68
Fig. 13 Controles de transformación de <i>E. coli</i> DH5α. a. Crecimiento normal en medio LB (verifica viabilidad), b. Sin crecimiento en medio LB + ampicilina (no resistencia), c. Crecimiento de una transformante con un vector conocido Amp ^R (capacidad de transformación).	68
Fig. 14 Transformantes de <i>E. coli</i> DH5α Amp ^R con el plásmido pJET- <i>AtatfB</i> en placa con agar LB+Amp.	69
Fig. 15 DNA plasmídico de las colonias transformantes de <i>E. coli</i> DH5α con pJET- <i>AtatfB</i> Gel de agarosa 1 %. Las 10 colonias analizadas muestran una banda en el tamaño esperado ≈2000pb para el vector.	69
Fig. 16 Confirmación de ligación del fragmento de <i>AtatfB</i> con pJET1.2/blunt. Gel de agarosa 1 %. <i>AtatfB</i> purificado se encuentra ≈500pb (primer carril después del marcador), al igual que las amplificaciones pertenecientes a las PCR para <i>AtatfB</i> de las colonias 1, 3 y 5 seleccionadas por la intensidad en la banda de DNAP de la Fig. 17(sigüientes tres carriles y el fragmento que libera la digestión del vector con la endonucleasa <i>NcoI</i> correspondiente a <i>AtatfB</i> (en el último carril).	69

Fig. 17 Mapa de la construcción del vector pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> . Apertura del vector con la endonucleasa <i>NcoI</i> , desfosforilación y ligación con el inserto <i>AtatfB</i> con cortes <i>NcoI</i>	71
Fig. 18 Controles para la construcción del vector pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> verificando cada elemento transformando <i>E. coli</i> ultracompetentes. a: Se verificó la viabilidad de las células ultracompetentes; b: no presentan resistencia a ampicilina; c: capaces de transformar; d: buen estado del vector y [Amp] adecuada; e: desfosforilación correcta; f: la ligasa es funcional; g: fondo de ligación; h: construcción exitosa.	72
Fig. 19 Construcción del vector pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> . 1: pGpdPki digerido con <i>NcoI</i> . 2: pGpdPki digerido y desfosforilado. 3: Construcción pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> . 4. Digestión de la construcción con <i>NcoI</i> . 5. <i>AtatfB</i> de referencia.	73
Fig. 20 Determinación de la CMI. a: control sin fleomicina. b: Crecimiento del hongo en 40 µg/mL. c: CMI, no hay crecimiento en 50 µg/mL.	74
Fig. 21 Controles de transformación. Izquierda: Protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol sin fleomicina. Derecha: Protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol con 50 µg/mL de fleomicina.	75
Fig. 22 Transformantes de <i>A. terreus</i> con el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i> , medio Czapek/sorbitol con 50 µg/mL de fleomicina.	75
Fig. 23 Primer pase. Medio Power, 4 días a 30°C. a: vista frontal. Se aprecian sectores en algunas transformantes y otras morfologías. b: vista posterior Medio Power, 4 días a 30°C.	76
Fig. 24 Ejemplo de secuencia de pases de las transformantes para eliminar el heterocarión.....	76
Fig. 25 Sensibilidad a estrés oxidante H ₂ O ₂ 2mM en micelio. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, <i>SiattfB</i> transformantes silenciadas. No se observa cambios en el crecimiento, por lo tanto, las transformantes no son hipersensibles en micelio.	77
Fig. 26 Sensibilidad a estrés oxidante en micelio. PDA + H ₂ O ₂ 4 mM. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, <i>SiattfB</i> transformantes silenciadas. Se observa disminución en el crecimiento en 1x10 ⁵ esporas/mL con respecto a la parental y al control.	78
Fig. 27 Cepa parental con estrés oxidante en esporas. Disminución de crecimiento 23%.....	79
Fig. 28 Transformante 7 con estrés oxidante en esporas. Disminución de crecimiento 63%	79
Fig. 29 Sensibilidad a estrés osmótico en micelio. PDA + NaCl 1mM. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, <i>SiattfB</i> transformantes silenciadas.	80
Fig. 30 Cepa parental con estrés osmótico en esporas. Disminución de crecimiento 33%.....	80
Fig. 31 Transformante 13 con estrés osmótico en esporas. Disminución de crecimiento 62%	81
Fig. 32 Transformantes preseleccionadas por su sensibilidad ante el estrés oxidante y osmótico en comparación con la cepa parental.	82
Fig. 33 Producción de lovastatina por FS a las 96h.	83
Fig. 34 Producción de lovastatina por FL a las 96h.....	84

Fig. 35 Gel de agarosa para electroforesis de los productos de PCR de la amplificación del vector de silenciamiento a partir del DNAg de P, C y las <i>SiattfB</i> con los primers F-pki y RpGd. 1° carril después del marcador: PCR del vector sin inserto purificado; 2° carril: PCR de la construcción del vector de silenciamiento purificado; 3° carril: PCR del DNAg de la parental, sin amplificación; 4° Carril: PCR del DNAg de C vector sin inserto. 6°-10°: PCR del DNAg de transformantes.	85
Fig. 36 Cinética de producción de lovastatina por FL y pH en el eje derecho.....	86
Fig. 37 Cinética de producción de lovastatina por FS y pH en el eje derecho.....	87
Fig. 38 Biomasa de FL determinada por gr de biomasa seca.	88
Fig. 39 Esporas de FS por gr de masa seca.....	88
Fig. 40 Cinética de EROs en FL.....	89
Fig. 41 Cinética de EROs en FS.....	89
Fig. 42. Crecimiento radial en mm en medio PDA de las transformantes verdaderas.	90
Fig. 43 Crecimiento radial en medio Czapek de las transformantes verdaderas.	91
Fig. 44 Crecimiento radial en medio Power de las transformantes verdaderas.	91
Fig. 45 Comparación de la esporulación de las transformantes verdaderas con la cepa parental.	92
Fig. 46 Predicción de importinas α -dependientes de NLS en la posición 65 a 86 en la secuencia de aminoácidos de AtAtfB por cNLS Mapper.....	106
Fig. 47 Modelo de la red de interacción proteína-proteína de AtAtfB asociada a otras proteínas, basándose en datos experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones. Software STRING.....	107

Índice de tablas

Tabla 1. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener sondas de <i>AtatfB</i>	53
Tabla 2. Condiciones PCR para amplificar <i>AtatfB</i>	53
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR con Phusion High Fidelity DNA Polimerasa.....	54
Tabla 4. Condiciones de PCR con Phusion High Fidelity DNA Polimerasa.	54
Tabla 5. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para validación de las transformantes.....	54
Tabla 6. Condiciones de PCR para validación de las transformantes.	55
Tabla 7. Reacción de PCR de colonia para <i>E. coli</i> pJET- <i>AtatfB</i>	55
Tabla 8. Condiciones de PCR de colonia para <i>E. coli</i> pJET- <i>AtatfB</i>	55
Tabla 9. Reacción ligación de <i>AtatfB</i> a pJET.....	56
Tabla 10. Condiciones de digestión de DNA plasmídico.....	58
Tabla 11. Condiciones de desfosforilación de DNA plasmídico.....	59
Tabla 12. Construcción del vector pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i>	60
Tabla 13. Controles de la construcción del vector pGpdPki-RNAi- <i>AtatfB</i>	61
Tabla 14. Resumen de resultados obtenidos del BLASTp realizado en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 con los homólogos de AtAtfB.	64
Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos del BLASTn realizado en el genoma de <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 con los homólogos del gen <i>AtatfB</i>	64
Tabla 16. Primers diseñados para amplificar un fragmento del gen <i>AtatfB</i>	66
Tabla 17. Concentración y pureza de los productos de purificación a gran escala del vector pJET- <i>AtatfB</i> y la sonda <i>AtatfB</i> con extremos <i>Nco</i> I.	70
Tabla 18. Resumen de los datos del fenotipo de las transformantes confirmadas de integración de la construcción del vector de silenciamiento.	93
Tabla 19. Resumen de interacciones de proteínas con AtfB.....	107

Índice de ANEXOS

Anexo I. Análisis bioinformático de AtAtfB.....	106
Anexo II. Diseño de primers.....	108
Anexo III. Secuencia obtenida del fragmento amplificado por los primers diseñados FIR2, correspondiente a <i>AtatfB</i>	109
Anexo IV. BLAST de la secuencia obtenida de <i>AtatfB</i> con <i>atfB</i> de <i>A. terreus</i> NIH2624.....	110
Anexo V. Cinética de producción específica de lovastatina en FL de las transformantes.....	111
Anexo VI. Medio PDA sin H ₂ O ₂ . Izquierda: vista frontal, derecha: vista posterior. P: parental, C: control (vector sin inserto)	112
Anexo VII. Medio PDA H ₂ O ₂ 2mM Izquierda: vista frontal, derecha: vista posterior. P: parental, C: control (vector sin inserto)	113
Anexo VIII. Placa PDA control para pruebas de sensibilidad a estrés oxidante y osmótico.....	114
Anexo IX. Placa PDA + H ₂ O ₂ 4 mM para prueba de sensibilidad a estrés oxidante en micelio.....	114
Anexo X. Placa PDA + NaCl 1 mM para prueba de sensibilidad a estrés osmótico en micelio.....	115
Anexo XI. Crecimiento radial.....	115

Abreviaturas

AtatfB: Gen *atfB* de *Aspergillus terreus*

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FL: Fermentación líquida

FS: Fermentación sólida

m.s. Masa seca de cultivo sólido

RNAi: Silenciamiento génico por RNA de interferencia

SiatfB: Transformantes de *Aspergillus terreus* con el gen *atfB* silenciado

1. Introducción

Los hongos filamentosos producen una gran variedad de metabolitos secundarios originados a partir de intermediarios del metabolismo primario; estos compuestos no tienen un papel fisiológico durante la fase de crecimiento. En esta primera fase (trofofase) no se sintetizan, sino que son producidos durante una etapa de producción subsecuente en la que el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo (idiofase), la cual inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de algún nutriente clave como carbono, nitrógeno o fosfato (Barrios-González *et al.*, 2003). Al faltar alguno de estos nutrientes, se altera la producción de metabolitos primarios y se originan inductores de enzimas que darán lugar a metabolitos secundarios.

En los productos no fundamentales en el metabolismo microbiano existe una gran diversidad de moléculas bioactivas, como los antibióticos, fármacos, micotoxinas, entre otras. Uno de los grupos de fármacos que en las últimas décadas ha tomado relevancia en países occidentales son las estatinas. Estos compuestos se utilizan para disminuir el colesterol y los triglicéridos en sus distintas formas, debido a que estos últimos favorecen la incidencia de las enfermedades coronarias y la progresión de lesiones de arteriosclerosis, las cuales representan una de las causas más importantes de muerte. Del colesterol total del cuerpo, solamente una tercera parte proviene de la dieta, las otras dos terceras partes son sintetizadas por el hígado (Alberts, 1988). Debido a esto, la inhibición de la biosíntesis del colesterol es una estrategia importante para reducir los niveles de colesterol en sangre.

Las estatinas naturales son una clase de moléculas con estructura policétida, las cuales pueden obtenerse mediante el metabolismo secundario de hongos. La lovastatina es un metabolito secundario con actividad inhibitoria sobre la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, reduciendo de esta manera los niveles de colesterol en la sangre (Manzoni & Rollini, 2002). Convencionalmente se ha obtenido lovastatina empleando mutantes de *Aspergillus terreus* en FL, sin embargo, la FS recientemente ha emergido como una potente tecnología para producir concentraciones más altas de enzimas y metabolitos secundarios (Baños *et al.*, 2009). Debido a la alta producción de lovastatina en estos estudios, se investigó acerca de los estímulos ambientales específicos en la FS. Se encontró recientemente que el contacto directo con el aire es un estímulo muy importante, el cual induce la alta producción, además del estímulo del soporte sólido. Considerando lo anterior, este efecto estimulante del contacto directo con el aire puede ser mediado por la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Miranda *et al.*, 2014).

Para conocer los eventos que causan estas diferencias, nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios bioquímicos y moleculares que muestran que existen ciertos estímulos ambientales que sólo se encuentran en medio sólido, éstos son detectados y traducidos para así generar una respuesta fisiológica

o molecular. Así mismo, el aumento de la producción de lovastatina ha sido relacionado con una mayor transcripción de los genes biosintéticos (Barrios-Gonzalez *et al.* 2010).

Por otro lado, dado que la producción de EROs ocurre espontáneamente en los organismos aerobios, se hace necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies. Debido que una elevación de las EROs puede suceder rápidamente, las rutas de respuesta de los hongos deben ser igualmente rápidas. Por lo tanto, la célula debe ser capaz de detectar el balance redox alterado, modular la actividad de reguladores transcripcionales apropiados y entonces inducir la expresión de genes diana relevantes (genes de defensa antioxidante) (Miranda, 2013).

En estudios realizados por Miranda *et al.* (2013) en *Aspergillus terreus*, se encontró que la acumulación de EROs coincide con el inicio de la producción de lovastatina y, a su vez, se encontraron diferencias entre la FS y FL en los niveles de EROs. Mientras que en la FL los niveles bajos y controlados parecen ser importantes para un buen nivel de producción, en la FS la acumulación de EROs fue menor pero mucho más estable a lo largo de la idiofase. Estas diferencias fisiológicas podrían estar asociadas a la alta producción de lovastatina en medio sólido (Miranda *et al.*, 2013).

Además, varios estudios con *Aspergillus parasiticus*, relacionan a las EROs con la activación de factores de transcripción (YapA, AtfB, y MsnA), con activación de enzimas antioxidantes y con la producción de aflatoxinas como metabolitos secundarios, sugiriendo que el estrés oxidante propicia la producción de aflatoxinas (Hong *et al.*, 2013a).

Por otra parte, la biosíntesis de lovastatina está relacionada con las EROs, las cuales son controladas por genes reguladores del estado oxidante de la célula. Se encontró en el análisis *in silico* del promotor del gen *lovE* (regulador de la vía biosintética de lovastatina), que posee varios sitios putativos de unión de proteínas que funcionan como factores transcripcionales de respuesta a estrés oxidante, entre los cuales, se encontró un sitio de unión putativo para AtfB (Miranda *et al.* 2014), por lo que este factor transcripcional podría ser el nexo entre las EROs y los genes de biosíntesis de lovastatina. Hay pocos estudios en otras especies de *Aspergilli* en relación con ortólogos del gen *atfB*, de los cuales sólo algunos sugieren una posible relación del metabolismo secundario con el estrés oxidante, pero no existen reportes de la función del gen en *A. terreus*.

Actualmente, el mecanismo por el cual las EROs regulan la biosíntesis de lovastatina no está completamente claro. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue estudiar el nexo que existe entre las especies reactivas de oxígeno y la regulación a nivel transcripcional de la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus*. Debido a que hay algunos factores de transcripción de respuesta a estrés oxidante, que podrían ser los nexos de regulación entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina, este trabajo se enfoca en analizar la función de AtfB sobre la biosíntesis de este metabolito secundario, mediante la obtención de mutantes atenuadas en su expresión.

2. Antecedentes

2.1 Metabolismo secundario

Los metabolitos primarios son por lo general comunes para varios microorganismos, mientras que los metabolitos secundarios están limitados a algunas especies solamente. Los hongos filamentosos producen una gran variedad de metabolitos secundarios originados a partir de intermediarios del metabolismo primario y son clasificados según su precursor (Roussos & Perraud-Gaime, 1996).

Estos compuestos no tienen un papel fisiológico durante la fase de crecimiento, al contrario de los metabolitos primarios. Una característica del metabolismo secundario es que los metabolitos generalmente no son sintetizados durante la fase de crecimiento (trofofase), sino que son producidos durante una etapa de producción subsecuente (idiofase). Esta fase inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de algún nutriente clave como carbono, nitrógeno o fósforo (Barrios-González *et al.*, 2003).

Los metabolitos secundarios microbianos tienen una gran diversidad en sus estructuras químicas, sin embargo, sus rutas biosintéticas se encuentran unidas a una red más uniforme del metabolismo primario. Se ha demostrado que los metabolitos secundarios son formados mediante rutas alternas al metabolismo primario y que parten de un pequeño número de puntos de ramificación, los cuales definen las categorías de familias biosintéticas (Barrios-González *et al.*, 2003).

Aunque los antibióticos son los metabolitos secundarios mejor conocidos, existen otros metabolitos con un enorme rango de actividades biológicas, y que, por lo tanto, tiene una importancia actual o potencial para la industria (Barrios-González *et al.*, 2003).

Estudios a nivel molecular han mostrado que los genes de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios están agrupados (en clústers) en el genoma del hongo o de los actinomicetos. Además, hay estudios que indican que frecuentemente un gen regulatorio específico está incluido dentro de este conjunto de genes. La co-regulación de estos clústers puede, en parte, ser explicada por el control transcripcional coordinado de los genes biosintéticos por factores de transcripción de dominio “estrecho” o “amplio” en hongos. Los reguladores específicos de dominio estrechos, usualmente se localizan en el clúster y regulan positivamente la expresión de genes. Los factores de dominio amplio son factores transcripcionales que son importantes en la respuesta celular integrativa, a parámetros ambientales como a fuentes de C y N, temperatura, etc. Estas respuestas a las señales ambientales son transmitidas a través de factores de transcripción globales (Dedos de zinc Cys²His²) que median la señalización de carbono (*creA*), nitrógeno (*areA*) y pH (*pacC*). La regulación por factores de

transcripción de dominio amplio o estrecho asegura que las rutas de los metabolitos secundarios pueden responder a la demanda de un metabolismo celular general y la presencia de inductores de ruta específicos (Keller *et al.*, 2005).

2.1.1. Clasificación de los metabolitos secundarios de acuerdo con la familia biosintética.

Los metabolitos microbianos, muestran una enorme diversidad de estructuras químicas. Sin embargo, sus rutas biosintéticas están unidas a una red más uniforme del metabolismo primario. Se ha demostrado que estos son formados por rutas alternas al metabolismo primario y que son un número pequeño de puntos de ramificación los cuales definen una amplia categoría de familias biosintéticas (Barrios-González *et al.*, 2003.)

- I. Metabolitos derivados del ácido shikímico (aminoácidos aromáticos). Ejemplos son los alcaloides ergot y los antibióticos candicidina y cloranfenicol.
- II. Metabolitos derivados de aminoácidos. Esta familia incluye los antibióticos β -lactámicos, como penicilina, cefalosporinas y cefamicinas, así como antibióticos ciclicopéptidicos tales como la gramicidina o la ciclosporina usado como agente inmunosupresivo.
- III. Metabolitos derivados de Acetil-Co A. Incluye todos los intermediarios del ciclo de Krebs. Esta familia puede subdividirse en policétidos y terpenos. Ejemplos de este grupo, incluye al antibiótico eritromicina, el compuesto insecticida-anti parasítico avermectina, el agente antitumoral doxorubicina y la lovastatina. Un ejemplo del segundo grupo es el agente antitumoral no toxigénico taxol.
- IV. Metabolitos derivados de azúcares. Ejemplos de este grupo son la estreptomycinina y la kanamicina.

2.2 Lovastatina

En países occidentales, las enfermedades coronarias y la progresión de lesiones de arterosclerosis representan una de las causas más importantes de muerte. La cardiopatía isquémica es una enfermedad que se deriva también por la acumulación de colesterol y triglicéridos en la sangre, de acuerdo con la OMS, esta enfermedad es la principal causa de muerte a nivel mundial (WHO, 2018). Se sabe que un gran factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias es una concentración elevada de colesterol en plasma, especialmente el colesterol de baja densidad lipoproteica (LDL). En personas con un metabolismo de lípidos normal, sólo un tercio del total de

colesterol en el cuerpo proviene de la dieta, mientras que los dos tercios restantes son sintetizados directamente a partir de precursores intracelulares por varios órganos (Alberts, 1988). El objetivo, entonces, es reducir el exceso de colesterol en plasma hasta que la concentración sea consistente para el mantenimiento de las funciones normales del cuerpo.

Las estatinas se han colocado a la vanguardia como fármacos preventivos de enfermedades cardiovasculares, debido a que numerosos ensayos clínicos han demostrado que reducen la morbilidad de enfermedad coronaria y la mortalidad de pacientes en riesgo. Lo cual explica el gran éxito de las estatinas en los ámbitos médico y comercial (Barrios-González & Miranda, 2010).

Las estatinas son una clase de moléculas con estructura policétida las cuales pueden obtenerse mediante el metabolismo secundario de hongos. De todas las estatinas, la lovastatina fue el primer medicamento hipocolesterolémico en ser aprobado por la FDA de EU y en años recientes, se le ha encontrado uso como agente potencial terapéutico para el tratamiento de varios tipos de tumores (Barrios-González & Miranda, 2010).

La lovastatina es un metabolito secundario con actividad inhibitoria sobre la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, la cual cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato durante la síntesis de colesterol. Reduciendo de esta manera, los niveles de colesterol en la sangre. El compuesto HMG-CoA, puede ser metabolizado a compuestos más simples sin la necesidad de construir intermediarios lipofílicos con anillo de esterol (Manzoni & Rollini, 2002).

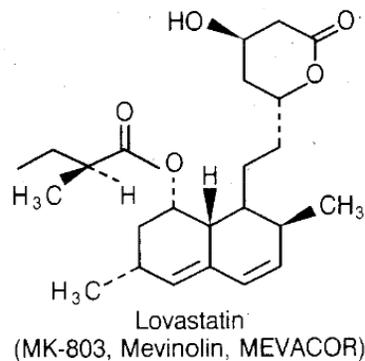


Fig. 1a Estructura química de la lovastatina (Alberts, 1988)

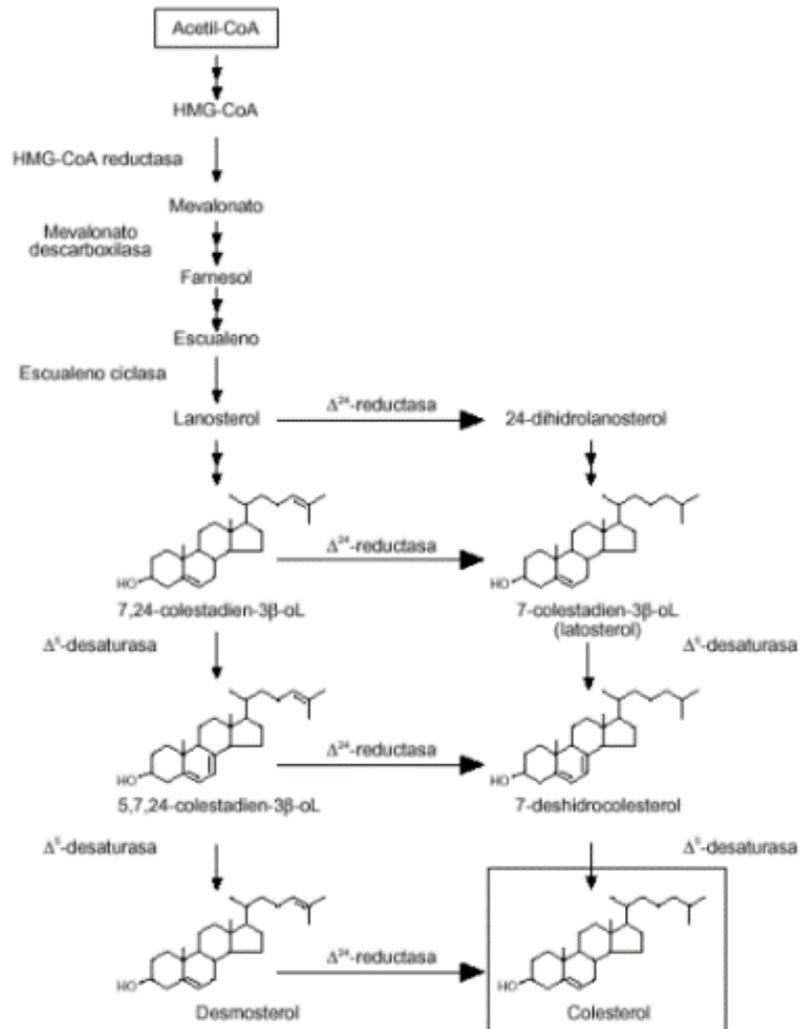


Fig. 1b Ruta biosintética de colesterol (Fernández *et al.* 2003)

Las estatinas naturales (lovastatina y pravastatina) son sintetizadas principalmente por cepas de *Aspergillus terreus* y por diferentes especies del género *Monascus*. La lovastatina, llamada también, mevinolina, fue obtenida de una cepa aislada del suelo clasificada como *Aspergillus terreus* en los laboratorios CIBE en Madrid, España (Alberts, 1988).

Estudios en *Monascus ruber*, *Paecilomyces viridis* y *Aspergillus terreus* sobre la ruta que involucra la síntesis de lovastatina, han demostrado que la ruta es iniciada a partir de unidades de acetato. La monacolina L, que es sintetizada a partir de nueve moléculas de acetato, es convertida luego a monacolina J mediante una hidroxilación, para posteriormente convertirse en lovastatina. La ruta

biosintética de la lovastatina está compuesta por la formación de dos cadenas de policétidos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas por la policétido sintasa.

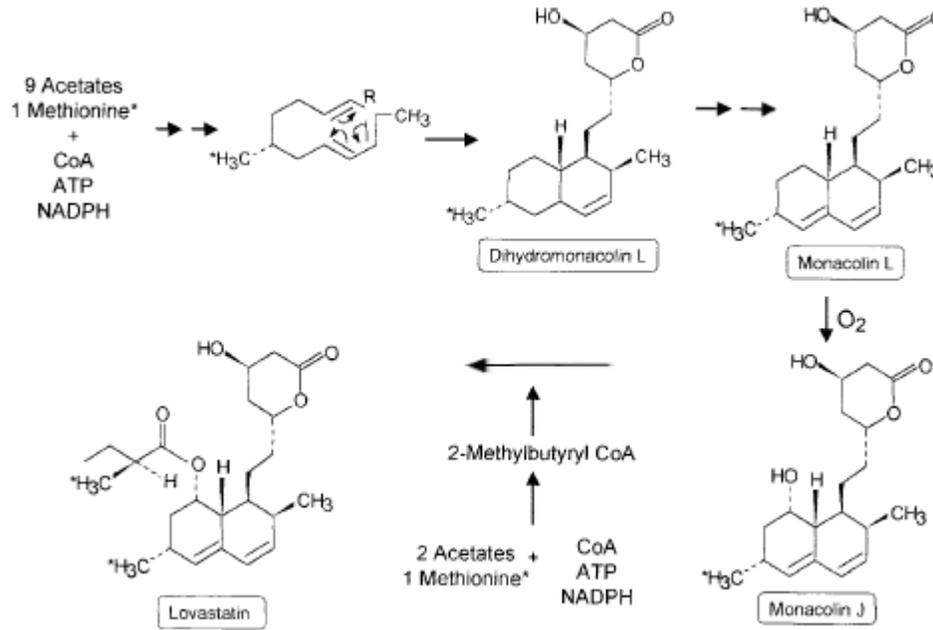


Fig. 2 Ruta biosintética de la lovastatina por *Aspergillus terreus* (Manzoni y Rollini, 2002)

El clúster de genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos de lectura abiertos (open reading frames u ORFs), dos de los cuales codifican para proteínas reguladoras, *lovE* y *lovH*; para la biosíntesis de policétidos son *lovB* y *lovF*; *lovC* codifica para la enoil reductasa; *lovD* para la transesterasa; *ORF2* y *ORF17* genes del citocromo P-450; *ORF1* y *ORF10* genes potenciales de resistencia; *ORF12* y *ORF16* genes de transporte; *lovG*, *ORF12*, *ORF15* y *ORF18* función desconocida).

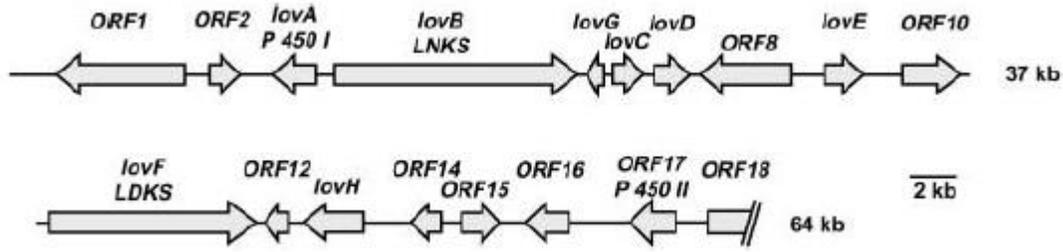


Fig. 3 Clúster de genes biosintéticos de la lovastatina (Manzoni y Rollini, 2002).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante FL usando mutantes sobre productoras de *Aspergillus terreus*, sin embargo, la FS recientemente ha emergido como una potente tecnología para producir concentraciones más altas de enzimas y metabolitos secundarios (Baños *et al.*, 2009).

La producción por la cepa de *A. terreus* ATCC 20542, el productor original de lovastatina, en FL fue incrementado hasta alcanzar 7-8 g/L, utilizando procedimientos de mutagénesis (Manzoni & Rollini, 2002).

Baños *et al.* (2009) diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial (poliuretano de alta densidad) en donde se encontró que la producción fue dos veces mayor que la producción del sistema conocido de FS sobre bagazo de caña. Además de que el rendimiento de lovastatina, usando como soporte poliuretano de alta densidad, fue 30 veces más alto que el de la FL, y la biomasa fue casi 15 veces más productiva. Por otra parte, empleando este sistema, se permite el uso del líquido del cultivo absorbido, haciéndolo un sistema limpio y comparable que facilita su estudio.

Debido a la alta producción de lovastatina en estos estudios, después este grupo investigó acerca de los estímulos ambientales específicos en la FS. Se encontró recientemente que el contacto directo con el aire es un estímulo muy importante el cual induce la alta producción. Considerando lo anterior, este efecto estimulante podría ser mediante el estrés oxidante a través de un aumento en la formación de EROs (Miranda *et al.*, 2014).

En nuestro grupo de investigación se desarrolló un proceso de alta producción de lovastatina por un sistema novedoso de FS en espuma de poliuretano, donde la producción es 30 veces más alta que en FL, de manera que además de tener potencial industrial, es un ejemplo claro de que la fisiología en medio sólido es diferente a la del medio líquido (Baños *et al.*, 2005). Es importante entender este fenómeno a nivel molecular, bioquímico y fisiológico, pues además de su interés científico, esto permitirá en un futuro, diseñar mejores sistemas de producción de lovastatina (y de otros metabolitos secundarios) y sistemas racionales para construir cepas mejoradas genéticamente.

2.3 Fermentación en medio sólido (FS)

Cultivo microbiano que se desarrolla sobre la superficie y en el interior de una matriz sólida, en ausencia de agua libre (Pandey *et al.*, 2001). La fermentación en estado sólido (FS), es un sistema de cultivo microbiano que ha sido usado en muchos países orientales desde la antigüedad, para preparar una diversidad de alimentos fermentados derivados de granos y semillas de arroz (Lonsane *et al.*, 1985). En los últimos 20 años diferentes sistemas de FS han sido desarrollados, estos trabajan en el diseño del desarrollo del cultivo microbiano, en los soportes utilizados y en la ausencia de agua libre presente en el sistema (Baños *et al.*, 2005).

2.3.1 Fermentación sólida en soportes inertes

Estos sistemas involucran el cultivo de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con medio líquido. En la FS, el soporte inerte sirve solamente como un reservorio de nutrientes (en una fase líquida), pero también como un punto de anclaje para los microorganismos (Oojkaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005). Las características del soporte pueden convertirse en desventajas para el sistema de producción, y pueden superarse empleando soportes inertes, permitiendo mejorar el control de la transferencia de calor y masa. Una ventaja de este tipo de sistema es que hace menos complicado la recuperación del producto. Los productos extra o hasta intracelulares, pueden ser extraídos más fácilmente del soporte inerte, ya que estos pueden ser obtenidos con menos impurezas. Quizás la ventaja más importante de este sistema es que facilita los estudios básicos, ya que la composición del medio puede ser diseñada con precisión. En esta forma, puede probarse un medio definido y el efecto de diferentes compuestos. Además, el medio líquido puede extraerse del soporte inerte en cualquier tiempo del cultivo y analizar sus componentes. El sistema permite el diseño de un medio de producción adecuado, y es más fácil de desarrollar los balances de masa para modelar procesos más avanzados y controlarlos, ya que se conocen las concentraciones de todos los nutrientes en el medio de producción (Oojkaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2006).

En relación con los metabolitos secundarios de producción por la FS, una clara diferencia con la FL es el mayor rendimiento, a menudo en periodos más cortos. Además, a veces el metabolito se produce sólo en FS, a pesar de que el organismo también muestra un buen crecimiento en FL (Barrios-

González, 2012). Por ejemplo, en FS en salvado de trigo por *Aspergillus oryzae* se han obtenido rendimientos 500 veces mayores de proteína heteróloga (quimosina) que en FL, además que se observó que este sistema tiene ventajas que permite la reducción de problemas debidos a procesos posteriores durante la extracción del producto (Barrios-González 2012).

Baños *et al.* (2010), diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakaacs *et al.* 1998). La producción con esta cepa, en FL con exactamente el mismo medio de cultivo, fue solamente de 0.62 mg/mL. Esta cepa también fue probada en FS sobre bagazo de caña impregnado con el mismo medio líquido, y la producción final fue de 8.61 mg/g. Estos estudios muestran que la producción de lovastatina obtenida en el sistema en FS fue más alta que en cualquier sistema de FS o FL reportado (Baños *et al.* 2010).

Estudios desarrollados en nuestro grupo de trabajo (Barrios-González *et al.* 2008) al producir lovastatina utilizando *A. terreus*, revelaron que en FS los genes de la vía (relacionados con la biosíntesis de lovastatina) se expresan más intensamente en este sistema sólido en comparación con la FL. Esto sugiere que en FS, el hongo recibe señales que le indican que está en un medio sólido y que generan una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferente (de medio sólido); y que una de sus características es la alta capacidad de producción de lovastatina.

Actualmente, la fisiología de la FS se encuentra en proceso de ser caracterizada, aunque se han realizado importantes avances en los últimos años. Estos avances demuestran mayores productividades y menos predisposición a problemas con la inhibición de sustrato. Además, hay muchos casos en que las enzimas producidas en FS difieren de las producidas en FL, y que las cepas silvestres o mutantes seleccionadas para los procesos de FS son diferentes a las seleccionadas para los procesos de FL. Es decir, muy rara vez son cepas eficientes en ambos sistemas. Sin embargo, pocos trabajos han estudiado las diferencias fisiológicas que surgen durante el crecimiento de células microbianas en los dos tipos de sistemas de cultivo (Barrios-González, 2012).

2.3.2 Estímulos del medio sólido.

Se han desarrollado estudios que indicaron que existen ciertos estímulos ambientales que hacen notar al hongo que se encuentra en medio sólido. Estos estímulos deben ser detectados y entonces traducidos,

disparando un número de eventos a nivel molecular, que a su vez generan una respuesta y con esto se desencadena la fisiología del medio sólido (Barrios-González 2012).

Ávila-Cisneros (2009) desarrolló estudios fisiológicos diseñados para evaluar la contribución de diferentes estímulos a la fisiología del medio sólido. Se identificaron al contacto con el aire como un estímulo muy importante, seguido por el estímulo del soporte, y un menor efecto de la baja actividad de agua y alta concentración de nutrientes. Estos hechos sugieren que el hongo recibe señales que indican que está en uno u otro sistema de cultivo y que esto hace generar una expresión diferencial de genes que dan como resultado una fisiología diferencial.

2.4 Estrés oxidante

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación (reducción). Esta oxidación es fundamental para la vida, debido a que participa en los procesos de obtención de la energía celular. Sin embargo, cuando existe una mayor producción de radicales libres que sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, aparece el estrés oxidante que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro (Elejalde Guerra, 2001).

Se denomina estrés oxidante a aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a afectar el estado redox celular. En los sistemas biológicos los elementos prooxidantes provienen en su mayoría del O_2 , por lo que son denominados genéricamente especies reactivas de oxígeno (EROs). El desbalance entre la generación de ERO y los sistemas de defensas antioxidantes conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica (ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos) (Martínez Sánchez, 2005). Las EROs como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) son generadas como subproductos metabólicos del crecimiento aerobio y en contraste, se ha encontrado evidencia de que las EROs participan en funciones vitales de señalización para diversos procesos celulares. En hongos, estudios han evaluado el rol que juegan las EROs en los procesos de diferenciación; por ejemplo, se ha encontrado un desbalance redox provocado por una elevación en el nivel de EROs en el inicio de la transición de conidio a hifa aérea en *N. crassa* (Aguirre *et al.* 2005; Aguirre *et al.* 2006). Además de la relación entre el metabolismo secundario y las EROs, la cual es una elevación en la concentración de ellas

(justo al iniciarse la biosíntesis de lovastatina) que se mantiene durante toda la idiofase (Miranda, 2013)

Las EROs se generan endógenamente en las células, por múltiples procesos en la célula, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la β -oxidación de ácidos grasos, o al exponer las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. A pesar de las condiciones prooxidantes de la vida aeróbica y de los distintos ataques ambientales, los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido.

Debido a que la producción de EROs ocurre espontáneamente en los organismos aerobios, se hace necesario la presencia de un sistema de defensa que contrarreste los efectos oxidantes de estas especies. Dentro de los agentes antioxidantes de alto peso molecular se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRs), peroxirredoxinas (Prxs) entre otras (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006).

Sin embargo, si la concentración de las EROs sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidante (EOX). Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del O_2 , daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular. Dado que una elevación de las EROs puede pasar rápidamente, las rutas de respuesta de los hongos deben ser igualmente rápidas, la célula debe ser capaz de detectar el balance redox alterado, modular la actividad de reguladores transcripcionales apropiados, y entonces inducir la expresión de genes diana relevantes (Moye-Rowley, 2003).

2.5 Estrés osmótico

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular; la proliferación celular se reanuda después de un período de aclimatación, el cual varía dependiendo de un número de factores, como pueden ser el tipo y la severidad del estrés, del estado de

crecimiento, entre otros (Blomberg *et al*, 2000). Al mismo tiempo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además, se induce la expresión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Rep *et al*, 1999). Dichos mecanismos se detallan a continuación.

Vía de HOG MAP kinasa: La vía HOG (High Osmolarity Glicerol), se activa principalmente bajo condiciones de estrés hiperosmótico y regula la transcripción de genes, muchos de los cuales a su vez se inducen por la vía general de respuesta a estrés. La vía HOG es una de las vías de MAP kinasas (proteín kinasas activadas por mitógenos) mejor caracterizadas. Las MAP kinasas son unidades de señalización altamente conservadas en eucariontes, donde juegan un papel esencial en la respuesta a factores ambientales, hormonas, factores de crecimiento o citocinesis. Estas vías controlan el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación y muchas de las vías de respuesta a estrés. En cualquiera de estas vías de señalización hay tres MAP kinasas secuenciales y esenciales, una MAP kinasa-kinasa-kinasa (MAPKKK o MEKK), una MAP kinasa-kinasa (MAPKK o MEK) y una MAP kinasa (MAPK). La MAPKKK fosforila y activa a la MAPKK que, subsecuentemente, fosforila y activa a la MAPK; normalmente esta última fosforilación lleva a la MAPK hacia el núcleo, donde fosforila a sus blancos (Hohmann *et al*, 2003).

Síntesis y acumulación de Glicerol: La vía de HOG regula la síntesis de glicerol, el cual forma parte de un grupo de moléculas conocidas como “osmolitos compatibles”. Estos compuestos se acumulan en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación causada por el estrés hiperosmótico y tienen la característica de acumularse en grandes cantidades sin afectar el funcionamiento de la célula. Existe una gran variedad de osmolitos compatibles utilizados por los organismos: iones, azúcares, polioles de estos azúcares, así como aminoácidos y sus derivados (Yancey *et al*, 1982). El glicerol puede ser utilizado como fuente de carbono y energía, así como para proteger a la célula contra altas temperaturas, estrés oxidante y estrés hiperosmótico. El glicerol es un alcohol poli hídrico que se sintetiza a partir de fosfato de dihidroxiacetona, un intermediario de la glucólisis (Baños, 2010)

2.6 Metabolismo secundario y estrés oxidante

La biosíntesis de aflatoxinas es un modelo de metabolismo secundario es inducido por la acumulación de EROs (Roze *et al.*, 2011). Varios estudios con *Aspergillus parasiticus*, relacionan a la formación de EROs con la activación de factores de transcripción (YapA, AtfB, y MsnA), activación de enzimas antioxidantes y la producción de aflatoxinas como metabolitos secundarios, sugiriendo que el estrés oxidante propicia la producción de aflatoxinas (Hong *et al.*, 2013a). Se han logrado también, identificar varios factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al estrés oxidante (Yap1, AtfB y Nap1(AnYap1)) que, en algunos casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés, entre ellos los factores transcripcionales tipo bZIP, los que unen a cobre y con dedos de zinc.

En estudios realizados por Miranda *et al.*, (2013) en donde se analizó la generación de EROs y el estado oxidante de la célula, se encontró que la acumulación de EROs coincide con el inicio de la producción de lovastatina es decir las EROs contribuyen en la señalización para iniciar la idiofase en fermentación sólida y líquida. Por otra parte, se encontraron diferencias entre la FS y FL en los niveles de EROs, mientras que en la FL los niveles altos y poco controlados, en la FS, la acumulación de EROs fue menor respecto a FL, pero mucho más estable a lo largo de la idiofase. Estas diferencias fisiológicas podrían estar asociadas a la alta producción de lovastatina en FS (Miranda *et al.*, 2013).

La importancia de relación entre la acumulación de EROs y la producción de lovastatina se determinó empleando el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) que redujo los niveles de EROs, resultando así la disminución de la biosíntesis de lovastatina, esto en consecuencia de una disminución en el nivel de transcritos de los genes de la vía por efecto del antioxidante (Miranda, *et al.*, 2014).

2.7 Respuesta celular al estrés oxidante

Para hacer frente a situaciones desfavorables de estrés, se necesita una rápida señalización de un nuevo ambiente estresante, sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Debido a que una elevación de las EROs puede pasar rápidamente, las rutas de respuesta de los hongos deben ser igualmente rápidas, la célula debe ser capaz de detectar el balance redox alterado, modular la actividad de reguladores transcripcionales apropiados, y entonces inducir la expresión de los productos génicos requeridos para amortiguar la elevación letal de las EROs (Miranda, 2013).

Estas rutas de señalización conservadas se incorporan a un módulo sistemático de fosforilación multietapa (un análogo del sistema de dos componentes en bacterias), el cual transmite la señal al módulo de la ruta de estrés por la activación de la proteína kinasa (SAPK/MAPK), y estos modulan la actividad de la formación de factores transcripcionales específicos relacionados con el estrés oxidante/osmótico (Bibián-León, 2015).

2.7.1 Factores transcripcionales en respuesta a EROs.

Se han logrado identificar varios factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al estrés oxidante que, en algunos casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés, entre ellos los factores transcripcionales tipo bZIP, los que unen a cobre y con dedos de zinc. En las especies de *Aspergillus* por lo menos existen tres vías de señalización que están implicadas en la dirección de la respuesta transcripcional a estrés oxidante: a) proteína kinasa (MAPK), b) SrrA (Skn7 en la levadura) y c) Yap1. Este último es un factor de transcripción que actúa como un sensor redox que se podría activar directamente por el aumento de niveles de EROs (Pérez, 2014)

En la biosíntesis de aflatoxinas se ha demostrado que se detona e intensifica por el desarrollo de especies reactivas de oxígeno (Hong *et al.*, 2013b) En hongos filamentosos la modulación de bZIPs (Yap1, AtfA, AtfB, FlbB, JlbA, MeaB, NapA, y RsmA) participa en la respuesta al estrés oxidante. Por ejemplo, Apyap-1, miembro de la familia Yap1, fue asociado con la formación de conidiósporas y la biosíntesis de aflatoxinas susceptible al estrés oxidante (Roze *et al.*, 2011). El complejo Hap y AtfB representan unos fuertes candidatos para jugar un papel en el mecanismo que inicia la transcripción de los genes *fas1* y *fas2*, y que coordina su expresión con la transcripción de otros genes en el cluster de biosíntesis de aflatoxinas como parte de la respuesta al estrés oxidante (Hong *et al.*, 2013a)

Al igual que en el modelo de aflatoxinas, Miranda *et al.*, (2014) también encontraron que factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, como Skn7, Yap1 y Msn2/4, y otros incluyendo Hsf1, poseen sitios putativos de unión a los promotores de los genes *lovE* y *lovF*.

Dentro del género *Aspergillus*, ortólogos de Yap1 se identificaron en *A. nidulans*, *A. fumigatus* y *A. parasiticus*. En *A. nidulans*, se reportó que NapA juega un papel importante en la defensa celular contra el estrés oxidante como peróxido de hidrogeno y radicales superóxido. Se encontró que NapA es un factor de transcripción que podría activar genes de defensa contra el estrés oxidante como *catB* (catalasa de micelio), *trxB* (tioredoxina reductasa), *thiO* (tioredoxina) y *glrA* (glutación reductasa) en respuesta a peróxido de hidrógeno (Menke *et al.*, 2013). Una sobreexpresión de *napA* resultó en una mayor tolerancia al estrés oxidante y a su vez, disminuyó la producción de metabolitos secundarios en *A. nidulans*, incluyendo esterigmatocistina, entre otros (Hong & Linz, 2008). La delección de *ApypA*, un ortólogo de YAP1 en *A. parasiticus*, ocasiona una susceptibilidad a oxidantes extracelulares, acumulación precoz de EROs y aflatoxinas, y una conidiación prematura comparada con la cepa silvestre (Lee *et al.*, 2002). Además, esta cepa produjo más hidroperóxidos y aflatoxinas en semillas de maíz en comparación con la cepa silvestre, lo cual podría sugerir una relación entre el estrés oxidante y la biosíntesis de aflatoxinas (Lee *et al.*, 2004). Similar a lo anterior, la interrupción de *Aoyap1* en *A. ochraceus* incrementó la producción de ocratoxina y una formación más alta de EROs (Reverberi *et al.*, 2012).

Recientemente, una cepa silenciada de *yap1* en *A. terreus* se caracterizó, las principales diferencias fueron el adelanto e incremento en la acumulación de EROs, así como también el adelanto e incremento en la biosíntesis de lovastatina. Se igualaron las EROs de la cepa parental con la transformante *siyap1*, a través del uso de un antioxidante exógeno, y la biosíntesis de lovastatina también se redujo al mismo nivel que el de la cepa silvestre, mientras que *siyap1* sin antioxidantes muestra mayores niveles de lovastatina, característicos del silenciamiento y con un adelanto. Por lo tanto, el silenciamiento de *yap1* incrementó las EROs y éstas fueron las responsables del aumento y adelanto de la biosíntesis de lovastatina; lo que demuestra que el gen *yap1* no es un regulador negativo de la biosíntesis de lovastatina (Pérez-Sánchez *et al.*, manuscrito en preparación).

En un modelo de regulación de la producción de aflatoxinas por EROs, el grupo de Linz estableció un mapa que describe la activación de diversos factores transcripcionales mediante la señalización por EROs. Algunos de estos factores de transcripción se unen en los promotores de genes de antioxidantes y de biosíntesis de aflatoxinas, como se muestra en la siguiente figura. Las EROs que

activan los genes de defensa antioxidante podrían tener una doble función al inducir la activación de genes del metabolismo secundario.

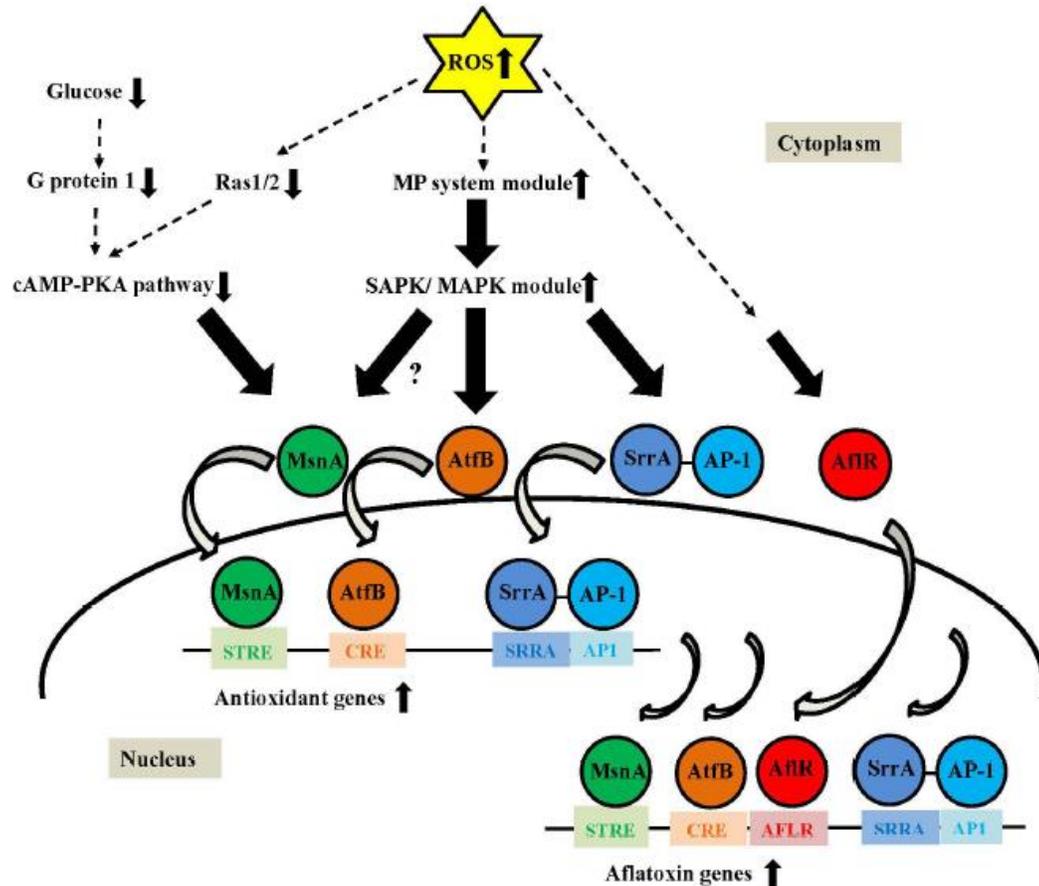


Fig. 4 Modelo de activación transcripcional de defensa antioxidante y metabolismo secundario en biosíntesis de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus* (Hong *et al.*, 2013a)

Por otra parte, Miranda *et al.*, (2013) identificaron sitios putativos de unión en el promotor del gen *lovE* de biosíntesis de lovastatina para diversos factores de transcripción. Nótese que, en su mayoría, son factores transcripcionales que responden al estrés oxidante (Skn7, Nrf2, Msn2/4, AtfB, Ap-1, Atf2 y NF-kB) y algunos más que responden a estrés nutricional (CreA, Adr1, Rpn4). Algunos sitios de unión se encontraron sobre la cadena principal (+) y algunos otros en la cadena antisentido (-).

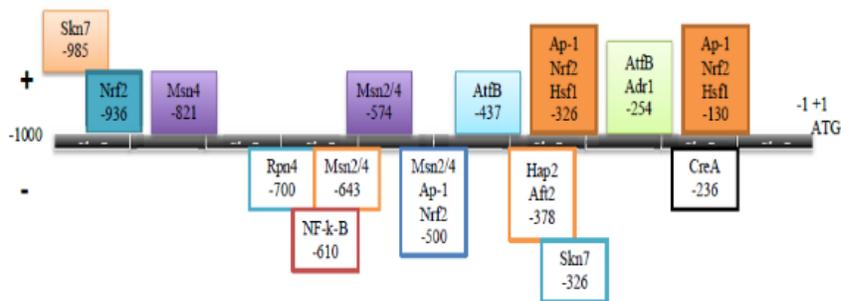


Fig. 5 Posibles sitios de unión de factores transcripcionales que responden a diferentes tipos de estímulos en el promotor del gen regulador del clúster biosintético de lovastatina *lovE* (Miranda *et al.*, 2013).

2.7.2 EROs regulan la biosíntesis de lovastatina.

El estudio de la relación del estrés oxidante y la biosíntesis de lovastatina inició con los resultados obtenidos por Baños *et al.*, (2007) donde *A. terreus* fue mutada y una cepa resistente a EOX, fue elegida por métodos de selección racional. La nueva mutante, fue cultivada en el sistema con el soporte artificial, presentando un aumento del 62% en la producción de lovastatina. Estos resultados indicaban que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* podría estar relacionada con su capacidad de contender contra el EOX, ya que se encontró que las mutantes aisladas y resistentes a este tipo de estrés, eran sobre productoras de lovastatina en FS, mas no en FL

Posteriormente, Miranda *et al.*, (2013) encontraron un incremento importante en la concentración de las EROs durante la idiofase en la producción de lovastatina en FL y FS, sugiriendo una conexión entre las EROs y la biosíntesis de lovastatina.

Como seguimiento de este trabajo, Miranda *et al.*, (2014) estudiaron la contribución de las EROs en la regulación de la biosíntesis de lovastatina. Se estudió por medio de la adición de un antioxidante (N-Acetil-L-Cisteína, NAC) a la FL y FS En FS la adición de 100 mM de antioxidante NAC a las fermentaciones de lovastatina, provocó un decremento en la acumulación de las EROs de 53% junto con una disminución de la producción de lovastatina del 79%, una situación similar se observó en FL Además, encontraron que el decremento de la producción de lovastatina fue debido a una disminución en la expresión del gen *lovE*, pero también del gen *lovF*. Además de abatir las EROs con el NAC, estimularon su acumulación en FL y FS por medio de la adición de peróxido de hidrógeno,

encontrando un adelanto en la producción de lovastatina debida a un adelanto de la expresión de *lovE* y *lovF*.

Los resultados obtenidos por Miranda *et al.*, (2014) fueron contundentes: las EROs están regulando la biosíntesis de lovastatina a nivel transcripcional. Al igual que en el modelo de aflatoxinas, Miranda *et al.*, (2014) también encontraron que existen sitios putativos de unión en los promotores de los genes *lovE* y *lovF* para factores de transcripción en respuesta a estrés oxidante, como Skn7, Yap1 y Msn2/4, y otros incluyendo AtfB.

2.8 Silenciamiento génico

El silenciamiento de genes mediante ARN es un sistema que está descrito en diferentes clases de organismos eucariotas, hongos como *N. crassa* (Romano y Macino, 1992), *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* (Nakayashiki, 2005). Es un mecanismo regulador de la expresión que suprime, a nivel transcripcional y/o a nivel traduccional la expresión de un gen de acuerdo con la especificidad de la secuencia. Andrew Z. Fire y Craig C. Mello recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2006 por sus trabajos con RNAi para analizar la regulación de la expresión génica en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

Actualmente, el mecanismo común descrito parte del estudio del ARN producido por los transgenes o transposones. Estos tipos de ARN son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento propia de la célula, desencadenando la respuesta. Inicialmente, una ARN-polimerasa dependiente de ARN es la enzima que reconoce estos ARN y los convierte en ARN bicatenarios. Estos ARN son procesados por una endonucleasa del tipo ARNasa III (Dicer), en una reacción dependiente de ATP. En seguida, se generan moléculas bicatenarias cortas del ARN procesado, denominadas ARN de interferencia (RNAi). Estas contienen la cadena sentido y la antisentido de la molécula bicatenaria original y suelen tener entre 21 y 25 nucleótidos, aunque presentan una longitud variable según el organismo. Estos ARNs cortos se incorporan en un complejo de ARNasa multicomponente denominado RNA-inducing silencing complex (RISC) y sirven como moléculas “guía” las cuales conducen a la degradación endonucleolítica del ARNm diana (Agarwal *et al.*, 2003).

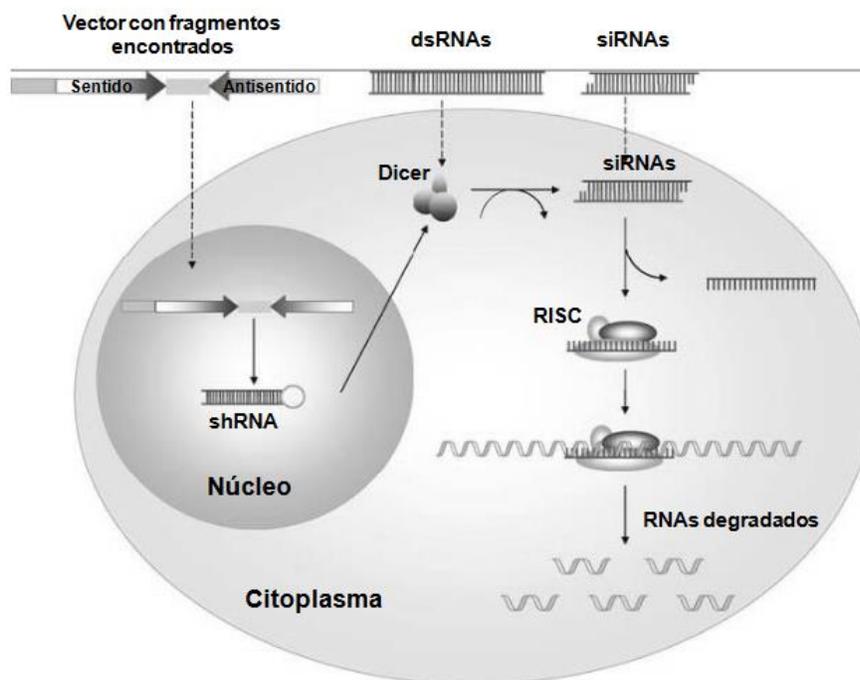


Fig. 6 Esquema general del proceso de silenciamiento mediado por RNAi (Agarwal *et al.*, 2003).

2.9 AtfB

AtfB es un miembro de la familia CREB/ATF que se une a sitios de CRE y que codifica un factor de transcripción bZIP perteneciente a la familia de proteínas de unión a sitios CRE dependiente de cAMP. Sakamoto *et al.*, (2009) predijeron los sitios putativos de unión (5'-TGACGTCA-3') de AtfB en los promotores de los genes que pudieran estar regulados por este factor de transcripción en *Aspergillus oryzae* usando el programa MEME. La mayoría de las proteínas pertenecientes a la familia ATF/CREB se unen a la secuencia consenso de los motivos CRE (5'-T(G/T)ACGT(C/A)A-3'), porque todos los genes BUP (*atfB*-upregulated) de *A. oryzae* tienen sitios CRE en sus promotores, estos genes son candidatos para la regulación directa por AtfB (Sakamoto *et al.*, 2008). En el modelo de aflatoxinas, AtfB tiene sitios de unión en los promotores de los genes de defensa antioxidante, así como también, en los promotores de los genes de biosíntesis de aflatoxinas (Hong *et al.*, 2013b). En nuestro grupo de investigación, anteriormente se identificaron sitios putativos para la unión de diversos factores transcripcionales en el promotor del gen *lovE*, el cual regula la biosíntesis de

lovastatina a nivel transcripcional. Los sitios de unión para AtfB fueron en las posiciones -237 y -254 sobre la cadena principal. (Miranda *et al.*, 2013)

Sakamoto *et al.* (2008) identificaron al gen *atfB* de *Aspergillus oryzae* como un gen con expresión baja en la etapa temprana de crecimiento, pero que incrementaba gradualmente a través de la fase de conidiación en cultivo en estado sólido. La delección del gen *atfB* de *A. oryzae* dio como resultado una disminución en el nivel de ARNm de varios genes normalmente regulados positivamente durante el crecimiento en un medio sólido, incluido el gen de catalasa *catA*. Además, el mutante de *atfB* presentó una ligera disminución en la conidiación y produjo conidios que germinaron normalmente pero que eran sensibles a altas concentraciones de H₂O₂ (> 250 mM). Por otra parte, los conidios en la cepa Δ *atfB* tenían menos acumulación de trehalosa que los de la cepa silvestre (Sakamoto *et al.*, 2008). Se ha demostrado en otros estudios que la trehalosa es importante para la tolerancia al estrés abiótico en los conidios (Fillinger *et al.*, 2001).

Sakamoto *et al.* (2009) encontraron que en *A. oryzae*, la mayoría de los genes regulados por AtfA son regulados por AtfB, pero algunos genes regulados por AtfA no requieren a AtfB, incluyendo algunos genes putativos involucrados en la resistencia al estrés oxidante. AtfB tiene una regulación positiva en otros genes, incluyendo *catA* (catalasa específica de conidios), en la fase tardía en cultivo sólido en la cual *A. oryzae* produce conidios vigorosamente.

En *Aspergillus parasiticus*, AtfB se une a los promotores de siete genes en el clúster de biosíntesis de aflatoxinas y de genes involucrados en la respuesta a estrés que tengan sitios CRE (Roze *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2013b). Estos genes contienen un motivo conservado AAGCC. Bajo condiciones de biosíntesis de aflatoxinas se sugiere a AtfB como un regulador positivo en la expresión de los genes de aflatoxinas. Un ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA) confirmó que AtfB es parte de un complejo de proteínas que se une al promotor de *nor-1* en el clúster de aflatoxinas, y que CRE1 (represión catabólica) junto con un sitio AP-1 (Yap1) son necesarios para la unión. Se sugirió que AtfB podría formar un heterodímero con AP-1 (otro factor de transcripción asociado a la tolerancia al estrés en conidios). Ellos proponen que AtfB pudiera ser una clave en el circuito regulatorio que integra al metabolismo secundario y la respuesta celular al estrés oxidante debido a que bajo condiciones de biosíntesis de aflatoxinas se sugiere a AtfB como un regulador positivo en la expresión de los genes de aflatoxinas producidas en caja de Petri (Roze *et al.*, 2011).

En estudios de Wee *et al.* (2017) se indica que AtfB podría ser un regulador en la biosíntesis de aflatoxinas, la respuesta al estrés oxidante y en el desarrollo de conidiósporas en *A. parasiticus*. El silenciamiento de *atfB* mostró una disminución en la producción de aflatoxinas y un desarrollo de conidiósporas dañado.

En el modelo propuesto por Hong *et al.* (2013a), se indica que altos niveles de EROs intracelulares en hongos podrían regular negativamente la vía de señalización cAMP-PKA. Al mismo tiempo, las EROs regularían positivamente la cascada de señalización de SAPK/MAPK a través del sistema de fosforilación multipaso. De esta manera la activación de la cascada de SAPK/MAPK promueve la unión de AtfB y SrrA a los sitios correspondientes de CRE, SRRA y API en los promotores de los genes de biosíntesis de antioxidantes para su inducción.

En el trabajo realizado por Hagiwara *et al.* (2009) en donde se estudia la relación entre AtfA y la respuesta al estrés osmótico y al tratamiento con fungicida en *Aspergillus nidulans*, se encontró una proteína putativa AtfB, que contiene un dominio de cierre de leucina básico con 47% de identidad a AtfB de *A. oryzae* y 42% a AtfA de *A. nidulans*. En contraste con *A. oryzae*, en donde la expresión de *atfB* fue incrementando gradualmente durante la fase de crecimiento mientras que la de *atfA* fue constante (Sakamoto *et al.*, 2008), la expresión de ambos factores de *A. nidulans*, incrementa de manera similar durante el desarrollo asexual, en la respuesta al estrés osmótico y al tratamiento con fludioxonil. Estas similitudes sugieren que el patrón de expresión de AtfA y AtfB podría deberse a la cascada de señalización de la vía MAP kinasas por estrés osmótico, y de esta manera podrían formar complejos de regulación de los genes implicados en las respuestas al estrés osmótico y al tratamiento con el fungicida (Hagiwara *et al.*, 2009).

En *Aspergillus fumigatus* la interrupción de *atfB* mostró una disminución en la virulencia en un modelo de aspergilosis invasiva pulmonar. La ausencia de AtfA o AtfB no sólo incrementaron la sensibilidad a estrés osmótico y oxidante, sino que también a agentes de daño a la pared celular. Por lo tanto, Pereira *et al.* proponen que MpkC/SakA son activadores de AtfA y posiblemente de AtfB como factores de transcripción en diferentes tipos de estrés (Pereira *et al.*, 2017).

En *Aspergillus terreus*, no se encuentra una proteína denominada como AtfB en NCBI, por lo cual el primer objetivo de esta tesis fue identificar al gen en el genoma de la cepa disponible. Al mismo tiempo, no existen estudios de la proteína ni del gen en esta especie del género *Aspergillus*.

3. Justificación

Recientemente se ha encontrado mayor evidencia de que el metabolismo secundario, en hongos filamentosos, está asociado con el estrés oxidante. Se sugiere que la producción de aflatoxinas correlaciona en forma positiva con un estado oxidante, es decir, que podría detonarse e intensificarse por el desarrollo de EROs (Hong *et al.*, 2013a).

En nuestro grupo de trabajo también se han encontrado resultados similares con la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus*. Baños *et al.*, (2007) demostraron que el estrés oxidante en medio sólido tiene un papel importante sobre la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Los autores aislaron mutantes resistentes a este tipo de estrés, encontrando que un alto porcentaje de éstas eran sobre productoras de lovastatina en FS. Posteriormente, Miranda *et al.* (2013) encontraron una acumulación de EROs al inicio de la idiofase, en FS y FL, sugiriendo una posible regulación de la biosíntesis por las EROs. Finalmente, se demostró que la producción de lovastatina está regulada por las EROs a nivel transcripcional. Esto lo lograron, incrementando o abatiendo a las EROs, por medio de la adición de peróxido de hidrógeno o antioxidantes. El resultado fue contundente, la producción de lovastatina disminuía en presencia del antioxidante y se adelantaba en presencia de peróxido de hidrógeno en trofofase. Los genes de biosíntesis de lovastatina (*lovE* y *lovF*) disminuyeron su expresión en presencia del antioxidante y la incrementaron en presencia de prooxidantes. Por lo tanto, se concluyó, que las EROs regulan positivamente la biosíntesis de lovastatina (Miranda *et al.*, 2014).

Debido al papel que juegan las EROs en la fisiología de los organismos como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales y los antecedentes de ortólogos del gen *atfB* en otras especies, el presente proyecto se planteó investigar el papel de *AtfB* en la regulación por EROs. Para lograrlo, se buscó silenciar el gen. Un interés adicional será que existen pocos reportes de silenciamiento en hongos, ninguno sobre el silenciamiento en *Aspergillus terreus*.

Con estos resultados se obtendrá una visión más amplia, de la regulación del metabolismo secundario. Adicionalmente, se podrá ampliar el conocimiento sobre las diferencias moleculares de la fisiología del medio sólido en relación con la fisiología en medio líquido.

4. Hipótesis

El factor transcripcional AtfB está implicado en la regulación de la biosíntesis de lovastatina, como un regulador positivo, por lo que las cepas silenciadas presentarán una disminución en la producción de lovastatina en fermentación sólida y líquida, sin que se presenten cambios en la acumulación de especies reactivas de oxígeno en comparación con la cepa parental, indicando que AtfB es un nexo entre el estrés oxidante y el metabolismo secundario.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el posible papel regulatorio del gen *atfB* como nexo de las Especies Reactivas de Oxígeno y la biosíntesis de lovastatina, en fermentación líquida y sólida por *Aspergillus terreus*.

5.2 Objetivos particulares

- 1.1.1. Identificar y clonar el gen *atfB* en *Aspergillus terreus* TUBF-514.
- 1.1.2. Diseñar y construir el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*AtatfB* y obtener las transformantes de *A. terreus*.
- 1.1.3. Realizar una caracterización de las transformantes en: producción, acumulación de EROs, crecimiento, esporulación y resistencia a estrés (oxidante y osmótico).
- 1.1.4. Evaluar la producción de lovastatina y niveles de las EROs de las cepas mutantes en fermentación sólida y líquida.

6. Materiales y métodos

6.1 Equipos

- Balanza analítica Explorer OHAUS
- Balanza granataria ADP
- Cámaras de electroforesis: Mini-Sub Cell GT, BIO-RAD.
- Centrífuga refrigerada PrO-Research By Centurion Scientific Ltd.
- Gel DOC EZ Imager BIO-RAD
- HPLC WatersTM 600.
- Incubadora SI-600R
- Microcentrifuga 5415 C, Eppendorf
- Microcentrifuga Sorvall Legend Micro 17, AccesoLab
- Microscopio Olympus CH30.
- NanoDrop²⁰⁰⁰ Thermo Scientific
- Potenciómetro Conductronic pH120.
- Sonicador Branson 120
- Termociclador T100TM, BIORAD.
- Thermomixer, Eppendorf
- Transiluminador de luz UV, UVP.
- Ultracongelador -86°C Thermo Scientific.
- Estufa 50, 80°C, Proveedor Científico S.A.
- Autoclave Lorma Electrónico Digital AV28L, LORMA
- Fuente de alimentación para electroforesis Power-PAC 300, BIO-RAD
- Termoblock myBLOCK Mini Dry Bath, Benchmark
- Vortex Thermo Scientific
- UV Crosslinker UVC 500, Arnet Sham
- Campana de flujo laminar, VECO
- BioPhotometer, eppendorf
- DTX 8800 Multimode Detector

6.2 Microorganismos

6.2.1 Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUBE-514

Esta cepa inicialmente fue aislada del suelo del desierto de Irak por el Dr. György Szakács, pertenece a la colección de la Technical University of Budapest, Hungría. Es una cepa silvestre, pero de una relativamente alta producción de lovastatina (Szakács *et al.*, 1998). El tamaño de su genoma es de 35 Mb, además es un hongo filamentoso que produce diversos metabolitos secundarios clínicamente relevantes como la lovastatina.

6.2.2 Cepa bacteriana: *E. coli* DH5 α

La cepa es utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse en ella (hasta 5×10^8 transformantes por microgramo de ADN). Entre sus características más útiles está la de poseer una delación en el gen Z del operón lac, que hace que se puedan seleccionar fácilmente con ella aquellos transformantes que posean un plásmido capaz de originar la α -complementación de dicha mutación (Sambrook & Russell, 2001).

6.3 Vectores empleados

6.3.1 Vector de clonación pJET 1.2/Blunt (ThermoScientific®)

El kit de clonación de PCR CloneJET™ es un sistema de selección positivo avanzado para la clonación de alta eficiencia de los productos de PCR generados con cualquier ADN polimerasa termoestable. Además, cualquier otro fragmento de ADN de extremo romo o cohesivo se puede clonar. La ligación en el vector de selección positiva incluido tarda sólo 5 minutos y produce más de 99% de clones recombinantes.

El vector pJET ThermoScientific para extremos romos es un vector de clonación linealizado, el cual acepta insertos desde 6 pb hasta 10 kpb. Los extremos 5' del vector de clonación contienen grupos fosforilados, por lo tanto, no se requiere la fosforilación de los primers. Contiene un marcador de ampicilina, además, el vector recirculado expresa un gen letal después de la transformación que no permite la propagación. Como resultado, sólo los clones recombinantes que contienen el inserto

aparecen en las placas de cultivo. *bla* (Ap^R) es el gen β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina; *rep* (pMB1) es el replicón del plásmido pMB1, que es el responsable de la replicación del vector; *eco47IR* es el gen letal que permite la selección positiva de las recombinantes; PlacUV5 es el promotor *Plac* modificado para la expresión del gen *eco47IR* a un nivel suficiente para permitir una selección positiva.

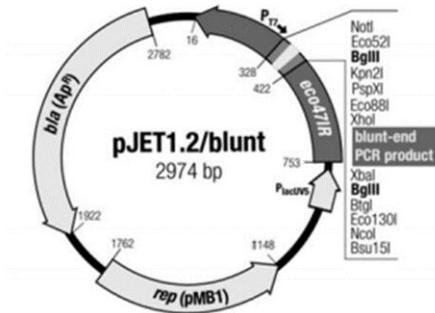


Fig. 7 Mapa del vector pJET (ThermoScientific®).

6.3.2 Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi

Obtenido del plásmido pJL43-RNAi (Ullán *et al.*, 2008) y modificado por Marcial Quino (2011). El vector pGdpPki-RNAi contiene el promotor del gen gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa A (*gdh*) de *Aspergillus nidulans*, el terminador del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (*cyo1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen de resistencia a fleomicina (*ble*). Este vector posee los promotores de los genes *gpd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pki* (piruvato kinasa), en sentidos opuestos y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*.

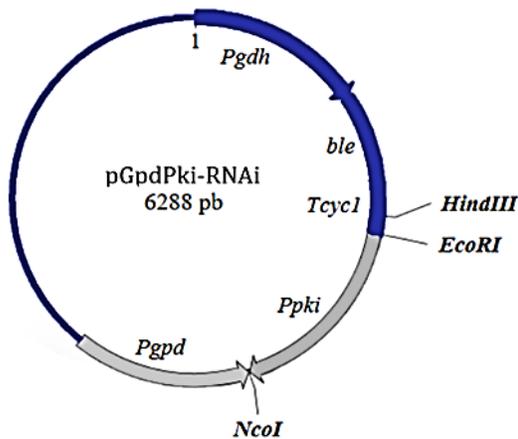


Fig. 8 Mapa del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi con los promotores Ppki y Ppki, en sentido opuesto y enfrentados, separados por un sitio de restricción *NcoI*.

6.4 Medios de cultivo

6.4.1 Medios para *Aspergillus terreus*

6.4.1.1 Medio Power: Para propagación de las esporas y mantenimiento de la cepa.

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

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

6.4.1.2 Medio completo: Obtención de micelio.

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

Se llevó a 100 mL de volumen y se ajustó el pH a 6.5 con KOH al 10%. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

6.4.1.2.1 Solución de sales 20X (SS20X)

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

6.4.1.2.2 Solución de Elementos Traza (SET)

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

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

6.4.1.3 Czapek/Sorbitol: para la regeneración de los protoplastos

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

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

6.4.1.3.1 Soluciones para protoplastos

KCM	g/L	PCM	g/L	SP2X	g/L
KCl (0.7 M)	52.2	CaCl ₂	5.55	KCl (1.1 M)	82.005
CaCl ₂ (50 mM)	5.55	MES	1.952	Ác. cítrico (0.1M)	16.213
MES (10 mM)	1.952	PEG 6000	30%		

6.4.1.4 Medio PDA

Se utilizó el medio PDA Bioxon^{MR} y se siguieron las instrucciones del proveedor: 39 g de polvo para cada litro de medio. Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 2 N y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

6.4.1.5 Medio de producción

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

	FS (2.5X)	FL (1X)
	g/L	g/L
Glucosa	6	15
Lactosa	34	85
Harina de soya	3	7.5
KNO ₃	2	5
KH ₂ PO ₄	3	7.5
NaCl	0.5	1.25
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	1.25
SET-P (mL)	1.25	3.125

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

6.4.1.5.1 Solución de elementos traza para medio de producción de lovastatina (SET-P)

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

Se fueron adicionando los sólidos en orden, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se ajustó el volumen y después se dejó enfriar. Se debe guardar a 4°C (Baños *et al.*, 2005).

6.4.2 Medios para *Escherichia coli* DH5 α

6.4.2.1 Luria-Bertani (LB)

	g/L
Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH al 10% y se añadió agua destilada hasta el volumen deseado. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C.

6.4.2.2 Buffer TB

	g/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	10.88
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.22
KCl	18.65
PIPES 0.5 M pH6.7	20

Esterilizar por filtración en 0.45 μ m

6.4.2.2.1 PIPES 0.5 M pH 6.7

	g/100 mL
piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico)	15.1

Ajustar pH con KOH 5 M y esterilizar por filtración en 0.45 μ m.

6.5 Antibióticos

6.5.1 Ampicilina

Se empleó ampicilina Sigma® para la selección de transformantes y mantenimiento del plásmido con resistencia a éste. Se preparó un stock a 100 mg/mL y se esterilizó por filtración en membrana de 0.22 μ m Millipore™ y se guardó a -20°C. Cuando se requirió, el medio LB fue suplementado con Ampicilina en una concentración de 100 mg/mL.

6.5.2. Fleomicina

Se preparó un stock a 20 mg/mL a partir de Fleomicina Powder InvivoGen® y se esterilizó por filtración en membrana de 0.22 µm Millipore™, esta solución se mantuvo a -20°C hasta su uso.

6.6 Condiciones de cultivo

6.6.1 Esporulación de *A. terreus*

En un matraz de 125 mL con 20 mL de medio Power, se inocularon 10 µL de la suspensión de esporas en glicerol de *A. terreus* de primera generación humedeciendo previamente el medio para lograr un esparcimiento homogéneo en toda la superficie. Se incubó a 30 °C por 5 días hasta observar las esporas de color café característico (Baños *et al*, 2005).

6.6.2 Conteo de esporas

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

$$\bar{x} \times 1000 \times 25 \times 1000 = \text{esporas/mL}$$

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

6.6.3 Obtención de micelio joven de *A. terreus*

Se inocularon asadas de esporas frescas de *A. terreus* sobre 30 mL de medio completo en matraces Erlenmeyer estériles con tapón de algodón. Se incubaron a 30°C durante 20h sin agitación (Baños *et al*, 2005).

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

Las cajas Petri con medio PDA para realizar conteo de colonias o crecimiento de micelio en ciertas condiciones se incubaron a 30°C por 24 h para el conteo de esporas y 3 días para observar micelio. La inoculación para el conteo de colonias se realizó esparciendo masivamente 100 µL de la suspensión de 1×10^3 esporas/mL con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Para el desarrollo de micelio se inoculó

una alícuota de 10 μ L de la concentración de esporas correspondiente sobre la superficie del medio solidificado, se esperó hasta que la gota haya sido absorbida para conservar la forma y se llevó con cuidado a la incubadora sin agitación.

6.6.5 *Escherichia coli* DH5 α

Las placas Petri con medio LB inoculadas con la cepa correspondiente se mantuvieron a 37°C por 16 h. Los cultivos líquidos se incubaron a las mismas condiciones de tiempo y temperatura, en matraz más una agitación de 250 rpm.

6.7 Técnicas microbiológicas

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

En placas Petri de 60x15 mm con medio Czapek 1% agar, se inocularon 10 μ L de las diluciones 10⁷, 10⁶, 10⁵ y 10⁴ de esporas frescas de *A. terreus* recolectadas anteriormente, en dos puntos diferentes de la placa. Cada unidad experimental contó con una concentración de fleomicina determinada entre 40 y 130 μ g/mL y se realizó por duplicado. La unidad control contó de la misma siembra de esporas, pero el medio careció de fleomicina. Se incubó por cuatro días a 30°C (Baños, 2010).

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

El medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) preparado previamente con su respectiva concentración de fleomicina se midió con ayuda de tubos falcón estériles de 50 mL, para vaciar 5 mL en placas Petri chicas (60 mm), cuando este se encontró a 50°C. De manera similar, en otros tubos se agregó el medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) preparado previamente con su respectiva concentración de fleomicina más 300 μ L de mezcla de transformantes por cada 5 mL de medio. El preparado se vertió sobre la capa de medio solidificada en la base de las cajas hechas anteriormente y se dejó solidificar. Se incubó a 30°C por 5 días, monitoreando cada día.

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

De acuerdo con Bibián-León (2015), el objetivo fue obtener transformantes estables, es decir, evitar que las transformantes finales poseyeran heterocarión (dos diferentes tipos de núcleos). Las transformantes inicialmente muestran núcleo transformado y no transformado, y cuando estos protoplastos se fusionan unos con otros resultan dicariones. El micelio de las transformantes se picó con un palillo estéril y se sembró en medio Power por picadura, las cajas se incubaron a 30°C por 3-4 días. De esta manera se realizó el primer pase, eliminando el micelio dicarión en el cual las esporas que se formen sólo llevarán un núcleo. En este paso se tienen esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. El segundo pase se realizó inoculando las esporas en medio de selección de fleomicina (Czapek) por estría abierta con incubación a 30°C. Cuando se observó el desarrollo de una colonia aislada, ésta se lavó con solución isotónica de NaCl 0.9% estéril y se sembró en medio de esporulación (Power) para posteriormente realizar la cosecha de las esporas y su conservación en glicerol.

Todas las pruebas de fermentación y caracterización de las transformantes se realizaron con la tercera generación. Es decir, de las suspensiones de esporas conservadas en glicerol, se propagaron las esporas en el medio correspondiente, se recolectaron y se sembraron en los respectivos medios para cada análisis.

6.8 Producción de lovastatina en FL y FS

Los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento de la cepa *Aspergillus terreus* TUB F-514, de la colección de cepas de la Technical University of Budapest, fue incubada sobre agar PDA durante 6 días a 30°C para esporulación. Las esporas fueron colectadas con una solución de Tween 80 al 0.05% y usadas para inocular las fermentaciones de lovastatina.

Para FL, 50 mL de medio de producción de lovastatina (Szackács *et al.*, 1998), y modificado (Baños *et al.*, 2005), fueron repartidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL estériles con tapones de algodón. Los cultivos fueron inoculados a una concentración de 2×10^6 esporas/mL e incubados a 30°C a una agitación de 200 r.p.m. hasta 96 horas.

Para FS, una concentración de 2.5 veces del medio de producción de lovastatina (2.5X) fue inoculado con esporas de *A. terreus* (2×10^6 esporas/mL), y empleado para impregnar el soporte sólido inerte a un contenido de humedad del 85%. Se empleó espuma de poliuretano de alta densidad, el cual fue pretratado

con una solución de NaOH al 40% y HCl al 10%. Los cubos de 1 cm³, fueron impregnados con el medio inoculado, y 6 g de este medio sólido fue colocado en cada matraz Erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron cubiertos con papel aluminio y Parafilm (Pechiney Plastic Pacaging, Menasha, WI, USA) como lo describió Baños *et al.* (2005). Es decir, 0.21 g de cubos de poliuretano impregnados uniformemente con 6 mL de medio 2.5X inoculado.

6.9 Caracterización de las transformantes

6.9.1 Sensibilidad a estrés oxidante

6.9.1.1 Micelio

Con ligeras modificaciones del protocolo descrito por Sakamoto *et al.* (2008), se evaluó la sensibilidad del micelio de las cepas fúngicas a estrés oxidante causado por peróxido de hidrógeno en placas de bioensayo estériles con medio PDA a diferentes concentraciones (1, 2, 3 y 4 mM). Se inoculó con 10 µL de concentración de esporas 1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴ esporas/mL por duplicado. Se analizó el efecto a las 72 horas de incubación a 30°C, comparando el fenotipo de las transformantes, la cepa control (transformante con el vector de silenciamiento sin inserto) y la cepa parental. Se utilizó una placa control inoculada exactamente igual, pero con medio sin H₂O₂.

6.9.1.2 Esporas

Se analizó la sensibilidad de las transformantes al estrés oxidante con H₂O₂ 100 mM en conidios a una concentración de 1x10³ esporas/mL, mediante una reacción de 15 minutos. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero con solución salina isotónica en lugar del peróxido de hidrógeno. Pasado el tiempo de reacción, se tomaron 100 µL y se sembraron en una caja Petri con 30 mL de medio PDA por triplicado. Las colonias resultantes se contaron a las 48 h de incubación a 30°C (Baños, 2010)

6.9.2 Sensibilidad a estrés osmótico

6.9.1.1 Micelio

Con ligeras modificaciones del protocolo descrito por Sakamoto *et al.* (2008), se evaluó la sensibilidad del micelio de las cepas fúngicas a estrés en presencia de NaCl a 1 mM en placas de bioensayo estériles con medio PDA. Se inoculó con 10 µL de concentración de esporas 1x10⁷, 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴ esporas/mL

por duplicado. Se analizó el efecto a las 72 horas de incubación a 30°C, comparando el fenotipo de las transformantes, la cepa control (transformante con el vector de silenciamiento sin inserto) y la cepa parental. Se utilizó la misma placa control, inoculada igual, pero con medio PDA puro.

6.9.1.2 Esporas

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

6.9.3 Esporulación

En cajas Petri chicas con 10 mL de medio Power, se inocularon 10 μ L de una suspensión de 1×10^8 esporas/mL de cada cepa. Esta suspensión se realizó a partir de esporas frescas y en solución isotónica NaCl 0.9%. Se incubaron a 30°C durante dos días. Después de este tiempo se colectaron las esporas con una solución de Tween 80 al 0.02% (p/v) con la ayuda de perlas de vidrio y se hizo un conteo por medio de la cámara de Neubauer. Se prepararon tres cajas para cada tiempo de conteo por cada cepa, se realizaron mediciones a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 170 h.

6.9.4 Crecimiento radial

Se realizó el análisis de crecimiento radial en los medios mínimos PDA, Czapek y medio de esporulación Power, mediante la inoculación de 10 μ L de una suspensión de 1×10^8 esporas/mL a partir de una recolección de esporas frescas, en cajas Petri de 50 mm por triplicado. Se midió el crecimiento en milímetros cada 24 h con ayuda de un calibrador vernier.

6.10 Técnicas analíticas

6.10.1 Extracción de lovastatina

6.10.1.1 FS

Se tomó 1 g de soporte húmedo, al cual se le adicionó 10 mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker®) al 50% con agua destilada, se dejó en agitación durante 30 min a 250 rpm y después 30 min en el sonicador (Branson 120), la muestra se filtró a través de una membrana de 0.45 µm de poro Millipore®. Las muestras se guardaron en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta su cuantificación.

6.10.1.2 FL

Se tomaron dos tipos de muestra: una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo y se le adicionaron 2 mL de acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker® al 50 %; la otra proveniente del micelio. Se tomó 1 g de micelio húmedo el cual se pasó a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker®) al 50 %, seguida de una agitación en el vortex durante 2 min. Los tubos se colocaron en el sonicador durante 30 min, la muestra se filtró a través de una membrana Millipore® de 0.45 µm de poro. Todas las muestras fueron guardadas en microtubos de 1.5 mL a -20°C hasta su cuantificación.

6.10.2 Cuantificación de lovastatina

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

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

Se pesaron 20 mg de lovastatina (Fermic S.A. de C.V.) y se disolvieron en 50 mL de NaOH (0.1N preparado con 25% de acetonitrilo). Se ajustó a pH 7.7 con HCl 0.1 N (preparado en acetonitrilo), se incubó a 45°C durante 1 h, se ajustó el volumen a 100 mL y se guardó en alícuotas de 1 mL a -20°C. Este proceso asegura un 98% de conversión de la forma lactona a la forma β-hidroxiácida (Yang & Hwang 2006), sin embargo, hubo que confirmarlo mediante HPLC, para obtener una curva patrón con las

concentraciones reales de la forma β -hidroxiácida. Posteriormente se realiza una curva patrón a partir de la concentración conocida de las alícuotas y se lee en HPLC.

6.10.3 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

La oxidación de la sonda H_2DCF -DA (Sigma-Aldrich) por las EROs, se midió a través de una cinética. A 10 mL de PBS con una concentración de 20 mM H_2DCF -DA, se le adicionaron 100 mg de micelio de FL o en su caso, 1 g de cultivo sólido de FS. La reacción se incubó en condiciones de oscuridad y en hielo durante 30 min. Transcurrido el tiempo, cada muestra se filtró, se congeló y se molió con N_2 líquido (con ayuda de mortero y pistilo). Aproximadamente 500 mg del polvo (micelio molido y congelado), se adicionaron a un microtubo de 1.5 mL negro (o ámbar), y a éste se le adicionó 1 mL de PBS frío. El tubo fue mezclado en vórtex durante 20 seg y centrifugado a 12000 x g a 4°C por 15 min. 200 μ l del sobrenadante se colocaron sobre una placa de 96 pozos para fluorescencia, la cual se leyó en el lector multimodal DTX 880 Multimode Detector (Beckman-Coulter, Inc, Brea, CA, USA), empleando 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Se realizó el mismo procedimiento, pero sin emplear la sonda H_2DCF -DA (control negativo), al final a la fluorescencia emitida en las muestras tratadas con la sonda, se les restó la fluorescencia del control negativo. La normalización de la fluorescencia (dada en Unidades Relativas de Fluorescencia, o URF) se obtuvo al dividir este resultado entre el contenido de biomasa, en FL por peso seco y en FS por ácidos nucleicos (Miranda, 2013). Todo se realizó por triplicado.

6.10.4 Determinación de biomasa y humedad

En FL, la biomasa y la humedad se determinaron por peso seco, filtrando todo el contenido de un matraz a través de un papel filtro de 90mm WhatmanTM de peso constante y conocido, se dejó secar a 80°C durante 48 h, hasta peso constante.

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

6.10.5 pH

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

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

6.11 Técnicas moleculares

6.11.1 Extracción de ADN genómico de *A. terreus*

El micelio joven obtenido con las condiciones del apartado 6.6.3 se colectó con ayuda de una espátula, se secó con papel absorbente, posteriormente se maceró hasta pulverizar con nitrógeno líquido y se guardó en microtubos a -70°C hasta su procesamiento.

A un microtubo con micelio pulverizado se le adicionaron 800 μL de Buffer de extracción (EDTA 50mM y SDA 0.2%), se incubó a 68°C durante 30 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregaron 100 μL de acetato de potasio 2.5M pH 4.2, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 10min. Se centrifugó 5min. Del sobrenadante se tomaron 700 μL y se le adicionaron 700 μL de isopropanol. Se centrifugó a 14000 rpm 5 min desechando el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400 μL de TE pH 8 (EDTA 1 mM-Tris-HCl 10 mM, 1:1), se adicionaron 40 μL de acetato de sodio 3M pH 7. La mezcla se calentó 68°C durante 1 h con agitación a 300 rpm. Para solubilizar, se mezcló por agitación en vortex. Se le adicionó 1 mL de etanol al 95% frío y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. La mezcla se lavó dos veces con 800 μL de etanol al 70% frío. El ADN se resuspendió en 100 μL de TE pH 8 con 1 μL de solución RNAsa 100 mg/mL. La mezcla se incubó a 37°C durante 1.5h. Después, se le adicionaron 300 μL de TE pH 8. Se extrajo con un volumen de (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1). Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, colectando la fase de arriba. Se le agregó 10% del volumen total de acetato de sodio 3 M pH 5.2, más 700 μL de etanol absoluto frío (2.5 vol.). Se centrifugó durante 20 min a 14000 rpm a 4°C . La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70% frío. Se secó sobre una superficie de papel absorbente y se resuspendió en 30 μL de H_2O grado biología molecular y se guardó a -20°C .

6.11.2 Identificación del gen *atfB* en *Aspergillus terreus* TUBF-514

6.11.2.1 Diseño de primers

A partir de “*Aspergillus terreus* NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) partial mRNA (XP_001211156.1)”, se diseñaron dos juegos de primers con cortes *Nco*I. Los detalles se pueden encontrar en el Anexo 1.

6.11.3 PCR

6.11.3.1 PCR para obtención de la sonda de un fragmento del gen *AtatfB*

Se realizó un PCR con gradiente de temperatura por cada combinación de juegos de primers diseñados para determinar la temperatura óptima de obtención del fragmento del gen *atfB* de *A. terreus* en el termociclador (T100™ Thermo Cycler de Biorad), con las siguientes condiciones:

	Volumen (μL)
H ₂ O grado Biología Molecular	56.5
5X GoTaq Flexi Buffer	20
MgCl ₂ 25 mM	10
dNTPs 10 μM	2
<i>atfB</i> Primer Forward 10 μM	5
<i>atfB</i> Primer Reverse 10 μM	5
DNAg <i>A. terreus</i>	1
GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega®) 5 U/μL	0.5

Tabla 1. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para obtener sondas de *AtatfB*

1 Desnaturalización inicial	95°C ; 1 min
2 Desnaturalización	95°C ; 30 s
3 Alineamiento	Gradiente 55-65°C ; 30 s (T _m óptima 61.7°C)
4 Extensión	72°C ; 1 min
5 Go to	Paso 2 por 30 ciclos
6 Extensión final	72°C ; 5 min
7 Guardar	4°C ; ∞

Tabla 2. Condiciones PCR para amplificar *AtatfB*

También se amplificó el fragmento del gen *AtatfB* con Phusion High-Fidelity DNA Polimerasa (Thermo Scientific™) para obtener un producto de PCR con extremos romos, mediante las condiciones de PCR siguientes.

	Volumen (μL)
H ₂ O grado Biología Molecular	66
Phusion HF 5X	20
dNTPs 10μM	2
<i>atfB</i> Primer Forward 10 μM	5

<i>atfB</i> Primer Reverse 10 μ M	5
DNAg <i>A. terreus</i>	1
Phusion HF DNA Polimerasa ThermoScientific® 2 U/ μ L	1

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR con Phusion HF DNA Polimerasa

1 Desnaturalización inicial	98°C ; 30 s
2 Desnaturalización	98°C ; 7 s
3 Alineamiento	Gradiente 55-65°C ; 25 s (Tm óptima 61.7°C)
4 Extensión	72°C ; 25 s
5 Go to	Paso 2 por 30 ciclos
6 Extensión final	72°C ; 5 min
7 Guardar	4°C ; ∞

Tabla 4. Condiciones de PCR con Phusion HF DNA Polimerasa.

6.11.3.2 PCR para obtener la confirmación de la integración del vector de silenciamiento

pGpdPki-RNAi-*AtatfB* al genoma de las Si*AtatfB* de *A. terreus*

Con los primers diseñados para hibridar sobre los promotores en sentido contrario pki-F y pGdR, y la temperatura óptima de hibridación de 66.5 °C se realizó la reacción de PCR al DNAg de las Si*atfB* de *A. terreus*.

	Volumen (μ L)
H ₂ O grado Biología Molecular	53.5
5X GoTaq Flexi Buffer	20
MgCl ₂ 25 mM	10
dNTPs 10 μ M	2
<i>pki</i> Primer Forward 10 μ M	5
<i>pGd</i> Primer Reverse 10 μ M	5
DNAg <i>A. terreus</i>	1
GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega®) 5 U/ μ L	0.5

Tabla 5. Reacción de PCR con Taq Polimerasa para validación de las transformantes

1 Desnaturalización inicial	95°C ; 1 min
2 Desnaturalización	95°C ; 30 s
3 Alineamiento	66.5°C ; 30 s
4 Extensión	72°C ; 1 min
5 Go to	Paso 2 por 34 ciclos
6 Extensión final	72°C ; 5 min
7 Guardar	4°C ; ∞

Tabla 6. Condiciones de PCR para validación de las transformantes.

6.11.3.3 PCR de colonia *E. coli* DH5α con el vector pJET-*AtatfB*

Dentro de la campana de flujo laminar se picó la colonia bacteriana transformante con el vector pJET-*AtatfB* a analizar y se realizó una estria abierta en una placa LB + Amp para descargar la mayoría de las células. La punta se introdujo en el tubo de reacción por cinco minutos sin agitar y posteriormente se llevó al termociclador en las siguientes condiciones.

	Volumen (μL)
H ₂ O grado Biología Molecular	13.1
5X GoTaq Flexi Buffer	4
MgCl ₂ 25mM	1.2
dNTP's 10mM	0.8
<i>atfB</i> Primer Forward 10 μM	0.4
<i>atfB</i> Primer Reverse 10 μM	0.4
GoTaq Flexi DNA Polimerasa (Promega®) 5 U/μL	0.1

Tabla 7. Reacción de PCR de colonia para *E. coli* pJET-*AtatfB*

1 Desnaturalización inicial	95°C ; 2 min
2 Desnaturalización	94°C ; 30 s
3 Alineamiento	61.7°C ; 30 s
4 Extensión	72°C ; 1 min
5 Go to	Paso 2 por 34 ciclos
6 Extensión final	72°C ; 5 min
7 Guardar	4°C ; ∞

Tabla 8. Condiciones de PCR de colonia para *E. coli* pJET-*AtatfB*

6.11.3.4 Purificación de producto de PCR por corte de banda

Se utilizó el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®. Se siguió el protocolo tal y como lo indica el proveedor. Después de correr las muestras en un gel de electroforesis de agarosa con la cantidad de reacción suficiente para obtener un buen rendimiento después de la purificación (100-200 µL), se cortó la banda correspondiente en el transiluminador de luz UV y se colocó en un microtubo estéril. Se agregaron 1 µL de “Membrane Binding Solution” por cada mg de gel y se homogenizó a 65°C. Se transfirió el gel disuelto a la minicolumna, incubando un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 14000 rpm un minuto, se agregaron 700 µL de “Membrane wash solution”, se volvió a centrifugar y se repitió el lavado con 500 µL centrifugando por cinco minutos. Se centrifugó ahora sin tapar la microcentrífuga por un minuto, después se hizo pasar 50 µL de agua grado biología molecular a la columna y se guardó la muestra a -20°C.

6.11.4 Clonación del fragmento del gen *AtatfB* con el vector pJET en células ultracompetentes

E. coli DH5α

6.11.4.1 Ligación del fragmento al vector de clonación

	Volumen (µL)
2X Buffer de reacción	10
atfB (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase) purificado 60 ng/µL	1
pJET1.2/blunt Cloning Vector 50 ng/µL	1
H ₂ O libre de nucleasas	7
T4 DNA Ligasa	1
Total	20

Tabla 9. Reacción ligación de *AtatfB* a pJET

La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche, posteriormente se visualizó el resultado por PCR de colonia en un gel de electroforesis.

6.11.4.2 Células ultracompetentes de *E. coli* DH5 α

Se realizó un preinóculo con 25 mL de medio LB y 12 colonias de células DH5 α y se incubaron a 37°C durante 8–10 h. Se inocularon 250 mL de medio LB con 2.5 mL del preinóculo. Se dejaron crecer con agitación constante (180–250 rpm) a 18°C durante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.55 a 600 nm. Se transfirió el matraz a un baño de hielo y se mantuvo durante 10 min. Se centrifugó el medio a 5000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 80 mL de Buffer TB frío, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 20 mL de TB más 1.4 mL de DMSO, y se mantuvo en hielo durante 10 min. El volumen final se repartió en alícuotas de 100 μ L en microtubos de 1.5 mL, y se sumergió el fondo en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -70°C para su uso (Sambrook & Russell, 2001).

6.11.4.3 Transformación bacteriana

Se tomaron 50 μ L de células ultracompetentes y se depositaron en un microtubo de 1.5 mL. Se le adicionaron 5 μ L de plásmido, se resuspendió suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se transfirió la mezcla a 42°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo (shock térmico) para inducir a las células la toma de DNA exógeno. Se adicionaron 800 μ L de medio LB, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 h. Se sembró una alícuota de 100 μ L en la superficie de una placa LB-Agar más ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. Se incubó de 12 a 16 horas a 37°C (Sambrook & Russell, 2001).

6.11.5 Extracción de DNA plasmídico por minipreps.

Se seleccionaron 10 colonias del centro de la placa anterior y se analizó el DNA plasmídico por obtención de minipreps por *boiling*. De las colonias seleccionadas se hicieron cultivos en 2 mL de medio LB + Amp por 12-16 h a 37 °C y 220 rpm. Se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 5000 rpm por cinco minutos. Se añadieron 350 μ L de solución STET (10 mL de EDTA 50 mM pH8, 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH8, 8 g de sacarosa, 500 μ L de Tritón X-100 y H₂O hasta 100 mL) y 20 μ L de lisozima 10 mg/mL al pellet seco, se homogeneizó en vórtex hasta resuspender las células. Posteriormente se hirvieron las muestras por un minuto y de inmediato se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos. Se añadieron al sobrenadante 45 μ L de acetato de sodio 3M y 600 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Después se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se lavó el pellet con etanol 70% frío, nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 30 μ L de H₂O y se guardó a -20 °C.

6.11.6 Purificación a gran escala de DNA plasmídico por midipreps.

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

6.11.7 Digestión de DNA plasmídico.

Se realizó la reacción de digestión con la enzima de restricción *NcoI* Thermo Scientific[™] a los vectores de clonación y de silenciamiento, incubando por 3 h a 37°C con las siguientes condiciones.

	Volumen (µL)
H ₂ O libre de nucleasas	14.7
10X Buffer Tango	2
RNAsa (10mg/mL)	0.2
<i>NcoI</i> (10 U/µL)	0.1
DNA plasmídico	3
Total	20

Tabla 10. Condiciones de digestión de DNA plasmídico

6.11.8 Desfosforilación de DNA plasmídico digerido.

Para evitar la ligación reversible (espontánea) del vector PGpdPki-RNAi se desfosforilaron los extremos del vector abierto con las siguientes condiciones de reacción, incubando 10 min a 37°C, se detuvo la reacción calentando a 75°C por 5 min.

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

Tabla 11. Condiciones de desfosforilación de DNA plasmidico

6.11.9 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*atfB*

La construcción del vector de silenciamiento se logró siguiendo el siguiente protocolo. En primer lugar, se obtuvo un midiprep (6.11.6) del vector pGpdPki, en seguida se digirió con la enzima de restricción *NcoI* (6.11.7), se desfosforiló (6.11.8) y finalmente se realizaron las reacciones de ligación procurando una relación vector-inserto de 5:1.

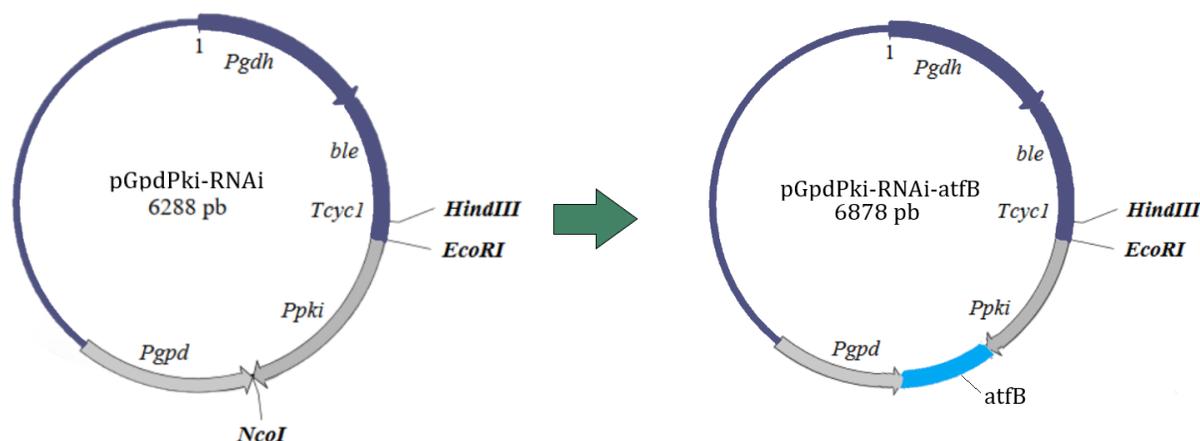


Fig. 9 Mapa de la inserción de *AtatfB* en el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi

a. Digestión (Apertura del vector)	Volumen (μL)
H ₂ O grado biología molecular	14.7
10X Buffer Tango	2
RNAsa (10mg/mL)	0.2
<i>NcoI</i> (10 U/μL)	0.1
Miniprep de pGpdPki (764.608 ng/ μL, 1.71(260/280))	3
Total	20

La reacción se incubó 3 h a 37°C, se corrió en un gel de agarosa 1% para corte de banda y se purificó con el kit Wizard® de Promega.

b. Desfosforilación	
DNA lineal (6288 pb) de la digestión anterior 379.073 ng/μL, 1.84(260/280)	1
10 X Buffer FastAP	2
FastAP Fosfatasa termosensible alcalina (Thermo Scientific) 1 U/μL	1
H ₂ O grado biología molecular	16
Total	20

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

c. Ligación con el inserto <i>atfB</i> con extremos <i>NcoI</i>	
Vector pGpdPki abierto y desfosforilado 95.022 ng/μL, 0.89(260/280)	3
Inserto <i>atfB</i> (<i>NcoI</i>) 21.82 ng/μL, 1.63 (260/280)	2
Buffer 10 X	2
T4 DNA Ligasa 1 U/μL (Promega)	1
H ₂ O grado biología molecular	12
Total	20

La reacción se incubó 4°C toda la noche.

Tabla 12. Construcción del vector pGpdPki-RNAi-*AtatfB*

Se realizó la transformación bacteriana en *E. coli* DH5α (6.11.4.3) con la construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*AtatfB* utilizando los siguientes controles para verificar cada paso de la construcción.

Control	Crecimiento en placa		Verifica
a. <i>E. coli</i> DH5α	LB	Césped	-Viabilidad
b. <i>E. coli</i> DH5α	LB + Amp	No	- Ampicilina activa -La cepa no es resistente
c. <i>E. coli</i> transformada con un vector que tenga resistencia a Amp		Colonias	-La concentración de ampicilina es adecuada -La cepa es capaz de transformar
d. <i>E. coli</i> + pGpdPki sin digerir		Colonias	-Buen estado del vector
e. <i>E. coli</i> + pGpdPki digerido y desfosforilado		No	-Funcionalidad de la fosfatasa -No re-circularización del vector
f. <i>E. coli</i> + pGpdPki digerido y ligado		Colonias	-Funcionalidad de la ligasa

g. <i>E. coli</i> + pGpdPki digerido, desforsforilado y ligado		No	-Fondo de ligación
h. <i>E. coli</i> + pGpdPki digerido, desforsforilado y ligado con <i>atfB</i> (<i>NcoI</i>)		Colonias	-Ligación de <i>atfB</i> al vector pGpdPki

Tabla 13. Controles de la construcción del vector pGpdPki-RNAi-*atfB*

6.11.10 Transformación de *A. terreus* con pGpdPki-RNAi-*AtatfB* por protoplastos

6.11.10.1 Protoplastos

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

La reacción se incubó a 30°C a 80 rpm y se monitoreó cada hora en el microscopio para observar la formación de protoplastos. La reacción duró aproximadamente 3 horas; cuando se observaron protoplastos aislados al igual que conglomerados sin pared celular. Se filtró nuevamente el micelio, en el filtrado se encuentran a los protoplastos. El filtrado se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante dejando 5 mL con el pellet del fondo (protoplastos). Posteriormente se resuspendió por inversión, para distribuir 1 mL por cada microtubo; estos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se agregó al pellet 500 µL de SP2X, se resuspendió por inversión y centrifugó a 6000 rpm por 7 min a 4°C, se desechó el sobrenadante. Y se agregó nuevamente 500 µL de SP2X, se resuspendió por inversión y se centrifugó a 6000 rpm por 7 min a 4°C. Se lavó el pellet con 1 mL de KCM, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Se tiró el

sobrenadante dejando únicamente de 100 ó 200 μL para resuspender por inversión nuevamente el pellet y agregar 20 μL de PCM.

6.11.10.2 Transformación de *A. terreus*

Se agregaron 20 μL de DNAP (construcciones de silenciamiento o vector sin inserto purificados), en microtubos de 1.5 mL nuevos sobre hielo, y 100 μL de protoplastos. Se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 minutos en hielo. Se tomó uno como control donde no haya ADN. A cada tubo, se agregó 600 μL de PCM, se mezcló por inversión y se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 600 μL de KCM, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente hasta la extensión de la placa.

Para verificar que la transformación del hongo con el vector de silenciamiento original (sin inserto) no confiriera ninguna actividad diferente a la cepa parental en el fenotipo de esta, se realizó la misma transformación y restricción de paso del heterocarión con el vector pGpdPki-RNAi sin inserto.

6.11.10.3 Extensión en placa

Se prepararon 45 placas Petri de 60x15 mm con 5 mL de medio Czapek/Sorbitol (agar 2%) con fleomicina en una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se sembró por cobertera (6.7.2) las reacciones de transformación, es decir, se agregaron las reacciones de transformación al medio Czapek/Sorbitol (agar 1%) con fleomicina y se vertió en las placas preparadas anteriormente. Las transformantes se incubaron a 30°C por 5 días y se monitoreó el crecimiento cada uno de los días.

De acuerdo con Bibián-León (2015), el objetivo es obtener transformantes estables, es decir, evitar que las transformantes finales poseyeran heterocarión (dos diferentes tipos de núcleos). Las transformantes inicialmente muestran núcleo transformado y no transformado, y cuando estos protoplastos se fusionan unos con otros resultan dicariones. El micelio de las transformantes se picó con un palillo estéril y se sembró en medio Power por picadura, las cajas se incubaron a 30°C por 3-4 días. De esta manera se realizó el primer pase, eliminando el micelio dicarión en el cual las esporas que se formen sólo llevarán un núcleo. En este paso se tienen esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. El segundo pase se realizó inoculando las esporas en medio de selección de fleomicina (Czapek) por estría abierta con incubación a 30°C. Cuando se observó el desarrollo de una colonia aislada, ésta se lavó con solución isotónica de NaCl 0.9% estéril y se sembró en medio de esporulación (Power) para posteriormente realizar la cosecha de las esporas y su conservación en glicerol.

6.12 Uso de herramientas bioinformáticas

a) Predicción de la localización subcelular de AtfB con YLoc (Interpretable Subcellular Localization Prediction)

La predicción de la localización subcelular es una importante herramienta como alternativa a los métodos experimentales; YLoc (Interpretable Subcellular Localization Prediction) es un servidor web fácil de interpretar que permite predecir la localización subcelular de cualquier proteína. La razón principal de esta predicción es la presencia de una secuencia NLS o *nuclear localization signal* (secuencias cortas de aminoácido predominantemente básicas, identificadas como señales de importación nuclear para algunas proteínas); el 41% de las proteínas nucleares tienen este atributo mientras que solo el 1% de las proteínas secretadas muestran este mismo atributo. Lo cual confirma que se trata de un factor transcripcional. Además, la proteína muestra una gran cantidad de aminoácidos polares, el 60% de las proteínas nucleares muestran estas características, por otro lado, solo el 2% de las proteínas secretadas tienen esta característica. (Briesemeister *et al.*, 2010)

b) Predicción de sitios de unión de importinas α -dependientes de NLS con el software cNLS Mapper

El software cNLS Mapper basado en Kosugi *et al.* (2009) permite la predicción de importinas α -dependientes de NLS, este método predictivo permite resultados precisos, sensibles y específicos por sobre cualquier otro método al identificar la secuencia correspondiente al sitio de unión de importinas en la secuencia de aminoácidos de la proteína a analizar.

c) Modelo de interacción de proteínas del software STRING

El modelo de interacción de una proteína de interés asociada a otras proteínas se basa en datos experimentales disponibles en las bases de datos. Los métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones del software STRING analizan los dominios presentes en cada proteína de la red de interacción.

7. Resultados

7.1 Identificación de *atfB* (ATEG_01978) en *A. terreus* NIH2624

En la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) no se encuentra el gen denominado *atfB* para *Aspergillus terreus* NIH2624 como tal, para lograr su identificación en esta cepa se realizaron BLAST con las secuencias de aminoácidos y nucleótidos del factor transcripcional en otras especies de *Aspergilli* y *Penicillium*. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de los análisis.

Identidad de *atfB* en otras especies de *Aspergilli*

- *Aspergillus terreus* NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) partial mRNA XP_001211156.1 690pb

	NCBI Acceso	a.a.	Identidad
<i>Aspergillus parasiticus</i>	A0A0F0IP79.1	318	36% (74/205)
<i>Aspergillus flavus</i>	XP_002381221.1	318	37% (75/205)
<i>Aspergillus oryzae</i>	XP_001824132.1	318	37% (75/205)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Q4WVQ7.1	328	36% (75/211)
<i>Aspergillus nidulans</i>	CBF71585.1	322	34% (56/167)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002567872.1	319	35% (55/156)

Tabla 14. Resumen de resultados obtenidos del BLASTp (aminoácidos) realizado en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 con los homólogos de *atfB* o AtAtfB.

	NCBI Acceso	nucleótidos	Identidad
<i>Aspergillus parasiticus</i>	HQ396161.1	957	44/52(85%)
<i>Aspergillus flavus</i>	XM_002381180.1	957	42/52(81%)
<i>Aspergillus oryzae</i>	AB120718.1	4779	42/52(81%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XM_748264.1	987	61/75(81%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XM_002567826.1	960	42/50(84%)

Tabla 15. Resumen de resultados obtenidos del BLASTn (nucleótidos) realizado en el genoma de *Aspergillus terreus* NIH2624 con los homólogos del gen *AtatfB*.

De acuerdo con los BLAST realizados, se identificó a la secuencia de nucleótidos denominada “*Aspergillus terreus* NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) partial mRNA XM_001211156.1” como *atfB* de *Aspergillus terreus* NIH2624, al cual llamamos *AtatfB*. Esto es debido a que al realizar los BLAST a partir de las secuencias de aminoácidos o nucleótidos de los genes *atfB* conocidos en otras especies de *Aspergillus* con el genoma de *A. terreus* NIH2624 corresponde a la secuencia con los mejores resultados de alineamiento en coincidencia de todas las especies comparadas. Cabe mencionar que en el BLASTn la cobertura de los análisis es baja, pero esta secuencia se trata del dominio conservado de bZIP característico de los *atfB* en los diferentes *Aspergilli*.

7.1.2 Análisis bioinformático de AtAtfB

Para conocer más características de este interesante gen, se emplearon tres herramientas bioinformáticas que permitieron identificar a *AtAtfB* como un factor de transcripción debido a su localización nuclear y sitios específicos para la importación al núcleo dentro de su secuencia. Además de mostrar interacciones con otras proteínas que pueden ayudar a un análisis futuro.

a) Predicción de la localización subcelular de *AtfB* con YLoc (Interpretable Subcellular Localization Prediction)

Los resultados del análisis de la proteína *AtfB* de *A. terreus*, usando un modelo de predicción YLoc-LowRes y la versión Fungi, mostraron que esta proteína es de localización nuclear, esto con 100% de probabilidad y una confianza de 0.81. La razón principal de esta predicción es la presencia de una secuencia NLS o *nuclear localization signal* (secuencias cortas de aminoácido predominantemente básicas, identificadas como señales de importación nuclear para algunas proteínas), el 41% de las proteínas nucleares tienen este atributo mientras que solo el 1% de las proteínas secretadas muestran este mismo atributo. además de que la proteína también muestra una gran cantidad de aminoácidos polares.

b) Predicción de sitios de unión de importinas α -dependientes de NLS con el software cNLS Mapper

En el análisis para *AtfB* de *A. terreus* con un score de 7.3 se encontró una secuencia en la posición 65 a 86 en la secuencia de aminoácidos de *AtAtfB*. (Detalle en el Anexo I)

c) Modelo de interacción de AtfB asociada a otras proteínas, basándose en datos experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones. Software STRING

Se encontró que el factor transcripcional AtfB de *A. terreus* tiene un dominio de cierre básico de leucinas, se asocia principalmente a otras proteínas involucradas en la defensa ante estrés osmótico (AtfA y Hog1), además de otras proteínas relacionadas con la fosforilación de proteínas (MpkC, Spm1). (Detalle en el Anexo I)

7.2 Identificación y amplificación del fragmento del gen *atfB* en el genoma de *A. terreus*

TUBF-514

Para lograr identificar la existencia del gen en la cepa TUBF-514, a partir de la secuencia identificada en el genoma de *A. terreus* NIH2624, se diseñaron dos pares de primers sobre “*Aspergillus terreus* NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) partial mRNA (XM_001211156.1)” con los requerimientos necesarios. La estructura final y características de los primers se muestran a continuación.

Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	Longitud de oligos (pb)
F1 GCGCCATGGATAACTTCCACTTCC	62.2 °C	24
F2 GAGCCATGGGGCCTCGG	58 °C	16
R1 GTTCCATACTATCCCATGGAGGCC	61 °C	24
R2 CTTCATGGGGGTGATCGTAGCC	61.5 °C	23

Tabla 16. Primers diseñados para amplificar un fragmento del gen *AtatfB*

Tamaños esperados de los amplicones para las combinaciones de los juegos de primers.

F1-R1 614 pb F2-R1 552 pb

F1-R2 474 pb F2-R2 412 pb

7.3. Gradiente de temperatura para encontrar la Tm

Para encontrar la temperatura de hibridación (Tm) óptima para amplificar el fragmento del gen *AtatfB* se realizó una PCR con gradiente partiendo de la Tm de diseño. Se probaron las cuatro combinaciones de ambos juegos de primers para encontrar la ideal.

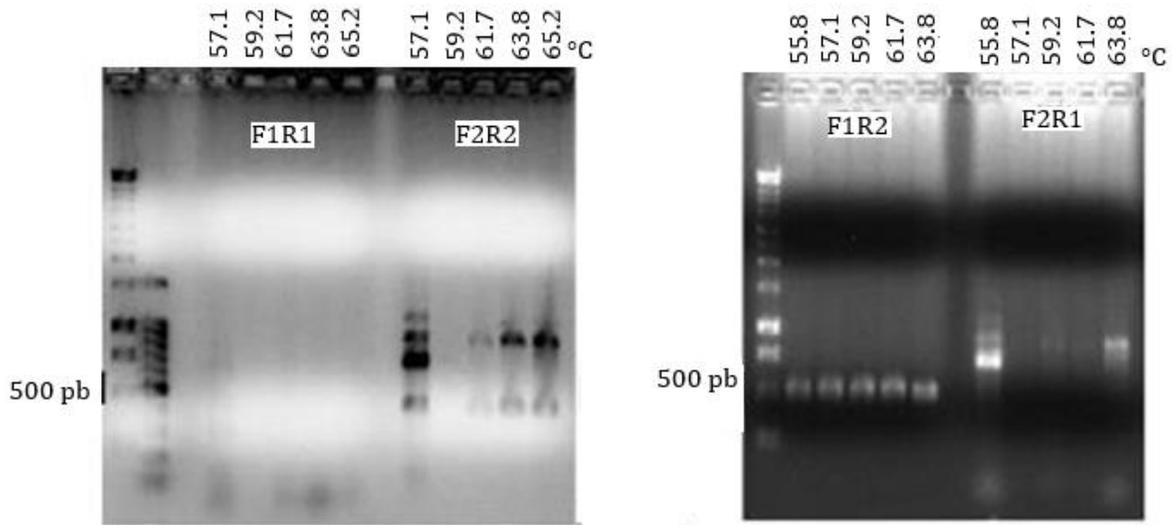


Fig. 10 PCRs de *AtattB* con las combinaciones de los dos pares de primers diseñados en gradiente de temperatura para amplificar el gen. Gel de agarosa 1% para electroforesis. F1R2 amplifica específicamente un amplicón de ≈ 474 pb.

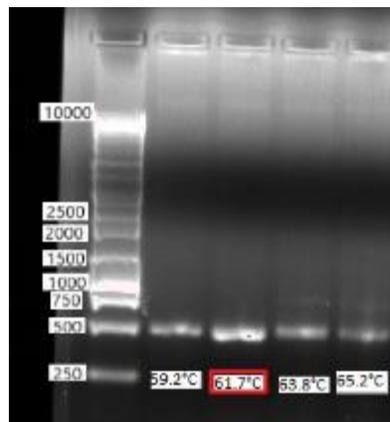


Fig. 11 PCR para obtener la temperatura óptima de alineamiento para amplificar *AtattB* con F1R2, $T_m=61.7^\circ\text{C}$ tiene una sola banda definida e intensa. Gel de agarosa 1% para electroforesis.

La combinación de primers que resultó efectiva para amplificar un fragmento correspondiente a 468 pb fue F1R2 (Fig. 10). La temperatura óptima de hibridación resultó en 61.7°C (Fig. 11), a esta temperatura el fragmento se amplificó con mayor intensidad y no aparecieron bandas inespecíficas.

7.4 Clonación del fragmento

7.4.1 Amplificación y purificación

Con el objetivo de amplificar el fragmento con extremos romos se procedió a realizar una PCR utilizando Phusion High-Fidelity DNA Polimerasa (Thermo Scientific™). La temperatura óptima de alineamiento fue de 61.7°C. El producto de la PCR se cortó y se purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega®.

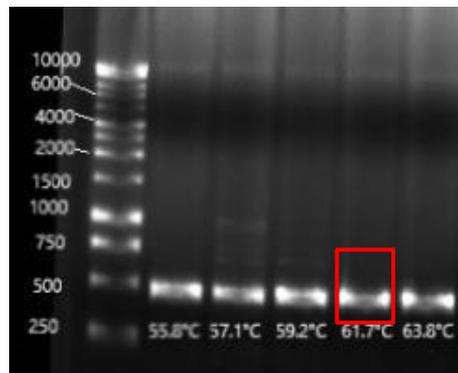


Fig. 12 Amplificación de alta fidelidad de *AtatfB* con Phusion High-Fidelity DNA Polimerasa. $T_m = 61.7^\circ\text{C}$.
Gel de agarosa al 1%

7.4.2 Clonación de *AtatfB* en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™)

Con la reacción indicada en el apartado 6.11.4.1 Ligación del fragmento al vector de clonación, se transformaron células ultracompetentes *E. coli* DH5 α (6.11.4.3). Las células fueron viables, sin resistencia a ampicilina y con capacidad de transformación, de acuerdo con la siguiente figura donde se muestran las características deseadas. La concentración de ampicilina fue de 100 $\mu\text{g/mL}$.

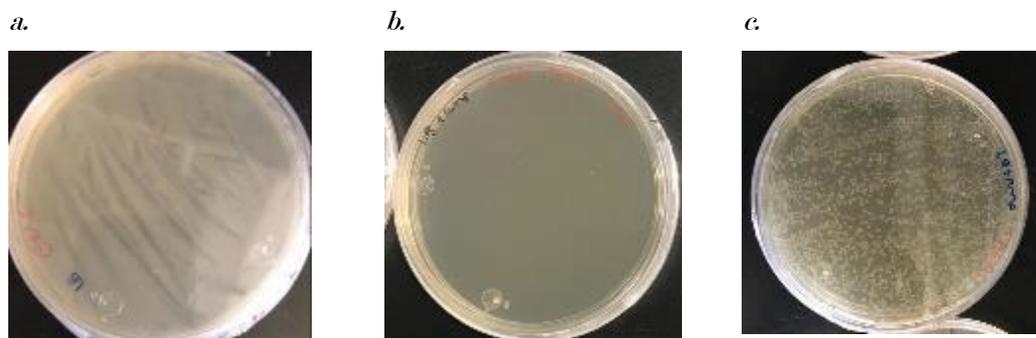


Fig. 13 Controles de transformación de *E. coli* DH5 α . a. Crecimiento normal en medio LB (verifica viabilidad),
b. Sin crecimiento en medio LB + ampicilina (no resistencia), c. Crecimiento de una transformante con un vector conocido Amp^R (capacidad de transformación).

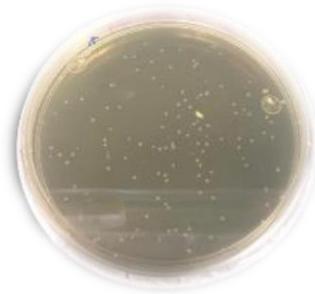


Fig. 14 Transformantes de *E. coli* DH5 α AmpR con el plásmido pJET-*AttfB* en placa con agar LB + Amp.

Se seleccionaron 10 colonias del centro de la placa anterior y se analizó el DNA plasmídico por obtención de minipreps por el método de *boiling* (6.11.5).

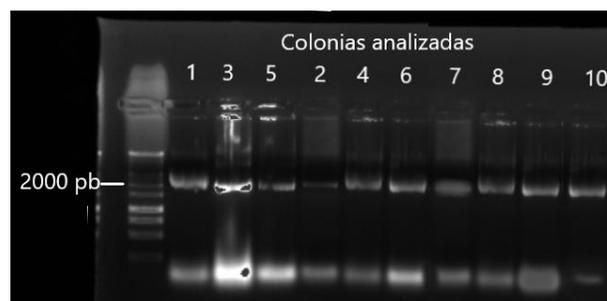


Fig. 15 DNA plasmídico de las colonias transformantes de *E. coli* DH5 α con pJET-*AttfB*. Gel de agarosa 1 %. Las 10 colonias analizadas contienen el vector, se observa una banda en el tamaño esperado \approx 2000pb para el vector.

Se realizó también una PCR de colonia (6.11.3.3) de tres transformantes y se digirieron los minipreps con la endonucleasa *NcoI* (6.11.7) para verificar la liberación del fragmento de *atfB*.

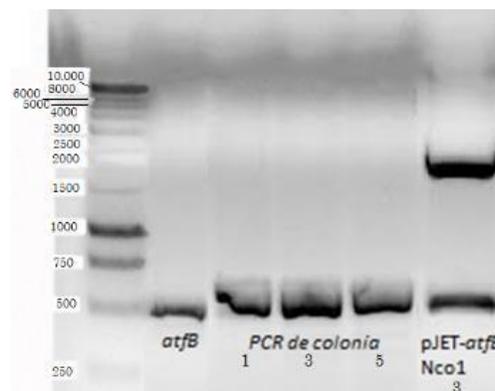


Fig. 16 Confirmación de ligación del fragmento de *atfB* con pJET1.2/blunt. Gel de agarosa 1 %. *AttfB* purificado se encuentra \approx 500pb (primer carril después del marcador), al igual que las amplificaciones

pertenecientes a las PCR para *AtatfB* de las colonias 1, 3 y 5 seleccionadas por la intensidad en la banda de DNAP de la Fig. 17 (siguientes tres carriles y el fragmento que libera la digestión del vector con la endonucleasa *NcoI* correspondiente a *AtatfB* (en el último carril).

En el segundo carril se observa el fragmento de *atfB* de referencia, el cual coincide en tamaño molecular (590 pb) con las sondas amplificadas por PCR de colonia en los siguientes tres carriles y la liberación del fragmento de *atfB* de pJET con *NcoI*, en el último carril.

Para obtener el vector con un grado alto de pureza y en concentración suficiente para los siguientes protocolos, se obtuvo un midiprep (6.11.6). De una colonia seleccionada, se digirió un midiprep de pJET-*atfB* con la enzima de restricción *NcoI* para obtener el fragmento de *atfB* con extremos *NcoI* a una concentración que permita la ligación al vector de silenciamiento (proporción 5:1). Se realizó una digestión 37°C por 3h (6.11.7). Se agregaron 2 µL de buffer de carga y se corrió en un gel de agarosa 1.2% para corte de banda. Posteriormente se cortó el fragmento observado en 590 pb y se purificó por el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

Las concentraciones de los productos obtenidos se muestran a continuación. Los valores fueron obtenidos con la lectura de las muestras en NanoDrop2000 Thermo Scientific.

	Concentración (ng/ µL)	260/280
Midiprep pJET- <i>atfB</i>	839.408	1.924
<i>atfB</i> con extremos <i>NcoI</i> purificado	22.926	1.912

Tabla 17. Concentración y pureza de los productos de purificación a gran escala del vector pJET-*AtatfB* y la sonda *AtatfB* con extremos *NcoI*.

7.5 Construcción del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*atfB*

La construcción del vector de silenciamiento se logró siguiendo el esquema de la Fig. 19. En primer lugar, se obtuvo un midiprep del vector pGpdPki, en seguida se digirió con la endonucleasa *NcoI* para abrir el vector en el sitio entre los dos promotores encontrados *Pgpd* y *Ppki*, se desfosforiló para evitar la recircularización del vector y finalmente se realizaron las reacciones de ligación, condiciones mostradas en Tabla 12.

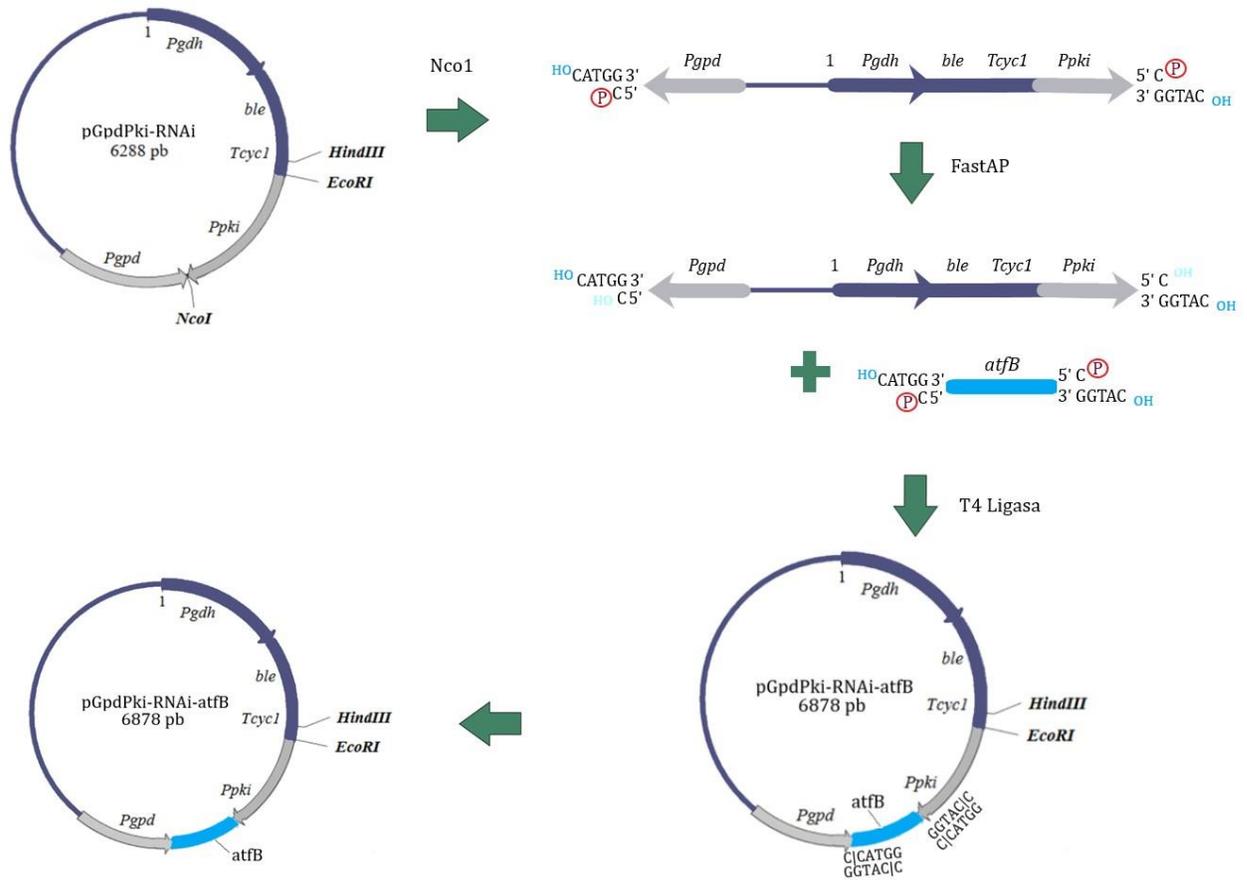


Fig. 17 Mapa de la construcción de pGpdPki-RNAi-AtfB. Apertura del vector con la endonucleasa NcoI, desfosforilación y ligación con el inserto AtfB cortes NcoI.

Posteriormente se transformó a *E. coli* DH5 α ultracompetente (6.11.4.3) empleando controles básicos de transformación y controles específicos para verificar cada paso (Tabla 13).

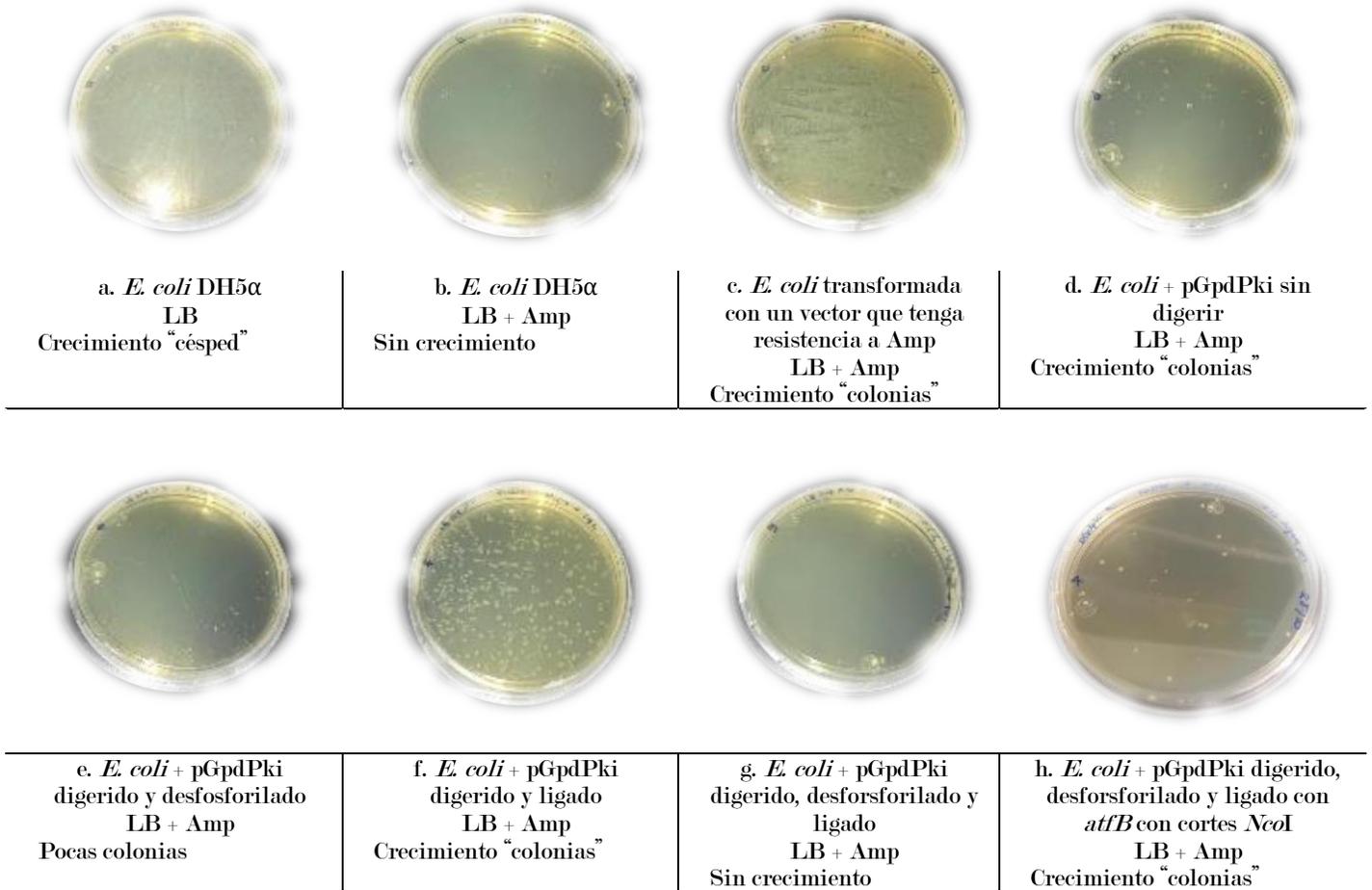


Fig. 18 Controles para la construcción del vector pGpdPki-RNAi-*AtatfB* verificando cada elemento transformando *E. coli* ultracompetentes. a: Se verificó la viabilidad de las células ultracompetentes; b: no presentan resistencia a ampicilina; c: capaces de transformar; d: buen estado del vector y [Amp] adecuada; e: desfosforilación correcta; f: la ligasa es funcional; g: fondo de ligación; h: construcción exitosa.

A continuación, se muestra un gel de agarosa al 1 % con la secuencia de la construcción de pGpdPki-RNAi-*AtatfB*(6.11.9). En el primer carril y segundo carril, después del marcador, se muestra al vector en sus etapas de apertura y desfosforilación, respectivamente, posteriormente el DNA plasmídico de las transformantes y la digestión de este, en donde se verifica la liberación del fragmento de *AtatfB* ≈590 pb.

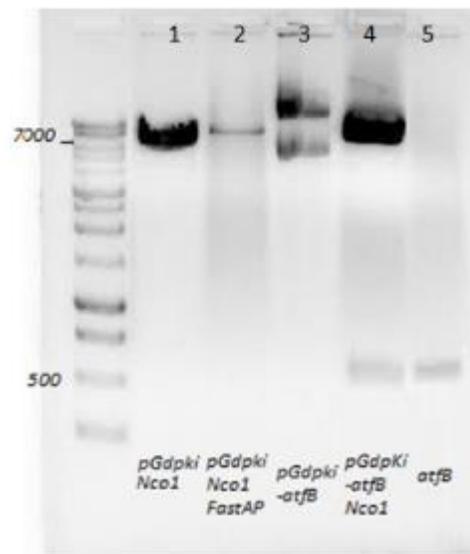


Fig. 19 Construcción del vector pGdpPki-RNAi-*AtatfB*. 1: pGdpPki digerido con *Nco*I. 2: pGdpPki digerido y desfosforilado. 3: Construcción pGdpPki-RNAi-*AtatfB*. 4: Digestión de la construcción con *Nco*I. 5. *AtatfB* de referencia.

Después de verificar que las colonias contenían el vector de la ligación de pGdpPki-RNAi-*AtatfB*, se seleccionó y purificó una colonia a gran escala mediante la obtención de midipreps (6.11.6). Posteriormente se corrió un gel de electroforesis (agarosa 1%) para cortar y purificar el fragmento liberado utilizando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

El fragmento liberado se secuenció con el objetivo de corroborar que los fragmentos amplificados correspondieran al gen *atfB*. Se hizo un BLAST (NCBI) con la secuencia obtenida en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular UAM Iztapalapa y el resultado de *AtatfB* coincidió con el gen *atfB* de *A. terreus* NIH2624 en un 98.58%. La secuencia obtenida de *AtatfB* y el BLAST se encuentran en los anexos III y IV respectivamente.

7.6 Transformación de *A. terreus* con el vector de silenciamiento pGdpPki-RNAi-*AtatfB*

Para obtener mutantes silenciadas del gen *atfB* de *A. terreus*, el primer paso fue determinar la concentración mínima inhibitoria del hongo, para poder realizar la selección de las transformantes. Dichas cepas se generaron mediante la introducción del vector por protoplastos en siembra por cobertera.

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

Con la metodología descrita en el punto 6.7.1 se identificó la concentración mínima inhibitoria en 50 $\mu\text{g/mL}$.

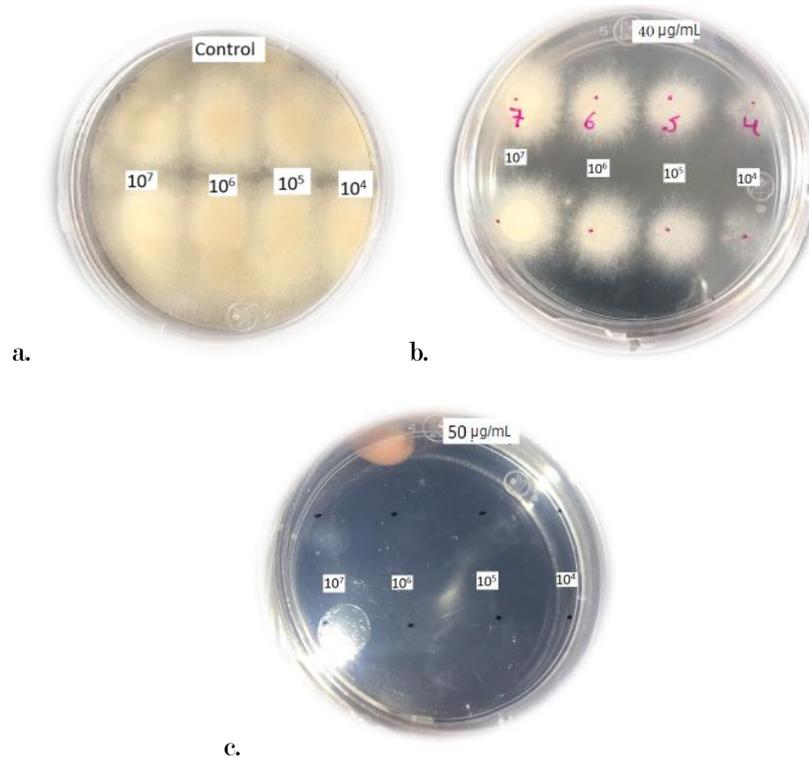


Fig. 20 Determinación de la CMI. a: control sin fleomicina. b: Crecimiento del hongo en 40 $\mu\text{g/mL}$. c: CMI, no hay crecimiento en 50 $\mu\text{g/mL}$

7.6.2 Obtención de transformantes de *A. terreus* con pGpdPki-RNAi-*atfB* por protoplastos

Después de verificar las condiciones de la generación de protoplastos (Fig. 23), en donde se confirmó que son viables y no cuentan con resistencia a fleomicina, se transformaron con el vector de silenciamiento. Se logró observar un crecimiento de las transformantes entre el tercer y cuarto día. Para el quinto se notó que comenzaron a esporular en el medio Czapek, lo cual no es un comportamiento característico (es un medio donde normalmente no esporulan). En total se obtuvieron 30 transformantes.

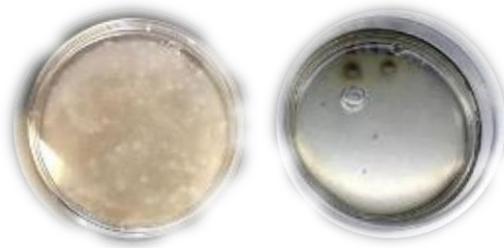


Fig. 21 Controles de transformación. Izquierda: Protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol sin fleomicina. Derecha: Protoplastos sin transformar en medio Czapek/sorbitol con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina.

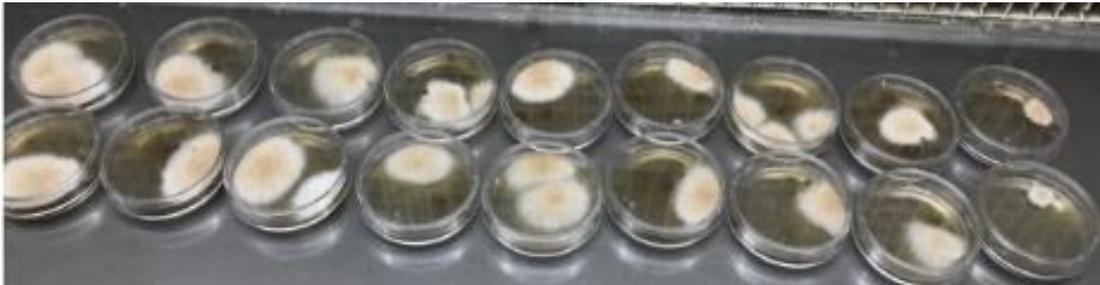


Fig. 22 Transformantes de *A. terreus* con el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*AtatfB*, medio Czapek/sorbitol con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fleomicina.

De acuerdo con Bibián-León (2015), el objetivo es obtener transformantes estables, es decir, evitar que las transformantes finales fueran heterocariones (dos diferentes tipos de núcleos). Las transformantes inicialmente muestran núcleo transformado y no transformado, y cuando estos protoplastos se fusionan unos con otros resultan dicariones. Con el primer pase, se restringió el paso de micelio dicarión, las esporas que se formen a partir de él sólo llevarán un núcleo. En este paso se tienen esporas con núcleo transformado y esporas con núcleo no transformado. Con el segundo pase se seleccionaron únicamente las esporas con núcleo transformado y con ellas se realizó la cosecha para su conservación en glicerol.

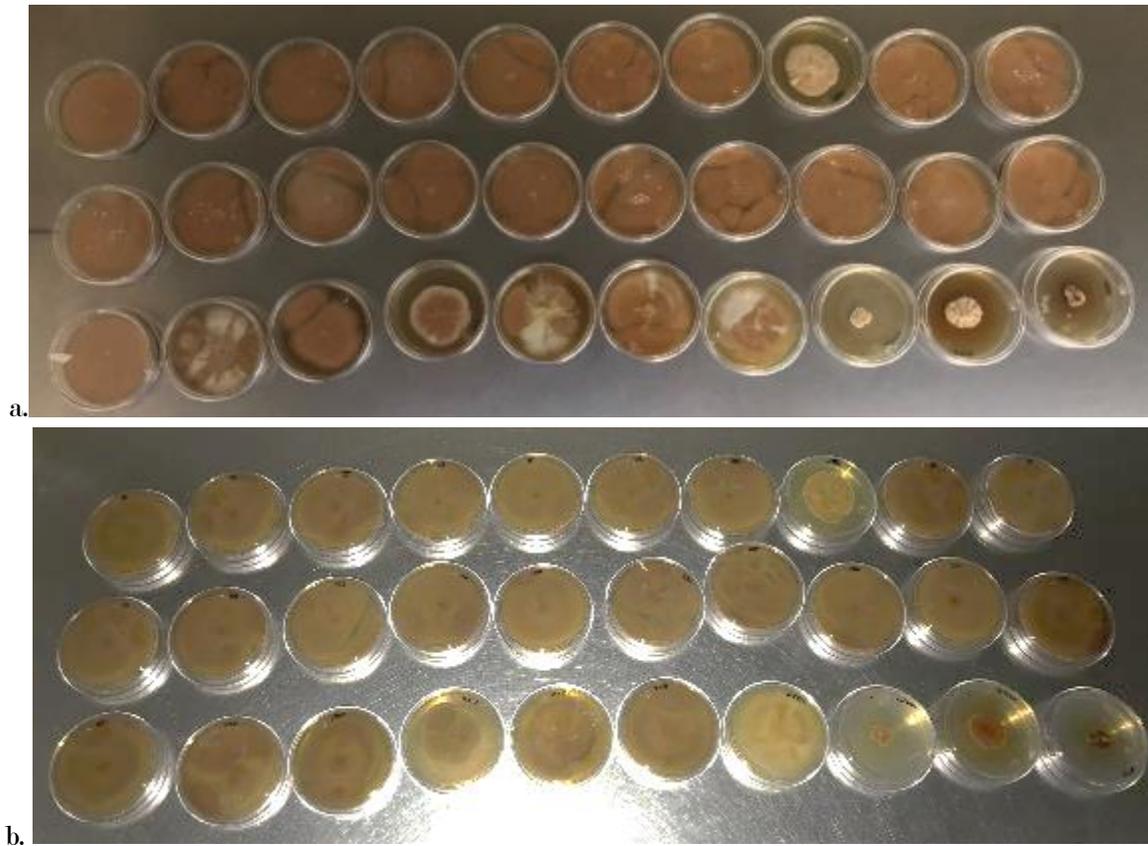


Fig. 23 Primer pase. Medio Power, 4 días a 30°C. a: vista frontal. Se aprecian sectores en algunas transformantes y otras morfologías. b: vista posterior Medio Power, 4 días a 30°C.



Fig. 24 Ejemplo de secuencia de pases de las transformantes para eliminar el heterocarión.

Después de los pases hasta la segunda generación, en donde se restringe que persista el heterocarión, se obtuvieron en total 27 transformantes presuntamente con el gen *AtatfB* silenciado, las cuales

resistieron los pases y la fleomicina, también se seleccionó una transformante con el vector sin inserto como control.

7.7 Preselección de transformantes

Para reducir el número de transformantes a trabajar y evitar que se invierta recursos y tiempo en falsas transformantes, se preseleccionaron a las transformantes que presentaran el fenotipo esperado de acuerdo con estudios en homólogos del gen silenciado en otras especies de *Aspergilli*. El fenotipo buscado fue sensible a estrés oxidante y osmótico.

7.7.1 Prueba de sensibilidad a estrés oxidante en micelio

Se evaluó la sensibilidad de las transformantes a estrés oxidante causado por el peróxido de hidrógeno con el método descrito en el punto 6.9.1. En el anexo, se encuentran todas las imágenes a detalle, a continuación, se muestran los principales efectos en la sensibilidad de las transformantes. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

a) Micelio

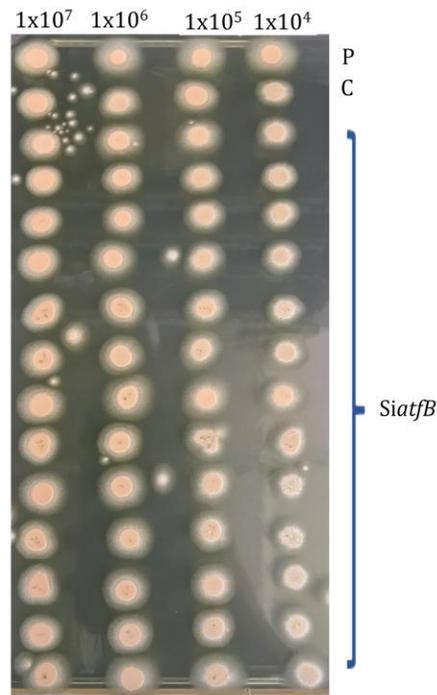


Fig. 25 Sensibilidad a estrés oxidante en micelio. PDA + H₂O₂ 2 mM. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, *SiatfB* transformantes silenciadas. No se observa cambios en el crecimiento, por lo tanto, las transformantes no son hipersensibles en micelio.

Aparentemente no se encuentran diferencias en el desarrollo del micelio en condiciones de estrés, se pudieron observar ligeras diferencias en la morfología macroscópica del micelio únicamente en la concentración de 1×10^4 esporas/mL, pero en general no mostraron sensibilidad a estrés oxidante en micelio al no haber mostrado un cambio notable en el crecimiento de las transformantes en las placas con H_2O_2 1 mM en comparación con la cepa parental. Es decir, las transformantes silenciadas no son hipersensibles al estrés oxidante.

Posteriormente, las transformantes que resultaron sensibles a estrés oxidante en conidios (ver sección 7.8.2), se les probó nuevamente su sensibilidad en micelio, ahora con una concentración más alta de peróxido de hidrógeno (4mM). Se observó que en una concentración de esporas/mL de 1×10^6 y 1×10^5 existe sensibilidad debido a que presenta una disminución del crecimiento en comparación con la parental, además de que en 1×10^4 ya no hay crecimiento. Por lo tanto, de las transformantes probadas, siete presentaron ligera sensibilidad a estrés oxidante.

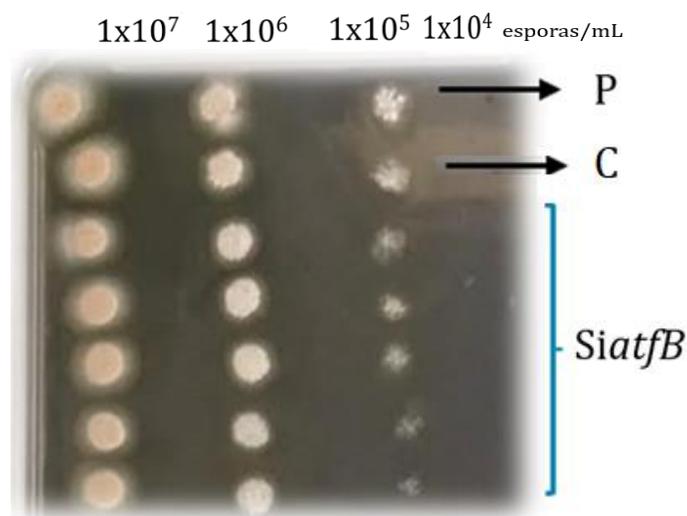


Fig. 26 Sensibilidad a estrés oxidante en micelio. PDA + H_2O_2 4 mM. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, *SiatfB* transformantes silenciadas. Se observa disminución en el crecimiento en 1×10^5 esporas/mL con respecto a la parental y al control.

7.7.2 Prueba de sensibilidad a estrés oxidante en conidios

Se analizó la sensibilidad de las transformantes al estrés oxidante con H_2O_2 100 mM en esporas a una concentración de 1×10^3 esporas/mL en un tiempo de contacto de 15 minutos. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento, pero con solución salina isotónica en lugar del peróxido de hidrógeno. La viabilidad de las esporas ante el estrés oxidante se cuantificó mediante las colonias que crecieron

después de 48 h de incubación a 30°C. A continuación, se muestra el efecto en la cepa parental, el crecimiento disminuyó en un 20%.

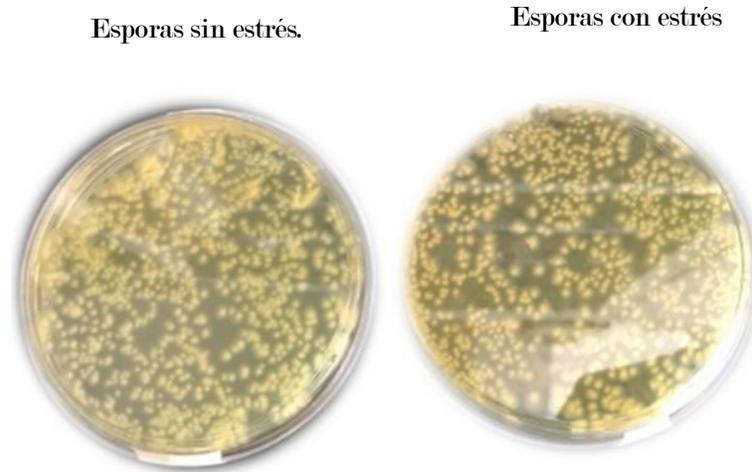


Fig. 27 Cepa parental con estrés oxidante en esporas. Disminución de crecimiento 23%.

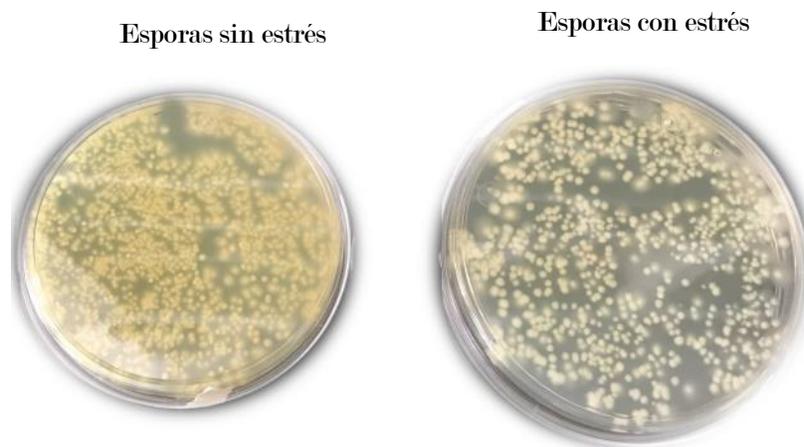


Fig. 28 Transformante 7 con estrés oxidante en esporas. Disminución de crecimiento 63%.

En total, 61.5% de todas las transformantes silenciadas fueron sensibles a estrés oxidante en esporas. En algunos casos se logró cuantificar hasta un 63% más de sensibilidad con respecto a la parental.

7.7.3 Prueba de sensibilidad a estrés osmótico en micelio

Se probó la sensibilidad al estrés osmótico con NaCl 1 mM en micelio, los resultados mostraron que no hubo disminución en el crecimiento de las transformantes silenciadas con respecto a la cepa parental, es decir, no son sensibles a este tipo de estrés en micelio.

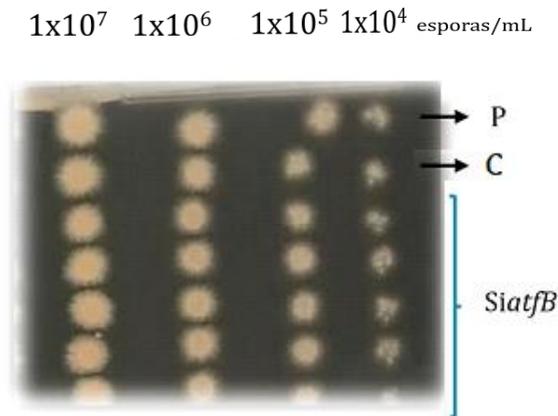


Fig. 29 Sensibilidad a estrés osmótico en micelio. PDA + NaCl 1mM. P: parental, C: transformante con el vector sin inserto, SiatfB transformantes silenciadas.

7.7.4 Prueba de sensibilidad a estrés osmótico en conidios

Se analizó la sensibilidad de las transformantes al estrés osmótico con NaCl 100 mM en esporas a una concentración de 1x10³ esporas/mL. La viabilidad de las esporas ante el estrés oxidante se cuantificó mediante las colonias que crecieron después de las condiciones de incubación.

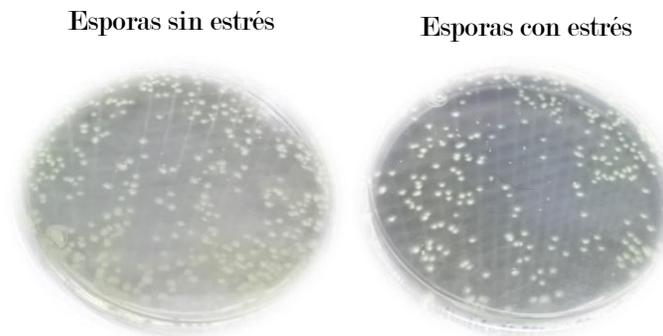


Fig. 30 Cepa parental con estrés osmótico en esporas. Disminución de crecimiento 33%.

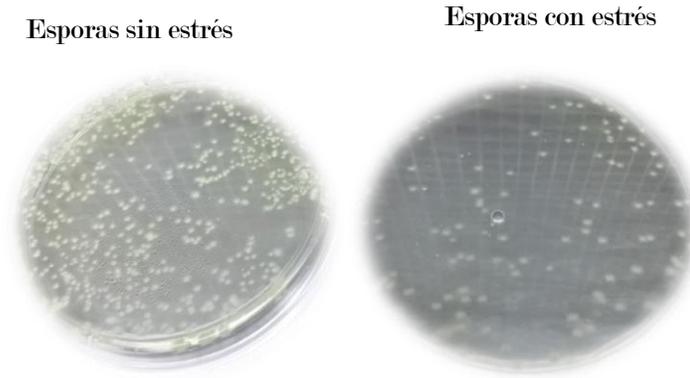


Fig. 31 Transformante 13 con estrés osmótico en esporas. Disminución de crecimiento 62%

En total, 58% de todas las transformantes silenciadas fueron sensibles a estrés osmótico en esporas. En algunos casos se logró cuantificar hasta un 62% más de sensibilidad con respecto a la parental.

7.8.5 Transformantes preseleccionadas con base en la sensibilidad al estrés

En la siguiente figura se muestra el comportamiento de las transformantes ante los dos tipos de estrés probado en esporas, se destaca la diferencia entre el crecimiento de la cepa parental y las cepas silenciadas. Las columnas lisas son las propias a la prueba de estrés oxidante, mientras que las rayadas son las correspondientes al estrés osmótico. La cepa parental está representada por una P y la cepa transformada con el vector de silenciamiento sin inserto se denota con la letra C.

La preselección se realizó para las transformantes silenciadas que fueran más sensibles ante ambos tipos de estrés, estas fueron las T1, T2, T3, T4, T7, T10, T11, T12, T13, T15, T18 Y T22, se destacan la T7, T12 y T13.

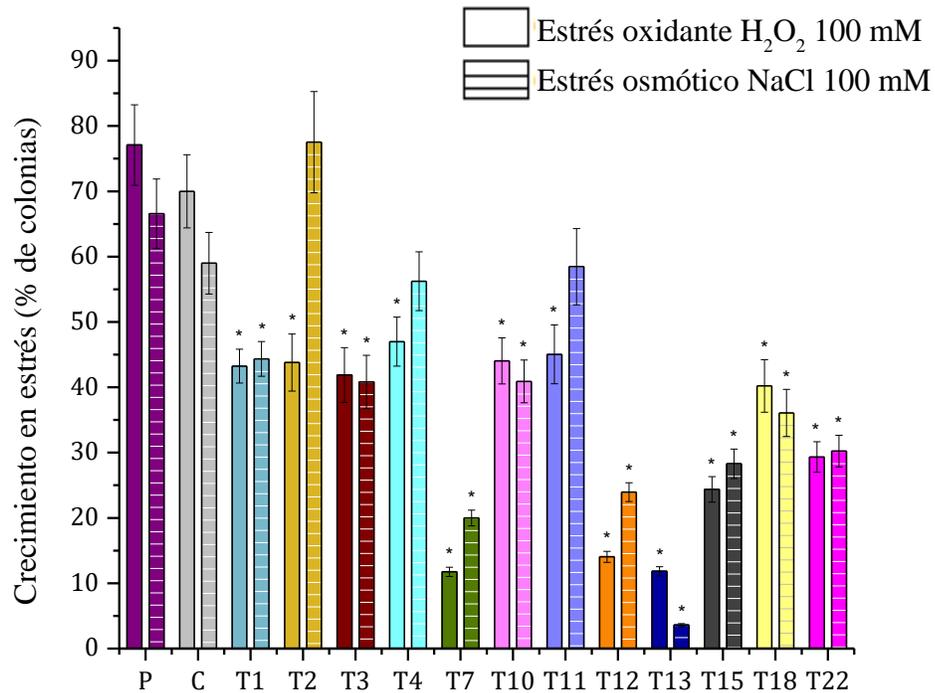


Fig. 32 Transformantes preseleccionadas por su sensibilidad ante el estrés oxidante y osmótico en comparación con la cepa parental.¹

7.8 Producción de lovastatina por las transformantes en medio sólido y líquido.

A continuación, se muestra la producción de lovastatina en FS y FL de las transformantes silenciadas, en cultivos de 96 h. El cual fue el siguiente paso para encontrar el efecto de silenciar el gen *AtattB* en relación con el metabolismo secundario de *A. terreus*.

¹ * Diferencias significativas con respecto a la cepa parental "P". Asumiendo una distribución normal y varianzas iguales en una prueba POST-HOC de Tukey con nivel de significancia <0.01

Fermentación sólida. En la FS, todas las transformantes mostraron una disminución en la producción. Se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en siete de las doce transformantes, las cuales son las T2, T3, T7, T11, T12, T13 y T15. Además, no se encontraron diferencias entre la producción de la cepa parental y la cepa control (transformante con vector sin inserto).

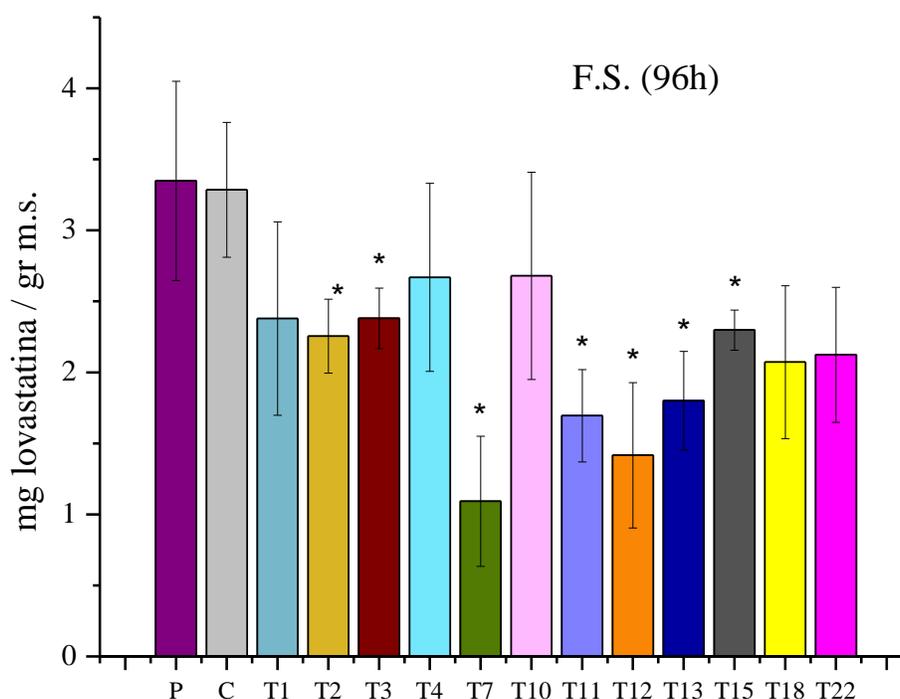


Fig. 33 Producción de lovastatina por FS a las 96 h.²

² * Diferencias significativas con respecto a la cepa parental "P". ANOVA asumiendo una distribución normal y varianzas iguales en una prueba POST-HOC de DMS con nivel de significancia < 0.05

Fermentación líquida. En la FL, la producción subió en 4 transformantes y en las T2, T7, T12 y T13, con significancia estadística ($p < 0.05$), con respecto a la cepa parental y al control.

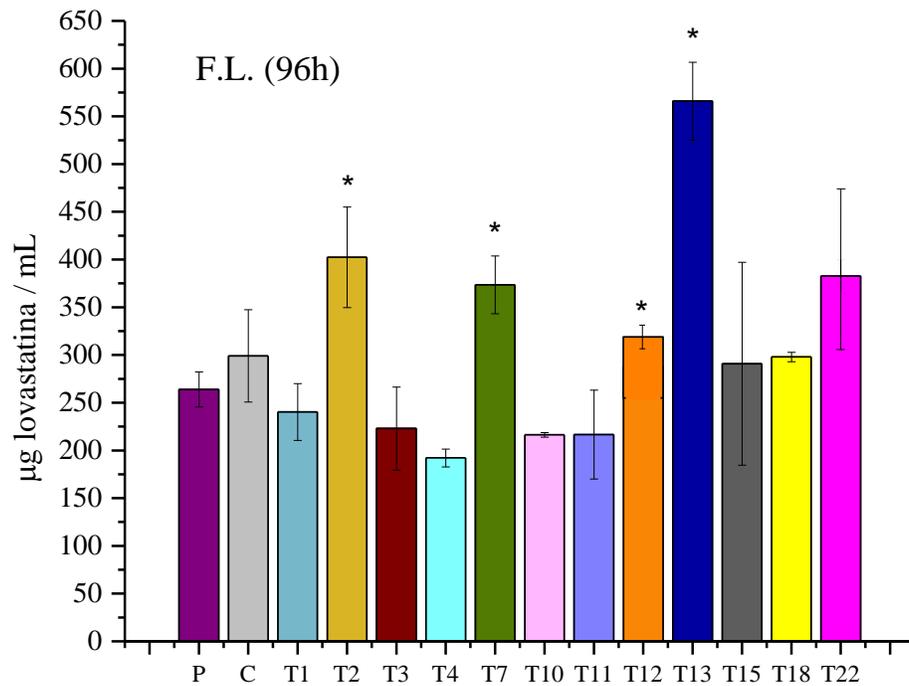


Fig. 34 Producción de lovastatina por FL a las 96 h.³

³ * Diferencias significativas con respecto a la cepa parental "P". ANOVA asumiendo una distribución normal y varianzas iguales en una prueba POST-HOC de DMS con nivel de significancia < 0.05

7.9 Confirmación de la integración del vector de silenciamiento

De las transformantes que presentaron más sensibilidad a estrés oxidante y osmótico, y que además tuvieran un efecto en la producción de lovastatina, se extrajo DNAg para confirmar la integración del vector de silenciamiento al genoma mediante una reacción de PCR con primers que hibridan en los promotores “encontrados” de la construcción. De esta manera se comprobó que las cepas realmente contuvieran la construcción de silenciamiento. Se encontró que las cepas T7, T12, T13 y T18 tienen integrado el vector y son, por lo tanto, transformantes verdaderas.

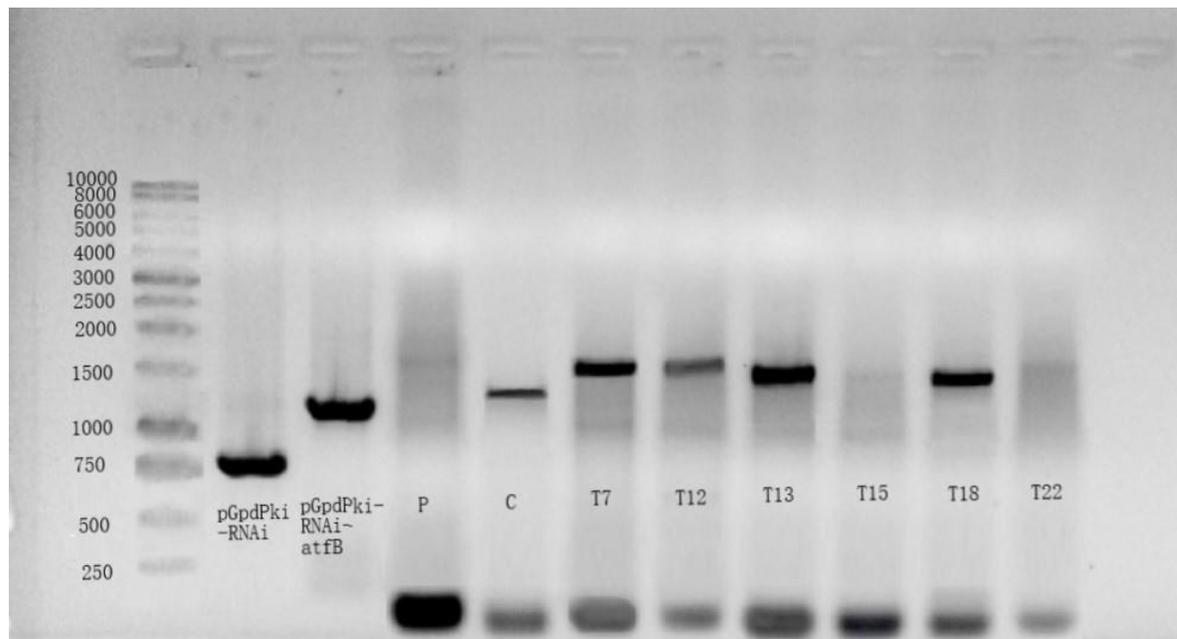


Fig. 35 Gel de agarosa para electroforesis de los productos de PCR de la amplificación del vector de silenciamiento a partir del DNAg de P, C y las *Si $atfB$* con los primers F-pki y RpGd. 1° carril después del marcador: PCR del vector sin inserto purificado; 2° carril: PCR de la construcción del vector de silenciamiento purificado; 3° carril: PCR del DNAg de la parental, sin amplificación; 4° Carril: PCR del DNAg de C vector sin inserto. 6°-10°: PCR del DNAg de transformantes.

7.10 Cinética de producción de lovastatina de las *Si $atfB$* elegidas

Con los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionaron tres transformantes verdaderas, es decir, que tuvieran integrado el vector de silenciamiento, las cuales fueron las más sensibles a los tipos de estrés probados y que además tuvieran un cambio significativo en la producción de lovastatina. Las transformantes elegidas de acuerdo con el análisis anterior fueron las T7, T12 y T13, de éstas se realizó una cinética de producción de lovastatina para analizarlas a profundidad, en comparación de la cepa parental (P) y la cepa control con el vector sin inserto (C).

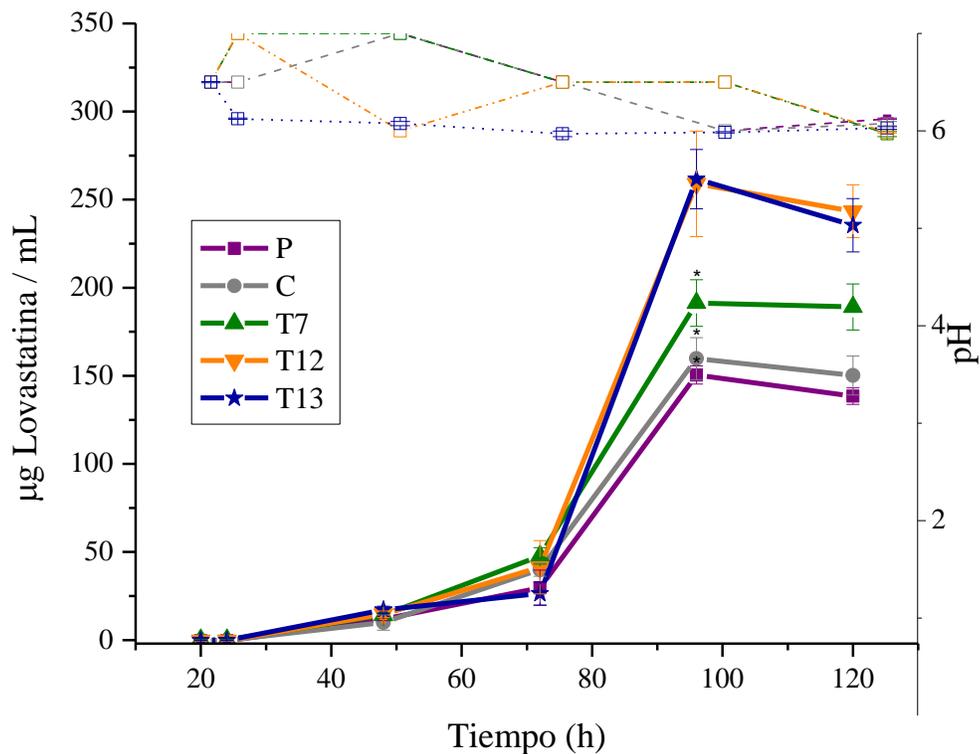


Fig. 36 Cinética de producción de lovastatina por FL y pH en el eje derecho

En la FL se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) de la producción de lovastatina de las tres transformantes, además de que la cepa control y la parental son iguales estadísticamente.

De modo contrario, la cinética de FS muestra una disminución en la producción de las tres cepas silenciadas, mientras las cepas control y parental son iguales. Las cepas silenciadas T7, T12 y T13 bajaron la producción de lovastatina a partir de las 48 h

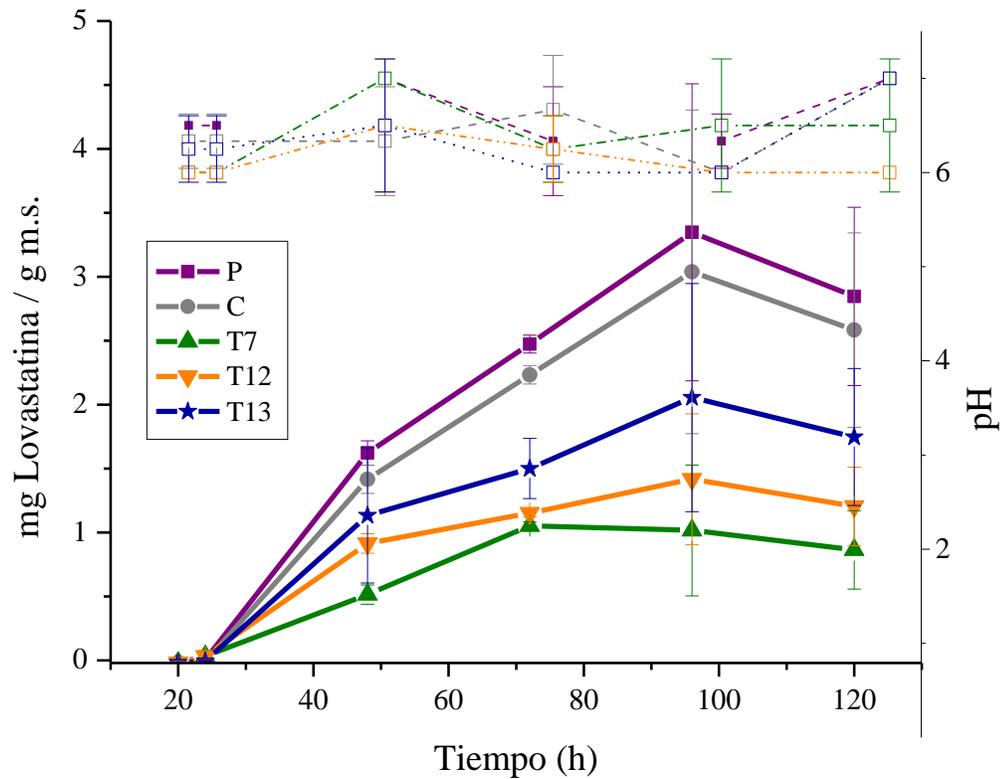


Fig. 37 Cinética de producción de lovastatina por FS y pH en el eje derecho

Las gráficas siguientes muestran la cinética de biomasa en FL y la generación de esporas en la FS como medida indirecta de la biomasa, para asegurar que los resultados anteriores no se deban a una variación de la biomasa. Los resultados confirman la idea anterior, debido a que no se observan diferencias entre las cepas analizadas en ambos casos.

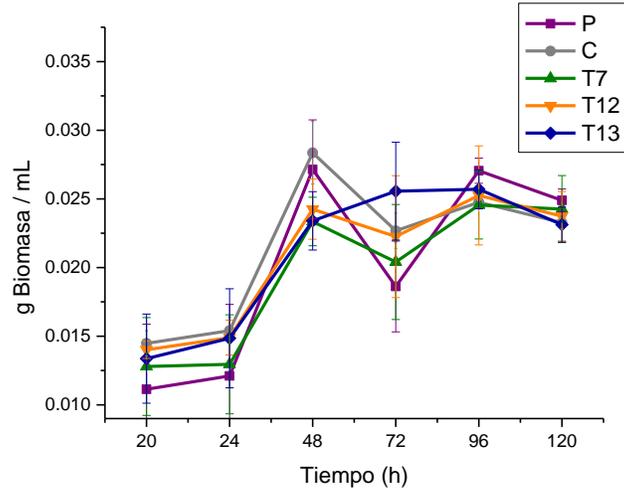


Fig. 38 Biomasa de FL determinada por gr de biomasa seca.

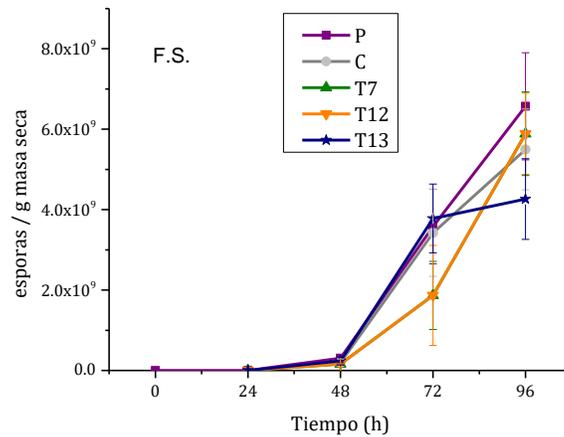


Fig. 39 Esporas de FS por gr de masa seca

7.11 Cinética de acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Con el objetivo de estudiar la relación entre el estrés oxidante y el gen *AtatfB*, se realizó una cinética de la acumulación de las especies reactivas de oxígeno utilizando una sonda fluorogénica no fluorescente ($H_2DCF-DA$), la cual es oxidada por las EROs, y de esta manera, detectada a los 485 nm de excitación y 530 nm de emisión.

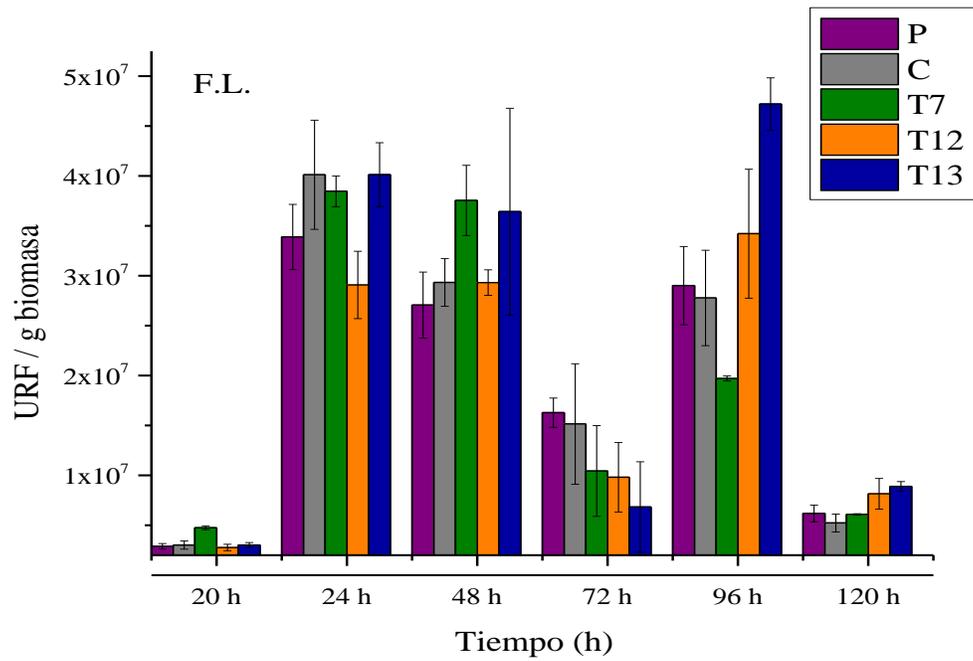


Fig. 40 Cinética de EROs en FL.

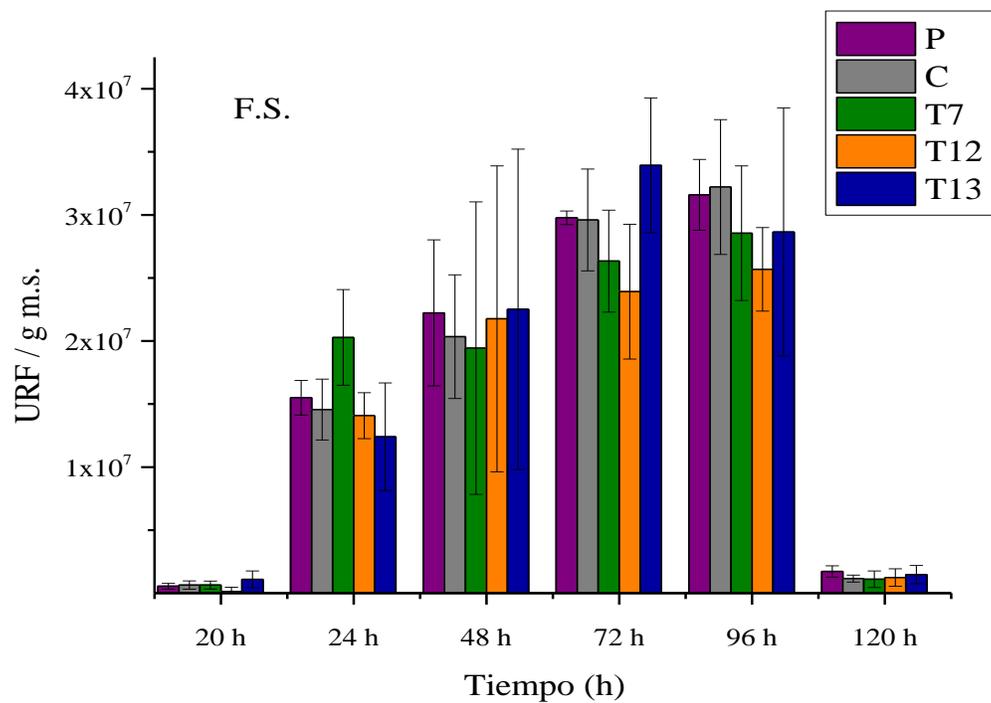


Fig. 41 Cinética de EROs en FS.

Los resultados de ambos sistemas de fermentación indican que en general, no hay un cambio importante entre las cepas analizadas, salvo en algunos casos. Es decir, se observa que las URF (unidades relativas de fluorescencia) se mantienen en un nivel similar, cuando existe realmente una diferencia significativa en la producción de lovastatina en ambos sistemas. Se observa también que en la FS los niveles de acumulación de EROs son menores que los de la FL, pero más estables.

7.12 Evaluación de otras características fenotípica de las transformantes elegidas

Para continuar analizando los posibles efectos de silenciar el gen *AtatfB* se estudió el crecimiento radial en tres medios de cultivo, comparando la cepa parental y la cepa control con las tres transformantes analizadas en cuanto a producción de lovastatina y acumulación de EROs.

7.12.1 Crecimiento radial

En general, no se observaron diferencias en la velocidad del crecimiento radial entre las transformantes analizadas y las cepas parental y control (transformada con el vector sin inserto) en los medios analizados.

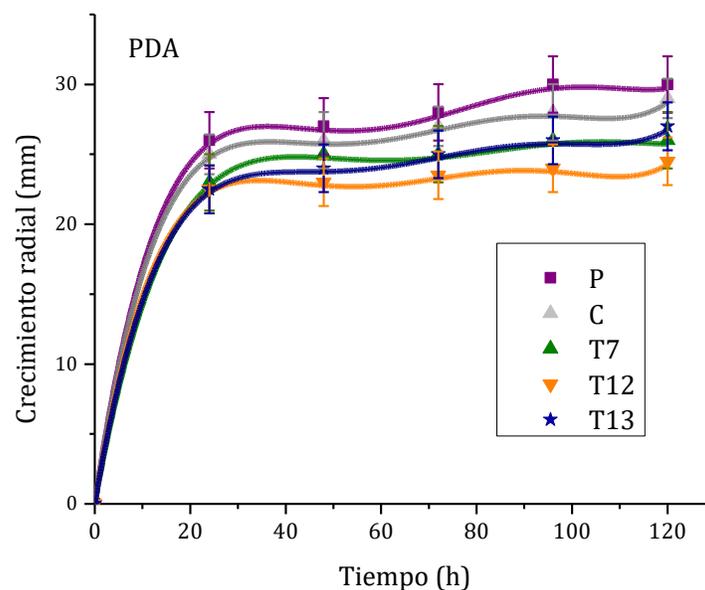


Fig. 42. Crecimiento radial en mm en medio PDA de las transformantes verdaderas.

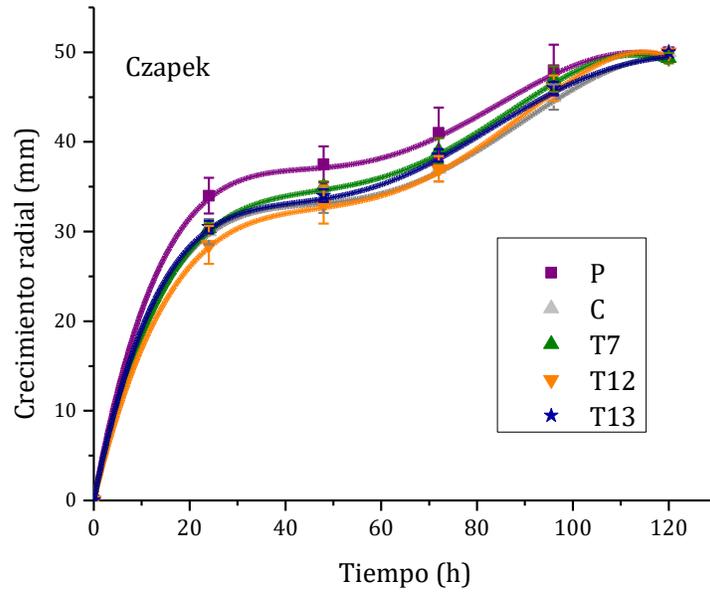


Fig. 43 Crecimiento radial en medio Czapek de las transformantes verdaderas.

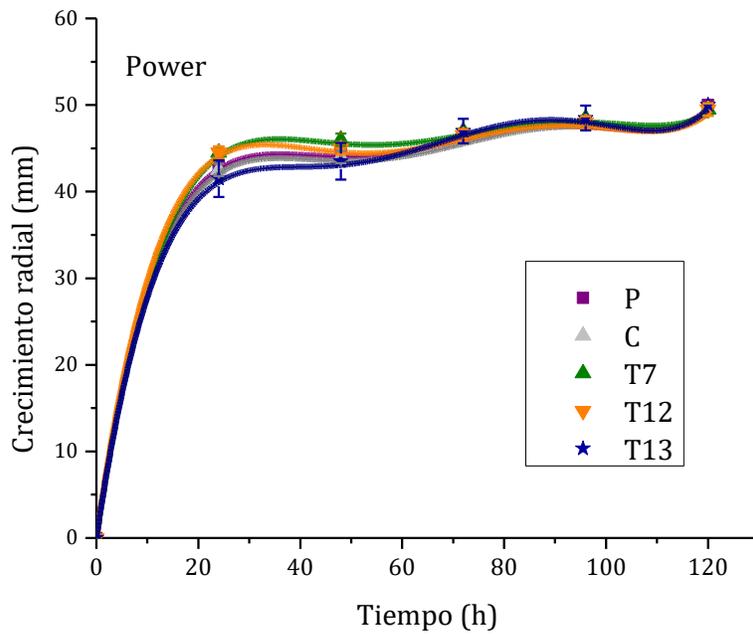


Fig. 44 Crecimiento radial en medio Power de las transformantes verdaderas.

Estadísticamente, no hay evidencia significativa ($p < 0.05$) de diferencias en la velocidad de crecimiento de las *SiatfB* con la cepa parental.

7.12.2 Esporulación

Desde el inicio de la obtención de las transformantes, se observó un inicio precoz en la esporulación, a simple vista, es decir el micelio se comenzó a cubrir de esporas un día antes que la cepa parental. Para comprobar lo observado, se sembró el mismo número de esporas frescas en medio de esporulación para su propagación (6.9.3), se recolectaron con el mismo volumen y se cuantificaron las esporas de cada cepa por triplicado por 7 días. Se observó un inicio precoz entre las 72 y las 96 h de las tres transformantes silenciadas en comparación con las cepas parental y control.

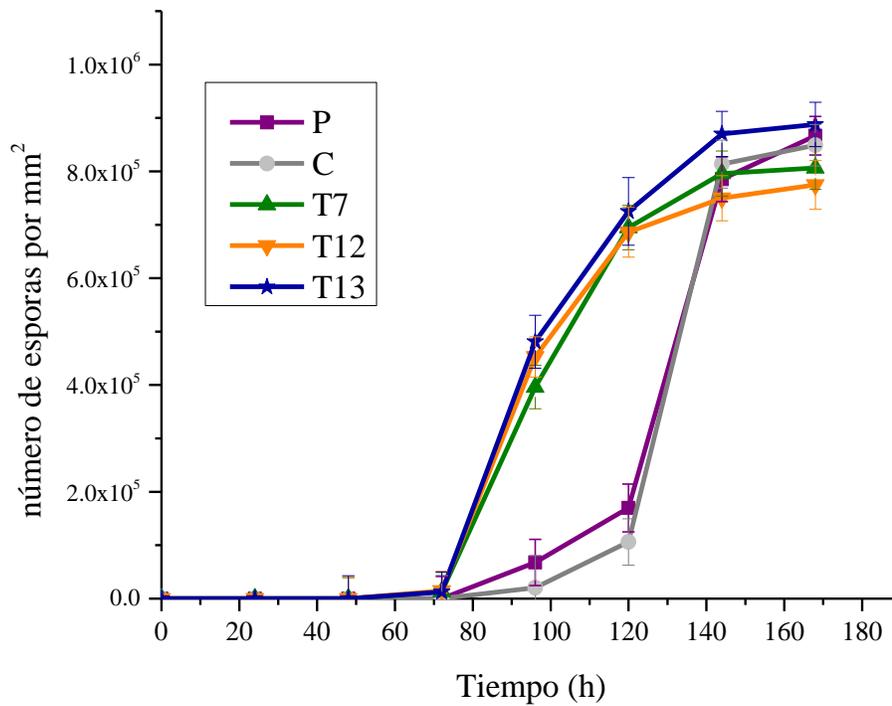


Fig. 45 Comparación de la esporulación de las transformantes verdaderas con la cepa parental.

Finalmente, se resume a continuación las características fenotípicas de las transformantes silenciadas verdaderas. Todas son muy sensibles a estrés oxidante en esporas, también son sensibles a estrés osmótico en esporas; la producción de lovastatina en FS disminuyó, mientras que en FL aumentó; y en las tres SiAtfB analizadas en esporulación se detectó un inicio precoz.

SiAtfB	Sensibilidad a estrés oxidante (%)	Sensibilidad a estrés osmótico (%)	Producción de lovastatina en FS (%)	Producción de lovastatina en FL (%)	Esporulación precoz
T7	63	45	-70	+50	Sí
T12	61	41	-59	+20	Sí
T13	62	62	-44	+124	Sí
T18	51	29	-41	+20	-

Tabla 18. Resumen de los datos del fenotipo de las transformantes confirmadas de integración de la construcción del vector de silenciamiento.

8. Discusión

Las transformantes silenciadas, obtenidas con las estrategias descritas anteriormente, presentaron diferencias fenotípicas en comparación con la cepa parental en cuanto a sensibilidad a estrés oxidante y osmótico; producción de lovastatina en FL y FS; crecimiento y esporulación, como a continuación se discute. Además, se comprobó que la cepa control (transformante con el vector sin inserto), se comporta exactamente igual que la cepa parental, es decir, la integración del vector al genoma de las transformantes no confiere ninguna actividad relevante.

8.1 Sensibilidad de estrés oxidante y osmótico de las *SiattfB*

Estudios de silenciamiento de *attfB* en otras especies de *Aspergillus* indican que existe sensibilidad ante el estrés oxidante cuando se atenúa la expresión del gen en *A. parasiticus*, *A. oryzae* y *A. fumigatus* (Sakamoto *et al.*, 2008; Roze *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017; Wee *et al.*, 2017). También se incrementa la sensibilidad al estrés osmótico en *A. fumigatus* en cepas silenciadas (Pereira *et al.*, 2017), y a su vez en, *A. nidulans* la expresión de *attfB* aumenta en la respuesta del estrés osmótico (Hagiwara *et al.*, 2009). Por lo tanto, el fenotipo esperado para las transformantes silenciadas fue uno con sensibilidad a estrés oxidante principalmente en esporas, así como también con sensibilidad a estrés osmótico, en concordancia con el análisis de interacción de proteínas de AtAtfB (8.1).

Los resultados de la prueba de sensibilidad a estrés oxidante en micelio (7.8.1) indicaron que las transformantes no son hipersensibles a estrés oxidante (H_2O_2 1mM) en trofofase, mientras que siete de las transformantes analizadas presentaron ligera sensibilidad a estrés oxidante en micelio al detectar sensibilidad a concentraciones de peróxido de hidrógeno más altas (4mM).

En cuanto a las esporas, el análisis de la sensibilidad de las transformantes al estrés oxidante con H_2O_2 100 mM (7.8.2), indicó que existe una alta sensibilidad (hasta 63% más sensibles que la sensibilidad de la cepa parental) en los conidios.

En esta etapa se identificaron 12 transformantes con el fenotipo esperado (sensibilidad a estrés oxidante en esporas), con las cuales se realizaron los análisis de caracterización.

Lo anterior concuerda con el reporte de que en *A. oryzae* la expresión de *attfB*, se registra hasta el final de la fase de crecimiento; *attfB* se identificó como un gen con expresión baja en la etapa temprana de crecimiento, pero que incrementaba gradualmente a través de la fase de conidiación en cultivo en

estado sólido de acuerdo con Sakamoto *et al.* (2008). Es por ello por lo que no se encontraron diferencias en el desarrollo del micelio de las transformantes, en comparación de la cepa parental, pero si hubo una alta sensibilidad a estrés oxidante en las esporas de las transformantes. Por lo que *atfB* debe de estar presente en el desarrollo de las esporas del hongo

Debido a que otra característica del fenotipo esperado era sensibilidad a estrés osmótico, se analizó el desarrollo de micelio y viabilidad de las esporas de las transformantes con una concentración de NaCl 1 mM y 100 mM respectivamente. Los resultados indicaron un comportamiento similar al encontrado en los ensayos de estrés oxidante. Es decir, no hubo diferencias en el desarrollo de micelio, pero existió sensibilidad en las esporas. Esto refuerza la idea de que *AtatfB* podría estar involucrado en la defensa ante el estrés oxidante y osmótico durante la fase tardía de crecimiento, o inicio de la idiofase y en la esporulación.

Las doce transformantes seleccionadas de acuerdo con su sensibilidad de ambos tipos de estrés fueron las T1, T2, T3, T4, T7, T10, T11, T12, T13, T15, T18 Y T22 (Fig. 32).

Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios en *A. parasiticus* y *A. oryzae* (Sakamoto *et al.*, 2008; Roze *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017; Wee *et al.*, 2017), en los que se encontró, en cepas interrumpidas en *atfB*, producción de conidios defectuosos en condiciones de ambos tipos de estrés.

8.2 Producción de lovastatina de las *SiatfB* de *A. terreus*

La primera parte de la hipótesis de este trabajo es el factor transcripcional *AtAtfB* está implicado en la regulación de la biosíntesis de lovastatina, como un regulador positivo, por lo que las cepas silenciadas presentarán una disminución en la producción de lovastatina en FS y FL. Para demostrarlo inicialmente se realizaron fermentaciones de punto final (96 h) con las transformantes preseleccionadas de acuerdo con su fenotipo sensible a estrés oxidante y osmótico.

Para comenzar, se observó que la transformante con el vector sin inserto, denominada cepa control (C), se comporta exactamente igual a la cepa parental. Esto indica que la integración del vector sin inserto no confiere características especiales y, por lo tanto, los efectos mostrados en las transformantes se deben al silenciamiento del gen *atfB* por RNAi.

En general, en la FL, con respecto a la cepa parental y al control, la producción sube en las T2, T7, T13 y T18, con significancia estadística ($p < 0.05$). Siendo este el efecto de silenciar el gen entre las transformantes (Fig. 34).

En cuanto a la FS se logró observar un efecto todavía más más claro debido a que todas las transformantes analizadas disminuyeron la producción, en siete de estas se identificó una

disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la producción de lovastatina en este punto (Fig. 33). Estos resultados sugerían que AtfB es un regulador positivo en la FS de lovastatina, mientras que en FL funciona como un regulador negativo. Esto, si comprobamos que no es un efecto indirecto por modificación del perfil de EROs (ver abajo)

Con lo cual se comprueba la hipótesis de que AtAtfB es un regulador positivo en el metabolismo secundario de *A. terreus*, en el sistema de FS, pero se añade la función a AtAtfB como un regulador negativo en el sistema de FL. Lo anterior sujeto todavía a comprobar que no es un efecto indirecto por modificación del perfil de EROs, y si además se comprueba que la construcción de silenciamiento está en el genoma de las transformantes.

Para validar la función de AtAtfB como un regulador del metabolismo secundario asociado al estrés oxidante, se extrajo DNAg de las transformantes que presentaron más sensibilidad a estrés oxidante y osmótico, y que además tuvieran un efecto en la producción de lovastatina. Esto, para confirmar la integración de la construcción al genoma, y así comprobar que las cepas fueran verdaderas transformantes con la construcción de silenciamiento integrada.

Con los resultados mostrados en la Fig. 34 se identificó, a partir de los amplicones del vector de silenciamiento obtenidos por PCR del genoma de las transformantes, a las transformantes verdaderas. Así, se verificó la integración del vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*atfB* en las cepas T7, T12, T13 y T18, indicando que las T15 y T18 aparentemente son falsos positivos.

Para estudiar la producción de lovastatina, se probaron tres transformantes verdaderas con cambios significativos en ambos sistemas de fermentación (T7, T12 y T13), y de éstas se realizó una cinética de producción de lovastatina para analizarlas a profundidad, en comparación de la cepa parental (P) y la cepa control con el vector sin inserto (C).

En la FL se identificó que el punto de producción máximo es a las 96 h, al igual que la FS y al mismo tiempo, se identificó un comportamiento diferente en ambos sistemas. En FS todas las transformantes silencias presentaron una disminución de la producción del metabolito secundario, hasta un 70% (*SiatfB1*). Mientras que en FL el aumento de la producción es hasta un 124% más (*SiatfB13*). Estos resultados confirmaron la función diferencial sólido/líquido de AtfB en la producción de lovastatina por *A. terreus*, que ya sugerían los datos de la sección anterior.

8.3 Acumulación de EROs en la producción de lovastatina por las *SiatfB* de *A. terreus*

Con los resultados obtenidos de la cuantificación de las EROs durante las fermentaciones, se pudo observar que existe una tendencia de igualdad en la acumulación entre las transformantes y la cepa parental. Esto quiere decir, que la disminución de producción no se debe a una baja en la acumulación

de especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, el efecto se debe al silenciamiento del factor transcripcional *atfB*. Lo anterior responde a la segunda parte de la hipótesis, en la cual se indica que los niveles de EROs no presentarán diferencias significativas entre la cepa parental y las transformantes durante la producción del metabolito secundario.

Las diferencias de producción observadas en ambos sistemas de fermentación no se deben a una disminución en la concentración de biomasa a lo largo del tiempo, ni de una disminución en los niveles de las EROs, es decir el efecto sería directamente responsabilidad de la atenuación del gen. Es decir, la disminución de la expresión del factor de transcripción *atfB* conduce a una deficiente activación del factor transcripcional *lovE*, el cual, a su vez, disminuye en este caso la actividad del clúster biosintético de lovastatina. Lo que sugiere que podría suceder lo contrario en el sistema de FL.

Lo anterior es sumamente interesante debido a que se identifica un papel clave de AtfB como nexo entre las EROs y los genes de biosíntesis; pero también sugiere un papel clave en la fisiología en medio sólido. Además, el diferente efecto en FS y en FL podría ser la puerta de entrada al estudio de diferencias genotípicas en la fisiología de ambos medios de fermentación.

En general, los resultados obtenidos concuerdan con el modelo de aflatoxinas propuesto por Roze *et al.* (2011), bajo condiciones de biosíntesis de aflatoxinas se sugiere a AtfB como un regulador positivo en la expresión de los genes de aflatoxinas producidas en caja de Petri, aunque no pensaron que pudiera ser diferente en FL.

Además, en estudios de Wee *et al.*, (2017) se indica que AtfB también podría participar en la respuesta al estrés oxidante porque una mutante interrumpida presentó una disminución en la producción del metabolito secundario, así como también en la formación defectuosa de conidios en condiciones de estrés.

8.2.4 Crecimiento y esporulación.

En los resultados obtenidos en el análisis de crecimiento radial en los tres medios analizados no se encontraron diferencias significativas entre las transformantes y la cepa parental, lo cual indica que *atfB* no interviene en el crecimiento radial de *A. terreus*.

Por el contrario, se encontró un efecto en la esporulación ya que todas las transformantes presentaron un inicio precoz en la esporulación a simple vista. Esto se comprobó con el conteo de las esporas de las transformantes verdaderas, el micelio comenzó a cubrirse con el color café característico de las esporas desde el tercer día de incubación, desarrollando su máxima concentración entre el cuarto y quinto día, mientras que en la cepa parental se inicia la esporulación hasta el quinto día alcanzando

su máximo en el sexto día. Pero el máximo nivel de producción de esporas entre las transformantes y la cepa parental no tienen diferencia, es decir que se alcanza el mismo número de esporas al final.

Estos resultados, junto con el hecho de que no se modificó la acumulación de EROs, indican que AtAtfB está también involucrado en procesos de diferenciación celular, actuando en la conidiación.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo proveen suficiente evidencia para decir que el factor transcripcional AtAtfB está involucrado en la cascada de señalización de defensa ante el estrés oxidante y osmótico, además de tener una función como regulador en el metabolismo secundario en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Fungiendo como regulador positivo en el caso de la FS y como regulador negativo en la FL. Esto es realmente intrigante; es posible que el diferente rol esté relacionado con los factores transcripcionales con que se asocia en uno y otro sistema de cultivo.

Por otra parte, estudios de Hong *et al.* (2013a) asocian a los factores de transcripción AtfB, Ap-1, MsnA y SrrA al proponer que niveles elevados de EROs activan genes de antioxidantes y aflatoxinas por dos vías de transducción de señal. Primero las EROs regulan negativamente la vía cAMP-PKA, lo cual resulta en la unión de MsnA al promotor de los genes de defensa antioxidante. Simultáneamente, las EROs activan la cascada de señalización SAPK/MAPK a través de un sistema de fosforilación multipaso, la cual resulta en la unión de AtfB y SrrA a los promotores y en la inducción de genes antioxidantes. Entonces MsnA, AtfB y SrrA (SrrA resulta a AP-1) se unirían a los promotores de genes biosintéticos de aflatoxinas.

Con lo anterior, junto con los resultados obtenidos en esta tesis, se propone que AtAtfB es una clave en el circuito regulatorio que integra al metabolismo secundario y la respuesta celular al estrés oxidante.

9. Conclusiones

(1) Se identificó a *AtatfB* en *Aspergillus terreus*, se clonó un fragmento del gen y se construyó el vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*AtatfB*. Las transformantes silenciadas presentaron el siguiente fenotipo:

- Las Si*AtatfB* no son hipersensibles a estrés oxidante ni osmótico en micelio, aunque el 25 % de ellas fueron ligeramente sensibles.
- 61.5% de las Si*AtatfB* fueron **sensibles a estrés oxidante en esporas**, hasta un 63% más sensibles que la cepa parental.
- 58% de las Si*AtatfB* fueron **sensibles a estrés osmótico en esporas**, hasta 62% más que la parental.
- Se seleccionaron las Si*AtatfB* sensibles a ambos tipos de estrés. De estas, **todas presentaron un decremento de hasta 70 % en la producción de lovastatina en FS.**
- En FL, de las Si*AtatfB* sensibles a ambos tipos de estrés, **un tercio presentó un aumento significativo en la producción de lovastatina de hasta 124%**. El resto de ellas no tienen diferencia de producción con la cepa parental.
- Se confirmó que de las seis Si*AtatfB* sensibles a ambos tipos de estrés y que tienen diferencias de producción de lovastatina (en ambos sistemas de fermentación), **cuatro tienen integrado el vector de silenciamiento, es decir, son transformantes verdaderas.**
- Las Si*AtatfB* verdaderas no presentaron cambios en el crecimiento en comparación con la cepa parental.
- Las Si*AtatfB* verdaderas mostraron un **inicio precoz en la esporulación**, pero al final alcanzaron el mismo número de conidios que la cepa parental.

(2) No se presentaron diferencias importantes en la acumulación de EROs entre la cepa parental y las Si*AtatfB* verdaderas. Esto demostró que el efecto de debe directamente al silenciamiento del factor transcripcional AtAtfB.

(3) Se demostró que **AtAtfB actúa como regulador positivo en la producción de lovastatina en FS, y en contraste, funciona como un regulador negativo en FL.**

(4) AtAtfB es **un nexo en el circuito regulatorio que integra al metabolismo secundario y la respuesta celular al estrés oxidante**, además de que se encuentra **involucrado en la diferente fisiología que muestran los hongos en FS y FL.**

10. Perspectivas

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo proveen suficiente evidencia para decir que el factor transcripcional AtfB está involucrado en la cascada de señalización de defensa ante el estrés oxidante y osmótico, además de tener una doble función como regulador positivo en el metabolismo secundario en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*, en el sistema de FS y como regulador negativo en el sistema de FL. Con lo anterior se propone que AtfB es una clave en el circuito regulatorio que integra al metabolismo secundario y la respuesta celular al estrés oxidante de manera distinta en ambos sistemas de fermentación. Para continuar con el estudio de este gen y seguir confirmando la hipótesis inicial se podrían elaborar ensayos de unión al promotor de *lovE*, el cual es el regulador específico del clúster biosintético de lovastatina. Además de analizar a mayor profundidad su intervención en la cascada de señalización proveniente del estímulo por parte de las EROs en la vía de señalización cAMP-PKA y describir la activación del factor transcripcional proveniente de la cascada de señalización de la vía de las MAP kinasas. Estudiar los mecanismos de regulación que difieren en la FS y la FL a partir de lo obtenido. Por otra parte, es necesario realizar estudios de expresión génica, en donde se demuestre la atenuación de la expresión del gen *atfB* en de las transformantes, la validación de ellas se realizará con Southern-Blot y Northern-Blot.

11. Referencias

1. Agarwal M., Sahi C., Katiyar-Agarwal S., Agarwal S., Young T., Gallie D.R., Sharma V.M., Ganesan K., Grover A. (2003). Molecular characterization of rice HSP101: complementation of yeast HSP 104 mutation by disaggregation of protein granules and differential expression in Indica and japonica rice types. *Plant Mol. Biol.* 51, 543-553.
2. Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in microbiology*, 13(3), 111-118.
3. Aguirre, J., Hansberg, W. & Navarro, R. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 44, 101–107.
4. Alberts, A. W. (1988). Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American journal of cardiology*, 62(15), J10-J15.
5. Ávila-Cisneros N. (2009). Efecto del contacto con el aire, el estrés osmótico y el estímulo de exploración del micelio sobre la producción de lovastatina en *Aspergillus terreus*. Tesis (Maestría en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.
6. Baños, J. G (2010) Producción de lovastatina en fermentación sólida sobre soporte inerte artificial, por una cepa silvestre de *Aspergillus terreus* (TUB f-514) y por sus mutantes resistentes a estrés osmótico y a estrés oxidante. Tesis (Doctorado en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
7. Baños, J. G., Tomasini, A., Szakács, G., & Barrios-González, J. (2005). Fisiología y producción de lovastatina de *A. terreus* en fermentación sólida de dos fases. Morelia, Michoacán, México: VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos.
8. Baños, J. G., Tomasini, A., Szakács, G. & Barrios-González, J. (2009). High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: an artificial inert support. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 105-110.
9. Barrios-González, J. & Miranda, R. U (2010). Biotechnological production and applications of statins. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(4), 869-883.
10. Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185.
11. Barrios-González, J., Fernández, F. J. & Tomasini, A. (2003). Production of microbial secondary metabolites and strain improvement. *Microbial Biotechnology*, 322-333
12. Barrios-González, J., Baños, J. G., Covarrubias, A. A. & Garay-Arroyo, A. (2008). Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(2), 179.

13. Bibián-León, M. E. (2015). Papel de los genes *srrA* y *msnA* en la biosíntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Tesis (Maestría en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
14. Blomberg A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptatio to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett.* 182, 1-8
15. Cárdenas-Rodríguez, N. & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*, 17(2), 164-173.
16. Elejalde Guerra, J. I. (2001). Estrés oxidante, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de medicina interna*. 18(6), 50-59.
17. Fernández J., Hernández M., Ríos G. y Gutiérrez C. (2003). Cholesterol biosynthetic pathway. *J. Antibiot.* 16, 234-246.
18. Fillinger, S., Chaverche, M. K., Van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., & d'Enfert, C (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 147(7), 1851-1862.
19. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 806-811.
20. Foleh-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledias, F. & Covarrubias, A. A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista latinoamericana de microbiología*. 46, 24-46.
21. Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Yoshimi, A., Mizuno, T. & Abe, K. (2009). Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genetics and Biology*, 46(11), 868-878.
22. Hohmann S. (2003) Osmotic Stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol. Mol. Biol.* 66, 300-372
23. Hong, S. Y. & Linz, J. E. (2008). Functional expression and subcellular localization of the aflatoxin pathway enzyme Ver-1 fused to enhanced green fluorescent protein. *Applied and environmental microbiology*, 74(20), 6385-6396.
24. Hong, S. Y., Roze, L. V. & Linz, J. E. (2013a). Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins*, 5(4), 683-702.
25. Hong, S. Y., Roze, L. V. & Linz, J. E. (2013b). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiol. Open*, 2, 144-160.
26. Keller, N.P., Turner, G. & J.W. Bennett. (2005). Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Reviews/Microbiology*. 3, 937-947

27. Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., and Yanagawa H. (2009) Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10171-10176.
28. Lee, L. W., Chiou, C. H. & Linz, J. E. (2002). Function of native OmtA in vivo and expression and distribution of this protein in colonies of *Aspergillus parasiticus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5718-5727.
29. Lee, L. W., Chiou, C. H., Klomparens, K. L., Cary, J. W. & Linz, J. E. (2004). Subcellular localization of aflatoxin biosynthetic enzymes Nor-1, Ver-1, and OmtA in time-dependent fractionated colonies of *Aspergillus parasiticus*. *Archives of microbiology*, 181(3), 204-214.
30. Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiartman, S., & Ramakrishna, S. V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), 258-265.
31. López, J. C., Pérez, J. S., Sevilla, J. F., Fernández, F. A., Grima, E. M., & Chisti, Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus* effects of the C: N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and microbial technology*, 33(2-3), 270-277.
32. Manzoni, M. & Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 555-564.
33. Marcial Quino, J. (2011). Identificación de un aspartato proteasa producida por *Amylomyces rouxii*, silenciamiento del gen que la codifica y efecto sobre la actividad tirosinasa. Tesis (Doctorado en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
34. Martínez Sánchez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(3).
35. Menke, J., Weber, J., Broz, K. & Kistler, H. C. (2013). Cellular development associated with induced mycotoxin synthesis in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 8(5), 63077.
36. Miranda Labra, R. U. (2013). Relación del estrés oxidante con la biosíntesis de lovastatina por *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida. Tesis (Doctorado en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.
37. Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mejía, A. & Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: differences and similarities in submerged-and solid-state fermentations. *Fungal biology*, 117(2), 85-93.
38. Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mendoza, M., Pérez-Sánchez, A., Fierro, F. & Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal biology*, 118(12), 979-989.
39. Moye-Rowley, W., (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 381

40. Nakayashiki H. (2005). RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett.* 579, 5950-5957.
41. Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., and Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, 18(8), 356-360
42. Pandey, A., Soccol, C. R., Rodríguez-León, J. A., & P. Nigam. (2001). Solid-State Fermentation in Biotechnology Fundamentals and Applications. *Asia Tech Publishers*, 100–221.
43. Pereira Silva, L., Alves de Castro, P., Reis, T. F., Paziani, M. H., Von Zeska Kress, M. R., Riaño-Pachón, D. M. & Goldman, G. H. (2017). Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakAHOG1 and MpkC dependent. *Cellular microbiology*, 19.
44. Pérez Sánchez, A. (2014). Efecto de los estímulos del medio sólido: contacto directo con el aire y estímulo del soporte, en la producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Tesis (Maestría en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
45. Pérez Sánchez, A. (2018). Regulación y producción de las EROs durante la FS y FL de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Tesis (Doctorado en Biotecnología). México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana
46. Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J.M. Hohmann S. Ammerer G. y Ruis H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires MsnIp and the novel nuclear factor HotIp. *Mol Cell Biol*, 19, 5474-5485
47. Reverberi, M., Gazzetti, K., Punelli, F., Scarpari, M., Zjalic, S., Ricelli, A. & Fanelli, C. (2012). AoyapI regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(5), 1293-1304.
48. Romano N., Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343-3353.
49. Roussos, S. & Perraud-Gaime, I. (1996). Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. *Fonds documentaire ORSTOM*.
50. Roze, L. V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D. & Linz, J. E. (2011). Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *aspergilli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35137-35148.
51. Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., Kobayashi, K., Mizuno, A., Akita, O. & Gomi, K. (2009). *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 887-897.
52. Sambrook J., Russell D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

53. Samiee, S. M., Moazami, N., Haghghi, S., Aziz Mohseni, F., Mirdamadi, S., & Bakhtiari, M. R. (2003). Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal*, 7(1), 29-33.
54. Briesemeister, S., Rahnenführer, J., & Kohlbacher, O. (2010). Going from where to why interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics*, 26(9), 1232-1238.
55. Suryanarayan, S. & Mazumdar, K., 2003. Patent US6664095 - Solid state fermentation
56. Szakács, G., G. Morovján Y R.P. Tengerdy. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*, 20(4), 411-415.
57. Ullán, R. V., Godio, R. P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R., Kosalkova, K. & Martín, J. F. (2008). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. validation studies using β -lactam genes expression. *Journal of microbiological methods*, 75(2), 209-218.
58. Wee, J., Hong, S. Y., Roze, L. V., Day, D. M., Chanda, A. & Linz, J. E. (2017). The Fungal bZIP Transcription Factor AtfB Controls Virulence-Associated Processes in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins*, 9(9), 287.
59. WHO. (24 de mayo de 2018). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de Las 10 principales causas de defunción: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
60. Yancey P., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. y Somero G.N: (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-1222
61. Yang, D.-J. & Hwang, L.S., (2006). Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. *Journal of chromatography*, 1119(1-2), 277-284

12. ANEXOS

Anexo I. Análisis bioinformático de AtAtfB

- Predicción de sitios de unión de importinas

Predicted NLSs in query sequence	
MNNFFHHGDMDNFHLVVRNGQPTPPPFDEPRASVASSFQYPALSPENYS	50
PPDSANGATGSSGGRRRKIEDTDGGADEETAKRRRFLERNRLAASKCRQK	100
KKMEAQMLEQKCEKETKRRLSLNRQVRDHREELIDLRGLLLAHAGCGNPA	150
IDRYLAKMVATITPIKDHGGNSDKEDSPPTIDVPAADPDMSSQPLFFGFD	200
GGQSPGPPSDSMEPSFMVDTFDDFIYQDE	229

Fig. 46 Predicción de importinas α -dependientes de NLS en la posición 65 a 86 en la secuencia de aminoácidos de AtAtfB por cNLS Mapper

- Modelo de interacción de AtfB asociada a otras proteínas, basándose en datos experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones. Software STRING

Para AtfB de *A. terreus* se obtiene la siguiente red de interacción proteína-proteína donde los nodos representan las proteínas con sus respectivos códigos en la base de datos del NCBI y las líneas las interacciones entre ellas.

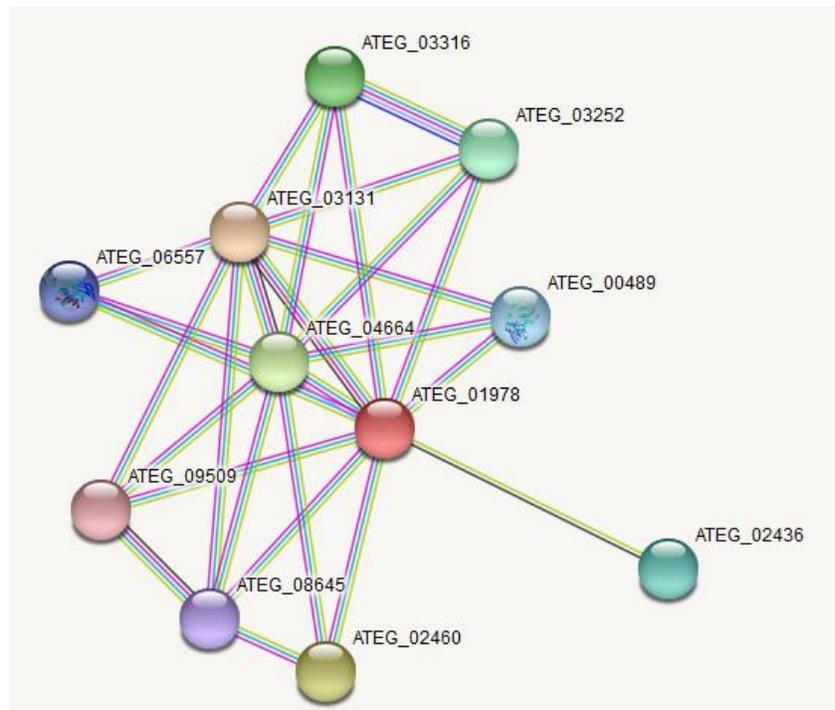


Fig. 47 Modelo de la red de interacción proteína-proteína de AtAtfB asociada a otras proteínas, basándose en datos experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de publicaciones. Software STRING

A continuación, se enlista a detalle los dominios presentes en cada proteína de la red de interacción y el score del análisis.

Código	Dominios
<p>ATEG_01978 AtfB 299 aa</p>	<p>0 100 200</p> <p>Dominio bZIP de factor de transcripción Posición 78 de 142</p>
<p>ATEG_04664 AtfA 536 aa</p>	<p>0 100 200 300 400 500</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pfam Aft1_OSA: región encontrada en el factor de transcripción Aft1, el cual es requerido en la respuesta a un amplio rango de estreses. El dominio OSM está involucrado en la respuesta al estrés osmótico. Posición 48 a 106 • Pfam Aft1_HRA y Aft1_HRR: Estos dominios se encuentran en el factor de transcripción Aft1 que se requiere para una amplia gama de respuestas al estrés. Los dominios HRA y HRR están involucrados en la recombinación meiótica.
<p>ATEG_00489 318 aa</p>	<p>0 100 200 300</p> <p>Fosforilación de proteínas. Posición 26 a 253</p>
<p>ATEG_09509 484 aa</p>	<p>0 100 200 300 400</p> <p>Histona desacetilasa. La regulación de la transcripción es, en parte, modulada por acetilación de histonas reversible en varias lisinas. Posición 59 a 358</p>
<p>ATEG_00489 318 aa</p>	<p>0 100 200 300 400</p> <p>homology model (Q0D0P5 / 3gc8A) identity: 50.3%</p> <p>Proteín kinasa activada por mitógeno hog1; La proteín kinasa activada por mitógeno participa en una vía de transducción de señales que se activa por cambios en la osmolaridad del entorno extracelular. Controla la regulación osmótica de la transcripción de genes diana</p>
<p>ATEG_06557 393 aa</p>	<p>0 100 200 300 400</p> <p>homology model (Q0CIC7 / 4lopA) identity: 51.3%</p> <p>Proteín kinasa activada por mitógeno MpkC; La proteín kinasa activada por mitógeno se requiere para el crecimiento en medios donde el sorbitol o el manitol es la única fuente de carbono; Pertenece a la superfamilia de la proteín kinasa. Familia de la proteín kinasa Ser / Thr. Subfamilia MAP kinasa. HOG1 sub-subfamilia. Posición 19 a 321</p>
<p>ATEG_03131 253 aa</p>	<p>0 100 200</p> <p>Dominio de bZIP: Proteína A de control de cross-pathway. Posición 194 to 253</p>

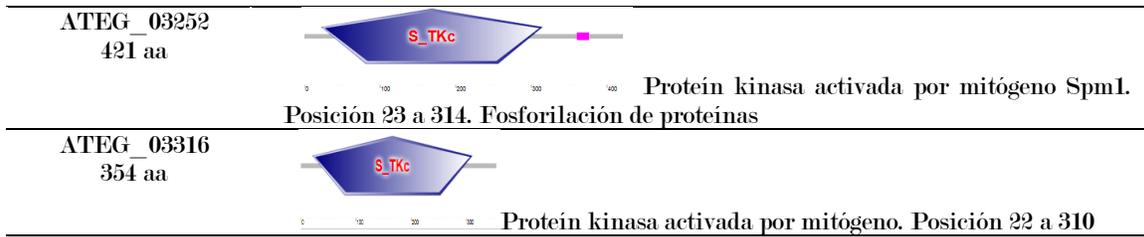


Tabla 19. Resumen de interacciones de proteínas con AtfB

Anexo II. Diseño de primers

El diseño de los primers se hizo sobre el exón de mayor longitud y con las siguientes condiciones: Fragmento del gen entre 300-800 pb; oligos entre 18-30 pb; oligos con secuencia para corte con la enzima de restricción *NcoI*; T_m mayor a 55°C; oligos sin “strings” (CCC o GGG); al final del oligo debe haber una “pinza” (GG o CC). Además, se analizó que los primers no hibridaran entre sí (utilizando como herramienta el programa BioEdit™), ni más de una vez en el genoma de *A. terreus* NIH2624.

Aspergillus terreus NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) partial mRNA (XM_001211156.1)

5' C 3'

ATGAATAACTTCCCCTTCCACCACGGCGACATGGATAACTTCCACTTCC TTGTTTCGCAACGGCCAGCCCACC
 CCACCGCCGTTTGACGAGCCACGGGCTCGGTGGCTTCCTCCTTTCAGTACCCCGCGCTGTCGCCGAAAACCT
 ACAGCCCTCCCGACAGTGCACAACGGCGCCACCGGCTCCTCGGGTGGTTCGTCGACGCAAAATCGAGGACACC
 GACGGGGGCGCCGACGAGGAGACGGCGAAGCGCCGGCGATTCTAGAGCGCAACCGGCTCGCGGCCAGCA
 AATGCCGCCAAAAGAAGAAGATGGAGGCGCAGATGCTGGAGCAGAAGTGCAGAAAAGAGACGAAAACGG
 AGACTGTCTCTTAATAGACAGGTCCGTGATCATCGAGAGGAATTGATCGATCTGAAGGGGCTCCTGTGG
 CGCATGCCGGCTGCGGCAACCCAGCAATCGACCGGTACCTGGCAAAGATGGTGGCTACGATCACCCCATC
 AAAGATCACGGGGGGAACAGCGACAAGGAGGATTCACCTCCTACAATCGACGTGCCTGCCGCCACCCGG
 ACATGTCTCCTCGCAGCCGCTATTTTTTGGGTTCGATGGGGGCCAGTCCCCGGGGCCTCCATCCGATAGTATG
 GAACCGTCGTTTATGGTTGACACCTTCGACGATTCATCTATCAGGATGAATAA

Secuencia 5' → 3'	T_m (°C)	Longitud de Oligos (pb)
F1 GCGCCATGGATAACTTCCACTTCC	62.2 °C	24
F2 GAGCCATGGGCTCGG	58 °C	16
R1 GTTCCATACTATCCCATGGAGGCC	61 °C	24
R2 CTTCATGGGGGTGATCGTAGCC	61.5 °C	23

Anexo III. Secuencia obtenida del fragmento amplificado por los primers diseñados FIR2, correspondiente a *AtatfB*.



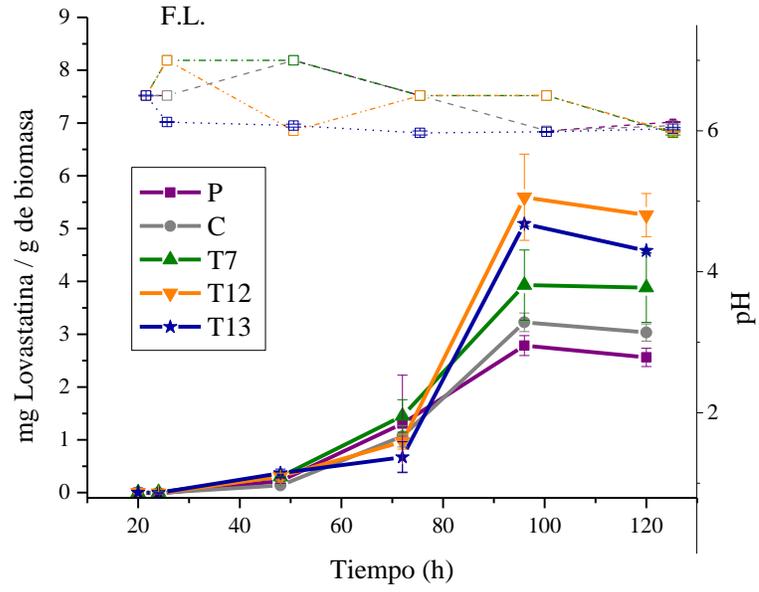
Anexo IV. BLAST de la secuencia obtenida de *AtatfB* con *atfB* de *A. terreus* NIH2624

Job Title	XM_001211156:Aspergillus terreus NIH2624 predicted...
RID	WMK4ZTA114 Search expires on 11-13 13:09 pm Download All ▾
Program	Blast 2 sequences Citation ▾
Query ID	XM_001211156.1 (nucleic acid)
Query Descr	Aspergillus terreus NIH2624 predicted protein (ATEG_01978) ...
Query Length	690
Subject ID	lcl Query_35933 (dna)
Subject Descr	None
Subject Length	591
Other reports	MSAviewer ?

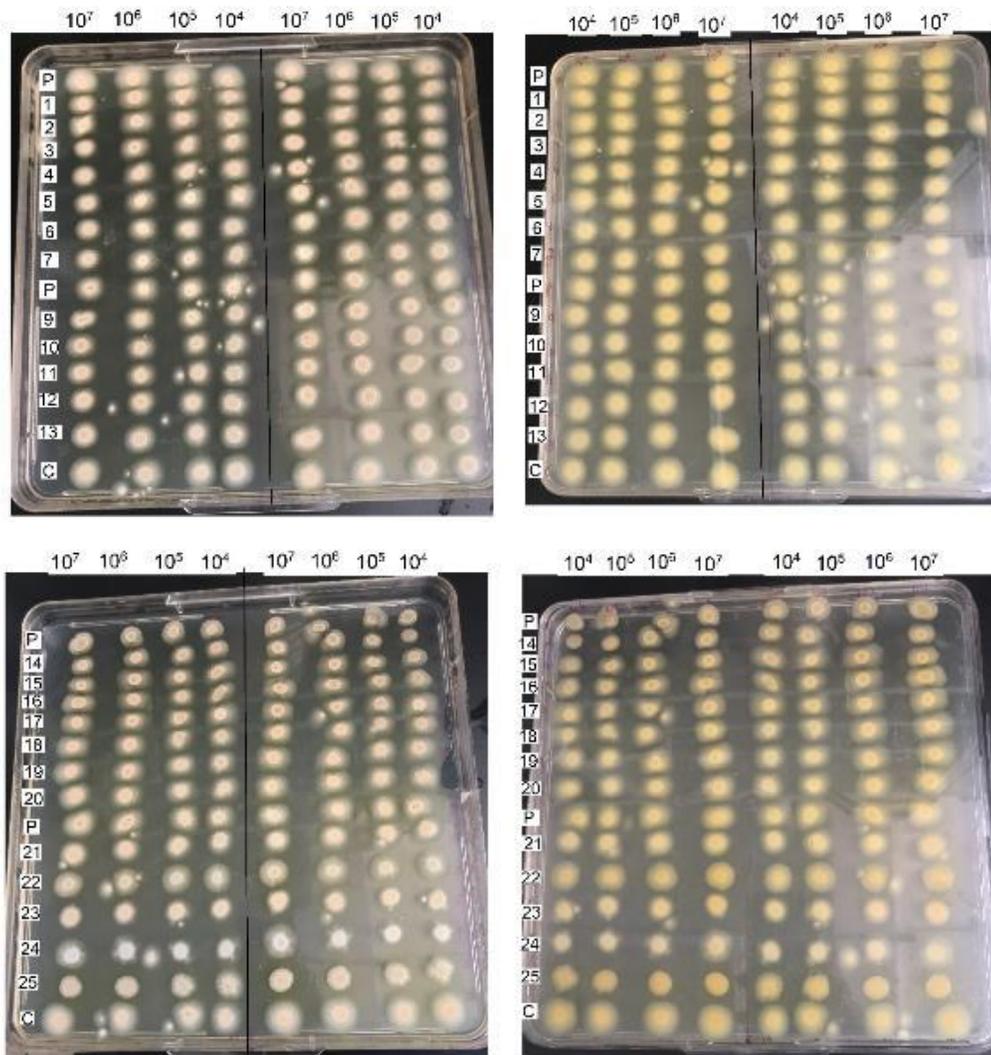
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> None provided	749	749	61%	0.0	98.58%	Query_35933

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
749 bits(405)	0.0	417/423(99%)	0/423(0%)	Plus/Plus
Query 69	CACCCACCGCCGTTTGACGAGCCACGGGCTCGGTGGCTCCTCCTTTCAGTACCCCGC	128		
Sbjct 13	CACCCGCGCCGCGTTTGACGAGCAACGGGCTCGGTGGCTCCTCCTTTCAGTACCCCGC	72		
Query 129	GCTGTGCGCCGAAAACACTACAGCCCTCCCGACAGTGCCACGGCGCCACCGGCTCCTCGGG	188		
Sbjct 73	GCTGTGCGCCGAAAACACTACAGCCCTCCCAACAGTGCCACGGCGCCACCGGCTCCTCGGG	132		
Query 189	TGGTCGTCGACGAAAATCGAGGACACCGACGGGGCGCCGACGAGGAGACGGCGAAGCG	248		
Sbjct 133	TGGTCGTCGACGAAAATCGAGGACACCGACGGGGCGCCGATGAGGAGACGGCGAAGCG	192		
Query 249	CCGGCGATTCTAGAGCGCAACCGGCTCGCGGCCAGCAAATGCCGCCAAAAGAAGAAGAT	308		
Sbjct 193	CCGGCGATTCTAGAGCGCAACCGGCTCGCGGCCAGCAAATGCCGCCAAAAGAAGAAGAT	252		
Query 309	GGAGGCGCAGATGCTGGAGCAGAAGTGCAGAAAAGAGACGAAACGGAGACTGTCTCTTAA	368		
Sbjct 253	GGAGGCGCAGATGCTGGAGCAGAAGTGCAGAAAAGAGACGAAACGGAGACTGTCTCTTAA	312		
Query 369	TAGACAGGTCGGTGATCATCGAGAGGAATTGATCGATCTGAAGGGGCTCCTGCTGGCGCA	428		
Sbjct 313	TAGACAGGTCGGTGATCATCGAGAGGAATTGATCGATCTGAAGGGGCTCCTGCTGGCGCA	372		
Query 429	TGCCGGCTGCGGCAACCCAGCAATCGACCGGTACCTGGCAAAGATGGTGGCTACGATCAC	488		
Sbjct 373	TGCCGGCTGCGGCAACCCAGCAATCGACCGGTACCTGGCAAAGATGGTGGCTACGATCAC	432		
Query 489	CCC 491			
Sbjct 433	CCC 435			

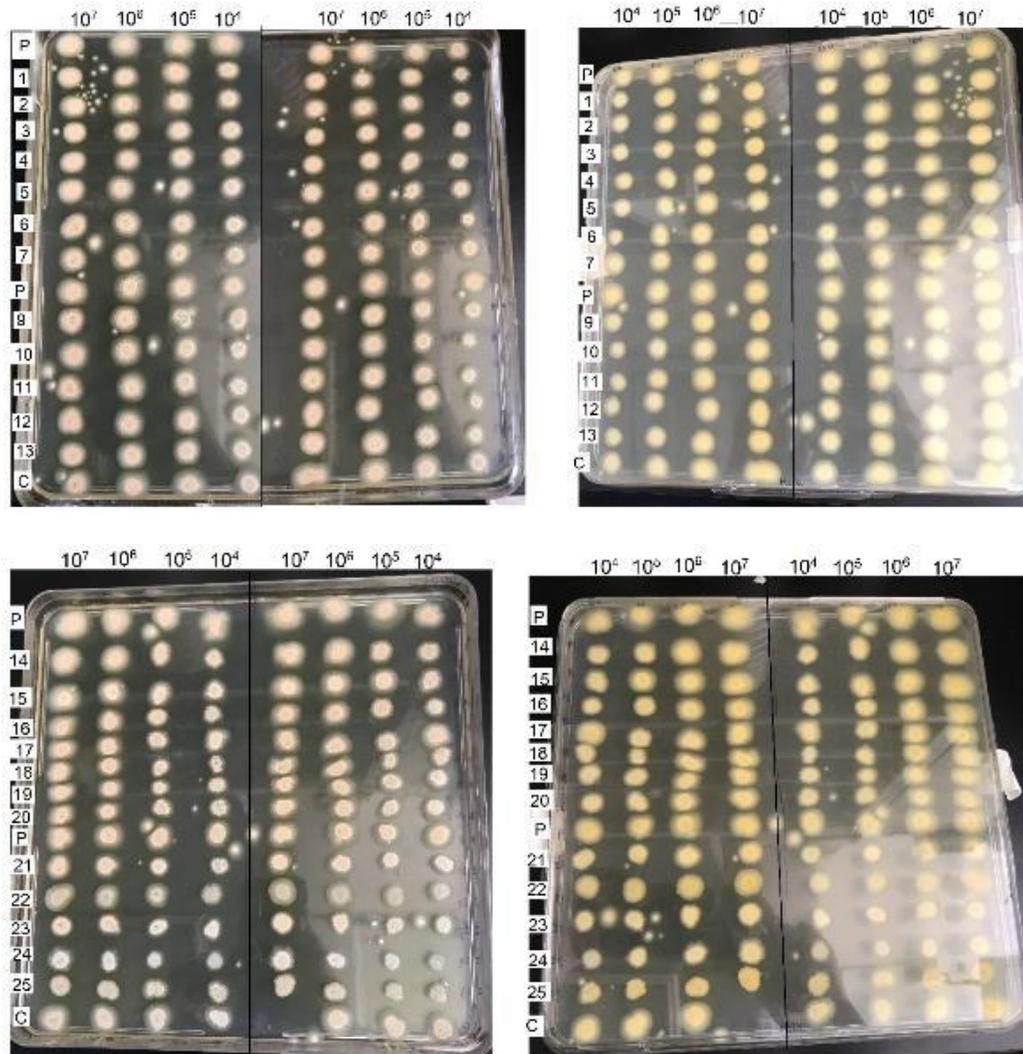
Anexo V Cinética de producción específica de lovastatina en FL de las transformantes



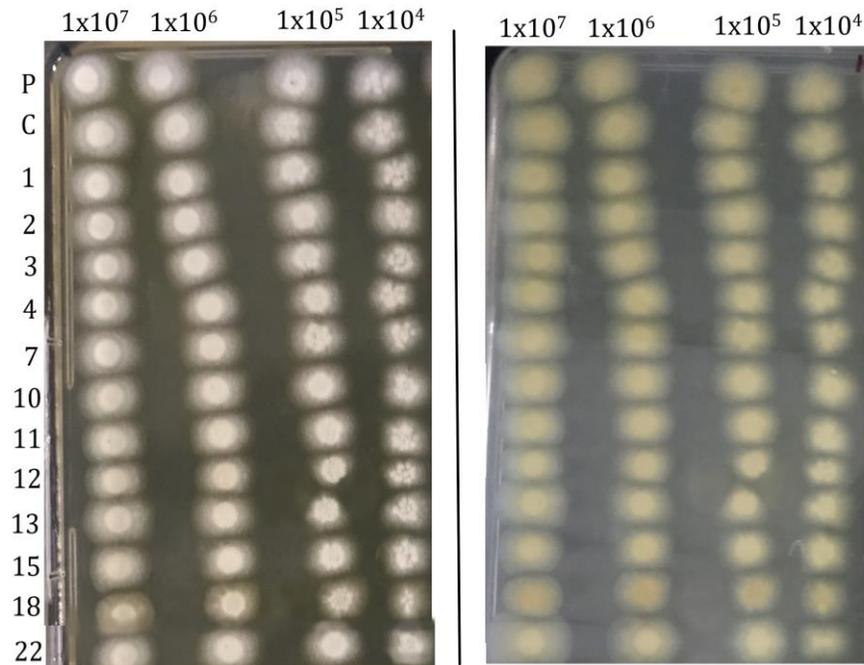
Anexo VI. Medio PDA sin H₂O₂. Izquierda: vista frontal, derecha: vista posterior. P: parental, C: control (vector sin inserto)



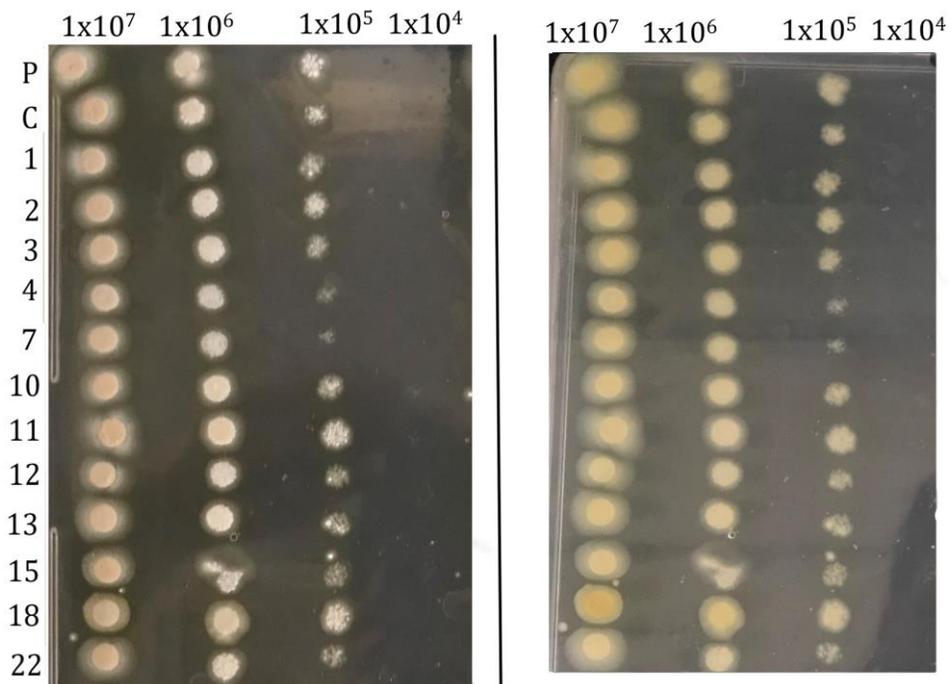
Anexo VII Medio PDA H₂O₂ 2 mM Izquierda: vista frontal, derecha: vista posterior. P: parental, C: control (vector sin inserto)



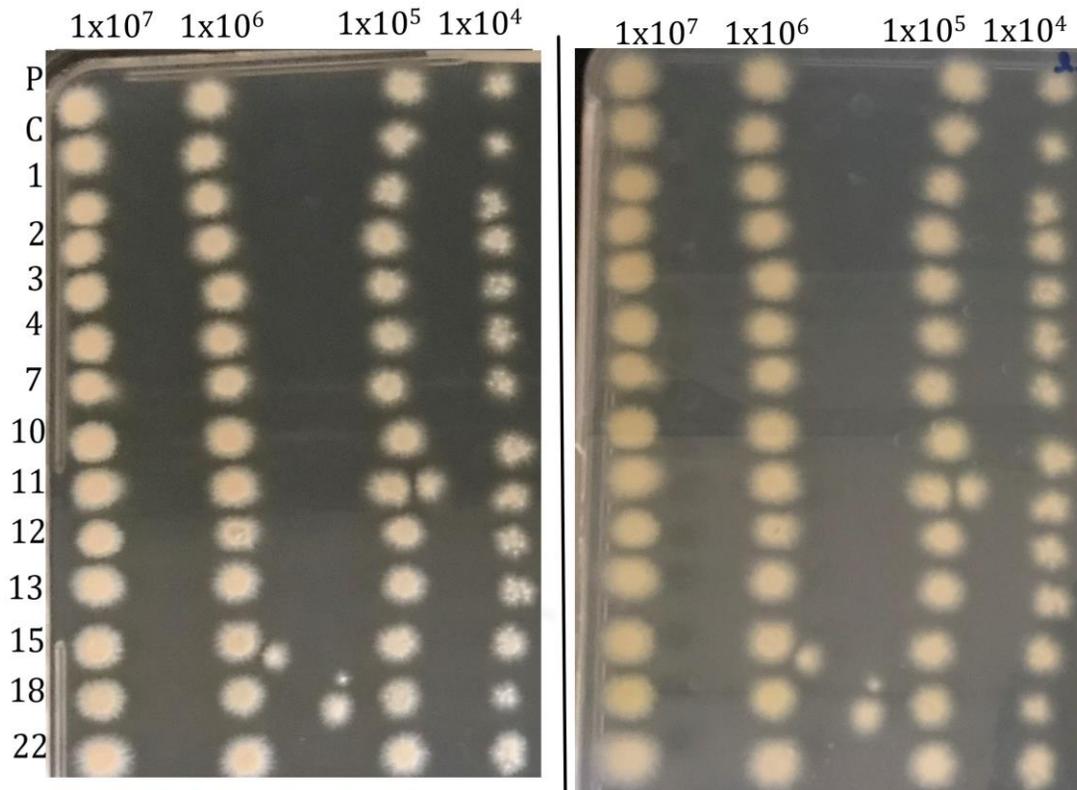
Anexo VIII Placa PDA control para pruebas de sensibilidad a estrés oxidante y osmótico



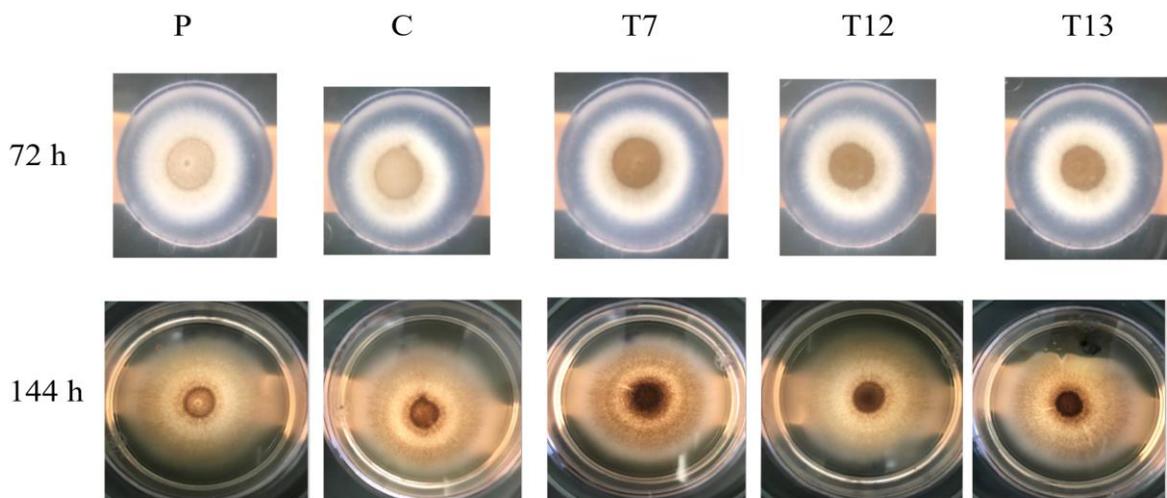
Anexo IX. Placa PDA + H_2O_2 4 mM para prueba de sensibilidad a estrés oxidante en micelio



Anexo X. Placa PDA + NaCl 1 mM para prueba de sensibilidad a estrés osmótico en micelio



Anexo XI Crecimiento radial





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00269

Matrícula: 2173801808

Papel del gen atfB en la biosíntesis de lovastalina

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 27 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ
- DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
- DRA. AILED PÉREZ SÁNCHEZ
- DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA




MONTSERRATT HERRERA MARTELL
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MONTSERRATT HERRERA MARTELL

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

APROBAR

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

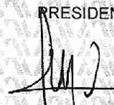
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICÁLDE

PRESIDENTE



DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

VOCAL



DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL



DRA. AILED PÉREZ SÁNCHEZ

SECRETARIA



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA