



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

*Unidad Iztapalapa*

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EXPRESIÓN DEL GEN *sod1* DURANTE LA TROFOFASE E  
IDIOFASE DE *Aspergillus terreus* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA  
Y LÍQUIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBQ. Roxana Uri Miranda Labra

Director de Tesis:

Dr. Javier Barrios González.

Asesores:

Dra. Adriana Garay Arroyo.

Dr. Armando Mejía Álvarez.

México, D.F.

Enero 31, 2008.

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

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, se encuentra inscrita en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el número de registro 0471-O.

México, D.F., 31 de enero del 2008.

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

**EXPRESIÓN DEL GEN *sod1* DURANTE LA TROFOFASE E IDIOFASE DE  
*Aspergillus terreus* EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y LÍQUIDA PARA LA  
PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA.**

Que presentó

**Roxana Uri Miranda Labra**

Comité tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González.

Asesores: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Dra. Adriana Garay Arroyo.

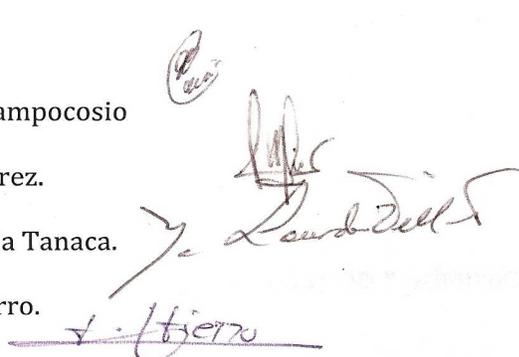
Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez.

Vocal: Dra. Ma. De Lourdes Villa Tanaca.

Vocal: Dr. Francisco Fierro Fierro.



**A D-os de Abraham, Isaac e Israel:**

Por todas las bendiciones recibidas, y porque me has dejado concluir este importante objetivo en mi vida. Gracias por todos aquellos regalos que me das día con día.

**A mis padres Mary y Saúl:**

Sabiendo que no existirá una forma de agradecer toda una vida de sacrificios y esfuerzos, quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo. LOS AMO, son los mejores padres de este mundo.

**A mis hermanos Gersom, Mare y Yhadin:**

Por toda la paciencia, el apoyo, pero sobre todo el amor que me han demostrado siempre, son mi inspiración, LOS AMO.

**Con cariño y admiración.**

# AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer en especial al **Dr. Javier Barrios González**, por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección, no pude haber escogido mejor asesor. Gracias por toda la paciencia y sobre todo el apoyo que me dió.

A mis asesores, Armando Mejía y Adriana Garay, gracias por sus consejos para poder realizar mejor mi trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, por hacer más ameno el trabajo, por todos sus consejos para poder realizarlo, y por esas ricas nieves que compartimos. En especial gracias a mis amigas Maura, Tania y Doris.

A mi tía Eva y familia, por la hospitalidad que me brindaron al recibirme en su hogar cuando decidí emprender este proyecto en mi vida.

A mi amiga Diana, por no sólo ser mi amiga, sino mi hermana, y por estar conmigo en todos los momentos buenos y no tan buenos, pero sobre todo por creer en mí, gracias por tus palabras cuando creí que ya no podía.

Gracias a todos mis profesores de la maestría, que me transmitieron parte de su conocimiento.

Un agradecimiento especial a CONACyT, por la beca otorgada para poder cumplir con este objetivo, y sobre todo a la UAM-I por darme la oportunidad para lograrlo.

Y a todos aquellos que de alguna manera estuvieron siempre conmigo y que creyeron en mí, y que son tantos que no cabrían en este pequeño espacio.

A todos ustedes...

**GRACIAS.**

## RESUMEN

La lovastatina, es un medicamento que ayuda a reducir los niveles de colesterol en la sangre humana, y es producido industrialmente por el hongo *Aspergillus terreus*, en fermentación en medio líquido (FL). Estudios recientes en nuestro grupo han demostrado que al producir lovastatina en fermentación sólida (FS), la producción se eleva considerablemente (Baños *et al.*, 2005), mostrando claramente que existe una fisiología especial del medio sólido. Así mismo, se realizaron otro tipo de estudios, donde se aislaron mutantes resistentes a estrés oxidativo (EOX), mostrando que un alto porcentaje de estas mutantes son sobreproductoras de lovastatina con respecto a la cepa parental, pero sólo en fermentación sólida (FS), lo cual nos indica que en este tipo de cultivo el EOX juega un papel importante en el nivel de producción de la lovastatina (Baños *et al.*, 2007).

El objetivo principal de este trabajo fue el de establecer el papel que juega el EOX en el inicio del metabolismo secundario, para lo cual se estudió mediante análisis de Northern-blot la expresión de los genes *sod1* y *catB* como indicadores del nivel de EOX, tanto en FS como en FL.

Encontramos un período de estrés oxidativo (PEO) que precede el inicio de la idiofase, tanto en FS como en FL. Sin embargo, este PEO presenta diferentes características para cada sistema de fermentación.

En FS, la relación entre el PEO y el inicio de la idiofase se da de manera más directa e inmediata, contrario a lo observado en la FL; además, encontramos que en FL, la intensidad del nivel del EOX fue mayor que en FS.

Los resultados sugieren que la existencia del PEO y las características observadas para cada sistema de fermentación, podrían ser clave para dar inicio al metabolismo secundario, y en FS, podría ser importante para que el nivel de producción de la cepa sea mayor que en FL.

Aunque existen reportes donde se relaciona un EOX intenso que precede el cambio de etapa morfogénica, el cual comprende el inicio de la esporulación en *N. crassa* (Toledo *et al.*, 1998), encontramos que este PEO no se correlaciona directamente con el inicio de la esporulación en *A. terreus*, lo cual observamos por el inicio de la expresión del gen *brlA* (factor transcripcional de la esporulación), ya que este se enciende entre 24 y 48 h después del PEO.

Se ha reportado que una de las vías por las cuales se puede relacionar la resistencia al estrés, metabolismo secundario, esporulación y desarrollo fúngico, es la vía cAMP-PKA (o vía general de estrés). No existen reportes de cómo esta vía funciona para *A. terreus*. Los resultados obtenidos, muestran que el comportamiento reportado es aplicable sólo para FL, ya que la expresión del gen *fadA* (que codifica para una subunidad  $\alpha$  de una proteína G), se expresó fuertemente durante la trofofase, y disminuyó 3 veces durante la idiofase, manteniéndose constante. Sin embargo en FS, este gen se expresó a los mismos niveles observados en la idiofase de la FL, pero durante toda la fermentación, sugiriendo que esto podría ser clave en el entendimiento del porque el hongo produce mejor en FS que en FL, ya que al existir un comportamiento diferente de la vía cAMP-PKA, contiene mejor contra el EOX desde el inicio de la fermentación.

# ÍNDICE GENERAL.

A.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
B.	ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
C.	ABREVIATURAS.....	xv
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1	METABOLISMO SECUNDARIO.....	3
2.1.1	ASPECTOS GENERALES.....	3
2.1.2	FAMILIAS BIOSINTÉTICAS.....	4
2.1.3	REGULACIÓN GENÉTICA.....	5
2.1.4	METABOLISMO SECUNDARIO Y DESARROLLO FÚNGICO.....	6
2.1.5	REGULADOR GLOBAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO.....	7
2.2	ESTATINAS.....	8
2.2.1	ESTRUCTURA.....	9
2.2.2	LA LOVASTATINA.....	10
2.2.2.1	BIOSÍNTESIS.....	11
2.2.3	PRODUCCIÓN.....	12
2.3	FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (FS).....	15
2.3.1	DEFINICIÓN.....	15
2.3.2	TIPOS MODERNOS DE FS.....	15
2.3.2.1	FS SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS NATURALES.....	15
2.3.2.2	FS SOBRE SOPORTES SÓLIDOS INERTES.....	15
2.3.2.3	DESARROLLO DE PROCESOS DE FS SOBRE SOPORTES INERTES PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	16
2.4	ESTRÉS OXIDATIVO.....	19
2.4.1	SISTEMAS DE DEFENSA ANTI-OXIDANTE NO ENZIMÁTICOS.....	21
2.4.2	SISTEMAS DE DEFENSA ENZIMÁTICOS.....	21
2.4.3	LA RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS.....	23
2.4.3.1	LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
3.	HIPÓTESIS.....	27
4.	OBJETIVOS.....	28
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1	APARATOS Y/O EQUIPOS EMPLEADOS.....	29
5.2	MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	29
5.2.1	Cepa fúngica: <i>Aspergillus terreus</i> TUBF-514.....	29
5.2.2	Cepa bacteriana: <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	29
5.3	VECTORES PLASMÍDICOS.....	29
5.3.1	pGem-T y pGem-T easy.....	29

5.4	MEDIOS DE CULTIVO.....	30
5.4.1	MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>Aspergillus terreus</i> .....	30
5.4.1.1	MEDIO CZAPEK.....	30
5.4.1.2	MEDIO PMI.....	30
5.4.1.3	MEDIO POWER.....	30
5.4.1.4	SOLUCIÓN DE SALES 20X.....	30
5.4.1.5	SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA.....	30
5.4.1.6	MEDIO COMPLETO PARA <i>A. terreus</i> .....	30
5.4.2	MEDIO DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	31
5.4.2.1	MEDIO LURIA-BERTANI (LB):.....	31
5.4.2.2	Antibióticos suplementados.....	31
5.5	CONDICIONES DE CULTIVO: PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA EN FS Y FL.....	31
5.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	31
5.6.1	LOVASTATINA.....	31
5.6.2	AZÚCARES.....	32
5.6.3	pH.....	32
5.6.4	BIOMASA Y HUMEDAD.....	32
5.6.5	EXPRESIÓN DE GENES.....	32
5.7	ÁCIDOS NUCLEICOS.....	32
5.7.1	ADN.....	32
5.7.1.1	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>Aspergillus terreus</i> .....	32
5.7.1.2	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i> : LISIS ALCALINA.....	33
5.7.1.3	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. coli</i> : MEGAPREP.....	33
5.7.2	ARN.....	34
5.7.2.1	EXTRACCIÓN.....	34
5.7.2.2	CUANTIFICACIÓN.....	34
5.7.2.3	ELECTROFORESIS EN GELES CON FORMALDEHÍDO.....	34
5.7.2.4	NORTHERN- BLOT.....	35
5.7.2.5	FIJACIÓN DEL ARN A LA MEMBRANA.....	35
5.8	DISEÑO DE PRIMER'S.....	35
5.8.1	PRIMER'S para obtener la SONDA <i>sod1</i> (Cu, Zn - Superóxido Dismutasa).....	35
5.8.2	PRIMER'S para obtener la SONDA <i>catB</i> (Catalasa B).....	35
5.8.3	PRIMER'S para obtener la SONDA <i>brlA</i> (Factor transcripcional de la esporulación).....	35
5.8.4	PRIMER'S para obtener la SONDA <i>fadA</i> (Subunidad $\alpha$ de la proteína G).....	35
5.8.5	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y BÚSQUEDA DE ZONAS CONSERVADAS.....	36
5.8.6	OBTENCIÓN DE SONDAS PCR, EMPLEANDO EL TERMOCICLADOR DE GRADIENTE.....	36
5.8.7	FREEZE AND SQUEEZE: PURIFICACIÓN DE SONDAS.....	36
5.8.8	CLONACIÓN DE LAS SONDAS EN EL VECTOR pGem-T o pGem-T easy.....	36
5.8.9	TRANSFORMACIÓN EN <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	37

5.8.9.1	PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.....	37
5.8.9.2	PCR DE COLONIA.....	37
5.9	MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS.....	38
5.9.1	MARCAJE DE LAS SONDAS: Random Primer.....	38
5.9.2	HIBRIDACIÓN.....	38
5.9.3	LAVADOS.....	38
5.9.4	AUTORRADIOGRAFÍA.....	38
5.9.5	DENSITOMETRÍA.....	38
5.10	OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.....	38
5.10.1	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	38
5.10.2	CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	39
5.10.3	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	39
5.10.4	ELECTROTRANSFERENCIA.....	39
5.10.5	LAVADOS.....	39
5.10.6	OXYBLOT.....	39
6.	RESULTADOS.....	40
6.1	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS DE LOS GENES DE INTERÉS.....	40
6.1.1	PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN <i>sod1</i> .....	41
6.1.2	PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN <i>catB</i> .....	41
6.1.3	PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN <i>brlA</i> .....	42
6.1.4	PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN <i>fadA</i> .....	42
6.2	CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE LOS GENES <i>sod1</i> , <i>catB</i> , <i>brlA</i> Y <i>fadA</i> .....	43
6.3	TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.....	43
6.3.1	TRANSFORMANTES DE <i>sod1</i> .....	43
6.3.2	TRANSFORMANTES DE <i>catB</i> .....	44
6.3.3	TRANSFORMANTES DE <i>brlA</i> .....	44
6.3.4	TRANSFORMANTES DE <i>fadA</i> .....	45
6.4	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS.....	45
6.5	COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA Y ESPORULACIÓN ENTRE FS Y FL.....	47
6.6	COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>sod1</i> (COMO INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO) EN FS Y FL.....	50
6.7	COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>catB</i> (COMO UN INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO) EN FS Y FL.....	51
6.8	INICIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN FS Y FL: EXPRESIÓN DEL GEN <i>lovE</i> .....	52
6.9	INICIO DE LA ESPORULACIÓN EN FS Y FL: EXPRESIÓN DE <i>brlA</i> .....	53
6.10	REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO A TRAVÉS DE LA VÍA cAMP-PKA (VÍA GENERAL DE ESTRÉS) EN FS Y FL: EXPRESIÓN DEL GEN <i>fadA</i> .....	54

6.11	FERMENTACIÓN SÓLIDA: RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON EL INICIO DE LA IDIOFASE, ESPORULACIÓN Y VÍA GENERAL DEL ESTRÉS (VÍA cAMP-PKA). .....	55
6.12	FERMENTACIÓN LÍQUIDA: RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON EL INICIO DE LA IDIOFASE, ESPORULACIÓN Y VÍA GENERAL DEL ESTRÉS (VÍA cAMP-PKA). .....	56
6.13	PERFIL DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN FS Y FL.....	58
7.	DISCUSIÓN.....	60
7.1	COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA EN FS Y EN FL.....	60
7.2	RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>sod1</i> (COMO INDICADOR DE EOX) Y EL INICIO DE LA IDIOFASE EN FS Y EN FL. ....	61
7.3	DIFERENCIAS EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL PEO OBSERVADO EN FS Y EN FL. ....	62
7.4	PERÍODO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA FERMENTACIÓN DE LOVASTATINA Y LA ESPORULACIÓN. ....	64
7.5	REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO A TRAVÉS DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES cAMP-PKA (VÍA GENERAL DE ESTRÉS): EXPRESIÓN DEL GEN <i>fadA</i> EN FS Y FL.....	64
8.	CONCLUSIONES. ....	66
9.	PERSPECTIVAS.....	67
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	68
11.	ANEXOS.....	73
11.1	DISEÑO DE PRIMER'S DEGENERADOS.....	73
11.1.1	PARA OBTENER LA SONDA DEL GEN <i>sod1</i> , QUE CODIFICA PARA UNA SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	73
11.1.2	PARA OBTENER LA SONDA DEL GEN <i>catB</i> , QUE CODIFICA PARA UNA CATALASA B.....	76

## A. ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 2-1</b> Controles integrados en la transducción de señales en la producción de esporas (conidiación) y el metabolismo secundario en <i>Aspergillus nidulans</i> . Las líneas continuas, muestran las rutas conocidas, y las líneas punteadas indican una ruta hipotética. FadA, subunidad $\alpha$ de una proteína G, heterotrimérica; FlbA, una proteína regulatoria que tiene un motivo RGS (regulador de la señalización de proteína G); PkaA, subunidad catalítica de una proteína quinasa A; BrlA, factor de transcripción, producto del primer gen de la vía reguladora central de la conidiogénesis; AflR (regulador de aflatoxinas), un factor de la transcripción específica de la biosíntesis de esterigmatocistina/aflatoxina (Keller <i>et al.</i> , 2005). ...	7
<b>Figura 2-2</b> Modelo propuesto para la regulación del metabolismo secundario por LaeA (Bok y Keller, 2004). .....	8
<b>Figura 2-3</b> Ruta biosintética del colesterol (Manzoni <i>et al.</i> , 2002).....	9
<b>Figura 2-4</b> Base estructural de las estatinas (anillo de naftaleno y $\beta$ -hidrolactona)(Manzoni <i>et al.</i> , 2002).....	9
<b>Figura 2-5</b> Cadenas unidas en las posiciones del C8(R <sub>1</sub> ) y C6(R <sub>2</sub> ) de la base estructural de la estatina (Manzoni <i>et al.</i> , 2002). .....	10
<b>Figura 2-6</b> Clúster de genes biosintéticos de la lovastatina ( <i>lovB</i> y <i>lovF</i> biosíntesis de policétidos; <i>lovC</i> enoil reductasa; <i>lovD</i> transesterasa; <i>lovE</i> y <i>lovH</i> genes reguladores; <i>ORF2</i> Y <i>ORF17</i> genes del citocromo P-450; <i>ORF1</i> y <i>ORF10</i> genes potenciales de resistencia; <i>ORF12</i> y <i>ORF16</i> genes de transporte; <i>lovG</i> , <i>ORF12</i> , <i>ORF15</i> y <i>ORF18</i> función desconocida)(Manzoni <i>et al.</i> , 2002). .....	11
<b>Figura 2-7</b> Ruta biosintética de la lovastatina (Manzoni <i>et al.</i> , 2002).....	13
<b>Figura 2-8</b> Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de dióxígeno (Folch-Mallol <i>et al.</i> , 2004).....	20
<b>Figura 5-1</b> Vector pGem-T.....	29
<b>Figura 5-2</b> Vector pGem-T Easy.....	30
<b>Figura 6-1</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al emplear 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen <i>sod1</i> de 281 pb.....	41
<b>Figura 6-2</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen <i>catB</i> de 234 pb.....	41
<b>Figura 6-3</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen <i>brlA</i> de 495 pb.....	42
<b>Figura 6-4</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen <i>fadA</i> de 535 pb.....	42
<b>Figura 6-5</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 281 pb correspondiente al gen <i>sod1</i> . .....	43
<b>Figura 6-6</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 234 pb correspondiente al gen <i>catB</i> . .....	44
<b>Figura 6-7</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 535 pb correspondiente a <i>brlA</i> . .....	44

<b>Figura 6-8</b> Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión realizada con la enzima <i>EcoRI</i> al ADN plasmídico obtenido de cada una de las 8 colonias, para aquella que poseía el fragmento de 495 pb correspondiente a <i>fadA</i> . .....	45
<b>Figura 6-9</b> Cinéticas de producción de lovastatina (c), esporas (b) y comportamiento del pH (a) durante el desarrollo de una FS durante 144 h (6 días).....	48
<b>Figura 6-10</b> Cinéticas de producción de lovastatina (c), esporas (b) y comportamiento del pH (a), durante el desarrollo de una FL durante 144 h (6 días).....	49
<b>Figura 6-11</b> Análisis de Northern-blot con la expresión del gen <i>sod1</i> , durante la trofofase e idiofase de FS (A) y de FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de la densitometría (parte superior de cada panel) indica el número de veces que el gen está expresado, tomando como 1 la señal emitida a las 18 h de la FS. ....	50
<b>Figura 6-12</b> Análisis de Northern-blot con la expresión del gen <i>lovE</i> , indicando el inicio de la idiofase en FS(A) y en FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de densitometría (números en la parte superior de cada panel) muestra el número de veces que el gen es expresado con respecto a la señal emitida a las 48 h de FS.....	52
<b>Figura 6-13</b> Análisis de Northern-blot con la expresión del gen <i>brlA</i> , indicando el inicio de la esporulación a nivel transcripcional en FS(A) y en FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de la densitometría indica el número de veces que el gen es expresado, tomando como 1 la señal emitida a la 72 h de la FS.....	53
<b>Figura 6-14</b> Análisis de Northern-blot con la expresión del gen <i>fadA</i> , durante la trofofase e idiofase de una FS (A) y una FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga. El valor de la densitometría indica el número de veces que el gen fue expresado, tomando como 1 la señal emitida a las 22 h de la FS. ....	54
<b>Figura 6-15</b> Análisis de Northern-blot con la expresión de cada uno de los genes de estudio ( <i>fadA</i> , <i>sod1</i> , <i>lovE</i> y <i>brlA</i> ), mostrando la correlación existente entre ellos, durante el desarrollo de la FS.....	55
<b>Figura 6-16</b> Análisis de Northern-blot con la expresión de cada uno de los genes de estudio ( <i>fadA</i> , <i>sod1</i> , <i>lovE</i> y <i>brlA</i> ), mostrando la correlación existente entre ellos durante el desarrollo de la FL. ....	57
<b>Figura 6-17</b> Perfil de proteínas oxidadas de muestras provenientes de FS. La señal emitida por la reacción con el luminol, es proporcional a la cantidad de proteínas oxidadas. ....	58
<b>Figura 6-18</b> Perfil de proteínas oxidadas de muestras provenientes de FL. ....	58

## **B. ÍNDICE DE TABLAS.**

**Tabla 5-1** Pasos programados en el Termociclador de gradiente para realizar PCR y obtener las diferentes sondas..... 36

**Tabla 6-1** Diseño de oligos para amplificar un fragmento de cada unos de los genes de estudio..... 40

**Tabla 6-2** Resultado del análisis de tipo Blast para cada una de las secuencias obtenidas..... 46

## C. ABREVIATURAS.

FS	Fermentación sólida.
FL	Fermentación líquida.
MS	Metabolito secundario.
EOX	Estrés oxidativo.
PEO	Período de estrés oxidativo.
h	hora.
min	minuto.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
g	gramo.
mg	miligramo.
µg	microgramo.
L	litros.
mL	mililitro.
µL	microlitro.
µm	micrómetro.
g/L	gramo/litro.
mg/mL	miligramo/mililitro.
µg/mL	microgramo/mililitro.
esporas/mL	esporas/mililitro.
µg/g ms	microgramo/gramo micelio seco.

# 1. INTRODUCCIÓN.

La hipercolesterolemia, es la acumulación del colesterol en el plasma sanguíneo que causa la aterosclerosis (bloqueo de arteria), conduciendo a enfermedades coronarias y ataques al corazón, que son la principal causa de muerte en México. De todo el colesterol contenido en el cuerpo, una tercera parte proviene de la dieta, y cerca de las dos terceras partes es sintetizado por el cuerpo (Hendrickson *et al.*, 1999).

Las estatinas, son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que es la enzima clave en la regulación de biosíntesis de colesterol en humanos y animales (Manzoni *et al.*, 1999).

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 (Valera *et al.*, 2005).

Se ha encontrado también que un número de organismos tales como *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* y ciertas especies de *Penicillium* y *Trichoderma*, producen lovastatina (Valera *et al.*, 2005).

En los procesos de fermentación líquida (FL) para la producción de lovastatina a gran escala, se han empleado cepas mejoradas genéticamente de *Aspergillus terreus* (Manzoni *et al.*, 1999). En años recientes, varios investigadores han mostrado gran interés en la fermentación en medio sólido (FS) como un proceso alternativo a la FL, debido a las grandes ventajas que posee (Krishna *et al.*, 2005). Además, de que la FS tiene mayores rendimientos y ofrece mejor estabilidad del producto (Robinson *et al.*, 2001).

Previamente, la FS era empleada principalmente para la producción de enzimas industriales, pero hoy en día, es explotada para la producción de metabolitos secundarios (Robinson *et al.*, 2001) .

En nuestro grupo 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 la fisiología en medio sólido (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. ANTECEDENTES.**

### **2.1 METABOLISMO SECUNDARIO.**

#### **2.1.1 ASPECTOS GENERALES.**

Los metabolitos secundarios microbianos, son compuestos producidos principalmente por hongos y actinomicetos, usualmente en la fase tardía del crecimiento (idiofase), son compuestos con una variedad en estructuras químicas sofisticadas, producidos por cepas de ciertas especies microbianas, y por algunas plantas (Pandey *et al.*, 2001; Barrios-González *et al.*, 2007).

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).

Estos compuestos, no juegan un rol fisiológico durante la fase exponencial del crecimiento. Además, se han descrito como opuestos a los metabolitos primarios (como aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos), que son esenciales para el crecimiento (Barrios-González *et al.*, 2003).

Una característica del metabolismo secundario es que los metabolitos usualmente no se producen durante la fase rápida del crecimiento (trofofase), sino que son sintetizados en una etapa de producción subsecuente (idiofase) (Barrios-González *et al.*, 2003).

La producción de metabolitos secundarios inicia cuando el crecimiento es limitado por el agotamiento de un nutriente clave: carbono, nitrógeno o fosfato. Por ejemplo, la biosíntesis de penicilina por *Penicillium chrysogenum* inicia cuando la glucosa se agota del medio de cultivo y el hongo inicia el consumo de lactosa, que es un azúcar de más lenta asimilación (Barrios-González *et al.*, 1988).

Muchos de los metabolitos secundarios de importancia económica son producidos por los actinomicetos, particularmente por el género *Streptomyces*, y por hongos (Pandey *et al.*, 2001).

### 2.1.2 FAMILIAS BIOSINTÉTICAS.

Los metabolitos secundarios 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 mostrado que los metabolitos secundarios son formados por rutas alternas al metabolismo primario y que parten de un número pequeño de puntos de ramificación, los cuales definen una amplia categorías de familias biosintéticas (Barrios-González *et al.*, 2003, Keller *et al.*, 2005):

1. **Metabolitos derivados del ácido shikímico** (aminoácidos aromáticos). Ejemplos son los alcaloides ergot y los antibióticos candidina y cloramfenicol.
2. **Metabolitos derivados de aminoácidos.** Esta familia incluye los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como penicilina, cefalosporinas y cefamicinas, así como antibióticos ciclopéptidicos tales como la gramicidina o la ciclosporina como agente inmunosupresivo.
3. **Metabolitos derivados del Acetil-CoA** (y compuestos relacionados, incluyendo los intermedios del ciclo de Krebs). Esta familia puede subdividirse en policétidos y terpenos. Ejemplos de este grupo, incluye al antibiótico eritromicina, el compuesto insecticida-antiparasitario avermectina, y el agente antitumoral doxorubicina. Un ejemplo del segundo grupo es el agente antitumoral no toxigénico taxol.
4. **Metabolitos derivados de azúcares.** Ejemplos de este grupo, son la estreptomina y la kanamicina.

### 2.1.3 REGULACIÓN GENÉTICA.

Ya que las rutas biosintéticas secundarias están vinculadas a las rutas metabólicas primarias y utilizan los mismos intermedios, los mecanismos regulatorios tales como: inducción, regulación por catabolito y/o regulación por retroalimentación, regulan su biosíntesis. Estos mecanismos regulatorios específicos de las rutas, operan en conjunto con un control general el cual está ligado a la velocidad de crecimiento (Barrios-González *et al.*, 2007).

En FL, estos mecanismos regulatorios son controlados por manipulaciones ambientales. En procesos de fermentación para producción de antibióticos regulados por carbono, son conducidos lentamente utilizando fuentes de carbono como la lactosa (Barrios-González *et al.*, 2007).

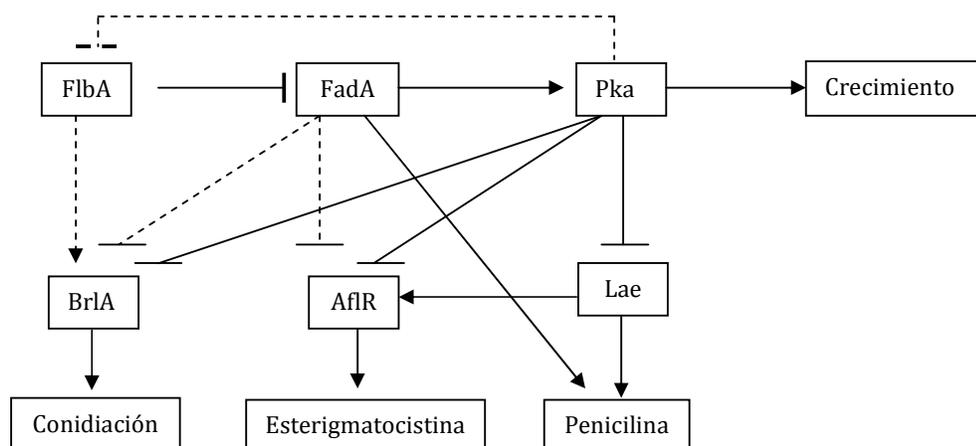
Estudios a nivel molecular han mostrado que los genes de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios están agrupados (en clúster) en el genoma del hongo o de los actinomicetos. Además, hay estudios que indican que frecuentemente un gen específico regulatorio está incluido dentro de este conjunto de genes. La co-regulación de estos clústers puede, en parte, ser explicado por el control transcripcional coordinado de los genes biosintéticos por factores de transcripción de dominio “estrecho” o “amplio” en hongos. Los reguladores específicos de ruta 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. Las respuestas a las señales ambientales, son transmitidas a través de factores de transcripción globales (Dedos de zinc Cys2His2) que median la señalización de carbón (*creA*), nitrógeno 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).

#### 2.1.4 METABOLISMO SECUNDARIO Y DESARROLLO FÚNGICO.

Se ha observado por décadas, una asociación entre la formación de un producto natural y el desarrollo morfológico. Por ejemplo, una clase inusual de mutantes de *Aspergillus parasiticus* llamadas `sec`, son deficientes tanto para la esporulación, como para la producción de aflatoxinas. Aunque están presentes los genes que codifican las enzimas para sintetizar aflatoxinas, la expresión de *aflR*, que es un regulador específico de la ruta, se reduce de 5 a 10 veces en cepas toxigénicas comparada con la cepa parental. Un ejemplo similar, involucra una mutación en el gen *fluP* de *A. parasiticus*, que resulta en un fenotipo morfológico de hifa esponjosa, una reducción en el número de esporas asexuales producidas y una reducción en el nivel de producción de aflatoxinas (Keller *et al.*, 2005).

Se ha revisado recientemente la correlación del metabolismo secundario con el desarrollo fúngico, y los autores hacen una nota especial en la regulación conjunta de estos procesos, a través de la proteína G heterométrica y la ruta de transducción de señales de la proteína quinasa A. Particularmente, han sido bien caracterizadas FadA, una proteína G en *A. nidulans*, y PkaA, una proteína quinasa que se encuentra corriente abajo en la ruta regulatoria de FadA (Calvo *et al.*, 2002). Ambas proteínas, regulan negativamente la síntesis de aflatoxinas y esterigmatocistina (Fig.2-1) (Keller *et al.*, 2005).

PkaA regula la producción de esterigmatocistina transcripcional y post-transcripcionalmente, a través del producto del gen de *aflR*, y se postula que una cascada regulatoria similar, controla la regulación en *A. parasiticus*. AflR es inactivado por PkaA, mediante fosforilación, y la transcripción de *aflR* es reprimida por la actividad de PkaA; la represión de la transcripción de *aflR* es mediada por PkaA a través de una metil transferasa, llamada LaeA (Bok y Keller, 2004; Keller *et al.*, 2005).

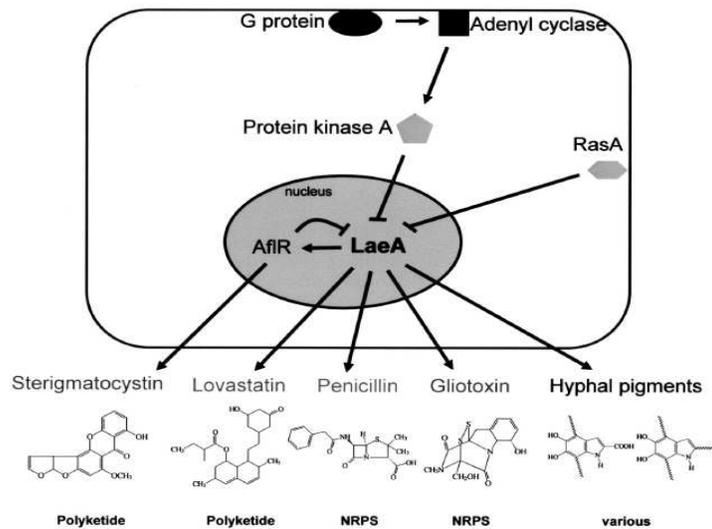


**Figura 2-1** Controles integrados en la transducción de señales en la producción de esporas (conidiación) y el metabolismo secundario en *Aspergillus nidulans*. Las líneas continuas, muestran las rutas conocidas, y las líneas punteadas indican una ruta hipotética. FadA, subunidad  $\alpha$  de una proteína G, heterotrimérica; FlbA, una proteína reguladora que tiene un motivo RGS (regulador de la señalización de proteína G); PkaA, subunidad catalítica de una proteína quinasa A; BrlA, factor de transcripción, producto del primer gen de la vía reguladora central de la conidiogénesis; AflR (regulador de aflatoxinas), un factor de la transcripción específica de la biosíntesis de esterigmatocistina/aflatoxina (Keller *et al.*, 2005).

### 2.1.5 REGULADOR GLOBAL DEL METABOLISMO SECUNDARIO.

Los metabolitos secundarios, o los indicadores bioquímicos del desarrollo fúngico, son de un interés intenso para la humanidad, debido a sus propiedades farmacéuticas y/o tóxicas. *LaeA*, es un regulador del metabolismo secundario en este género. La delección de *laeA*, bloquea la expresión del clúster de genes, como el de la esterigmatocistina (carcinógeno), penicilina (antibiótico) y lovastatina (agente antihipercolesterolémico). Contrario a esto, la sobreexpresión de *laeA*, dispara el incremento de la transcripción de genes de la penicilina y lovastatina y su subsecuente formación de producto (Fig. 2-2). La expresión de *laeA* es regulada negativamente por AflR, un factor de transcripción Zn2Cys2 de la esterigmatocistina, en una retroalimentación cíclica, así como por dos elementos de la transducción de señales, la proteína quinasa A y RasA. Aunque estas dos últimas proteínas, también regulan negativamente, las cepas  $\Delta laeA$  muestran poca diferencia en la producción de esporas, comparadas con la cepa silvestre,

indicando que el rol primario de LaeA es el de regular los clúster de genes metabólicos (Bok y Keller, 2004).

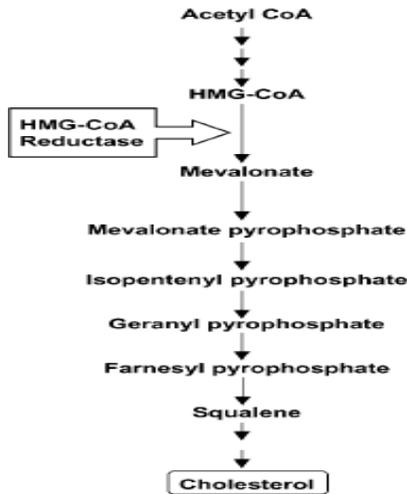


**Figura 2-2** Modelo propuesto para la regulación del metabolismo secundario por LaeA (Bok y Keller, 2004).

## 2.2 ESTATINAS.

La hipercolesterolemia es la acumulación de colesterol en el plasma sanguíneo que causa aterosclerosis (bloqueo de la arteria), conduciendo a enfermedades coronarias de corazón y ataques cardíacos (Valera *et al.*, 2005). Por lo tanto la posibilidad de controlar la síntesis de novo del colesterol endógeno (Fig. 2-3), que representa aproximadamente dos tercios del colesterol total del cuerpo, representa una forma efectiva de bajar los niveles de colesterol en plasma (Manzoni *et al.*, 2002).

Existen varios metabolitos secundarios de estructura química compleja que son sintetizados mediante la ruta de los policétidos en hongos filamentosos. Ejemplo de éstos son, la lovastatina, el monacolina J, monacolina L, la mevastatina, que pueden ser producidos por *Monascus ruber*, *Penicillium brevicompactum* y *Aspergillus terreus* (Hajjaj *et al.*, 2001).

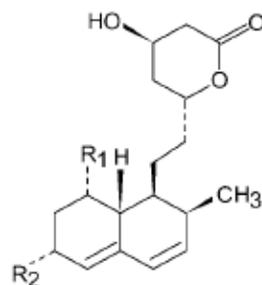


**Figura 2-3** Ruta biosintética del colesterol (Manzoni *et al.*, 2002).

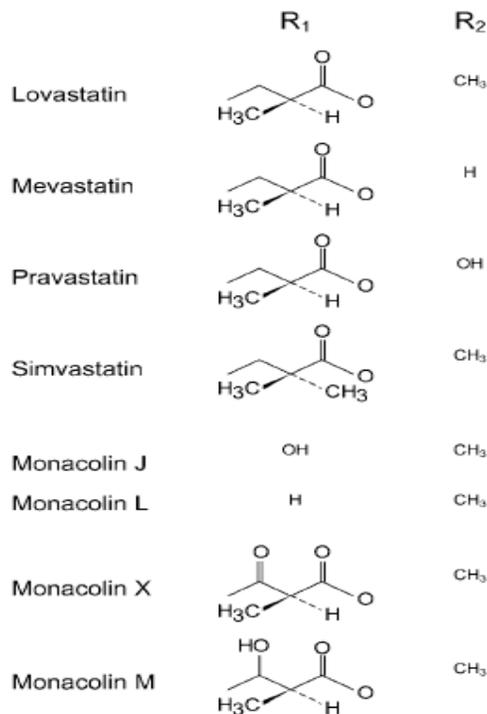
Actualmente son cinco las estatinas de uso clínico. La lovastatina y pravastatina (derivada de la mevastatina) son estatinas naturales de origen fúngico, mientras que la simvastatina es un derivado semisintético de la lovastatina, la atorvastatina y fluvastatina son estatinas completamente sintéticas, derivadas del mevalonato y piridina, respectivamente (Manzoni *et al.*, 2002).

### 2.2.1 ESTRUCTURA.

Las estatinas naturales son muy similares en estructura química, ya que poseen en común un policétido principal, un sistema de anillos de hidroxí-hexahidronaftaleno (Fig.2-4), el cual es diferente en los lados de la cadena, en la posición del C8 (R1) y del C6 (R2) (Fig.2-5) (Manzoni *et al.*, 2002).



**Figura 2-4** Base estructural de las estatinas (anillo de naftaleno y  $\beta$ -hidrolactona) (Manzoni *et al.*, 2002).



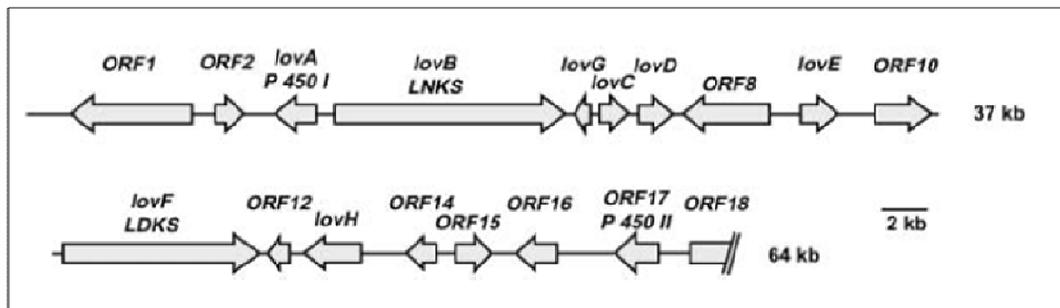
**Figura 2-5** Cadenas unidas en las posiciones del C8(R<sub>1</sub>) y C6(R<sub>2</sub>) de la base estructural de la estatina (Manzoni *et al.*, 2002).

## 2.2.2 LA LOVASTATINA.

La lovastatina es un inhibidor de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (mevalonato: NADP1 oxidoreductasa [EC 1.1.1.34]) la cual cataliza la reducción de HMG-CoA a mevalonato (Fig.2-3) durante la síntesis del colesterol (Hajjaj *et al.*, 2001).

La ruta biosintética de la lovastatina se ha investigado por resonancia magnética y espectroscopia de masas (Yoshizawa *et al.*, 1994; Hendrickson *et al.*, 1999). Estos estudios concluyeron que la lovastatina está compuesta de dos cadenas de policétidos unidas a través de un enlace éster, las cuales son ensambladas por la Policétido Sintasa, resultados que provienen de la clonación y la parcial caracterización del clúster de genes biosintéticos de lovastatina de *A. terreus* (Hajjaj *et al.*, 2001).

El clúster de genes biosintéticos de la lovastatina consiste en 18 probables marcos de lectura abiertos (open reading frames u ORFs), 2 de los cuales codifican para proteínas reguladoras, *lovE* y *lovH* (Fig.2-4)(Manzoni *et al.*, 2002).



**Figura 2-6** Clúster de genes biosintéticos de la lovastatina (*lovB* y *lovF* biosíntesis de policétidos; *lovC* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lovE* y *lovH* genes reguladores; *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)(Manzoni *et al.*, 2002).

### 2.2.2.1 BIOSÍNTESIS.

Investigaciones anteriores llevadas a cabo en una cepa de *Monascus ruber* sobre las estatinas monacolina J y L, y que fueron marcadas con  $^{14}\text{C}$ , sugiere que estos compuestos son precursores de la lovastatina y que por lo tanto pueden clasificarse como metabolitos intermediarios de la ruta de biosíntesis de lovastatina.

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 sintetizado a partir de 9 moléculas de acetato, es convertido luego a monacolina J mediante una hidroxilación, para posteriormente convertirse en lovastatina (Fig.2-7) (Manzoni *et al.*, 2002).

Recientes investigaciones genéticas han estudiado el mecanismo enzimático involucrado en la biosíntesis de lovastatina. Los resultados mostraron que hay un Sistema Multifuncional de Policétidos Sintasa (PKSs) el cual comprende una Nonácetido Sintasa (LNKS) involucrada en la ciclación de la cadena principal de

policétidos, para formar el sistema de anillos de hexahidronaftaleno, y una Dicitido Sintasa (LDKS) involucrada en la transferencia del metilbutiril al costado de la cadena de la monacolina J (Manzoni *et al.*, 2002).

Han sido dilucidados los genes que codifican estas enzimas y los factores regulatorios en la producción de lovastatina en *A. terreus* que son la clave en el entendimiento de la biosíntesis.

En general, los recientes avances en la clonación de genes han permitido la identificación de más de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la lovastatina y han confirmado la ruta de biosíntesis hipotética en investigaciones anteriores.

### **2.2.3 PRODUCCIÓN.**

Las investigaciones llevadas a cabo desde 1970 han indicado la posibilidad de obtener un amplio rango de estatinas, tanto como los productos finales e intermediarios del metabolismo microbiano secundario.

Se han desarrollado procesos a gran escala solamente para pocas de las estatinas descritas en la literatura. Para otras moléculas, la investigación todavía está en curso y por lo tanto son susceptibles de desarrollo. Estos estudios han resultado en un profundo entendimiento de los diferentes aspectos relativos a los mecanismos involucrados en la producción de las estatinas, proveyendo las bases necesarias para el desarrollo de proceso a gran escala.

La Lovastatina (llamada mevinolina) fue la primer estatina en ser aprobada por la FDA de EU (1987) y puesta a disposición para el mercado farmacéutico como un medicamento anticolesterolémico. Esta estatina fue obtenida de una cepa aislada del suelo y clasificada como *A. terreus* en los Laboratorios CIBE en Madrid (España) y de *M. ruber* (llamada monacolina K) por ENDO (1979). Pocos años después la lovastatina también fue obtenida de 17 cepas de diferentes especies de 124 cepas probadas de *Monascus*, en particular, *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus*, y *M. pubigerus*. (Hajjaj *et al.*, 2001; Manzoni *et al.*, 2002).

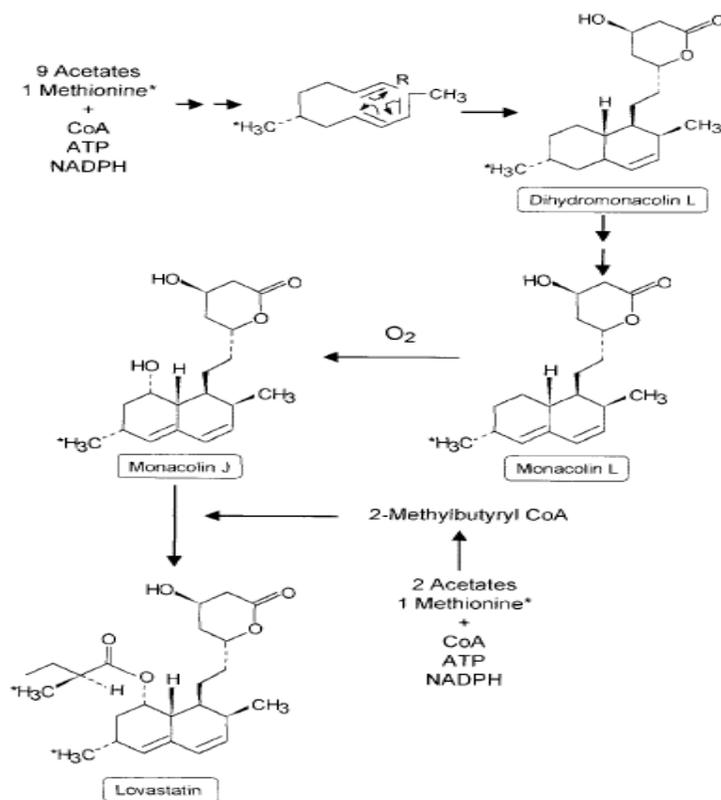


Figura 2-7 Ruta biosintética de la lovastatina (Manzoni *et al.*, 2002).

La producción convencional de lovastatina se ha llevado a cabo mediante FL. Recientemente la productividad de la cepa de *A. terreus* ATCC 20542, el productor original de lovastatina, fue incrementado por el grupo Metkinen, hasta alcanzar 7-8 g/L, utilizando procedimientos de mutagénesis y la experiencia adquirida en el desarrollo de programas de mejoramiento de procesos (Manzoni *et al.*, 2002).

Por otro lado, la fermentación sólida (FS) es un método de cultivo antiguo que se ha modernizado en los últimos 20 años, de manera que se considera una tecnología emergente con gran potencial para la producción de enzimas y metabolitos microbianos (Robinson *et al.*, 2001).

Existen varios estudios para la obtención de lovastatina mediante la FS. En años recientes, los investigadores han mostrado un creciente interés en este tipo de

fermentación, como una alternativa potencial a la FL, dado que se pueden utilizar sustratos económicos (como residuos agrícolas), se requiere poco procesamiento y las etapas de transmisión continua, utiliza menos potencia y genera menos efluentes. Además, la FS tiene una alta productividad y ofrece mejor estabilidad de producto. Previamente, la FS era utilizada principalmente para la producción de enzimas industriales, pero en la actualidad, esta tecnología es aplicada para la producción de metabolitos secundarios (Manzoni *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2001).

Se ha producido lovastatina empleando *Aspergillus flavipes* mediante FS usando diferentes sustratos sólidos, tales como salvado de trigo, harina de soya, salvado de grano, desechos frutales y sus combinaciones. Valera *et al.* (2005), encontraron que empleando salvado de trigo se llegaba a producir hasta 13.49 mg/g (sólido seco) de lovastatina en camas estancadas y 16.65 mg/g de lovastatina en camas agitadas aireadas, después de 6 días de fermentación.

Biocon (Biocon, Bangalore, India) es una de las compañías que ha obtenido la aprobación para la producción de lovastatina por el FDA de EU (Enero 2001). Fue la primer compañía hindú, en obtener esta aprobación para moléculas derivadas de fermentación para uso farmacéutico. El proceso de producción de lovastatina, está basada en una tecnología propia de fermentación, el Plafractor, un biorreactor a gran escala de matriz sólida (Mazumdar y Suryanaraya, 2003). Este nuevo biorreactor, tiene las ventajas de un sustrato sólido y la FL, y permite la reducción de problemas debidos a procesos posteriores durante la extracción del producto.

Se ha encontrado que al producir lovastatina por *Aspergillus terreus* en FS, empleando poliuretano como soporte inerte, hay una producción 30 veces mayor que en FL. Al emplear un soporte inerte, permitió conocer la producción específica, obteniendo un parámetro comparable con respecto a lo obtenido en FL, y se encontró que ésta era 13 veces mayor en FS con respecto a FL (Baños *et al.*, 2005).

## **2.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (FS).**

### **2.3.1 DEFINICIÓN**

Cultivo microbiano que se desarrolla sobre la superficie y en el interior de una matriz sólida, en ausencia de agua libre (Canel *et al.*, 1980; Pandey *et al.*, 2001; Hasseltine *et al.*, 1977).

### **2.3.2 TIPOS MODERNOS DE FS.**

Se han distinguido dos tipos de sistemas de FS dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada; el más comúnmente utilizado involucra un sistema de cultivo sobre material natural, y el menos frecuentemente utilizado, un cultivo que involucra un soporte inerte impregnado con medio líquido (Aidoo *et al.*, 1982; Barrios-González & Mejía, 1996).

#### **2.3.2.1 FS SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS NATURALES.**

Es el sistema más comúnmente usado (y el más frecuentemente descrito) para el cultivo de microorganismos sobre productos agrícolas, tales como arroz, salvado de trigo, etc. El cultivo sobre este tipo de materiales, sirven tanto como soporte y como fuente de nutrientes. Estos sistemas de cultivo, tienen la ventaja de utilizar materiales crudos que son baratos y que están moderadamente procesados. Sin embargo, tiene una desventaja: la fuente de carbono constituye parte de su estructura física. Durante el crecimiento de los microorganismos, el medio sólido puede ser parcialmente degradado, y da como resultado, el cambio de sus características físicas, particularmente en cultivos largos para fermentaciones de metabolitos secundarios. Como resultado, la transferencia de calor y masa se reducen (Ooijkaas *et al.*, 2000; Barrios-González & Mejía, 1996).

#### **2.3.2.2 FS SOBRE SOPORTES SÓLIDOS INERTES.**

Estos sistemas involucran el cultivo de microorganismos sobre un soporte inerte impregnado con medio líquido. En esta 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. Las desventajas descritas anteriormente, pueden superarse empleando soportes inertes, permitiendo mejorar el control de la transferencia de calor y masa. Otra 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 éstos 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 diseñado 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. Por otra parte, se han empleado dos variantes en este tipo de sistema: a) FS sobre soportes inertes naturales, tales como bagazo de caña de azúcar; b) FS sobre soportes inertes artificiales, tales como espuma de poliuretano, poliestireno, amberlita, vermiculita, perlita, partículas de pozolano (material volcánico) y gránulos de arcilla (Oojkaas *et al.*, 2000; Baños *et al.*, 2005).

### **2.3.2.3 DESARROLLO DE PROCESOS DE FS SOBRE SOPORTES INERTES PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.**

El uso de soportes inertes impregnados con medio líquido, ofrece flexibilidad adicional cuando se diseña el medio para la producción óptima de metabolitos. Para el estudio de la producción de metabolitos secundarios sobre soportes inertes, se han empleado medios recomendados para la FL y también se ha optimizado el grado de concentración, el cual usualmente se encuentra entre 2 y 2.5 veces de la empleada en FL (Barrios-González *et al.*, 1988; Domínguez *et al.*, 2000, Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000, Baños *et al.*, 2005; Barrios-González *et al.*, 2004). Una vez que el nivel de concentración es establecido, la concentración óptima de los nutrientes individuales pueden ser determinados como, por ejemplo, por un

diseño centrado en la composición y la metodología de análisis de superficie de respuesta. De este modo, se pueden encontrar los valores óptimos con menor número de experimentos, como se ha hecho en FS sobre sustratos sólidos.

Aunque la FS sobre soportes inertes son muy convenientes para estudios básicos, otros trabajos indican que la fermentación sobre bagazo impregnado (soporte inerte natural) puede ser muy productivo, como en el caso de penicilina (13 mg/g)(Barrios-González & Mejía 1996; Barrios-González *et al.*, 1993). Resultados muy recientes muestran que los soportes inertes naturales pueden ser excelentes para la producción de metabolitos secundarios.

Baños *et al.* (2005), diseñaron un proceso de producción de lovastatina por FS sobre un soporte inerte artificial donde se obtuvo 19.95 mg/g en 7 días. Estos estudios fueron desarrollados con *A. terreus* TUB F-514, una cepa silvestre aislada de muestras de suelo de Irak (Szakács *et al.*, 1998). La producción de 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 8.615 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. La “fisiología especial” del medio sólido se manifiesta con claridad aquí ya que cada mg de micelio en FS, muestra una producción de 816 µg de lovastatina; mientras que el proveniente de FL produce sólo 25 µg de lovastatina (con la misma cepa y composición de medio de cultivo) (Baños *et al.*, 2005).

Existen reportes donde se manifiesta con claridad esta fisiología especial del medio sólido, ya que en algunos casos se ha encontrado que enzimas que se producen en forma intracelular en FL, son de tipo extracelular en FS, y que ambas muestran diferente peso molecular y características cinéticas. Se ha encontrado que los hongos contienen distintos genes que codifican para una misma clase de enzima y que estos genes equivalentes son regulados diferencialmente dependiendo del medio donde se encuentren. 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 (Hisada *et al.*, 2005).

En una segunda etapa del trabajo de Baños *et al.* (2007), *A. terreus* TUB F-514 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, produciendo 27.89 mg/g. Estos resultados indican que la alta producción de lovastatina de *Aspergillus terreus* está relacionada con su capacidad de contender contra el EOX, ya se encontró que las mutantes aisladas y resistentes a este tipo de estrés, eran sobreproductoras de lovastatina en FS, más no en FL.

El panorama que comenzó a surgir es que este tipo de estrés tiene una mayor intensidad en FS, en relación con el cultivo líquido, y que los mecanismos de adaptación al EOX no sólo son valiosos para el hongo creciendo en medio sólido, sino que probablemente inducen una mayor producción de lovastatina y otras características de la fisiología del medio sólido.

Existe evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno (EROS), tales como los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno, funcionan como segundos mensajeros intracelulares (Finkel, 1998).

Esto se ve reflejado en los estudios realizados con el hongo *Neurospora crassa* indican que hay un breve período transitorio de EOX al comienzo de cada etapa morfogénica (Toledo *et al.*, 1995).

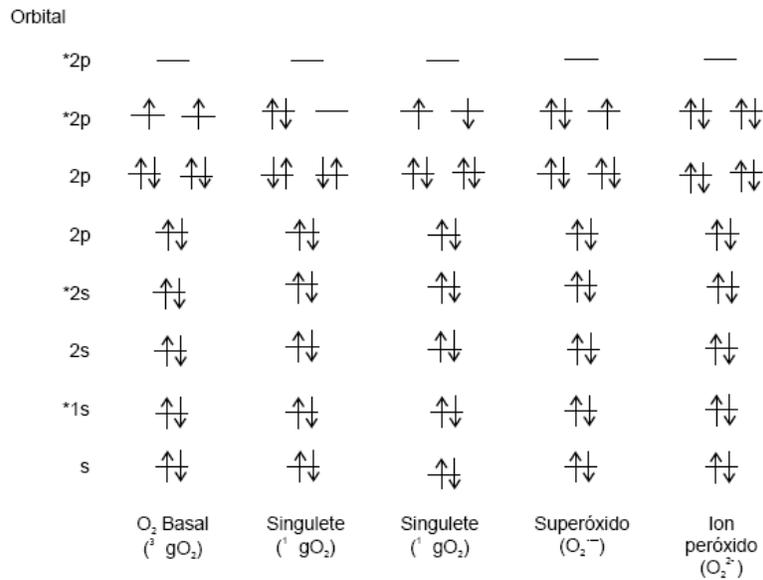
Kreiner *et al.* (2000), estudiaron el efecto de la tensión de oxígeno disuelto y la concentración de oxígeno en la tasa de crecimiento del hongo *A. niger* B1-D y en la producción de una enzima recombinante en FL; encontraron que existía una mayor actividad de las enzimas SOD (superóxido dismutasa) y CAT (catalasa) al final de la fase estacionaria y el inicio de la fase de decaimiento de una fermentación líquida.

Es interesante notar que estudios sobre la producción de aflatoxinas en *Aspergillus parasiticus* indicaron que hay un EOX que coincide con la transición entre trofofase e idiofase; y que las cepas más aflatoxigénicas muestran un EOX en ese punto mucho más intenso que las cepas no toxigénicas (Jayashree *et al.*, 2000). Indicando que la intensidad del EOX puede estar relacionada con el nivel de producción de la cepa.

## 2.4 ESTRÉS OXIDATIVO.

El dioxígeno ( $O_2$ ) es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Además, casi todos los seres vivos utilizan el dioxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula, se forman durante la respiración, moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROS). Las EROS regulan varios procesos celulares pero también resultan nocivas para los organismos (Halliwell *et al.*, 1999).

Las EROS son derivados del oxígeno más reactivo que el  $O_2$  en su estado basal. El  $H_2O_2$  es un oxidante débil; sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos ( $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  respectivamente) forma al radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad. En el ion peróxido los dos átomos se encuentran unidos por un solo enlace débil, de tal forma que al aceptar un par de electrones extra, este enlace se elimina totalmente. La protonación de este producto genera agua. El dioxígeno singulete ( $^1O_2$ ) a diferencia de las EROS mencionadas, no es producto de la reducción parcial del dioxígeno basal. El  $^1O_2$  se genera mediante la captación de energía por uno de los electrones desapareados del  $O_2$  en su estado basal, al cambiar de giro forma el  $^1\Sigma_gO_2$  (Fig.2-8). Esta forma del oxígeno singulete es muy inestable y decae en la forma  $^1\Delta O_2$  (Fig.2-8) cuando se aparean los dos electrones de los orbitales  $\pi^*$  de antiunión. La forma  $^1\Delta O_2$  puede volver al estado de dioxígeno basal con la emisión de un fotón o bien puede aceptar un electrón o un par de electrones con giros opuestos, razón por la cual el  $^1O_2$  resulta tan reactivo.



**Figura 2-8** Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de dioxígeno (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Las EROS se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la  $\beta$ -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.

Sin embargo, si la concentración de las EROS sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidativo (EOX). Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del O<sub>2</sub>, daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular (Storz *et al.*, 1987).

Para contener con el EOX y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las EROS, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

### 2.4.1 SISTEMAS DE DEFENSA ANTI-OXIDANTE NO ENZIMÁTICOS.

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente en moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico. Éstos en general actúan atrapando algunas de las EROS y son:

- El glutatión (Collinson *et al.*, 1995).
- Las poliaminas (Balasundaram, *et al.*, 1991).
- El ácido eritroascórbico (Kim *et al.*, 1996).
- Las metalotioneínas (Hamer, 1986).
- Las flavohemoglobinas (Zhao *et al.*, 1996).
- Las glutarredoxinas (Luikenhuis *et al.*, 1998).
- Las tiorredoxinas (Muller, 1991).

### 2.4.2 SISTEMAS DE DEFENSA ENZIMÁTICOS.

Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de eliminar EROS.

**LA CATALASA** ( $H_2O_2$  oxidoreductasa, Ec. 1.11.1.6), transforma el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ . *S. cerevisiae* posee dos de estas enzimas codificadas por los genes *CTA1* y *CTT1*. El gen *CTA1* codifica para la catalasa que se localiza en los peroxisomas, la cual es la encargada de remover el  $H_2O_2$  que se produce durante la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Como se ha mencionado, el gen *CTT1* se regula por EOX, osmótico y ante la falta de nutrientes. Las cepas deficientes en ambas catalasas son hipersensibles al  $H_2O_2$  en la fase estacionaria y las mutantes en uno u otro gen son incapaces de montar una respuesta adaptativa al  $H_2O_2$  en fase de crecimiento exponencial (Ruis & Hamilton, 1992).

En el caso de hongos filamentosos, se ha encontrado que contienen distintos genes que codifican la misma clase de enzimas que son reguladas diferencialmente de

acuerdo a las condiciones. Es el caso de dos genes de catalasas, *catA* y *catB*, de *Aspergillus oryzae* (Hisada *et al.*, 2005), y tres en el caso de *Aspergillus nidulans* (Kawasaki *et al.*, 1997).

Así pues, en el caso de *Aspergillus nidulans*, el gen *catA* codifica para una catalasa específica de esporas, la cual se va perdiendo durante la germinación y el crecimiento, la actividad de *catB* apenas es detectable en esporas asexuales (conidios), desaparece después de la germinación e inicia a acumularse a las 10 h después de la inoculación de esporas, desde principio a fin del crecimiento y conidiación. El mRNA del *catB* se encuentra ausente en la conidia, y su acumulación se correlaciona con la actividad catalasa, sugiriendo que la expresión de *catB* es regulado a nivel de transcripción. El gen *catB* es inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, choque térmico, paraquat, o el catabolismo del ácido úrico pero no por el estrés osmótico. Este patrón de regulación y su rol protector en contra del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ofrecido por *catA* y *catB*, en diferentes estados del ciclo de *A. nidulans*, sugieren que los genes catalasas desarrollan una función redundante de satisfacer la demanda de las catalasas en los diferentes estados de la regulación metabólica y genética representada por el crecimiento de la hifa contra las esporas (Kawasaki *et al.*, 1997).

**SUPERÓXIDO DISMUTASAS (SOD).** Son enzimas abundantes presentes en muchos de los organismos aeróbicos y anaeróbicos. Su actividad conocida es la dismutación del radical superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, para dar dióxígeno y peróxido de hidrógeno:



Varios investigadores han estudiado la respuesta al EOX midiendo la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) (Kreiner *et al.*, 2000) y/o la expresión de su gen correspondiente (Tribus *et al.*, 2005).

En varios hongos *Aspergillus* y *N. crassa*, el gen que codifica para una Cu, Zn-SOD, es conocido como *sod1* (Birmingham-McDonogh *et al.*, 1988). La levadura posee dos SOD, la MnSod codificada por el gen *sod2* que se localiza en la mitocondria y la

Cu/Zn Sod codificada por el gen *sod1* de localización citoplásmica. La Cu/Zn Sod parece ser la enzima que remueve  $O_2^-$  del citoplasma y posiblemente también del peroxisoma, mientras que la MnSod parece proteger la mitocondria del  $O_2^-$  generado durante la respiración y en la exposición al etanol (Gralla *et al.*, 1991; Jamieson *et al.*, 1994). Cabe mencionar que la falta de esta proteína también provoca un fenotipo osmosensible (Garay-Arroyo *et al.*, 2003).

Otras defensas enzimáticas son:

- Las enzimas de la ruta de las pentosas (Juhnke *et al.*, 1996; Slekar *et al.*, 1996).
- La glutatión reductasa (Collinson *et al.*, 1995).
- La glutatión peroxidasa (Inoue *et al.*, 1999).
- La tiorredoxina peroxidasa (Park *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2002).
- Las peroxirredoxinas (Garrido *et al.*, 2002; Delaunay *et al.*, 2002).

Evidencias diversas muestran que la regulación de la respuesta antioxidante en *S. cerevisiae* ocurre mayoritariamente a nivel transcripcional. Estas evidencias también muestran una superposición considerable entre las respuestas provocadas ante una condición de EOX y aquéllas observadas en distintas condiciones de estrés como las promovidas por la falta de nutrientes, por el calor, el choque osmótico y la resistencia a metales pesados como el cadmio.

Lo anterior sugiere que las diversas condiciones de estrés generan conjuntamente una condición hiperoxidante. Consecuentemente, se han identificado varios de los factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al EOX cuya actividad, en algunos de los casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés (Moye-Rowley, 2002).

### **2.4.3 LA RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS.**

En estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae*, se ha encontrado que cuando ésta se enfrenta a condiciones desfavorables, la levadura sintetiza moléculas

llamadas “proteínas de estrés” que atenúan o reparan el daño causado por estrés. Su estudio ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta.

Se ha descrito también un fenómeno denominado “Protección cruzada” el cual consiste en que la inducción de la tolerancia a un tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, y esto a su vez, ha originado la idea de la “Respuesta General a Estrés (RGE)”.

Cuando se da la RGE, existe una fuerte intercomunicación entre las diferentes vías de respuesta a estrés, lo cual se verá reflejado en una disminución en la velocidad de crecimiento, la inducción de diversos mecanismos de protección, y en un metabolismo basal (disminución del gasto energético), entre otros.

Se ha encontrado que existen genes que son regulados en respuesta a diferentes condiciones de estrés, en los cuales dentro de su promotor se encuentra, ya sea el elemento STRE (Stress Responsive Element), o el elemento PDS (Post Diauxic Shift).

Existe evidencia de varias vías de transducción de señales, entre las más estudiadas se encuentran:

- Vía cAMP-PKA: la controla los niveles de AMP cíclico (cAMP), el cual a través de la proteína quinasa A (PKA) transduce o señala cambios en el ambiente. Requiere de la actividad de las proteínas G (Calvo *et al.*, 2002).
- Vía de TOR (Calvo *et al.*, 2002; Folch-Mallol *et al.*, 2004): respuesta a la limitación de nitrógeno.
- Vía de HOG (High Osmolarity Glicerol)(Calvo *et al.*, 2002; Folch-Mallol *et al.*, 2004): responsable del mecanismo de osmoregulación, involucrado en el mantenimiento del turgor celular. Respuesta a otros tipos de estrés. Pertenece a una de las vías mejor caracterizada de las MAP quinasas.

### 2.4.3.1 LA RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO.

Las células fúngicas también deben tratar con una amplia variedad de cambios ambientales potencialmente tóxicos durante el curso de su proliferación. Un ejemplo importante de un desafío ambiental al que los hongos se enfrentan es precisamente a estos altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS). Una característica crítica en esta respuesta al EOX es la necesidad para señalar rápidamente al nuevo ambiente estresante, lo cual en turno, conduce a la reprogramación de la expresión de genes y a sus productos requeridos para contrarrestar la elevación letal de las EROS. Dado que el EOX puede ocurrir rápidamente (lo cual se define como una “explosión oxidativa”), la ruta de respuesta de los hongos debe ser similarmente rápida. 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 genes requeridos. Los hongos usan diferentes significados para controlar la expresión de los genes activados por el redox, y una característica común es la necesidad de una respuesta transcripcional a los cambios oxidativos (Moye-Rowley *et al.*, 2002).

Existen pocos estudios respecto a la respuesta provocada por el EOX, pero se ha encontrado que ésta ocurre a nivel transcripcional, y que existe superposición entre las respuestas provocadas ante una condición de EOX y aquellas observadas a otros tipos de estrés. Las diversas condiciones de estrés (térmico, osmótico, salino, etc.) generan conjuntamente una condición hiperoxidante.

Se han logrado identificar varios factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al EOX, que en algunos casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés:

- *Factores transcripcionales tipo bZip:* Yap1p, Yap2p, Gcn4p.
- *Factores transcripcionales que unen cobre:* Ace1p, Mac1p.
- *Factores transcripcionales con dedos de zinc:* Hap1p, Hap2p, Hap3p y Hap4p.

Es evidente la selección de diferentes moléculas reguladoras que le dan cierta especificidad a las vías de transducción de señales. Esto nos dice que existe una íntima interacción entre cada una de las diferentes vías. Mientras que tratar al EOX es una necesidad común para el hongo, en diferentes organismos se hace uso de diferentes mecanismos para detoxificarse de las EROS y asegurar supervivencia (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

En el caso de *S. pombe* tiene una elaborada red de señales que activan un factor de transcripción después de detectar el EOX. Existe evidencia de que la Histidina Quinasa puede servir como un sensor de EROS, activando una red de señalización que detecta cambios en un ambiente oxidativo de una célula. Las células de *S. cerevisiae* parecen responder a señales oxidantes directas con los reguladores transcripcionales tales como Yap1p. Todas las especies fúngicas examinadas parecen expresar factores de transcripción similares al Yap1p de *S. cerevisiae*. Además, los genes homólogos Hsf1p y Skn7p pueden ser localizados en las secuencias genómicas de *S. pombe* y *C. albicans*, y probablemente están presente en todos los hongos (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

### **3. HIPÓTESIS.**

- A. En *Aspergillus terreus*, existe un EOX al final de la trofofase que precede el inicio de la idiofase (producción de lovastatina).
- B. El EOX es mayor en FS que en FL, lo cual se manifiesta en una mayor expresión de los genes *sod1* y *catB*.

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la expresión de los genes *sod1* y *catB*, como indicadores del nivel de EOX y relacionar éste con la inducción de los genes de biosíntesis de lovastatina en *Aspergillus terreus*, en FS y FL.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1) Diseño de oligos y obtención por PCR de las sondas correspondientes a los genes *sod1*, *catB*, *lovE*, *brlA* y *fadA*.
- 2) Determinar el período de transición de trofofase a idiofase durante la FS y FL de lovastatina, siguiendo la cinética de producción del metabolito.
- 3) Analizar la expresión de los genes antes mencionados, por Northern-blot, durante la trofofase e idiofase en la FS y FL de lovastatina.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 APARATOS Y/O EQUIPOS EMPLEADOS.

- Balanza analítica OHAUS Explorer.
- Cámaras de electroforesis: Electrophoretic Gel System E-C Minicell EX370 M y EC 350.
- Centrífuga 5415, Eppendorf.
- Electroporador 2510, Eppendorf.
- Espectrofotómetro UV-1201 Shimadzu.
- Eppendorf Biophotometer.
- Gel DOC 2000 BIO-RAD.
- Incubadora Environ-Shaker 3597.
- Horno de microondas SANYO.
- Microscopio Olympus CH30.
- Potenciómetro Orion mod.525 A.
- Termociclador Mastercycle Personal, Eppendorf.
- Transiluminador de luz UV, BIO-RAD.
- Ultracentrífuga AVANTI 30 BECKMAN.
- Ultracongelador -20°C Revco.
- Ultracongelador -70°C Forma Scientific.

### 5.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

#### 5.2.1 Cepa fúngica: *Aspergillus terreus* TUBF-514.

La cepa fue proporcionada por la Technical University of Budapest (TUB), Hungría (Szakács *et al.*, 1998). El tamaño de su genoma es de 35 Mb. Es un hongo filamentosos que produce metabolitos secundarios clínicamente relevantes como las estatinas.

Linaje: *Eukaryota*; *Fungi*; *Dikarya*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetes*; *Eurotiomycetidae*; *Eurotiales*; *Trichocomaceae*; *mitosporic Trichocomaceae*; *Aspergillus*; *Aspergillus terreus*.

#### 5.2.2 Cepa bacteriana: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

La cepa es utilizada normalmente en experimentos de transformación debido a la alta eficiencia que puede conseguirse en ella (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes por microgramo de ADN) (Hanan, 1983). Entre sus características más útiles está la de poseer una delección 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  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.

### 5.3 VECTORES PLASMÍDICOS.

#### 5.3.1 pGem-T y pGem-T easy.

Son sistemas convenientes para clonación de productos de PCR. Los vectores son preparados al digerirse con la enzima *EcoRV* y al agregarle una timidina en el lado 3' de ambos extremos. Esta 3'-T sobresaliente en el sitio de inserción, mejora la eficiencia de la ligación de un producto de PCR dentro del plásmido, además que previene la recircularización del vector (Fig. 5.1 y 5.2).

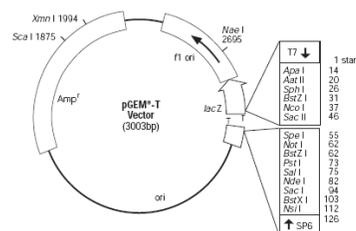


Figura 5-1 Vector pGem-T.

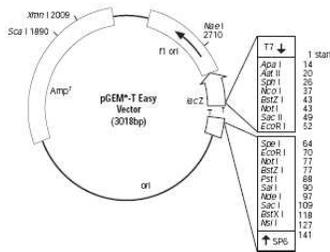


Figura 5-2 Vector pGem-T Easy

## 5.4 MEDIOS DE CULTIVO.

### 5.4.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA *Aspergillus terreus*.

5.4.1.1 **MEDIO CZAPEK:** De esporulación y mantenimiento.

	g/L
Sacarosa	30.0
NaNO <sub>3</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01

5.4.1.2 **MEDIO PMI:** medio de esporulación y mantenimiento.

	g/L
Balto peptona	5.0
Lactosa	5.0
NaCl	4.0
Sólidos de maceración	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.060
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.050
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.003
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001

5.4.1.3 **MEDIO POWER:** De esporulación y mantenimiento.

Medio PMI	500 mL
Medio CZAPEK	500 mL
Agar	2%

5.4.1.4 **SOLUCIÓN DE SALES 20X. (SS20X):** Guardar a temperatura ambiente.

	g/L
NaNO <sub>3</sub>	120.0
KCl	10.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4

5.4.1.5 **SOLUCIÓN DE ELEMENTOS TRAZA (SET):**

	g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	1.1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
CoCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11
Na <sub>4</sub> EDTA	5.0

Se fueron adicionando los sólidos en orden, a 80 mL de H<sub>2</sub>O destilada, disolviendo cada uno completamente antes del siguiente. Se calentó a ebullición, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 100 mL.

5.4.1.6 **MEDIO COMPLETO PARA A. terreus:** obtención de micelio.

SS20X	5 mL
SET	100 µL
Glucosa	1 g
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%. Por cada

matraz Erlenmeyer de 125 mL, se colocaron 35 mL de medio completo, se esterilizó 15 min a 120°C. Se inoculó con una asada de esporas y se incubó a 30°C durante 18 h.

#### 5.4.2 MEDIO DE CULTIVO PARA *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

##### 5.4.2.1 MEDIO LURIA-BERTANI (LB):

	g/L
Bacto-triptona	10
NaCl	10
Extracto de Levadura	5
Agar (para medio sólido)	20

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.

##### 5.4.2.2 Antibióticos suplementados.

Se empleó Ampicilina (SIGMA) para selección de transformantes y mantenimiento del plásmido con resistencia a éste. El stock se preparó en una concentración de 100 mg/mL. Se esterilizó por filtración, al emplear membranas de 0.20  $\mu$ m de poro marca Millipore. Se guardó en alícuotas de 500  $\mu$ L a -20°C. Cuando se requirió, el medio LB fue suplementado con Ampicilina en una concentración de 100  $\mu$ g/mL.

#### 5.5 CONDICIONES DE CULTIVO: PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA EN FS Y FL.

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 crecida 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. Los cultivos fueron inoculados a una concentración de  $2 \times 10^6$  esporas/mL e incubados a 30°C a una agitación de 200 r.p.m. durante 6 días.

Para FS, una concentración de 2.5 veces del medio de producción de lovastatina (2.5X) fue inoculado con esporas de *A. terreus* ( $2 \times 10^6$  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 cm<sup>3</sup>, 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).

Para ambos tipos de fermentación, cada punto de muestreo, se realizó por triplicado.

#### 5.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS.

##### 5.6.1 LOVASTATINA.

**EXTRACCIÓN DE FS.** Se pesó 1 g de soporte húmedo, al cual se le adicionó 10 mL de acetonitrilo al 50% con agua, con agitación durante 30 min a 250 r.p.m. y después 30 min en el sonicador (Branson 120), la muestra se pasó a través de una membrana de 0.40  $\mu$ m de poro (Millipore). Las muestras se guardaron en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

**EXTRACCIÓN DE FL.** Se tomaron dos tipos de muestra, una proveniente del caldo de fermentación, del cual se tomaron 2 mL de caldo, al cual se le

adicionaron 2 mL de acetonitrilo al 50%; la otra proveniente del micelio, se pesó 1 g de micelio húmedo el cual se pasó a un tubo con 5 g de perlas de vidrio y 10 mL de acetonitrilo al 50%, seguida de una agitación en el vórtex durante 2 min. Los tubos se colocaron en el sonicador durante 30 min, la muestra se pasó a través de una membrana Millipore de 0.40  $\mu\text{m}$  de poro. Todas las muestras fueron guardadas en microtubos de 1.5 mL a 4°C hasta su cuantificación.

**CUANTIFICACIÓN.** Se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), utilizando una columna Novapack C-18 (150 x 3.9 mm, 4 $\mu\text{m}$ ), con una fase móvil de acetonitrilo: ácido fosfórico 0.1 % (50% v/v), la velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min, y la forma  $\beta$ -hidroxiácida se determinó a 238 nm con un detector de arreglo de diodos.

### 5.6.2 AZÚCARES.

Se realizó por HPLC, empleando una columna YMC-Pack NH2 S-5 de 120Å (4.6x250 mm, 12 nm), con una fase móvil de acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (75:25), la velocidad de flujo fue de 1 mL/min. La lactosa y la glucosa fueron detectadas a los 8 y 5 min respectivamente a 190 nm, con un detector de arreglo de diodos.

### 5.6.3 pH.

**pH en FS.** Se tomó 1 g de soporte húmedo en 10 mL de agua. La mezcla fue sometida al vórtex durante 2 min, el pH fue medido directamente en el líquido resultante.

**pH en FL.** Se tomó directamente del caldo de fermentación después de haber filtrado el micelio.

### 5.6.4 BIOMASA Y HUMEDAD.

**Humedad en FS.** Se tomaron unos cubos de soporte húmedo y se secaron al horno a 60°C durante 48 h; por diferencia de peso se conoció la humedad. La biomasa se determinó por el método de

Glucosamina (Tomasselli *et al.*, 2001; Marcial *et al.*, 2005) empleando el soporte seco utilizado para conocer la humedad.

**Biomasa en FL.** Se empleó el método de peso seco, donde el micelio filtrado, se secó al horno a 60°C durante 48 h.

### 5.6.5 EXPRESIÓN DE GENES.

**En FS:** En una caja de Petri, se colocaron de 5 cubos de soporte húmedo, los cuales se congelaron con N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

**En FL:** Se tomó el micelio completo de un solo matraz, el cual fue pasado a través de un filtro Nyal estéril. La biomasa se colocó dentro de una caja Petri y se congeló con N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

## 5.7 ÁCIDOS NUCLEICOS.

### 5.7.1 ADN.

#### 5.7.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Aspergillus terreus*.

Se pusieron a germinar esporas de *A. terreus* sobre MEDIO COMPLETO. Se incubaron a 30°C durante 20 h. El micelio producido se recogió y se colocó en una caja de Petri para luego ser congelado con N<sub>2</sub> líquido. El micelio se guardó a -70°C hasta su procesamiento.

El método empleado para la extracción de ADN es el que a continuación se describe:

El micelio congelado se molió y se hicieron alícuotas de 0.5 mL del volumen del tubo eppendorf. A cada tubo, se le adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de BE<sup>1</sup>, se incubó a 68°C durante 30 min. Se centrifugó 5 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5M pH 4.2, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 10 min.

<sup>1</sup>Buffer de extracción: EDTA 50 mM y SDS 0.2%.

Se centrifugó 5 min. Del sobrenadante se tomaron 700  $\mu\text{L}$  y se le adicionaron 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Se centrifugó 5 min, se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA pH 8.0, y se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M pH 7.0. La mezcla se calentó 68°C durante 1 h. Para solubilizar, se mezcló por agitación en vórtex. Se le adicionó 1 mL de etanol al 95% y se centrifugó durante 5 min. La mezcla se lavó 2 veces con 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA pH 8.0 con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNAsa. La mezcla se incubó a 37°C durante 1.5 h. Después, se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de TE<sup>2</sup>. Se extrajo con 1 volumen de CIA (Cloroformo-Alcohol Isoamílico). Se centrifugó durante 5 min. De más o menos 1/10 del volumen total, se le agregó acetato de sodio 3M pH 5.2, más 700  $\mu\text{L}$  de etanol frío (2.5 vol.). Se centrifugó durante 20 min a 14000 r.p.m. a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70%. Se secó y resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O desionizada.

### 5.7.1.2 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*: LISIS ALCALINA.

Se colocaron cultivos O.N. de las células a analizar. Se centrifugaron 1.5 mL de cultivo durante 2 min a la velocidad máxima. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con ayuda de un palillo y el vórtex en 200  $\mu\text{L}$  de la solución I<sup>3</sup> hasta la homogeneidad. Se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución II<sup>4</sup> (preparada al momento) mezclando por inversión hasta que el lisado estuviera claro. Se agregó también 200  $\mu\text{L}$  de la solución III<sup>5</sup>, se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 5 min. Se centrifugó durante 10 min a máxima velocidad para bajar los restos celulares y cromosomas. El sobrenadante fue

transferido a un tubo limpio, agregándole 100 $\mu\text{L}$  de TE 10:1 y un volumen de fenol-cloroformo isoamílico, mezclando bien por inversión y centrifugando 5 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio adicionándole 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo (para precipitar proteínas), se mezcló bien por inversión y se centrifugó durante 2 min a la máxima velocidad. El sobrenadante se volvió a transferir a otro tubo, adicionándole 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión y dejando a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se centrifugó durante 10 min para bajar el ADN. El sobrenadante fue removido y desechado, el tubo se secó y se le agregó 1 volumen de etanol al 70% (v/v en agua). Se centrifugó durante 3 min, se desechó el sobrenadante. La pastilla de ADN se secó y resuspendió en 20  $\mu\text{L}$  de RNAsa.

### 5.7.1.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli*: MEGAPREP.

Se inocularon 50 mL de medio LB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende amplificar y se cultivaron de 12 a 16 h a 37°C, con una agitación de 250 r.p.m. El medio LB se suplementó con el antibiótico (en este caso Ampicilina en una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células se recogieron por centrifugación a 5,000 r.p.m. durante 5 min. Las células fueron resuspendidas en 3 mL de solución I. Se mezcló bien y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 6 mL de solución II (preparada al momento). Se mezcló suavemente (una agitación vigorosa origina la ruptura del ADN genómico de la bacteria hospedadora, lo que se traduciría en una contaminación del ADN plasmídico con el ADN genómico de la bacteria) y se mantuvo en hielo durante 10 min. Posteriormente se añadieron 4.5 mL de una solución, previamente enfriada a 4°C de solución III. Se mezcló vigorosamente y se mantuvo durante 10 min. Se centrifugó nuevamente a 15,000 r.p.m. a 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue recuperado y pasado a través de un filtro

<sup>2</sup> Tris-EDTA pH 8.0 (TE).

<sup>3</sup> Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM TRIS pH 8.0 y 10 mM EDTA pH 8.0.

<sup>4</sup> Solución II. 400  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O; 50  $\mu\text{L}$  SDS 10% y 50  $\mu\text{L}$  NaOH 2 N.

<sup>5</sup> Solución III: 5 M Acetato de Potasio, ácido acético glacial.

Nytral de 25  $\mu\text{m}$  de poro. El filtrado se recogió en un nuevo tubo. El ADN plasmídico se precipitó añadiendo 0.6 volúmenes de isopropanol y manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, se centrifugó a 8,000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 10 min; el precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v). Tras secarlo se resuspendió en 1 mL de TE y guardado en un tubo eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 5.7.2 ARN.

### 5.7.2.1 EXTRACCIÓN.

El método empleado para extracción de ARN, es el que a continuación se describe:

Cada muestra congelada se molió. Se llenaron los tubos a un volumen, para muestras de FL, no más de 250  $\mu\text{L}$ , y para el caso de muestras de FS, no más de 500  $\mu\text{L}$ . Se llenaron hasta 4 tubos por muestra, los cuales se echaron a flotar en  $\text{N}_2$  líquido. El polvo restante se guardó en microtubos, los cuales se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A cada tubo se le adicionó 1 mL del reactivo de TRIZOL (Invitrogene), se mezcló por agitación en vórtex hasta su descongelación e incorporación total del reactivo. Para muestras de FS, se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 5 min a temperatura ambiente y para muestras de FL, solamente se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  a 12,000 r.p.m. durante 15 min. La fase acuosa se colectó y colocó en un nuevo tubo. La precipitación se realizó con 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y al colocarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  O.N. Se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  a 12,000 r.p.m. durante 30 min. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75%, se mezcló por agitación en vórtex y se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  a 7,500 r.p.m. durante 5 min. Finalmente el ARN se resuspendió en 11  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O-depc}^6$  por cada tubo. Para resuspender, se dejó en hielo durante 10 min, y

después se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min con agitación.

### 5.7.2.2 CUANTIFICACIÓN.

Se utilizó el espectrofotómetro, este método sirvió también para ver parámetros de pureza y limpieza. Se utilizaron celdas de cuarzo o celdas especiales (Uvette de Eppendorf). Para medir la absorbancia al blanco, se utilizaron 998  $\mu\text{L}$  de agua desionizada + 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O-depc}$ . Se mezcló por agitación en vórtex y se midió la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Para medir la absorbancia de las muestras, se usaron 998  $\mu\text{L}$  de agua desionizada + 2  $\mu\text{L}$  de ARN (muestra), se mezcló por agitación en vórtex y se midió la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. La medición se realizó en el Eppendorf Biophotometer

Se preparó un gel con formaldehído (como se describe en los siguientes apartados) y se corrió 1  $\mu\text{g}$  de ARN. Se visualizó con luz UV y esta imagen sirvió como base para obtener todos los factores para luego obtener concentraciones homogéneas con cantidades mayores de ARN.

### 5.7.2.3 ELECTROFORESIS EN GELES CON FORMALDEHÍDO.

Por cada 100 mL de solución de agarosa se necesitaron de 1.2 g de agarosa + 87 mL de agua (destilada estéril), la mezcla se fundió al microondas. Entre  $50-55^{\circ}\text{C}$ , se le agregaron 10 mL de MAE 10X<sup>7</sup>. En la campana de extracción, se le agregaron 3 mL de formaldehído al frasco. Tras gelificación, se colocaron dentro del tanque de electroforesis tampón MAE 1X. Las muestras se colocaron dentro del pocillo y se corrió el gel de 2 a 4 h a 150-200 V. Las bandas se visualizaron con la luz ultravioleta, se tomó la foto y se procedió a la transferencia o Northern-blot.

<sup>6</sup> Dietilpirocarbonato: 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

<sup>7</sup> MAE10X: 0.2 M MOPS, 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA, ajustado a pH 7.0 con NaOH.

#### 5.7.2.4 NORTHERN BLOT.

La cámara de transferencia fue limpiada con SDS 1% y enjuagada con H<sub>2</sub>O-depc. Se colocó buffer SSC10X<sup>8</sup> en la cámara hasta los 2 bordes (pero sin rebasarlos). Se colocó 1 tira larga de filtro 3MM y se verificó que los extremos colgasen y fueran mojados por el buffer, enseguida se colocaron la 2da. y la 3er. tira. Con cuidado, se colocó el gel boca abajo (de manera que la transferencia se haga de la parte mas plana), también se colocó la membrana, y después se colocaron los 3 cuadros de filtro 3MM (al tamaño del gel), seguido del papel absorbente y/o papel periódico. Se colocó un vidrio cuadrado (centrado) y un libro de 250 g. Se dejó toda la noche. Después de 12-16 h, la transferencia fue desmontada, quitando todo el peso hasta llegar a la membrana, la cual fue rotulada con lápiz.

#### 5.7.2.5 FIJACIÓN DEL ARN A LA MEMBRANA.

En un recipiente, se colocaron 500 mL de NaOH 0.05 M, dentro del cual, se colocó la membrana y con cronómetro en mano, se contaron 5 min. Se sacó la membrana y se enjuagó durante 2 min con agua corriente. Después de fijar la membrana, se colocó dentro de un recipiente que contuviera SSC2X. La membrana se envolvió con egapack, para luego ser llevada al transiluminador, para marcar ribosomales (carriles) con lápiz. Se tomó la fotografía y se guardó en el refrigerador para su posterior uso.

### 5.8 DISEÑO DE PRIMER'S.

#### 5.8.1 PRIMER'S para obtener la SONDA *sod1* (Cu, Zn - Superóxido Dismutasa).

Se realizó tomando en cuenta las secuencias de los genes de interés ya publicados en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), de hongos del género *Aspergillus* y *Neurospora sp.*, ya que al

<sup>8</sup> SSC10X: NaCl 1.5M + Citrato de sodio 0.15M, ajustado a pH 7 con HCl 0.1N.

momento de diseñar estos oligos, el genoma de *A. terreus* aún no se encontraba publicado, además, el gen no había sido clonado antes, por lo que los primer's resultaron degenerados. Los alineamientos múltiples y la búsqueda de zonas conservadas, se encuentra en el anexo 1.

#### 5.8.2 PRIMER'S para obtener la SONDA *catB* (Catalasa B).

Se realizó tomando en cuenta las secuencias de los genes de interés ya publicados en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), de hongos del género *Aspergillus* y *Neurospora sp.*, ya que al momento de diseñar estos oligos, el genoma de *A. terreus* aún no se encontraba publicado, además, el gen no había sido clonado antes, por lo que los primer's resultaron degenerados. Los alineamientos múltiples y la búsqueda de zonas conservadas, se encuentra en el anexo 2.

#### 5.8.3 PRIMER'S para obtener la SONDA *brlA* (Factor transcripcional de la esporulación)

Para el diseño de los oligos, se consideró el genoma de *Aspergillus terreus* ya publicado por el Broad Institute<sup>9</sup> o directamente en el NCBI con el número de acceso al Genbank: XM\_001214318 para el gen.

#### 5.8.4 PRIMER'S para obtener la SONDA *fadA* (Subunidad $\alpha$ de la proteína G).

Los oligos se diseñaron a partir del genoma de *Aspergillus terreus* por el BROAD INSTITUTE, o a través del número de acceso al Genbank XM\_001210595 del NCBI.

<sup>9</sup>

[http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus\\_terreus/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_terreus/Home.html)

### 5.8.5 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS Y BÚSQUEDA DE ZONAS CONSERVADAS.

Se realizó empleando el programa Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3. Las zonas conservadas se encontraron con el mismo software.

### 5.8.6 OBTENCIÓN DE SONDAS PCR, EMPLEANDO EL TERMOCICLADOR DE GRADIENTE.

La obtención de las sondas por PCR, se realizó con la composición de la siguiente mezcla de reacción:

Componente:	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O (grado Biología Molecular)	52.5
Buffer 10X	10.0
dNTP's 10 mM	4.0
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.0
PrimerF 10 mM	5.0
PrimerR 10 mM	5.0
DNA (dilución 10 <sup>-1</sup> )	20.0
Taq Polimerasa (Invitrogen®)	0.5
Volumen Total	100.0

Las condiciones del programa de PCR, se describen en la Tabla 5-1.

**Tabla 5-1.** Pasos programados en el Termociclador de gradiente para realizar PCR y obtener las diferentes sondas.

	<i>sod1</i>	<i>fadA</i>	<i>brlA</i>
1	94°C; 3'	94°C; 3'	94°C; 3'
2	94°C; 30''	94°C; 30''	94°C; 30''
3	56°C; 50'' G: 4°C	63°C; 50'' G: 4°C	66°C; 50'' G: 4°C
4	72°C; 30''	72°C; 30''	72°C; 30''
5	GOTO 2 REP 35	GOTO 2 REP 35	GOTO 2 REP 35
6	72°C; 10'	72°C; 10'	72°C; 10'

Donde **G** es gradiente de temperatura. **GOTO** indica a partir de que paso iniciar los ciclos y **REP** indica el número de ciclos a realizar.

### 5.8.7 FREEZE AND SQUEEZE: PURIFICACIÓN DE SONDAS.

Se hizo un agujero en la tapa de un microtubo de 0.5 mL con la aguja caliente (al mechero), generalmente se prepararon de 2 a 3 tubos por banda. Se colocó "lana de vidrio" en el fondo del tubo perforado y se empacó con ayuda de unas pinzas Millipore y se rotularon. El tubo perforado se colocó dentro de otro microtubo de 1.5 mL, el cual también fue rotulado. Cuando nuestras muestras terminaron de correr, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 0.1%. El gel teñido se colocó en una cámara de U.V. y se cortó la banda con cutter, se metió dentro de los tubos de 0.5 mL. Los tubos se congelaron con N<sub>2</sub> líquido (ambos tubos: 0.5 y 1.5 mL) y en caso de no contar con N<sub>2</sub> líquido, los tubos se congelaron a -70°C durante 15-20 min o lo suficiente para congelar la agarosa. Se colocaron dentro de la centrifuga, primero el tubo de 1.5 mL y dentro de este el de 0.5 mL. Se centrifugaron durante 5 min a 8000 r.p.m. A cada tubo se le agregó 2.5 µL de glucógeno (25 mg/mL). Se procedió a agregar 3.5 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5 M/Etanol absoluto (1:6), todo frío. Se dejaron precipitando O.N. a -20°C. Se centrifugó 5 min a 14,000 r.p.m. a 4°C. La pastilla se lavo con 200 µL de etanol al 70% frío. Se centrifugó 5 min a 14,000 r.p.m. a 4°C. El etanol es decantado, para luego dejar secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 10 µL de agua.

### 5.8.8 CLONACIÓN DE LAS SONDAS EN EL VECTOR pGem-T o pGem-T easy.

Se empleó el kit de clonación de PROMEGA para ambos vectores. Se calculó una relación vector:inserto de 3 a 1.

Nota: Para conocer la concentración del ADN, se empleó un gel de agarosa con una concentración de 1 µg/mL de bromuro de etidio al 0.1%, se corrió 1 µL

de muestra de ADN (obtenido del Freeze and Squeeze). La concentración se determinó al tomar como base que 20 ng de ADN son apenas visibles y haciendo una correlación aproximada a la vista.

Por lo tanto, la mezcla de reacción para cada una de las sondas empleada para la ligación fué la siguiente:

COMPONENTE	Vol (µL)
Buffer 2X	5.0
pGem-T Vector	1.0
Producto de PCR	0.7
Ligasa	1.0
H <sub>2</sub> O (alta pureza)	2.3
Volumen total	10.0

La reacción se incubó a 4°C O.N.

### 5.8.9 TRANSFORMACIÓN EN *E.coli* DH5α.

Se empleó el método de Electroporación, para lo cual se prepararon células electrocompetentes. Se emplearon celdas de 0.1 cm, y se realizó lo siguiente: 60 µL de células electrocompetentes se colocaron en el fondo de la celda, se adicionaron 3 µL de mezcla de ligación. Esta mezcla se colocó dentro del electroporador, y se le dio un voltaje de 1100 V. Las transformantes obtenidas fueron recogidas y sembradas en medio de LB.

#### 5.8.9.1 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.

Inicialmente se sembraron células de *E.coli* DH5α en cajas con medio LB durante 16 h y 37°C. De una colonia aislada, se inocularon 10 mL de medio LB y se incubaron a 37°C a 150 r.p.m., hasta que se obtuvo una densidad de 0.5 a 0.6 a 600 nm (aproximadamente 2 h). Cuando se llegó a la densidad requerida, los matraces se incubaron en un baño de hielo por 15 min y posteriormente se centrifugaron 10 min a 5000 r.p.m. El sobrenadante fue decantando y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de agua helada. Se agregaron 500 mL de agua helada y se centrifugaron 10 min a

5000 r.p.m. El sobrenadante fue retirado y la pastilla se volvió a resuspender en 5 mL de agua fría, posteriormente se añadió 250 mL de agua helada, se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min, el sobrenadante se retiró y la pastilla fue resuspendida en 20 mL de glicerol al 10% (frío). Se mezcló bien y todo se transfirió a un tubo falcon de 50 mL. Se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se retiró y se resuspendió en 2 mL de glicerol frío al 10 %. Se formaron alícuotas de 40 µL por tubo eppendorf previamente enfriados con N<sub>2</sub> líquido. Se guardaron a -70°C.

#### 5.8.9.2 PCR DE COLONIA.

Se preparó la mezcla de reacción para PCR por colonia a estudiar, como se describe a continuación:

Componente:	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O (de alta pureza)	18.25
Buffer 10X	2.50
dNTP's 10 mM	1.00
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75
Primer 5' 10 mM	1.25
Primer 3' 10 mM	1.25
Taq Polimerasa (Invitrogen®)	0.125
Volumen Total	25.00

En la campana de extracción, se tomó una colonia con una punta para micropipeta estéril (de 200 µL), la colonia tomada se inoculó en una caja nueva con LB Amp<sup>100</sup> para descargar la mayoría de las células, y posteriormente se introdujo la misma punta dentro del tubo de PCR durante 5 min (sin agitar). Posteriormente, el tubo se tomó y se colocó dentro del termociclador, utilizando el programa correspondiente al fragmento a buscar. Posteriormente el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa, en donde las colonias seleccionadas fueron aquellas donde se produjo la amplificación del fragmento del gen al tamaño correspondiente.

## 5.9 MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS.

### 5.9.1 MARCAJE DE LAS SONDAS: Random Primer.

Se utilizó el Kit de marcaje Amersham Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) de GE Healthcare para marcar 50 ng de sonda con 5 µL de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP. El método empleado fue el siguiente:

Antes de iniciar, se calculó la concentración de la(s) sonda(s) en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Se hicieron controles positivos de cada sonda, poniendo 5 µL de ésta (el volumen que se puso en la hibridación) en una membrana de 3x3 cm de Hybond N+. Luego, en un vidrio, se le adicionaron 900 µL de NaOH 0.4 M y se dejó 20 min. Se lavó con agua y se dejó en SSC 2X.

Se preparó una dilución (con H<sub>2</sub>O) de la sonda, para tener un volumen de 50 µL con aproximadamente 40 ó 50 ng de ADN totales. Se calentó la sonda (diluida) 10 min a ebullición (~95°C) y luego se colocó en hielo durante 5 min. Por otra parte, se etiquetaron los tubos de marcaje (del kit) y se bajaron las bolitas de cada uno de ellos. A cada uno de ellos se le adicionaron 45 µL de la sonda. Ya en el gabinete, con cuidado, se adicionaron 5 µL de  $\alpha$ -dCTP<sup>32</sup> y se mezcló. Se incubó a 37°C por 30 min. Finalmente se añadieron 175 µL de NaOH 0.1 M y se dejó dentro del gabinete.

### 5.9.2 HIBRIDACIÓN.

Las membranas se prehibridaron junto con los controles correspondientes con 10 mL de PSE<sup>10</sup>, en el horno a 65°C durante 10 o 20 min. El PSE de prehibridación se desechó y se le agregó 10 mL de PSE nuevo al tubo de hibridación más 225 µL de la sonda marcada (50 µL sonda +175 µL de NaOH 0.1 M), para posteriormente meterlos en el horno e hibridar O.N. a 65°C.

<sup>10</sup> PSE: 3 mL de Fosfato sódico 1 M pH 7.2, 7 mL de SDS 10%, y 20 µl de EDTA 0.5M.

### 5.9.3 LAVADOS.

Se etiquetaron tubos falcon de 15 mL con el nombre de la sonda. Cada tubo de hibridación se sacó del horno y se vació el líquido dentro del tubo falcón correspondiente. Al tubo de hibridación se le adicionaron 100 mL de solución de lavado, el cual fue llevado nuevamente al horno de hibridación a 65°C durante 20 min, esta acción se realizó dos veces.

### 5.9.4 AUTORRADIOGRAFÍA.

Las membranas se colocaron entre dos películas de acetato y fueron envueltos en egapack y puestos dentro de un Hypercassette de Amersham LIFESCIENCE, el cual contenía pantallas intensificadoras de la misma marca. La exposición se llevó a cabo sobre películas Kodak Scientific Imaging Film, X-Omat Blue XB-1, de 18 x 24 cm, a -70°C. El tiempo de exposición fue directamente proporcional a la señal proporcionada por el contador Geiger-Müller.

### 5.9.5 DENSITOMETRÍA.

Se utilizó el programa ImageJ® para normalizar las señales emitidas en la película, las cuales eran proporcionales a la cantidad de transcritos del gen de estudio. Se empleó como base de cálculo el ARN ribosomal en cada carril.

## 5.10 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.

### 5.10.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Aproximadamente 250 µL de micelio molido proveniente de FS o FL, se mezclaron con 500 µL de BEP<sup>11</sup>. Los tubos se centrifugaron a 14,000 r.p.m. a 4°C durante 30 min. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo. Las proteínas se liofilizaron y se resuspendieron en 30 µL de H<sub>2</sub>O desionizada. Se tomaron 5 µL de

<sup>11</sup> Buffer de Extracción de Proteínas: EDTA 50mM, SDS 0.2%. 1 pastilla de COMPLETE (Roche)/2 mL de BEP.

proteína para cuantificar por el método de Bradford.

### 5.10.2 CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Se hizo una solución de 100 µg/mL de albúmina. Se hizo una dilución 1/10. La curva patrón se construyó de la forma siguiente:

µg	proteína (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	Bradford (µL)
0	0	800	200
2	20	780	200
4	40	760	200
6	60	740	200
8	80	720	200
10	100	700	200

Se realizó la siguiente mezcla para cuantificar proteína: 795 µL de H<sub>2</sub>O desionizada + 5 µL de proteína + 200 µL de Reactivo de Bradford. La mezcla se leyó a 595 nm y el resultado se extrapoló con la curva patrón.

### 5.10.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Se preparó el gel (de corrida y concentrador, ver anexo 3), se precorrió 30 min a 120 V. Se cargaron de 10 µg de proteína en un tubo eppendorf y se completó con BC<sup>12</sup>. Se cargó el gel y se corrió a 125 V durante 60 min con BE<sup>13</sup>.

### 5.10.4 ELECTROTRANSFERENCIA.

Se cortó una membrana PVDF a la medida del gel, aproximadamente 8.5 x 5 cm, más 4 cuadros de papel filtro 3MM del mismo tamaño. La membrana se activó al sumergirla en metanol absoluto por 30 seg, 20 min antes de lavarla dos veces con agua por 5 y 2 min (cada

lavado). Finalmente se colocó en BT<sup>14</sup>. La transferencia se llevó a 290 mA durante 60 min a 4°C (con hielo).

### 5.10.5 LAVADOS.

La membrana se bloqueó con leche al 8% en TBS-Tween 20<sup>15</sup>, durante 1 h en agitación. Se lavó con TBS-Tween 20, 2 o 3 veces para eliminar el exceso de leche.

### 5.10.6 OXYBLOT.

Se emplearon las instrucciones descritas en el OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit. Se emplearon 2 mL de sustrato luminiscente (luminol de Millipore®), durante 15 min en agitación. Se retiró la membrana y se quitó el exceso de sustrato y se colocó en parafilm. La membrana se colocó dentro de un cassette y se realizaron diferentes pruebas de tiempo. La película se reveló.

<sup>12</sup> Buffer de carga 3X: 6 mL de 0.5 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mL de glicerol, 0.75 g de SDS, 0.015 g de DTT, 0.005 g de azul de bromofenol. Llevar a 10 mL con H<sub>2</sub>O.

<sup>13</sup> Buffer de electroforesis: Buffer de electroforesis: 6.05 g de Tris-base, 28.8 g de glicina, 1 g de SDS. Poner a pH 8.3.

<sup>14</sup>Buffer de transferencia: 3.03 g Tris-base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol. Aforar a 1 litro H<sub>2</sub>O. El pH debe de estar entre 8.1 y 8.5.

<sup>15</sup> TBS: 2.42 g de Tris-HCl 20 mM; 8 g de NaCl 137 mM; Ajustar el pH a 7.6. Aforar a 1 litro. TBS-TWEEN 20: 0.5 mL Tween 20 en 1000 mL de TBS.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE FRAGMENTOS DE LOS GENES DE INTERÉS.

El diseño de los oligos correspondientes y el tamaño (en pares de bases) de cada sonda, se describen en la Tabla 6-1.

**Tabla 6-1** Diseño de oligos para amplificar un fragmento de cada uno de los genes de estudio.

GEN	OLIGO 5'→3'	TAMAÑO DE SONDA (pb)	REFERENCIA
<i>sod1</i>	TCCGTGGWGACTCCAARRTCWCCGG <sup>16</sup>	281	#GenBank: XM_001215721
	CKKCTTGGAGCCSWYGGMGTACCC		
<i>catB</i>	TGGGAYTTCTTCAGCYMSCAGCC	234	#Id. B.I. <sup>17</sup> ATEG_07477.1
	CGSWKGWAGTCRGSRTTCTTGCC		
<i>brlA</i>	AACCGTCCCCTCTATCCGGAAGG	495	#GenBank: XP_001214318
	GCATGGTTCGCGTAATGATGCATGGC		
<i>fadA</i>	TGCCATTGAGCGCATCGCTCAACC	535	#Id. B.I. ATEG_00509.1
	CATTGACTGCGCCATGACGAACC		

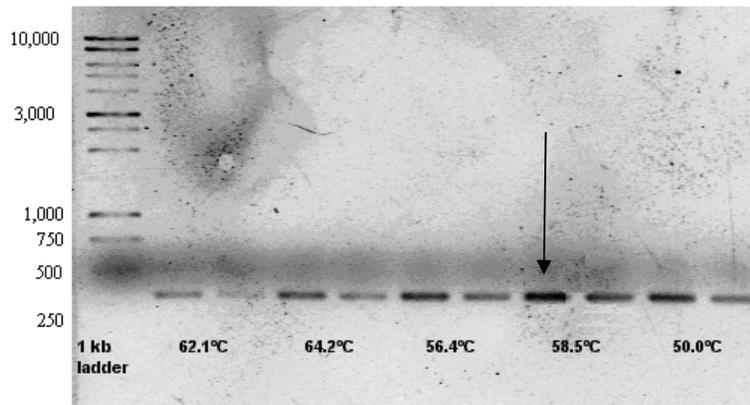
Se realizaron experimentos para obtener la temperatura óptima de anillamiento o de hibridación, para lo cual se utilizó el termociclador de gradiente (TG), determinándose la mejor para cada caso.

<sup>16</sup>Oligos degenerados: No existía publicado el genoma de *Aspergillus terreus* cuando se diseñaron. Y= C/T, M=A/C, S=C/G, K=G/T, R=A/G, N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, H=A/T/C, W=A/T.

<sup>17</sup> Número de identificación en el Broad Institute: [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus\\_terreus/FeatureSearch.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_terreus/FeatureSearch.html)

### 6.1.1 PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN *sod1*.

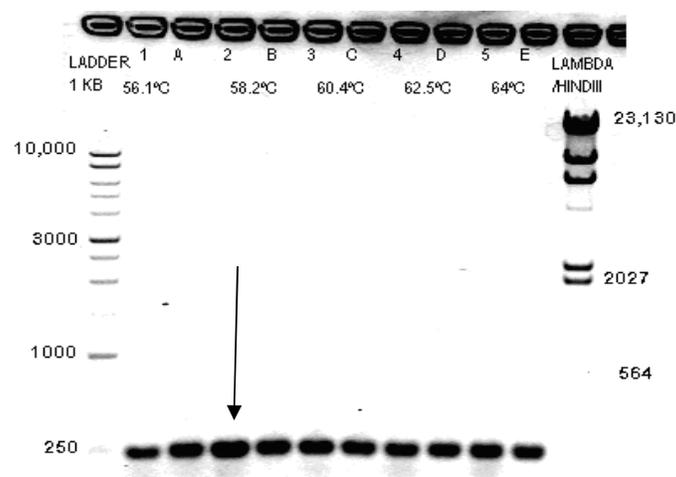
Para obtener el fragmento del gen *sod1* de 281 pb, al probarse 5 temperaturas diferentes, se encontró que la mejor temperatura de anillamiento (o hibridación) fue de 58.5°C (Fig.6-1).



**Figura 6-1** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al emplear 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen *sod1* de 281 pb.

### 6.1.2 PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN *catB*.

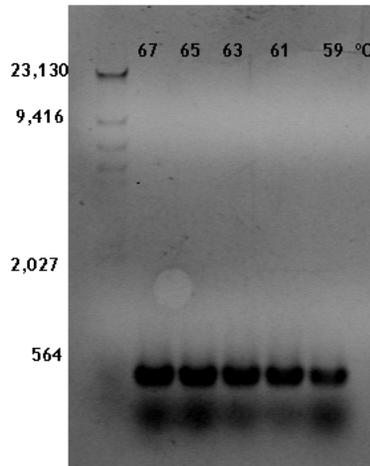
Para obtener el fragmento del gen *catB* de 234 pb, se encontró que al probarse 5 temperaturas distintas de hibridación, la mejor temperatura resultó ser la de 58.2°C (Fig.6-2).



**Figura 6-2** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen *catB* de 234 pb.

### 6.1.3 PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN *brlA*.

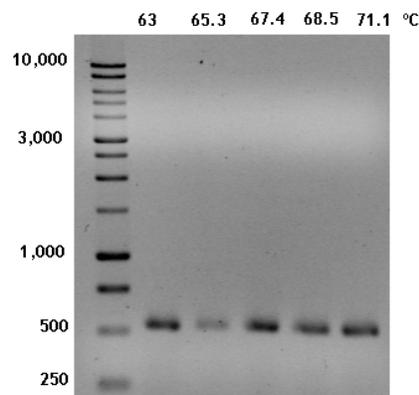
Para obtener el fragmento correspondiente al gen *brlA* de 495 pb, existió un rango de temperatura comprendido entre 61°C y 67°C, donde el producto de PCR fue obtenido óptimamente (Fig.6-3).



**Figura 6-3** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen *brlA* de 495 pb.

### 6.1.4 PCR PARA OBTENER UN FRAGMENTO DEL GEN *fadA*.

La obtención del fragmento de 535 pb correspondiente al fragmento del gen *fadA*, existió un rango de temperatura, donde el producto de PCR fue obtenido óptimamente, y fue entre 67.4°C y 71.1°C, aunque también mostró buen resultado a 63°C (Fig.6-4).



**Figura 6-4** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de PCR al probar 5 temperaturas diferentes de hibridación, para obtener el fragmento correspondiente al gen *fadA* de 535 pb.

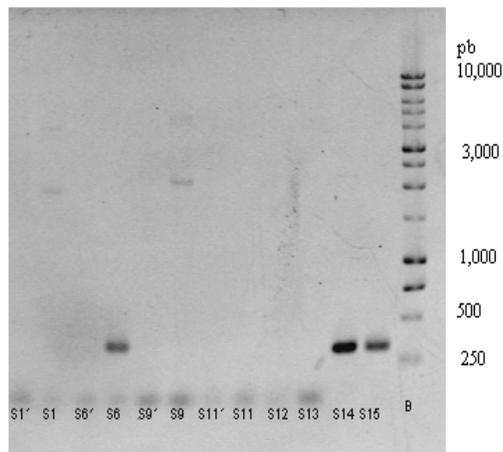
## 6.2 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE LOS GENES *sod1*, *catB*, *brlA* Y *fadA*.

Cada uno de los fragmentos fue clonado dentro de un vector pGem-T o pGem-T easy (según la disponibilidad). El resultado de la selección de las transformantes se describe en los siguientes apartados.

## 6.3 TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.

### 6.3.1 TRANSFORMANTES DE *sod1*.

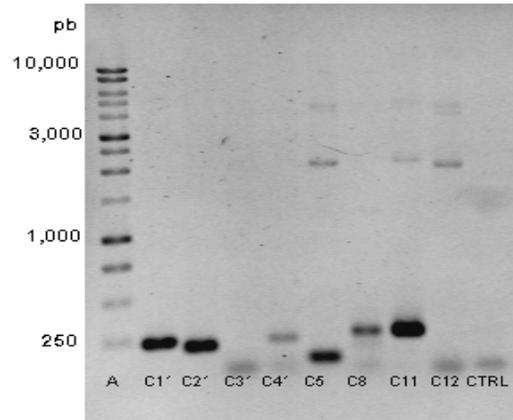
Se seleccionó la transformante indicada como S15, que mostró tener un fragmento arriba de 250 pb, correspondiente al fragmento del gen *sod1* (Fig.6-5).



**Figura 6-5** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 281 pb correspondiente al gen *sod1*.

### 6.3.2 TRANSFORMANTES DE *catB*.

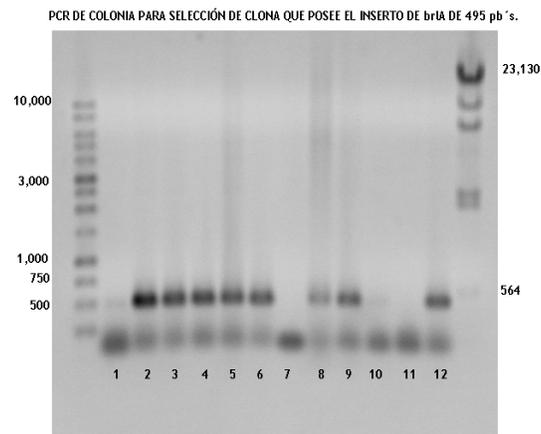
Se seleccionó la transformante marcada como C2 para análisis, ya que se obtuvo una amplificación de un fragmento por debajo de 250 pb, que correspondería al fragmento del gen *catB* de 234 pb (Fig.6-6).



**Figura 6-6** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 234 pb correspondiente al gen *catB*.

### 6.3.3 TRANSFORMANTES DE *brlA*.

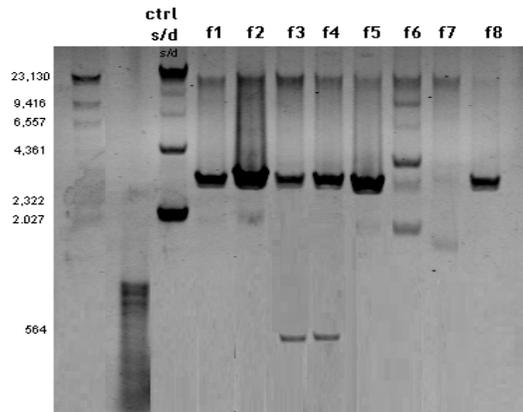
Se seleccionó la transformante indicada como 2 de todas las colonias obtenidas, ya que mostró tener un fragmento arriba de 500 pb, que correspondería al fragmento de *brlA* de 535 pb (Fig.6-7).



**Figura 6-7** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado del PCR de colonia, para buscar aquella que posee el inserto de 535 pb correspondiente a *brlA*.

### 6.3.4 TRANSFORMANTES DE *fadA*.

De las 8 colonias obtenidas, la indicada como f3, fue seleccionada, ya que mostró tener un fragmento por debajo de las 500 pb, que correspondería al fragmento del gen *fadA* de 495 pb (Fig.6-8).



**Figura 6-8** Gel de agarosa al 1% que muestra el resultado de la digestión realizada con la enzima *EcoRI* al ADN plasmídico obtenido de cada una de las 8 colonias, para aquella que poseía el fragmento de 495 pb correspondiente a *fadA*.

### 6.4 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS.

El resultado de la secuenciación obtenida, se muestra en la Tabla 6-2. La secuenciación obtenida y comparada con las bases de datos (programa Blast del NCBI), comprobó que cada uno de los fragmentos obtenidos, correspondían al gen de interés, por lo que al marcarse con  $\alpha$ dCTP<sup>32</sup>, se empleó cada uno como SONTA para los experimentos posteriores de hibridación. En el caso de la sonda del gen *lovE*, éste fue secuenciado en un trabajo anterior.

**Tabla 6-2** Resultado del análisis de tipo Blast para cada una de las secuencias obtenidas.

<b>Gen</b>	<b>Resultado del Blast</b>	<b>No. acceso al GenBank</b>	<b>% identidad</b>
<b><i>sod1</i></b>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 superoxide dismutase (ATEG_06543) mRNA, complete cds	XM_001215721.1	94
<b><i>catB</i></b>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 catalase B precursor (ATEG_07477) mRNA, complete cds	XM_001216098.1	95
<b><i>brlA</i></b>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 regulatory protein brlA (ATEG_05140) mRNA, complete cds	XM_001214318.1	96
<b><i>fadA</i></b>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 guanine nucleotide-binding protein alpha subunit (ATEG_00509) mRNA, complete cds	XM_001210595.1	97
<b><i>lovE</i></b>	Secuenciada en otro trabajo (Barrios-González <i>et al.</i> , 2008).	-----	-----

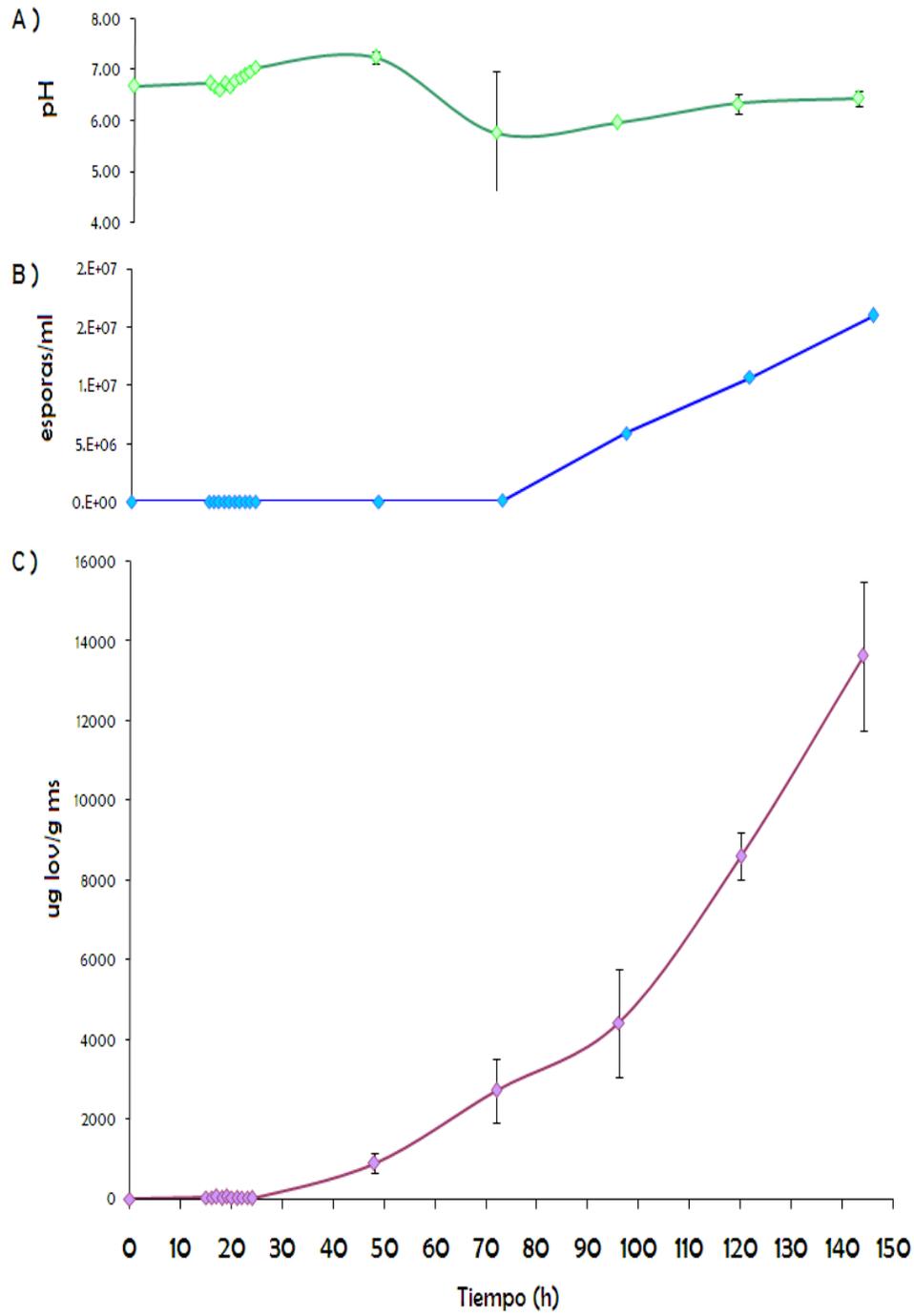
## 6.5 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATINA Y ESPORULACIÓN ENTRE FS Y FL.

La producción de lovastatina obtenida en cada uno de los sistemas fue diferente y comparable con el resultado de otros experimentos realizados anteriormente en el laboratorio (Baños *et al.*, 2005), al día 6 de producción.

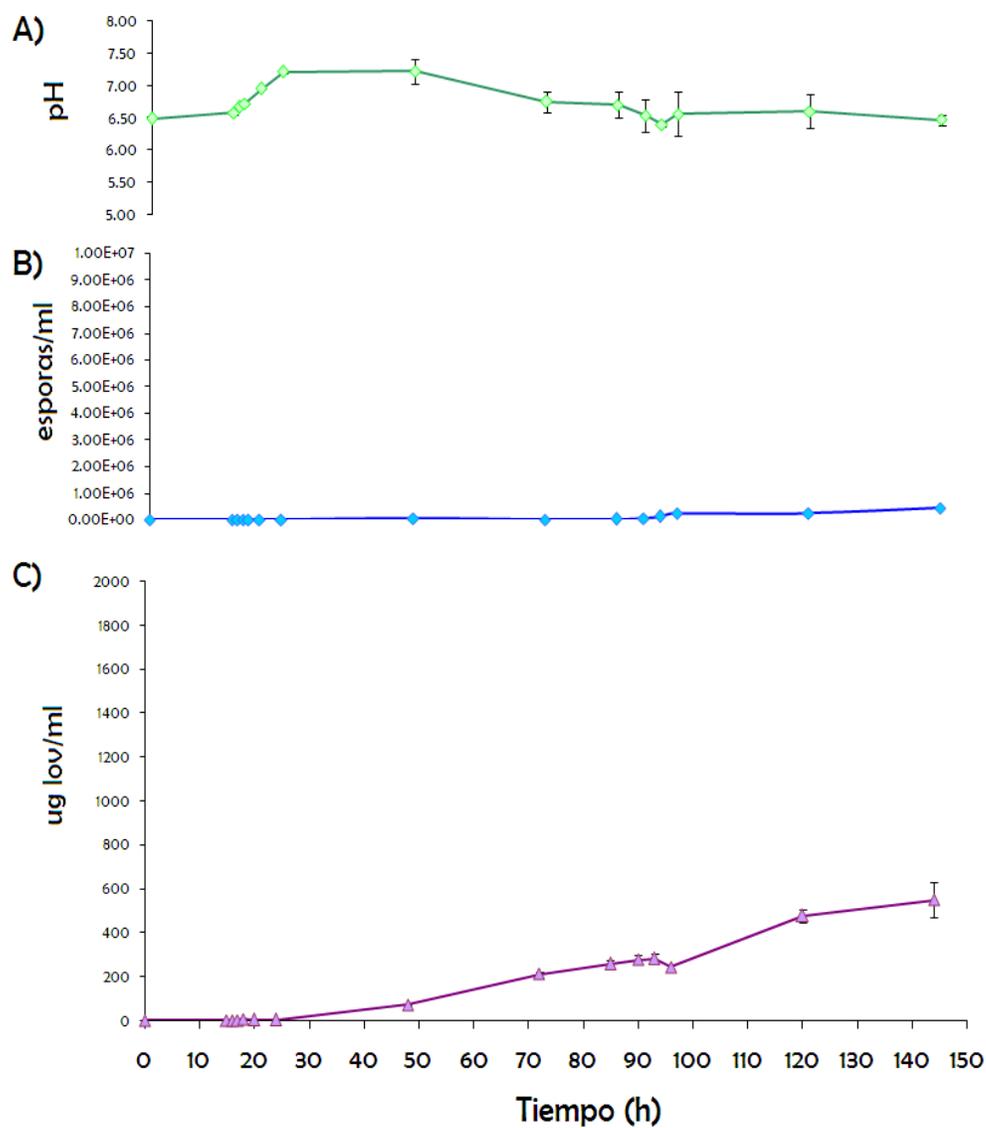
En el caso de FS, se obtuvo una producción final promedio de lovastatina de 13,631  $\mu\text{g/g ms}$  (micelio seco) (Fig.6-9.C), y para el caso de FL, se obtuvo una producción final promedio de 547  $\mu\text{g/mL}$  (Fig.6-10.C), 25 veces más en FS que en FL.

La producción de esporas en FS inicia entre las 48 y 72 h, llegándose a producir hasta un promedio de  $1.6 \times 10^7$  esporas/mL a las 144 h (Fig. 6.9.B). Sin embargo, en FL, las esporas comienzan a producirse entre las 85 y 90 h, llegando a un promedio  $4.3 \times 10^5$  esporas/mL a las 144 h (Fig.6-10.B).

El comportamiento del pH en FS se da entre un rango de 5.5 y 7.5 (Fig.6-9.A), mientras que en FL, el comportamiento se encuentra entre 6.5 y 7.5 (Fig.6-10.A). Lo cual nos dice, que el pH es estable durante el desarrollo de ambas fermentaciones.



**Figura 6-9** Cinéticas de producción de lovastatina (c), esporas (b) y comportamiento del pH (a) durante el desarrollo de una FS durante 144 h (6 días).

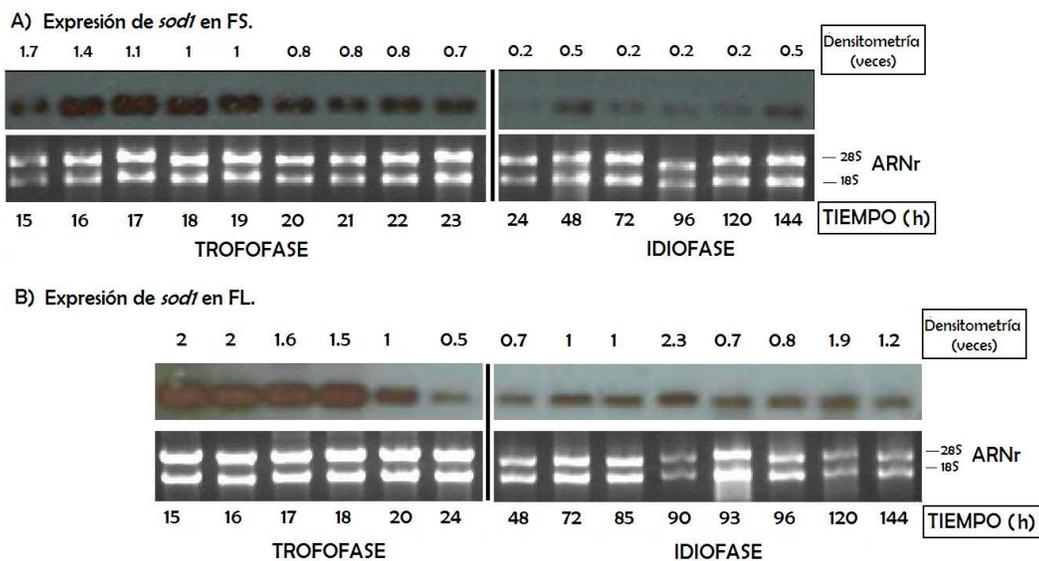


**Figura 6-10** Cinéticas de producción de lovastatina (c), esporas (b) y comportamiento del pH (a), durante el desarrollo de una FL durante 144 h (6 días).

## 6.6 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *sod1* (COMO INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO) EN FS Y FL.

Los resultados de la expresión de *sod1* (que codifica para una Superóxido Dismutasa) en FS (Fig. 6-11.A) indican que existe un período de expresión intenso de aproximadamente 8 h (de 15 a 23 h), y que se encuentra durante la trofofase de producción. No existe otro pico de expresión importante durante la idiofase, aunque la expresión de este gen se presenta a lo largo de la fermentación.

La expresión de *sod1* en FL (Fig.6-11.B) , indica que existe un PEO durante la trofofase (al igual que en FS), pero al parecer, este período de tiempo es más corto, ya que viene intensamente expresado desde las 15 hasta las 18 h (una duración de entre 3 y 4 h) de la fermentación, decayendo su expresión hasta un 50% menos a las 20 h. Existen otros dos picos de expresión a las 90 y 120 h respectivamente, y es interesante porque estos picos se encuentran presentes durante la idiofase.



**Figura 6-11** Análisis de Northern-blot con la expresión del gen *sod1*, durante la trofofase e idiofase de FS (A) y de FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de la densitometría (parte superior de cada panel) indica el número de veces que el gen está expresado, tomando como 1 la señal emitida a las 18 h de la FS.

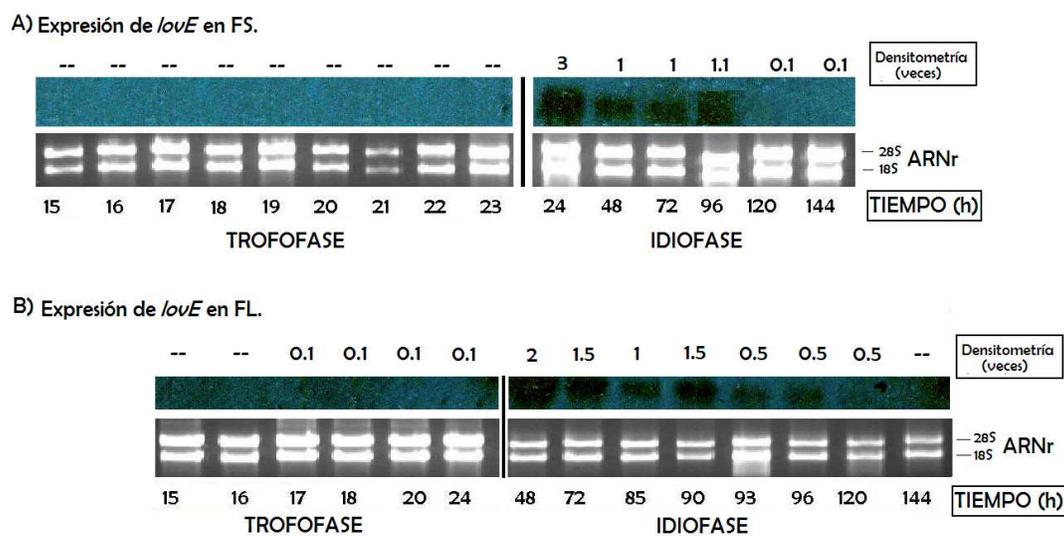
La intensidad de la expresión de *sod1* en FL, parece (a simple vista) que es hasta 2 veces mayor que en FS. Sin embargo, el análisis de densitometría muestra que en FL existe una expresión 30% mayor con respecto al máximo pico de expresión observado en FS (a las 15 h), y esto es debido por la sobresaturación de píxeles en el área medida que no se puede obtener un dato más acertado, por lo cual se tendrían que realizar pruebas en el tiempo de exposición en la película para obtener una señal que, al realizarle densitometría, el resultado sea más aproximado.

#### **6.7 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *catB* (COMO INDICADOR DE ESTRÉS OXIDATIVO) EN FS Y FL.**

El resultado generado después de la hibridación con la sonda del gen *catB*, fue nulo, no se obtuvo ninguna señal.

## 6.8 INICIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN FS Y FL: EXPRESIÓN DEL GEN *lovE*.

El resultado la expresión del gen *lovE* que codifica para el factor transcripcional del clúster de genes biosintéticos de la lovastatina, fue el siguiente: En FS, el gen se enciende a las 24 h (2 veces más con respecto a los otros tiempos, y una vez mayor que el máximo en FL), lo cual se correlacionó con el inicio de la producción de lovastatina (Fig.6-9.C), y se apaga entre las 96 y 120 h (Fig.6-12.A). En FL, *lovE* se enciende entre las 24 y 48 h (Fig. 6-12.B), y se apaga entre las 96 y 120 h, muy similar a lo mostrado en FS.

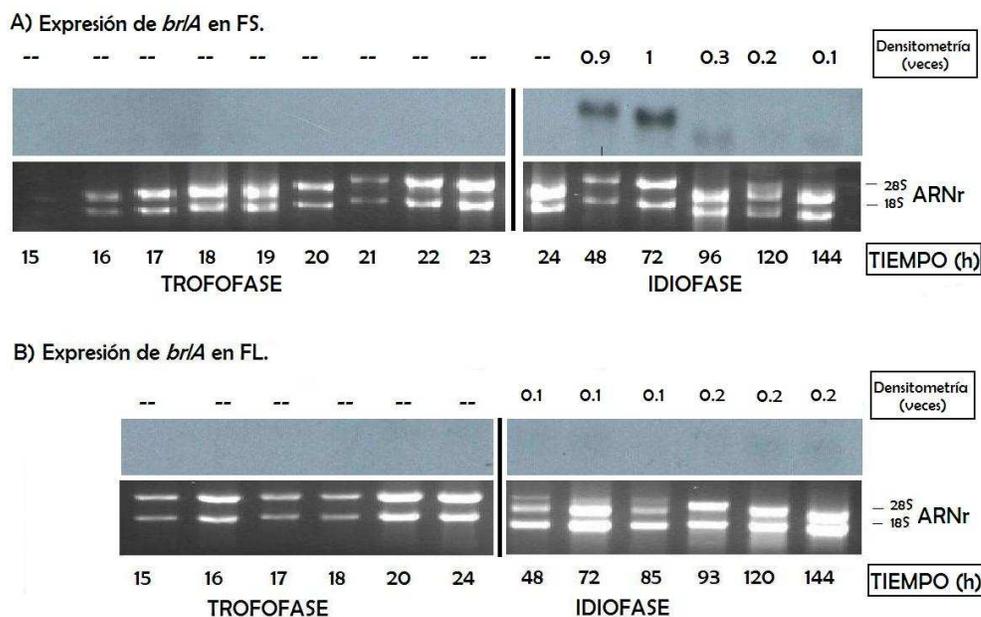


**Figura 6-12** Análisis de Northern-blot con la expresión del gen *lovE*, indicando el inicio de la idiofase en FS(A) y en FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de densitometría (números en la parte superior de cada panel) muestra el número de veces que el gen es expresado con respecto a la señal emitida a las 48 h de FS.

Este resultado coincide con la cinética de producción de lovastatina en FS (Fig. 6-9.C) ya que la producción inicia después de las 24 h, y en FL inicia entre las 24 y 48 h (Fig.6-10.C), indicando el inicio de la idiofase en cada uno de los sistemas de fermentación.

## 6.9 INICIO DE LA ESPORULACIÓN EN FS Y FL: EXPRESIÓN DE *brlA*.

Para determinar que en el caso de *A. terreus*, el EOX observado se correlaciona con el inicio de la idiofase y no con la esporulación, se decidió analizar la expresión del gen *brlA* (factor transcripcional de la esporulación) en FS y FL.



**Figura 6-13** Análisis de Northern-blot con la expresión del gen *brlA*, indicando el inicio de la esporulación a nivel transcripcional en FS(A) y en FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga para normalizar las señales emitidas. El valor de la densitometría indica el número de veces que el gen es expresado, tomando como 1 la señal emitida a la 72 h de la FS.

Se encontró que el gen *brlA* en FL (Fig.6-13.B), se expresa a un nivel casi indetectable, y que solo puede medirse por densitometría (valores de 0.1 veces de la mas alta expresión en FS), aunque se llegan a cuantificar esporas en este sistema de cultivo, la cantidad es mucho menor que las cuantificadas en sólido (Fig.6-9.B).

En FS (Fig.6-13.A), el gen se expresa fuertemente entre las 48 y las 72 h, para luego decaer hasta un 30% de la expresión a las 96 h (Fig.6-13.A) y permanecer constante hasta el final de la fermentación.

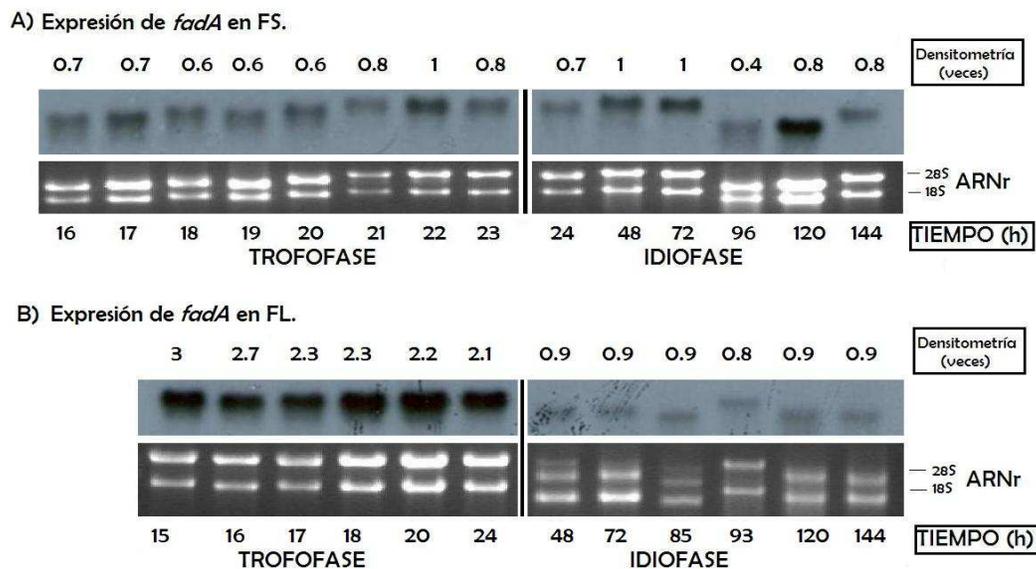
Este resultado indica que el gen *brlA* sólo se enciende (considerablemente) en FS entre las 24 y 48 h de la fermentación, después de haberse iniciado la idiofase.

## 6.10 REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO A TRAVÉS DE LA VÍA cAMP-PKA (VÍA GENERAL DE ESTRÉS) EN FS Y FL: EXPRESIÓN DEL GEN *fadA*.

En *A. terreus* no se ha estudiado el funcionamiento de la vía de señalización cAMP-PKA y su relación con el metabolismo secundario, la esporulación y la respuesta al estrés. Por lo que se decidió analizar la expresión de *fadA* en FS y FL, como un indicador del funcionamiento de la vía.

El resultado de la expresión en FS de *fadA* es expresado durante la trofofase e idiofase de manera casi constante (Fig.6-14.A) y a un bajo nivel de expresión.

Sin embargo, en FL, este gen es fuertemente expresado en la trofofase (entre las 15 y 24 h), para luego bajar el nivel de expresión en la idiofase (entre las 48 y 144 h) (Fig.6-14.B).



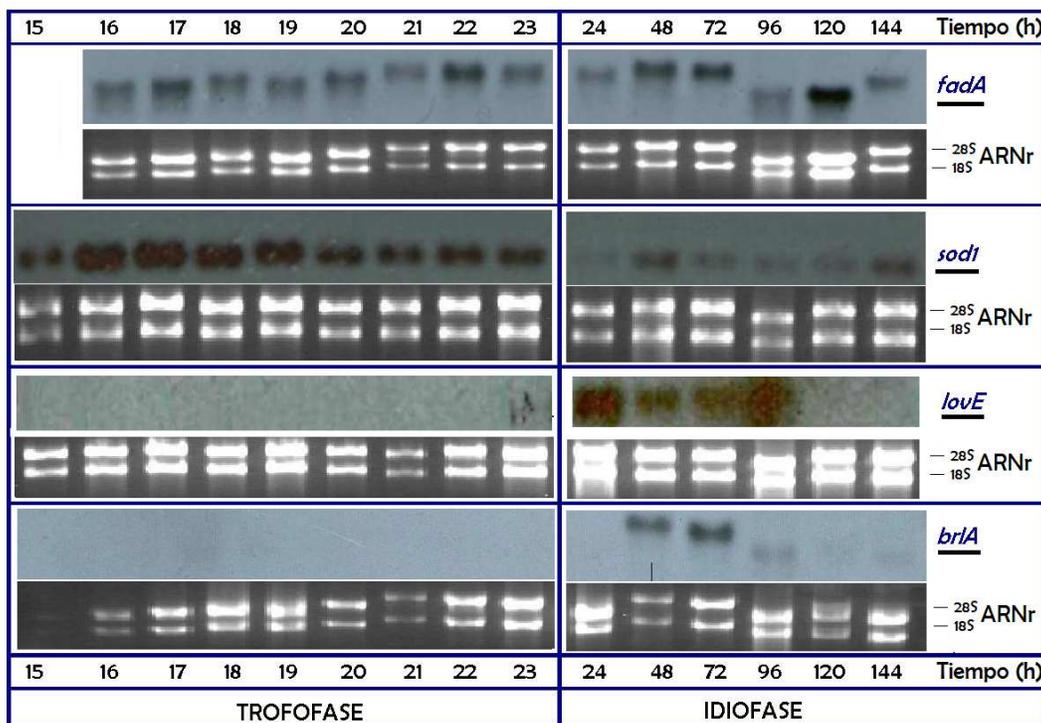
**Figura 6-14** Análisis de Northern-blot con la expresión del gen *fadA*, durante la trofofase e idiofase de una FS (A) y una FL (B). El ARN ribosomal (teñido con bromuro de etidio), fue empleado como control de carga. El valor de la densitometría indica el número de veces que el gen fue expresado, tomando como 1 la señal emitida a las 22 h de la FS.

### 6.11 FERMENTACIÓN SÓLIDA: RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON EL INICIO DE LA IDIOFASE, ESPORULACIÓN Y VÍA GENERAL DEL ESTRÉS (VÍA cAMP-PKA).

La correlación existente entre todos los genes de estudio en FS (Fig. 6-15), es la siguiente: se puede observar que *sod1* se encuentra intensamente expresado durante la trofofase, lo cual estaría indicando un PEO de aproximadamente 8 h.

El gen *lovE* es encendido a las 24 h, justo cuando la expresión de *sod1* ha bajado más del 50% de la máxima expresión obtenida (el EOX ha decaído). Este gen a su vez marca el inicio de la idiofase, como se observa también en la cinética de producción de lovastatina (Fig.6-9.C).

La expresión de *sod1* en este caso, no se correlaciona con el encendido del gen *brlA* ya que este se enciende 24 h después de darse este PEO, es decir, se enciende entre las 24 y 48 h, lo cual nos estaría indicando que el inicio de la esporulación no se correlaciona directamente con el PEO observado durante las primeras horas de la fermentación. Sin embargo, *fadA* se expresa durante todo el desarrollo de la fermentación, mostrando un comportamiento prácticamente constante.



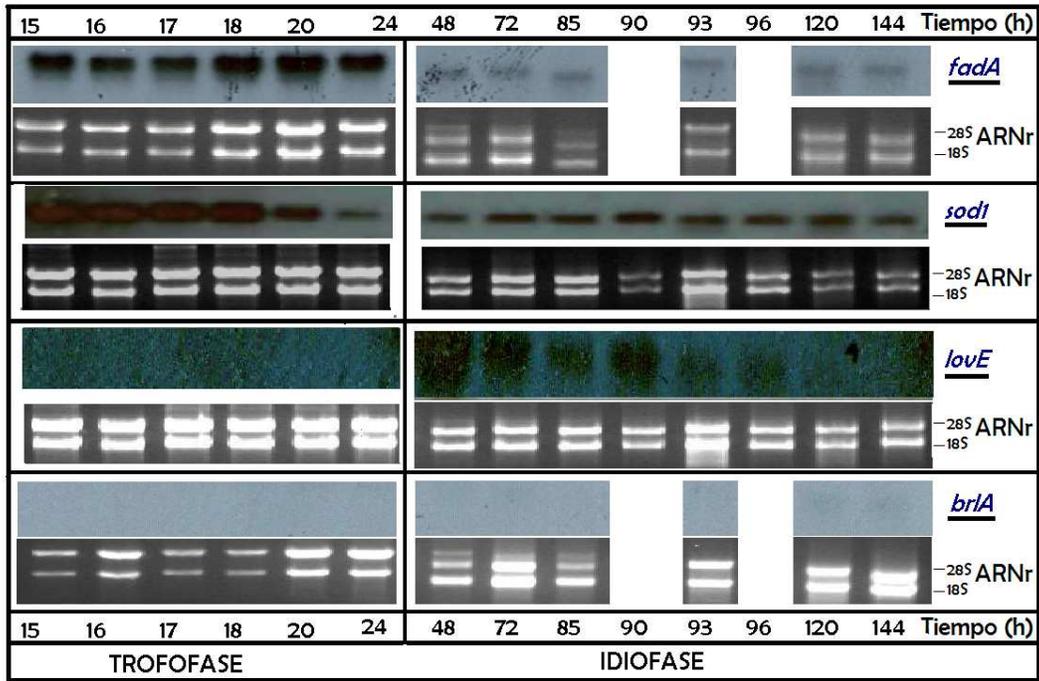
**Figura 6-15** Análisis de Northern-blot con la expresión de cada uno de los genes de estudio (*fadA*, *sod1*, *lovE* y *brlA*), mostrando la correlación existente entre ellos, durante el desarrollo de la FS.

## 6.12 FERMENTACIÓN LÍQUIDA: RELACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON EL INICIO DE LA IDIOFASE, ESPORULACIÓN Y VÍA GENERAL DEL ESTRÉS (VÍA cAMP-PKA).

La Fig. 6-16, muestra la correlación existente entre todos los genes de estudio. El gen *sod1* muestra un PEO de expresión de las 15 a las 18 h de la fermentación, y comienza a descender a las 20 h, se presentan además, dos picos de expresión a las 90 y 120 h respectivamente. Esto nos estaría indicando que en trofofase, el PEO es mucho más corto que en FS (aproximadamente de 4 h).

El gen *lovE* se enciende varias horas después de presentarse este PEO (entre 24 y 48 h), indicando que existe una correlación no muy directa entre el PEO y el inicio de la idiofase. Aunque la expresión del gen *brlA* no se enciende durante el desarrollo de la fermentación, existen niveles de expresión basales lo que se refleja en la baja producción de esporas durante la fermentación, pero, además, indicando que el PEO no se relaciona tan directa con el inicio de la esporulación (Fig. 6-16).

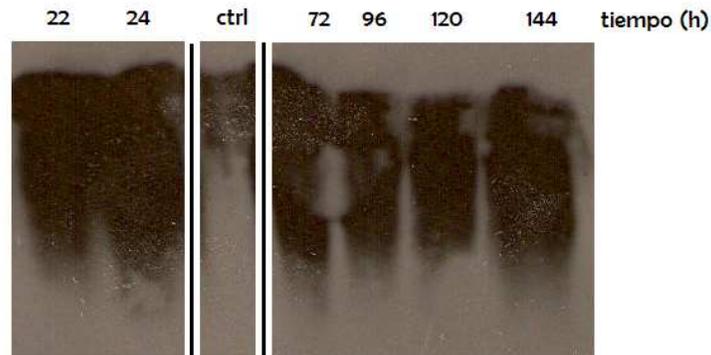
El gen *fadA*, se expresa hasta 3 veces más durante la trofofase, decayendo su expresión en la idiofase y manteniéndose constante hasta el final de la fermentación. También observamos una correlación entre la fuerte expresión de *fadA* y de *sod1*.



**Figura 6-16** Análisis de Northern-blot con la expresión de cada uno de los genes de estudio (*fadA*, *sod1*, *lovE* y *briA*), mostrando la correlación existente entre ellos durante el desarrollo de la FL.

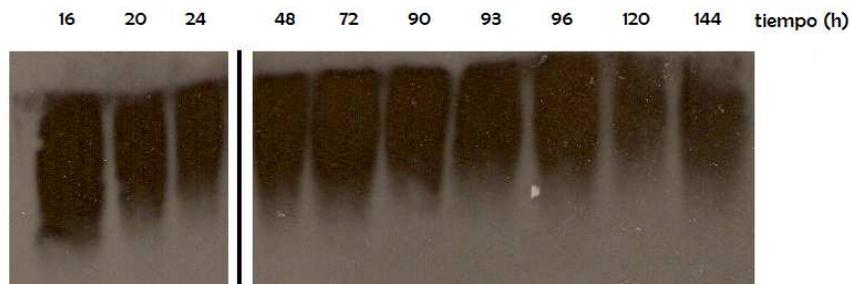
### 6.13 PERFIL DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN FS Y FL.

Para comparar el resultado obtenido por la expresión de *sod1* en FS y en FL, se empleó el método del Oxyblot (para determinar el nivel de oxidación de proteínas oxidadas por el EOX), el cual reveló en FS una oxidación mayor durante la trofofase con respecto a la idiofase aunque a las 144 h, la oxidación parece ser mayor (Fig.6-17), esto último no es consistente con lo obtenido por la expresión de *sod1* (Fig.6-11).



**Figura 6-17** Perfil de proteínas oxidadas de muestras provenientes de FS. La señal emitida por la reacción con el luminol, es proporcional a la cantidad de proteínas oxidadas.

En FL, al parecer, todas las muestras, a excepción de las 120 y 144 h, muestran alto grado de oxidación de proteínas (Fig. 6-18). El resultado obtenido a las 120 h, no es consistente con el pico de expresión observado para *sod1* a las 120 h (Fig. 6-11.B), donde esperábamos una oxidación de proteínas considerable.



**Figura 6-18** Perfil de proteínas oxidadas de muestras provenientes de FL.

Cabe mencionar que este procedimiento, sólo se realizó una vez, y se empleó un solo control negativo como referencia para todas las muestras (tanto para FS como FL), además no se empleó un control positivo. Con esto, puede ser que el resultado obtenido no sólo se deba a la oxidación de proteínas que existió al momento de tomar la muestra, sino que también pudo ocurrir una oxidación posterior por las condiciones en que la muestra se encontraba.

## 7. DISCUSIÓN.

### 7.1 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LOVASTATIN EN FS Y EN FL.

En un trabajo anterior del grupo, se desarrolló un nuevo proceso de producción de lovastatina sobre FS, empleando poliuretano (PUF, polyurethane foam) como soporte inerte, en el cual se obtuvo una producción al día 8, 30 veces mayor que en FL (Baños *et al.*, 2005). Al emplear PUF, se pudo calcular la producción específica en FS ( $\mu\text{g}$  lovastatina/mg micelio seco), con la cual es posible realizar una comparación más precisa entre los dos tipos de fermentación. Así se encontró que en FS, la producción específica fue 13 veces mayor que en FL (816  $\mu\text{g}/\text{mg}$  vs 54  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Los resultados de fermentación de esta tesis muestran, al día 6 (144 h), una producción de lovastatina 25 veces mayor en FS con respecto a FL (13,631  $\mu\text{g}/\text{g}$  ms vs 547  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo cual es comparable a lo reportado anteriormente.

Evidentemente, este es un ejemplo dramático de la llamada “fisiología particular del medio sólido”; i.e. de que en FS el micelio funciona de una forma muy diferente a la ya muy estudiada fisiología en medio líquido.

De hecho, a menudo se reporta, en estudios comparativos FS vs FL, una mayor producción y productividad de enzimas y de metabolitos en FS (Robinson *et al.*, 2001, Barrios-González *et al.*, 1997; Mejía & Barrios-González, 2007). El caso de la alta productividad de glucoamilasa por *A. oryzae* en FS es un caso especial de un mecanismo bien estudiado a nivel molecular. Los estudios de Hata *et al.* (1997, 1998) revelaron que la enzima glucoamilasa era producida en mucho mayor cantidad por la FS. Después, los autores descubrieron que la glucoamilasa producida en FS era distinta a la producida en FL, por lo que determinaron la secuencia de aminoácidos de ambas, pudiendo así clonar los genes. Mediante un análisis de expresión encontraron que el gen *glaB* se expresaba exclusivamente en medio sólido. Esto sugiere que, 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 esta alta capacidad de producción de metabolitos secundarios (lovastatina).

En un estudio anterior, se demostró que una causa importante para la mayor producción de lovastatina en FS es que los genes de la vía se expresan más intensamente en este sistema. Lo que no se sabe es qué señales están recibiendo los promotores, principalmente los de los genes reguladores, para comportarse de esa manera (Barrios-González *et al.*, 2008).

## **7.2 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *sod1* (COMO INDICADOR DE EOX) Y EL INICIO DE LA IDIOFASE EN FS Y EN FL.**

En FS, al estar el micelio en contacto directo con el aire, es razonable pensar que esta sujeto a un mayor EOX, y que éste influye sobre el nivel de producción del hongo. Los resultados de Baños *et al.* (2007), demostraron que el EOX en el medio sólido, tiene un papel importante sobre el nivel de producción de lovastatina por *Aspergillus terreus*. Los autores aislaron mutantes resistentes a EOX y encontraron que un alto porcentaje de estas mutantes eran sobreproductoras de lovastatina en FS. Interesantemente, se encontró que estas mutantes, que producían bien en FS, eran malas productoras en FL, ya que la producción disminuyó en todos los casos (en promedio 28%). Estos resultados sugieren que la resistencia al EOX, representa una ventaja para producir lovastatina en FS pero no en FL.

Por otro lado, Toledo *et al.* (1995) en estudios realizados con el hongo *Neurospora crassa*, encontraron que el desarrollo de un estado hiperoxidante, coincide con el inicio de cada una de las tres etapas morfogénicas comprendidas en el proceso de diferenciación: adhesión de la hifa, formación de hifa aérea y la producción de la conidia. Hansberg *et al.* (2007), demostraron que es necesaria la intervención de un EOX para que se lleve a cabo la diferenciación celular, ya que al emplear antioxidantes exógenos, observaron que la esporulación no se llevaba a cabo.

En el presente estudio se pensó que la idiofase podría considerarse como una “diferenciación bioquímica” del hongo, la cual, como se vio anteriormente, también está relacionada con la esporulación. De esta manera, se esperaba

encontrar un EOX justo antes de iniciarse la idiofase y que éste podría ser mayor en FS. En relación a la metodología para detectar el EOX, se consideró que podría ser monitoreado por la inducción que este fenómeno causa en las enzimas catalasa y superóxido dismutasa. Sin embargo, el medir la actividad enzimática nos daría una respuesta muy tardía, ya que se sabe que las enzimas son destruidas por el EOX. Así, se decidió determinar la inducción de estas enzimas a nivel de transcripción por Análisis de Northern.

En el presente trabajo la expresión del gen *sod1* (que codifica para una superóxido dismutasa), funcionó como indicador de EOX, y así fue posible demostrar que hay un PEO intenso al final de la trofofase, que precede el inicio de la idiofase, tanto en FS como en FL. El inicio de la idiofase fue determinado con mucha precisión, ya que se determinó por la inducción del gen *lovE*, factor transcripcional específico del clúster de genes de biosíntesis de lovastatina.

Esta es la primera vez que se puede correlacionar el EOX con el inicio de la síntesis de lovastatina. De hecho el único reporte en la literatura que relaciona un EOX intenso, precediendo la síntesis de un metabolito secundario es el de Jayashree *et al.* (2000), sobre la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus*. Los autores encontraron que un EOX intenso, precede la síntesis de aflatoxinas; y que cepas aflatoxigénicas muestran un EOX más intenso que las no toxigénicas. Es posible que este sea un fenómeno general que precede la síntesis de metabolitos secundarios en hongos; quizás generando una señal de regulación para la expresión de los genes de la idiofase.

### **7.3 DIFERENCIAS EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL PEO OBSERVADO EN FS Y EN FL.**

Si lo mostrado en el párrafo anterior es así, las diferencias en las características del PEO pueden ser muy importantes y estar relacionadas con la gran diferencia en producción de lovastatina en ambos sistemas de cultivo. Interesantemente, en esta tesis los PEO observados en la FS y en la FL muestran claras diferencias.

La diferencia más notoria es en la intensidad del EOX. Los resultados mostraron que el EOX es al menos 2 veces más intenso en FL que en FS. Esto fue inesperado, ya que como se explicó en secciones anteriores, la cantidad de O<sub>2</sub> en contacto con el micelio es mucho mayor en FS. Sin embargo, estos resultados coinciden con lo reportado por Hisada *et al.* (2005) quienes construyeron un gen reportero con el promotor del gen *catB* para medir EOX en *Aspergillus oryzae*. Los autores encontraron que el EOX fue 6.25 veces mayor en FL que en FS, aunque no determinaron la producción de ningún metabolito secundario.

Si la menor intensidad del EOX en la FS está relacionado con el mayor nivel de producción, esto podría explicar por qué las mutantes resistentes a EOX aisladas por Baños *et al.* (2007) eran buenas productoras de lovastatina. Es probable que estas mutantes tengan mejores defensas contra el EOX, por lo que la intensidad de este durante el PEO sería relativamente baja.

Una segunda diferencia es que en FS la correlación entre el fin del PEO y el inicio de la idiofase es casi inmediata, ya que se observó fuerte inducción de *sod1* hasta las 23 h y la inducción del gen *lovE* ya se observa desde las 24 h (1 hora de diferencia).

En FL la correlación es menos directa, ya que el último punto del EOX fue a las 20 h y la inducción de *lovE* se observó hasta las 48 h. Aunque en este caso el muestreo fue menos intenso (que en el caso de la FS) es claro que a las 24 h ya no había EOX y para este tiempo, no se había inducido el gen *lovE*; sin embargo, en un futuro sería interesante determinar con precisión el tiempo que transcurre entre el PEO y el inicio de la idiofase en FL. El hecho de que en FS la correlación entre el fin del PEO y el inicio de la idiofase es casi inmediata, y que no vuelve a haber otro PEO sugiere que en FS la señalización en las vías de regulación es más clara y directa que en FL. Lo anterior podría ser el estímulo que da como resultado una mayor expresión de los genes de biosíntesis (Barrios-González *et al.* 2008) y por lo tanto una mayor producción de lovastatina.

Hasta la fecha, no hay reportes que indiquen la existencia de un PEO en cualquier tipo de fermentación, y menos, como influye las características de éste (en intensidad y duración), sobre el nivel de producción en un sistema de fermentación dado.

#### **7.4 PEO EN LA FERMENTACIÓN DE LOVASTATINA Y LA ESPORULACIÓN.**

En este punto de la tesis era importante aclarar si el PEO observado en las fermentaciones de lovastatina era el mismo relacionado con la esporulación y que fue estudiado en *N. crassa* por Toledo *et al.* (2005). Por esta razón, se estudió también la expresión del gen *brlA* de *A. terreus*, el cual codifica para el factor transcripcional para los genes de conidiación. Los resultados indicaron que el PEO observado en FS, está más lejano del inicio de la esporulación (observado por la expresión de *brlA*) y aún más de la cinética de producción de esporas. En FL, simplemente el gen no se induce. Esto es interesante, ya que según lo reportado por Toledo *et al.* (2005), el inicio de la esporulación es precedido por un EOX intenso, lo cual observaron al medir la oxidación del NADP(H) y la excreción del glutatión disulfuro. Sin embargo, en el presente trabajo observamos que la inducción del gen *brlA*, se presenta entre 24 y 48 h después del PEO; es decir que el PEO correlaciona en forma más cercana con la síntesis del metabolito secundario que con la conidiación.

#### **7.5 REGULACIÓN DEL METABOLISMO SECUNDARIO A TRAVÉS DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES cAMP-PKA (VÍA GENERAL DE ESTRÉS): EXPRESIÓN DEL GEN *fadA* EN FS Y FL.**

Uno de los puntos principales en el cual el metabolismo secundario pudiera relacionarse con el estrés oxidativo, es vía de señalización cAMP-PKA, la cual inicia con una proteína G, cuya subunidad  $\alpha$  es la codificada por el gen *fadA*. Se ha reportado que al encontrarse FadA activa, se activan los genes relacionados con el crecimiento, pero no los relacionados con la producción de metabolitos secundarios, la resistencia a diferentes estreses y los de esporulación (Keller *et al.*, 2005). Se ha encontrado que FadA regula negativamente la producción de un metabolito secundario, como es el caso de esterigmatocistina en *A. nidulans* y

aflatoxinas en *A. parasiticus*. Por analogía, en la presente tesis se esperaba que en *A. terreus* la expresión de este gen, durante la trofofase, fuera mayor que durante la idiofase.

Los resultados mostraron que en FL el comportamiento fue el esperado, ya que la expresión de *fadA* fue 3 veces más intensa durante la trofofase (crecimiento) que en la idiofase; sugiriendo que FadA también regula negativamente la producción de lovastatina.

En forma inesperada, la expresión de *fadA* en la FS fue completamente diferente. La expresión de este gen fue relativamente constante en ambas fases (trofo- e idiofase) y 3 veces menos intensa que el máximo obtenido en FL.

Estos resultados parecen coincidir con los reportados por García-Rico *et al.* (2007) para *Penicillium chrysogenum*. Los autores encontraron que la expresión del gen *pga1* (similar a *fadA*) fue, en caja de petri con medio con agar, 1.7 veces menor que en FL.

Los resultados de esta tesis indican que el mecanismo de acción reportado para FadA en *A. nidulans* es aplicable a *A. terreus* en FL.

Sin embargo, los resultados para FS demuestran un comportamiento diferente de la vía cAMP-PKA en este sistema de cultivo. Al parecer, en FS el hongo percibe señales de estreses desde el inicio del cultivo, por lo que *fadA* tiene una expresión relativamente menor (protección cruzada). Proponemos que es por esto que al llegar el momento del PEO el sistema defensivo de diferentes estreses ya está activo y logra reaccionar rápido y mantener el EOX en niveles relativamente bajos (menores que en FL). Esto, a su vez, podría influir positivamente en el nivel de producción de la cepa en este sistema de fermentación.

## 8. CONCLUSIONES.

- Tanto en FS como FL, existe un período de estrés oxidativo (PEO) intenso justo antes del inicio de la idiofase tanto en FS como en FL.
- En FL, la intensidad del EOX fue mayor que en FS.
- El PEO se correlaciona más directamente con el inicio de la idiofase en FS que en FL. En FS, la inducción del gen *lovE* se da inmediatamente después de que se presenta el PEO (indicando el inicio de la idiofase), mientras en FL el gen se enciende entre 24 y 48 h después de presentarse el PEO.
- El PEO detectado, no se correlaciona en forma tan cercana (en tiempo) con el inicio de la esporulación.
- Existen diferencias en la expresión del gen *fadA* en FS y en FL. En FL se expresa fuertemente en la trofofase y 3 veces menos durante la idiofase. En FS la expresión de *fadA* es relativamente constante y mucho menos intensa que en FL (intensidad similar a la de la idiofase de la FL).

## **9. PERSPECTIVAS.**

Los resultados obtenidos en este trabajo, abren un área de investigación muy amplia e interesante. En un futuro, sería muy importante demostrar primero que el PEO no sólo correlaciona en el tiempo con el inicio de la producción de lovastatina, sino que es indispensable para la idiofase. Esto podría realizarse por métodos genéticos o por métodos fisiológicos.

Después de lo anterior, sería importante manipular las características del PEO (intensidad y duración), para poder relacionarlo con el nivel de producción de lovastatina, tanto en FS como en FL.

Con esta información se podría obtener una aplicación biotecnológica como mejores sistemas de producción y/o mejoramiento genético de la cepa a partir del conocimiento adquirido.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aidoo, K. E., Hendry, R., & J.B. Wood.** 1982. Solid substrate fermentations. *Advances in Applied Microbiology*. 28: 201–237.
- Balasundaram, D., Tabor, CW. & H. Tabor.** 1991. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 88:5872–5876.
- Baños, J.G., Tomasini, A., Szakács, G. & J. Barrios-González.** (2005) Fisiología y producción de lovastatina de *A. terreus* en fermentación sólida de dos fases. VI Congreso de Biología Celular y Molecular de Hongos. 27 al 29 de octubre. Morelia, Michoacán, México.
- Baños, J.G., Mejía, A., Garay, A. & J. Barrios-González.** (2007) Producción de lovastatina en fermentación sólida por mutantes resistentes a estrés oxidativo. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 25 a 29 de junio. Morelia, Michoacán, México.
- Barrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-González, G. & L. López.** 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*. 10:793-798.
- Barrios-Gonzalez, J., Castillo, TE., & A. Mejía.** 1993. Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnology Advances*. 11:525-537.
- Barrios-González, J. & A. Mejía.** 1996. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. 2:85-121.
- Barrios-González, J., Fernández, F.J. & A. Tomasini.** 2003. Production of microbial secondary metabolites and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*. Special Issue: Microbial Biotechnology. 2(3):322-333.
- Barrios-González, J., Baños J.G., Tomasini, A. & A. Mejía.** 2004. Patente: “Procedimiento para la producción de lovastatina por fermentación sólida en soporte inerte artificial. Depositada el 16 de diciembre de 2004, con el No. PA/a/2004/012778.
- Barrios-González, J. & A. Mejía.** 2007. Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In: Pandey A, Larroche C, Soccol CR, Rodríguez-León JA (eds) *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Chapter 14 Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, pp 262-296
- Barrios-González, J., Baños, J.G., Covarrubias, A.A. & A. Garay-Arroyo.** 2008. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are differently expressed in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. En prensa.
- Bok, W., J. & N.P. Keller.** 2004. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*. 3 (2): 527–535.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. & N.P. Keller.** 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3):447-459.

- Cannel, E., & M. Moo-Young.** 1980. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*. 4: 2-7.
- Collinson, L.P. & I.W. Dawes.** 1995. Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. *Genes & Development*. 156:123-127.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., & M B. Toledano.** 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redoxtransducer in gene activation. *Cell*. 111(4):471-81.
- Domínguez, M.M Mejía, A. & J. Barrios-González.** 2000. Respiration studies of penicillin solid state fermentation. *Journal of Bioscience Bioengineering*. 89(5): 409-413.
- Finkel, T.** 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:248-253.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & A.A. Covarrubias-Robles.** 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 46(1-2):24-46.
- Garay-Arroyo, A., Lledias, F., Hansberg, W., & A.A. Covarrubias.** 2003. Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Letters*. 539(1-3):68-72.
- García-Rico, R., Martín, J.F. & F. Fierro.** 2007. The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Research in Microbiology*. 158:437-446.
- Garrido, E., & C.M. Grant.** 2002. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Molecular Microbiology*. 43(4):993-1003.
- Gralla, E. & J.S. Vallentine.** 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*. 173:5918-5920.
- Hajjaj, H., P. Niederberger & P. Duboc.** 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (6): 2596-2602.
- Halliwell, B. & M.C.Gutteridge.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. London. Oxford University Press.
- Hamer, D.** 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*. 55:913-951.
- Hansberg, W. Peraza, L., Vega, V., Cano, N., Aguirre, J., Rangel, P. y M. Chávez.** Microbial cell differentiation: a response to oxidative stress. III Taller Internacional de Aspectos Comparativos del Estrés Oxidativo en Sistemas Biológicos. Octubre 17-19, 2007. Cuautla, Morelos, México.
- Hasseltine, C. W.** 1977. Substrate fermentations. *Process Biochemistry*. 12: 24-27.
- Hendrickson, L., C.R. Davis, C.Roach, D.K. Nguyen, T. Aldrich, P.C. Mcada & C.D. Reeves.** 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked

mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemistry & Biology*. 6:429-439.

**Hisada, H., Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe & O. Akita.** 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience And Bioengineering*. 99(6):562-568.

**Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., & A. Kimura.** 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 274(38):27002-9.

**Jamieson, D., Rivers, S.L. & D.W.S. Stephen.** 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*. 140:3277-3283.

**Jayashree, T, & C. Subramanyam.** 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(10): 981-985.

**Juhnke, J., Krems, B., Kotter, P. & K.D. Entian.** 1996. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Molecular Gen Genetics*. 252:456-464.

**Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., & J. Aguirre.** 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*. 179(10):3284-3292.

**Keller, N.P., Turner, G. & J.W. Bennett.** 2005. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Reviews/Microbiology*. 3:937-947.

**Kim, S., Huh, Wk., Kim, J.Y., Huang, S.W. & S.O. Kang.** 1996. D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1297:1-8.

**Kreiner, M., McNeil, B., & L.M. Harvey.** 2000. "Oxidative stress" response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). *Biotechnology and Bioengineering*. 70(6):662-669.

**Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. & C.M. Grant.** 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*. 9:1081-1091.

**Manzoni, M. & M. Rollini.** 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 555-564.

**Marcial J., Barrios-González J. & A. Tomasini.** 2005. Effect of médium composition on pentachlorofenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochemistry*. In press. (2005).

**Mazumdar-Shaw, K. & S. Suryanarayan.** 2003. Commercialization of a novel fermentation concept. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. 85:29-42.

**Moye-Rowley, WS.** 2002. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxidant & Redox Signaling*. 4(1):123-40.

- Muller, E.** 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*. 266:9194-9202.
- Narasaiah, K.V.A., Sashidar, R.B.A., & C.A.B. Subramanyam.** 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathology*. 162 (3): 179-189.
- Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J. & A. Rinzema.** 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 18:356-360.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., & P. Nigam.** 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology—Fundamentals and Applications*. Asia Tech Publishers, Inc. New Delhi, pp. 100–221.
- Park, S.K., Cha, M.K., Jeong, W., & I.H. Kim.** 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(8):5723-5732.
- Robinson, T., Singh, D., & P. Nigam.** 2001. Solid state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55:284-289.
- Ruis, H. & B. Hamilton.** 1992. Regulation of yeast catalase genes. In *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, CSH Press:153-172.
- Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G. & S. Roussos.** 2000. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry*. 36:103-109.
- Slekar, K., Kosman, D.J. & V.C. Culotta.** 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry*. 271:28831-28836.
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. & B.N. Ames.** 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 84:8917-8921.
- Szakács, G., G. Morovján & R.P. Tengerdy.** 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*. 20(4): 411-415.
- Toledo, I., Rangel, P., & W. Hansberg.** 1995. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 319 (2): 519-524.
- Tomasselli S.C., Vergoignan, C., Feron G., & A. Durand.** 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* growth in solid state cultivation conditions. *Journal of Biochemical Engineering*. 7: 1-5.
- Valera, H.R, J. Gomes, S. Lakshmi, R. Gururaja, S. Suryanarayan & D. Kumar.** 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37:521–526.

**Yoshizawa, Y., D. J. Witter, Y. Liu, & J. C. Vederas.** 1994. Revision of the biosynthetic origin of oxygens in mevinoлин (lovastatin), a hypocholesterolemic drug from *Aspergillus terreus* MF 4845. *Journal of American Chemical Society*. 116:2693-2694.

**Zhao, X., Raitt, D., Burke, P.V., Clewell, A.S., Kwast, K.E. & R.O. Poyton.** 1996. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 271:25131-25138.

# 11. ANEXOS.

## 11.1 DISEÑO DE PRIMER'S DEGENERADOS.

### 11.1.1 PARA OBTENER LA Sonda DEL GEN *sod1*, QUE CODIFICA PARA UNA SUPERÓXIDO DISMUTASA.

NÚMEROS DE ACCESO AL GENBANK DE LOS GENES EMPLEADOS EN EL ALINEAMIENTO MÚLTIPLE:

CDS *sod1 Aspergillus nidulans*: AF281058  
 mRNA *sod1 Aspergillus nidulans*: AF305546  
 CDS *sodC Aspergillus oryzae*: AB078725.1  
 CDS *sodC Neurospora crassa*: EAA35055.1  
 CDS *sod1 Aspergillus fumigatus*: AF281057  
 CDS *sod1 Aspergillus flavus*: AF401280.1

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE REALIZADO EN EL PROGRAMA BIOEDIT:

```

                                     INICIA EXÓN
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
A nidulans TCTCGATTGC CCTGGTCTTA TTCTTAAATC ATTGGATGCG GTAGCGGTGT AACCTTTCTG ACATGGT-- GTTC--TTAG TTGCTGTCCG TGGTGACTCC
A nidulans -----AT CCTCACATCA CTTTCAGGT- -TTAACCAAT TCAACTTTAT AATTCCATCA AAATGGTCAA GGCT--GTTG CTGTCCTCCG TGGTGACTCC
A fumigatu -----
A flavus s -----
A oryzae s TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGGTGCCG CTAGCTCCGA CATGAGAATC ATGGCTGACG GCTCTAGTTG CTGTTCTCCG TGGAGACTCC
N crassa s -----CTGCA TTATTGGCT- ---AGAAGAC AGTACGGC-T AACCTCTTTC ATATTCGT-- -CCA--GTCG CTGTCGTCCG TGGTGACTCT
Consensus TYTYKWTTYD YYTBDYHKYW YTHTYDDNTY WTTRRHNVMB NBWRCKBYRW MAYBHBWHYV AHRDBBBHMR GBYHTAKTHG YTGYYSTCCG TGGWGACTCY

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
A nidulans AAGGTCTCCG GCACCGTCAC CTTTGAACAG GCCGACGAGA ACTCCAACAC CACCGTCTCA TGGAACATCA CCGGCAACGA CCCCAACGCT GAGCGTGGCT
A nidulans AAGGTCTCCG GCACCGTCAC CTTTGAACAG GCCGACGAGA ACTCCAACAC CACCGTCTCA TGGAACATCA CCGGCAACGA CCCCAACGCT GAGCGTGGCT
A fumigatu AAGATCACC GCACTGTAC CTTTCGAGCAG GCCGACGAGA ACTCTCCAC CACCGTCTCT TGGAACATCA AGGGCAACGA CCCCAACGCC AAGCGTGGCT
A flavus s AAAATCTCCG GCACCGTCAC CTTTCGAGCAG GCTGACGCCA ACGCCCCTAC CACTGTCTCC TGGAACATCA CCGGCCACGA CGCCAACGCT GAGCGTGCCT
A oryzae s AAAATCTCCG GCACCGTCAC CTTTCGAGCAG GCTGACGCCA ACGCCCCTAC CACTGTCTCC TGGAACATCA CCGGCCACGA CGCCAACGCT GAGCGTGCCT
N crassa s AACGTCAAGG GCACCGTGAT CTTTCGAGCAG GAGTCCGAGT CCGCTCCAC TACCATCACC TACGACATCT CTGGCAACGA CCCCAACGCC AAGCGCGGCT
Consensus AAVRTCWMSG GCACYGTSAY CTTYGARCA GMBKMGMSW MCKCYMMYAC YACYRTCWCH TRSRACATCW MBGGCMACGA CSCCAACGCY RAGCGYGSCT
  
```

Primer FWD propuesto:

T	C	C	G	T	G	G	T	G	A	C	T	C	A	A	G	G	T	C	T	C	C	G	G
							A																





### 11.1.2 PARA OBTENER LA SONDA DEL GEN *catB*, QUE CODIFICA PARA UNA CATALASA B.

NÚMEROS DE ACCESO AL GENBANK DE LOS GENES EMPLEADOS EN EL ALINEAMIENTO MÚLTIPLE:

CDS *CATB Emericella nidulans*: U80672.1  
 mRNA *CATB Aspergillus nidulans*: XM\_677516  
 CDS *CATB Aspergillus oryzae*: AB078864.2  
 CDS *CAT3 Neurospora crassa*: XM\_952733.1  
 CDS *CATB Aspergillus fumigatus*: U87850.1

ALINEAMIENTO MÚLTIPLE REALIZADO EN EL PROGRAMA BIOEDIT:

```

    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
CATB E.nid  -----ATA TCGTCGGTAA CAACATTCCC GTCTTTTTC TCCAGGATGC CATCCAGTTC CCCGACCTGA TCCACGCCGT CAAGCCCAAG GCGGATCGTG
mRNA CATB  -----ATA TCGTCGGTAA CAACATTCCC GTCTTTTTC TCCAGGATGC CATCCAGTTC CCCGACCTGA TCCACGCCGT CAAGCCCAAG GCGGATCGTG
CATB A.Ory  ATCACAGATA TTGTGGCAA CAACATTCCC GTCTTCTTCA TCCAGGACGC TATTCTTTTC CCTGATCTCA TCCACGCTGT CAAGCCTCGT GGTGACAATG
CAT3 N.Cra  -----ATA TCGTCGGCAA CAACATTCCC GTCTTTTTC TCCAGGATGC CATCCGCTTC CCCGACCTTA TTCACTCCGT CAAGCCTAGC CCCGACAATG
CATB A.fum  GTCATAGATA TCGTGGAAA CAATATCCCT GTATTCTTCA TCCAGGATGC TATCTCTTC CCCGATCTGA TCCACGCCGT CAAGCCAGA GGTGACAACG
Consensus  RTCAYAGATA TYGTYGGHAA CAAYATYCCY GTMTTYTTC TCCAGGAYGC YATYDBTTC CCYGAYCTBA TYCACKCYGT CAAGCCYMRN SSYGAYMRYG
    
```

```

    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
    1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
CATB E.nid  AAATCCCGCA GGCTGCCACG GCCCATGACG CCGCCTGGGA TTTCTTCAGC CAGCAGCCCT CGACTCTTCA CACCCTGCTC TGGGCCATGG CCGGTCACGG
mRNA CATB  AAATCCCGCA GGCTGCCACG GCCCATGACG CCGCCTGGGA TTTCTTCAGC CAGCAGCCCT CGACTCTTCA CACCCTGCTC TGGGCCATGG CCGGTCACGG
CATB A.Ory  AGATCCCTCA GGCTGCCACT GCCCATGACT CTGCTTGGGA CTTCTTCAGC CAGCAGCCCA GTTCCTTGA CACCCTGCTC TGGGCCATGT CCGGCCATGG
CAT3 N.Cra  AGGTCCCCA AGCCGCCACC GCCCAGACT CCGCTTGGGA CTTCTTCAGC TCCCAGCCCT CCGCTCTCA CACCCTTTC TGGGCCATGT CTGGCAACGG
CATB A.fum  AGATCCCTCA GGCTGCGACT GCTCATGACT CCGCCTGGGA CTTCTTCAGC CAGCAGCCAA GCACGATGCA CACTGCTC TGGGCTATGT CTGGGCATGG
Consensus  ARRYCCBCA RGCYCSACB GCYAYGACK CBGCTGGGA YTTCTTCAGC YMSCAGCCMW SDBCMBTCA CACMCTSYTC TGGGCYATGK CYGGBMAYGG
    
```

PRIMER FWD:

T	G	G	G	A	Y	T	T	C	T	T	C	A	G	C	Y	M	S	C	A	G	C	C
				C										C	A	C						
				T										T	C	G						

TM:

A+T=9X2 =18

G+C=14X3 =42

TM =60°C

PRIMER FWD: 5' TGG·GAY·TTC·YYC·AGC·YMS·CAG·CC 3'



