



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BASICAS Y APLICADAS CENTRO DE
INVESTIGACION EN DINAMICA CELULAR

**Análisis transcriptómico del halófilo *Aspergillus sydowii*
EXF-12860 en condiciones de baja actividad de agua inducida por
NaCl y MgCl₂**

TESIS

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. Lyselle Ruíz de León

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón Alberto Batista García

CUERNAVACA, MORELOS

Enero, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Análisis transcriptómico del halófilo *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en condiciones de baja actividad de agua inducida por NaCl y MgCl₂**, que presenta la alumna **Lyselle Ruíz de León (10024373)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Ninfa Ramírez Durán UAEMex	APROBADO	
Dra. Verónica Lira Ruan CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

NINFA RAMÍREZ DURÁN | Fecha:2020-11-12 13:05:34 | Firmante

JitANXFgwP3R46bgRth9/hkzWB6+0sp7j/7djkzqqLpGRBhCSwQAGXYV9cToBtGLPnrlgqXk/xD2RJ7twq6EPPHFsEZY7VyzwEep8KN6VEIhutj7og/AA4i6fafsCb99GxRtlyWrvJk
W2jRQqjr32TyAriV/GB9R3K7A8BI2bwboRISHCjEDo+e0VrmJeKoCEraZZAQSfKqLN7Rb/yGSSY/oa4U+Ulg6b8UuJ0v/TJ6m6gaC20/GPbezgoqK6yulmrkjeD02e9EnOWtVOJ6g
CK5YH/XKulE8OtQLwv2Fk2azzKVD8czLuxKAmCNKIPDjlyYqHosdPqOx56Wg2UnA==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2020-11-17 16:45:32 | Firmante

Vp6dN1jLkfohU/Y9ErnyxpEhaHiw/BbMO77XOQa7poQKwnXxSeNbtgl/7fCMvlnxNHk4WGvbL8pvrX9DaCu5gkYg8BeYv28vBAzYzTnyQVlIba1jmBITsWN+qCM8WnY25BtbLhcel
TqqWINIjEjJHxCz2MlrFpfWOYMY05AUUDCNifU8TtW4nk36JA/7JqdtXRRtJ2zJ5+P4Sv8GePoqr3313NV0JyUpe7f8qqw+Vhcd+5t+HWFUlojb+q3MASI8jqau0k/V1n0g3DUmO
0zChm6zaUODOs/Hw4CZfxn1M31FOwAxio+ubYru4flmp5h2lB9qXLN9nM4lftSoiCRQ==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-11-17 17:20:48 | Firmante

ZinvHopVT1g59hnaO+mufsnJbuJ1LiKgnYhpNCjSlzhREiBj/0ipB7H39bu7UH1bP/f1NfYw8JEZc67FrKEk0xPq9qGK6urWSh2RMKIMoPGtkK65EPW4LNRwXDQat5T7aS3zA4xRn
o/PDhurDZFNjyKfWkVcs0l6HRIJlzwgZ7QO9VtsS1aVbWLLyD6dvZCOolyKq2IMlhSIOi+oig2N988xhgWynfldDSrkiayKqta6U/QwHnfWaG9HlId5jvPwsWCqRa1+PzMKCPqfNto
DnxP3XgBBydMFYQt7RdANPj69lfm43FVhikrNoBxjDcpwSFIRG2cAGXBzX+8koOIA==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2020-11-17 17:32:13 | Firmante

J6cDY50mtYz3O7ifajGJr6TWmfKKCFnpKEoN3kB31N569OFfSPG1xshlzU/Vr6elpWHMCMG1iEI6lblaiT+GGfgifEcX/X5c/Dt/09UJfpydw4SR7NkG17eiwYi62yqA7JbwxnIcJz5m7d
GyzwpBG4T0pjlrbhyiF5MMioQ+3ctPYQfGKsAdW5OEDwglEFUbtIHnvZQ6bSVSAIEWTR2TOHKUlueglq9ZjJBJyMhWxzLgo1j6W8pYn86lI5LhPgSYU4XFkJwmeJC9Oe9Q1mP
b8q9kHmTJvDJ4iUiW3l3ILO7sWA2tlE42P5geuXfWxKfvc3hR5B+lhccOl6mzYFbw==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2020-11-17 17:36:33 | Firmante

RhbHCvZ/BXisd8HfLS+wT6Dyy0L3grjdNBE/Sb1NCFtYK5RGpHqUjSISEX4Q764raOqPewRYyXONzaoBwU0NdvJxU89+ml7L0yQ5r0WJm7RLMKClwchya9G5ymPH52SjaVod
PKMWu69kNkBVptqxVhDu5r9065rVpYBchKKS7hMRw72Rn6BuVSDOwFUhBYZftgni0/EoXj4eb4Oyqx0zcNtMEa+iwBzotTjpDGAxLS+PA2FW8qMD65JpjrCJChrFo0XZJRCcYg
nbH3TVWUKTQ6Gss+kgXX3NT08ePKt4G9f2HCLCgSukJeGMOwRON8jtcvHbWOak5AvMxui17AUw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0ZIAQ9

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kXEIj6VngXC4ZngYvuKQAYFLB9f8OwTF>



Agradecimientos

Al Dr. Ramón Alberto Batista García, mi asesor de tesis, por su apoyo, cariño y ejemplo a lo largo de este camino. A mi mamá por ser mi guía en todo y mi apoyo. A mi tío por su apoyo y ejemplo. A mi familia, mi abuela, Amaury y mis hermanos Amy y Mauro porque son mi todo. A Tony porque está siempre allí para mí y me ha apoyado incondicionalmente y a su familia. A Heidi por su amistad y gracias a ayuda hizo posible la realización de este documento. A todos mis compañeros del laboratorio que contribuyeron de una forma u otra con la realización de esta tesis, en especial a las chicas *Aspergillus*. A todas las personas que contribuyeron y me guiaron a lo largo del camino, en especial a la Dra. Lira por sus sugerencias y por su tiempo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado a lo largo de mis estudios, dándome la oportunidad de realizar este trabajo de la manera más efectiva posible. Muchísimas gracias a todos. A Dios por supuesto.

Dedicatoria

A mis hermanos porque cada cosa que hago en mi vida es para ellos, son mi luz, mi razón de vivir. A mi mamá y a mi abuela porque son todo para mí y me lo han dado todo, sobre todo la familia más maravillosa que puede existir y el amor más lindo y puro del universo. A Amaury, porque Dios no me pudo dar un mejor padre. A mi tío porque es una de las personas que más admiro y siempre ha estado allí para mí. A Tony porque no existe persona en este mundo más especial y perfecta para mí. A Dios.

Tabla de Contenido

Resumen	2
Listado de abreviaturas.....	3
1. Introducción	4
1.1 Actividad de agua.....	4
1.3 Mecanismos de respuesta a condiciones de baja a_w	6
1.4 Especies reactivas del oxígeno	15
1.7 <i>Aspergillus</i> en condiciones de baja actividad de agua	18
2. Antecedentes	20
3. Justificación	22
Hipótesis.....	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
2. Materiales y Métodos.....	24
2.1 Medios de cultivo.....	24
2.2 Metodología	24
2.3 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en <i>Aspergillus sydowii</i> EXF-12860 en crecido en presencia de las sales NaCl y MgCl ₂	26
2.4 Determinación de la composición de compuestos osmóticamente activos en <i>A. sydowii</i> crecido en presencia de las sales NaCl y MgCl ₂	29
2.5 Extracción de total ARN	30
2.6 Análisis del transcriptoma de <i>Aspergillus sydowii</i>	34
3. Resultados y discusión.....	38
3.1 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>A. sydowii</i> en presencia de NaCl y MgCl ₂	38
3.2 Presencia de estrés oxidativo en <i>A. sydowii</i> crecido en las sales NaCl y MgCl ₂	40
3.3 Análisis de solutos compatibles	43
3.4 Análisis transcriptómico de <i>A. sydowii</i> en presencia de las sales NaCl y MgCl ₂	48
4. Conclusiones.....	71
Referencias.....	73

Resumen

En nuestro planeta existen ambientes que presentan condiciones extremas donde se desarrolla exitosamente la vida de las comunidades microbianas extremófilas. Un ejemplo de estos son los ambientes con elevadas concentraciones de iones, en los cuales la disponibilidad de agua en el medio es muy baja por lo que representa un reto para la vida. Los microorganismos extremófilos presentan mecanismos de respuesta que les permiten sobrevivir en estos ambientes con elevadas presiones osmóticas. En los hábitats hipersalinos se han identificado una gran diversidad de hongos extremófilos entre los que se destacan por su tolerancia a las altas concentraciones de sales especies del género *Aspergillus*. No se conocen claramente los mecanismos moleculares que diferencian la respuesta a condiciones de baja actividad de agua (a_w) impuesta por diferentes iones como NaCl y MgCl₂. Para una mayor claridad se realizó un análisis transcriptómico de *Aspergillus sydowii* crecido en presencia de 2 M de la sal caotrópica MgCl₂ y la sal cosmotrópica NaCl para entender los mecanismos diferenciales de respuesta a estrés osmótico. A partir del procesamiento del transcriptoma se identificaron 376 transcritos regulados positivamente y 436 transcritos regulados negativamente. Entre los transcritos regulados positivamente se identificaron genes involucrados en la respuesta al daño en el genoma, la biosíntesis de solutos compatibles, las modificaciones de la pared celular, el transporte celular y el estrés oxidativo. Se detectaron por Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC) aquellos solutos compatibles involucrados en la respuesta al estrés osmótico en *A. sydowii* y no se encontraron diferencias en presencia NaCl con respecto a la presencia de MgCl₂. En ambas condiciones la utilización de compuestos osmóticamente activos está dada por una mezcla de solutos como la trehalosa, el manitol, el arabitol, el eritritol y el glicerol. En presencia de 2 M de MgCl₂ se detectó un incremento superior en la actividad enzimática de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa que el detectado en presencia de 2 M NaCl. Esto sugiere que existe un estrés oxidativo en *A. sydowii* a altas concentraciones de MgCl₂ y que las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa están involucradas en la respuesta del mantenimiento de la homeostasis redox a nivel celular.

Listado de abreviaturas

a_w : Actividad de agua
NaCl: Cloruro de sodio
MgCl₂: Cloruro de magnesio
Na⁺: Ion sodio
Mg²⁺: Ion magnesio
H⁺: Ion hidrógeno
K⁺: Ion potasio
Fe⁺: Ion hierro
Cu⁺: Ion cobre
Zn: Zinc
KCl: Cloruro de potasio
MgSO₄: Sulfato de magnesio
NaBr: Bromuro de sodio
CaCl₂: Cloruro de calcio
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido desoxirribonucleico
DEPC: Pirocarbonato dietil
HOG: Vía de alta osmolaridad del Glicerol
DO: Densidad óptica
ARNm: ARN mensajero
ED: Expresión Diferencial
FDR: Tasa de Aparición de Falsos Positivos
GO: Ontología Genética
HFB: Hidrofobina
logFC: Logaritmo de la tasa de cambio de expresión
RNAseq: Plataforma de secuenciación de alto flujo de ARN
Phe: Fenantreno
BaP: Benzoalfapireno
PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Definición
GC: Guanina-Citocina
MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

1. Introducción

1.1 Actividad de agua

El agua es un recurso de vital importancia para todos los organismos vivos (1). La vida solo puede existir en un rango estrecho de disponibilidad de agua, en un entorno determinado, el cual se expresa como actividad de agua (a_w) (2). La a_w se define como la cantidad de agua disponible en el medio y es un término utilizado originalmente por la industria farmacéutica y alimenticia para referirse a la vida útil y calidad de un producto (3). La a_w es un parámetro físico químico que mide el grado de hidratación de una mezcla y es una de las propiedades más importantes del agua en los sistemas vivos. La a_w expresada como fracción molar del agua, es el determinante primario del metabolismo y la división celular. Para cada microorganismo existe un valor específico de a_w al cual sus actividades bióticas cesan, lo cual a su vez puede depender de otros parámetros ambientales. Existen dos ambientes en los cuales la disponibilidad de agua puede ser un factor limitante para la vida de los organismos. Un entorno con baja a_w puede ser una solución en la cual la disponibilidad de agua se determina por la concentración de solutos en esa solución. Otro caso es un entorno complejo físicamente heterogéneo, como el suelo, que se presenta cuando la disponibilidad de agua se determina principalmente por los efectos capilares o de unión a la superficie (3). Solo algunos microorganismos pueden crecer en ambientes con altas presiones osmóticas, características de medios súper saturados (4). Entre los lugares en los que el agua constituye un reto para la vida encontramos desiertos, ecosistemas árticos, acuáticos, con concentraciones de NaCl ≥ 1.0 M, u otros donde la concentración de glucosa o solutos orgánicos es muy elevada ($\geq 50\%$), como la miel de abeja. La a_w debido a su significado biológico, tiene gran importancia ya que determina el crecimiento microbiano, incluso en condiciones extremas de a_w tales como (≤ 0.85) (4).

La a_w se basa en la Ley de Raoult's para soluciones ideales, la cual plantea que al agregar soluto a un solvente puro disminuye la presión de vapor del solvente. Por otro lado, la a_w no tiene en cuenta las interacciones del soluto con componentes distintos al agua [4]. Se calcula mediante la siguiente fórmula: $a_w = P/P_0 = n_1/n_1+n_2$

Dónde: P es la presión de vapor de la solución y P_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura; n_1 número de moles del solvente (agua) y n_2 número de moles del soluto (3).

La a_w puede variar de cero (ausencia total de agua) a uno (agua pura) ya que decrece con el aumento de las concentraciones de los solutos. Además, para una solución ideal la a_w es independiente de la temperatura y en realidad, en la práctica, en una solución dada varía solo ligeramente con la temperatura dentro del rango de temperaturas admisibles que permiten el crecimiento microbiano (3). Las características del soluto, tales como su naturaleza química y concentraciones presentes en el medio no solo disminuyen la disponibilidad de agua, sino que además causan presiones osmóticas y efectos tóxicos (5).

1.2 La vida en condiciones de baja actividad de agua

Los organismos capaces de crecer en condiciones de baja a_w son denominados xerófilos o xerotolerantes. El término xerofilia indica que el organismo requiere bajos niveles de a_w para su crecimiento. Mientras que los xerotolerantes son aquellos capaces de crecer en condiciones de baja a_w , sin embargo, no requieren necesariamente de estas condiciones para su crecimiento. Los organismos xerófilos son capaces de crecer a menores valores de a_w en comparación con los organismos xerotolerantes, aunque existen excepciones a esta regla dentro de los procariontes (3). El estrés impuesto por iones y solutos orgánicos no tiene que ser necesariamente el mismo. No obstante, muchos microorganismos xerófilos que crecen óptimamente en concentraciones elevadas de azúcares presentes en los alimentos son capaces de tolerar bajos niveles de a_w impuestos por iones (4). Los organismos xerófilos o xerotolerantes son capaces de crecer en presencia de cloruro de potasio (KCl), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otras sales o moléculas orgánicas. Existe un grupo de organismos que presentan un requerimiento específico de cloruro de sodio (NaCl), llamados halófilos. Tales organismos requieren de forma estricta la presencia de NaCl en el medio, generalmente en concentraciones mayores a 1 M o 1.5 M. Mientras que el término halotolerante se refiere a aquellos organismos que no presentan ningún requerimiento específico de NaCl, pero son capaces de continuar su crecimiento en medios con concentraciones de NaCl, mayores a 1 M. Los hongos capaces de crecer en concentraciones de sal de 3 M y que son generalmente aislados de ambientes salinos de cerca de 1.7 M, son considerados halófilos. Mientras que aislamientos esporádicos de hongos capaces de crecer *in vitro* a 3 M de NaCl son considerados como halotolerantes (6). Los lagos hipersalinos superficiales y las salinas solares son los principales hábitats para microorganismos halófilos y halotolerantes (7). El grupo más importante de especies

halotolerantes está representado por *Aspergillus niger*, *Aspergillus sydowii*, *Eurotium amstelodami* y *Penicillium chrysogenum* [12]. Las levaduras melanizadas o ascomycetos meristemáticos son un grupo dominante en ambientes hipersalinos. *Hortea werneckii* es la levadura melanizada dominante en aguas hipersalinas, con salinidades de 3.0 M de NaCl (6). En órdenes como Wallemiales (Basidiomycota), Capnodiales, Dothideales y Eurotiales (Ascomycota), la halofilia es característica de varios grupos en el mismo orden, pero estos no necesariamente son filogenéticamente cercanos unos con otros. La patogenicidad y el oportunismo son igualmente fuera de lo común en el Reino Fungi como la xerotolerancia. Los hongos patógenos y extremófilos (halotolerantes/xerotolerantes) pertenecen a los mismos órdenes. Con solo algunas excepciones, a nivel individual de especie estas dos características aparecen mutuamente exclusivas (6). Resulta interesante el estudio de los mecanismos que le permiten a estos hongos patógenos crecer en condiciones extremas (baja a_w), debido a su potencial biotecnológico (8), (9).

1.3 Mecanismos de respuesta a condiciones de baja a_w

Los microorganismos capaces de vivir en ambientes extremos con baja a_w producto de la presencia de solutos como NaCl, glucosa, $MgCl_2$, $CaCl_2$, entre otros, presentan mecanismos de respuesta a estrés osmótico. Entre estos mecanismos se encuentran la síntesis y acumulación de solutos compatibles, la activación de la Vía de Alta Osmolaridad del Glicerol (HOG), el aumento de la fluidez de la membrana plasmática, la producción de hidrofobinas, la homeostasis de los iones, entre otros (Figura 1).

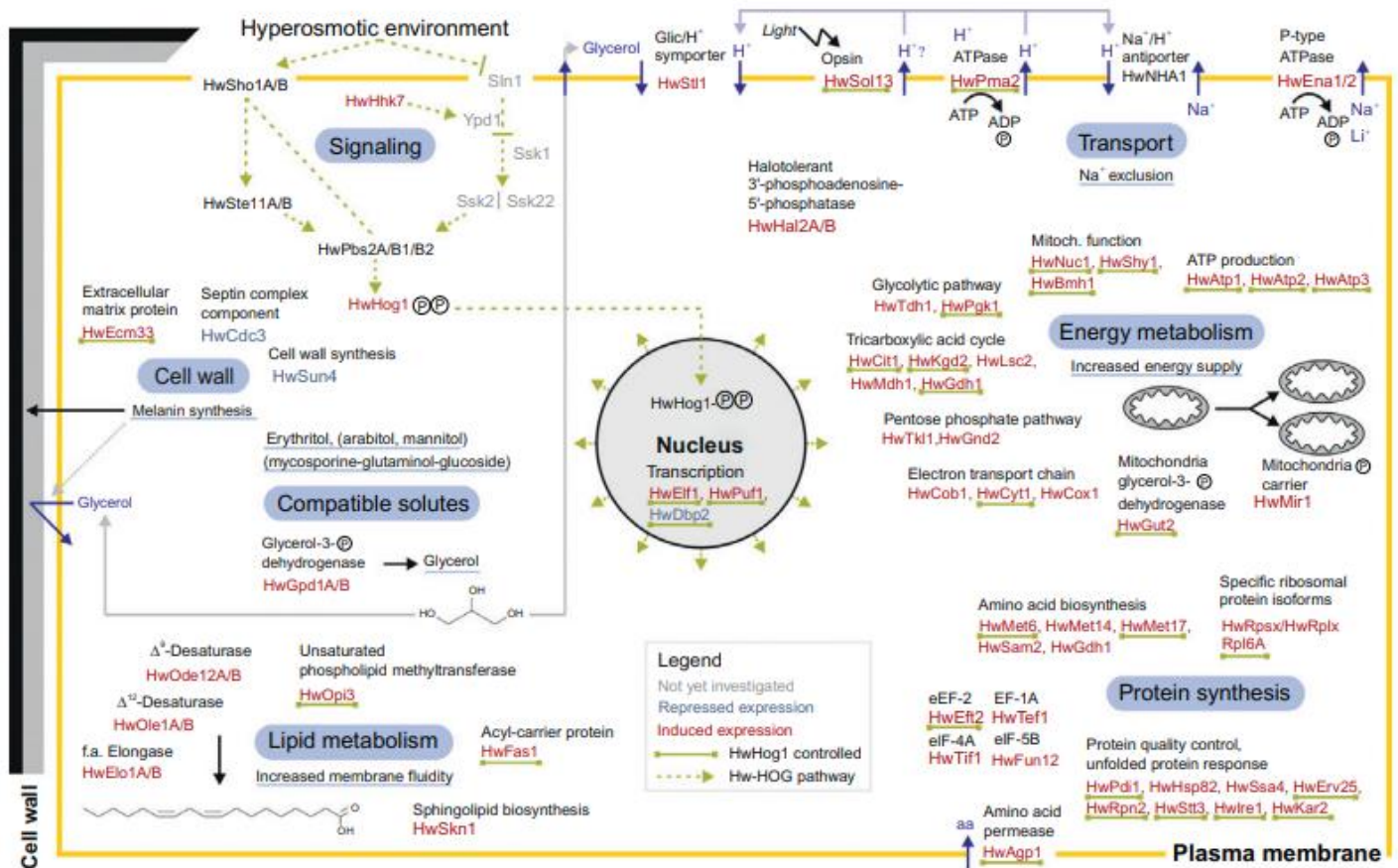


Figura 1. Modelo de respuesta a estrés osmótico en la levadura melanizada *H. werneckii*. Como resultado del aumento de la presión osmótica en el medio se activa la vía de HOG a partir de osmosensores (flechas verdes), los cuales modulan la expresión de algunos genes de respuesta a estrés osmótico (flechas verdes discontinuas). Como resultado ocurren cambios transcripcionales (los genes con una expresión positiva están escritos en rojo y los que tienen una expresión negativa están escritos en azul). El impacto negativo que provoca en las células las altas concentraciones de sales en el medio se contrarresta con el incremento en el suministro energético celular (biogénesis a nivel mitocondrial y el incremento de la biosíntesis de proteínas). Lo que impulsa procesos demandantes de energía como la exportación de sodio (Na⁺) e hidrógeno (H⁺), el importe de glicerol, la biosíntesis de solutos compatibles y otros procesos. En el caso de *H. werneckii* la melanización de la pared celular reduce la salida de solutos compatibles fuera de la célula y la restructuración de los lípidos de la membrana ayuda al mantenimiento de la estructura dinámica de la bicapa lipídica, lo que favorece la integridad de la célula y los procesos celulares asociados a la membrana plasmática. Tomado de (10).

Homeostasis de los iones

El incremento de las concentraciones de solutos en el medio causa un aumento de las presiones osmóticas y provoca un desbalance iónico por lo que la célula necesita aumentar el transporte activo de iones para lograr una homeostasis de los iones. La levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* es utilizada como modelo de estudio en la respuesta celular de homeostasis de los iones en presencia de estrés osmótico. En un reporte de levaduras marinas, *D. hansenii* fue una de las menos afectadas por las altas concentraciones de NaCl. Se ha reportado que el flujo de Na^+/K^+ juega un papel importante en esta tolerancia. Para esta levadura el Na^+ no resulta tóxico ya que, en presencia de NaCl, *D. hansenii* crece mejor y acumula más concentraciones de este ion que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es también utilizada como un organismo modelo en estudios sobre la respuesta celular al incremento de las presiones osmóticas en el medio. La presencia de Na^+ puede proteger a la célula frente a factores adicionales de estrés (11). En *D. hansenii* y en el halófilo *Wallemia ichthyophaga*, se acumulan mayores concentraciones de Na^+ , que en el extremadamente halotolerante *Hortea werneckii*, el cual aparentemente excluye este catión (12). Este resultado evidencia la evolución independiente del mecanismo de homeostasia de iones para estos hongos (6). En especies del género *Saccharomyces*, una de las enzimas más importantes involucradas en los mecanismos de respuesta a altas concentraciones de sal son las ENA ATPasas involucradas en la exclusión de Na^+ . En *D. hansenii* existen dos genes que codifican para esta Na^+ -ATPasa, *DhENA1* y *DhENA2*. En el caso de *DhENA1*, se expresa diferencialmente en presencia de altas concentraciones de NaCl. Mientras que la expresión de *DhENA2* requiere de un alto pH. Sin embargo, la expulsión de Na^+ por sí solo, no es suficiente para comprender el mecanismo de tolerancia a las altas concentraciones de sal en *D. hansenii*. En esta levadura la existencia de un transporte con baja y alta afinidad en el influjo de K^+ y en el eflujo de Na^+ , es de alguna manera similar pero también considerablemente diferente al de *S. cerevisiae* (6). Cuando *D. hansenii*, crece en un medio en presencia de altas concentraciones de glucosa y de NaCl en la fase exponencial de crecimiento existe un balance osmótico establecido por un gradiente de signos contrarios entre el Na^+ y el glicerol, a través de la membrana plasmática. Lo cual evidencia el hecho de que estos dos gradientes estén vinculados a través de un simporte de Na^+ -glicerol, que emplea el gradiente del Na^+ como una fuerza conductora que impulsa el gradiente de glicerol. Sin embargo, a pesar de que el

transporte activo de glucosa en esta levadura es un simporte de Na^+ -glicerol, que mantiene el gradiente de glicerol en función del gradiente de Na^+ , es capaz de aceptar al K^+ como un co-sustrato cuando las concentraciones de Na^+ son demasiado bajas (6). La homeostasis intracelular del hidrógeno (H^+), también juega un papel importante en la tolerancia a la salinidad y los resultados obtenidos en dos cepas de *D. hansenii*, muestran que cuanto más cerca pueda mantener una cepa su pK_i a su nivel de homeostasis (pH_i), mejor puede manejar el estrés provocado por altas concentraciones de NaCl (6). En *D. hansenii* han sido identificados varios transportadores de K^+/Na^+ localizados en la membrana plasmática o en la membrana interna de la célula. La existencia de una bomba de protones en *D. hansenii* es similar a la que ha sido propuesta en *S. cerevisiae*. El ortólogo del gen *DhPMA1* en *S. cerevisiae* que codifica para la enzima H^+ -ATPasa, fue encontrado en *D. hansenii*. Esta bomba de protones genera el potencial de membrana que se requiere para que ocurra el intercambio K^+/Na^+ en estas células (6). En *H. werneckii* han sido identificados dos genes que codifican para la enzima sensible a la salinidad: *HwENA1* y *HwENA2*. Los estudios en la expresión de estos genes (*HwENA1/2*) han revelado que son sensibles al incremento de las concentraciones de sal y al incremento del pH, condiciones que son características en los nichos naturales en donde habita *H. werneckii*. Mediante un análisis filogenético de la proteína HwENA, se reveló que pertenece al grupo de hongos que presenta ATPasas de tipo P, la cual es filogenéticamente más antigua que las enzimas Na^+/K^+ ATPasas, sensibles a sal presentes en *S. cerevisiae* y también presentes en los halotolerantes en *D. hansenii* y en *Yarrowia lipolytica* (6).

Solutos compatibles

Los solutos compatibles son compuestos osmóticamente activos que proveen a la célula de balance osmótico y turgencia, sin interferir en el metabolismo celular. Una de las estrategias ampliamente utilizadas por los microorganismos para contender contra la baja a_w es la síntesis y acumulación de solutos compatibles. La turgencia celular disminuye cuando la actividad de agua extracelular es menor que la del citoplasma. Es por ello que las células microbianas gastan energía en sintetizar, tomar del exterior y retener solutos compatibles como un mecanismo para realizar un ajuste osmótico celular (6). La mayoría de las bacterias y eucarias utilizan la estrategia de la acumulación de solutos compatibles para mantener las concentraciones intracelulares de iones como Na^+ por debajo de los

niveles que resultarían tóxicos para la célula. La mayoría de los hongos acumulan diferentes polioles y aminoácidos libres y sus derivados. La levadura *S. cerevisiae* utiliza casi de forma exclusiva el glicerol como osmolito. En otras levaduras y hongos es conocida la producción o acumulación de polioles a partir del ambiente, como el eritritol, ribitol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol, galacticol, entre otros (6). En la levadura *D. hansenii* ha sido detectada la presencia de pequeñas concentraciones de arabitol, trehalosa, ácido glutámico y alanina. Para esta levadura ha sido reportado que en altas concentraciones de sal (2 a 3 M de NaCl) se acumulan mayores concentraciones de glicerol que de trehalosa. Mientras que, bajo un estrés moderado, provocado por 2 M de NaCl, se acumula más trehalosa que glicerol. La síntesis, el transporte y la acumulación de glicerol son eventos muy regulados, figura 2 (13). La síntesis de glicerol es estimulada por concentraciones de Na⁺ altas y en parte se debe al aumento de la expresión de los genes que codifican para glicerol-3-fosfato deshidrogenasas (*GPD1*) y para glicerol-3-fosfatasa (*GPP2*). En la levadura xerófila *H. werneckii* ha sido comprobado que el glicerol se acumula predominantemente durante la fase de crecimiento exponencial y disminuye notablemente durante la fase estacionaria a concentraciones de 5 M de NaCl (13). La síntesis de glicerol se encuentra regulada a través de la vía de respuesta al estrés HOG, explicada de forma detallada posteriormente. (6). A pesar de los avances en las investigaciones mencionadas con anterioridad, los mecanismos de homeostasis relacionados con la síntesis y acumulación de solutos compatibles en los hongos filamentosos es aún limitado. Algunos estudios reportan que el glicerol es el soluto compatible que se encuentra frecuentemente en distintos microorganismos. Los estudios realizados en *Aspergillus niger* revelan que en micelio “joven” (48-72 horas) se acumula principalmente glicerol, seguido de eritritol, mientras que en micelio “viejo” (120 horas) se encuentran principalmente manitol y eritritol (14), (15). La mayoría de las investigaciones proponen que la acumulación de solutos compatibles es una de las adaptaciones de mayor importancia fisiológica en hongos halófilos. Se ha reportado que la levadura *H. werneckii* y el basidiomiceto *Wallemia ichthyophaga*, contienen mezclas de polioles (glicerol, arabitol y manitol) (2). Mientras que para *A. niger* y *Aspergillus nidulans* se ha descrito la acumulación de trehalosa y manitol en las conidiosporas, como una estrategia de osmoadaptación a condiciones de hipersalinidad (14), (16). Una de las adaptaciones morfológicas a la baja a_w en hongos, es el incremento en número y/o tamaño de las vesículas intracelulares, posiblemente asociadas a la acumulación de solutos compatibles. A pesar de su importancia fisiológica, en hongos filamentosos los solutos

compatibles han sido escasamente estudiados, por lo que la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de estos no se conoce claramente.

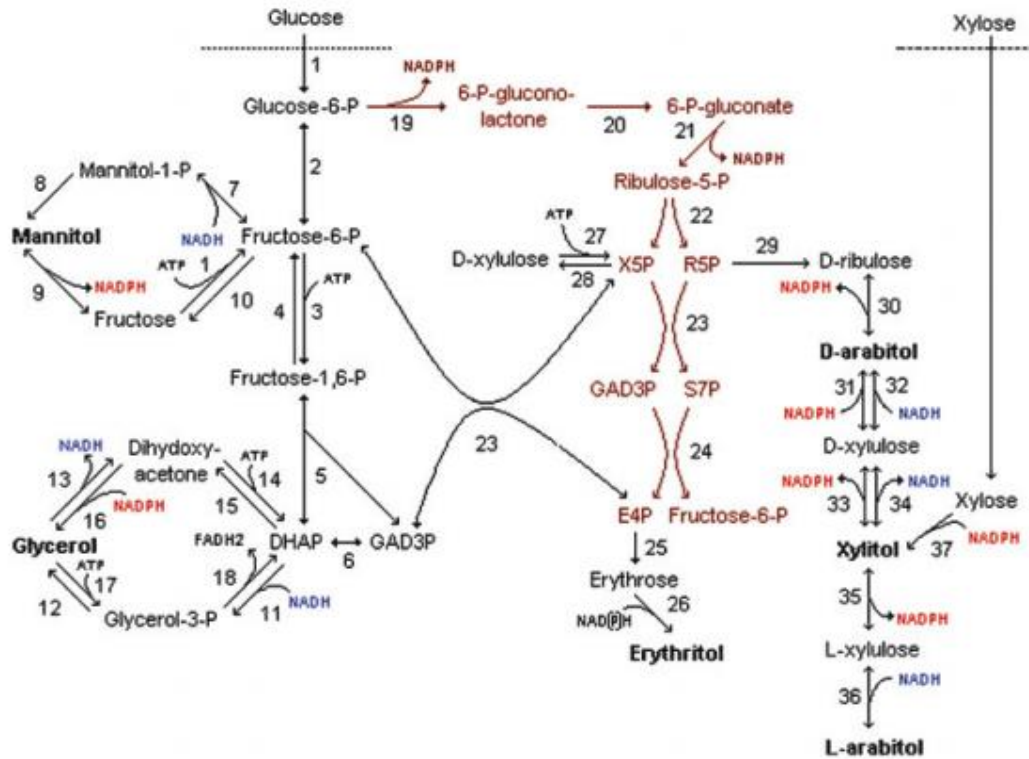


Figura 2. Vía anabólica y catabólica de síntesis de polioles en *Aspergillus niger*. 1, hexoquinasa; 2, isomerasa de fosfato de glucosa; 3, 6-fosfofructoquinasa; 4, hexose bifosfatasa; 5, aldolasa de bifosfato de fructosa; 6, triose fosfato isomerasa; 7, manitol-1-fosfato deshidrogenasa; 8, manitol-1-fosfatasa de fosfato; 9, manitol deshidrogenasa dependiente de NADP; 10, fosfatasa de fructosa-6-fosfato; 11, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (o DHAP reductasa); 12, glicerol-3-fosfatasa de fosfato; 13, Glicerol deshidrogenasa dependiente de NAD; 14, DHA quinasa; 15, fosfatasa DHAP; 16, NADP dependiente de glicerol deshidrogenasa (o DHA dependiente de NADPH); 17, glicerol quinasa; 18, Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; 19, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 20, lactonasa; 21, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 22, fosforiboisomerasa; 23, transketolase; 24, transaldolasa; 25, fosfatasa eritrose-4-fosfato; 26, eritro reductasa; 27, D-xilulosa quinasa; 28, D-xilulosa 5-fosfatasa de fosfato; 29, D-ribulosa 5-fosfato fosfatasa; 30, D-ribulosa reductasa dependiente del NADP; 31, D-xilulose reductasa dependiente de NADP; 32, D-xilulosa reductasa dependiente de NAD; 33, NADP dependiente de xilitol deshidrogenasa; 34, xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD; 35, L-xilulosa reductasa dependiente de NADP; 36, L-arabitol dependiente de NAD deshidrogenasa; 37, D-xilosa reductasa. Tomado de (17).

Vía de HOG

La vía de HOG tiene una gran importancia ya que su papel a nivel fisiológico es el de activar las respuestas adaptativas ante el incremento de la osmolaridad en el medio externo. El incremento de la presión osmótica conduce a la pérdida de agua y a la reducción del tamaño a nivel celular. La célula necesita contrarrestar este efecto con el objetivo de mantener su forma y turgencia. Además, necesita garantizar una concentración óptima de agua e iones en el citosol y en sus organelos, para que funcionen de forma adecuada las reacciones bioquímicas celulares. La vía de HOG no es más que un mecanismo de transducción de señales perteneciente a las MAPK. La MAP quinasa Hog1 es también necesaria en la adaptación a otros tipos de estrés, tales como: el estrés oxidativo, arsenito, estrés debido a las bajas temperaturas y estrés provocado por ácido acético. Existen ortólogos del gen *Hog1* en probablemente todos los eucariontes. Su función está relacionada con la respuesta osmoadaptativa y en la respuesta a otros tipos de estrés. Los mecanismos de activación y regulación, así como los blancos moleculares de esta vía difieren entre organismos. La fosforilación y por lo tanto la actividad de Hog1 MAPK, se encuentra controlada por Sln1 y por Sho1, quienes convergen en MAP quinasa (MAPKK), Pbs2. Sin embargo, no está completamente claro de qué manera Hog1 es controlado por Sln1 y por Sho1 porque cada uno por sí solo es capaz de activar a Hog1 como respuesta a un estrés hiperosmótico. Sln1 es un sensor localizado en la membrana plasmática que abarca la membrana dos veces. Este sensor se encuentra relacionado con el osmosensor EnvZ de bacterias, que se considera que podría detectar cambios en la tensión y la turgencia de la membrana celular. Sho1 es controlado por los sensores mucilaginosos transmembranas Msb2 y Hkr1. No se conocen hasta el momento los mecanismos físicos involucrados en la osmosensibilidad. Ssk1, Ssk2 y Ssk22 son las MAPKKKs, las cuales permiten su autofosforilación y autoactivación de Pbs2 (MAPKK) que a su vez fosforila y activa a Hog1 (MAPK). La fosforilación de Hog1 conduce a su importación dentro del núcleo donde participa en el control de la expresión de genes en los promotores dianas. No todas las quinasas Hog1 son reclutadas al núcleo, ya que también tiene blancos en el citosol. Muchos detalles moleculares de la ruta de activación hasta el momento no se conocen con claridad, figura 3 (18), (12), (19), (20).

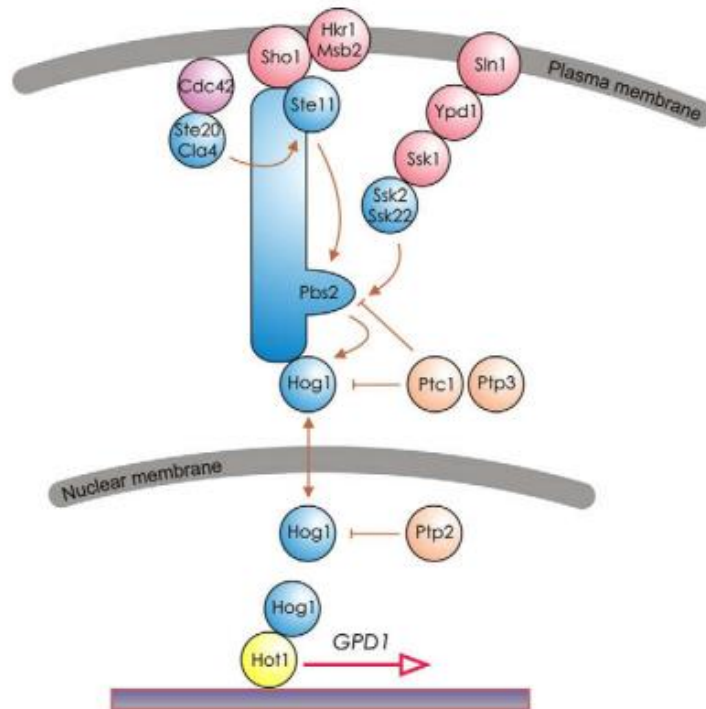


Figura 3. Componentes y flujo de información de la Vía de HOG, en levaduras. Los sensores localizados en la membrana y regulados se encuentran en rojo, las proteínas quinasas, en azul y las proteínas fosfatasa, en anaranjado y los factores de transcripción, en amarillo. Las dos ramas convergen al nivel de Pbs2 que activa a Hog1, que se acumula en el núcleo bajo condiciones de estrés. Ste11, Ssk2 y Ssk22 son MAPKKKs. Pbs2 es una MAPKK y Hog1 es una MAPK en el sistema. Tomado de (18).

Fluidez de la membrana plasmática

Los cambios en las propiedades de la membrana plasmática también tienen una importante función en la adaptación ante situaciones de estrés. La composición lipídica de la membrana plasmática tiene un papel importante en la retención del glicerol. En levaduras resistentes a muy altas concentraciones de sal como *D. hansenii* y *H. werneckii* se ha reportado la presencia de membranas altamente fluidas, lo que puede sugerir que estén mejor equipadas para retener el glicerol (6). El glicerol representa una paradoja para las células que acumulan solutos compatibles. Esto se debe a que el glicerol presenta una masa molecular pequeña y un alto coeficiente de permeabilidad lo que le permite atravesar fácilmente la membrana lipídica en comparación con otras moléculas no cargadas polares similares. Por lo que el eflujo pasivo hacia el citoplasma podría limitar la acumulación del glicerol dentro de la célula. En algas halófilas del género *Dunaliella* sp. la

permeabilidad de la membrana para el glicerol es considerablemente baja, lo cual está correlacionado con su alto contenido de esteroides. En *H. werneckii* y en otros hongos melanizados tanto halófilos, como halotolerantes, el ergosterol es el principal esteroide y otros 23 tipos de esteroides constituyen la fracción lipídica más distintiva de la membrana celular (6). Sin embargo, en *H. werneckii* el contenido total de esteroides no cambia con el incremento de la salinidad y las células mantienen sus membranas altamente fluidas en un amplio rango de salinidades. En contraste, se ha reportado que la fluidez de la membrana es baja en *S. cerviceae* y en el halotolerante *Aspergillus pullulans* (11). Los ácidos grasos tienen un efecto importante sobre las propiedades de las membranas celulares. Estudios en *H. werneckii* identificaron genes que codifican para tres enzimas modificadoras de ácidos grasos D9-saturasa, D12-desaturasa y elongasa, cada uno con dos copias. La transcripción de los genes que codifican para estas enzimas revela que responden a estrés salino. La baja expresión reportada en estos genes en presencia de concentraciones óptimas de sales indica que los cambios en la expresión de las enzimas modificadoras de ácidos grasos podrían ser uno de los mecanismos de la regulación de la fluidez de la membrana celular. La regulación de la fluidez de la membrana celular es muy importante para lograr el correcto funcionamiento de las células en un entorno osmótico en constante cambio (6).

Hidrofobinas

Una de las estrategias de respuesta a estrés osmótico es el incremento de la transcripción de genes que codifican para hidrofobinas (HFBs). Las HFBs son proteínas pequeñas producidas exclusivamente por hongos filamentosos. Estas se autoensamblan en interfases hidrofílicas-hidrofóbicas formando películas anfipáticas que disminuyen la tensión superficial del agua y permiten que las estructuras aéreas crezcan en el aire (21). Las HFBs participan en la formación de estructuras aéreas hidrofóbicas ya que se requieren hidrofobinas para la adhesión de las hifas a superficies hidrofóbicas. Presentan actividad lectina (unen polisacáridos de la pared celular) en la región hidrofílica por lo que intervienen en la morfogénesis de las células fúngicas. Las HFBs evitan la permeabilidad del agua mientras que se mantiene la permeabilidad a los gases confiriendo fortaleza y rigidez a la pared celular, al mismo tiempo que modifican el movimiento de solutos a través de la misma (11). Estudios en *W. ichthyophaga* revelan la presencia de 26 genes que codifican para HFBs, donde casi la mitad de estos se sobreexpresan como

consecuencia de las altas concentraciones de NaCl en el medio. A concentraciones de NaCl al 10%, se sobreexpresan ocho genes de HFBs. Mientras que cuatro genes de HFBs se sobreexpresan a concentraciones de NaCl al 30% (altas) (22). Las HFBs poseen un porcentaje mayor de residuos ácidos que las homólogas de hongos no halófilos, lo cual es una característica de las proteínas de Arqueas extremófilas (22). Lo que sugiere que las HFBs podrían cumplir una función importante para el crecimiento en condiciones de halofilia (11).

1.4 Especies reactivas del oxígeno

La exposición de los microorganismos al estrés, incluido el estrés provocado por altas concentraciones de sales en el medio pueden incrementar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los hongos son organismos especialmente atractivos como modelos para estudios relacionados con el estrés oxidativo debido a que son capaces de crecer en altas concentraciones de iones como medios saturados de NaCl o incluso concentraciones de MgCl₂ dos veces superiores a las concentraciones toleradas de magnesio en bacterias (2) (23). Sin embargo, no se ha estudiado la relación entre el estrés oxidativo y la halofilia. Un estudio en *H. werneckii* plantea la hipótesis de que el estrés oxidativo es uno de los factores limitantes del crecimiento en condiciones hipersalinas (23).

La producción de ROS es una de las características fundamentales del metabolismo del oxígeno a lo largo del árbol de la vida. Las células han evolucionado hacia mecanismos que en circunstancias normales responden de forma eficiente al daño causado por estos químicos. Cuando se afecta el balance entre la producción de ROS y la defensa por antioxidantes se produce un estrés oxidativo (23). Las ROS pueden dañar lípidos, proteínas y moléculas de ADN, si no son apropiadamente eliminadas. El estrés oxidativo proviene de fuentes extracelulares y ocurre como consecuencia de perturbaciones ambientales, tales como la presencia de agentes oxidantes, la exposición a los rayos UV o las células fagocíticas (24). Entre los radicales endógenos, que funcionan como intermediarios del metabolismo a nivel celular están los derivados de las coenzimas, como la oxidación de NADPH a NADP, los radicales libres derivados del glutatión (GSH) y los radicales derivados de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que estos últimos son muy sensibles para la iniciación de una reacción en cadena mediada por radicales. Mientras que otra fuente importante de producción de radicales libres es la respiración celular. Con

relación a esto algunas sustancias altamente tóxicas en estado fisiológico no lo son por sí mismas, solo que al ser transformadas metabólicamente se convierten en intermediarios altamente reactivos, como es el caso del oxígeno, figura 4 (25). El oxígeno molecular produce el anión superóxido, que es convertido por la superóxido dismutasa, en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es reducido por catalasas o por glutatión peroxidasa a agua o parcialmente reducido (por la vía de Fenton, reacción catalizada por iones ferrosos) a radical hidroxilo. El daño causado por el anión superóxido, es dirigido principalmente por proteínas con grupos prostéticos Fe-S. El hidroxilo es extremadamente oxidante, causando daño indiscriminado a un gran número de biomoléculas. Como consecuencia de esto, son de corta duración y el daño que causan es parcialmente controlado. Comparado con esto el H_2O_2 es relativamente estable y no tiene carga por lo que puede difundir a través de la membrana biológica, mientras que en la célula daña principalmente a proteínas con grupos prostéticos Fe-S (23) (2).

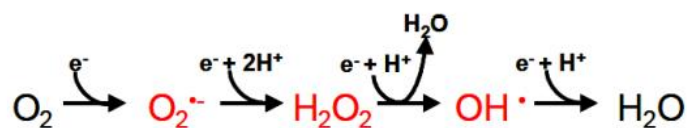


Figura 4. Las ROS, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\bullet), se generan a partir de la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2). Tomado de (26).

1.5 Ecosistemas hipersalinos

Existen dos tipos de ambientes hipersalinos que se diferencian por su origen y formación: thalassohaline y athalassohaline (27). Ambientes thalassohalines, como estanques marinos, marismas y salinas solares son originados por la evaporación del agua del mar y por esta razón predominan los iones de sodio y cloruro. Durante el progreso de la evaporación del agua, la composición iónica cambia debido a la precipitación consecutiva de la calcita (CaCO_3), yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hálito (NaCl), silvita (KCl) y carnalita ($\text{KCl} \cdot \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) después de que sus solubilidades hayan sido superadas (27), (28). En ambientes thalassohaline, ricos en NaCl (~ 2.0 M), existe una gran biodiversidad, incluida la de hongos. En los athalassohaline, ricos en MgCl_2 y CaCl_2 existen pocos reportes sobre la presencia de hongos y otros microorganismos (29) (5).

Un entorno natural con concentraciones de MgCl_2 mucho más altas que las que se encuentran en el Mar Muerto es Discovery Basin, localizado a una profundidad de 3.58 km por debajo de la superficie del mar Mediterráneo a 200 km de la costa occidental de Creta. Presenta una temperatura de 35 a 38 °C y una concentración total de sales disueltas de cerca de 470 g/l y está compuesta por MgCl_2 casi puro (concentraciones en mol/kg H_2O : Mg^{2+} , 5.15; Cl^- , 10.15; Na^+ , 0.084; K^+ , 0.089; Ca^{2+} , 0.001; SO_4^{2-} , 0.110; Br^- , 0.110). La existencia de esta salmuera de MgCl_2 y el gradiente de salinidad formado entre la interfase entre el agua del mar Mediterráneo y la concentración de la salmuera, provee una oportunidad única de explorar los límites de la vida al incrementarse las concentraciones de sales caotrópicas, no compensadas por concentraciones significantes de cationes cosmotrópicos estabilizantes. La primera exploración microbiana en este lugar sugirió la existencia de una comunidad microbiana significativa en el fondo de una piscina de salmuera (28).

1.6 Características de las sales cosmotrópicas y caotrópicas

La serie de iones Hofmeister o Serie Liotrópica es básicamente una clasificación de los iones en orden de su capacidad para generar precipitación salina en las proteínas (30) (31) (32). Los efectos Hofmeister de los iones sobre las estructuras biológicas pueden ser cosmotrópicos o caotrópicos. Los iones caotrópicos debilitan las interacciones electrostáticas y desestabilizan macromoléculas biológicas. Mientras que ocurre lo contrario con los iones cosmotrópicos que provocan estabilización (28). La diferencia entre el efecto cosmotrópico de la sal NaCl y el efecto caotrópico de las sales MgCl_2 y CaCl_2 está dado por la toxicidad que provocan las concentraciones altas de los iones desestabilizantes Mg^{2+} y Ca^{2+} , incluso en la mayoría de los organismos halófilos (33). Hasta cierto punto el efecto caotrópico de Mg^{2+} y del Ca^{2+} puede ser contrarrestado por la presencia de iones cosmotrópicos. Algunas Archaeas halófilas pueden crecer en altas concentraciones de MgCl_2 pero solo con la compensación cosmotrópica de concentraciones significativas de NaCl (5), (28), (34). Los reportes sobre la posible vida en condiciones extremadamente altas de iones cosmotrópicos (estabilizantes como: NaCl , KCl y MgSO_4) y caotrópicos (desestabilizantes como: NaBr , MgCl_2 y CaCl_2) son escasos para procariontes y casi ausentes para el dominio Eucariota, incluidos los hongos (31). Un estudio realizado con el objetivo de comprobar la capacidad de diversos hongos de crecer en ambientes extremos con muy altas concentraciones de sales tanto cosmotrópicas

como caotrópicas reportó la preferencia por concentraciones relativamente altas de sales cosmotrópicas. Existen reportes sobre la capacidad de tolerancia excepcional de varios hongos de crecer en altas concentraciones de $MgCl_2$ (por encima de 2.1 M) o de $CaCl_2$ (por encima de 2.0 M), sin la compensación de sales cosmotrópicas. Especies como *H. werneckii*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium chevalieri* y *W. ichthyophaga* son capaces de prosperar en medios con las más altas concentraciones de todas las sales (excepto por el $CaCl_2$ en el caso de *W. ichthyophaga*) (2). La mayor concentración de $MgCl_2$ soportada por un hongo en ausencia de iones cosmotrópicos es 2.1 M, la cual es mucho mayor que la que había sido previamente determinada como limitante del crecimiento microbiano (1.26 M) (2).

Sal caotrópica $MgCl_2$

La acción desestabilizante o caotrópica sobre las estructuras biológicas es la razón principal por la cual los cationes divalentes como el Mg^{2+} resultan tóxicos a altas concentraciones incluso para los microorganismos adaptados a medios hipersalinos (2). El arqueón cuadrado plano *Haloquadratum walsbyi* es un miembro destacado de la biota de los estanques salinos cristalizados en todo el mundo. En un estudio realizado en esta especie se reporta que a pesar de la presencia de sistemas de eflujo catiónico que demandan energía, las altas concentraciones externas de Mg^{2+} provocan el incremento de las concentraciones internas de este ion con valores superiores a los descritos para otros organismos. Los iones de Mg^{2+} tienen un efecto estabilizador sobre la doble cadena de ADN, sobre la estructura secundaria del ARN, y sobre el heterodúplex ADN-ARN. En genomas con un alto contenido de guanina-citocina (GC) como en la mayoría de los miembros de *Haloquadratum*, el efecto adicional de estabilización por Mg^{2+} puede resultar en la rigidez del ADN, lo cual puede interferir con procesos esenciales como la replicación del ADN y la transcripción (28).

1.7 *Aspergillus* en condiciones de baja actividad de agua

Los hongos ascomicetos filamentosos en particular del género *Aspergillus* son quizás los hongos xerófilos degradadores de alimentos de mayor importancia económica. Crecen bien en climas templados y tropicales (mínimo 9 °C, óptimo 25-30 °C) y toleran tanto las temperaturas elevadas (máximo 40-47 °C) como condiciones de baja a_w (11), (35). Varias especies de *Aspergillus* caracterizadas como xerófilas/halófilas son eficientes en la

degradación de biomasa, la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y en la producción de compuestos de valor añadido que los hacen potencialmente atractivos para la industria (36), (21), (37) (38). Resulta claro que dentro de los hongos capaces de contener con muy baja disponibilidad de agua en el medio, el género *Aspergillus* resulta un modelo especialmente atractivo para el estudio de los mecanismos de tolerancia a baja a_w , dado que son capaces de crecer en el rango de los menores valores de a_w que sustentan la vida (0.75 - 0.80) y aun así presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (11), (35).

Aspergillus sydowii

El hongo filamentoso ubicuo *Aspergillus sydowii* es principalmente conocido por ser un patógeno de corales que causa lesiones tisulares y oscurecimiento por melanización. Esta especie puede ser encontrada en hábitats hipersalinos, en aguas de las salinas y en alimentos secos. También se aisló de varios nichos terrestres desde suelos cercanos al Ártico hasta regiones tropicales y a partir de materia vegetal en descomposición. Los aislados terrestres no son patógenos de corales lo que indica la presencia de un ecotipo distintivo, aunque las características genéticas y metabólicas descritas hasta el momento no confirman esta afirmación. Algunas cepas de *A. sydowii* se estudiaron por su potencial biotecnológico como productoras de metabolitos secundarios y por sus enzimas degradadoras de biomasa vegetal. Un estudio transcriptómico de *A. sydowii* aislado de microalgas antárticas reportó la habilidad de esta especie para producir enzimas que degradan lignina para crecer utilizando la lignina como la única fuente de carbono (21). *A. sydowii* presenta la característica de crecer hasta 4 M de NaCl y de degradar biomasa vegetal bajo estas condiciones (2).

2. Antecedentes

Los ambientes hipersalinos eran considerados exclusivamente habitados por poblaciones de algas y bacterias halófilas. Sin embargo, Gunde-Cimerman y colaboradores en el 2000 reportaron una gran diversidad de hongos en ambientes hipersalinos con concentraciones de NaCl de 30% (39).

Según Zajc y colaboradores en el 2014, las investigaciones sobre los mecanismos de adaptación de hongos extremófilos capaces de crecer en ambientes hipersalinos están enfocados generalmente en el uso de NaCl en el medio debido a que la mayoría de los ambientes hipersalinos son ricos en esta sal (2). Sin embargo, existen ambientes hipersalinos naturales ricos en sales como $MgCl_2$ y no se conocen claramente los mecanismos de adaptación que le permiten a los hongos sobrevivir en ambientes donde las altas concentraciones de esta sal pueden ser un factor limitante para la vida (2), (28).

Gunde-Cimerman y colaboradores en el 2009, reportaron las principales adaptaciones de los hongos a las altas concentraciones de NaCl. Utilizaron como organismos modelos para explicar estas adaptaciones a representantes de hongos halófilos y halotolerantes como la levadura *D. hansenii*, *H. werneckii* y *Wallemia ichthyophaga* aislados de ambientes hipersalinos (40).

Jančič y colaboradores en el 2015, crecieron diferentes especies pertenecientes al género *Wallemia* en diferentes sustratos, entre ellos sustratos con baja a_w . Este estudio se realizó con el objetivo de entender la distribución natural de este género. Los resultados revelaron la capacidad de crecimiento de *W. ichthyophaga* en medio líquido con 2 M de $MgCl_2$. Este fue el primer reporte de un microorganismo capaz de crecer en tan altas concentraciones de $MgCl_2$ (41).

Zajc y colaboradores en el 2014, realizaron un estudio en el cual seleccionaron 135 cepas de hongos pertenecientes a 94 especies de 31 géneros, aislados previamente de ambientes hipersalinos, para observar su crecimiento en presencia de diferentes sales incluyendo al $MgCl_2$ y determinar qué concentraciones resultan limitantes para la vida. Estos resultados reportaron que 2.1 M es la mayor concentración de la sal caotrópica $MgCl_2$ que soporta la vida sin la compensación de una sal cosmotrópica. Entre las especies que logran crecer en 2 M de $MgCl_2$ estuvo el hongo halófilo filamentoso *A. sydowii* (2).

En estudios previos del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB, en busca de hongos halófilos-halotolerantes con actividad lignocelulolítica, se aisló la cepa filamentosa identificada como *A. sydowii* EXF-12860 atendiendo a criterios taxonómicos, micromorfológicos y moleculares. Este hongo se obtuvo a partir de la fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar en medio mínimo suplementado con 2 M de NaCl (42). Pérez-Llano y colaboradores en el 2020, realizaron un análisis transcriptómico de *A. sydowii* crecido en 0.5 M y 2 M de NaCl. Este estudio sugiere que debido a que las principales modificaciones fisiológicas ocurren en presencia de 2 M de NaCl y no en la condición óptima de crecimiento de 0.5 M de NaCl, los mecanismos que describen el crecimiento de hongos halófilos son una consecuencia de la respuesta al estrés salino y no una adaptación a estas condiciones (21).

Peidro-Guzmán y colaboradores en el 2020, crecieron *A. sydowii* en medio mínimo con HPAs como única fuente de carbono y evaluaron su remoción en el tiempo. Los resultados obtenidos permitieron reportar la capacidad de *A. sydowii* de remover dos de los principales contaminantes orgánicos: Phe y BaP (HPAs), de ambientes acuáticos hipersalinos (36).

Debido a su ecología extremotolerante y a su potencial biotecnológico *A. sydowii* emerge como un modelo fúngico prospectivo para el análisis molecular de la respuesta a condiciones salinas (21). Es por ello que en esta investigación se utilizó la cepa *Aspergillus sydowii* EXF-12860 (42).

3. Justificación

La realización de este proyecto permitirá determinar con mayor claridad las respuestas moleculares que tienen lugar durante el crecimiento en presencia de sales cosmotrópicas (NaCl) y caotrópicas (MgCl₂) en hongos filamentosos como *A. sydowii*. Hasta el momento no existen estudios moleculares sobre *A. sydowii* crecido en presencia de MgCl₂, por lo cual esta investigación es de relevancia científica, a la vez que garantiza la generación de conocimiento científico básico, original, de frontera y novedoso. Hacemos énfasis en que el proyecto generará información relevante sobre la composición genética y la fisiología de especies capaces de crecer en presencia de una sal caotrópica, sin una compensación de sales cosmotrópicas. Contribuyendo a sistematizar el conocimiento del género *Aspergillus*, el cual es usado como modelo para estudios de fisiología y genética en hongos. Este proyecto posibilitará conocer nuevas secuencias génicas codificantes para enzimas de interés industrial, lo cual tendrá un impacto positivo en la generación de conocimiento con potencialidades de aplicación en procesos biotecnológicos asociados a la industria de los alimentos, cosméticos y de tratamiento de residuos como biomasa vegetal, entre otros. Además, permitirá comprender las diferencias en la producción de solutos compatibles en presencia de sales cosmotrópicas y sales caotrópicas, así como comparar y determinar la presencia de estrés oxidativo entre las condiciones estudiadas. Este aspecto proporciona flexibilidad a esta propuesta, que desde la generación de conocimiento básico soporta futuras investigaciones aplicadas (investigación básica orientada), la cual se enfoca en el uso biotecnológico de hongos extremófilos.

Hipótesis

Debido a la capacidad de *Aspergillus sydowii* para crecer en ambientes con baja actividad de agua (a_w), es posible que los mecanismos moleculares de adaptación a estas condiciones provocados por NaCl y MgCl₂ sean similares.

Objetivo general

Analizar mediante transcriptómica comparativa los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de *Aspergillus sydowii* en condiciones de baja a_w inducida por NaCl y MgCl₂.

Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de crecimiento de *A. sydowii* en condiciones de a_w inducida por NaCl y MgCl₂.
2. Evaluar mediante biomarcadores de estrés oxidativos, la respuesta antioxidante de *A. sydowii* expuesto a NaCl y MgCl₂.
3. Determinar la composición de compuestos osmóticamente activos en *A. sydowii* en condiciones de a_w inducidas por NaCl y MgCl₂.
4. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii* crecido en condiciones de baja a_w inducida por NaCl y MgCl₂.

2. Materiales y Métodos

2.1 Medios de cultivo

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de medio de cultivo líquido YMB se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada con 2 M de NaCl (Tabla I) y para 1 L de agua destilada con 2 M de MgCl₂ (Tabla II):

Tabla I. Preparación de medio de cultivo YMB con NaCl

Medio YMB para 1 L de agua destilada	Cantidades
Malta	10 g
Levadura	4 g
Dextrosa	4 g
Peptona	5 g
2 M de NaCl (Cloruro de Sodio)	116.88 g

Tabla II. Preparación de medio de cultivo YMB con MgCl₂

Medio YMB para 1 L de agua destilada	Cantidades
Malta	10 g
Levadura	4 g
Dextrosa	4 g
Peptona	5 g
2 M de MgCl ₂ (Cloruro de Magnesio)	406.6 g

2.2 Metodología

Cepa, condiciones de cultivo y diseño experimental

La cepa *Aspergillus sydowii* EXF-12860 es un hongo halófilo filamentoso aislado de la fermentación sólida de bagazo de caña de azúcar (42). Según el Portal genómico (JGI)

(<https://genome.igi.doe.gov/portal/>) existe un genoma ensamblado de *Aspergillus sydowii* con tamaño de 34.38 Mbp.

A. sydowii fue crecido en medio de cultivo YMB, como medio rico de crecimiento para la comparación de las condiciones evaluadas en este estudio porque no buscamos sumarle un estrés nutricional adicional a nuestro organismo tipo. Se mantuvieron constantes el resto de los parámetros de crecimiento para realizar una correcta comparación entre las condiciones utilizadas.

Como condición de referencia se utilizó el crecimiento de *A. sydowii* en presencia de un estrés moderado de 2 M de la sal cosmotrópica NaCl. Como condición estresante se utilizó el crecimiento de *A. sydowii* en presencia de 2 M de la sal caotrópica de MgCl₂. Ambas muestras se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm en zaranda, a 28 °C de temperatura. En resumen, se utilizaron diferentes tipos de sales a la misma molaridad, ya que de esta forma serán comparables biológicamente las condiciones de crecimiento de la cepa en todos los experimentos descritos posteriormente.

Para determinar el tiempo del crecimiento de *A. sydowii* en el cual se evaluarían todos los experimentos (determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, determinación de compuestos osmóticamente activos y la extracción de ARN para el análisis transcriptómico) se seleccionó el tiempo correspondiente a la mitad de la fase de crecimiento exponencial en la condición de NaCl (2 M). Para lo cual se realizó un análisis de la curva de crecimiento, mediante la medición del peso húmedo y peso seco de la biomasa total durante siete días. Para esto, se calculó la ecuación de la recta exponencial y se graficaron, mediante la herramienta Excel, las curvas de crecimiento tanto de peso húmedo como de peso seco. La ecuación de la recta exponencial es: $f(x)=b^x$ donde $b > 0$ y $b \neq 0$ (b es la base y x es el exponente). Para la condición de 2 M de MgCl₂ se utilizó el mismo tiempo de extracción de la condición de 2 M de NaCl, utilizada como punto de referencia para garantizar una correcta comparación biológica entre las condiciones (43).

Obtención de las muestras

Para la obtención de las muestras se preparó un pre-inóculo de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 a partir de tres ponches de placas (crecidas en medio YMA, Tabla VI), con 250 mL de medio de cultivo YMB (Tabla I), en matraz de 500 mL, a una concentración de 2 M de NaCl, agitado a 150 rpm en zaranda, a 28 °C, durante siete días. Este micelio se lavó 18

horas en solución salina (Tabla III), según cada condición evaluada (2 M de NaCl y 2 M de MgCl₂). Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm y para cada muestra dentro de las dos condiciones se inoculó 0.2 g de micelio en 50 mL de medio de cultivo YMB, variando el tipo de sal empleada en cada caso, en agitación a 150 rpm, 28 °C, por cinco días. Para cada experimento realizado en esta investigación se obtuvieron las muestras de cada condición evaluada de la misma forma descrita anteriormente.

Tabla III. Solución salina para 1 L de agua destilada

Condiciones	2 M de NaCl	2 M de MgCl ₂
Peso Molecular	58.44 g/Mol	203.3 g/Mol
Gramos	116.88 g	406.6 g
a_w	0.96	0.95

Tabla IV. Preparación de medio de cultivo YMA con NaCl

Medio YMA para 1 L de agua destilada	Cantidades
Malta	10 g
Levadura	4 g
Dextrosa	4 g
Peptona	5 g
2 M de NaCl (Cloruro de Sodio)	116.88 g
Agar	150 g

2.3 Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en *Aspergillus sydowii* EXF-12860 en crecido en presencia de las sales NaCl y MgCl₂

Para la obtención de las muestras de *A. sydowii* se inoculó en medio YMB, durante 72 horas en presencia de NaCl y MgCl₂ ambos a concentraciones de 2 M. Las muestras de sobrenadantes y de micelio se obtuvieron por centrifugación a 6.000g. Las células fueron maceradas en nitrógeno líquido y se les añadió 1 mL de agua ultrapura por muestra. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con réplicas técnicas para las muestras de

sobrenadante y de micelio. Se midió la actividad de biomarcadores antioxidantes y pro-oxidantes. Se utilizaron controles negativos sin inocular para todos los ensayos.

Biomarcadores antioxidantes

Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa

La actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) se determinó por el método descrito por (44), con modificaciones para microplaca. Este ensayo se basa en que el Pirogallol en medio básico se autooxida generando en el medio una reacción con el radical superóxido, de esta forma la reacción con el radical se propaga, acelerando la autooxidación del Pirogallol cuya forma oxidada absorbe la luz a 420nm. La presencia de un secuestrador de radicales súper óxidos en el medio, como la SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de autooxidación del Pirogallol a 25 °C y pH = 8.20.

Actividad Catalasa

La actividad de la enzima catalasa se determinó utilizando el kit *EnzyChrom™ Catalase Assay Kit* (ECAT-100, BioAssay System, Hayward, CA). Este ensayo mide directamente la degradación del H₂O₂ por la catalasa, utilizando un tinte redox. El incremento de la actividad catalasa en el ensayo provoca un cambio en la intensidad del color a 570 nm o fluorescencia ($\lambda_{em} / \lambda_{ex} = 585 / 530\text{nm}$).

Actividad de la glutatión peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GPX) cataliza la reducción de H₂O₂ en presencia de glutatión reducido. La actividad de GPX se midió utilizando el kit *EnzyChrom™ Glutathione Peroxidase Activity Kit* (EGPX-100, BioAssay System, Hayward, CA). Este ensayo mide directamente el consumo de NADPH en las reacciones acopladas a

enzimas. La disminución de la densidad óptica a 340nm es directamente proporcional a la actividad enzimática en la muestra.

Biomarcadores pro-oxidantes

Determinación de Hidroperóxidos Orgánicos

Los hidroperóxidos orgánicos (HPO) y el H_2O_2 presentes en la muestra convierten el Fe^{2+} en Fe^{3+} en medio ácido. El Fe^{3+} forma un complejo coloreado con el xilenol naranja que es detectable por medición espectrofotométrica a 560nm. El procedimiento se realizó como indican instrucciones del juego de reactivos Bioxytech H_2O_2 -560 (45), de Oxis internacional Inc. Portland, USA.

Determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas

La determinación de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP) se realizó siguiendo la transformación de los iones yodo a yodo diatómico que provocan los PAOP, mediante el cambio de Densidad óptica (DO) a 340nm. Se utiliza como patrón cloramina T y los resultados se expresaron como μM de cloramina según lo reportado previamente por (46).

Determinación de malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos

La determinación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) se realizó mediante la reacción entre el N-metil-2 fenil-indol con el MDA y los 4-HDA a los 45 °C. Una molécula de MDA o de 4-hidroxi-alquenal reacciona con dos moléculas de N-metil-2-fenil-indol rindiendo cromóforo estable que absorbe a 586nm (47).

Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o Potencial de Peroxidación

La determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica o el potencial de peroxidación se realizó induciendo procesos de peroxidación lipídica por catálisis con Cu^{2+}

(2mM) en la muestra biológica. Esta medición permite conocer el balance entre factores prooxidantes y antioxidantes, basándonos en mediciones de la formación de MDA (48).

Cálculos estadísticos

El análisis estadístico se determinó por *Multiple T-test* y para determinar las diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas se utilizó el método *Correct for Multiple comparisons using the Holm-Sidak method* con una significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$). Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando la versión Prism8 (<https://www.graphpad.com>) de GraphPad.

2.4 Determinación de la composición de compuestos osmóticamente activos en *A. sydowii* crecido en presencia de las sales NaCl y MgCl₂

A. sydowii fue crecido en las condiciones evaluadas en el estudio de 2 M de MgCl₂ y 2 M de NaCl durante siete días para generar biomasa. Luego para detectar los solutos compatibles utilizados por este hongo filamentoso para contender contra el estrés osmótico inducido por estas sales se realizaron detecciones de estos solutos en los tiempos cero horas, 18 horas, 96 horas y 168 horas, para cada condición. Para ello se centrifugaron las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos y se secó el micelio en el horno a 80 °C, por 48 horas. La preparación de las muestras para el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realizó como se describe en [6] y [46]. Se realizó la extracción de los solutos a partir de 100 mg de micelio seco [6]. El micelio se resuspendió en una solución de Bligh y Dyer (compuesto de cloroformo-metanol-agua [10:5:3.4]) y se incubó en agitación toda la noche. Se añadió cloroformo y agua ultrapura (1:1) y la suspensión se homogenizó en un agitador tipo vórtex durante 20 segundos. Las muestras se centrifugaron a 4500rpm durante 10 minutos para la separación de las fases. Los solutos se extrajeron de la fase superior metanol-agua y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis por HPLC. El análisis por HPLC (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) se realizó en un sistema isocrático con una columna Bio-Rad AMINEX HPX-87H (300 x 7.6 mm) a una temperatura de 50°C. Se utilizó como fase móvil ácido sulfúrico (5 mM). Se inyectaron 10 estándares de solutos compatibles (galactitol, malititol, ribitol, sorbitol, xilitol, trehalosa, manitol, arabitol, eritritol y glicerol).

Las curvas de calibración fueron obtenidas usando 5 mg/ml y se utilizaron 10 mg/ml de los estándares analíticos de cada osmolito analizado (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). La detección de la señal se realizó mediante un polarímetro, el cual es un sistema de detección apropiado para azúcares y polioles. Los cromatogramas se procesaron utilizando la versión 2.51 del software ChromQuest (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El análisis cromatográfico se realizó en el Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos (México).

Cálculos estadísticos

El análisis estadístico se determinó por *Multiple T-test* y para determinar las diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas se utilizó el método *Correct for Multiple comparisons using the Holm-Sidak method* con una significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$). Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando la versión Prism8 (<https://www.graphpad.com>) de GraphPad.

2.5 Extracción de total ARN

Obtención de las muestras para la extracción

Se utilizó el mismo método de obtención de micelio para la extracción de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 para las dos condiciones evaluadas. Las muestras de micelios para cada condición se obtuvieron a partir de su crecimiento en 200 mL de medio de cultivo YMB, agitado en zaranda a 150 rpm, a una temperatura de 28 °C, durante siete días. Posteriormente, se filtraron al vacío y se extrajeron los micelios. Para lavar estos micelios se dejaron toda la noche en solución salina (Tabla II). Las muestras se inocularon a partir de 0.2 g de micelio en 50 mL de medio de cultivo YMB, variando el tipo de sal empleada en cada caso (2 M de NaCl y 2 M de MgCl₂) por tres días en agitación a 150 rpm, a 28 °C. Las soluciones se centrifugaron durante 10 minutos, a 4000 rpm, a 4 °C. Los micelios se colocaron en nitrógeno líquido. Se utilizaron dos controles negativos sin inocular a 50 ml de medio YMB a 2 M de NaCl y 2 M de MgCl₂ respectivamente y un control positivo a 0 M inoculado con 0.2 g de micelio.

Protocolo de extracción

La extracción de ARN total se realizó por triplicado para cada condición respectivamente (condición de referencia: 2 M de NaCl y condición de estrés: 2 M de MgCl₂). La extracción de ARN se realizó a partir del método de extracción de ARN por fenol ácido (49). Primeramente, se colectó el micelio para cada condición y a cada muestra se les añadió 1 mL de Trizol, se homogenizó en un agitador tipo vórtex y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se maceró el micelio congelado y se vertió en viales de 1.5 µL. Se añadieron 600 µL de solución A previamente preparada (ver tabla V) y se homogenizó en un agitador tipo vórtex. La mezcla se adicionó a un tubo que contenía 600 µL de fenol ácido precalentado a 62 °C y se homogenizó en un agitador tipo vórtex a máxima velocidad durante 15 segundos. Se incubó la mezcla a 62 °C durante cinco minutos, agitando manualmente por 10 segundos cada 50 segundos y posteriormente se centrifugó a 12 250 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un vial nuevo de 1.5 µL que contenía 1 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se homogenizó en un agitador tipo vórtex a máxima velocidad por 10 segundos. Se centrifugó a 13 250 rpm durante cinco minutos y se decantó (se retiró el exceso de etanol con un papel absorbente limpio). Al precipitado se le añadió 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se homogenizó en un agitador tipo vórtex hasta despegar la pastilla del vial. Se centrifugó a 12 250 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente y se decantó cuidadosamente. El botón formado, se resuspendió en 400 µL de solución A y se homogenizó en un agitador tipo vórtex durante 10 segundos. Luego, se le añadió 1 mL de etanol absoluto y se homogenizó en un agitador de tipo vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos. Se centrifugó a 13 250 rpm durante cinco minutos y se decantó (se retiró el exceso de etanol con un papel absorbente limpio). Al precipitado se le añadió 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente y se homogenizó en un agitador tipo vórtex (hasta despegar la pastilla del vial). Se centrifugó a 12 250 rpm durante tres minutos a temperatura ambiente y se decantó cuidadosamente. Se dejó abierto el vial de 1.5 µL dentro de la campana de flujo laminar durante 40 minutos y posteriormente se resuspendió el pellet en 20 µL de agua libre de nucleasas.

Tabla V. Preparación de la solución A

Sustancias	Cantidades
H ₂ O DPEC	36.9 ml
SDS al 1 %	2 ml
Acetato de Sodio 3 M pH 4.8	267 µL
EDTA 0.5 M pH 8	0.8 ml
Volumen final	40 ml

Cuantificación del ARN

El ARN se cuantificó. Para ello 2 µL de muestra por duplicado se colocaron en un Nanodrop. Tres muestras y un control (agua en la que se resuspendió el ARN), este procedimiento brinda en la unidad de medida de nanogramos/microlitro (ng/µL). Por lo que se aplica la siguiente fórmula que nos da la concentración real de la concentración en cada µL:

$$[\text{RNA}] (\text{ng}/\mu\text{L}) = \frac{[\text{RNA}] \text{ equipo } (\text{ng}/\mu\text{L}) * 30 \mu\text{L} (\text{vol. de resuspensión del RNA})}{1000}$$

$$[\text{RNA}] (\text{ng}/\mu\text{L}) = \text{__x__ } \mu\text{g} / \mu\text{L}$$

Corrida en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis de ARN en gel de agarosa al 1%. Con el objetivo de visualizar la resolución de las bandas indicadas a partir de los fragmentos ribosomales 28 S, 18 S y 5 S. El volumen para aplicar en la electroforesis será equivalente a 1.5 µg/µL de ARN (concentración de ARN que deseo ver en la electroforesis).

$$\begin{aligned} \text{Volumen a aplicar en} &= \frac{1500 \text{ ng}}{[\text{RNA}] \text{ que me da el equipo (ng/ } \mu\text{L)}} \\ \text{la electroforesis} & \\ \\ \text{Volumen a aplicar en} &= _x_ \mu\text{L} \\ \text{la electroforesis} & \end{aligned}$$

Para la preparación de muestras de ARN para correr la electroforesis se añadió un Buffer 2X *RNA loading dye*, de igual cantidad que la muestra a usar (calculada en el Nanodrop). La mezcla de ARN más Buffer se calentó cinco minutos a 70 °C y se aplicó en el gel. La corrida se realizó en las condiciones de 90 V por 40 minutos. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta ser enviadas para ser secuenciadas.

Preparación de las muestras para ser enviadas a secuenciar

La mejor condición para el almacenamiento del ARN es mediante una precipitación con etanol (estable durante un año a -20 °C). Para todas las soluciones se utilizó agua tratada con pirocarbonato dietil (DEPC). Se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (NaOAc, pH 5,5) a la solución de ARN y se mezcló suavemente. Se agregaron dos volúmenes de etanol al 100% a la solución de ARN y se mezcló suavemente. Se agregaron 10 µL de acetato de sodio 3 M (NaOAc, pH 5.5) y 220 µL de etanol al 100% a la solución de ARN y se mezcló muy bien. Las muestras se enviaron con paquetes de hielo azul. Las muestras de ARN se enviaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5~2.0 mL claramente etiquetado y sellado con Parafilm. Se incluyó una breve descripción del

protocolo de extracción y/o enriquecimiento de ARN utilizado en los campos de comentarios de la hoja de pedido.

2.6 Análisis del transcriptoma de *Aspergillus sydowii*

Secuenciación de los transcriptos

La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina HiSeq2500 de extremos pareados con lecturas de 75pb y profundidad de secuenciación de entre 30 y 50 millones de lecturas por librería [23], [24]. Este diseño permitió estudiar los cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas [25].

Análisis de la calidad de las lecturas

Los datos crudos recibidos de la secuenciación se transformaron en lecturas crudas en formato fastq. Para el procesamiento de los mismos se analizó la calidad de las lecturas mediante el uso del software FastQC (50). Este tiene como objetivo proporcionar un informe del control de la calidad ya que puede detectar problemas que se originan en el secuenciador o en el material de la biblioteca de inicio (51).

Depuración de las lecturas

En la mayoría de las plataformas de secuenciación, la calidad de las lecturas se degrada a medida que avanza la ejecución del programa por lo que resulta necesario realizar una depuración de estas. Dados los parámetros de calidad obtenidos fue necesario realizar un preprocesamiento de las lecturas utilizando diferentes herramientas en línea de comandos. Para ello, se utilizó rCorrector, para la eliminación de k-meros erróneos en las lecturas (52). Posteriormente, las lecturas crudas de cada condición se normalizaron antes de realizar la construcción del ensamblaje utilizando la herramienta bbnorm de BBSMap v. 38.08 (53), con un promedio de profundidad de 100x para reducir la posibilidad de errores cadena abajo. Luego, se utilizó la herramienta Trimmomatic para recortar datos en formato fastq provenientes de Illumina y eliminar adaptadores (54). Luego se utilizó el RemoveFastqcOverrepSequenceReads.py para remover las secuencias sobrerrepresentadas (52).

Ensamblado *de novo* y anotación funcional

El procesamiento de los datos de secuenciación se realizó utilizando un ensamblaje *de novo* utilizando el programa Trinity (55). La anotación de las secuencias ensambladas se realizó mediante BLAST (Expectation value: $1e^{-3}$, Open Gap Penalty: 9, Gap Extension Penalty: 2) en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot; utilizando el software Omicsbox. Para la cuantificación de la abundancia de los transcritos se utilizó el programa Kallisto (56). Los niveles de expresión se reportaron en transcritos por millón (TPM) (57).

Análisis de expresión diferencial por pares (Función PRO)

Los análisis de expresión diferencial (ED) se realizaron mediante la plataforma Omicsbox diseñada para realizar análisis de conteos de datos derivados de la tecnología RNAseq. Esta aplicación se basa en el programa edgeR (análisis empírico de DGE en R) el cual permite la identificación de características genómicas expresadas de forma diferencial (por ejemplo: genes) en una comparación por pares de dos condiciones experimentales diferentes. El paquete de software edgeR que pertenece al proyecto Bioconductor (un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos en R (58)), implementa métodos de estadísticas cuantitativas para evaluar el valor de significancia individual de genes entre dos condiciones experimentales. Para realizar el análisis de expresión diferencial se eliminaron los transcritos con bajos niveles de expresión en todas las condiciones, es decir, aquellos que tenían menos de dos conteos por millón de lecturas ($cpm < 2$). Se consideraron como ED aquellos transcritos con $\log FC > 2$ y $FDR < 0.1$. Al ejecutar el análisis de ED se especificaron una serie de parámetros que están divididos en tres secciones diferentes: Preprocesamiento de los datos, Diseño experimental y comparación y pruebas. Dentro de la página para realizar el preprocesamiento de los datos se realizó un filtrado de genes con bajo número de conteos. Mediante *CPM Filter* se estableció un filtro para excluir genes con conteos bajos en las librerías ya que esos genes pueden interferir con las aproximaciones estadísticas posteriores. El filtrado se realizó sobre una base de conteos por millón (CPM), para tener en cuenta las diferencias en el tamaño de la librería entre las muestras. Además, dentro de esta sección de

preprocesamiento se calcularon factores de normalización para ajustar los datos crudos donde toma la forma de los factores de ajuste para los tamaños de las librerías que entrarán en los modelos estadísticos. Estos factores de correlación son utilizados para calcular el tamaño efectivo de las librerías y el método estadístico de normalización utilizado fue TMM, el cual es una medida ajustada de los valores de M . En este método los valores se obtienen del método delta de Datos Binomiales (este método es recomendado). Luego se realizó la segunda sección de Diseño experimental donde se diseñó el archivo experimental para lo cual se seleccionó el archivo de extensión .txt que contiene los factores experimentales con las condiciones asociadas a cada muestra en formato delimitado por tabulaciones (las filas correspondieron a las muestras y las columnas a los factores experimentales, asegurándonos de que la primera columna de la tabla designada tuviera exactamente el mismo nombre que aparece en la tabla de conteos). Se utilizó un diseño simple que realiza una comparación pareada entre muestras que pertenecen a dos condiciones experimentales. La prueba estadística empleada fue GLM (*Quasi Likelihood F-Test*) que es una alternativa del Ratio Test y provee mayor robustez y control fiable de la tasa de error cuando el número de réplicas es bajo. El flujo de trabajo a seguir para realizar un análisis de expresión diferencial se describe en la Figura 5.

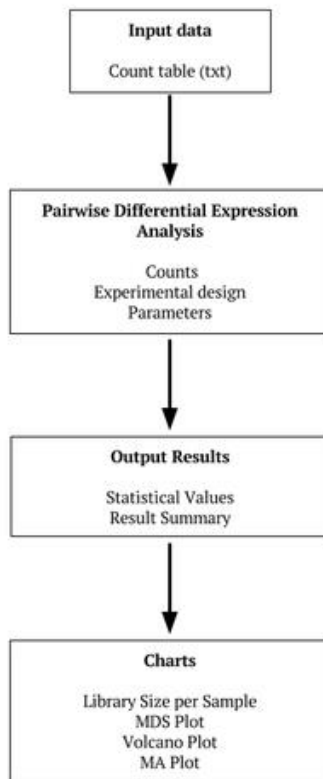


Figura 5. Flujo de trabajo a seguir para realizar un análisis de expresión diferencial en el software Omicsbox.

Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas

La anotación de términos de GO se realizó mediante el programa Omicsbox. Para la determinación del enriquecimiento se utilizó el método computacional Análisis de Enriquecimiento *Gene Set* (GSEA) (59), incluido en el programa Blast2GO. Por medio de este método se obtuvieron los gráficos correspondientes a rutas o vías metabólicas en base a los términos correspondientes a las ontologías: Proceso biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC). En cada caso se graficaron los términos más significativos de acuerdo con el método GSEA y se realizó el análisis de los niveles de expresión de los transcritos anotados con esos términos.

3. Resultados y discusión

3.1 Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *A. sydowii* en presencia de NaCl y MgCl₂

La gráfica de la curva de crecimiento de *A. sydowii* representada en la figura 4 mostró un carácter exponencial entre los días dos y cuatro de cultivo, lo cual se comprobó mediante un ajuste a una curva exponencial en los intervalos de tiempo mostrados en la tabla VI, siendo la región comprendida entre los días dos y cuatro de cultivo la que mejor se ajusta a este tipo de comportamiento, por lo que de acuerdo a estos resultados se seleccionó para la extracción del ARN el día tres, correspondiente a la mitad de la fase exponencial. A nivel molecular esto se traduce en que en el punto máximo de la fase exponencial se ha traducido el mayor número de enzimas y se han producido los metabolitos secundarios relacionados con la respuesta al estrés osmótico, por lo que, si se pretende realizar un análisis transcriptómico de *A. sydowii* en estas condiciones, es acertado seleccionar, para la extracción del ARN, un tiempo que se encuentre a la mitad de la fase exponencial, dado que, a diferencia de lo que ocurre en organismos procariontes, donde la transcripción y la traducción son dos procesos acoplados, de manera que a medida que se forman las cadenas de ARNm y se separan del molde, los ribosomas proceden a su traducción, en organismos eucariotes son dos procesos independientes separados en el tiempo y el espacio, ya que la transcripción ocurre en el núcleo mientras que la traducción ocurre en el citoplasma de la célula (36). La curva correspondiente al peso húmedo no se tomó en cuenta porque no fue constante en el tiempo debido a la presencia de agua en cantidades variables en el micelio. Figura 6, tabla VI. (41). No se presentan los resultados de la curva de crecimiento en presencia de 2 M de MgCl₂ debido a que el hongo no crece en esta condición (2) por lo que se utilizó la condición crecida en 2 M de NaCl como referencia para determinar el tiempo de extracción del ARN.

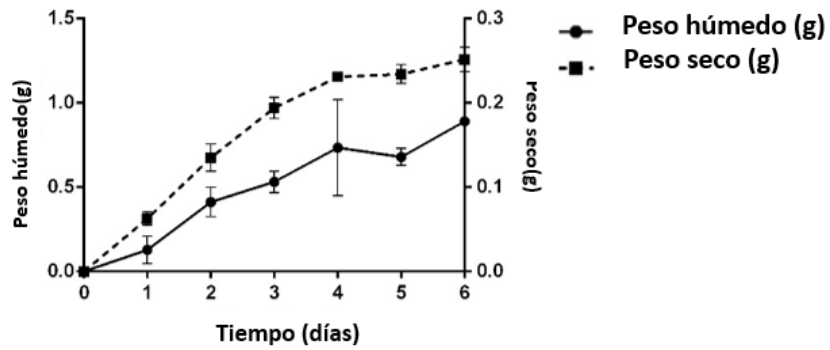


Figura 6. Curvas de crecimiento de *A. sydowii*, peso húmedo y peso seco. Intervalo de la fase exponencial entre los días 2-4. El tiempo de tres días corresponde a la mitad de la fase de crecimiento exponencial.

Tabla VI. Intervalos en días de los valores de peso seco de los cultivos de condición óptima de 2 M de NaCl en medio líquido. Donde se determinó para cada intervalo la ecuación de la recta exponencial y su valor de R^2 , para determinar el intervalo que mejor se ajusta a la fase de crecimiento exponencial. A mayor valor de R^2 mayor probabilidad de aceptar una hipótesis como correcta.

Tiempo de intervalo (días)	R^2
1-3	0.9594
1-4	0.9101
1-5	0.8262
1-6	0.7773
2-4	0.9597
2-5	0.8449
2-6	0.8166
3-5	0.8062
3-6	0.864
3-7	0.8696

3.2 Presencia de estrés oxidativo en *A. sydowii* crecido en las sales NaCl y MgCl₂

El estrés causado por altas concentraciones de sales provoca daños oxidativos en organismos tanto procariontes como eucariontes (23). Existen escasos estudios enfocados en el análisis del estrés oxidativo en hongos halófilos en respuesta a la presencia de sales cosmotrópicas y caotrópicas. Algunas especies de hongos pueden tolerar concentraciones extremas de sales, incluso ciertas sales como el MgCl₂. La relación entre la capacidad antioxidante de los hongos y su halotolerancia fue descrita recientemente a nivel genómico en el halófilo *W. ichthyophaga*, en la levadura negra halotolerante *H. werneckii* y en *Aspergillus pullulans* (23). Con el objetivo de conocer la respuesta de defensa celular antioxidante en *A. sydowii* ante su exposición a concentraciones estresantes provocadas por la sal cosmotrópica NaCl y la sal caotrópica MgCl₂ fue determinada la respuesta a ocho biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos en el micelio y el sobrenadante. El aumento de la actividad de estos biomarcadores es un indicativo de la presencia de estrés oxidativo. Los biomarcadores que no fueron detectados con una actividad significativa sugieren que no están involucrados en la respuesta al estrés oxidativo en *A. sydowii* en las condiciones experimentales evaluadas.

En el micelio de *A. sydowii* crecido en presencia de NaCl y MgCl₂ fue detectado un incremento de la actividad de las enzimas catalasa y GPX. Se encontraron diferencias estadísticas para ambas enzimas entre las condiciones de estudio. Los mayores niveles de actividad de catalasa y GPX se encontraron en presencia de MgCl₂ con respecto a la presencia de NaCl. Este resultado es suficiente para sugerir que en *A. sydowii* crecido en un medio con 2 M de MgCl₂ existe un estrés oxidativo y que las enzimas catalasa y GPX están involucradas en la respuesta del mantenimiento de la homeostasis redox a nivel celular (24) (Figura 7). Tiene sentido encontrar su actividad en el micelio ya que estas enzimas se encuentran localizadas en organelos internos. La catalasa es una enzima localizada en los peroxisomas. En presencia de esta enzima ocurre la conversión de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua (H₂O) y oxígeno (O₂), donde la reacción catalítica utiliza dos moléculas de H₂O₂ sin el uso de otro tipo de sustrato (60), (61). El H₂O₂ es producido por la reducción divalente del O₂ molecular o por dismutación del anión súper óxido, el cual no es un radical libre, porque sus orbitales contienen dos electrones con spines antiparalelos. El H₂O₂ es el más estable y el menos reactivo entre los productos de

reducción del O_2 molecular. Este se puede generar por la actividad de diferentes oxidasas y algunas enzimas mitocondriales. En condiciones biológicas el H_2O_2 es un oxidante débil, sin embargo, su reacción con el hierro (Fe^{2+}) o con el anión superóxido genera un radical más reactivo, el radical hidroxilo. También, el H_2O_2 puede reaccionar con cloruro (Cl^-) en presencia de la actividad de enzimas mieloperoxidasas generando ácido hipocloroso (HClO), el cual puede formar puentes de hidrógeno estables y complejos con los pares de bases del ácido nucleico, ocasionando una alta reactividad sobre la molécula de ADN (25). Otra enzima antioxidante que tiene un papel importante en la protección frente al estrés oxidativo es la glutatión peroxidasa. Es representante de una familia de enzimas con actividad peroxidasa. El ensayo de actividad celular de la glutatión peroxidasa se basa en la oxidación de glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Esta reacción es catalizada por la glutatión peroxidasa acoplada al reciclaje de GSSG de vuelta a GSH, utilizando glutatión reductasa y NADPH. La disminución de la absorbancia de NADPH durante la oxidación de NADP es indicativa de la actividad de la glutatión peroxidasa ya que esta enzima es el factor limitante de la velocidad de estas reacciones acopladas (61), (25).

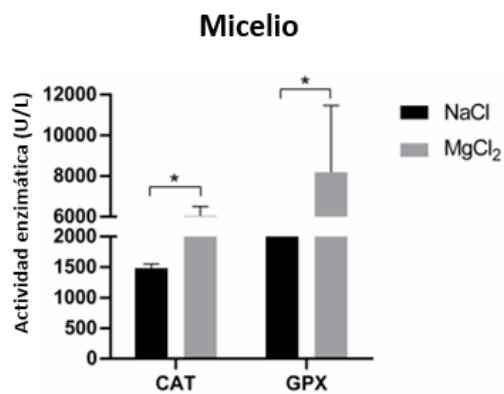


Figura 7. Actividad enzimática de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en U/L, en micelio de *A. sydowii* en las condiciones de presencia de NaCl y MgCl₂, ambos a 2 M. Se muestran diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas para cada soluto determinado, con una significancia de ($\alpha=0.05$).

En muestras de sobrenadante de *A. sydowii* crecido en presencia de NaCl y MgCl₂ fue detectado un incremento de la actividad de los biomarcadores pro-oxidantes malonildialdehído y 4-hidroxiálquenos. No fueron encontradas diferencias estadísticas significativas entre las condiciones evaluadas en el experimento (Figura 8). Este resultado sugiere que en *A. sydowii* el crecimiento en presencia de 2 M NaCl y el crecimiento en presencia de 2 M MgCl₂ causa estrés oxidativo provocando lipoperoxidación en igual extensión en presencia de ambas sales. En condiciones ácidas específicas, tanto el malonildialdehído como el 4-hidroxiálquenos reaccionan con N-metil-2-fenilindole y son indicativos de daño oxidativo a lípidos y proteínas, respectivamente (47). Estos bioproductos de la peroxidación lipídica son llamados biomarcadores porque miden el nivel de oxidación de biomoléculas. El malonildialdehído mide la presencia de grupos aldehídos en lípidos oxidados. Mientras que el 4-hidroxiálquenos, mide la presencia de grupos alquenos en los lípidos oxidados. Estos son liposolubles por lo que pueden atravesar la membrana lipídica (47) (2) (62).

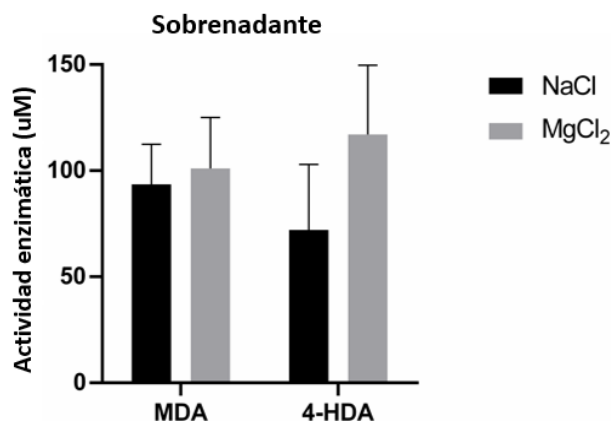


Figura 8. Actividad de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiálquenos (4-HDA), en U/L, en sobrenadante de *A. sydowii* en las condiciones de presencia de NaCl y MgCl₂, ambos a 2 M. No se encontraron diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas para cada soluto determinado, con una significancia de ($\alpha=0.05$).

Sería interesante detectar la actividad otros tipos de biomarcadores enzimáticos de estrés oxidativo como peroxiredoxinas, glutatión transferasas, glioxilasas I y glioxilasas II. Ya que genes que codifican para estas y otras enzimas como catalasas, glutatión peroxidadasas y

superóxido dimutasas (evaluadas en este estudio) se identificaron como involucradas en la respuesta al estrés oxidativo en especies de hongos halófilos y halotolerantes y fueron comparadas con genes de 16 hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos) con el fin de encontrar una relación entre el estrés oxidativo y el estrés osmótico. Este estudio indica que la máxima tolerancia a la salinidad se correlaciona con el número de genes que codifican para las tres enzimas principales relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo que son la superóxido dimutasa, la catalasa y la peroxiredoxina (23).

3.3 Análisis de solutos compatibles

Una de las estrategias más ampliamente utilizadas por los hongos para contender contra las concentraciones altas de sales en el medio es la biosíntesis y acumulación de solutos compatibles. El uso de solutos compatibles bajo un estrés osmótico favorece el balance de la presión osmótica celular y no se requiere de ninguna adaptación específica en los sistemas intracelulares (63). Los polioles son compuestos osmóticamente activos que tienen un papel importante en el balance del potencial redox ya que en la síntesis y el catabolismo de los mismos están involucrados generalmente cofactores enzimáticos (NADH y NADPH) (17). Por esta razón, se analizaron extractos de células de *A. sydowii* crecido en las condiciones de NaCl y MgCl₂ ambos a concentraciones de 2 M con el objetivo de entender la respuesta diferencial en la estrategia de utilización de solutos compatibles entre estas condiciones. Los extractos de células fueron procesados por HPLC (Figura 9).

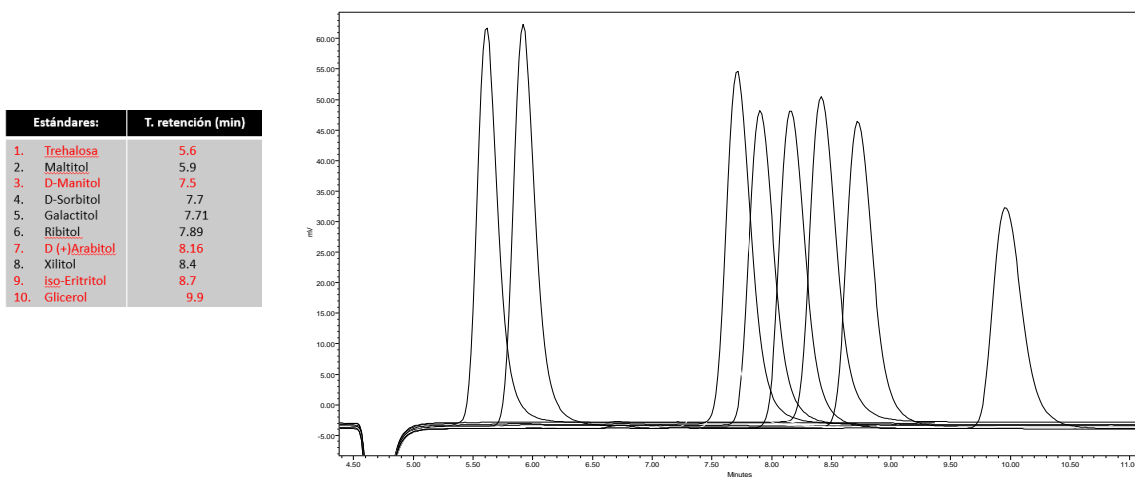


Figura 9. Cromatograma medido por HPLC de las curvas de calibración de los estándares de polioles que serán medidos posteriormente en las condiciones de nuestro experimento (*A. sydowii* crecido en presencia de $MgCl_2$ y $NaCl$, ambos a concentración de 2 M). En el eje de las x se muestra el tiempo de retención de los polioles en minutos y en el eje de las y en mV una señal correspondiente a la respuesta creada por los analitos que salen del sistema (esta señal es proporcional a la concentración del analito específico separado). En la leyenda de los estándares de polioles (los polioles escritos de color rojo fueron encontrados en las condiciones experimentales evaluadas).

Los solutos compatibles detectados a partir de los estándares de polioles inyectados fueron la trehalosa, el manitol, el arabitól, el eritritol y el glicerol. Las cantidades de estos polioles varían con la salinidad del medio (YMB, Tabla I y II) y con la fase de crecimiento del hongo en el cultivo. Los tiempos seleccionados para realizar las mediciones se basan en la curva de crecimiento descrita previamente. Donde a las 18 horas se corresponde con la fase de adaptación, el tiempo de 72 horas se corresponde con la mitad de la fase de crecimiento exponencial y el tiempo de 168 horas se corresponde con el inicio de la fase estacionaria. No fueron detectados en las condiciones evaluadas en este estudio los solutos galactitol, maltitol, ribitol, sorbitol y xilitol. Mientras que los solutos compatibles detectados para ambas condiciones fueron la trehalosa, el manitol, el arabitól, el eritritol y el glicerol (Figura 10).

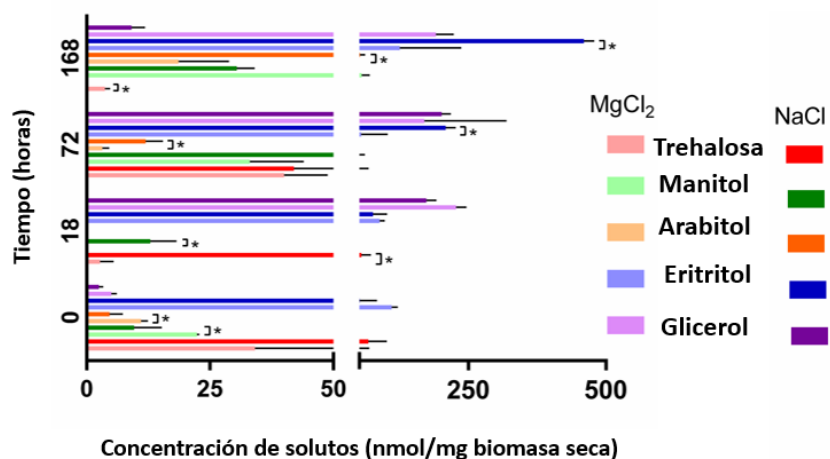


Figura 10. Cantidades intracelulares en nmol/mg de trehalosa, manitol, arabitol, eritritol y glicerol, en células de *A. sydowii* en presencia de 2 M de NaCl y 2 M de MgCl₂. Se muestran diferencias estadísticas entre las condiciones evaluadas para cada soluto determinado, con una significancia de ($\alpha=0.05$). Biomasa seca.

Los principales polioles descritos en la literatura son el manitol, el glicerol, el eritritol y el arabitol, mientras que otros polioles como el xilitol, el ribitol, el D-theitol y dulcitol se producen en condiciones ambientales específicas (17). En el caso de la trehalosa fueron encontradas diferencias estadísticas significativas entre las condiciones evaluadas en los tiempos de 18 y 168 horas, correspondientes a las fases de adaptación y estacionaria, respectivamente. En el caso del manitol se encontraron diferencias estadísticas significativas en las 0 y 18 horas. En el arabitol se encontraron diferencias estadísticas significativas en las 0, 72 y 168 horas. Para el eritritol se encontraron diferencias estadísticas significativas a las 72 y 168 horas. Mientras que para el glicerol no fueron encontradas diferencias estadísticas significativas en ninguno de los tiempos evaluados por lo que se puede sugerir que este soluto juega un papel importante en la respuesta al estrés osmótico en *A. sydowii* en igual extensión para ambas condiciones evaluadas.

En *A. sydowii*, para la condición de estudio crecida en presencia de la sal caotrópica MgCl₂, el soluto principal encontrado fue el glicerol. Este es también el principal soluto compatible en levaduras, incluida *S. cerevisiae* (64), así como en *H. verneckii* y *W. ichthyophaga* (1), (65), (6), (66), (11). El glicerol puede ser utilizado en la célula como una fuente de carbono y sus niveles citosólicos de síntesis y degradación son un factor

importante para el mantenimiento del balance redox en la célula. Además de estas funciones mencionadas el glicerol es utilizado para la síntesis de glicerofosfolípidos y triacilglicéridos sumado al hecho de que es utilizado para combatir el estrés oxidativo y térmico. Bajo un estrés osmótico, el glicerol es masivamente sintetizado *de novo* a partir de la dihidroxiacetona-fosfato, por la vía del glicerol-3 fosfato de forma dependiente a la vía de HOG, descrita previamente (64). Además, tiene un papel en el mantenimiento de los niveles de ADN mitocondrial y en la activación de la transcripción (67). La biosíntesis del glicerol representa la opción energéticamente menos costosa para la célula. A partir de los resultados obtenidos se puede sugerir que *A. sydowii* en presencia de 2 M de $MgCl_2$ se está enfrentando a un estrés osmótico que provoca un estrés oxidativo por lo que su energía debe estar focalizada hacia su supervivencia. Como se puede observar en la figura 2, para la síntesis de glicerol se requiere de la conversión de NADPH a NADH (17), con lo que influye positivamente ante el daño metabólico causado por el estrés oxidativo, ya que a mayor cantidad de NADPH disponible, se genera mayor cantidad de radical anión súper óxido ya que la enzima NADPH oxidasa convierte el O_2 en radical anión superóxido, a partir de la oxidación de la coenzima NADPH a NADP (25).

En *A. sydowii*, para la condición de estudio crecida en presencia de la sal cosmotrópica NaCl, el soluto principal encontrado es el eritritol. Con relación a esto, se ha planteado en *A. niger* que el eritritol está involucrado en la osmorregulación y mantiene el equilibrio redox a nivel celular (17). En muchas especies de hongos, como por ejemplo en *A. nidulans*, el glicerol y el eritritol mejoran la germinación de los conidios, bajo condiciones de estrés osmótico inducido por la presencia de NaCl (34). Un estudio en *A. niger* plantea que la síntesis de polioles ocurre como respuesta a diferentes factores como la disponibilidad de oxígeno y que la acumulación de eritritol se debe al exceso de actividad en la vía de las pentosas fosfato comparado con la demanda celular de las vías intermedias. Existe una elevada actividad de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato durante la fase estacionaria. También, el arabitol y el eritritol se incrementan en presencia de limitaciones de oxígeno, cuando la producción de biomasa es baja y la producción de CO_2 es elevada. Consecuentemente, existe una elevada probabilidad de que la producción de estos polioles haya ocurrido producto de una desviación del flujo de carbono de la vía de las pentosas fosfato combinado con una decreciente necesidad de biosíntesis de intermediarios (17). En nuestro estudio en *A. sydowii* a pesar de que es el eritritol el soluto principal para la condición de 2 M de NaCl, hay que resaltar que la

estrategia de la utilización de solutos compatibles está dada por una mezcla de varios polioles.

En algunas especies del género *Aspergillus*, el manitol fue encontrado en altas concentraciones en los conidios en etapas tempranas del proceso de germinación. Por lo que se consideraba que era la principal fuente de carbono en los conidios de especies del género *Aspergillus*. Sin embargo, estudios han demostrado que la principal función del manitol en los conidios es la protección de las esporas frente a diferentes tipos de estrés como altas temperaturas, estrés oxidativo, congelación y liofilización (17).

En el caso de la especie *A. nidulans*, se ha observado que la trehalosa se acumula como respuesta al estrés oxidativo y por calor, así como durante la conidiación, aunque no durante un choque hiperosmótico. Este mecanismo, de ser confirmado mediante la cuantificación de trehalosa en diferentes condiciones, pudiera constituir una estrategia novedosa de respuesta a estrés hiposmótico en halófilos (1), (65), (6), (66), (11). La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas con un enlace α -1,1. Este soluto está ampliamente distribuido en las levaduras, acumulándose de forma principal cuando las condiciones favorecen la disminución del crecimiento, específicamente durante periodos de inanición y diferenciación. No obstante, durante la fase estacionaria en *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado concentraciones elevadas de trehalosa, cuando se está en un medio con baja a_w , lo cual indica que la trehalosa tiene una pequeña función en la osmorregulación durante las etapas del crecimiento de microorganismos (63).

El arabitol es un alcohol polihídrico esteroisómero del xilitol (68). El arabitol puede funcionar como un soluto compatible, sin embargo, durante un choque hiposmótico funciona como un soluto compatible de segundo rango, ya que presenta valores muy bajos. Además se agota cuando las fuentes de energía son escasas por lo que en el caso de la levadura *Saccharomyces rouxii* se ve obligada a metabolizar el glicerol (67).

En *A. sydowii* una mezcla de solutos compatibles como manitol, eritritol, trehalosa, arabitol y el glicerol (solute principal) se utilizan como respuesta de defensa frente al estrés osmótico inducido por altas concentraciones de las sales $MgCl_2$ y $NaCl$. Este resultado es consistente con la hipótesis de que los solutos compatibles son agentes protectores frente a diferentes formas de estrés osmótico. Lo cual sugiere que para contender frente a un estrés hídrico inducido por sales cosmotrópicas o sales caotrópicas se emplea la

estrategia de los solutos compatibles en igual extensión. Este resultado concuerda con lo planteado por (34), donde analizan en *A. nidulans* la estrategia de solutos compatibles en presencia de estrés hídrico inducido por un compuesto caotrópico como el etanol y plantean que no existen diferencias en la producción de solutos compatibles en presencia de un compuesto caotrópico con respecto a una sal caotrópica.

3.4 Análisis transcriptómico de *A. sydowii* en presencia de las sales NaCl y MgCl₂

Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN del cultivo de *Aspergillus sydowii* EXF-12860, crecido en condiciones de estrés osmótico inducido por la presencia de las sales NaCl y MgCl₂ y se obtuvieron rendimientos entre 1 y 2 µg/µl de ARN. Se pudo determinar el RIN (del inglés: *RNA Integrity Number*) en las muestras analizadas mediante electroforesis capilar, además en los electroferogramas se puede observar que las señales correspondientes a los fragmentos 28 S y 18 S son intensas como se observa en la figura 11, lo cual indica la integridad y pureza de la muestra. Se obtuvieron muestras de las siguientes condiciones por triplicado: en presencia de 2 M de la sal NaCl como condición de referencia de estrés provocado por una sal cosmotrópica y 2 M de la sal MgCl₂ como condición de estrés provocado por una sal caotrópica.

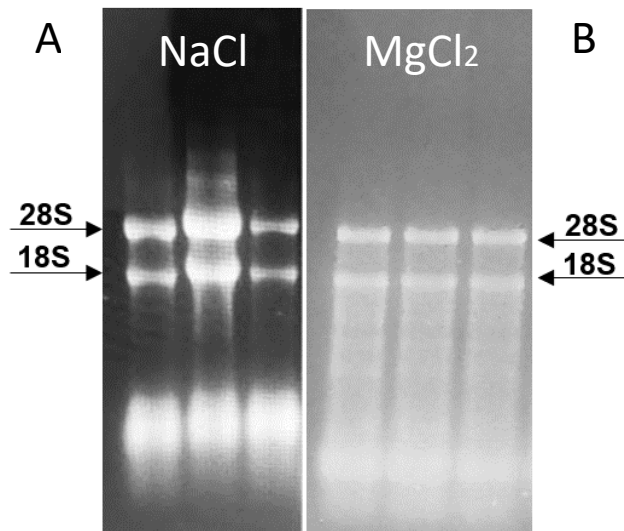


Figura 11. Extracción de ARN total del micelio de *Aspergillus sydowii* EXF-12860 crecido en presencia de 2 M de la sal cosmotrópica NaCl y en presencia de 2 M de la sal caotrópica MgCl₂ como condición de estrés. a. Evaluación de la calidad del ARN mediante electroforesis en agarosa (1%). A. *A. sydowii* EXF-12860 2 M de NaCl (aw ~ 0.96) como condición de referencia; B. *A. sydowii* EXF-12860 2 M de MgCl₂ (aw ~ 0.95) como condición de estrés.

Control de calidad de la secuenciación RNAseq

A partir de los secuenciadores modernos que presentan un alto rendimiento se pueden generar millones de secuencias. Sin embargo, antes de realizar el análisis de estas para arribar a conclusiones biológicas, es necesario verificar la calidad de las lecturas. En este sentido, el análisis mediante el programa FastQC tiene como objetivo proporcionar un informe de control de la calidad que pueda detectar problemas que se originan en el secuenciador o en el material de la biblioteca de inicio (51). Los datos crudos recibidos de la secuenciación por Illumina HiSeq2500 se encuentran en formato fastq. La profundidad de la secuenciación fue de aproximadamente 40 millones de lecturas por muestra. Se obtuvieron fragmentos de 150 pares de bases, secuenciados por ambos extremos figuras 12 y 13. En total se procesaron aproximadamente de 38 972 890 secuencias, estas lecturas crudas presentaron un porcentaje GC entre 54 y 55%. El análisis revela una calidad media de la secuenciación entre 28 y 34 (escala Phred33: calidades de 0 a 41), los cuales son considerados valores de buena calidad.

✔ Per base sequence quality

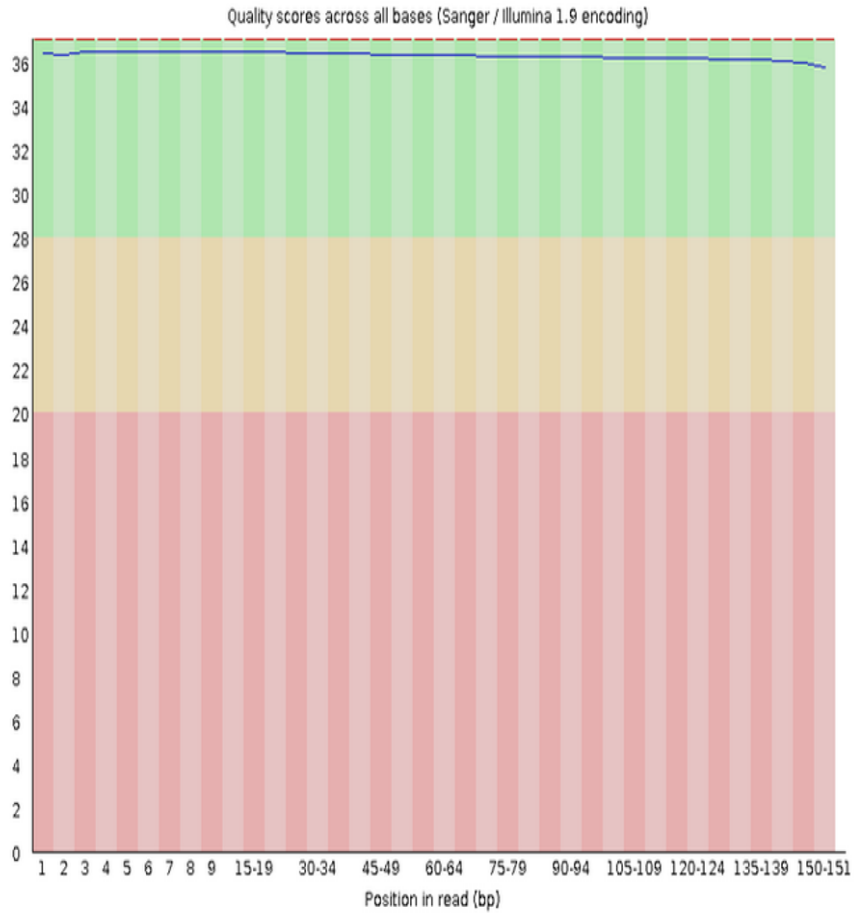


Figura 12. Evaluación de la calidad de la secuenciación de las lecturas crudas en formato fastq de las muestras en presencia de la condición de referencia de 2 M de la sal cosmotrópica NaCl (Gráficas representativa de las 6 librerías secuenciadas) (FastQC Software). Calidad promedio de secuenciación por posición de las lecturas.

Per base sequence quality

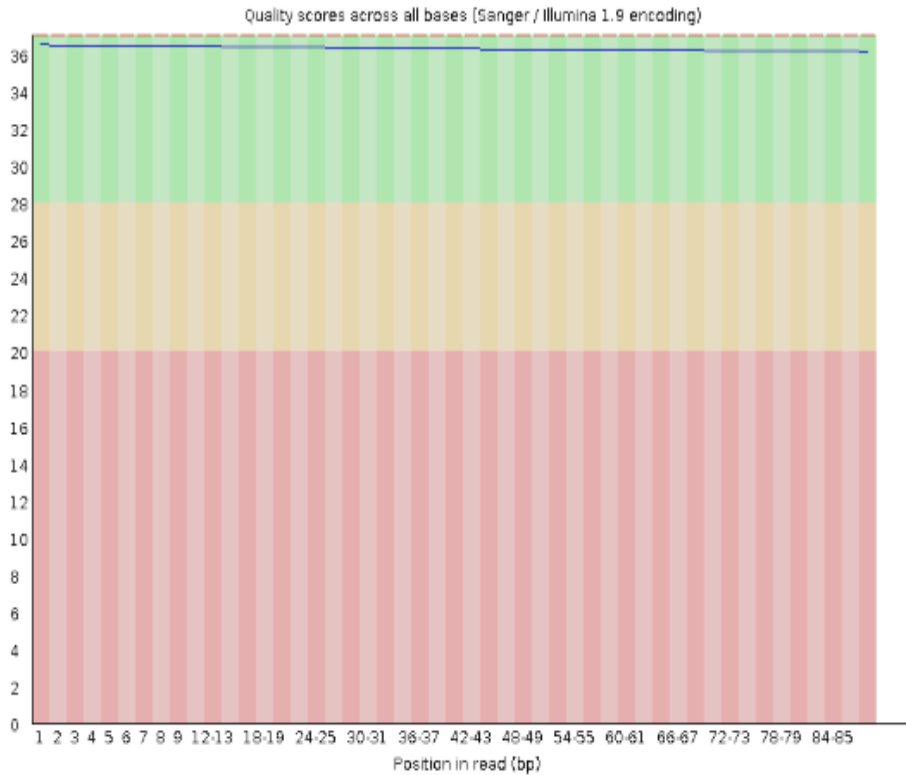


Figura 13. Evaluación de la calidad de la secuenciación de las lecturas crudas en formato fastq de las muestras en presencia de la condición de estrés de 2 M de la sal caotrópica de $MgCl_2$ (Gráficas representativa de las 6 librerías secuenciadas) (FastQC Software). Calidad promedio de secuenciación por posición de las lecturas.

Otros parámetros de calidad revelados por la herramienta FastQC, presentaron porcentajes de baja calidad como: altos niveles de contenido de secuencias por base, secuencias duplicadas, secuencias sobrerrepresentadas y presencia de adaptadores en las muestras. Esto se debe a que las muestras no han sido depuradas bioinformáticamente para eliminar el contenido de adaptadores y secuencias que presenten baja calidad de secuenciación (51), (54). Por este motivo se realizó un preprocesamiento de las lecturas para de esta manera mejorar la calidad futura del alineamiento.

Ensamblaje *de novo* y anotación funcional

Posterior a la corrección de las lecturas mediante una serie de herramientas en línea de comandos, se procedió al ensamblaje *de novo* en el programa Trinity. El transcriptoma contiene 41 761 fragmentos ensamblados (*contigs*), los cuales pertenecen a 22 195 posibles estructuras génicas, donde el 50% de las bases ensambladas se encuentran en *contigs* de al menos 2 620 bases de longitud, como se puede observar en la tabla VII.

Tabla VII. Estadísticos de caracterización del ensamblaje *de novo* del transcriptoma (Trinity Software).

Assembly statistics

Counts of transcripts, etc.

Total trinity 'genes': 22 195

Total Trinity transcripts: 41 761

Percent GC: 50.90

Stats based on ALL transcript contigs:

Contig N10: 5311

Contig N20: 4247

Contig N30: 3623

Contig N40: 3074

Contig N50: 2620

Median contig length: 1371

Average contig: 1735.23

Total assembled bases: 72465025

El 47.89% del total de transcriptos codificantes fue anotado funcionalmente mediante BLAST, contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. Dicha anotación determina que muchos de los mecanismos involucrados en los procesos biológicos estudiados no pueden ser descritos con claridad (Figura 14).

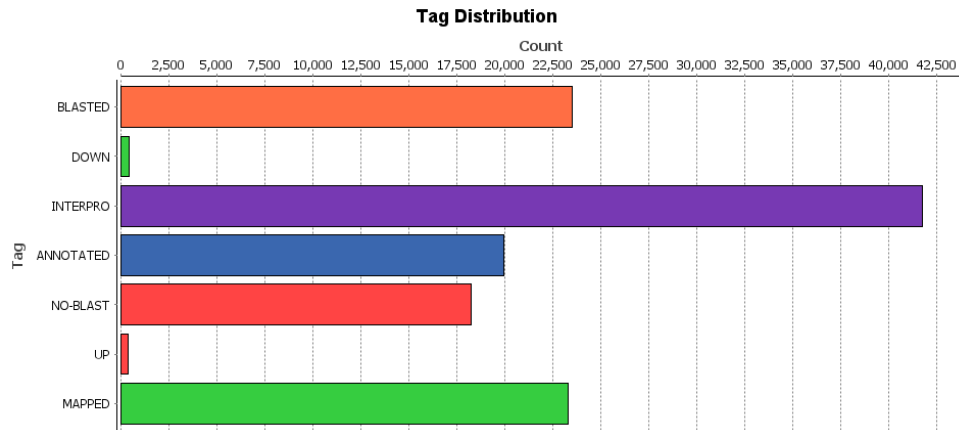


Figura 14. Progreso del análisis realizado a las muestras de estudio, donde se observa la variación del número de secuencias a medida que avanza el procesamiento de estas. (Blast2GO Software).

La anotación en términos de Ontología Genética (GO) de los transcritos reveló que se encuentran regulados de forma representativa los procesos biológicos. En el GO correspondiente a la Función Molecular se encontraron regulados principalmente las actividades hidrolasa, transporte transmembrana, transferasa, la unión de ácidos nucleicos y oxidorreductasa (Figura 15). En el GO correspondiente a Procesos Biológicos se encontraron regulados de forma representativa los procesos de ciclo celular, los procesos de modificación de proteínas celulares, los procesos catabólicos celulares y las respuestas celulares al estrés (Figura 16). En el GO correspondiente a Componentes celulares se encontraron regulados de forma representativa el sistema de endomembranas, las membranas plasmáticas y las vesículas citoplasmáticas (Figura 17).

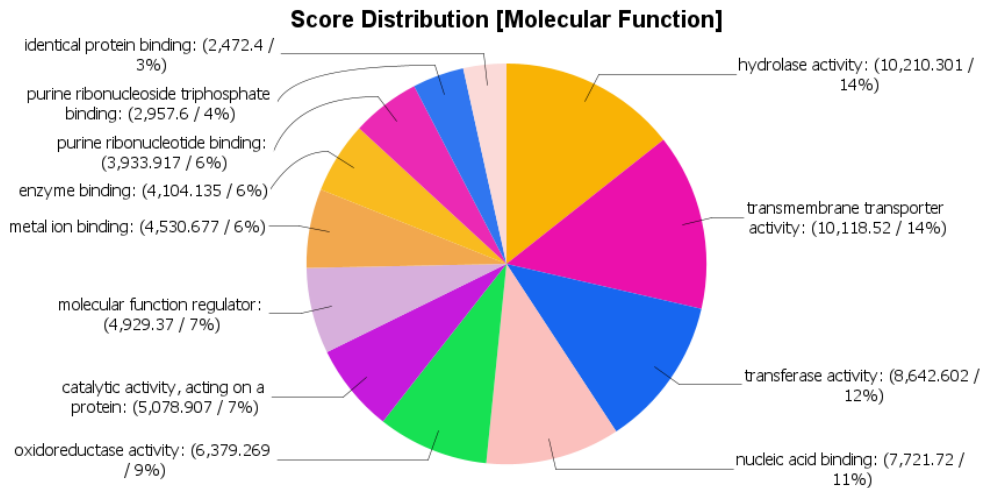


Figura 15. Distribución en términos GO de los transcritos anotados (Blast2GO Software). Función molecular, siendo los más representativos la actividad hidrolasa y la actividad de transporte transmembrana.

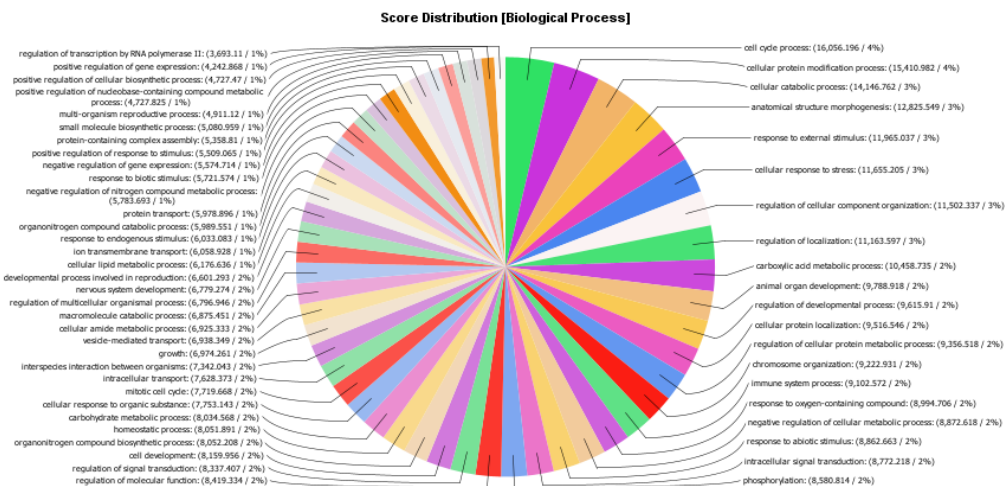


Figura 16. Distribución en términos GO de los transcritos anotados (Blast2GO Software). Procesos biológicos, siendo los más representativos los procesos cíclicos celulares y los procesos celulares relacionados con modificaciones de las proteínas.

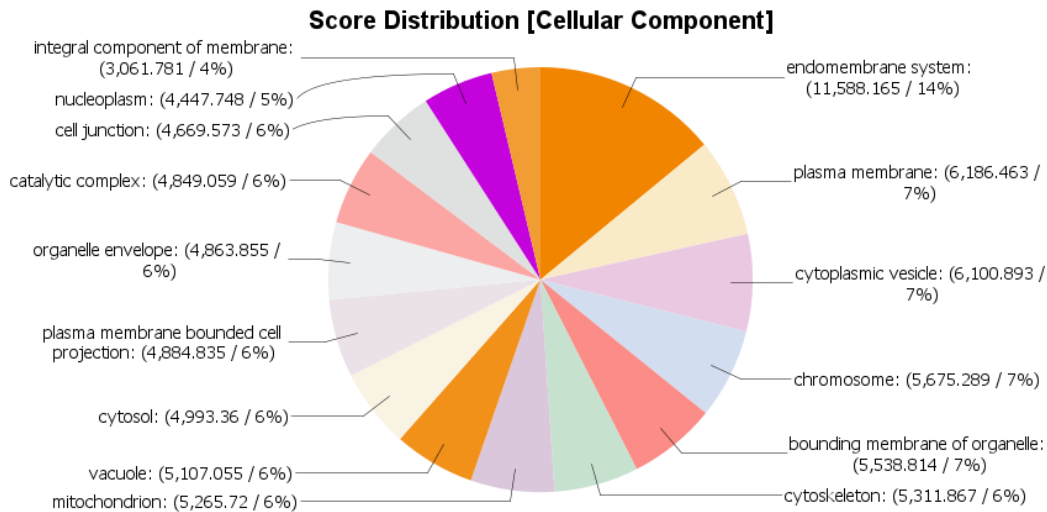


Figura 17. Distribución en términos GO de los transcritos anotados (Blast2GO Software). Componentes celulares, siendo los más representativos el sistema de endomembranas, la membrana plasmática, la vesícula citoplasmática, los cromosomas y las membranas de organelos.

Análisis de la expresión diferencial de genes

Los resultados de la Expresión Diferencial (ED) de genes de una condición respecto a otra se pueden observar en la Figura 19. El número de genes ED (FDR < 0.05) fue 809. Se encontraron regulados positivamente con un $\log_{2}FC > 2$, 373 transcritos y se encontraron regulados negativamente con un $\log_{2}FC < -2$, 436 genes (Figura 18. Resumen de los resultados de ED). Se filtraron los transcritos con bajo número de conteos (cpm < 2) en al menos tres réplicas, para aumentar la fortaleza estadística de la predicción de genes ED (57). La eliminación de estos transcritos permitió homogenizar los niveles de lecturas por transcrito en las muestras, reduciendo la variabilidad asociada al conteo, lo que previene la aparición de falsos positivos. La eliminación de estos transcritos no afecta los genes identificados como ED por los métodos utilizados posteriormente. Se generaron diferentes gráficos estadísticos para una visión global de los resultados. El gráfico MDS Plot, generó una gráfica de dispersión binomial, en la cual las distancias representan los típicos cambios del $\log_{2}FC$ entre las muestras (Figura 20). El Volcano Plot representó una dispersión construida por puntos que representan el logaritmo negativo del ajuste de p-values (FDR), sobre el eje de las y, *versus* el $\log_{2}FC$ del eje de las x (Figura 21). El gráfico MA Plot representó un smear de puntos que muestra el $\log_{2}FC$ del eje de las y *versus* el promedio del logaritmo de CPM en el eje de las x (Figura 22). El *heatmap* es una

representación visual de dos dimensiones de los datos, en el cual los valores numéricos de los puntos se representaron por un rango de colores (Figura 23), el dendograma añadido a la izquierda y encima es producido por agrupamiento tomando como entrada de distancia Euclidiana, calculada entre genes (izquierda) y muestras (encima). Las primeras barras contienen el diseño experimental de los datos que muestran la asociación entre muestras y covariables experimentales. Además, se representan los 50 genes principales ED (clasificados por FDR), todos los genes expresados diferencialmente.

Pairwise Differential Expression Results

Name: isoform_level_results

Dataset Overview

- Number of total features: **41,761**
- Number of filtered features: **21,070**
- Number of features after filtering: **20,691**
- Number of analyzed samples: **6/6**

Results

Number of differentially expressed (DE) features (FDR < 0.05): **809**

- Up-regulated (logFC > 2): **373**
- Down-regulated (logFC < -2) : **436**

Experimental Design

Sample	Lib. size (pre-filter)	Lib. size (post-filter)	Norm. factor	Stage
AD-CO-NaCl3	30,697,288	30,557,052	0.477	Optimal
AD-MG2	25,486,421	25,368,993	1.225	Stressful
AD-MG1	26,677,209	26,561,127	1.166	Stressful
AD-CO1	32,202,715	32,053,457	1.091	Optimal
AV-MG3	31,989,796	31,841,243	1.229	Stressful
AD-CO-NaCl2	60,191,534	59,880,634	1.095	Optimal

Analysis Parameters

Parameter	Value
CPM Filter	2.0
Samples reaching CPM Filter	1
Normalization Method	TMM (Trimmed mean of M values)
Design Type	Simple Design
Primary Experimental Factor	Stage
Primary Contrast Condition	Stressful
Primary Reference Condition	Optimal
Select a Statistical Test	GLM (Quasi Likelihood F-Test)
Robust	true

References

- Robinson MD., McCarthy DJ. and Smyth GK. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139-40.
- OmicsBox - Bioinformatics made easy. BioBam Bioinformatics (Version 1.4.10). March 3, 2019. www.biobam.com/omicsbox.

Figura18. En esta figura se puede observar un resumen de los resultados finales de la ED.

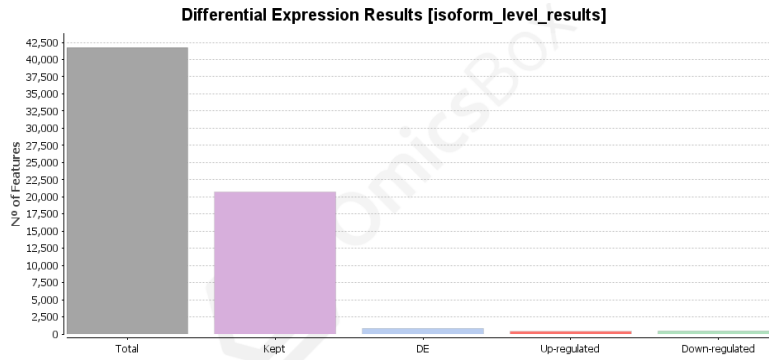


Figura 19. En la figura se observa el resumen de los resultados, donde se muestra el número total de isoformas 41 761, número de isoformas conservadas (cuando pasan el proceso de filtrado), 21 070, genes diferencialmente expresados 809, genes regulados positivamente 373, genes regulados negativamente 436.

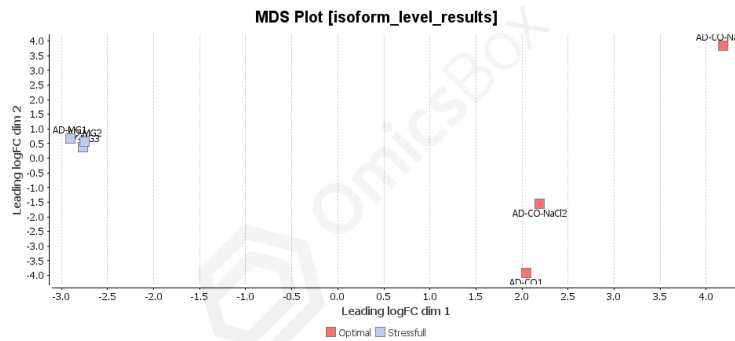


Figura 20. En MDS Plot, se puede observar la dispersión binomial que representa las distancias que representan los típicos cambios del logFC entre las muestras.

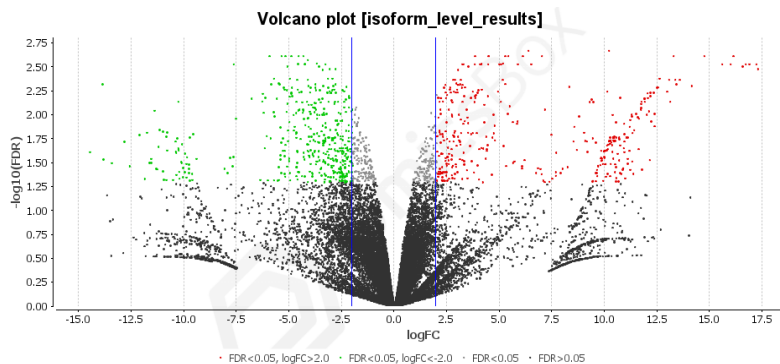


Figura 21. En Volcano Plot la dispersión del logaritmo negativo del ajuste de p-values (FDR), sobre el eje de las y, *versus* el logFC del eje de las x, los genes regulados positivamente y los genes regulados negativamente se muestran en verde y rojo, respectivamente.

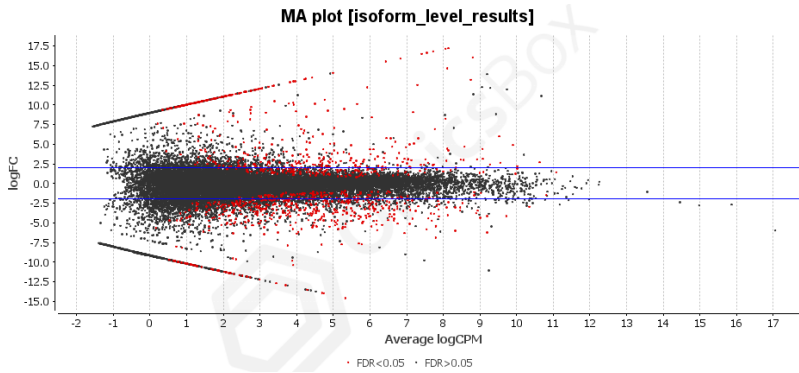


Figura 22. En MA Plot el smear de puntos muestra el logFC del eje de las y *versus* el promedio del logaritmo de CPM en el eje de las x. Genes ED se observan de color rojo.

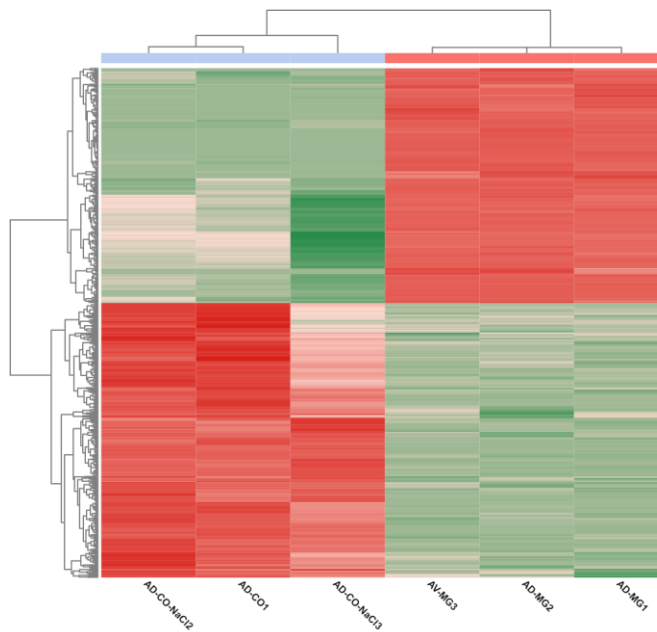


Figura 23. El *heatmap* muestra una representación visual de dos dimensiones de los datos, en el cual los valores numéricos de los puntos se representan por un rango de colores, el dendrograma añadido a la izquierda y encima es producido por un método de agrupamiento jerárquico que toma como entrada de distancia Euclidiana, calculada entre genes (izquierda) y muestras (encima). Las primeras barras contienen el diseño experimental de los datos que muestran la asociación entre muestras y covariables experimentales. Los genes regulados positivamente y los genes regulados negativamente se observan de color verde y rojo, respectivamente.

Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas

En el enriquecimiento de términos GO para el conjunto de genes ED en presencia de NaCl y MgCl₂ se observa que con respecto a los componentes celulares se ven favorecidos los complejos de oxidación NADPH (Figura 25). Mientras que en el nivel de función molecular los principales procesos biológicos regulados son: actividad oxidorreductasa, ácidos monocarboxílicos, unión de ion hierro, entre otros (Figura 26). Además, los principales procesos biológicos regulados son: el catabolismo de la L-fenilalanina, procesos catabólicos de la tirosina, procesos catabólicos de aminoácidos celulares, procesos metabólicos de ácidos monocarboxílicos, procesos catabólicos de ácidos orgánicos, procesos catabólicos de la regulación negativa del glucógeno, procesos de oxidación/reducción, procesos metabólicos de las hexosas, entre otros.

Se observa en el gráfico de *NES vs Significance Chart*, de valores-p *versus* puntuaciones de enriquecimiento normalizadas, donde se encontraron los conjuntos de genes enriquecidos significativos (Figura 24).

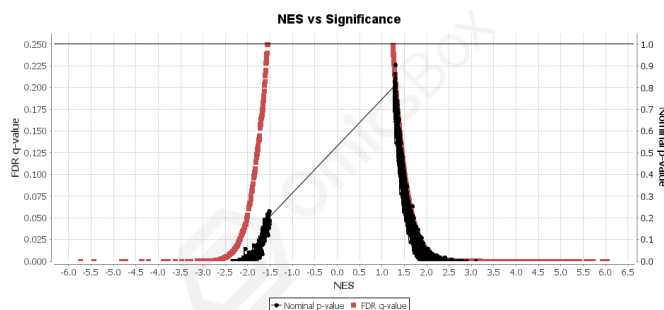


Figura 24. *NES vs Significance Chart*, se observa un gráfico de valores-p *versus* puntuaciones de enriquecimiento normalizadas.

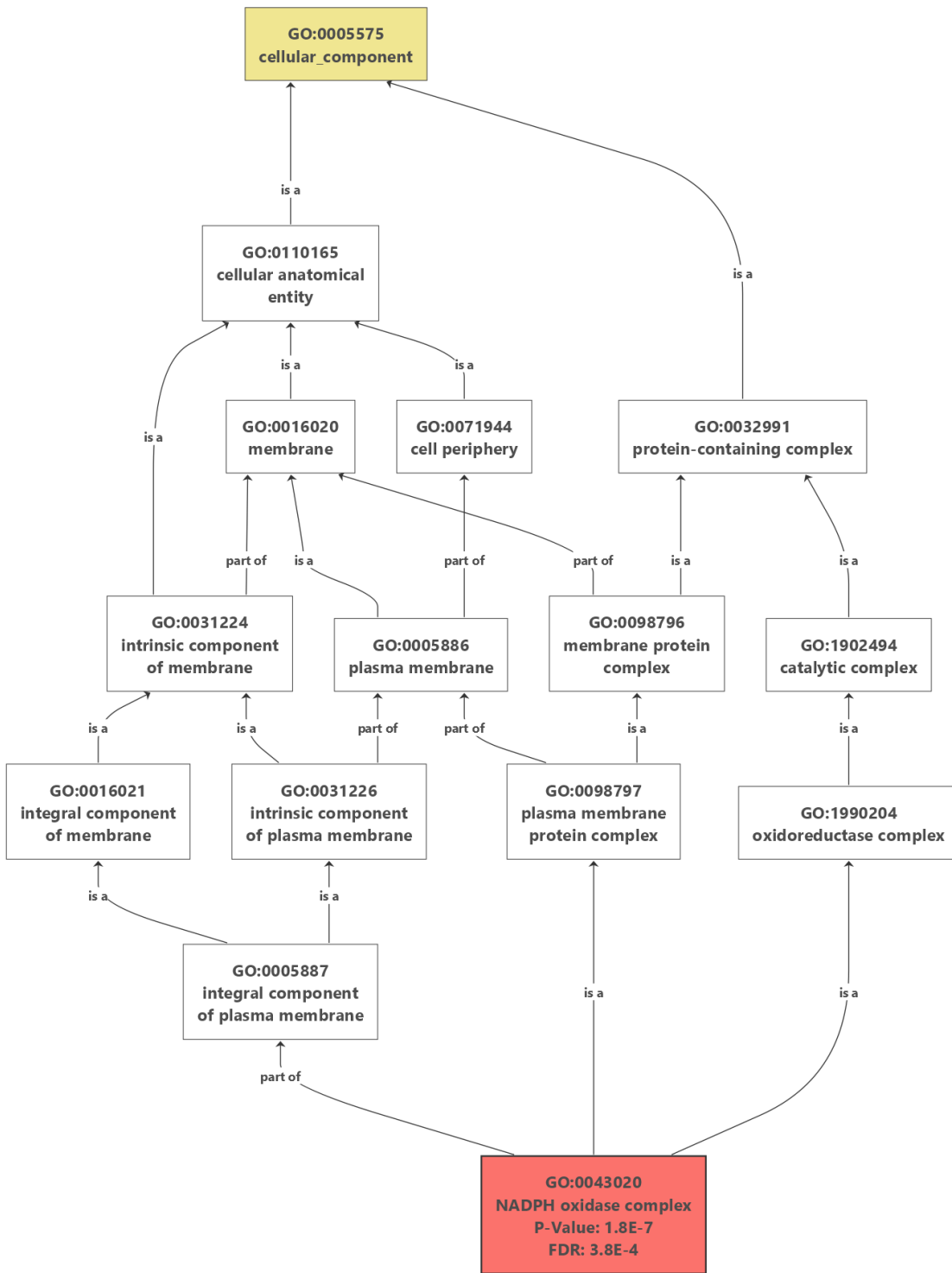


Figura 25. Enriquecimiento de términos GO en el conjunto de genes ED en presencia de 2 M de MgCl₂. Se muestran los términos GO enriquecidos a nivel de componentes celulares, con un valor de $p < 0.1$ del método computacional GSEA en el software Omicsbox. Rojo: Genes ED (regulados positivamente).

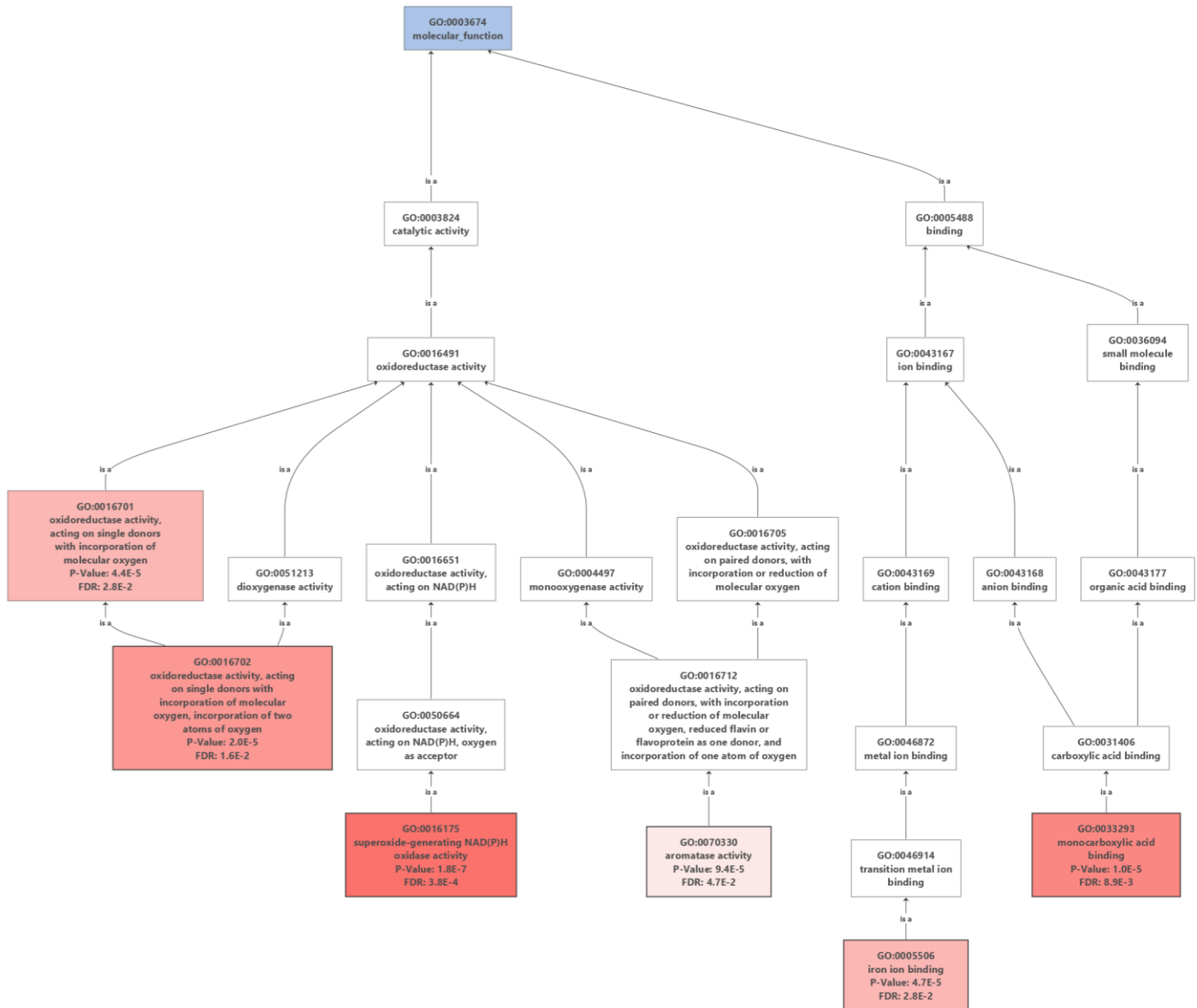


Figura 26. Enriquecimiento de términos GO en el conjunto de genes ED en presencia de 2 M de $MgCl_2$. Se muestran los términos GO enriquecidos a nivel de función molecular, con un valor de $p < 0.1$ del método computacional GSEA en el software Omicsbox. Rojo: Genes ED (regulados positivamente).

Transcriptos relacionados con estrés oxidativo

Debido al metabolismo molecular del oxígeno como aceptor final de la cadena de transporte electrónico, todos los organismos aeróbicos están expuestos a intermediarios

de los reactivos del oxígeno. Cuando los intermediarios de las ROS se encuentran en concentraciones bajas actúan como mensajeros secundarios. Mientras que a elevadas concentraciones pueden ocasionar daño a macromoléculas biológicas como ADN, lípidos y proteínas. Sin embargo, existen varios mecanismos capaces de desintoxicar eficientemente los intermediarios de las ROS (69). El estrés oxidativo es uno de los factores limitantes del crecimiento de *H. werneckii* en ambientes con altas concentraciones de sales. Son muy escasos los estudios en hongos tolerantes a altas concentraciones de sal relacionados con la respuesta al estrés oxidativo (70). En la presente investigación en *A. sydowii* en la condición crecida en 2 M de $MgCl_2$, se encontraron diferencialmente expresados transcritos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo. Estuvo regulado positivamente el gen *Catalasa* HPII (*katE*), con un $\log_{2}FC=3.21$, el cual tiene la función de convertir el H_2O_2 en H_2O y O_2 para proteger a la célula de los efectos tóxicos del H_2O_2 . Un estudio relacionado con el papel que juegan las catalasas del micelio y conidios en la patogenicidad de *Aspergillus fumigatus*, plantean la expresión de tres catalasas en los conidios y dos en el micelio, las cuales están codificadas por tres estructuras génicas separadas, *CATA*, *CAR1* y *CAT2* (71). En *A. fumigatus* se caracterizó una superóxido dimutasa extracelular (72) que podría jugar un papel esencial en la protección frente a ROS (71), (73). Es conocido que en levaduras los genes *tripéptido glutatión* y *pequeña proteína tiorredoxin* son redundantes en la protección celular cuando la célula se expone a concentraciones elevadas de superóxido, H_2O_2 y radicales hidroxilo (70). En el caso del gen *Tiorredoxin* (*Trx*), se reguló positivamente con un $\log_{2}FC=7.32$. Este gen codifica para una de las dos enzimas que forman el sistema redox del sistema de tiorredoxinas. Dentro de las funciones fisiológicas asignadas para la enzima a la cual codifica el gen *Trx* se incluye la reducción de la proteína disulfuro, la asimilación de azufre, la desintoxicación de ROS, la reparación de proteínas y la regulación de enzimas y factores de transcripción. Existen reportes de la relación de *Trx* en la apoptosis, las actividades *cocytokine*-, *chemokine*- y la actividad de estimulación del crecimiento (69). El gen *aconitasa* (*aco*) estuvo regulado positivamente con un $\log_{2}FC=11.6$. Las aconitasas son proteínas de hierro azufre que catalizan la isomerización reversible de citrato e isocitrato por la vía *cis*-aconitasa. Las aconitasas mitocondriales son parte del ciclo del ácido cítrico y en el citosol actúan como factores *trans* regulatorios que controlan la homeostasis del hierro a nivel postranscripcional. Ambas isoformas, la mitocondrial y la citosólica contienen un grupo prostético (4Fe-4S) en el cual el hierro no está ligado a un residuo de la proteína y puede unirse a un grupo hidroxilo del sustrato o

del agua (74). También estuvieron diferencialmente expresados tres transcritos del gen *citocromo P450 (cyp)* que codifican para una enzima que forma parte de un diverso grupo de hemo monooxigenasas que tienen un papel importante en el metabolismo. Estas enzimas contribuyen al balance redox ya que tienen una función importante en los procesos celulares, incluidos funciones inmunes y de señalización celular (75). El transcritos que corresponde al gen *Succinato-CoA ligasa (scot)* estuvo regulado positivamente, con un $\log FC=2.59$. Estos resultados sugieren que el estrés provocado por el crecimiento de *A. sydowii* en 2 M de $MgCl_2$ provocó un estrés oxidativo. Por lo tanto, este hongo halófilo regula la expresión transcripcional de diferentes genes implicados en el manejo de la defensa del estrés oxidativo. Lo que revela que la reprogramación transcripcional que se produjo ante la exposición de *A. sydowii* a 2 M de $MgCl_2$ podría haber ayudado a superar el desequilibrio entre los niveles celulares de oxidantes (ROS) y antioxidantes, para de este modo haber evitado la muerte celular.

Transcriptos relacionados con daños en el genoma

A pesar del efecto estabilizador que tienen los iones de Mg^{2+} sobre la doble cadena de ADN, la estructura secundaria del ARN y sobre el heteroduplex ADN-ARN en un genoma estable en alto contenido de GC, como ocurre en la mayoría de los miembros de *Haloquadratum*, este efecto puede resultar en la rigidez del ADN, lo cual puede interferir con procesos esenciales como la replicación del ADN y la transcripción (28). Es por esta razón que se considera tóxico debido a que provoca inducción de daños en el genoma. Este efecto es contrarrestado por mecanismos de reparación e integridad del genoma algunos de los cuales se observaron en las muestras crecidas en 2 M de $MgCl_2$. Por ejemplo, estuvieron regulados positivamente genes involucrados en la estructura de la cromatina en células eucariontes como la *Histona 4 (hh4)*, la *Acetiltransferasa de Histona GCN5*, la *Ubiquitina conjugada E2 2 (RAD6)* y la *Proteína homóloga AF-9 (YAF9)*. Además, en esta condición también se reguló positivamente el gen *ADN tirosil fosfodiesterasa (tdp)* que codifica para una enzima de reparación del ADN. Estuvo regulado positivamente el gen *ADN liasa (sitioapurínico o apirimidínico) (epex1)* el cual está involucrado en la vía de reparación de la escisión de bases del ADN provocado por lesiones de ADN inducidas por agentes oxidativos y alquilantes. Estuvo regulado positivamente el gen que codifica para *Exoribonucleasa (EXO1)*, involucrado en la reparación de discordancia y también en la recombinación mitótica entre repeticiones directas. También tiene un papel menor en la corrección de grandes desajustes de ADN

que se producen en el ADN heteroduplex durante la recombinación meiótica. Por otro lado, también estuvieron regulados positivamente genes que codifican para factores de transcripción como: *factor de transcripción de dominio de dedo (nscR)*, *factor de transcripción de clúster de ácido fusárico (FUB12)*, *factor de transcripción nuclear Y subunidad alfa isoforma X1 (NFYA)* y *factor de transcripción Sp8 (Sp8)*. Con relación a esto, se realizó un estudio a nivel transcriptómico en *A. sydowii*, crecido en presencia de HPAs. Los HPAs son compuestos tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos y en este estudio se encontraron regulados positivamente genes tales como: *ADN tirosil fosfodiesterasa (tdp)*, *Histona 4 (hh4)*, entre otros. La expresión positiva de estos genes es un indicativo del daño que provocan los HPAs en el genoma de *A. sydowii* (36). En nuestro estudio se encontraron genes similares lo que sugiere que el $MgCl_2$ a 2 M resulta tóxico para las células de *A. sydowii* por lo que ocurre una reprogramación transcripcional para contender con esta condición de estrés y reparar el daño inducido al genoma.

Transcriptos relacionados con la síntesis de solutos compatibles

En *A. sydowii*, no se encontraron cambios significativos en la transcripción de genes involucrados en la síntesis de solutos compatibles. No obstante, se encontraron diferencialmente expresados varios genes involucrados en la biosíntesis y degradación del glicerol. Entre estos está el gen *Aeróbico glicerol fosfato deshidrogenasa (glpD)*, con un $\log FC=7.99$. Este gen está involucrado en la degradación del glicerol por la vía de glicerol quinasa y participa en la conversión de glicerol-3-fosfato en dihidroxiacetona y se encuentra en el citoplasma. También estuvieron regulados positivamente los genes *ATP-dependiente dihidroxiacetona kinasa (TKFC)*, con un $\log FC=12.37$ y *Aspartato aminotransferasa citoplasmática (GOT1)*, los cuales están relacionados con los procesos catabólicos del metabolismo del glicerol y con los procesos de biosíntesis de glicerol, respectivamente. El glicerol se forma por la conversión de dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato y es subsecuentemente desfosforilado de glicerol-3-fosfato a glicerol. La primera reacción es catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). Existen dos isogenes diferentes que codifican para GPD. La primera isoforma identificada se induce bajo estrés osmótico (76). El glicerol puede ser utilizado en la célula como una fuente de carbono y sus niveles citosólicos de síntesis y degradación son un factor importante para el mantenimiento del balance redox en la célula. Además de estas funciones mencionadas, el glicerol es utilizado para la síntesis de glicerofosfolípidos y triacilglicéridos. También es utilizado para combatir el estrés oxidativo y térmico (64). La

regulación positiva de los genes expresados en el contexto del estrés analizado sugiere que existe una degradación del glicerol, por lo que la célula pudiera estar utilizando la energía proveniente del catabolismo de esta molécula para el mantenimiento del balance redox en la célula y/o para garantizar el funcionamiento de los transportadores de la membrana involucrados en la homeostasis de los iones. Los genes involucrados en la biosíntesis del glicerol sugieren que este poliol podría estar relacionado directamente con la biosíntesis de fosfolípidos involucrados en el reordenamiento de lípidos de la membrana citoplasmática y también puede estar contribuyendo con el mantenimiento de la turgencia celular.

Con relación al proceso de biosíntesis de trehalosa se encontró diferencialmente expresado el gen *trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1)*, con un $\log_{2}FC=4.58$. La biosíntesis de trehalosa-6-fosfato consiste en dos pasos enzimáticos catalizados por la subunidad oligomérica *TPS*, a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa (77). En la levadura *S. cerevisiae*, existen al menos tres proteínas que participan en este complejo, la trehalosa-6-fosfato sintasa, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa y una proteína regulatoria (78). La subunidad *TPS1* participa en la regulación del influjo de glucosa dentro de la célula y en la regulación del estrés térmico (77). La trehalosa (α -glúcido-1,2-glucosa) es un disacárido no reductor encontrado en diversos organismos como bacterias, hongos, algas, plantas, invertebrados e insectos. En el caso de los hongos, la trehalosa se acumula en el micelio durante la fase estacionaria y en los conidios. Es rápidamente metabolizado una vez reanudado el crecimiento o se inicia la germinación. La trehalosa era considerada solamente una reserva de carbohidratos. Sin embargo, ya es sabido que tiene una función protectora frente a varios tipos de estrés (78). En el caso de *A. nidulans*, la trehalosa se acumula en respuesta a un estrés oxidativo, estrés por calor y durante la conidiación, no siendo así en el caso del estrés osmótico (21).

Los solutos compatibles son una estrategia ampliamente utilizada por los hongos para contender contra el estrés osmótico (58), (1), (65), (10). Los resultados de este trabajo sugieren que ocurre una reprogramación transcripcional relacionada con la síntesis de solutos compatibles para contender con esta condición de estrés ya que se identificaron genes diferencialmente expresados relacionados con la biosíntesis y degradación de la trehalosa y el glicerol. Sin embargo, no se encontraron diferencialmente expresados genes relacionados con la biosíntesis de la manosa, el arabitol o el eritritol. Este resultado

concuenda con los resultados descritos previamente en este trabajo donde se detectaron la misma mezcla de solutos en *A. sydowii* en presencia de 2 M de $MgCl_2$ que en presencia de 2 M de NaCl. Por lo tanto, los genes que codifican para la biosíntesis de estos compuestos pueden estarse expresando en ambas condiciones y no de forma diferencial.

Transcriptos relacionados con la pared celular

La pared celular de los hongos es una estructura compleja que consiste en polisacáridos dispuestos de forma lineal y ramificada y presenta proteínas que le confieren una función inmunomoduladora y evasiva para brindar protección al hongo. La estructura de la pared celular es remodelada dinámicamente en dependencia de las condiciones ambientales a las cuales el hongo se enfrenta, lo que resulta en cambios en su composición (79). El cambio transcripcional de genes asociados con la construcción y remodelado de la pared celular de *A. sydowii* sugiere que esta estructura fue modificada bajo la presencia de 2 M de $MgCl_2$. El modelo actual de la composición de la pared celular de *Aspergillus* describe que la quitina es un polímero lineal de β -1,4-N-acetil-glucosamina, que se encuentra localizado cerca de la membrana celular con α (1-3)-glucanos cruzados formando una capa hidrofóbica rígida alrededor de β (1-3)-glucanos cruzados, convirtiendo esta región rígida en una segunda capa de β -glucanos hidratados. Finalmente, la región ultraperiférica de la pared celular está compuesta por mannan, arabinan, α (1-3)-glucanos y proteínas (21), (80). La cantidad de quitina presente en la pared celular es una función de su síntesis y degradación. Las quitinas sintasas (CHS) son una familia de proteínas que polimerizan la UDP-N-acetil-glucosamina intracelular y excretan polímeros de quitina hacia el espacio de la pared celular (21). En *A. sydowii* estuvo regulado positivamente el transcripto del gen *Endoquitinasa A (ctcA)*, $\log FC=2.28$, el cual está involucrado en la degradación de la quitina. También estuvo regulado positivamente el gen *Chitotriosidasa-1 (CHIT1)*, $\log FC=1.68$, que entre otras funciones puede mediar la hidrólisis de la quitina. En *A. fumigatus*, ocho genes que codifican para quitina sintasa fueron encontrados pero su función biológica específica no está totalmente clara, ya que al realizar la delección de muchos de estos genes, no se observó un efecto sobre el crecimiento o sobre el contenido de quitina de la pared celular (81). En el caso de *A. sydowii* al menos 11 diferentes transcriptos que codifican para ocho quitinasas sintasas fueron identificados, bajo condiciones de estrés salino (21). La regulación positiva de estos genes sugiere que en el contexto del estrés evaluado podría ocurrir un decrecimiento en el contenido de quitina de la pared celular.

La familia de glucosiltransferasas (*GEL family*), son unas de las proteínas asociadas a la pared celular más estudiadas y se encuentra presente en la pared celular de una gran cantidad de hongos. Su función consiste en cortar el recién sintetizado $\beta(1,3)$ -glucano y transferirlo a otra molécula de $\beta(1,3)$ -glucano, resultando en la elongación y acortamiento de las fibras de glucano. Las proteínas GEL también regulan el cruce de proteínas dentro de la pared celular, permitiendo el correcto ensamblaje de las estructuras de la pared (82). Estuvo regulado positivamente el transcrito del gen *1,3-beta glucanosil transferasa 1,3- (gel4)*, con un $\log_{2}FC=3.62$. El gen *gel4* está involucrado en el reordenamiento de la pared celular en hongos y es esencial en *A. fumigatus* (83). En *A. fumigatus* se identificaron siete genes, pero solo *gel1*, *gel2* y *gel4* se expresan durante el crecimiento micelial (81). También estuvo regulado positivamente el transcrito del gen *Glycosidasa (CRR1)*, que es una glicosidasa específica implicada en el ensamblaje de la pared celular de esporas durante la esporulación. De forma general bajo condiciones de estrés osmótico en *A. sydowii*, el contenido de quitina es reducido, mientras que el contenido de β -glucanos es incrementado en la pared celular. Estas modificaciones, generan la reducción de la elasticidad de la pared celular, permitiendo la resistencia a condiciones externas (21). Los resultados de este trabajo sugieren que ocurre una reprogramación transcripcional relacionada con las modificaciones de la pared celular bajo condiciones de estrés osmótico inducidas por 2 M de $MgCl_2$ ya que se identificaron regulados positivamente genes involucrados con la disminución del contenido de quitina e implicados en la elongación de los glucanos. Estos reordenamientos en la estructura de la pared celular sugieren que puede estar ocurriendo una reducción de la elasticidad y un engrosamiento de la pared celular para de esta manera contender contra la alta presión osmótica a la que está siendo sometida.

Transcriptos relacionados con el transporte celular

Algunos hongos halófilos tienen un gran número de sistemas de transporte, para regular la homeostasis a niveles de cationes alcalinos y mantener el flujo a través de la membrana plasmática para eliminar iones tóxicos (21). La súper familia de las proteínas *ATP-binding cassette (ABC)* es una de las mayores familias de proteínas. Estas transportan diversos tipos de sustratos, incluidos azúcares, amino ácidos, antibióticos, lípidos, esteroides, péptidos, metabolitos endógenos e iones (84). Algunos miembros de esta gran familia transportan agentes citotóxicos a través de la membrana biológica, resultando en la acumulación de toxinas. Por lo tanto, juegan un papel en la protección

celular frente a toxinas naturales. En *A. nidulans* la secreción de metabolitos secundarios endógenos, toxinas naturales exógenas y xenobióticos, está mediada por transportadores ABC (85). En los hongos *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. fumigatus*, han sido identificados genes que codifican para transportadores ABC (21). En este estudio estuvieron regulados positivamente transcritos que codifican para genes de transportadores ABC, como *ABC transportador multifármaco B (abcB)* logFC=11.9 y *ABC transportador multifármaco MDR (MDR1)*, logFC=10.43. La contribución de los transportadores ABC en el manejo de la halotolerancia de hongos filamentosos no se conoce claramente. Sin embargo la existencia de un gran número de genes que codifican para estos transportadores en el genoma de halófilos como *Aspergillus versicolor* y de *A. sydowii* (21) puede sugerirnos que están involucrados en el transporte de ciertos aminoácidos bajo condiciones de estrés osmótico.

Existe la hipótesis en *A. fumigatus*, de que genes específicos podrían codificar para factores de virulencia en este hongo. Uno de estos genes es *AFUA_7G05060*, que tiene gran interés ya que es homólogo del factor de virulencia bacteriano *MgtC*, implicado en el transporte de magnesio. Esta homología con el *MgtC* bacterial es única en el Reino Fúngico, ya que ningún otro homólogo MGTC fue identificado por una búsqueda en BLAST con otras especies eucariotas o en especies de *Aspergillus* (con la excepción de *Neosartorya fischeri*, que es el taxón más cercano a *A. fumigatus*) (81). En *A. sydowii* estuvieron regulados positivamente transcritos relacionados directamente con el transporte de magnesio como: *UPF0619 GPI-anchored membrane protein AFUA_3G00880 (AFUA_3G00880)*, logFC=6.36 y *Uncharacterized protein AFUA_6G02800 (AFUA_6G02800)* logFC=2.42. La regulación positiva de estos genes indica que en este hongo está ocurriendo un transporte activo de iones Mg^{2+} , lo que puede sugerir la existencia de un mecanismo de transporte que le permita expulsar este ion para regular su concentración intracelular.

También estuvieron regulados positivamente varios transcritos de genes relacionados con el transporte de la membrana como genes que codifican para transportadores dependientes de sodio como: *Transportador de nucleósidos 1 (CNT1)*, *Na^x/nucleósido cotransporte 1 (Slc28a2)* y el transcritos *Zinc transporte 3 (Slc30a3)*, involucrado en la acumulación de zinc. *H. werneckii* es capaz de crecer en las mayores concentraciones de sal, en medios saturados de cosmótrópicos (5 M de NaCl, 4.5 M de KCl, 3 M de $MgSO_4$) y las mayores concentraciones de caotrópicos (2.1 M de $MgCl_2$, 1.7 M de $CaCl_2$ y 4 M de

NaBr). Esta capacidad excepcional podría estar relacionada con la redundancia de los transportadores de membrana plasmática Na^+ y K^+ codificados en su genoma duplicado (2). La regulación positiva del transporte de estos iones sugiere que en la célula bajo el estrés osmótico evaluado se está invirtiendo energía en el transporte iónico de Na^+ y Zn lo cual pudiera estar favoreciendo los procesos celulares que le permitan manejar el estrés y pudieran contribuir a la defensa de la célula en estas condiciones.

4. Conclusiones

Al comparar los perfiles transcriptómicos de *A. sydowii* crecido en presencia de 2 M de $MgCl_2$ y de 2 M de NaCl se pudo ganar en claridad sobre los mecanismos de respuesta que le permiten a esta especie sobrevivir en estas condiciones hostiles, sin embargo, dado que es un tema poco estudiado es necesario profundizar aún más en estos. Mediante la evaluación a partir de biomarcadores de estrés oxidativos se determinó la respuesta antioxidante de *A. sydowii* expuesto a NaCl y $MgCl_2$. Estos resultados sugirieron que el crecimiento en presencia de $MgCl_2$ induce un estrés oxidativo mayor en relación con la presencia de NaCl lo cual se correlaciona con la naturaleza caotrópica del ion Mg^{2+} y con sus efectos tóxicos sobre la célula. En esta especie la respuesta de defensa antioxidante está dada por la acción de las enzimas catalasa y GPX que están involucradas en la respuesta del mantenimiento de la homeostasis redox a nivel celular. En *A. sydowii* una de las respuestas celulares que favorecen el mantenimiento del equilibrio osmótico en medios hipersalinos es la presencia de una mezcla de compuestos osmóticamente activos como manitol, arabitol, trehalosa, eritritol y glicerol, en igual extensión en cuanto a la mezcla de solutos detectados en el crecimiento en presencia de NaCl y $MgCl_2$. Existen diferencias en las concentraciones de estos solutos en el tiempo. Sin embargo, se puede concluir que tanto en presencia de $MgCl_2$ como en presencia de NaCl una de las formas de manejar el estrés osmótico provocado por estas sales es mediante la estrategia de los solutos compatibles. Este resultado es consistente con la hipótesis de que los solutos compatibles son agentes protectores frente a diferentes formas de estrés osmótico. Este mecanismo de respuesta es compartido con todos los hongos filamentosos xerófilos/halófilos que han sido estudiados en condiciones de estrés osmótico. A nivel transcripcional se identificaron en *A. sydowii* EXF-12860, 376 transcritos regulados positivamente y 436 regulados negativamente ($\log_{2}FC > 1$; $FDR < 0.05$). Cuando las células de *A. sydowii* crecen en presencia de 2 M de $MgCl_2$ ocurre la transcripción diferencial de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo y al daño en el genoma, por lo tanto, esta condición es altamente estresante. También existen genes regulados positivamente relacionados con la biosíntesis y el catabolismo del glicerol y de la trehalosa por lo tanto a nivel transcripcional se ve favorecida de forma diferencial la biosíntesis de estos solutos. También está ocurriendo una reprogramación transcripcional relacionada con mecanismos moleculares involucrados en las modificaciones de la pared celular por lo que pudiera conducir a una reducción de la elasticidad y a un engrosamiento

de la pared celular para de esta manera contener contra la alta presión osmótica a la que está siendo sometida la célula. A la vez que intenta mantener activo el transporte iónico mediante la regulación positiva de genes que codifican para transportadores de la membrana con lo cual se ve favorecido el mecanismo de homeostasis de los iones. Por lo tanto, en presencia de 2 M de $MgCl_2$ existe un estrés osmótico y un estrés oxidativo y las células responden a través de los mecanismos de respuesta generales descritos para contener ante un estrés osmótico en hongos filamentosos halófilos/xerófilos. El hongo filamentoso halófilo *A. sydowii* fue un buen modelo para este estudio.

Referencias

1. Kogej T, Stein M, Volkmann M, Gorbushina AA, Galinski EA, Gunde-Cimerman N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology*. 2007;153(12):4261–73.
2. Zajc J, Džeroski S, Kocev D, Oren A, Sonjak S, Tkavc R, et al. Chaophilic or chaotolerant fungi: A new category of extremophiles? *Front Microbiol*. 2014;5(DEC):1–15.
3. Grant WD, Danson MJ, Scott DJ, Halling PJ, Engberts JBFN, Ho MW, et al. Life at low water activity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2004;359(1448):1249–67.
4. Kim JJ, Enache E, Hayman M. Halophilic and Osmophilic Microorganisms. 2014;
5. Zajc J, Kogej T, Galinski EA, Ramos J, Gunde-Cimerman N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(1):247–56.
6. Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res* [Internet]. 2009;113(11):1231–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
7. Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42(3):353–75.
8. Waters AJ, Geiser DM, Taylor JW, Ritchie KB. Nicotine withdrawal and accident rates. *Nature*. 1984;137–8.
9. Soler-Hurtado MM, Sandoval-Sierra JV, Machordom A, Diéguez-Urbeondo J. *Aspergillus sydowii* and Other Potential Fungal Pathogens in Gorgonian Octocorals of the Ecuadorian Pacific. *PLoS One*. 2016;11(11):1–12.
10. Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A. Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Adv Appl Microbiol*. 2011;77:71–96.

11. Plemenitaš A, Lenassi M, Konte T, Kejžar A, Zajc J, Gostinčar C, et al. Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: A molecular perspective. *Front Microbiol.* 2014;5(MAY):1–12.
12. Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A. Adaptation To Life At High Salt Concentrations. Vol. 9, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. 2005. 1–573 p.
13. Gock MA, Hocking AD, Pitt JI, Poulos PG. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int J Food Microbiol.* 2003;81(1):11–9.
14. van Leeuwen MR, Krijgsheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, et al. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Stud Mycol.* 2013;74:59–70.
15. Witteveen CFB, Visser J. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;134(1):57–62.
16. Ruijter GJG, Visser J, Rinzema A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology.* 2004;150(4):1095–101.
17. A. Diano, 1 S. Bekker-Jensen, 1 J. Dynesen 2 J. Nielsen1, 1DTU. Polyol Synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of Oxygen Availability, Carbon and Nitrogen Sources on the Metabolism. *J Anat.* 2006;189 (Pt 3(Ii):503–5.
18. Hohmann S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett [Internet].* 2009;583(24):4025–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
19. Simaan H, Lev S, Horwitz BA. Oxidant-sensing pathways in the responses of fungal pathogens to chemical stress signals. *Front Microbiol.* 2019;10(MAR):1–12.
20. Day AM, Quinn J. Stress-activated protein kinases in human fungal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(JUL):1–15.
21. Pérez-Llano Y, Rodríguez-Pupo EC, Druzhinina IS, Chenthamara K, Cai F, Gunde-Cimerman N, et al. Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells.* 2020;9(3):525.

22. Zajc J, Liu Y, Dai W, Yang Z, Hu J, Gostinčar C, et al. Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: Haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*. 2013;14(1).
23. Gostinčar C, Gunde-Cimerman N. Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi. *Genes (Basel)*. 2018;9(3).
24. Arana DM, Alonso-monge R, Roma E, Gola S, Pla J. Signalling and Defences Against. 2008;1–16. Available from: [papers3://publication/uuid/D661091C-E324-43EE-9517-5711DC354E72](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16610913/)
25. Londoño JL, Químico Farmacéuti-Co P. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad PARTE III / PART III. :129–62.
26. Fabra UP. ESTRÉS OXIDATIVO ENDÓGENO EN LA LEVADURA *Schizosaccharomyces pombe* : LA ACTIVACIÓN DE LA QUINASA Sty1. 2009;
27. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002;28(1):56–63.
28. Oren A. 10.1007/978-94-007-6488-0_8.Pdf. LinkSpringerCom [Internet]. 2013;(1978):215–32. Available from: http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-94-007-6488-0_8.pdf%0Apapers3://publication/uuid/7D7251C2-F2B7-4D61-B334-37F479EC8273
29. Oren A, Gunde-Cimerman N. Fungal life in the dead sea. *Prog Mol Subcell Biol*. 2012;53:115–32.
30. Ball P, Hallsworth JE. Water structure and chaotropicity: Their uses, abuses and biological implications. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(13):8297–305.
31. Hofmeister F. Arbeiten aus dem pharmakologisehen Institut der deutschen Univer-sitar zu Prag. 12. Zur L e h r e y o n d e r W i r k u n g tier Salze. Dritte Mittheilung. *Arch Exp Pathol Pharmacol* [Internet]. 1888;25:1–30. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01838161>
32. Kunz W, Henle J, Ninham BW. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the

- science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2004;9(1–2):19–37.
33. Ma Y, Galinski EA, Grant WD, Oren A, Ventosa A. Halophiles 2010: Life in saline environments. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(21):6971–81.
 34. Hallsworth JE, Prior BA, Nomura Y, Iwahara M, Timmis KN. Compatible Solutes Protect against Chaotrope (Ethanol)-Induced, Nonosmotic Water Stress. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7032–4.
 35. Sklenář F, Jurjević, Zalar P, Frisvad JC, Visagie CM, Kolařík M, et al. Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section *Restricti*. *Stud Mycol.* 2017;88:161–236.
 36. Peidro-Guzmán H, Pérez-Llano Y, González-Abradelo D, Fernández-López MG, Dávila-Ramos S, Aranda E, et al. Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ Microbiol.* 2020;00.
 37. González-Abradelo D, Pérez-Llano Y, Peidro-Guzmán H, Sánchez-Carbente M del R, Folch-Mallol JL, Aranda E, et al. First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresour Technol* [Internet]. 2019;279(December 2018):287–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.002>
 38. Plemenitaš A, Vaupotič T, Lenassi M, Kogej T, Gunde-Cimerman N. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud Mycol.* 2008;61:67–75.
 39. Gunde-Cimerman N, Zalar P, De Hoog S, Plemenitaš A. Hypersaline waters in salterns - Natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000;32(3):235–40.
 40. Gunde-Cimerman N, Ramos J, Plemenitaš A. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycol Res.* 2009;113(11):1231–41.

41. Jančič S, Zalar P, Kocev D, Schroers HJ, Džeroski S, Gunde-Cimerman N. Halophily reloaded: new insights into the extremophilic life-style of *Wallemia* with the description of *Wallemia hederiae* sp. nov. *Fungal Divers.* 2016;76(1):97–118.
42. Batista-García RA, Balcázar-López E, Miranda-Miranda E, Sánchez-Reyes A, Cuervo-Soto L, Aceves-Zamudio D, et al. Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One.* 2014;9(8).
43. Tang IN, Munkelwitz HR, Wang N. Water activity measurements with single suspended droplets: The NaCl-H₂O and KCl-H₂O systems. *J Colloid Interface Sci.* 1986;114(2):409–15.
44. MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469–74.
45. Procedure P. 300uM H₂O₂ - 300uM H₂O₂. 2005;(21024):140.
46. Witko V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. *J Clin Lab Anal.* 1992;6(1):47–53.
47. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(10):1184–94.
48. Ozdemirler G, Mehmetcik G, Oztecan S, Toker G, Sivas A, Uysal M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Horm Metab Res.* 1995;27(4):194–6.
49. Pinto FL, Thapper A, Sontheim W, Lindblad P. Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol.* 2009;10:1–8.
50. Jervis-Bardy J, Leong LEX, Marri S, Smith RJ, Choo JM, Smith-Vaughan HC, et al. Deriving accurate microbiota profiles from human samples with low bacterial content

through post-sequencing processing of Illumina MiSeq data. *Microbiome* [Internet]. 2015;3(1):1–11. Available from: ???

51. Brown RB, Madrid NJ, Suzuki H, Ness SA. Optimized approach for Ion Proton RNA sequencing reveals details of RNA splicing and editing features of the transcriptome. *PLoS One*. 2017;12(5):1–15.
52. Freedman AH, Schweizer RM, Ortega-Del Vecchyo D, Han E, Davis BW, Gronau I, et al. Demographically-Based Evaluation of Genomic Regions under Selection in Domestic Dogs. *PLoS Genet*. 2016;12(3):1–23.
53. Haider B, Ahn TH, Bushnell B, Chai J, Copeland A, Pan C. Omega: An Overlap-graph de novo Assembler for Metagenomics. *Bioinformatics*. 2014;30(19):2717–22.
54. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
55. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*. 2013;8(8):1494–512.
56. Zhao G, Li J, Ren X, Chen C, Wang X. Few-layered graphene oxide nanosheets as superior sorbents for heavy metal ion pollution management. *Environ Sci Technol*. 2011;45(24):10454–62.
57. Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*. 2016;17(1):1–19.
58. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10).
59. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(2):231–62.
60. Cohen G, Judith M, X- T, li C, li C, X- T, et al. of Catalase in Tissue. 1970;38:30–8.

61. Assay LDHC. *BioAssay Systems. Test.* 2012;35(1992):94545.
62. Warris A, Ballou ER. Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2019;89:34–46. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.004>
63. González-Hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol.* 2002;44(3–4):137–56.
64. Duskova M, Borovikova D, Herynkova P, Rapoport A, Sychrova H. The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362(3):1–8.
65. Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol.* 2002;45(3):665–72.
66. Martinelli L, Zalar P, Gunde-Cimerman N, Azua-Bustos A, Sterflinger K, Piñar G. *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology. *Extremophiles.* 2017;21(4):755–73.
67. Brown AD. Compatible Solutes and Extreme Water Stress in Eukaryotic Micro-Organisms. *Adv Microb Physiol.* 1978;17(C):181–242.
68. Koganti S, Ju LK. *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochem Eng J* [Internet]. 2013;79:112–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.07.014>
69. Thön M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, Brakhage AA. The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: Impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem.* 2007;282(37):27259–69.
70. Petrovič U. Role of oxidative stress in the extremely salt-tolerant yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6(5):816–22.
71. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, et al.

- Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 2003;71(6):3551–62.
72. Holdom MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ, Monod M. Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):558–62.
 73. Grant CM. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol*. 2001;39(3):533–41.
 74. Fazius F, Shelest E, Gebhardt P, Brock M. The fungal α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol Microbiol*. 2012;86(6):1508–30.
 75. Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome P450s In the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2018;7(2017):44–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>
 76. Björkqvist S, Ansell R, Adler L, Lidén G. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(1):128–32.
 77. Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaeck C, et al. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol*. 1999;119(4):1473–82.
 78. Wolschek MF, Kubicek CP. The filamentous fungus *Aspergillus niger* contains two “differentially regulated” trehalose-6-phosphate synthase-encoding genes, *tpsA* and *tpsB*. *J Biol Chem*. 1997;272(5):2729–35.
 79. Assis LJ de, Adriana Manfiolli, Eliciane Mattos, João H. T. Marilhana Fabri, Iran Malavazi IDJ, Matthias Brock, d Robert A. Cramer AT, Daisuke Hagiwara LNAR, Goldmana GH. crossm. *Mol Biol Physiol*. 2018;9(6):1–15.
 80. Gow NAR, Latge J-P, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *The Fungal Kingdom*. 2017;(May):267–92.
 81. Gastebois A, Blanc Potard AB, Gribaldo S, Beau R, Latgé JP, Mouyna I.

Phylogenetic and functional analysis of *Aspergillus fumigatus* MGTC, a fungal protein homologous to a bacterial virulence factor. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(13):4700–3.

82. Ao J, Free SJ. Genetic and biochemical characterization of the GH72 family of cell wall transglycosylases in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2017;101:46–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2017.03.002>
83. Gastebois A, Fontaine T, Latgé JP, Mouyna I. β (1-3)glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(8):1294–8.
84. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008;9(1):105–27.
85. Andrade AC, Van Nistelrooy JGM, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA. The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol Gen Genet.* 2000;263(6):966–77.