UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

"Análisis polifásico de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de diferentes ambientes en condiciones de estrés"

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LYSELLE RUÍZ DE LEÓN

DIRECTORA

Dra. Sonia Dávila Ramos

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO, 2025

Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ramón Batista por acogerme en su grupo de investigación y apoyarme a lo largo de todo el trayecto de mi formación, desde la maestría, siempre con mucho cariño. Agradezco profundamente a la Dra. Sonia Dávila por su constante apoyo, por dar siempre lo mejor de sí desde que la conozco y por su calidez humana.

A todas las personas del laboratorio: todas me han apoyado de un modo u otro y juntas hemos construido una linda amistad. A Caribel, Henry, Yeny, Yordanys, Amanda Amelia, Amanda Martirena, Mike, Gise, Kevin, Adri, Tania y a todos quienes, de una forma u otra, han formado parte de este camino. En especial, agradezco a Naylin y a Nella, quienes han estado cerca desde la licenciatura y se ha convertido en grandes amigas. Y a Luis Pacheco: siempre es un gusto trabajar contigo amigo.

Gracias a todos en el CEIB por su apoyo en todos los sentidos, especialmente a Martín y a la Dra. Rayo.

Agradezco de forma particular a mi comité tutoral, porque hicieron posible que sacara lo mejor de mí en cada etapa. En especial al Dr. Folch, quien ha estado en mis tribunales desde la maestría: sus comentarios siempre han contribuido a mi crecimiento académico y me han motivado de una manera muy positiva. A la Dra. Katerina, por su compromiso constante y por cuidar que este documento tenga el rigor que merece.

Gracias a México por tanto. A la UAEM y a CONACYT, por su respaldo.

Gracias a Heidy, por ser una hermana.

A Tona, quien ha sido un gran maestro desde que llegó a mi vida, por sacar tantas cosas buenas de mí y por su inmenso amor.

A mi familia, porque todo en mi vida es posible gracias a ellos. A mi tío, a mi mamá maravillosa —una verdadera bendición—, a mi papá Pipo, el mejor del mundo, y a los hermanos más espectaculares que Dios me dio. Amy y Mauro, ustedes removieron mi vida con tanto amor: todo lo que hago es pensando en ustedes.

A mami y a papá, aunque no estén físicamente, los siento presentes en cada momento, alumbrando mi camino. Soy la persona más afortunada del mundo por la familia que me tocó. Gracias, mami y mama, por enseñarme lo que es ser amada incondicionalmente.

Y gracias a mí: por haber aprendido a quererme, por reconocer lo fuerte y capaz que soy, por haber logrado esto y saber que soy capaz de lograr mucho más. Gracias a Dios, al universo, o a lo que sea que hoy resuene conmigo y me mantiene conectada y despierta.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi familia ellos son lo más importante de mi vida. Pero especialmente se la quiero dedicar a mi abuela Isabel (alias mami).

Índice

Listado de Abreviaturas ..... - 2 -

Resumen ..... - 3 -

Abstract ..... - 5 -

1-Introducción General ..... - 7 -

1.1- Potenciales rutas de transmisión de especies de *Exophiala*, centrando la atención en *Exophiala dermatitidis*. ..... - 8 -

1.2-Adaptaciones que favorecen la extremotolerancia y el oportunismo en especies de *Exophiala*, con énfasis en *Exophiala dermatitidis*. ..... - 9 -

1.3-Características generales de *Exophiala dermatitidis*. ..... - 12 -

2-Antecedentes ..... - 14 -

Hipótesis ..... - 17 -

Objetivo general ..... - 17 -

Objetivos específicos ..... - 17 -

3-Metodología General ..... - 20 -

4-Referencias ..... - 24 -

Capítulo 1: Caracterización fisiológica y metabólica ..... - 30 -

5-Introducción Capítulo 1 ..... - 30 -

6-Metodología Capítulo 1 ..... - 31 -

6.1. Caracterización fisiológica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos. ..... - 31 -

6.1.1. Análisis filogenético de cepas de *Exophiala dermatitidis* a partir de la región ITS del ARNr. ..... - 31 -

6.1.2. Caracterización de la tolerancia a condiciones extremas de temperatura, concentraciones de NaCl y pH en una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis*... - 31 -

6.1.3. Caracterización de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes naturales y clínicos en cuanto a resistencia a antimicóticos, producción de hemólisis y formación de biopelículas. ..... - 31 -

6.2. Caracterización metabólica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos. ..... - 32 -

6.2.1. Evaluación del crecimiento de cepas de *Exophiala dermatitidis* en presencia de neurotransmisores (dopamina, serotonina, epinefrina y norepinefrina) y compuestos aromáticos (fenol, 1,2,4-bencenotriol, naftaleno y fenantreno) como única fuente de carbono. ..... - 32 -

6.2.2. Caracterización metabólica de *Exophiala dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310) mediante la metodología de microarreglos de fenotipos YT MicroPlateTM Biolog. ..... - 33 -

6.3. Inhibición de melanina en cepas de *Exophiala dermatitidis* y exposición a una variedad de pH, temperaturas, concentraciones de NaCl, neurotransmisores y compuestos aromáticos. ..... - 34 -

6.4. Análisis estadísticos ..... - 35 -

7-Resultados Capítulo 1 ..... - 36 -

7.1. Caracterización fisiológica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos ..... - 36 -

7.1.1. Análisis filogenético de la colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* a partir de la región ITS del ARNr ..... - 36 -

7.1.2. Poliextremotolerancia en cepas de *Exophiala dermatitidis*, creciendo bajo diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y valores de pH ..... - 37 -

7.1.3. Formación de biopelículas, actividad hemolítica y resistencia a antifúngicos en cepas de *Exophiala dermatitidis* ..... - 39 -

7.2 Caracterización metabólica y molecular de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos ..... - 40 -

7.2.1. Utilización de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos en cepas de *Exophiala dermatitidis* ..... - 40 -

7.2.2. Caracterización metabólica de alto rendimiento de cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* ..... - 42 -

7.3. Efecto de la inhibición de la melanina en cepas de *Exophiala dermatitidis* crecidas en diferentes pHs, temperaturas, concentraciones de NaCl y la presencia de neurotransmisores y compuestos policíclicos. ..... - 45 -

8-Discusión Capítulo 1 ..... - 47 -

9-Conclusiones Capítulo 1 ..... - 53 -

10-Referencias Capítulo 1 ..... - 54 -

Capítulo 2: Análisis genómico y pangenómico ..... - 59 -

11- Introducción Capítulo 2 ..... - 59 -

12-Metodología Capítulo 2 ..... - 60 -

12.1 Análisis de los genomas de las cepas EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 de *Exophiala dermatitidis.* ..... - 60 -

12.2- Análisis del pangenoma entre las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* y los genomas de referencia disponibles en NCBI. ..... - 60 -

12.3- Análisis estadísticos ..... - 61 -

13-Resultados Capítulo 2 ..... - 62 -

13.1 Identificación de enzimas activas de carbohidratos y vías metabólicas de catabolismo de xenobióticos y neurotransmisores mediante análisis genómico de cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* ..... - 62 -

13.2- Identificación de dominios virulentos en cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis.* ..... - 66 -

13.3- Análisis del pangenoma entre las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* y los genomas de referencia disponibles en NCBI. ..... - 67 -

14-Discusión Capítulo 2 ..... - 71 -

15-Conclusiones Capítulo 2 ..... - 74 -

16-Referencias Capítulo 2 ..... - 75 -

Capítulo 3: Metabolismo en presencia de compuestos aromáticos ..... - 78 -

17-Introducción Capítulo 3 ..... - 78 -

18-Metodología Capítulo 3 ..... - 80 -

18.1- Caracterización de la curva de crecimiento de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 80 -

18.2- Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 80 -

18.3- Análisis de los metabolomas de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-becenotriol como única fuente de carbono. ..... - 80 -

18.4- Caracterización de la utilización mitocondrial de sustratos por *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 mediante MitoPlate™ S-1 de Biolog crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 81 -

19-Resultados Capítulo 3 ..... - 83 -

19.1- Caracterización de la curva de crecimiento de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 83 -

19.2- Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) de la cepa *Exophiala dermatititids* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 84 -

19.3- Análisis de los metabolomas de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-becenotriol como única fuente de carbono. ..... - 85 -

19.4- Caracterización de la utilización mitocondrial de sustratos por *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 mediante MitoPlate™ S-1 de Biolog crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono. ..... - 88 -

20-Discusión Capítulo 3 ..... - 91 -

21-Conclusiones Capítulo 3 ..... - 94 -

22-Referencias Capítulo 3 ..... - 95 -

Capítulo 4: Impacto del estrés osmótico en el metabolismo ..... - 97 -

23-Introducción Capítulo 4 ..... - 97 -

24-Metodología Capítulo 4 ..... - 99 -

24.1. Caracterización de la capacidad osmotolerante de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas. ..... - 99 -

24.1.1. Crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en medio sólido. ..... - 99 -

24.1.2. Perfil metabólico de alto rendimiento utilizando tecnología Biolog en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis.* ..... - 99 -

24.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones extremas de sales caotrópicas y cosmotrópicas a diferentes temperaturas. ..... - 100 -

24.2. Análisis estadísticos ..... - 100 -

25-Resultados Capítulo 4 ..... - 101 -

25.1. Caracterización de la capacidad osmotolerante de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas. ..... - 101 -

25.1.1. Crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en medio sólido. ..... - 101 -

25.1.2. Perfil metabólico de alto rendimiento utilizando tecnología Biolog en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* ..... - 102 -

25.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones extremas de sales caotrópicas y cosmotrópicas a diferentes temperaturas. ..... - 105 -

26-Discusión Capítulo 4 ..... - 107 -

27-Conclusiones Capítulo 4 ..... - 110 -

28-Referencias Capítulo 4 ..... - 111 -

29-Perspectivas futuras ..... - 114 -

Anexos ..... - 116 -

Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Español	Inglés
FQ	Fibrosis quística	Cystic Fibrosis
EVs	Vesículas extracelulares	Extracellular Vesicles
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive Oxygen Species
UV	Ultravioleta	Ultraviolet
DHN-melanina	Dihidroxinaftaleno-melanina	Dihydroxynaphthalene-melanin
DOPA-melanina	Dihidroxifenilalanina-melanina	Dihydroxyphenylalanine-melanin
DHN	1,8-Dihidroxinaftaleno	1,8-Dihydroxynaphthalene
ECM	Matriz extracelular protectora	Extracellular Matrix
SOD	Superóxido dismutasa	Superoxide Dismutase
ncRNAs	ARNs no codificantes	Non-coding RNAs
ARNs	Ácidos ribonucleicos	Ribonucleic Acids
ARNt	ARN de transferencia	Transfer RNA (tRNA)
ARNr	ARN ribosomal	Ribosomal RNA (rRNA)
snoRNAs	ARNs pequeños nucleolares	Small Nucleolar RNAs
PAH	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
CFU	Unidades formadoras de colonias	Colony Forming Units
CARD9	Caspase Recruitment Domain Family Member 9	Caspase Recruitment Domain Family Member 9
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
ITS	Espaciador transcrito interno	Internal Transcribed Spacer
SSU	Subunidad pequeña	Small Subunit
PKS1	Poliquétido sintasa	Polyketide Synthase 1
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas9	Proteína asociada a CRISPR 9	CRISPR-associated Protein 9
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic Acid (DNA)
ADNr	ADN ribosomal	Ribosomal DNA
SDS	Sulfato de dodecilo de sodio	Sodium Dodecyl Sulfate
MM	Medio mínimo	Minimal Medium
MEA	Malt Extract Agar	Malt Extract Agar
MEB	Malt Extract Broth	Malt Extract Broth
PCA	Análisis de componentes principales	Principal Component Analysis
pH	Potencial de hidrógeno	Hydrogen Potential
WGDs	Duplicaciones del genoma completo	Whole-Genome Duplications
RNAse A	Ribonucleasa A	Ribonuclease A
GO	Ontología génica	Gene Ontology
KO	Identificadores de ortología KEGG	KEGG Orthology Identifiers
CAZy	Enzimas activas de carbohidratos	Carbohydrate-Active enZymes
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Reduced)
GH	Glicosidasas	Glycoside Hydrolases
AA	Actividades auxiliares	Auxiliary Activities
GT	Glicosiltransferasas	Glycosyltransferases
CE	Carbohidrato esterasa	Carbohydrate Esterases
PL	Liasas de polisacáridos	Polysaccharide Lyases
CBM	Módulos de unión a carbohidratos	Carbohydrate-Binding Modules
CAZyme	Enzimas CAZy	CAZy Enzymes
SNC	Sistema nervioso central	Central Nervous System (CNS)
ACh	Acetilcolina	Acetylcholine
CLSM	Microscopía Confocal de Barrido Láser	Confocal Laser Scanning Microscopy
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	High-Performance Liquid Chromatography
ESI	Ionización por electrospray	Electrospray Ionization
UHPLC-MS	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida	Ultra High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
$FADH_2$	Flavín adenina dinucleótido reducido	Flavin Adenine Dinucleotide (Reduced)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced)
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	Tricarboxylic Acid Cycle
AUC	Área bajo la curva	Area Under the Curve
MAO	Monoaminooxidasa	Monoamine Oxidase
COMT	Catecol-O-metiltransferasa	Catechol-O-Methyltransferase
aw	Actividad del agua	Water Activity
HOG	Osmolaridad de glicerol	High Osmolarity Glycerol
PTMs	Modificaciones postraduccionales	Post-Translational Modifications
LDA	Análisis Discriminante Lineal	Linear Discriminant Analysis

Resumen

Exophiala dermatitidis es una levadura melanizada poliextremotolerante y el principal patógeno oportunista de su género, capaz de colonizar a individuos inmunocomprometidos e incluso invadir el sistema nervioso central. Las adaptaciones que le permiten crecer en ambientes extremos también favorecen su oportunismo. *E. dermatitidis* ha sido aislada de una gran diversidad de ambientes, desde naturales hasta urbanos, por lo que es fundamental comprender si el sitio de aislamiento confiere ventajas adaptativas que favorecen su poliextremotolerancia y versatilidad metabólica. Por ello, en esta investigación se realizó un análisis polifásico de *E. dermatitidis* bajo diversas condiciones de estrés, con el objetivo de profundizar en las adaptaciones asociadas a su capacidad poliextremotolerante, su potencial oportunista y su adaptación a nichos extremos.

En este estudio, se analizaron 41 cepas de *E. dermatitidis* aisladas de ambientes naturales, urbanos y clínicos, evaluando su crecimiento a diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y niveles de pH. El crecimiento óptimo se observó a 28 °C, aunque hubo una gran variabilidad entre cepas en un rango de 4 a 42 °C. La adición de 5 % de NaCl favoreció el crecimiento y algunas cepas toleraron concentraciones de hasta 10 % y 17 %. Se detectó crecimiento en un amplio rango de pH, desde 2.5 hasta 12.5. La mayoría de las cepas mostraron una mayor formación de biopelículas a 37 °C, actividad hemolítica α y γ, y resistencia a antifúngicos. Se observó un mejor crecimiento en neurotransmisores que en compuestos poliaromáticos. Los análisis metabólicos de alto rendimiento revelaron patrones consistentes de oxidación en 94 fuentes de carbono en cinco cepas seleccionadas de distintos ambientes (EXF-5586, EXF-9187, EXF-13310, EXF-8193 y EXF-10123). La inhibición química de la biosíntesis de melanina con tricicazol en estas cinco cepas tuvo un impacto mínimo en el crecimiento bajo condiciones de estrés, aunque indujo cambios morfológicos en algunas de ellas.

El análisis genómico de estas cinco cepas seleccionadas reveló una amplia diversidad de enzimas activas sobre carbohidratos, así como rutas para la degradación de hidrocarburos poliaromáticos y neurotransmisores, que podrían estar involucradas en el metabolismo de estos compuestos. Los resultados indican que, a pesar de compartir el mismo trasfondo genético, existen diferencias notables en los patrones de crecimiento en presencia de hidrocarburos poliaromáticos y neurotransmisores, lo que podría estar relacionado con su sitio de aislamiento. Sin embargo, dominios asociados a virulencia estuvieron presentes en todos los genomas analizados.

Por otro lado, el análisis del pangenoma abierto de *E. dermatitidis*, realizado con estas cinco cepas y genomas de referencia disponibles en NCBI, mostró una estrecha relación entre las cepas clínicas, posiblemente debido a presiones evolutivas asociadas al sitio de aislamiento. Mientras tanto, las cepas aisladas de lavavajillas presentaron una alta similitud de secuencias y mínima divergencia genética, en contraste con la cepa proveniente de un ambiente natural, que mostró una mayor divergencia genética y características evolutivas únicas. Estos hallazgos sugieren que podríamos estar observando un proceso de especiación en tiempo real dentro de *E. dermatitidis*.

Algunos estudios indican que, en hongos, la capacidad de metabolizar compuestos fenólicos e hidrocarburos es un factor clave de virulencia que facilita las infecciones en el sistema nervioso central. Por ello, se caracterizó el metabolismo de la cepa clínica EXF-10123 de *E. dermatitidis* en presencia del neurotransmisor dopamina y del compuesto fenólico 1,2,4-bencenotriol como únicas fuentes de carbono. Los análisis metabolómicos revelaron que la dopamina no fue completamente metabolizada, mientras que el 1,2,4-bencenotriol podría haber sido degradado por completo sin acumulación de productos detectables. Además, se observó una mayor actividad metabólica mitocondrial en respuesta al 1,2,4-bencenotriol.

E. dermatitidis ha sido aislada de ambientes domésticos como lavavajillas, fregaderos y baños, donde pueden ocurrir períodos de baja actividad de agua o acumulación de sales debido a los productos de limpieza utilizados en estos sitios. Se considera que la ruta de entrada de *E. dermatitidis* a estos entornos domésticos es el agua proveniente de ambientes naturales. Esta levadura melanizada también ha sido aislada de ambientes naturales como glaciares, que pueden contener altas concentraciones de iones tóxicos atrapados entre los cristales de hielo. Se han observado diferencias en el crecimiento de la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis*, aislada de un glaciar, en presencia de sales caotrópicas y

cosmotrópicas. Los patrones de asimilación varían según el tipo de sal, lo que sugiere que estas influyen en los procesos metabólicos. Por ejemplo, sales como NaCl y KCl favorecen la oxidación de azúcares, mientras que $MgCl_2$ y LiCl tienen efectos variables.

Estos hallazgos destacan la naturaleza poliextremófila urbana de *E. dermatitidis*, su alta resiliencia, adaptabilidad metabólica y potencial patogénico en un contexto de cambio global.

Abstract

Exophiala dermatitidis is a melanized, polyextremotolerant yeast and the main opportunistic pathogen of its genus, capable of colonizing immunocompromised individuals and and even invade the central nervous system. The adaptations that enable its survival in extreme environments also enhance its opportunistic potential. *E. dermatitidis* has been isolated from a wide range of environments, from natural to urban settings, making it crucial to understand whether its site of isolation provides adaptive advantages that contribute to its polyextremotolerance and metabolic versatility. Therefore, this study conducted a polyphasic analysis of *E. dermatitidis* under various stress conditions to explore the adaptations associated with its polyextremotolerant capacity, opportunistic potential, and ability to colonize extreme niches.

In this study, 41 strains of *E. dermatitidis* isolated from natural, urban, and clinical environments were analyzed to assess their growth at different temperatures, NaCl concentrations, and pH levels. Optimal growth was observed at 28 °C, although there was considerable variability among strains, ranging from 4 to 42 °C. The addition of 5% NaCl promoted growth, with some strains tolerating concentrations as high as 10% and 17%. Growth was detected across a wide pH spectrum, from 2.5 to 12.5. Most strains exhibited increased biofilm formation at 37 °C, α and γ hemolysis, and resistance to antifungal agents. Growth was generally better in neurotransmitters than in polyaromatic compounds. High-throughput metabolic analyses revealed consistent oxidation patterns across 94 carbon sources in five selected strains isolated from different environments (EXF-5586, EXF-9187, EXF-13310, EXF-8193, and EXF-10123). Inhibiting melanin biosynthesis with tricyclazole in these five strains had minimal impact on growth under stress conditions, although it induced morphological changes in some of them.

Genomic analysis of these five selected strains revealed a wide diversity of carbohydrate-active enzymes, as well as pathways for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and neurotransmitters, potentially involved in the metabolism of these compounds. The results indicate that despite sharing the same genetic background, notable differences exist in growth patterns in the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons and neurotransmitters, which may be related to their isolation source. However, virulence-associated domains were present in all analyzed genomes.

Additionally, the open pangenome analysis of *E. dermatitidis*, incorporating these five strains along with reference genomes available in NCBI, revealed a close relationship among clinical strains, possibly linked to evolutionary pressures associated with their isolation site. In contrast, strains isolated from dishwashers exhibited high sequence similarity and minimal genetic divergence, whereas the strain from a natural environment displayed greater genetic divergence and unique evolutionary traits. These findings suggest that we may be witnessing real-time speciation within *E. dermatitidis*.

Some studies indicate that in fungi, the ability to metabolize phenolic compounds and hydrocarbons is a key virulence factor that facilitates infections in the central nervous system. Therefore, the metabolism of the clinical strain EXF-10123 of *E. dermatitidis* was characterized in the presence of the neurotransmitter dopamine and the phenolic compound 1,2,4-benzenetriol as sole carbon sources. Metabolomic analyses revealed that dopamine was not completely metabolized, whereas 1,2,4-benzenetriol may have been fully degraded without detectable accumulation of byproducts. Additionally, increased mitochondrial metabolic activity was observed in response to 1,2,4-benzenetriol.

E. dermatitidis has been isolated from domestic environments such as dishwashers, sinks, and bathrooms, where periods of low water activity or salt accumulation may occur due to cleaning products used in these areas. It is believed that *E. dermatitidis* enters these domestic environments through water originating from natural habitats.

This melanized yeast has also been isolated from natural environments such as glaciers, which can contain high concentrations of toxic ions trapped within ice crystals. Differences in the growth of the glacier-isolated strain EXF-8193 of *E. dermatitidis* have been observed in the presence of chaotropic and kosmotropic salts. Assimilation patterns vary depending on the type of salt, suggesting that salts influence metabolic processes. For instance, NaCl and KCl enhance sugar oxidation, whereas $MgCl_2$ and LiCl have variable effects.

These findings highlight the urban polyextremophilic nature of *E. dermatitidis*, its high resilience, metabolic adaptability, and pathogenic potential in the context of global change.

1-Introducción General

El género *Exophiala*, clasificado dentro de la clase Ascomycetes y la familia *Herpotrichiellaceae*, comprende aproximadamente 63 especies reconocidas (Isola et al., 2021; Thitla et al., 2022). Las especies del género, comúnmente conocidas como levaduras negras (del inglés: *black yeasts*), se destacan por su capacidad para sintetizar melanina, un polímero que parece mejorar significativamente su resistencia en condiciones ambientales extremas (Carr et al., 2023).

El género *Exophiala*, se distingue por su notable poliextremotolerancia y su adaptabilidad a diversos entornos. Su versatilidad nutricional y su capacidad para tolerar una amplia gama de estrés ambiental les permiten crecer en ambientes extremos (Gostinčar et al., 2022). Las adaptaciones que permiten la supervivencia en estos entornos extremos incluyen la producción de melanina, la síntesis de metabolitos secundarios, modificaciones en la composición de la membrana, la acumulación de solutos compatibles, el polimorfismo y la formación de biopelículas (Blasi et al., 2015; Kirchhoff et al., 2019; Romsdahl et al., 2021; Zakharova et al., 2013). Como especie tipo de su género, *E. dermatitidis* ejemplifica estos rasgos poliextremotolerantes, demostrando una capacidad excepcional para sobrevivir y proliferar en nichos ecológicos desafiantes y variados.

Más allá de su extremotolerancia, las especies pertenecientes al género *Exophiala* poseen un repertorio enzimático versátil, destacándose por su asimilación de hidrocarburos (Ide-Pérez et al., 2020). Esta capacidad les permite prosperar en entornos contaminados y ofrece un potencial biotecnológico para la biorremediación ambiental. Sin embargo, su aplicación debe considerarse con cautela debido a su potencial patogénico (Prenafeta-Boldú et al., 2006; Romsdahl et al., 2021; Zhang et al., 2019). Adicionalmente, muchas de las características que permiten a especies de *Exophiala* y otros miembros de la familia *Herpotrichiellaceae* persistir en entornos extremos y contaminados también contribuyen con su característico oportunismo (Gostinčar et al., 2011; Prenafeta-Boldú et al., 2006). Adaptaciones como el metabolismo de hidrocarburos, la producción de melanina y la tolerancia extrema al estrés, fundamentales para su supervivencia en ecosistemas hostiles, podrían simultáneamente favorecer su persistencia en entornos clínicos (Prenafeta-Boldú et al., 2006). En particular, la capacidad de asimilar compuestos fenólicos e hidrocarburos se ha propuesto como un posible factor de virulencia, especialmente en infecciones del sistema nervioso central causadas por especies como *Exophiala asiatica*, *Exophiala jeanselmei* y *E. dermatitidis* (Lavrin et al., 2020; Li et al., 2011; Prenafeta-Boldú et al., 2006).

En el ámbito clínico, *E. dermatitidis* es la especie de mayor relevancia dentro del género *Exophiala* (Lavrin et al., 2020). *E. dermatitidis* es un colonizador frecuente del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística (FQ) y tiene una importancia particular en individuos inmunocomprometidos. En Asia, se han reportado infecciones neurotrópicas cerebrales fatales en personas previamente sanas (Kirchhoff et al., 2019). Además de *E. dermatitidis*, otras especies como *E. jeanselmei, Exophiala spinifera, Exophiala mesophila, Exophiala oligosperma, Exophiala xenobiotica* y *Exophiala arunalokei* también han sido aisladas de pacientes humanos, evidenciando su asociación con infecciones en humanos (Singh et al., 2021).

Desde una perspectiva evolutiva, el género *Exophiala* constituye un modelo excepcional para investigar los procesos de adaptación y especiación, dada su capacidad para habitar entornos extremos y alternar entre distintas estrategias ecológicas (Babič et al., 2018; Chen et al., 2014; De Hoog et al., 2006; Ide-Pérez et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006; Thitla et al., 2022; Zalar et al., 2011). Además, la relación entre su resistencia ambiental y su potencial patogénico sugiere que las infecciones oportunistas de especies de *Exophiala* podrían haber surgido como una respuesta evolutiva a presiones selectivas en ecosistemas con escasez de nutrientes y altos niveles de estrés fisicoquímico (Gostinčar

et al., 2011; Matos et al., 2002). El análisis de estas trayectorias evolutivas permite profundizar en los mecanismos que sustentan la poliextremotolerancia y la patogenicidad fúngica, ofreciendo una visión más amplia sobre sus estrategias de supervivencia y sus implicaciones tanto para la salud humana como para la ecología ambiental.

1.1- Potenciales rutas de transmisión de especies de *Exophiala*, en particular de *Exophiala dermatitidis*.

Los procesos de industrialización han dado lugar a la creación de ambientes artificiales con condiciones fisicoquímicas inusuales que, aunque comunes en entornos urbanos, son extremas desde una perspectiva microbiológica (Gostinčar et al., 2011). Entre otros ejemplos de ambientes domésticos, se incluyen baños, cocinas y, de manera destacada, máquinas lavaplatos, los cuales comparten condiciones fisicoquímicas extremas como altas temperaturas, presencia intermitente de agua, periodos de baja actividad de agua durante fases secas y variaciones abruptas en la humedad relativa. Además, estos espacios interiores están sujetos a una exposición constante a agentes químicos, incluidos desinfectantes, detergentes y compuestos oxidantes como blanqueadores o peróxido de hidrógeno, así como a materiales sintéticos y contaminantes poco comunes en la naturaleza, como plásticos y compuestos aromáticos (Levy, 2001; Górny, 2004; Tringe et al., 2008; Gostinčar et al., 2011; Zalar et al., 2011; Babič et al., 2018). Estas condiciones son consideradas extremas para la mayoría de los microorganismos no adaptados, ya que imponen presiones de selección similares a las que se encuentran en entornos naturales hostiles (Tringe et al., 2008).

En este contexto, ciertas levaduras negras poliextremotolerantes, como las del género *Exophiala*, han demostrado una notable capacidad de persistencia y crecimiento en dichos ambientes (Zalar et al., 2011). Esta capacidad se atribuye a adaptaciones fisiológicas que les permiten tolerar el estrés térmico, osmótico, oxidativo, fluctuaciones de pH, entre otras (Zalar et al., 2011; Babič et al., 2018; Zajc et al., 2019). Tales adaptaciones, adquiridas o seleccionadas en ambientes domésticos extremos, podrían representar una preadaptación a la patogenicidad en humanos, ya que las mismas características que les confieren resistencia en estos nichos también son útiles para sobrevivir en tejidos humanos y evadir mecanismos inmunológicos (Gostinčar et al., 2011; Li et al., 2008). Un ejemplo claro es *E. dermatitidis*, especie recurrentemente aislada de baños de vapor, máquinas lavaplatos, y otros aparatos domésticos en contacto frecuente con el agua (Zupančič et al., 2016; Babič et al., 2018; Kondori et al., 2024). En estos entornos se han identificado múltiples genotipos coexistiendo, lo cual plantea la posibilidad de recombinación genética *in situ* y la emergencia de nuevas variantes con potencial patógeno desconocido (Zalar et al., 2011; Babič et al., 2018). En países desarrollados, el sistema de agua potable representa una vía directa de conexión entre los ambientes acuáticos naturales y el entorno doméstico, lo que podría facilitar la dispersión de estos microorganismos desde reservorios ambientales hacia espacios habitados por humanos. Esto sugiere que el hogar moderno puede actuar como un ecosistema de selección y transmisión para hongos oportunistas como *E. dermatitidis* (Figura 1), (Babič et al., 2018).

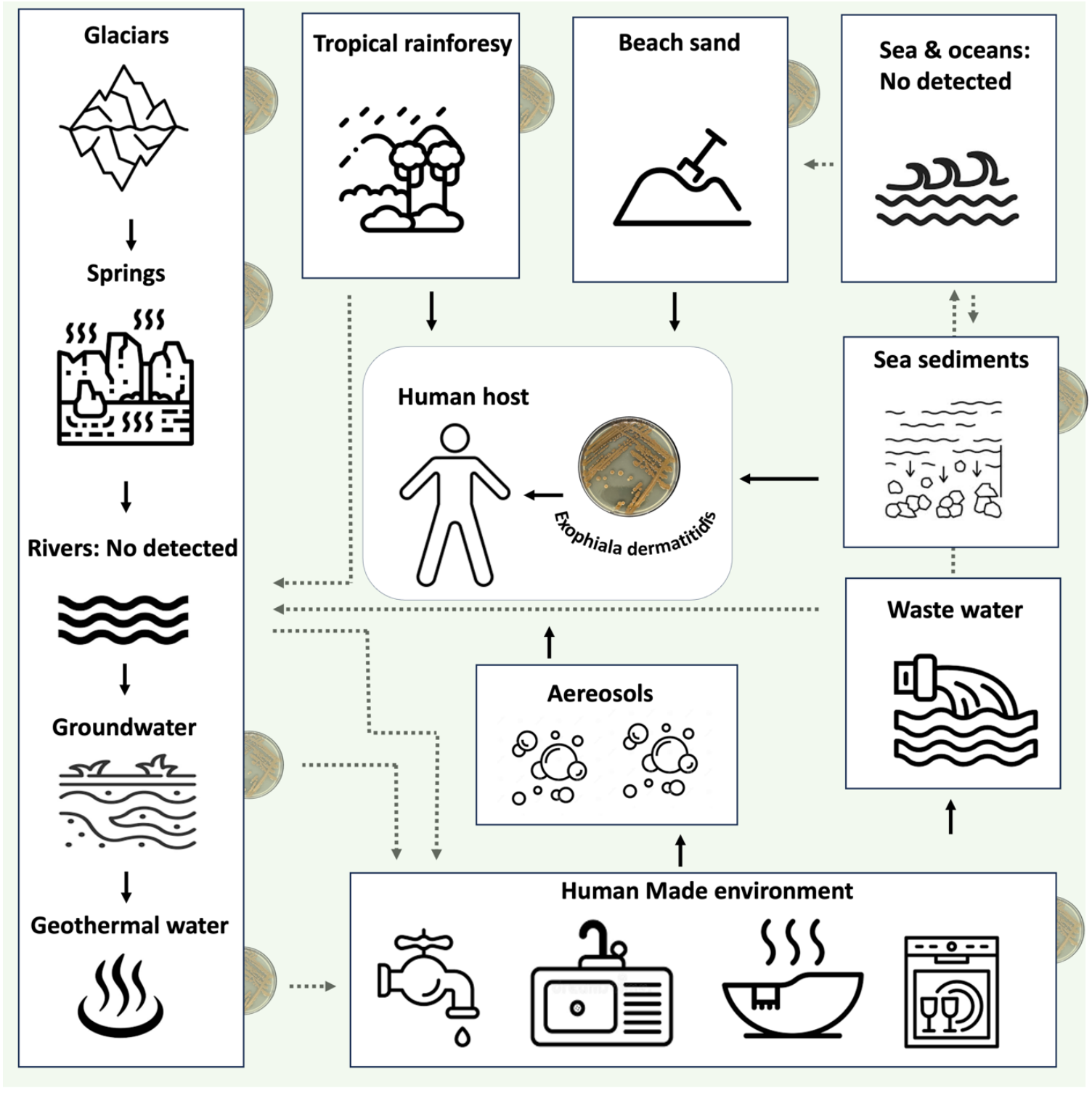


Figura 1. Presencia de *Exophiala dermatitidis* en ambientes naturales y creados por el hombre. Esta figura ilustra las potenciales vías de transmisión entre los diferentes ambientes (líneas continuas) y las vías potenciales de transmisión en humanos (líneas discontinuas).

1.2-Adaptaciones que favorecen la extremotolerancia y el oportunismo en especies de *Exophiala*, con énfasis en *Exophiala dermatitidis.*

Especies versátiles como *E. dermatitidis* están en contacto frecuente con humanos debido a su capacidad de colonizar diversos hábitats, entre ellos los ambientes domésticos o interiores. La colonización de este tipo de ambientes resulta de particular importancia debido a su capacidad de causar ocasionalmente infecciones oportunistas en humanos (Černoša et al., 2021; Lavrin et al., 2020). En este sentido, muchas de las adaptaciones que favorecen el oportunismo también favorecen la poliextremotolerancia (Černoša et al., 2021). Entre estas adaptaciones se encuentra la termotolerancia, el polimorfismo, la melanización, la tolerancia al estrés oxidativo, la producción de vesículas extracelulares (EVs), la formación de biopelículas, la degradación de compuestos aromáticos, la plasticidad genómica y potencial adaptativo, entre otras (Eisenman et al., 2020; Gostinčar et al., 2011; Kurbessoian et al., 2023; Lavrin et al., 2020; Slepecky and Starmer, 2009; Zalar et al., 2008).

La termotolerancia es el rasgo de principal importancia en las especies patógenas, debido a su habilidad de crecer a temperatura corporal (37 °C), lo que les permite causar infecciones en humanos (Gostinčar et al., 2011). Esta capacidad de adaptación permite que las especies del género *Exophiala* prosperen en una amplia variedad de entornos extremos y contrastantes, que van desde desiertos (Madrid et al., 2023) y formaciones rocosas (Thitla et al., 2022) hasta glaciares (Branda et al., 2010) y selvas tropicales (Sudhadham et al., 2008). Además, han sido identificadas en ambientes urbanos y estructuras artificiales creadas por el ser humano (Gümral et al., 2016), lo que demuestra su notable versatilidad ecológica. Especies como *E. dermatitidis* y *E. phaeomuriformis*, se han aislado con frecuencia de ambientes domésticos, incluidos lavavajillas, donde

soportan condiciones extremas como altas temperaturas (hasta 80 °C), humedad fluctuante y pH tanto alcalinos como ácidos (Zalar et al., 2011; Zupančič et al., 2016). Estudios transcriptómicos han demostrado que las bajas temperaturas (por ejemplo, 1 °C) generan una mayor inhibición del crecimiento en *E. dermatitidis* en comparación con temperaturas más elevadas (como 45 °C). La adaptación al frío en esta especie implica la sobreexpresión de genes de alfa-amilasa asociados a la síntesis de 1,3-glucano, la biosíntesis de trehalosa como mecanismo de crioprotección y una reducción en la actividad metabólica, evidenciada por menores niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (Blasi et al., 2015; Tesei et al., 2015). Estas respuestas resaltan la capacidad de la especie para modificar su fisiología y soportar condiciones de congelación.

Por otra parte, el dimorfismo es una característica distintiva de las especies de *Exophiala* que les permite transicionar entre formas levaduriformes y miceliales (Carr et al., 2023) en respuesta a factores de estrés ambiental como cambios abruptos en el pH, la temperatura o la actividad del agua. Esta flexibilidad morfológica mejora su capacidad para invadir y colonizar huéspedes, incrementando así su potencial patogénico (Kirchhoff et al., 2019, 2017). Existe una fuerte relación entre el dimorfismo y el aumento de la virulencia (Kirchhoff et al., 2019), ya que las transiciones dimórficas contribuyen a la adaptabilidad y patogenicidad de *E. dermatitidis*. Para muchos hongos patógenos el principal detonante de esta trasformación morfológica es la temperatura (Slepecky y Starmer, 2009). Wang y Szaniszlo (2009) destacaron el papel crítico del factor de transcripción PacC en la regulación de estas transiciones en *E. dermatitidis*. Además, se ha identificado al factor de transcripción APSES como un regulador clave del desarrollo celular fúngico, influyendo tanto positiva como negativamente en el dimorfismo de *E. dermatitidis* (Kirchhoff et al., 2019). Estos hallazgos subrayan la importancia del dimorfismo como un mecanismo adaptativo y un factor que contribuye al éxito ecológico y patogénico de *Exophiala*.

Una de las características distintivas de las especies de *Exophiala* es su capacidad para producir melanina, un polímero complejo ampliamente reconocido por sus propiedades protectoras (Kirchhoff et al., 2019; Suthar et al., 2023). La melanina desempeña múltiples funciones defensivas, como conferir resistencia a metales tóxicos, mitigar el estrés oxidativo mediante la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno, proteger de la radiación ultravioleta (UV) y favorecer la tolerancia a la desecación. Estas propiedades contribuyen a la capacidad de supervivencia de los hongos melanizados, como los pertenecientes al género *Exophiala*, en ambientes extremos (Carr et al., 2023). La producción de melanina en este género ocurre a través de tres rutas metabólicas diferenciadas: la vía de la DHN-melanina, la vía de la DOPA-melanina y la degradación de L-tirosina (Carr et al., 2023; Chen et al., 2014). En especies como *E. dermatitidis*, la melanina se sintetiza de manera endógena mediante la ruta del pentaquétido, que corresponde a la vía de la DHN-melanina, que es la más estudiada en hongos (Geis et al., 1984; Wheeler et al., 2008). Este proceso culmina con la polimerización del 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN), que representa el paso final en la síntesis de melanina (Wheeler et al., 2008). La enzima poliketido sintasa, codificada por el gen *WdPKS1*, es fundamental en la producción de melanina en *E. dermatitidis* (Paolo et al., 2006). En *E. dermatitidis*, la biosíntesis de melanina está finamente regulada por el pH y la temperatura, lo que indica su importancia en la tolerancia al estrés. Bajo condiciones ácidas, se incrementa la síntesis de DHN-melanina, con la participación de genes como *pks1*, *ayg2*, *arp1*, *abr2* y *abr1*, que contribuyen a la resistencia al ácido. La vía de degradación de L-tirosina, regulada por el gen *hppD*, potencia la producción de piomelanina, reforzando la tolerancia al pH. De forma interesante, los genes asociados a la vía de la DOPA-melanina (*melC2* y *melO*) se expresan en un amplio rango de pH, lo que refleja su papel en la adaptabilidad ambiental (Chen et al., 2014). Sin embargo, la producción de melanina disminuye significativamente a bajas temperaturas, con la regulación negativa de las tres rutas biosintéticas (Blasi et al., 2015). Además, la melanina y sus genes asociados también desempeñan un papel crucial en la enfermedad: durante infecciones cutáneas a 37 °C, se sobreexpresan genes como *tat*, *fahA* y *hppD*, lo que resalta la implicación de la piomelanina en la virulencia. Esto se relaciona con la activación de la vía de melanina derivada de L-tirosina durante infecciones cutáneas, la cual favorece la invasión tisular y potencia la virulencia en *E. dermatitidis* (Poyntner et al., 2018).

Una adaptación importante del género *Exophiala* es su capacidad para formar biopelículas, una característica que no solo aumenta su patogenicidad, sino que también desempeña un papel crucial en su resiliencia ambiental y plasticidad para colonizar diversos hábitats (Kirchhoff et al., 2017). Las biopelículas son comunidades multicelulares encapsuladas en una matriz extracelular protectora (ECM), que proporciona protección física y química, permitiendo a *Exophiala* resistir el estrés ambiental y establecerse en entornos nuevos y desafiantes (Heinrichs et al., 2013; Kirchhoff et al., 2017). La ECM, compuesta por proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, crea un microambiente favorable para la colonización y la actividad metabólica. Dentro de estas biopelículas, las células de *Exophiala* pueden comunicarse y coordinarse, lo que conduce a una mayor resistencia a los factores de estrés y una eficiencia metabólica mejorada (Kirchhoff et al., 2017). La biopelícula de *E. dermatitidis* presenta una estructura de matriz única y una composición variable de la pared celular, que incluye melanina, lo que no solo influye en la actividad metabólica, sino que también mejora la resistencia a factores estresantes y la eficiencia metabólica, lo que contribuye a su potencial patogénico (Kirchhoff et al., 2017). Por ejemplo, se ha observado la formación de biopelículas en aislamientos clínicos de *E. dermatitidis*, y esta capacidad de adherirse a superficies, como los catéteres venosos centrales, probablemente juega un papel en la persistencia de la micosis en ciertos casos (Itoh et al., 2021).

Las EVs son una adaptación destacada en *Exophiala*, ya que desempeñan roles cruciales en la biología fúngica, la comunicación intercelular y el transporte de moléculas involucradas en la biogénesis de la pared celular y el metabolismo (Bleackley et al., 2019; Lavrin et al., 2020). Estas partículas con doble bicapa lipídica también están implicadas en la patogénesis, ya que transportan antígenos, toxinas y enzimas asociadas con la virulencia (Bleackley et al., 2019). El neurotropismo y la poliextremotolerancia de *E. dermatitidis* lo posicionan como un modelo ideal para explorar las funciones de las EVs en la adaptación fúngica en condiciones extremas y oportunismo. Como se menciona posteriormente en la sección de antecedentes, Lavrin et al. (2020) destacaron los efectos neurotóxicos de las EVs melanizadas de *E. dermatitidis* en células de neuroblastoma humano, mientras que las EVs no melanizadas mostraron una toxicidad significativamente menor. Estos autores también enfatizaron la conexión entre las EVs de *E. dermatitidis* y la patogenicidad, así como su papel en la comunicación celular.

La tolerancia al estrés oxidativo es una adaptación vital en el género *Exophiala*, que le permite sobrevivir en entornos desafiantes. Enzimas como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y las peroxirredoxinas desempeñan un papel clave en la neutralización de las ROS generadas bajo factores de estrés abiótico como altas temperaturas, radiación UV, salinidad y escasez de nutrientes (Breitenbach et al., 2015). Estas enzimas no solo refuerzan la resistencia de las especies de *Exophiala* a condiciones extremas, sino que también podrían estar implicadas en aumentar su virulencia, y esto lo demuestra su resistencia a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Zajc et al., 2019). Song et al. (2017) reportaron que *E. spinifera* y *E. dermatitidis* presentan actividad antioxidante, lo que les confiere la capacidad de sobrevivir y prosperar en ambientes con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Esta tolerancia se atribuye a la presencia de genes que codifican enzimas bifuncionales catalasa/peroxidasa. De manera similar, Zajc et al. (2019) exploraron la tolerancia al estrés oxidativo de *E. dermatitidis* en presencia de 20 mM de peróxido de hidrógeno e identificaron homólogos de enzimas clave en la respuesta al estrés oxidativo, incluidas catalasas, SOD y peroxirredoxinas.

La versatilidad nutricional de los hongos poliextremotolerantes incluye la capacidad de asimilar hidrocarburos y utilizarlos como fuente de carbono. Algunos estudios relacionan la asimilación de compuestos aromáticos como hidrocarburos policíclicos aromáticos con patrones específicos de la infección neural (Lavrin et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006). Especies como, *E. xenobiotica*, aislada de sitios contaminados con hidrocarburos, han demostrado una capacidad única para asimilar diésel y gasolina (tanques de automóviles, dispensadores de combustible y bombas de gasolina) como fuentes de carbono (Isola et al., 2021). *E. jeanselmei*, *E. lecanii-corni* y *E. oligosperma* han sido aisladas de sistemas

de filtración de aire diseñados para tratar gases contaminados con hidrocarburos, lo que destaca su potencial para descomponer contaminantes volátiles (Prenafeta-Boldú et al., 2005). Asimismo, *E. macquariensis* ha sido identificada en suelos subantárticos contaminados con tolueno (Zhang et al., 2019). De manera similar, *E. dermatitidis* ha sido aislado de traviesas de ferrocarril de roble tratadas con creosota, un conservante derivado del alquitrán de hulla rico en compuestos aromáticos tóxicos (Döğen et al., 2013).

Una de las adaptaciones más importantes del género *Exophiala* es su capacidad de modificar su genoma, lo que le permite adaptarse rápidamente a nuevos entornos (Kurbessoian et al., 2023). Estas modificaciones incluyen reordenamientos cromosómicos que generan nuevas configuraciones genéticas sobre las cuales puede actuar la selección natural (Farré and Ruiz-Herrera, 2020). Teixeira et al. (2017), analizaron los elementos transponibles en *E. aquamarina* y descubrieron que constituyen el 5.2% de su genoma, lo que podría haber favorecido su expansión en comparación con otros hongos negros. El análisis de 23 genomas de especies ambientales y oportunistas dentro del orden *Chaetothyriales* ha proporcionado información valiosa sobre la plasticidad genómica y la adaptación a nichos específicos en el género *Exophiala*. En *E. dermatitidis*, la expresión de ARNs no codificantes (ncRNAs) y ARNt varía en respuesta al estrés térmico. A 1°C, se observa una mayor regulación positiva de ncRNAs, mientras que ciertos ARNs pequeños nucleolares (snoRNAs) intrónicos y ARNt procesados muestran patrones de expresión independientes, lo que sugiere un papel clave en la respuesta al estrés (Blasi et al., 2015). Por otro lado, el análisis del genoma y transcriptoma de *E. dermatitidis*, realizado por Chen et al. (2014), reveló que este hongo patógeno presenta una notable plasticidad genómica. Su adaptación a condiciones ambientales adversas se debe a la presencia de una diversidad de genes y mecanismos regulatorios. Por ejemplo, *E. dermatitidis* ha perdido la capacidad de sintetizar alfa-glucano, un componente común de la pared celular en otros patógenos que les ayuda a evadir el sistema inmunológico. Además, su genoma codifica múltiples genes de sintasas de quitina y regula fuertemente la expresión de genes relacionados con la síntesis de la pared celular en respuesta al estrés por pH. Asimismo, cuenta con tres rutas independientes de producción de melanina, cuya actividad aumenta bajo condiciones de estrés por pH, lo que podría contribuir a la mitigación del daño oxidativo.

1.3-Características generales de *Exophiala dermatitidis.*

E. dermatitidis es la especie más termotolerante y de importancia clínica dentro del género *Exophiala* y es conocida por su notable capacidad para prosperar en una amplia gama de condiciones ambientales extremas, demostrando poliextremotolerancia a diversos estresores (Kirchhoff et al., 2019; Teixeira et al., 2017). Esta levadura melanizada es un importante patógeno oportunista en humanos (Ma et al., 2024), encontrada en sistemas de agua potable, ambientes domésticos como saunas, cocinas, baños de vapor, tuberías de desagüe y lavavajillas (Gümral et al., 2016; Kirchhoff et al., 2019; Kulesza et al., 2021; Raghupathi et al., 2018; Zalar et al., 2011). Además, *E. dermatitidis* puede ser aislada de ambientes naturales extremos (Branda et al., 2010; Sudhadham et al., 2008), y sitios contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (Baron et al., 2021; Döğen et al., 2013). Sin embargo, el nicho natural de *E. dermatitidis* no se conoce claramente (Babič et al., 2018). En ambientes naturales, *E. dermatitidis* presenta muy baja frecuencia, con unas pocas unidades formadoras de colonias (CFU) por varios litros de agua (Babič et al., 2018). En contraste, en lavavajillas puede encontrarse en cantidades extremadamente altas, alcanzando hasta 10^6 células por cm^{-1} de junta de goma (Raghupathi et al., 2018; Zalar et al., 2011).

Las características fenotípicas y mecanismos moleculares de *E. dermatitis* favorecen su adaptación en diferentes ambientes extremos que van desde lavavajillas calientes hasta regiones polares frías, incluidos glaciares y entornos del Ártico y la Antártida (Blasi et al., 2015; Branda et al., 2010; Vaz et al., 2011). Su frecuencia de ocurrencia aumenta debido a las altas temperaturas, la presencia de hidrocarburos aromáticos, alifáticos y a la presencia de agua (Gümral et al., 2016). *E. dermatitidis* se caracteriza por su oligotropismo (Matos et al., 2003) y es un modelo de estudio en la adaptabilidad a diferentes factores de estrés como la temperatura (Blasi et al., 2015; Tesei et al., 2015), el pH (Chen et al., 2014), y la radiación ionizante (Malo et al., 2021; Schultzhaus et al., 2021, 2020).

E. dermatitidis representa un riesgo significativo para la salud, especialmente en individuos inmunocomprometidos, ya que puede causar infecciones cutáneas, subcutáneas, sistémicas, gastrointestinales, pulmonares y neurotrópicas (Kirchhoff et al., 2019; Kondori et al., 2011; Kulesza et al., 2021; Lavrin et al., 2020; Pinheiro et al., 2019; Sudhadham et al., 2008; Usuda et al., 2021; Zeng et al., 2007). Su capacidad para crecer a 37 °C, sintetizar metabolitos tóxicos y producir microvesículas melanizadas potencia su patogenicidad (Lavrin et al., 2020; Poyntner et al., 2018; Tesei et al., 2015). Además, evade el sistema inmune, causando frecuentemente infecciones graves del sistema nervioso central (Chowdhary et al., 2014; Kirchhoff et al., 2019; Sudhadham et al., 2008).

E. dermatitidis se clasifica bajo el nivel de seguridad biológica dos (Gostinčar et al., 2011). En algunos casos esta especie muestra un marcado neurotropismo e infecta principalmente a individuos sanos. *E. dermatitidis* coloniza el tejido cerebral como una metástasis cerebral, con una elevada mortalidad en ratas y en ocasiones con mutilaciones cutáneas secundarias graves. Las infecciones cerebrales en humanos han sido reportadas de forma principal en Asia. Es probable que al menos algunos de estos casos correspondan a personas con raros trastornos inmunitarios innatos relacionados con mutaciones en genes como *CARD9* y *STAT1*, los cuales codifican proteínas clave para la respuesta inmune. Sin embargo, aún se desconoce si la asociación entre estos trastornos genéticos y la infección por este hongo contribuye significativamente a la susceptibilidad a la enfermedad. La razón por la cual se observan tantos casos de este tipo de infecciones cerebrales causadas *por E. dermatitidis* en Asia Oriental sigue siendo desconcertante. Casos de meningitis en los Estados Unidos de América ocurren debido a la inyección epidural de esteroides, probablemente contaminado con *E. dermatitidis*, dentro del fluido cerebroespinal (Babič et al., 2018). La presencia de *E. dermatitidis* también fue reportada en muestras de heces de individuos sanos en frecuencias muy bajas (0.5-1.2%), durante períodos de diarreas severas (De Hoog et al., 2005).

Como se mencionará con mayor detalle en los antecedentes las cepas de *E. dermatitidis* presentan tres genotipos principales A, B y C, los cuales ha sido determinados a partir de la región ITS del ADNr. El genotipo A se encuentra de forma predominante en lavavajillas y es el genotipo preponderante en humanos. El genotipo B está conectado principalmente a hábitats naturales y el genotipo C es extremadamente raro y ha sido aislado exclusivamente de lavavajillas (Zupančič et al., 2016; Babič et al., 2018).

Dados los cambios ambientales globales, que van desde variaciones climáticas hasta un aumento de la urbanización y mayores estándares de vida en interiores —evidenciado por el creciente uso de electrodomésticos en regiones menos desarrolladas—, *E. dermatitidis* representa un organismo modelo para predecir posibles tendencias evolutivas en extremófilos urbanos microbianos. Las capacidades de *E. dermatitidis* podrían conducir a su mayor prevalencia en hábitats extremos interiores y áreas contaminadas. Por lo tanto, bajo estas condiciones cambiantes, podrían surgir nuevos ecotipos patogénicos de *E. dermatitidis* con mayor propagación en ambientes extremos y afectados por actividades humanas.

2-Antecedentes

Contexto ecológico y genético

El nicho ecológico de *E. dermatitidis* aún no está completamente definido. Sin embargo, se conoce la presencia de tres genotipos principales en esta especie —denominados genotipos A, B y C— lo cuales han planteado preguntas importantes sobre los procesos evolutivos que han moldeado su adaptación y su potencial patogenicidad. El genotipo A se asocia predominantemente con lavavajillas y es el más comúnmente asociado a casos clínicos, mientras que el genotipo B está vinculado a ambientes naturales, y el genotipo C es extremadamente raro, habiéndose aislado únicamente de lavavajillas (Babič et al., 2018; Zupančič et al., 2016). Esta distribución específica por genotipo sugiere una posible divergencia ecológica, en la que ciertos linajes estarían mejor adaptados a nichos de origen humano. De manera notable, las cepas aisladas del ambiente exhiben una mayor diversidad genética que aquellas asociadas con huéspedes humanos, lo que apoya la idea de una aparición más reciente del genotipo A (Matos et al., 2003).

La agrupación congruente de cepas según su fuente de aislamiento —particularmente aquellas provenientes de ambientes interiores— sugiere que condiciones como temperaturas elevadas, alta humedad y limitación de nutrientes podrían actuar como presiones selectivas que favorecen rasgos oportunistas. Por ejemplo, dentro de una misma instalación, cepas del genotipo B aisladas de una sauna seca no lograron crecer a 42 °C y formaron colonias secas, mientras que una cepa cercana del mismo genotipo, proveniente del baño de vapor, mostró un crecimiento típico a esta temperatura y produjo colonias viscosas (Matos et al., 2003).

Finalmente, la coexistencia de múltiples genotipos dentro de los mismos ambientes antropogénicos plantea la posibilidad de recombinación genética, lo que podría dar lugar a genotipos novedosos con un potencial patogénico aún no caracterizado (Zalar et al., 2011). Estas observaciones subrayan la necesidad de estudios evolutivos y ecológicos dirigidos a determinar si *E. dermatitidis* está experimentando una especiación ecológica en tiempo real o si su éxito en nichos urbanos se debe a la plasticidad fenotípica y a la adaptación convergente.

Diversidad y distribución en ambientes domésticos

Zupančič et al. (2016), investigaron la diversidad y distribución de hongos en 30 máquinas lavaplatos de hogares, aislando un total de 503 cepas de 10 géneros y 84 especies. El 83% de las máquinas fueron positivas a hongos y las especies patógenas oportunistas más comunes fueron *E. dermatitidis*, *Candida parapsilosis*, *E. phaeomuriformis*, *Fusarium dimerum* y el clado *Saprochaete/Magnusiomyces*. En total, el 47% de las especies detectadas correspondieron a *E. dermatitidis*. Los autores concluyeron que las máquinas lavaplatos representan un reservorio para especies patógenas oportunistas que pueden propagarse a otras áreas del hogar. Aunque los lavavajillas son uno de los sitios más representativos de los que se ha aislado *E. dermatitidis* (Zalar et al., 2011; Döğen et al., 2013; Gümral et al., 2016; Kondori et al., 2024), también se ha encontrado en otros ambientes interiores, como sellos de goma, depósitos de detergente, desagües, filtros, cocinas, fregaderos, portaplatos, máquina de café, frigeradores, apertura del grifo, lavadoras, entre otros sitios (Babič et al., 2018, Kondori et al., 2024).

Factores de virulencia

El número de infecciones causadas por *E. dermatitidis* en pacientes inmunocomprometidos ha aumentado, pero aún se conoce poco sobre los factores de virulencia y la respuesta del huésped. En este contexto, Poyntner et al. (2016) realizaron el primer análisis transcriptómico de *E. dermatitidis* durante una infección artificial en piel, revelando nuevos factores de virulencia. El estudio mostró que esta especie puede crecer en estas condiciones y penetrar la piel. El análisis genómico y de secuenciación del ARN reveló un transcriptoma complejo, con ARN circulares, transcriptos fusionados, ARN largos no codificantes y transcriptos antisentido. Los cambios en la transcripción afectaron principalmente las vías relacionadas con la adquisición de nutrientes, el metabolismo energético, la pared celular, la morfología y los factores de virulencia conocidos. Además, la vía de la L-tirosina melanina se encontró regulada positivamente durante la infección, y se incrementó la producción de alcaloides, especialmente alcaloides secundarios.

Poyntner et al. (2018), realizaron un análisis transcriptómico de *E. dermatitidis* para entender el impacto de la melanina como factor de virulencia. Para ello, generaron un mutante de la poliquétido sintasa (*PKS1*) mediante CRISPR/Cas9, lo que dio lugar a una cepa deficiente de melanina. Las diferencias entre las cepas mutadas y las silvestres fueron mínimas, observándose principalmente en las vías de la homeostasis del hierro, genes de la pared celular y proteasas. Los autores concluyeron que la melanina favorece la invasión y virulencia en los primeros días de la infección en la piel.

Zajc et al. (2019), evaluaron características que podrían definir funciones en el biocontrol y/o virulencia de diversas especies. Seleccionaron cinco especies con alto potencial como biocontroladoras en la agricultura, junto con dos patógenos oportunistas (*E. dermatitidis* y *Aureobasidium melanogenum*). Los autores sugieren que la poliextremotolerancia es una característica deseable tanto para los agentes de biocontrol como para los patógenos. Además, identificaron que el oligotropismo, la termotolerancia a 37 °C, la producción de sideróforos, la actividad ureasa, la melanización y la producción de biopelículas son los rasgos principales que aumentan el potencial de los hongos para causar infecciones oportunistas en mamíferos. Recomiendan considerar estos rasgos al evaluar la bioseguridad de los posibles agentes de biocontrol.

Relación entre patogenicidad y extremotolerancia

Gostinčar et al. (2018) estudiaron la relación entre el potencial patogénico y la extremotolerancia en hongos. Al comparar los genomas de varias especies, incluida *E. dermatitidis*, sus resultados respaldan la hipótesis de que los hongos oportunistas no están específicamente adaptados para la patogenicidad. Su potencial invasivo está estrechamente vinculado a su ecología poliextremotolerante. Por ello, sugieren que el enfoque para abordar los hongos patógenos oportunistas debería diferir al aplicado en patógenos verdaderos.

Genómica comparativa

Song et al. (2017) realizaron un análisis de genómica comparativa en las especies *E. spinifera* y *E. dermatitidis*, debido a que son levaduras melanizadas que pueden causar infecciones diseminadas en humanos aparentemente sanos. Ambas especies son las únicas en el género *Exophiala* que producen polisacáridos extracelulares. Aunque se consideran hongos oportunistas, presentan diferencias en sus perfiles clínicos, lo que sugiere que emplean estrategias patogénicas. Los factores de virulencia, como síntesis de melanina y cápsula, mostraron respuestas opuestas a estrés por peróxido de hidrógeno y temperatura, lo que contradice su papel en la fagocitosis. Los análisis genómicos revelaron diferencias en genes relacionados con el metabolismo lipídico, la modificación de la pared celular y la producción de cápsulas de polisacáridos.

Otros estudios complementarios sobre neurotoxicidad y biodegradación

Prenafeta-Boldú et al. (2006) determinaron, a partir de la comparación de regiones ITS de hongos, que la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos se encuentra predominantemente en ascomicetos pertenecientes a la familia *Herpotrichiellaceae*, dentro del orden *Chaetothyriales*, clase *Chaetothyriomycetes*. Esta familia ha sido principalmente estudiada por su vinculación con la patogenicidad humana, especialmente en ciertos miembros termotolerantes del grupo. Los autores sugieren que el conjunto de adaptaciones que permiten sobrevivir en ambientes extremos también predispone a estos hongos al oportunismo. Entre dichas adaptaciones destacan la tolerancia a la temperatura corporal, la melanización y el dimorfismo.

Adicionalmente, proponen que la capacidad para metabolizar alquilbencenos y compuestos relacionados constituye otra adaptación relevante, sustentada por evidencias tanto ecológicas como fisiológicas. En este contexto, señalan que el neurotropismo es inusual fuera de la familia *Herpotrichiellaceae*, y plantean una posible relación entre esta afinidad por el tejido nervioso y la asimilación de sustratos aromáticos. Esto se

debe a que, en términos estructurales, muchos compuestos presentes en el cerebro (neuroquímica) —especialmente intermediarios derivados de la degradación de alquilbencenos y lignina— son similares a los encontrados en ambientes ricos en hidrocarburos, como los biofiltros de aire. En consecuencia, el neurotropismo podría explicarse, al menos en parte, por la eficiente capacidad de estos hongos para utilizar sustratos catecólicos como fuente de carbono. Este patrón se ejemplifica en *E. dermatitidis*, una especie capaz de causar infecciones clínicas de carácter neurotrópico y que, además, ha sido aislada de ambientes que contienen compuestos fenólicos o hidrocarburos.

Lavrin et al. (2020), utilizaron EVs de la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis* para evaluar su neurotoxicidad en células de neuroblastoma. Los ensayos revelaron el potencial neurocitotóxico de las EVs especie. Además, sus estudios muestras que *E. dermatitidis* es capaz de crecer a 37 °C y asimilar hidrocarburos aromáticos (como tolueno y n-hexadecano). Además, mostró un crecimiento abundante en varios neurotransmisores seleccionados, entre estos la dopamina. Los autores también observaron que las hifas de *E. dermatitidis* invadían y penetraban las células de neuroblastoma, causando la degradación de la mayoría de ellas en tres días. Según estos los autores, especies como *E. dermatitidis* podría hipotéticamente ser una causa directa o indirecta desconocida en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Hipótesis

Las cepas de *Exophiala dermatitidis* exhiben una alta diversidad fenotípica y genotípica determinada por la diversidad de ambientes de donde han sido aisladas, lo que influye en su capacidad poliextremotolerante, su potencial oportunista y su adaptación a nichos extremos, incluido el cuerpo humano. El sitio de aislamiento puede conferir ventajas adaptativas que favorecen su poliextremotolerancia y versatilidad metabólica, reflejadas en la expresión diferencial de vías metabólicas, la capacidad de utilizar compuestos aromáticos y neurotransmisores como fuente de carbono, la resistencia a condiciones de estrés y la presencia de determinantes genómicos clave relacionados con virulencia y degradación de xenobióticos.

Objetivo general

Analizar el fenotipo y genotipo de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes naturales, urbanos y clínicos en condiciones de estrés.

Objetivos específicos

Capítulo 1: Caracterización fisiológica y metabólica

1. Caracterizar fisiológica y metabólicamente una colección de 41 cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos en condiciones de estrés asociadas a oportunismo.

<u>Tareas específicas</u>

1.1. Analizar filogenéticamente las cepas de *E. dermatitidis* utilizando la región ITS del ARNr.

1.2. Evaluar el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* bajo diversas condiciones de estrés (temperaturas, pH y salinidades).

1.3. Caracterizar en las cepas de *E. dermatitidis* resistencia a antimicóticos, actividad hemolisina y formación de biopelículas.

1.4. Evaluar el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* en presencia de neurotransmisores y compuestos aromáticos como única fuente de carbono.

1.5. Caracterizar metabólicamente las cepas seleccionadas EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 de *E. dermatitidis* mediante microarreglos de fenotipicos (YT MicroPlate™ Biolog).

1.6. Evaluar el impacto de la inhibición de melanina en las cepas seleccionadas EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 de *E. dermatitidis* en condiciones de estrés (temperaturas, pH, salinidades y en presencia de neurotransmisores y compuestos aromáticos como única fuente de carbono).

Capítulo 2: Análisis genómico y pangenómico

2. Realizar un análisis genómico comparativo y del pangenoma de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos.

Tareas específicas

2.1 Identificar en las cepas EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 de *E. dermatitidis* enzimas activas de carbohidratos, vías metabólicas de catabolismo de xenobióticos/neurotransmisores y dominios de virulencia.

2.2. Analizar el pangenoma para comparar los genes core y accesorios entre las cepas *E. dermatitidis* EXF-8193, EXF-10123, EXF-13310, EXF-5586, EXF-9187 estudiadas y los genomas de referencia disponibles en NCBI.

Capítulo 3: Metabolismo en presencia de compuestos aromáticos

3. Caracterizar el metabolismo de la cepa EXF-10123 de *Exophiala dermatitidis* en presencia los compuestos tóxicos dopamina y 1,2,4-bencenotriol como únicas fuentes de carbono.

Tareas específicas

3.1 Caracterizar las curvas de crecimiento de *E. dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como únicas fuentes de carbono.

3.2. Analizar la estructura celular mediante microscopía confocal láser y de contraste fases de la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis* crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como únicas fuentes de carbono.

3.3 Evaluar los metabolomas de *E. dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-becenotriol como únicas fuentes de carbono.

3.4. Caracterizar la utilización mitocondrial de sustratos por *E. dermatitidis* EXF-10123 mediante MitoPlateTM S-1 de Biolog en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol.

Capítulo 4: Impacto del estrés osmótico en el metabolismo

4. Caracterizar la capacidad osmotolerante de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas.

Tareas específicas

4.1. Evaluar el crecimiento de la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en medio sólido.

4.2. Caracterizar el perfil metabólico de alto rendimiento utilizando tecnología Biolog en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis.*

4.3. Evaluar el efecto de la temperatura y la molaridad en el crecimiento de la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas.

3-Metodología General

3.1-Condiciones de crecimiento de las cepas de *Exophiala dermatitidis* utilizadas en todos los capítulos de este trabajo:

Las cepas seleccionadas de *E. dermatitidis*, fueron aisladas de ambientes interiores (26 cepas), ambientes naturales (10 cepas) y clínicos (5 cepas), (Tabla I). Las cepas fueron criopreservadas a -80 °C en 20% de glicerol en la Colección de Cultivos Ex Infrastructural Centro Mycosmo, Departamento de Biología, Facultad de Biotecnología, Universidad de Ljubljana, Ljubljana, Eslovenia. Los cultivos se mantuvieron en medio MEA (Anexo I), a 37 ◦C. Adicionalmente se seleccionó la cepa de EXF-16016 (Ide-Pérez et al., 2020). Los preinóculos utilizados en todos los ensayos se realizaron en medio MEB (Anexo I) y fueron incubados a 37 °C durante cinco días con una agitación de 150 rpm.

Tabla I. Cepas de *Exophiala dermatitidis* utilizadas en este estudio.

Tipo	Cepa	Genotipo	Fuente	Localización (fecha)
Origen clínico	EXF-10123	Sin datos	Paciente (CBS 525.76) – cepa tipo	
	EXF-6895	Sin datos	Esputo obtenido de un paciente con fibrosis quística	Liubliana, Eslovenia
	EXF-10195	Sin datos	Esputo obtenido de un paciente con fibrosis quística	Suecia
	EXF-10273	Sin datos	Muestra de heces	Lisboa, Portugal (2014)
	EXF-10708	Sin datos	Pellet de *Atta laevigata* (hormiga cortadora de hojas).	Botucatu, Brasil (2009)
Ambientes naturales	EXF-6942	Sin datos	Contenedor de descarga en sistema de aguas residuales	Golnik, Eslovenia (2010)
	EXF-6986	Sin datos	Terreno de gasolinera	Liubliana, Eslovenia (2011)
	EXF-8192	Sin datos	Sedimento glacial superficial	Glaciar Calderone, Abruzo, Italia (2007)
	EXF-8193	Sin datos	Sedimentos glaciales profundos con tubificación	Glaciar Calderone, Abruzzo, Italia (2007)

	EXF-8194	Sin datos	Sedimentos glaciales profundos con tubificación	Glaciar Calderone, Abruzzo, Italia (2007)
	EXF-8493	A	Agua de pozo	Liubliana, Eslovenia (2013)
	EXF-8499	A	Agua geotérmica	Benedikt, Eslovenia (2013)
	EXF-8686	A	Agua del glaciar Triglav	Triglav, Eslovenia (2013)
	EXF-8985	A	Lodo de las salinas de Sečovlje	Sečovlje, Eslovenia (2013)
	EXF-16016	Sin datos	Sitios contaminados con petróleo y diésel	Tabasco, México (2018)
Ambientes Interiores	EXF-5567	C	Goma de lavavajillas	Eslovenia (2009)
	EXF-5576	A	Goma de lavavajillas	Eslovenia (2009)
	EXF-5586	C	Goma de lavavajillas	Eslovenia (2009)
	EXF-5646	B	Goma de lavavajillas	Eslovenia (2009)
	EXF-5652	A	Goma de lavavajillas	USA (2009)
	EXF-5745	A	Agua de lavado de autos	Jesenice, Eslovenia (2009)
	EXF-5758	A2	Goma de lavavajillas	Australia (2009)
	EXF-5767	A	Goma de lavavajillas	Austria (2009)
	EXF-5772	A	Goma de lavavajillas	Japón (2009)
	EXF-5827	A	Goma de lavavajillas	Israel (2009)

EXF-6113	A	Goma de lavavajillas	Sudáfrica (2009)
EXF-6392	Sin datos	Lavabo en el Hotel Bolívar	Argentina (2010)
EXF-7031	Sin datos	Filtro metálico, fondo del lavavajillas	Liubliana, Eslovenia
EXF-8036	A	Casa Gunnarsbyn; superficie del fregadero de la cocina - lado derecho	Suecia (2012)
EXF-8435	B	Agua de grifo	Liubliana, Eslovenia (2013)
EXF-9187	Sin datos	Polvo negro del sello de goma seco en el lavavajillas	Liubliana, Eslovenia (2013)
EXF-9312	Sin datos	Fregadero de cocina	Podlog en el valle de Savinja, Eslovenia (2013)
EXF-9345	A	Ventilador en lavavajillas	Mislinja, Eslovenia (2013)
EXF-9347	Sin datos	Rejillas de tuberías	Mislinja, Eslovenia (2013)
EXF-11720	Sin datos	Refrigerador	Bistrica ob Sotli, Eslovenia (2017)
EXF-11756	Sin datos	Refrigerador	Golnik, Eslovenia (2017)
EXF-11966	Sin datos	Refrigerador	Eslovenia (2017)
EXF-12130	Sin datos	Fregadero	Islandia (2017)
EXF-12753	Sin datos	Drenaje de fregadero	Lofoten, Noruega (2017)
EXF-13004	Sin datos	Drenaje de fregadero	Groenlandia, Dinamarca (2017)

EXF-13310	Sin datos	Taller mecánico de autos, mezcla de aceite y agua	Liubliana, Eslovenia (2019)

4-Referencias

Babič, M.N., Zupančič, J., Gunde-Cimerman, N., de Hoog, S., Zalar, P., 2018. Ecology of the Human Opportunistic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. Mycopathologia 183, 201–212. https://doi.org/10.1007/s11046-017-0134-8

Baron, N.C., Pagnocca, F.C., Otsuka, A.A., Prenafeta-Boldú, F.X., Vicente, V.A., Attili de Angelis, D., 2021. Black Fungi and Hydrocarbons: An Environmental Survey for Alkylbenzene Assimilation. Microorganisms 9, 1008. https://doi.org/10.3390/microorganisms9051008

Blasi, B., Tafer, H., Tesei, D., Sterflinger, K., 2015. From Glacier to Sauna: RNA-Seq of the Human Pathogen Black Fungus *Exophiala dermatitidis* under Varying Temperature Conditions Exhibits Common and Novel Fungal Response. PLoS One 10, e0127103. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127103

Bleackley, M.R., Dawson, C.S., Anderson, M.A., 2019. Fungal Extracellular Vesicles with a Focus on Proteomic Analysis. Proteomics 19. https://doi.org/10.1002/pmic.201800232

Branda, E., Turchetti, B., Diolaiuti, G., Pecci, M., Smiraglia, C., Buzzini, P., 2010. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). FEMS Microbiol Ecol 72, 354–369. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x

Breitenbach, M., Weber, M., Rinnerthaler, M., Karl, T., Breitenbach-Koller, L., 2015. Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. Biomolecules 5, 318–342. https://doi.org/10.3390/biom5020318

Carr, E.C., Barton, Q., Grambo, S., Sullivan, M., Renfro, C.M., Kuo, A., Pangilinan, J., Lipzen, A., Keymanesh, K., Savage, E., Barry, K., Grigoriev, I. V, Riekhof, W.R., Harris, S.D., 2023. Characterization of a novel polyextremotolerant fungus, *Exophiala viscosa* , with insights into its melanin regulation and ecological niche. G3: Genes, Genomes, Genetics 13. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad110

Černoša, A., Sun, X., Gostinčar, C., Fang, C., Gunde-Cimerman, N., Song, Z., 2021. Virulence traits and population genomics of the black yeast aureobasidium melanogenum. Journal of Fungi 7. https://doi.org/10.3390/JOF7080665

Chen, Z., Martinez, D.A., Gujja, S., Sykes, S.M., Zeng, Q., Szaniszlo, P.J., Wang, Z., Cuomo, C.A., 2014. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of *Wangiella dermatitidis* , A Major Cause of Phaeohyphomycosis and a Model Black Yeast Human Pathogen. G3 Genes|Genomes|Genetics 4, 561–578. https://doi.org/10.1534/g3.113.009241

Chowdhary, A., Meis, J.F., Guarro, J., de Hoog, G.S., Kathuria, S., Arendrup, M.C., Arikan-Akdagli, S., Akova, M., Boekhout, T., Caira, M., Guinea, J., Chakrabarti, A., Dannaoui, E., van Diepeningen, A., Freiberger, T., Groll, A.H., Hope, W.W., Johnson, E., Lackner, M., Lagrou, K., Lanternier, F., Lass-Flörl, C., Lortholary, O., Meletiadis, J., Muñoz, P., Pagano, L., Petrikkos, G., Richardson, M.D., Roilides, E., Skiada, A., Tortorano, A.M., Ullmann, A.J., Verweij, P.E., Cornely, O.A., Cuenca-Estrella, M., 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. Clinical Microbiology and Infection 20, 47–75. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12515

De Hoog, G.S., Matos, T., Sudhadham, M., Luijsterburg, K.F., Haase, G., 2005. Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* in healthy and impaired individuals. Mycoses 48, 142–145. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01083.x

De Hoog, G.S., Zeng, J.S., Harrak, M.J., Sutton, D.A., 2006. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. Antonie Van Leeuwenhoek 90, 257–268. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9080-z

Döğen, A., Kaplan, E., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2013. Massive Contamination of *Exophiala dermatitidis* and *E. phaeomuriformis* in Railway Stations in Subtropical Turkey. Mycopathologia 175, 381–386. https://doi.org/10.1007/s11046-012-9594-z

Eisenman, H.C., Greer, E.M., McGrail, C.W., 2020. The role of melanins in melanotic fungi for pathogenesis and environmental survival. Appl Microbiol Biotechnol. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10532-z

Farré, M., Ruiz-Herrera, A., 2020. The Plasticity of Genome Architecture. Genes (Basel) 11, 1413. https://doi.org/10.3390/genes11121413

Geis, P.A., Wheeler, M.H., Szaniszlo, P.J., 1984. Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. Arch Microbiol 137, 324–328. https://doi.org/10.1007/BF00410729

Górny, R.L., 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air - A review. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 11, 185–197.

Gostinčar, C., Grube, M., Gunde-Cimerman, N., 2011. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments? Fungal Biol 115, 1008–1018. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.03.004

Gostinčar, C., Zajc, J., Lenassi, M., Plemenitaš, A., de Hoog, S., Al-Hatmi, A.M.S., Gunde-Cimerman, N., 2018. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans. Fungal Divers 93, 195–213. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0414-8

Gostinčar, C., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2022. No need for speed: slow development of fungi in extreme environments. Fungal Biol Rev 39, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.002

Gümral, R., Özhak-Baysan, B., Tümgör, A., Saraçlı, M.A., Yıldıran, Ş.T., Ilkit, M., Zupančič, J., Novak-Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G.S., 2016. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. Fungal Divers 76, 1–9. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0327-8

Heinrichs, G., Hübner, I., Schmidt, C.K., de Hoog, G.S., Haase, G., 2013a. Analysis of Black Fungal Biofilms Occurring at Domestic Water Taps (II): Potential Routes of Entry. Mycopathologia 175, 399–412. https://doi.org/10.1007/s11046-013-9619-2

Ide-Pérez, M.R., Fernández-López, M.G., Sánchez-Reyes, A., Leija, A., Batista-García, R.A., Folch-Mallol, J.L., Sánchez-Carbente, M. del R., 2020. Aromatic Hydrocarbon Removal by Novel Extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* Spp. from an Oil Polluted Site in Mexico. Journal of Fungi 6, 135. https://doi.org/10.3390/jof6030135

Isola, D., Scano, A., Orrù, G., Prenafeta-Boldú, F.X., Zucconi, L., 2021. Hydrocarbon-Contaminated Sites: Is There Something More Than *Exophiala xenobiotic*a? New Insights into Black Fungal Diversity Using the Long Cold Incubation Method. Journal of Fungi 7, 817. https://doi.org/10.3390/jof7100817

Itoh, N., Murakami, H., Ishibana, Y., Matsubara, Y., Yaguchi, T., Kamei, K., 2021. Challenges in the diagnosis and management of central line-associated blood stream infection due to *Exophiala dermatitidis* in an adult cancer patient. Journal of Infection and Chemotherapy 27, 1360–1364. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.04.009

Kirchhoff, L., Olsowski, M., Rath, P.-M., Steinmann, J., 2019. *Exophiala dermatitidis* : Key issues of an opportunistic fungal pathogen. Virulence 10, 984–998. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1596504

Kirchhoff, L., Olsowski, M., Zilmans, K., Dittmer, S., Haase, G., Sedlacek, L., Steinmann, E., Buer, J., Rath, P.-M., Steinmann, J., 2017. Biofilm formation of the black yeast-like fungus *Exophiala dermatitidis* and its susceptibility to antiinfective agents. Sci Rep 7, 42886. https://doi.org/10.1038/srep42886

Kondori, N., Gilljam, M., Lindblad, A., Jönsson, B., Moore, E.R.B., Wennerås, C., 2011. High Rate of *Exophiala dermatitidis* Recovery in the Airways of Patients with Cystic Fibrosis Is Associated with Pancreatic Insufficiency. J Clin Microbiol 49, 1004–1009. https://doi.org/10.1128/JCM.01899-10

Kondori, N., Jaén-Luchoro, D., Karlsson, R., Abedzaedeh, B., Hammarström, H., Jönsson, B., 2024. *Exophiala* species in household environments and their antifungal resistance profile. Sci Rep 14, 17622. https://doi.org/10.1038/s41598-024-68166-4

Kulesza, K., Biedunkiewicz, A., Nowacka, K., Dynowska, M., Urbaniak, M., Stępień, Ł., 2021. Dishwashers as an Extreme Environment of Potentially Pathogenic Yeast Species. Pathogens 10, 446. https://doi.org/10.3390/pathogens10040446

Kurbessoian, T., Murante, D., Crocker, A., Hogan, D.A., Stajich, J.E., 2023. In host evolution of *Exophiala dermatitidis* in cystic fibrosis lung micro-environment. G3: Genes, Genomes, Genetics 13. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad126

Lavrin, T., Konte, T., Kostanjšek, R., Sitar, S., Sepčič, K., Prpar Mihevc, S., Žagar, E., Županski, V., Lenassi, M., Rogelj, B., Gunde Cimerman, N., 2020. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. Cells 9, 963. https://doi.org/10.3390/cells9040963

Levy, S.B., 2001. Antibacterial household products: Cause for concern. Emerg Infect Dis 7, 512–515. https://doi.org/10.3201/eid0707.017705

Li, D.M., Hoog, G.S. De, Saunte, D.M.L., Ende, A.H.G.G. Van Den, Chen, X.R., 2008. *Coniosporium epidermidis* sp . nov ., a new species from human skin 131–136. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.13

Li, D.-M., Li, R.-Y., de Hoog, G.S., Sudhadham, M., Wang, D.-L., 2011. Fatal *Exophiala* infections in China, with a report of seven cases. Mycoses 54, e136–e142. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01859.x

Ma, N., Zhao, Y., Tang, M., Xia, H., Li, D., Lu, G., 2024. Concurrent infection of *Exophiala dermatitidis* and *Angiostrongylus cantonensis* in central nervous system of a child with inherited CARD9 deficiency: A case report and literature review. Journal of Medical Mycology 34, 101455. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2023.101455

Madrid, H., Gené, J., Quijada, L., Cantillo, T., Gacitúa, R., Valdés, J., Sánchez, C., Prenafeta-Boldú, F.X., Wijayawardene, N., Silva, V., Godoy, P., 2023. *Exophiala atacamensis*, sp. nov., and *E. crusticola* from the Atacama Desert, northern Chile. Sydowia 75, 181–192.

Malo, M.E., Schultzhaus, Z., Frank, C., Romsdahl, J., Wang, Z., Dadachova, E., 2021. Transcriptomic and genomic changes associated with radioadaptation in *Exophiala dermatitidis*. Comput Struct Biotechnol J 19, 196–205. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.013

Matos, T., De Hoog, G.S., De Boer, A.G., De Crom, I., Haase, G., 2002. High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. Mycoses 45, 373–377. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00779.x

Matos, T., Haase, G., Gerrits van den Ende, A., 2003. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. Antonie Van Leeuwenhoek 83, 293–303. https://doi.org/10.1023/A:1023373329502

Paolo, W.F., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szaniszlo, P.J., Nosanchuk, J.D., 2006. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. BMC Microbiol 6, 55. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-55

Pinheiro, R.L., Cognialli, R.C.R., Barros, R.C., de A. Pinto, T., Cunha, M.F.M., Tahan, T.T., Voidaleski, M.F., Gomes, R.R., Becker, G.N., Andrade, L. V., Queiroz-Telles, F., Sybren de Hoog, G., Sakiyama, R.R., Vicente, V.A., 2019. Peritonitis by *Exophiala dermatitidis* in a pediatric patient. Med Mycol Case Rep 24, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.02.001

Poyntner, C., Blasi, B., Arcalis, E., Mirastschijski, U., Sterflinger, K., Tafer, H., 2016. The Transcriptome of *Exophiala dermatitidis* during Ex-vivo Skin Model Infection. Front Cell Infect Microbiol 6. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00136

Poyntner, C., Mirastschijski, U., Sterflinger, K., Tafer, H., 2018. Transcriptome Study of an *Exophiala dermatitidis* PKS1 Mutant on an *ex Vivo* Skin Model: Is Melanin Important for Infection? Front Microbiol 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01457

Prenafeta-Boldú, F., Hoog, X., G., Summerbell, R.C., 2005. Biosystematics and ecology of hydrocarbon-degrading fungi from air biofilters.

Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Sybren de Hoog, G., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev 30, 109–130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x

Raghupathi, P.K., Zupančič, J., Brejnrod, A.D., Jacquiod, S., Houf, K., Burmølle, M., Gunde-Cimerman, N., Sørensen, S.J., 2018. Microbial Diversity and Putative Opportunistic Pathogens in Dishwasher Biofilm Communities. Appl Environ Microbiol 84. https://doi.org/10.1128/AEM.02755-17

Romsdahl, J., Schultzhaus, Z., Cuomo, C.A., Dong, H., Abeyratne-Perera, H., Hervey, W.J., Wang, Z., 2021. Phenotypic Characterization and Comparative Genomics of the Melanin-Producing Yeast *Exophiala lecanii-corni* Reveals a Distinct Stress Tolerance Profile and Reduced Ribosomal Genetic Content. Journal of Fungi 7, 1078. https://doi.org/10.3390/jof7121078

Schultzhaus, Z., Chen, A., Shuryak, I., Wang, Z., 2021. The Transcriptomic and Phenotypic Response of the Melanized Yeast *Exophiala dermatitidis* to Ionizing Particle Exposure. Front Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609996

Schultzhaus, Z., Romsdahl, J., Chen, A., Tschirhart, T., Kim, S., Leary, D., Wang, Z., 2020. The response of the melanized yeast *Exophiala dermatitidis* to gamma radiation exposure. Environ Microbiol 22, 1310–1326. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14936

Singh, S., Rudramurthy, S.M., Padhye, A.A., Hemashetter, B.M., Iyer, R., Hallur, V., Sharma, A., Agnihotri, S., Gupta, S., Ghosh, A., Kaur, H., 2021. Clinical Spectrum, Molecular Characterization, Antifungal Susceptibility Testing of *Exophiala* spp. From India and Description of a Novel *Exophiala* Species, *E. arunalokei* sp. nov. Front Cell Infect Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686120

Slepecky, R.A., Starmer, W.T., 2009a. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. Mycologia 101, 823–832. https://doi.org/10.3852/08-197

Song, Y., Laureijssen-van de Sande, W.W.J., Moreno, L.F., Gerrits van den Ende, B., Li, R., de Hoog, S., 2017. Comparative Ecology of Capsular *Exophiala* Species Causing Disseminated Infection in Humans. Front Microbiol 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02514

Sudhadham, M., Prakitsin, S., Sivichai, S., Chaiyarat, R., Dorrestein, G.M., Menken, S.B.J., de Hoog, G.S., 2008. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. Stud Mycol 61, 145–155. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.15

Suthar, M., Dufossé, L., Singh, S.K., 2023. The Enigmatic World of Fungal Melanin: A Comprehensive Review. Journal of Fungi 9, 891. https://doi.org/10.3390/jof9090891

Teixeira, M.M., Moreno, L.F., Stielow, B.J., Muszewska, A., Hainaut, M., Gonzaga, L., Abouelleil, A., Patané, J.S.L., Priest, M., Souza, R., Young, S., Ferreira, K.S., Zeng, Q., da Cunha, M.M.L., Gladki, A., Barker, B., Vicente, V.A., de Souza, E.M., Almeida, S., Henrissat, B., Vasconcelos, A.T.R., Deng, S., Voglmayr, H., Moussa, T.A.A., Gorbushina, A., Felipe, M.S.S., Cuomo, C.A., de Hoog, G.S., 2017. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (*Chaetothyriales* , *Ascomycota*). Stud Mycol 86, 1–28. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.01.001

Tesei, D., Marzban, G., Marchetti-Deschmann, M., Tafer, H., Arcalis, E., Sterflinger, K., 2015. Proteome of tolerance fine-tuning in the human pathogen black yeast *Exophiala dermatitidis*. J Proteomics 128, 39–57. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.007

Thitla, T., Kumla, J., Khuna, S., Lumyong, S., Suwannarach, N., 2022. Species Diversity, Distribution, and Phylogeny of *Exophiala* with the Addition of Four New Species from Thailand. Journal of Fungi 8, 766. https://doi.org/10.3390/jof8080766

Tringe, S.G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W.H., Yap, J., Yao, F., Suan, S.T., Ing, S.K., Haynes, M., Rohwer, F., Wei, C.L., Tan, P., Bristow, J., Rubin, E.M., Ruan, Y., 2008. The airbone metagenome in an indoor urban environment. PLoS One 3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001862

Usuda, D., Higashikawa, T., Hotchi, Y., Usami, K., Shimozawa, S., Tokunaga, S., Osugi, I., Katou, R., Ito, S., Yoshizawa, T., Asako, S., Mishima, K., Kondo, A., Mizuno, K., Takami, H., Komatsu, T., Oba, J., Nomura, T., Sugita, M., 2021. *Exophiala dermatitidis*. World J Clin Cases 9, 7963–7972. https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i27.7963

Vaz, A.B.M., Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Garcia, V. de, Brandão, L.R., Teixeira, L.C.R.S., Moliné, M., Libkind, D., van Broock, M., Rosa, C.A., 2011. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. Brazilian Journal of Microbiology 42, 937–947. https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012

Wang, Q., Szaniszlo, P.J., 2009. Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. Fungal Genetics and Biology 46, 657–666. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.004

Wheeler, M.H., Abramczyk, D., Puckhaber, L.S., Naruse, M., Ebizuka, Y., Fujii, I., Szaniszlo, P.J., 2008. New Biosynthetic Step in the Melanin Pathway of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis* : Evidence for 2-Acetyl-1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene as a Novel Precursor. Eukaryot Cell 7, 1699–1711. https://doi.org/10.1128/EC.00179-08

Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., Gunde-Cimerman, N., 2019. Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. Genes (Basel) 10, 42. https://doi.org/10.3390/genes10010042

Zakharova, K., Tesei, D., Marzban, G., Dijksterhuis, J., Wyatt, T., Sterflinger, K., 2013. Microcolonial Fungi on Rocks: A Life in Constant Drought? Mycopathologia 175, 537–547. https://doi.org/10.1007/s11046-012-9592-1

Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G.S., Uršič, V., Sudhadham, M., Gunde-Cimerman, N., 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Stud Mycol 61, 21–38. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02

Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N., 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol 115, 997–1007. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007

Zeng, J.S., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., Harrak, M.J., de Hoog, G.S., 2007. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. J Clin Microbiol 45, 3713–3720. https://doi.org/10.1128/JCM.02012-06

Zhang, C., Sirijovski, N., Adler, L., Ferrari, B.C., 2019. *Exophiala macquariensis* sp. nov., a cold adapted black yeast species recovered from a hydrocarbon contaminated sub-Antarctic soil. Fungal Biol 123, 151–158. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.011

Zupančič, J., Babič, M.N., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. PLoS One 11, 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148166

Capítulo 1: Caracterización fisiológica y metabólica

5-Introducción Capítulo 1

E. dermatitidis como un microorganismo poliextremotolerante, lo que esta soportado por su habilidad de soportar temperaturas que van de 4 °C a 47 °C y de crecer en un rango de pH de 2.0 a 12.0. También muestra resistencia al estrés oxidativo, alta osmolaridad causada por varias sales (NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, NaBr, $MgSO_4$) y exposición a detergentes (Babič et al., 2018; Branda et al., 2010; Zalar et al., 2011).

E. dermatitidis se caracteriza por una notable diversidad genómica (Teixeira et al., 2017) y capacidades metabólicas únicas especializadas, incluyendo la degradación de hidrocarburos aromáticos (Lavrin et al., 2020) y compuestos fenólicos (de Hoog and Haase, 1993). Además, es capaz de metabolizar diversos neurotransmisores presentes en el cerebro, como acetilcolina, ácido γ-aminobutírico, glicina, glutamato y dopamina (Lavrin et al., 2020). Su capacidad neurotrópica se ha asociado con una elevada tasa de mortalidad, particularmente en individuos inmunocompetentes en Asia Oriental, donde se han registrado graves infecciones cerebrales causadas por cepas de *E. dermatitidis* (Kirchhoff et al., 2019; Sudhadham et al., 2008).

E. dermatitidis ha sido detectado en entornos naturales extremadamente oligotróficos, incluyendo regiones del Ártico y la Antártida, glaciares alpinos (Branda et al., 2010), manantiales termales (Sudhadham et al., 2008) y ambientes contaminados con hidrocarburos (Baron et al., 2021; Döğen et al., 2013). Notablemente, esta levadura melanizada prospera en áreas impactadas por la contaminación petrolera, como sitios ferroviarios tratados con creosota y superficies de concreto expuestas a derrames de petróleo (Döğen et al., 2013; Sudhadham et al., 2008). Estos ambientes suelen estar sujetos a condiciones extremas, incluyendo altas temperaturas, pH ácido, depleción de oxígeno, elevada salinidad y exposición intensa a radiación ultravioleta (Döğen et al., 2013; Prenafeta-Boldú et al., 2006). La capacidad de *E. dermatitidis* para utilizar PAH como única fuente de carbono subraya su extraordinaria versatilidad metabólica y adaptabilidad a nichos ambientales extremos (Lavrin et al., 2020; Zajc et al., 2019).

La poliextremotolerancia de *E. dermatitidis* se ve evidenciada en su resistencia a altas dosis de radiación, temperaturas extremas, estrés osmótico, desecación y estrés oxidativo (Döğen et al., 2013; Kirchhoff et al., 2019; Malo et al., 2021; Schultzhaus et al., 2021; Zajc et al., 2019; Zalar et al., 2011). Aunque las bases metabólicas y fisiológicas de esta resiliencia han sido poco estudiadas, se ha identificado que incluyen la síntesis de melanina en su pared celular y la secreción de polisacáridos extracelulares (de Hoog and Haase, 1993; Lavrin et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006; Song et al., 2017; Tesei et al., 2015; Zajc et al., 2019). Además, *E. dermatitidis* exhibe polimorfismo y una notable versatilidad metabólica, siendo capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos como alcoholes, azúcares, neurotransmisores y xenobióticos (Babič et al., 2018; de Hoog and Haase, 1993; Gostinčar et al., 2022; Lavrin et al., 2020).

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización fisiológica y metabólica de una colección de 41 cepas de *E. dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos (Tabla I). Se evalúan sus respuestas a diversas condiciones de estrés relevantes para su potencial oportunista, incluyendo variaciones de temperatura, pH y salinidad, así como su resistencia a antimicóticos, actividad hemolítica y capacidad de formar biopelículas. Además, se analiza su capacidad de crecimiento en presencia de neurotransmisores y compuestos aromáticos como única fuente de carbono. Finalmente, se realiza una caracterización metabólica detallada de cepas seleccionadas y se examina el impacto de la inhibición de melanina en su tolerancia al estrés.

6-Metodología Capítulo 1

6.1. Caracterización fisiológica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos.

Las condiciones de crecimiento e información de aislamiento de las cepas utilizadas en este capítulo están descritas previamente en la metodología general.

6.1.1. Análisis filogenético de cepas de *Exophiala dermatitidis* a partir de la región ITS del ARNr.

Las secuencias ITS de las cepas de *E. dermatitidis* utilizadas en este análisis fueron proporcionadas por el Departamento de Biología, Facultad de Biotecnología, Universidad de Ljubljana, Ljubljana, Eslovenia. Posteriormente, estas secuencias fueron empleadas para realizar el análisis presentado.

Se realizó un análisis filogenético a partir de la región ITS del ADN ribosomal de cepas de *E. dermatitidis*. Las secuencias fueron concatenadas y alineadas utilizando el software MAFFT 7.310 con configuración predeterminada. Gblocks versión 0.91b116 se utilizó para eliminar las regiones mal alineadas. Se infirió la filogenia a partir de la alineación de secuencias múltiples utilizando el software IQ-TREE 2.0.3 built bajo el enfoque de máxima verosimilitud.

6.1.2. Caracterización de la tolerancia a condiciones extremas de temperatura, concentraciones de NaCl y pH en una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis*.

La tolerancia de las cepas de *E. dermatitidis* a varias temperaturas (4 °C, 15 °C, 28 °C, 30 °C, 37 °C, and 42 °C), concentraciones de NaCl (5%, 10%, and 17%) y valores extremos de pH (2.5, 4, 10, and 12.5) se realizó en placas de 96 pocillos. Cada uno de los pocillos fue inoculado con 300 µL de medio MEB (Anexo 2), con una densidad celular de 0.5 (DO_{600} = 0.5). Las microplacas fueron incubadas durante cinco días a 150 rpm y el crecimiento celular fue monitoreado a 600 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA). Se utilizaron controles abióticos en cada ensayo. El crecimiento de las cepas bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones de NaCl, se incubó a dos temperaturas, 28 °C y 37 °C, para cada uno de los tratamientos. Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado (Gümral et al., 2016).

6.1.3. Caracterización de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes naturales y clínicos en cuanto a resistencia a antimicóticos, producción de hemólisis y formación de biopelículas.

Formación de biopelículas

La formación de biopelículas de la colección de cepas de *E. dermatitidis* se cuantificó utilizando el ensayo violeta de cristal (Ren et al., 2015), con modificaciones descritas por Zajc et al. (2019). La suspensión celular obtenida previamente de un preinóculo de cinco días fue inoculada en cada pocillo que contenía previamente 200 µL medio MEB (Anexo 2), con una DO_{600}=0.2 en microplacas de 96 pocillos. La incubación de las microplacas se realizó durante 48 horas tanto a 28 °C como a 37 °C. Posterior a la incubación, se añadieron 100 µL 1% (w/v) de violeta cristal a cada pocillo. Luego de 30 minutos los pocillos se lavaron con agua desionizada y se añadieron 100 µL al 10% (w/v) de sulfato de dodecilo de sodio (SDS) para solubilizar la biopelícula. La absorbancia de la suspensión resultante se medió a 590 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) (Zajc et al., 2019). Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado.

Actividad hemolítica

La medición de la actividad hemolítica de las cepas de *E. dermatitidis* fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Černoša et al. (2021). 5 µL de suspensión celular (DO_{600} = 0.1) fue inoculado en placas de agar sangre (Dibico, Cuautitlán Izcalli, México), suplementadas con 5 % de sangre desfibrinada estéril de bobino. Después de la incubación durante siete días a 28 °C y 37 °C, las características hemolíticas de las colonias fueron examinadas y clasificadas de acuerdo con Buxton (2005): α-hemólisis, indica una hemólisis parcial y decoloración verdosa-grisácea o parduzca alrededor de las colonias; β-hemólisis, se caracteriza por una hemólisis total y un claro halo alrededor de las colonias; y la γ-hemólisis es cuando no se observa hemólisis y no hay cambios alrededor de las colonias. Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado.

Susceptibilidad a antimicóticos

Se determinó la susceptibilidad de las cepas de *E. dermatitidis* a varios antimicóticos, incluidos la terbinafina, el ketoconazol, el fluconazol, el itraconazol y la nistatina (Merck, Darmstadt, Alemania). Estos antimicóticos fueron evaluados a diferentes dosis, tanto a altas como a bajas concentraciones (0.0313 y16.0 µg/mL de ketoconazol e itraconazol, 0.125 y 64.0 µg/mL de fluconazol, 0.33 y 1.0 µg/mL de terbinafina, 0.6024 y 32.0 µg/mL de nistatina), cubriendo el espectro de concentraciones mínimas inhibitorias previamente reportado por (Arikan et al., 2002; Barbara D. Alexander, 2017; Vitale et al., 2003). Las placas de Petri contenían Müller-Hinton Agar (Biolife, Milan, Italia) (Anexo 4) suplementado con discos impregnados con antifúngico y rociados con 5 µL de suspensión celular (DO_{600} = 0.1). Las placas de Petri fueron incubadas por 72 horas tanto a 28 °C como a 37 °C (Najafzadeh et al., 2014). Basándonos en la inhibición del crecimiento de las cepas la susceptibilidad a los antimicóticos fue categorizado en resistente, intermedio o sensible (Barbara D. Alexander, 2017). Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado.

6.2. Caracterización metabólica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos.

6.2.1. Evaluación del crecimiento de cepas de *Exophiala dermatitidis* en presencia de neurotransmisores (dopamina, serotonina, epinefrina y norepinefrina) y compuestos aromáticos (fenol, 1,2,4-bencenotriol, naftaleno y fenantreno) como única fuente de carbono.

El potencial metabólico de las cepas de *E. dermatitidis* de utilizar neurotransmisores (serotonina, dopamina, norepinefrina y epinefrina) y compuestos poliaromáticos (fenol, 1,2,4-bencenotriol, fenantreno y naftaleno) como única fuente de carbono fue evaluado utilizando microplacas de 96 pocillos (Tabla II). Cada pocillo contenía 300 µL de medio mínimo suplementado con 0.01 M de cada uno de los respetivos compuestos. La composición de medio mínimo puede ser observada en el Anexo 3. La densidad celular fue ajustada en cada uno de los pocillos a 0.1 (DO_{600}). Las microplacas fueron incubadas a 37 °C y agitadas a 150 rpm. El crecimiento fue monitoreado durante un período de cinco días utilizando el espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA). Cultivos en presencia de medio MEB (Anexo 2), fueron utilizados como control. Controles abióticos fueron incluidos en el experimento. Cada experimento fue realizado dos veces por triplicado.

Tabla II. Propiedades fisicoquímicas de los neurotransmisores y de los compuestos poliaromáticos utilizados en este estudio.

Compuestos	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Punto de fusión	Solubilidad	Número de donadores de enlace de hidrógeno	Número de aceptores de enlaces de hidrógeno	Masa monoisotópica	Área superficial polar topológica	Compuesto canónico
Dopamina (Dop)	$C_8H_{11}NO_2$	153.18 g/mol	128 °C	535 mg/mL	3	3	153.078978594	66.5 Å²	si
Serotonina (Ser)	$C_{10}H_{12}N_2O$	176.22 g/mol	167,7 °C	25.5 mg/mL	3	2	176.094963011	62 Å²	si
Epinefrina (Epi)	$C_9H_{13}NO_3$	183.204 g/mol	211.5 °C	0.18 mg/mL	4	4	183.08954328	72.7 Å²	si
Norepinefrina (Nor)	$C_8H_{11}NO_3$	169.18 g/mol	217 °C	849 mg/mL	4	4	169.07389321	86.7 Å²	si
Fenol (Phen)	C_6H_5OH	94.11 g/mol	42.7778 °C	82.8 mg/mL	1	1	94.041864811	20.2 Å²	si
1,2,4-bencenotriol (Ben-t)	$C_6H_6O_3$	126.11 g/mol	140.5 °C	1000 mg/mL	3	3	126.031694049	60.7 Å²	si
Naftaleno (Napht)	$C_{10}H_8$	128,1705 g/mol	80.3 °C	0.031 mg/mL	0	0	128.062600255	0 Å²	si
Fenantreno (Phe)	$C_{14}H_{10}$	178.23 g/mol	99 °C	1.15 mg/mL	0	0	178.078250319	0 Å²	si

6.2.2. Caracterización metabólica de *Exophiala dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310) mediante la metodología de microarreglos de fenotipos YT MicroPlateTM Biolog.

Para analizar los perfiles metabólicos de cinco cepas de *E. dermatitidis*: EXF-10123, EXF-8193, EXF-13310, EXF-5586 y EXF-9187 (Table I) se utilizó la tecnología YT MicroPlateTM de Biolog (Biolog, Hayward, CA, USA) (Figura 2). Estas cepas fueron seleccionadas para analizar sus perfiles metabólicos basados en criterios específicos: EXF-10123 es una cepa tipo (Lavrin et al., 2020), y el resto de las cepas han sido previamente caracterizadas en diversos estudios, con representación de diversos ambientes y estilos de vida (Zalar et al., 2011); (resultados nuestros no publicados).

La tecnología YT MicroPlateTM está compuesta por 94 ensayos simultáneos de oxidación y asimilación que generan un patrón que refleja los perfiles metabólicos de las cepas. En cada uno de los 96 pocillos de las microplacas se encuentran nutrientes esenciales y bioquímicos disecados incluidos aminoácidos, ácidos orgánicos, polialcoholes y azúcares (mono-, di- y poliscáridos). Pocillos específicos se encuentran destinados a los test de oxidación, donde debido a sensibilidad colorimétrica a la oxidación de las fuentes carbono es testeada mediante el cambio de coloración

provocado por la oxidación del tinte redox de violeta de tetrazolio. Por otro lado, los pocillos que contienen los test de asimilación no presentan un colorante redox y son utilizados para medir la utilización de los substratos. La suspensión celular ($DO_{600\ nm}$ = 0.1) obtenida de preinóculos de cinco días de las cepas de *E. dermatitidis* fueron añadidos al fluido de inoculación siguiendo el protocolo de YT MicroPlateTM de Biolog. 100 µL del fluido de inoculación fueron añadidos a cada pocillo de YT MicroPlates e incubados a 28 °C durante 20 días. Las lecturas para determinar la oxidación y asimilación de las diferentes fuentes de carbono fueron monitoreadas a 590 nm utilizando el espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) (Troncoso et al., 2017). La oxidación positiva fue identificada mediante el cambio a la coloración púrpura debido a la reducción del violeta de tetrazolio, mientras que la asimilación de las fuentes de carbono estuvo indicada por el incremento en la turbidimetría. La no oxidación de los substratos está asociada a reacciones metabólicas negativas y no presentaron un cambio en la coloración; mientras que el no incremento de la absorbancia se asocia a la ausencia de asimilación de los substratos (Kumari et al., 2023). Reacciones con valores de absorbancias ≥ 0.2 fueron consideradas como positivas (Rico and Preston, 2008). Las YT MicroPlates no inoculadas funcionaron como controles negativos, con controles adicionales en los pocillos que contienen Tween 80 y agua. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

YT Microplate Map

A-1 Water	A-2 Acetic Acid	A-3 Formic Acid	A-4 Propionic Acid	A-5 Succinic Acid	A-6 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	A-7 L-Aspartic Acid	A-8 L-Glutamic Acid	A-9 L-Proline	A-10 D-Gluconic Acid	A-11 Dextrin	A-12 Inulin
B-1 D-Cellobiose	B-2 Gentiobiose	B-3 Maltose	B-4 Maltotriose	B-5 D-Melezitose	B-6 D-Melibiose	B-7 Palatinose	B-8 D-Raffinose	B-9 Stachyose	B-10 Sucrose	B-11 D-Trehalose	B-12 Turanose
C-1 N-Acetyl-D-Glucosamine	C-2 α-D-Glucose	C-3 D-Galactose	C-4 D-Psicose	C-5 L-Sorbose	C-6 Salicin	C-7 D-Mannitol	C-8 D-Sorbitol	C-9 D-Arabitol	C-10 Xylitol	C-11 Glycerol	C-12 Tween 80
D-1 Water	D-2 Fumaric Acid	D3 L-Malic Acid	D-4 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	D-5 Bromosuccinic Acid	D6 L-Glutamic Acid	D-7 γ-Aminobutyric Acid	D-8 α-Ketoglutaric Acid	D-9 2 -Keto-D-Gluconic Acid	D-10 D-Gluconic Acid	D-11 Dextrin	D-12 Inulin
E-1 D-Cellobiose	E-2 Gentiobiose	E-3 Maltose	E-4 Maltotriose	E-5 D-Melezitose	E-6 D-Melibiose	E-7 Palatinose	E-8 D-Raffinose	E-9 Stachyose	E-10 Sucrose	E-11 D-Trehalose	E-12 Turanose
F-1 N-Acetyl-D-Glucosamine	F-2 D-Glucosamine	F-3 α-D-Glucose	F-4 D-Galactose	F-5 D-Psicose	F-6 L-Rhamnose	F-7 L-Sorbose	F-8 α-Methyl-D-Glucoside	F-9 β-Methyl-D-Glucoside	F-10 Amygdalin	F-11 Arbutin	F-12 Salicin
G-1 Maltitol	G-2 D-Mannitol	G-3 D-Sorbitol	G-4 Adonitol	G-5 D-Arabitol	G-6 Xylitol	G-7 i-Erythritol	G-8 Glycerol	G-9 Tween 80	G-10 L-Arabinose	G-11 D-Arabinose	G-12 D-Ribose
H-1 D-Xylose	H-2 Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	H-3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid plus D-Xylose	H-4 Quinic Acid plus D-Xylose	H-5 D-Glucuronic Acid plus D-Xylose	H-6 Dextrin plus D-Xylose	H-7 α-D-Lactose plus D-Xylose	H-8 D-Melibiose plus D-Xylose	H-9 D-Galactose plus D-Xylose	H-10 m-Inositol plus D-Xylose	H-11 1,2-Propanediol plus D-Xylose	H-12 Acetoin plus D-Xylose

Oxidation Tests Assimilation Tests

Figura 2. Fuentes de carbono en la microplaca YT MicroPlate de Biolog. Imagen tomada de: https://www.biolog.com/products/microbial-identification-microplates/yeast-test-panel/

6.3. Inhibición de melanina en cepas de *Exophiala dermatitidis* y exposición a una variedad de pH, temperaturas, concentraciones de NaCl, neurotransmisores y compuestos aromáticos.

Los preinóculos de cinco días en matraces de 125 mL con 30 ml de medio MEB (Anexo 2), se obtuvieron a partir de cepas de *E. dermatitidis* (EXF-10123, EXF-8193-EXF-13310, EXF-5586 y EXF-9187). Posteriormente, 20 mL de medio MEB (Anexo 2), con una densidad celular de 0.5 $DO_{600\ nm}$ fueron incubados en matraces de 125 mL a 28 °C y agitado a 150 rpm durante cinco días. Los cultivos de cada cepa fueron mantenidos con y sin el inhibidor de melanina triciclazol (0.5 mM) (Kejžar et al., 2013).

El efecto de la inhibición de melanina en la tolerancia a una variedad de pHs (2.5, 10, 12.5), temperaturas (4 °C, 28 °C, 37 °C), salinidades (5%, 10%, 15% NaCl), asimilación de neurotransmisores (0.01 M, dopamina y serotonina) y compuestos poliaromáticos (0.01 M, 1,2,4 bencenotriol y fenantreno) fue evaluado en las cepas seleccionadas de *E. dermatitidis*. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos que contenían 200 µL de medio de cultivo por pocillo. Las microplacas fueron incubadas a 28 °C por siete días. El efecto de la inhibición de la melanina en la

tolerancia al pH, la temperatura y la salinidad fue realizado en medio MEB (Anexo 2); mientras que la asimilación de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos fue realizado en medio mínimo (MM) (Anexo 3). La concentración celular inicial en cada pocillo fue de 0.1 DO_{600nm}.

El mantenimiento de la inhibición química en la biosíntesis de melanina mediante la adición de triciclazol en todo el experimento se estandarizó mediante el uso de varias dosis, incluyendo la adición inicial y seguida de más dosis adicionadas. La dosis inicial de triciclazol fue de 0.5 mM seguido por una dosis de 0.25 mM que fue efectiva en la supresión de la melanina durante el curso de los siete días del ensayo, evitando la pigmentación de los cultivos. Por lo que dos dosis del inhibidor de melanina fueron administradas a los cultivos en las microplacas.

El crecimiento del hongo fue monitoreado espectroscópicamente a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA). Adicionalmente, el crecimiento de los cultivos suplementado con el inhibidor de melanina fue monitoreado utilizando microscopio de contraste de fases (AmScope T720) with an Apo100×/1.25 N.A. objetivo (AmScope, Irvine, CA, USA). Adquisición de datos fue realizada utilizando la cámara de AmScope MU1000 para todas las observaciones. El experimento fue realizado por triplicado asegurándonos rigurosamente de la reproductividad de los resultados.

6.4. Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas en el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis,* con el fin de determinar su tolerancia a distintas temperaturas, pHs y salinidades, se analizaron mediante el test para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis. Posteriormente, se utilizó el test Conover-Iman *post hoc* test para determinar las diferencias entre los tratamientos, sirviendo como variable exploratoria, utilizando la velocidad de crecimiento como variable dependiente ($p \geq 0.05$).

Para analizar los patrones de crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* en presencia de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos se utilizó el Kruskal-Wallis test junto con Conover-Iman *post hoc* test ($p \geq 0.05$).

Estos análisis se realizaron utilizando el paquete agricolae R package (De Mendiburu F and Simon R, 2015). Además, para determinar la utilización de los neurotransmisores y compuestos poliaromáticos utilizados por las cepas estudiadas se realizó una correlación de Pearson. Para evaluar los perfiles de utilización de fuentes de asimilación se realizó un análisis de componentes principales (PCA) mediante el paquete Vegan R package (Jari Oksanen et al., 2022), incorporando el sitio de aislamiento de las cepas como una variable exploratoria.

En el experimento de Biolog YT MicroPlate, los datos de la absorbancia de los ensayos de oxidación y asimilación fueron ajustados mediante la substracción de la absorbancia del tiempo cero de los subsecuentes valores de absorbancia de cada uno de los pocillos a lo largo del tiempo. Para determinar la progresión temporal en cuanto a la oxidación y asimilación de los substratos se realizó una correlación de Pearson sobre las cinco cepas seleccionadas en este ensayo.

Para analizar el efecto de la inhibición de la melanina en las cepas seleccionadas de *E. dermatitis* se evaluó la tolerancia a diferentes condiciones de estrés mediante el empleo de prueba t pareada de Student ($p \geq 0.05$; $p \geq 0.01$; $p \geq 0.001$).

Todos los análisis estadísticos y las figuras se realizaron utilizando R version 4.2.2 (R Core Team, 2022) en RStudio IDE (version 2022.07.1).

7-Resultados Capítulo 1

7.1. Caracterización fisiológica de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos

7.1.1. Análisis filogenético de la colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* a partir de la región ITS del ARNr

La colección de 41 cepas de *E. dermatitidis* utilizadas en este estudio tiene muestras aisladas de todos los continentes de nuestro planeta (Figura 3A), de las cuales fueron analizadas filogenéticamente 40 secuencias ITS pertenecientes a cepas de *E. dermatitidis* (Figura 3B). Este estudio reveló la formación de dos grupos principales. En uno se agrupan principalmente los genotipos B y C, mientras que en el otro se clasifican las del genotipo A. No se observó una conexión clara entre los grupos que se forman y los sitios de aislamientos de las cepas, lo que puede estar relacionado con el tamaño de la muestra. Los resultados encontrados en este estudio sugieren que un solo gen no es suficiente para conocer la evolución de todo el genoma de estas cepas. Sin embargo, los resultados pudieran sugerir los posibles genotipos de las cepas. *E. dermatitidis* pertenece a un género de naturaleza polifilética (Bahadori et al., 2020). Como se mencionó previamente a partir de polimorfismos en la región ITS del ADN ribosomal se determinó la presencia de tres genotipos principales A, B y C en *E. dermatitidis* y esto fue corroborado mediante detección de intrones en el ADN ribosomal de la subunidad pequeña (SSU) y perfil genético por huellas moleculares (*Fingerprinting*) (Matos et al., 2003; Zalar et al., 2011). El genotipo A tiene una amplia distribución mundial y se encuentra asociado a casos clínicos, el genotipo B está principalmente conectado a hábitats naturales y el genotipo C es extremadamente raro (de Hoog et al., 2005; Matos et al., 2003; Zupančič et al., 2016).

Como se discutirá en el capítulo 2, las cepas de *E. dermatitidis* EXF-8187 y EXF-5586, ambas aisladas de ambientes interiores y agrupadas en el mismo clado, presentan evidencias de diploidía. La cepa EXF-5586 ha sido previamente identificada como perteneciente al genotipo B, por lo que se puede sugerir que EXF-8187 también pertenece a este genotipo. Sin embargo, se requieren más evidencias para confirmarlo con certeza, ya que existen subdivisiones dentro de esta clasificación (Matos et al., 2003; Zupančič et al., 2016).

Matos et al. (2003) plantean que es plausible pensar que cepas ambientales de *E. dermatitidis* han colonizado nuevos entornos, como los ambientes interiores, donde pudieron haber experimentado un cambio de hospedador y adquirido una mayor virulencia en humanos. Además, los autores sugieren que este evento probablemente ocurrió en Asia, región donde se han documentado las infecciones severas asociadas al genotipo A, el cual se considera de evolución más reciente.

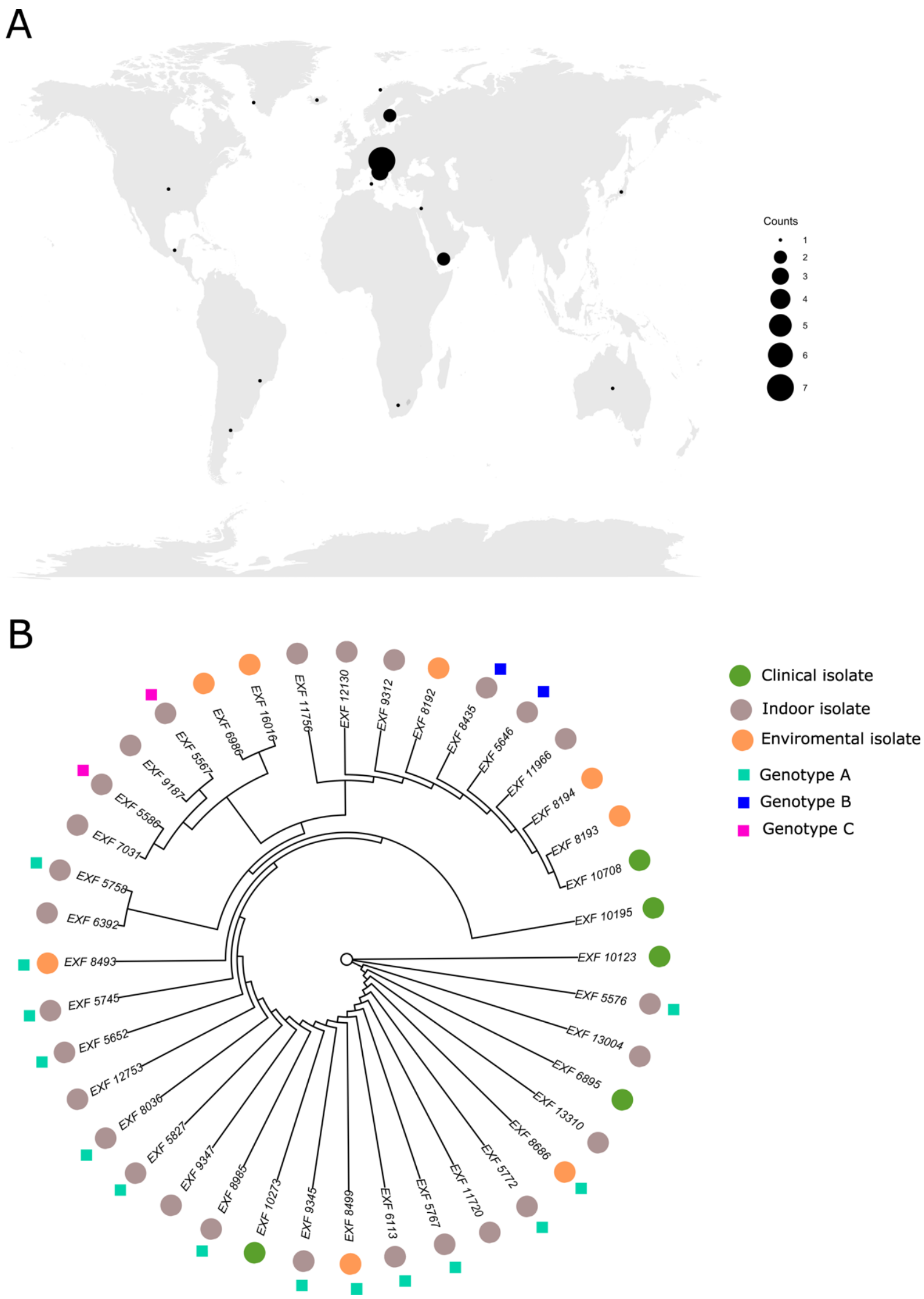


Figura 3. Colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de diferentes ambientes. (A) Distribución geográfica y abundancia de las cepas de *Exophiala dermatitidis* utilizadas en este estudio. (B) Análisis filogenético a partir de la región ITS del ADN ribosomal de 29 cepas de *Exophiala dermatitidis* utilizadas en este estudio.

7.1.2. Poliextremotolerancia en cepas de *Exophiala dermatitidis*, creciendo bajo diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y valores de pH

La Figura 4A-F presenta mapas de calor y diagramas de caja que muestran las tasas de crecimiento específicas de 41 cepas de *E. dermatitidis* a diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y valores de pH. La mayoría de las cepas demostraron adaptabilidad en el rango de temperatura evaluado, con un crecimiento óptimo observado a 28 °C. A esta temperatura, las tasas de crecimiento específicas oscilaron entre 0.002 h^{-1} y 0.017 h^{-1} (Figura 4B). Las tasas de crecimiento disminuyeron a la mitad cuando la temperatura se incrementó a 30 °C, excepto en la

cepa EXF-10195, aislada de un paciente con fibrosis quística, que mostró un crecimiento máximo (0.012 h^{-1}) a 30 °C. En general, las tasas de crecimiento fueron significativamente menores a 4 °C, 15 °C, 37 °C y 42 °C en comparación con 28 °C y 30 °C (Figuras 5A y B). Notablemente, la cepa EXF-5586, aislada de una goma de lavavajillas, mostró un crecimiento máximo (0.014 h^{-1}) a 4 °C, mientras que las cepas EXF-11756, EXF-6392 y EXF-9347, de entornos domésticos, alcanzaron su máximo crecimiento a 37 °C. La cepa EXF-13310, aislada de agua oleosa en un taller de mecánica automotriz, mostró su tasa de crecimiento más alta a 42 °C (0.07 h-1). Además, la cepa ambiental EXF-8193 y las cepas interiores EXF-8435, EXF-9187 y EXF-11966 mostraron un crecimiento notable a 42 °C. Las tasas de crecimiento más bajas para todas las cepas se observaron a 15 °C (Figura 4A y B).

A las temperaturas estudiadas (28 °C y 37 °C), las cepas mostraron un aumento en el crecimiento en presencia de 5% de NaCl (Figura 4C y D). La temperatura no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el crecimiento de las cepas en 5% de NaCl. En general, se observó una disminución en la tasa de crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* a 10% y 17% de NaCl, con una inhibición significativa del crecimiento a 17% de NaCl observada a ambas temperaturas (Figura 4C y D). El crecimiento de las cepas en 17% de NaCl fue notablemente influenciado por la temperatura, con un mayor crecimiento observado a 28 °C en comparación con 37 °C. El mapa de calor categoriza los aislados de *E. dermatitidis* en tres grupos principales (Figura 4C). Notablemente, bajo condiciones de 5% y 10% de NaCl a 28 °C y 37 °C, las tasas de crecimiento de ciertas cepas, incluyendo los aislados clínicos EXF-10123 y EXF-10273, las cepas interiores EXF-8036 y EXF-9187, y la cepa EXF-6986 obtenida de suelo contaminado cerca de una gasolinera, aumentaron significativamente. Entre todas las cepas evaluadas, la cepa clínica EXF-10123 mostró un crecimiento excepcionalmente rápido en 17% de NaCl a 28 °C (0.009 h-1). Por el contrario, las cepas EXF-16016, EXF-6942 y EXF-8192 mostraron las tasas de crecimiento más bajas en todas las condiciones examinadas (0.001 h-1, 0.002 h-1, 0.003 h-1, respectivamente) (Figura 4C). Estos hallazgos proporcionan evidencia de halotolerancia en las cepas de *E. dermatitidis*.

Las cepas de *E. dermatitidis* también mostraron una notable adaptabilidad a las variaciones de pH, prosperando tanto en condiciones altamente ácidas como alcalinas (Figura 4E y F). En general, las cepas mostraron una tasa de crecimiento más pronunciada en valores de pH de 4 y 10, independientemente de la temperatura (28 °C o 37 °C). Como se muestra en la Figura 4F, muchos aislados de *E. dermatitidis* exhibieron sus tasas de crecimiento específicas más altas a 28 °C en valores de pH de 4, 10 y 12.5. En contraste, la mayoría de los aislados mostraron su tasa de crecimiento específica más alta a pH 10 a 37 °C (Figura 4E). Notablemente, la cepa EXF-9187, obtenida de un lavavajillas, demostró la tasa de crecimiento específica más alta a pH 2.5 y 28 °C, pero no a 37 °C. Por otro lado, el aislado interior EXF-5772 exhibió patrones de tasa de crecimiento distintos a 37 °C, con la tasa de crecimiento más alta observada a pH 2.5 (0.01 h-1) y 10 (0.005 h-1) (Figura 4E). Estos hallazgos destacan el impacto significativo de la temperatura en el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* en diferentes condiciones de pH (Figura 4E y F).

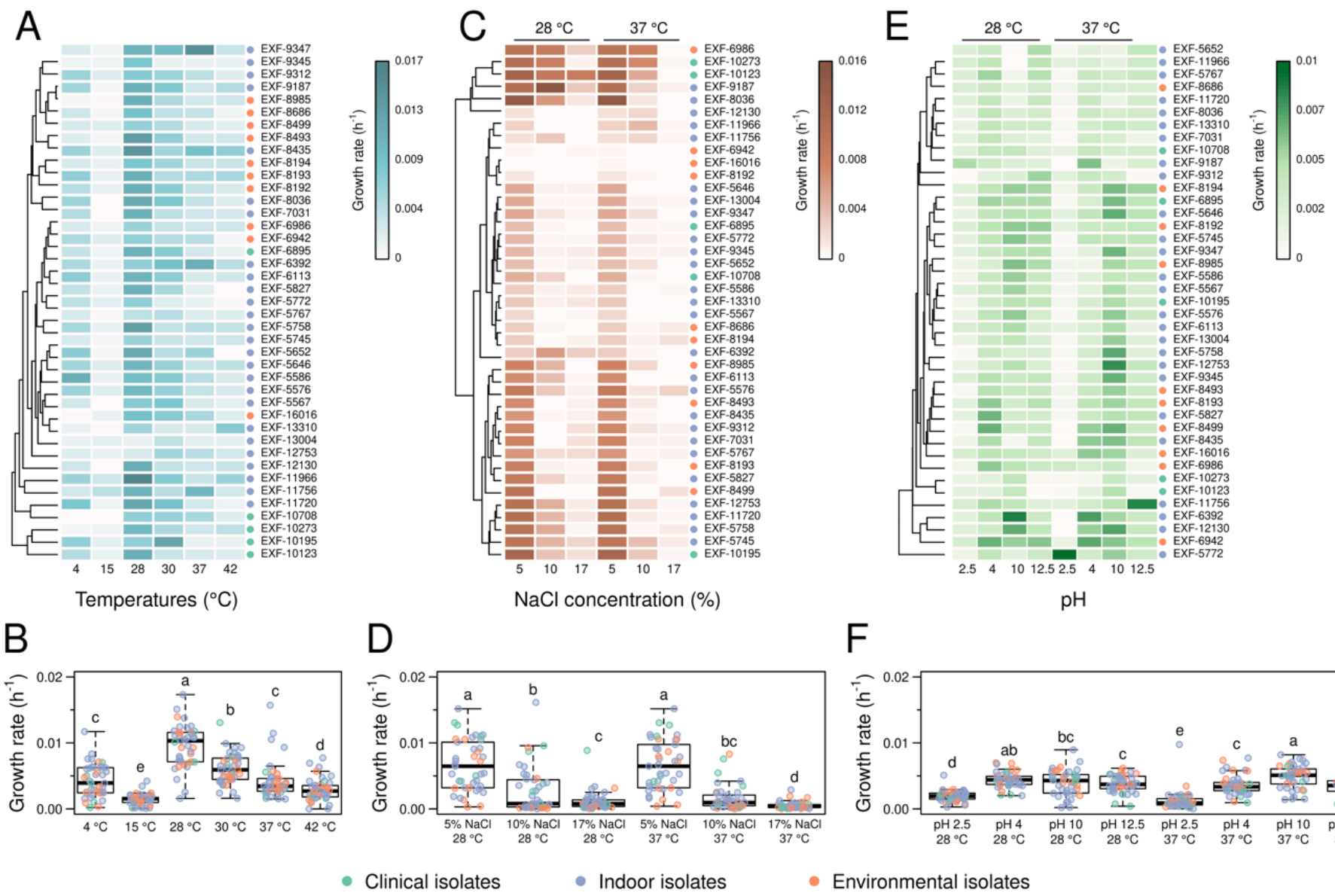


Figura 4. Crecimiento celular de 41 cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de muestras clínicas, domésticas y ambientales en una variedad de temperaturas (4 °C, 15 °C, 28 °C, 30 °C, 37 °C y 42 °C), concentraciones de NaCl (5%, 10% y 17%) y niveles de pH (2.5, 4, 10 y 12.5). Los mapas de calor (A, C, D) ilustran las tasas de crecimiento (h^-1) de las cepas de *Exophiala dermatitidis* bajo diferentes condiciones de temperatura, concentración de NaCl y pH, respectivamente. El análisis estadístico se realizó utilizando las pruebas de Kruskal-Wallis y Conover-Iman ($p \leq 0.05$).

7.1.3. Formación de biopelículas, actividad hemolítica y resistencia a antifúngicos en cepas de *Exophiala dermatitidis*

Se estudió la formación de biopelículas, la actividad hemolítica y la resistencia antifúngica de las cepas de *E. dermatitidis* (Figura 5). La mayoría de los aislados mostraron mayor formación de biopelículas a 37 °C. Sin embargo, las cepas EXF-8493 y EXF-8036 destacaron por su formación de biopelículas a 28 °C. El fenotipo α-hemolítico predominó entre las cepas de *Exophiala*, observándose en el 93 % de ellas, mientras que una menor proporción presentó fenotipos γ-hemolíticos tanto a 28 °C como a 37 °C (Figura 5). No se observó hemólisis β. A pesar de las altas concentraciones utilizadas, las cepas mostraron una resistencia considerable a la nistatina tanto a 28 °C como a 37 °C (Figura 5). Además, una proporción significativa de las cepas presentó resistencia a fluconazol e itraconazol. Sin embargo, el crecimiento de las levaduras fue sustancialmente inhibido por ketoconazol y terbinafina en ambos rangos de temperatura.

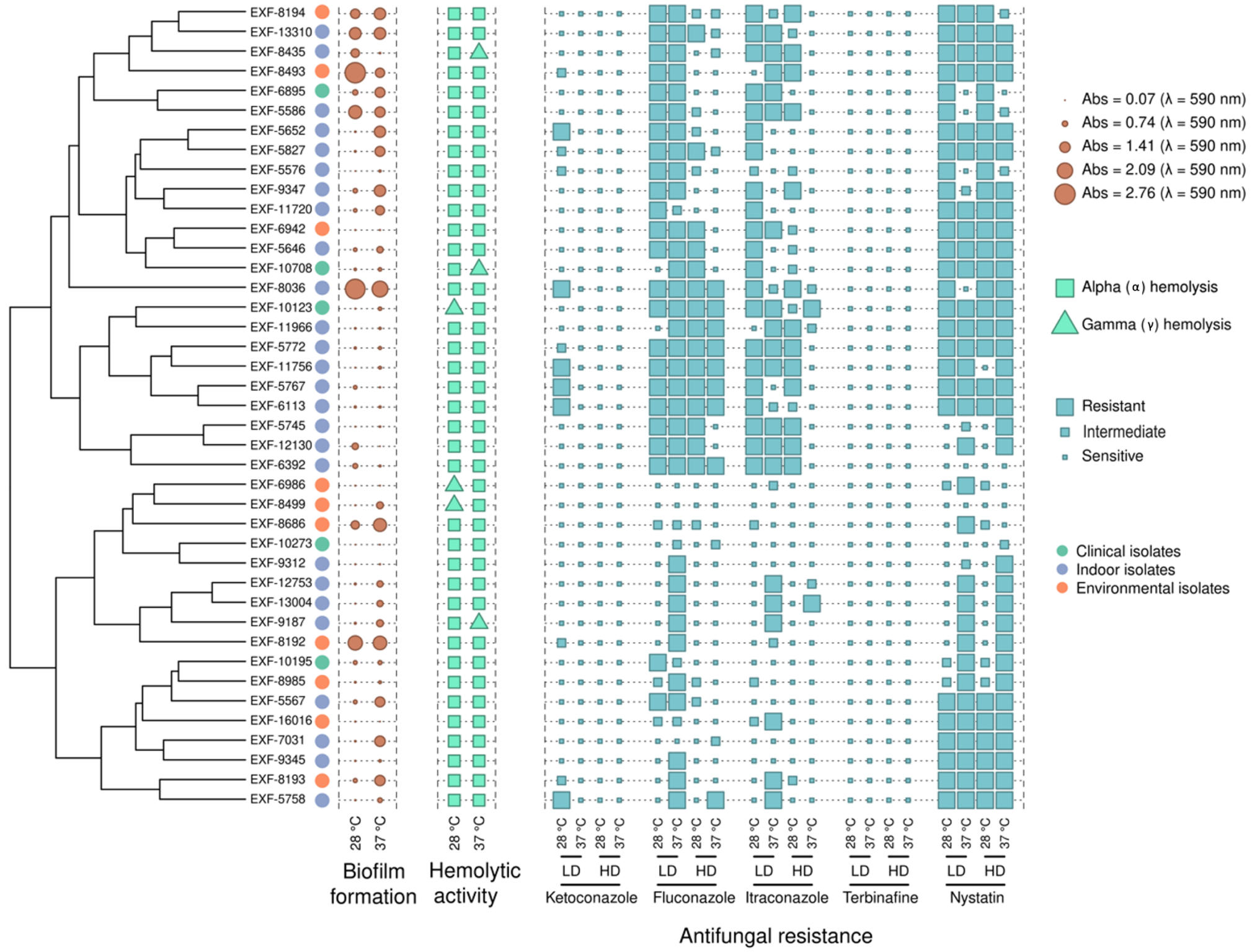


Figura 5. Formación de biopelículas, actividad hemolítica y resistencia antifúngica de las cepas de *Exophiala dermatitidis* cultivadas a 28 °C y 37 °C. La susceptibilidad a los medicamentos antifúngicos se probó tanto a dosis bajas (LD*) como altas (HD**): (0.0313* y 16.0** μg/mL de ketoconazol e itraconazol, 0.125* y 64.0** μg/mL de fluconazol, 0.33* y 1.0** μg/mL de terbinafina, 0.6024* y 32.0** μg/mL de nistatina).

7.2 Caracterización metabólica y molecular de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos

7.2.1. Utilización de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos en cepas de *Exophiala dermatitidis*

Se evaluó la respuesta de crecimiento de cepas de *E. dermatitidis* utilizando fuentes únicas de carbono, incluidos neurotransmisores (serotonina, dopamina, norepinefrina y epinefrina) y compuestos (poli)aromáticos (fenol, 1,2,4-bencenetriol, fenantreno y naftaleno) (Figura 6A). Las Figuras 6A y B indican que las cepas de *E. dermatitidis* mostraron un crecimiento significativamente mayor en presencia de neurotransmisores en comparación con los compuestos poliaromáticos. Destacando que la mayoría de las cepas mostraron un crecimiento óptimo en presencia del 1,2,4-bencenetriol como única fuente de carbono, seguido de la serotonina (Figuras 6A y B). Las cepas EXF-5586 y EXF-5646, provenientes de ambientes interiores, junto con la cepa EXF-16016 de un sitio contaminado con petróleo, se agruparon de manera independiente según sus respuestas de crecimiento frente a los hidrocarburos y neurotransmisores evaluados (Figura 6A).

Se observó una correlación positiva significativa ($p < 0.01$) entre el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* con diferentes neurotransmisores y compuestos poliaromáticos (Figuras 6C y D). En particular, las correlaciones positivas más fuertes se encontraron entre serotonina y 1,2,4-bencenotriol ($r = 0.8$), epinefrina y fenol ($r = 0.8$), epinefrina y naftaleno ($r = 0.8$), y norepinefrina y naftaleno ($r = 0.8$). Además, se encontraron correlaciones positivas significativas ($p < 0.01$) entre el crecimiento con los compuestos poliaromáticos fenol y naftaleno ($r = 0.8$), así como entre los neurotransmisores dopamina y epinefrina ($r = 0.9$) utilizados como fuentes de carbono (Figuras 6C y D).

El análisis de componentes principales (PCA) ilustró la correlación entre el crecimiento de *E. dermatitidis* en presencia de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos (Figura 6E). Se identificaron tres grupos distintos con varianzas comparables. El fenol, la dopamina y la epinefrina fueron los principales contribuyentes al PC1, mientras que el naftaleno, el fenantreno y la norepinefrina contribuyeron significativamente al PC2. Las contribuciones de varianza de 1,2,4-bencenotriol y serotonina contrastaron con las de otras fuentes de carbono. Además, se realizó un análisis PCA tridimensional para examinar la relación entre el crecimiento de *E. dermatitidis* en diversas fuentes de carbono (neurotransmisores y compuestos poliaromáticos) y el origen de las cepas de *E. dermatitidis* (Figura 6E). No se observó una agrupación discernible basada en la fuente de aislamiento entre los aislados de *E. dermatitidis*.

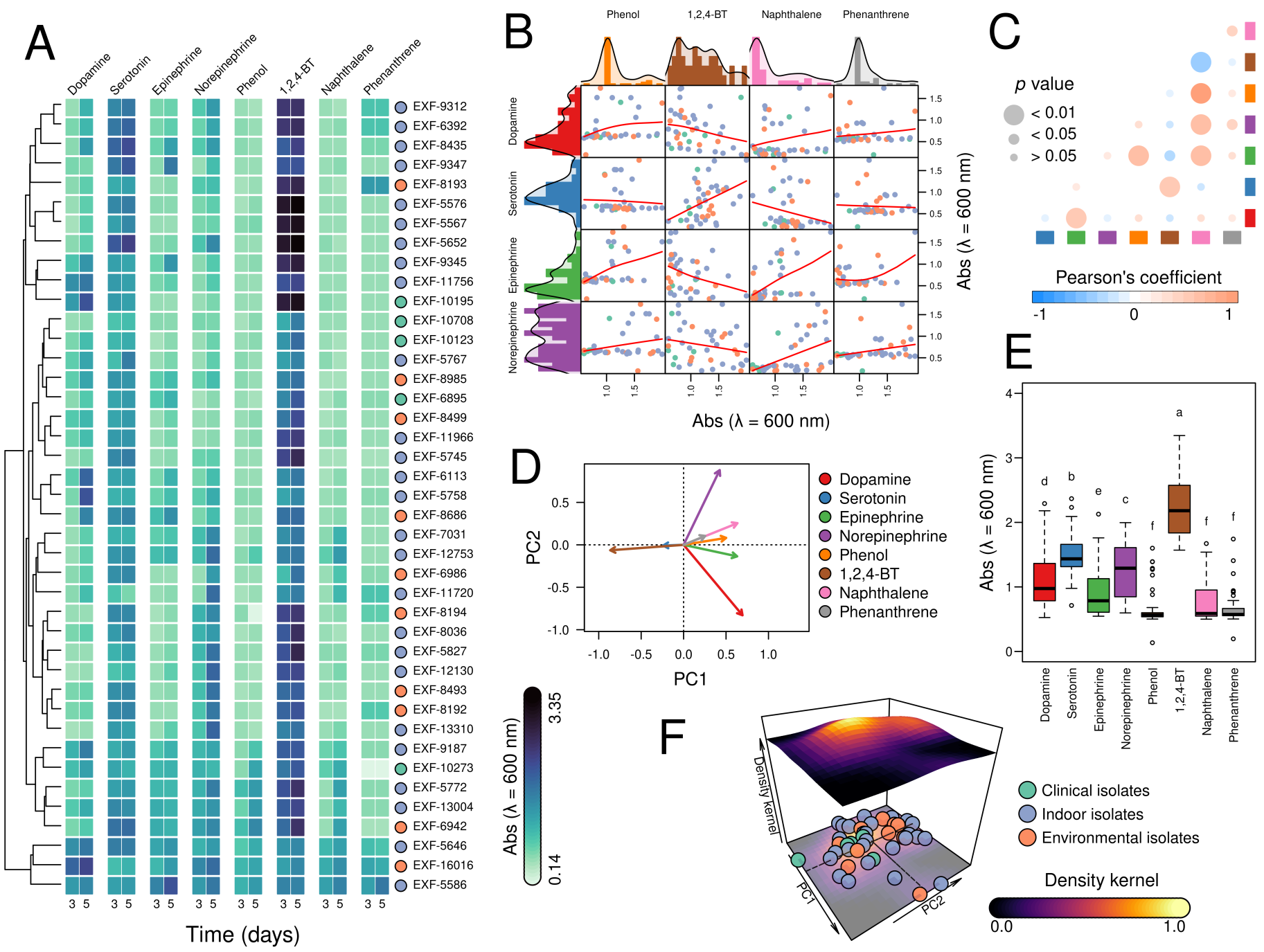


Figura 6. Crecimiento de las cepas de *Exophiala dermatitidis* utilizando diferentes neurotransmisores (serotonina, dopamina, norepinefrina y epinefrina) y compuestos poliaromáticos (fenol, 1,2,4-bencenotriol, fenantreno y naftaleno) como únicas fuentes de carbono. El mapa de calor (A) muestra el aumento de la absorbancia ($DO_{600\ nm}$) con el tiempo, indicando el crecimiento de las cepas de *Exophiala dermatitidis* con los neurotransmisores y compuestos poliaromáticos evaluados. Los coeficientes de correlación de Pearson (B, C) muestran correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre el crecimiento de las cepas y los neurotransmisores o compuestos aromáticos como únicas fuentes de carbono. Se muestra la visualización de la correlación con diagramas de dispersión (B). El análisis de componentes principales (D) revela patrones en el

crecimiento de las cepas de *Exophiala dermatitidis* bajo estas condiciones. Los diagramas de caja (E) muestran la distribución y los valores promedio de crecimiento de todas las cepas de *Exophiala dermatitidis* en presencia de neurotransmisores y compuestos aromáticos como fuentes únicas de carbono ($p < 0.05$). Los gráficos de distribución de densidad del núcleo (F) visualizan los resultados del análisis de componentes principales para las cepas de *Exophiala dermatitidis* cultivadas en presencia de neurotransmisores y compuestos aromáticos como fuentes únicas de carbono.

7.2.2. Caracterización metabólica de alto rendimiento de cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis*

La capacidad metabólica versátil de las cepas *E. dermatitidis* EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 fue demostrada mediante el ensayo Biolog MicroPlate, que evalúa la oxidación y asimilación de 94 fuentes de carbono diferentes, incluidos ácidos orgánicos, polialcoholes, aminoácidos y monosacáridos, disacáridos y polisacáridos (Figura 7). Estas cinco cepas fueron seleccionadas para ensayos metabólicos de alto rendimiento basados en criterios específicos mencionados con anterioridad. La cepa EXF-10123 es una cepa tipo (Lavrin et al., 2020), y el resto de las cepas han sido previamente caracterizadas en diversos estudios, con representación de diversos ambientes y estilos de vida (Zalar et al., 2011); (resultados nuestros no publicados).

La cinética de oxidación de las cepas de *E. dermatitidis* se ilustra en la Figura 7A, muestra patrones de oxidación consistentes entre todas las cepas evaluadas para los sustratos. Este hallazgo se refuerza mediante un análisis estadístico que revela una correlación positiva altamente significativa entre las cepas y sus cinéticas de oxidación durante un período de 20 días (Figura 7B). Los resultados de Biolog se utilizaron para desarrollar un modelo de regresión logística que incorpora dos parámetros: la tasa máxima de oxidación de sustratos (Figura 7C) o asimilación (Figura 7G), y la máxima oxidación observada (Figura 7D) o asimilación (Figura 7H). Entre las cepas evaluadas, EXF-10123 (un aislado clínico) y EXF-13310 (aislado de un taller mecánico) mostraron un rendimiento similar, con las tasas de oxidación más altas en la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas (Figura 7C). La cepa EXF-10123 también mostró el valor máximo de oxidación más alto para la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas (Figura 7D), excepto para los monosacáridos, donde la cepa EXF-8193 presentó un valor de oxidación máximo más alto. Cabe destacar que las cepas relacionadas con ambientes interiores, EXF-5586 y EXF-9187, mostraron los valores más bajos de tasa de oxidación y los valores más bajos de oxidación máxima en comparación con las demás cepas (Figura 7C y D).

La Figura 7E muestra la cinética de asimilación de diversos sustratos por cepas seleccionadas de *E. dermatitidis*. A diferencia de la prueba de oxidación, se observaron perfiles de asimilación distintos para cada cepa, lo que resultó en coeficientes de correlación relativamente bajos (Figura 7F). Las cepas EXF-8193 y EXF-13310 exhibieron perfiles de tasa de crecimiento similares (Figura 7G). La cepa EXF-8193 mostró mayores tasas de crecimiento con polialcoholes, aminoácidos y monosacáridos (Figura 7G), lo que coincide con el máximo crecimiento observado con estos compuestos (Figura 7H). Por otro lado, EXF-13310 presentó mayores tasas de crecimiento en presencia de polisacáridos y disacáridos, pero un crecimiento más lento con ácidos orgánicos (Figura 7G); sin embargo, mostró un alto crecimiento máximo en presencia de polisacáridos, disacáridos y ácidos orgánicos (Figura 7H). La cepa EXF-10123 mostró bajas tasas de crecimiento en la mayoría de los sustratos evaluados, especialmente con monosacáridos (Figura 7G). Sin embargo, alcanzó altos niveles de crecimiento máximo con todos los sustratos, excepto disacáridos, lo que indica una tasa de crecimiento lenta pero un gran potencial de crecimiento en comparación con otras cepas (Figura 7H).

En resumen, nuestros hallazgos revelaron que las cepas EXF-8193 y EXF-13310 presentaron perfiles de oxidación y asimilación por encima del promedio en todos los sustratos evaluados. En contraste, las cepas EXF-5586 y EXF-9187 mostraron perfiles de tasa de oxidación y tasa de crecimiento por debajo del promedio en los mismos sustratos.

Además, nuestros resultados demostraron que la oxidación y asimilación de los sustratos evaluados fueron influenciadas por ecotipos específicos de cada cepa, y no siempre existió una correlación directa entre las tasas de oxidación y asimilación para los sustratos. Específicamente, la cepa EXF-10123 presentó las tasas de oxidación más altas y los valores máximos de oxidación en la mayoría de los sustratos evaluados; sin embargo, también mostró la tasa de crecimiento más baja. No obstante, exhibió un valor máximo de asimilación más alto, lo que sugiere una versatilidad metabólica caracterizada por un crecimiento lento (Gostinčar et al., 2022).

Buscamos explorar la relación entre la oxidación y la asimilación de sustratos en cepas seleccionadas de *E. dermatitidis* (Figura 7I y J). La Figura 7I ilustra las curvas ajustadas y los intervalos de confianza que representan la correlación entre la oxidación y la asimilación de varios sustratos para cada cepa. Las cepas de *E. dermatitidis* se agruparon en dos grupos distintos: uno compuesto por EXF-5586 y EXF-13310, y el otro por EXF-10123, EXF-9187 y EXF-8193. Las cepas EXF-5586 y EXF-13310 presentaron valores de oxidación más bajos en comparación con las otras, lo que sugiere un estilo de vida diferente.

Los perfiles específicos de oxidación y asimilación se muestran en la Figura 7J, donde se revela que de los 28 sustratos evaluados, solo un subconjunto fue utilizado para la oxidación y asimilación por las cinco cepas de *E. dermatitidis*. Estos incluyen los sacaridos L-sorbosa, gentiobiosa, D-galactosa, turanosa, D-melezitosa, D-melibiosa y maltotriosa, así como los polialcoholes xilitol y D-sorbitol. Cabe destacar que estos sustratos exhibieron correlaciones significativas entre oxidación y asimilación en todos los casos ($p < 0.01$, $0.6 \leq r \geq 1.0$). Las cepas EXF-10123 y EXF-13310 demostraron la capacidad de oxidar y asimilar el mayor número de sustratos: 23 y 22 compuestos, respectivamente (Figura 7J). Curiosamente, la cepa EXF-9187 mostró un perfil distinto de utilización de sustratos en comparación con las otras cuatro cepas, utilizando el menor número de sustratos, lo que probablemente indica un nicho ecológico único relacionado con la disponibilidad de nutrientes en su sitio de aislamiento (polvo negro de una junta de goma en un lavaplatos) (Figura 7J).

Nuestros resultados destacan la diversidad entre las cepas de *E. dermatitidis* en cuanto a los perfiles de oxidación y asimilación de sustratos. Aunque todas las cepas oxidaron los sustratos probados con variaciones en las tasas y la oxidación máxima, las capacidades de asimilación variaron significativamente entre las cepas. Es importante señalar que la oxidación de sustratos no siempre implicó una posterior asimilación en todas las cepas, y la cepa aislada en ambientes interiores EXF-9187 presentó un perfil de utilización de sustratos notablemente diferente.

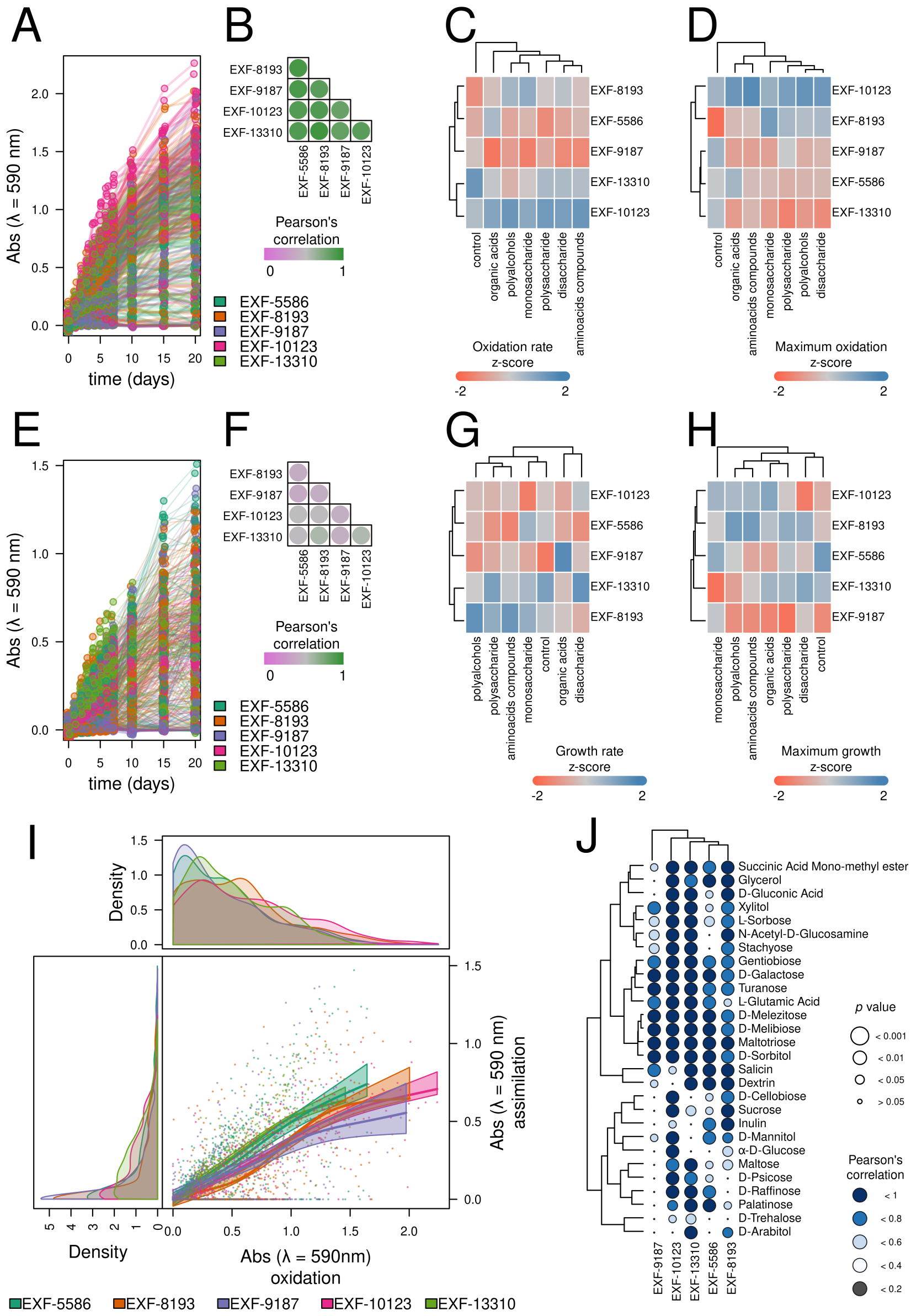


Figura 7. Caracterización metabólica de las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310) utilizando la metodología de microplaca fenotípica Biolog YT. Los paneles (A) y (E) muestran la oxidación de sustratos y las curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas desde el día 0 hasta el día 20 para las pruebas de oxidación y asimilación, respectivamente. Los paneles (B) y (F) presentan las matrices de correlación de las pruebas de oxidación y asimilación entre las cepas. Los paneles (C), (D), (G) y (H) muestran los puntajes Z de la tasa de oxidación y la máxima oxidación, así como la tasa de asimilación y la máxima asimilación de los sustratos por las cepas seleccionadas. Los paneles (I) y (J) ilustran las correlaciones entre las pruebas de oxidación y asimilación para las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis*.

7.3. Efecto de la inhibición de la melanina en cepas de *Exophiala dermatitidis* crecidas en diferentes pHs, temperaturas, concentraciones de NaCl y la presencia de neurotransmisores y compuestos policíclicos.

Se evaluó de manera integral el impacto de la inhibición química de la biosíntesis de melanina mediada por triciclazol en el crecimiento de cepas de *E. dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123, y EXF-13310) bajo diversos tipos de estrés. Además, se evaluó el crecimiento de estas cepas en presencia de triciclazol utilizando neurotransmisores (dopamina y serotonina) e hidrocarburos poliaromáticos (1,2,4-bencenotriol y fenantreno) como única fuente de carbono (Figura 8). En general, la inhibición de la melanina no afectó significativamente el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* bajo la mayoría de las condiciones probadas, incluyendo alta salinidad (15% NaCl), temperatura baja (4 °C), pH ácido extremo (2.5) y pH altamente alcalinos (10.0 y 12.5) (Figura 8A). Sin embargo, el inhibidor de melanina tuvo un impacto negativo en el crecimiento de la cepa EXF-13310 a 37 °C. La presencia de triciclazol también inhibió ligeramente el crecimiento psicotolerante de la cepa EXF-10123 a 4 °C. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las levaduras bajo condiciones de inhibición de melanina; aunque se notaron algunas diferencias, estas fueron menores en magnitud.

En cuanto a la salinidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento cuando se inhibió la biosíntesis de melanina, a 5%, 10% y 15% de NaCl (Figura 8A). Específicamente, a 5% de NaCl, el crecimiento de la cepa EXF-13310 se redujo significativamente en presencia de triciclazol. De manera similar, a 10% de NaCl, el crecimiento de EXF-13310 y EXF-5586 se redujo significativamente. A 15% NaCl, solo el crecimiento de la cepa EXF-8193, proveniente de glaciares, se vio afectado cuando se inhibió la biosíntesis de melanina. Además, el inhibidor de melanina redujo significativamente el crecimiento de algunas cepas de levadura tanto a pH ácido como alcalino (Figura 8A). Por ejemplo, el crecimiento de las cepas EXF-8193 y EXF-13310 a pH 2.5 y 12.5 fue considerablemente inhibido por el triciclazol. La cepa EXF-13310 mostró un crecimiento reducido en todos los valores de pH probados. El crecimiento extremotolerante de la cepa *E. dermatitidis* EXF-13310 se redujo cuando se inhibió la síntesis de melanina (Figura 8A), lo que sugiere que la melanina juega un papel crucial en conferir resistencia a varios tipos de estrés en esta cepa.

La inhibición de la melanina no afectó el crecimiento de la levadura en presencia de dopamina, serotonina o fenantreno (Figura 8A). Sin embargo, el triciclazol aumentó significativamente el crecimiento de EXF-8193 y EXF-9187 cuando se cultivaron con 1,2,4-bencenetriol. No se observaron diferencias significativas en la formación de biopelículas de las cinco cepas seleccionadas de *E. dermatitidis* cuando se cultivaron con y sin el inhibidor de la biosíntesis de melanina (Figura 8A).

Finalmente, se examinaron bajo el microscopio las cepas seleccionadas de *E. dermatitidis* para evaluar su crecimiento en presencia y ausencia de triciclazol. La Figura 8B muestra cambios significativos en su micromorfología cuando se añadió el inhibidor de melanina. Solo tres cepas (EXF-8193, EXF-10123 y EXF-13310) mostraron diferencias micromorfológicas evidentes en su crecimiento con y sin la presencia de triciclazol (Figura 8B). Las cepas EXF-8193 mostraron formación de pseudohifas cuando se cultivaron con 0.01 M de 1,2,4-bencenetriol y fenantreno en ausencia de triciclazol. De manera similar, se observó la formación de pseudohifas en EXF-10123 en presencia de 1,2,4-bencenetriol sin triciclazol. En contraste, los cultivos de estas cepas con triciclazole mostraron principalmente células aisladas agrupadas en racimos. Además, las cepas EXF-10123 y EXF-13310 formaron pseudohifas cuando se cultivaron en presencia de 0.01 M de dopamina y serotonina sin triciclazol, mientras que los cultivos con triciclazol mostraron células aisladas (Figura 8B). Estos resultados sugieren que la inhibición de melanina induce una transición de crecimiento pseudohifal a unicelular.

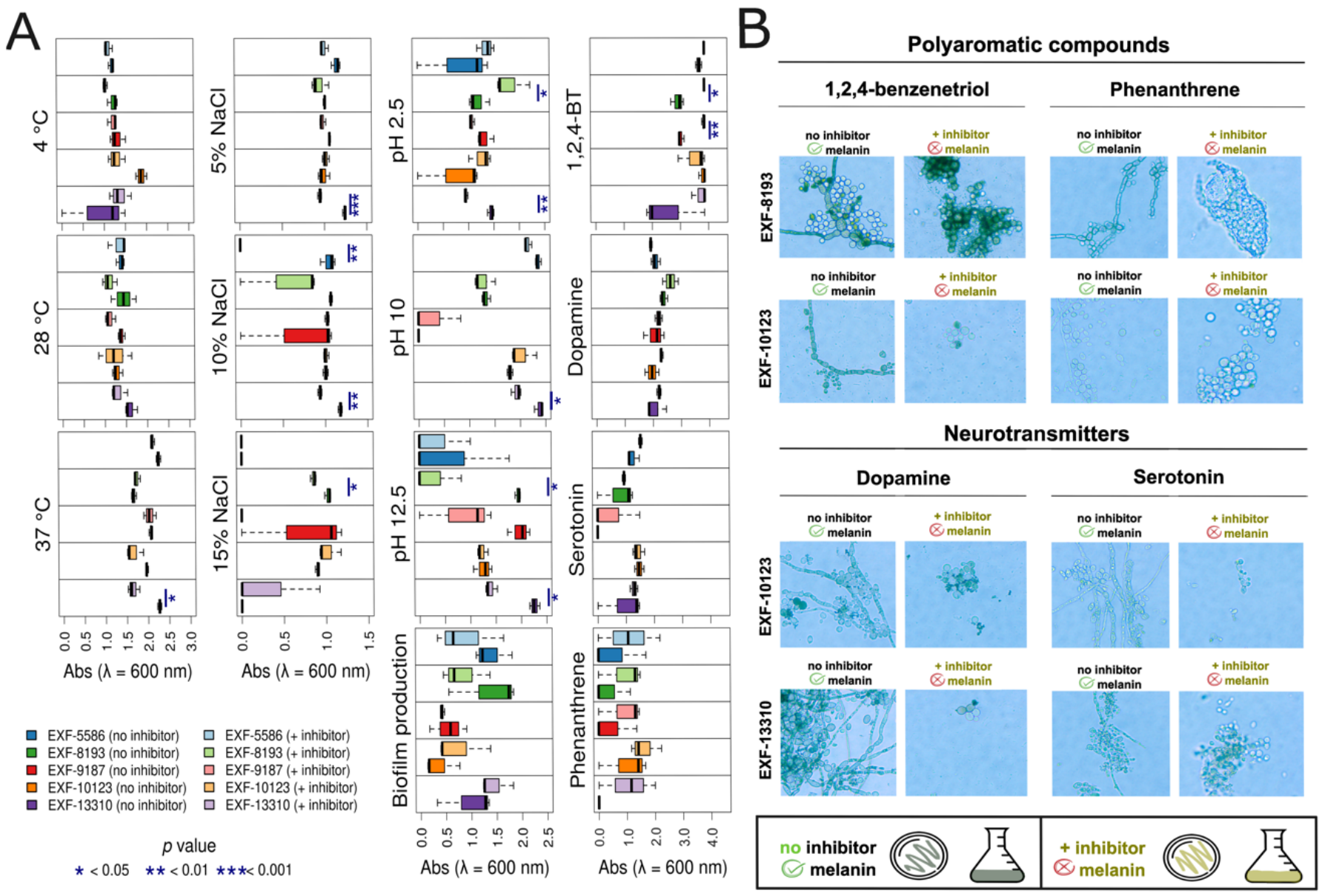


Figura 8. Se investigó el efecto del inhibidor de melanina triciclazol sobre el crecimiento de cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310) bajo diversas condiciones de cultivo. (A) Los diagramas de caja muestran el crecimiento de las cepas de *Exophiala dermatitidis* a diferentes temperaturas (4 °C, 28 °C y 37 °C), concentraciones de NaCl (5%, 10% y 15%), niveles extremos de pH (2.5, 10 y 12.5) y en presencia de 0.01 M de 1,2,4-bencenetriol (1,2,4-BT), dopamina, serotonina y fenantreno. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba t de Student pareada ($p \geq 0.05$; $p \geq 0.01$; $p \geq 0.001$). (B) Las observaciones microscópicas ilustran el crecimiento de *Exophiala dermatitidis* sobre 1,2,4-bencenotriol, dopamina, serotonina y fenantreno en presencia del inhibidor de melanina triciclazol.

8-Discusión Capítulo 1

E. dermatitidis habita en una variedad de ambientes extremos, generalmente de origen humano, como lavavajillas, saunas y baños (Blasi et al., 2015; Kulesza et al., 2021). Aunque la ecología de esta especie ha sido parcialmente caracterizada, el conocimiento sobre sus rasgos ecológicos sigue siendo limitado, y no se habían realizado estudios fisiológicos y metabólicos en una amplia colección de cepas provenientes de diversos ambientes.

En este estudio, nuestro objetivo fue mejorar la comprensión de la ecología y adaptación de *E. dermatitidis* mediante investigaciones exhaustivas sobre la proliferación celular y las respuestas al estrés de 41 cepas aisladas de ambientes interiores, naturales y muestras clínicas. Evaluamos sistemáticamente su crecimiento bajo diversas condiciones de estrés, incluyendo variaciones de temperatura, osmolaridad y pH, así como en presencia de neurotransmisores y compuestos poliaromáticos. Se utilizaron análisis metabólicos de alto rendimiento mediante la tecnología Biolog YT MicroPlateTM para evaluar la adaptabilidad metabólica de las cepas. Además, nuestro estudio profundizó en el papel de la melanina en la tolerancia de *E. dermatitidis* a condiciones extremas como temperatura, pH y salinidad, así como a la exposición a neurotransmisores y compuestos aromáticos policíclicos.

Fisiología y metabolismo versátiles en *Exophiala dermatitidis*

E. dermatitidis exhibe un amplio rango de termotolerancia, desde 4 °C hasta 47 °C e incluso a 60 °C en biofilms mixtos de bacterias y hongos (Blasi et al., 2015; Kulesza et al., 2021; Raghupathi et al., 2018), lo que le permite sobrevivir en condiciones diversas, incluido el cuerpo humano. Los estudios se han centrado principalmente en su crecimiento a 37 °C debido a su importancia clínica como patógeno oportunista (de Hoog et al., 2005; Lavrin et al., 2020). Sin embargo, el crecimiento óptimo para la mayoría de las cepas ocurre a 28 °C, aunque se adaptan bien en un rango amplio de temperaturas (4 °C – 42 °C). Esta adaptabilidad es crucial para su supervivencia en hábitats con fluctuaciones de temperatura, desde lavavajillas hasta glaciares (Kulesza et al., 2021). Los ajustes en la expresión génica en respuesta a los cambios de temperatura, como los cambios en la producción de lípidos y la disposición del citoesqueleto a temperaturas bajas, y el aumento de la actividad del aparato de Golgi a temperaturas altas, contribuyen a la termotolerancia de *E. dermatitidis* (Blasi et al., 2015).

Este estudio también confirmó la halotolerancia de *E. dermatitidis*, con la mayoría de las cepas capaces de crecer en concentraciones de NaCl del 5% al 10%. Sin embargo, el crecimiento se inhibió significativamente a 37 °C en comparación con 28 °C cuando se expuso a concentraciones más altas (10% y 17%) de NaCl. *E. dermatitidis* puede tolerar altas concentraciones de diversas sales, creciendo en condiciones de hasta 3 M NaCl, 2.5 M KCl, 0.75 M $MgCl_2$, 0.5 M $CaCl_2$, 0.75 M NaBr o 3 M $MgSO_4$ (Babič et al., 2018). Estos resultados son particularmente relevantes en las cepas aisladas de instalaciones de baño y lavavajillas que periódicamente enfrentan elevadas concentraciones de sales (Babič et al., 2018; Zalar et al., 2011).

E. dermatitidis también muestra una alta tolerancia a un amplio rango de niveles de pH (2.5–12.5), con una preferencia por condiciones alcalinas; el pH 10 fue óptimo para el crecimiento de la mayoría de las cepas. Sin embargo, algunas cepas (EXF-9187 y EXF-5772) han mostrado un crecimiento máximo en valores inusuales para esta especie, como pH 2.5 o pH 4. La capacidad de prosperar en ambientes alcalinos es ventajosa para las cepas que residen en ambientes interiores (Zalar et al., 2011), donde la exposición a detergentes alcalinos es común. Por otro lado, para la mayoría de las cepas de *E. dermatitidis* cultivadas a 28 °C, el crecimiento más favorable se dio en un rango de pH entre 4 y 12.5. A 37 °C, el pH óptimo disminuyó a pH 10. Wang and Szaniszlo (2009) también observaron variaciones dependientes de la temperatura en la tolerancia al pH que afectaron el crecimiento de *E. dermatitidis*, observando que el hongo crecía mejor a pH 3.5, 4 y 8 a 37°C en comparación con 25 °C.

Nuestros hallazgos sugieren que *E. dermatitidis* podría servir como un modelo versátil para estudiar la tolerancia al pH en organismos eucariotas. Se sabe poco sobre la regulación de la vía Pal/Rim en esta levadura negra, que es un mecanismo clave de adaptación involucrado en la alcalotolerancia en especies como *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae*, hongos en los que la regulación génica por pH ha sido ampliamente investigada (Fernández-López et al., 2023; Peñalva and Arst, 2004). Se ha sugerido que la adaptación a la alcalotolerancia en *E. dermatitidis* está regulada por PacC a nivel transcripcional (Wang and Szaniszlo, 2009). Chen et al. (2014) observaron que las respuestas celulares primarias a la acidez en *E. dermatitidis* incluyen el fortalecimiento de la pared celular, la desaceleración del metabolismo y la expulsión de cationes. Se necesitan más estudios para comprender completamente el perfil de expresión y la regulación de los genes expresados en condiciones alcalinas para entender la alta adaptación de *E. dermatitidis* a las variaciones de pH.

Para explorar la versatilidad fenotípica de *E. dermatitidis*, investigamos varias características relacionadas con su patogenicidad, dada su función como patógeno oportunista responsable de la fialohifomicosis (una infección micótica invasiva), infecciones del sistema nervioso central e infecciones del tracto respiratorio en individuos con fibrosis quística (Kirchhoff et al., 2019). La formación de biopelículas por *E. dermatitidis*, caracterizada por la producción de exopolisacáridos, dificulta la eliminación de infecciones y da lugar a infecciones crónicas recurrentes. Este rasgo también se ha asociado con termotolerancia, resistencia a medicamentos y evasión del sistema inmunológico (Boral et al., 2018; Kirchhoff et al., 2019; Sudhadham et al., 2008). En este estudio todas las cepas evaluadas de *E. dermatitidis* demostraron producción de biopelículas. Las cepas aisladas de superficies mojadas (EXF-8493 y EXF-8036), clasificadas dentro del genotipo A, el grupo fenotípico del patógeno (Kirchhoff et al., 2019), mostraron una fuerte formación de biopelículas. Contrario a estudios previos que sugerían una correlación entre la formación de biofilm y condiciones ambientales específicas (Sav et al., 2016), nuestros hallazgos sugieren que la formación de biopelícula está influenciada por la temperatura, más que por el sitio de aislamiento, con la mayoría de las cepas mostrando una mayor producción a 37 °C. Esto subraya una posible relación entre la formación de biopelículas y la patogenicidad de *E. dermatitidis*, incluso en cepas aisladas de ambientes exteriores.

La producción de hemolisina es otro mecanismo involucrado en la patogenicidad, donde ciertos hongos secretan proteínas capaces de lisar glóbulos rojos (Nayak et al., 2013). La investigación sobre las capacidades hemolíticas de *E. dermatitidis* es limitada. En un estudio previo, Seneviratne et al. (2015) reportaron hemólisis en agar con sangre de oveja por un aislado clínico de *E. dermatitidis*. Sin embargo, Sav et al. (2016) observaron que la actividad hemolítica estaba ausente en las cepas ambientales de *E. dermatitidis*. En el presente estudio, la actividad hemolítica de las cepas de *E. dermatitidis* mostró predominantemente α-hemólisis en las temperaturas evaluadas (28 °C y 37 °C). Curiosamente, las cepas de ambientes naturales y de ambientes creados por el hombre mostraron un potencial hemolítico similar al de las aisladas de muestras clínicas.

Existen pocos datos disponibles sobre los patrones de susceptibilidad de *E. dermatitidis* a los agentes antimicóticos, a pesar de la relevancia clínica de esta especie (Badali et al., 2011; Kirchhoff et al., 2019). Kirchhoff et al. (2019) hacen referencia a la sensibilidad de las cepas de *E. dermatitidis* a anfotericina B, itraconazol, voriconazol, flucitosina y terbinafina. En nuestro estudio evaluamos la susceptibilidad de las cepas de *E. dermatitidis* a cuatro inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (terbinafina, ketoconazol, itraconazol y fluconazol), así como a la antimicótica formadora de poros nistatina. Nuestros hallazgos indicaron que las cepas de *E. dermatitidis* fueron susceptibles a terbinafina y ketoconazol a 37 °C, pero mostraron menor sensibilidad a fluconazol e itraconazol. Notablemente, la mayoría de las cepas exhibieron resistencia a nistatina, posiblemente debido a diferencias en la composición de los esteroles de la membrana fúngica que afectan la eficacia de la nistatina (dos Santos et al., 2017; Lazardi et al., 1990; Pasko M. T. et al., 1990).

En resumen, el patógeno oportunista *E. dermatitidis* presenta una serie de características que contribuyen a su versatilidad ecológica y patogenicidad. Esta levadura melanizada destaca por su capacidad para prosperar a 37 °C, lo que es crucial para su colonización e infección en huéspedes de sangre caliente, incluidos los humanos. Además, *E. dermatitidis* demuestra actividad hemolítica, asociada con invasión y daño

tisular, y producción de biopelículas, lo que mejora su persistencia y resistencia a las defensas del huésped y tratamientos antifúngicos. Estas características fenotípicas subrayan el potencial patógeno de *E. dermatitidis* y destacan su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, posicionándola como un patógeno emergente de preocupación en el contexto de los cambios ambientales globales.

Comprender los fenotipos ecológicos y patogénicos de *E. dermatitidis* es crucial para predecir su propagación desde ambientes extremos hacia nuevos hábitats y para dilucidar sus mecanismos patogénicos, especialmente en el contexto de micosis cada vez más agresivas. Este conocimiento es esencial para desarrollar estrategias efectivas que permitan manejar y prevenir enfermedades fúngicas causadas por este patógeno adaptable.

La plasticidad fenotípica de las cepas de *E. dermatitidis* se resalta en su capacidad para utilizar tanto compuestos poliaromáticos como neurotransmisores como fuentes únicas de carbono, siendo el metabolismo de neurotransmisores un factor clave en su patogenicidad (Lavrin et al., 2020). La transformación de hidrocarburos específicos se ha relacionado con la patogenicidad fúngica. Por ejemplo, Prenafeta-Boldú et al. (2006) sugirieron que la capacidad de metabolizar alquilbencenos y fenoles podría mejorar la patogenicidad fúngica dentro de la familia *Herpotrichiellaceae*, que incluye al género *Exophiala*. Este estudio propuso una conexión entre el neurotropismo y la degradación de hidrocarburos en diferentes hongos patógenos. Ciertos hongos neurotrópicos, como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, especies de *Cladophialophora* y *Pseudallescheria boydii*, han demostrado la capacidad de asimilar hidrocarburos o fenoles como única fuente de carbono.

Nuestros hallazgos ilustran la notable capacidad del hongo negro *E. dermatitidis* para asimilar compuestos poliaromáticos, incluidos catecolaminas similares a neurotransmisores como dopamina, norepinefrina, epinefrina y serotonina (Döğen et al., 2013; Lavrin et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006). Esto sugiere que diversas cepas de *E. dermatitidis*, incluidas aquellas de ambientes interiores, tienen el potencial de inducir micosis sistémicas a través de la degradación de neurotransmisores. Esto podría dar lugar a la aparición de ecotipos virulentos capaces de causar nuevas neuropatías al pasar de ambientes naturales e interiores a hospederos humanos (Lavrin et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006). Zajc et al. (2019) y Lavrin et al. (2020) observaron que diversas cepas de *E. dermatitidis*, incluyendo aislados clínicos, ambientales y de interiores, demostraron ser eficaces en la utilización de tolueno, n-hexadecano y aceite mineral como únicas fuentes de carbono. De manera consistente, nuestro estudio encontró que la mayoría de las cepas de *E. dermatitidis* prosperaron utilizando fenol, naftaleno y fenantreno. Cabe destacar que el 1,2,4-bencentriol, un subproducto del metabolismo del benceno (Snyder, 2004) y un análogo estructural cercano de la dopamina (Dreyer et al., 2013), resultó ser excepcionalmente adecuado como sustrato para una amplia variedad de cepas de *E. dermatitidis*. La asimilación de estas fuentes de carbono respalda la hipótesis de que la asimilación de neurotransmisores podría estar vinculada al metabolismo de los PAH. De hecho, como se muestra en las figuras 3B y 3C, se observó una fuerte correlación entre la asimilación de 1,2,4-bencentriol y serotonina.

Las capacidades duales de biodegradación de *E. dermatitidis* y levaduras negras relacionadas, que les permiten metabolizar tanto PAH como neurotransmisores como la serotonina y la dopamina, representan un área de estudio con amplias implicaciones. Esta habilidad resalta sus estrategias adaptativas, permitiéndoles sobrevivir y prosperar en diversos hábitats, desde ambientes interiores hasta posiblemente en hospederos durante infecciones. La versatilidad metabólica de *E. dermatitidis* subraya su potencial patogénico y su capacidad para persistir en diversos nichos ecológicos. Elucidar estas vías metabólicas puede profundizar nuestro conocimiento sobre la fisiología y ecología de los hongos, además de tener aplicaciones prácticas, como el desarrollo de estrategias de biorremediación para la limpieza ambiental y la identificación de estas vías para terapias antifúngicas innovadoras. Por lo tanto, explorar los procesos biodegradativos de *Exophiala* spp. es crucial para avanzar tanto en la biología fundamental de los hongos como en las ciencias aplicadas en los campos ambiental y médico.

Para profundizar en el perfil metabólico de *E. dermatitidis*, realizamos un análisis de huella metabólica de cinco cepas seleccionadas utilizando los sistemas de fenotipado de alto rendimiento Biolog. La selección de estas cepas, que incluye la cepa tipo EXF-10123 (Lavrin et al., 2020), se basó en criterios preestablecidos. Las cepas restantes (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-13310) han sido caracterizadas en diversos estudios

previos, reflejando diferentes entornos y estilos de vida (Zalar et al., 2011; nuestros resultados no publicados). Las cepas de *E. dermatitidis* demostraron una amplia versatilidad metabólica, siendo capaces de metabolizar una variedad de carbohidratos, incluidos D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, L-arabinoso, sacarosa, maltosa, α-trehalosa, celobiosa, salicina, rafinosa y melezitosa. Esto refleja su capacidad para adaptar su metabolismo bajo condiciones ambientales desafiantes (Prenafeta-Boldú et al., 2006). Además, estas cepas mostraron crecimiento en alcoholes como glicerol, mesoeritritol, xilitol, D-glucitol y etanol, así como en etilamina, lisina y cadaverina, similar a los aislamientos clínicos de *Exophiala* (Babič et al., 2018). Esta plasticidad metabólica confirma su capacidad para utilizar una amplia gama de sacáridos, principalmente monosacáridos, ácidos orgánicos, alcoholes y aminoácidos, esenciales para que microorganismos "invasivos" como *E. dermatitidis* encuentren y utilicen fuentes de nutrientes dentro de sus hábitats naturales (North et al., 2011).

Las diferencias significativas en la asimilación de diversas fuentes de carbono entre las cinco cepas resaltaron su considerable diversidad metabólica. Las cepas EXF-5586 y EXF-9187, aisladas de ambientes interiores, mostraron las tasas de consumo y crecimiento celular más bajas en la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas (Figura 7). Por el contrario, las cepas EXF-13310 y EXF-10123 mostraron las tasas de consumo y crecimiento celular más altas con la mayoría de las fuentes de carbono evaluadas (Figura 7).

La diversidad metabólica observada en diferentes cepas de la levadura negra *E. dermatitidis* tiene importantes implicaciones para la evolución microbiana, la plasticidad fenotípica y la adaptabilidad, especialmente en el contexto de los cambios ambientales globales. Esta variabilidad resalta la capacidad de adaptación del patógeno a diferentes fuentes de nutrientes, lo que refuerza su potencial para sobrevivir y proliferar en una amplia gama de hábitats. La capacidad de *E. dermatitidis* para asimilar y crecer utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono, incluidos diferentes azúcares, alcoholes y aminoácidos, resalta su versatilidad metabólica y su capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales (Babič et al., 2018; Prenafeta-Boldú et al., 2006). Esta flexibilidad metabólica le permite sobrevivir y proliferar en una variedad de hábitats, lo que contribuye a su potencial patogénico y adaptación a ambientes cambiantes. Esta flexibilidad metabólica es crucial para la supervivencia y proliferación de *E. dermatitidis* en hábitats cambiantes, permitiéndole explotar los nutrientes disponibles y ocupar nuevos nichos ecológicos. Tales adaptaciones metabólicas no solo indican plasticidad fenotípica, sino que también contribuyen al potencial patogénico de *E. dermatitidis*, ya que prospera en diversos entornos y puede causar infecciones en diferentes organismos hospedadores. La propagación de *E. dermatitidis* a nuevos hábitats y su éxito como patógeno oportunista en la era del cambio global subraya la importancia de comprender su diversidad metabólica y estrategias adaptativas. Este conocimiento puede orientar el monitoreo ambiental, la prevención de enfermedades y el desarrollo de intervenciones terapéuticas dirigidas. Al esclarecer los fundamentos metabólicos de *E. dermatitidis* y sus variaciones específicas por cepas, obtenemos perspectivas sobre la dinámica evolutiva y la aptitud ecológica de esta especie de levadura en el contexto de los cambios ambientales actuales.

Respuestas mediadas por melanina en el crecimiento poliextremotolerante y utilización de compuestos poliaromáticos y neurotransmisores

La melanina, un pigmento ampliamente distribuido en los hongos (Toledo et al., 2017), ha emergido como un factor crucial para facilitar la poliextremotolerancia, una característica que permite a los hongos prosperar en ambientes extremos caracterizados por altos niveles de estresores como radiación UV, desecación y estrés oxidativo (Duarte et al., 2019; Grube et al., 2013). El papel protector de la melanina es multifacético, contribuyendo significativamente a la adaptación y supervivencia de los hongos en condiciones adversas (Duarte et al., 2019), al ayudar a preservar la integridad celular y mantener funciones vitales en entornos hostiles (Kejžar et al., 2013; Mohania et al., 2017). La importancia adaptativa de la melanina en la poliextremotolerancia se subraya por su correlación con la distribución ecológica de los hongos melanizados en hábitats extremos como fuentes termales, respiraderos de aguas profundas, salinas y regiones polares (Butinar et al., 2005; Duarte et al., 2019; Sudhadham et al., 2008; Van Dover et al., 2007). Entender los refuerzos mecánicos de la poliextremotolerancia mediada

por melanina es esencial para dilucidar la dinámica ecológica de los hongos y tiene implicaciones para las aplicaciones biotecnológicas y la investigación de la patogenicidad fúngica.

Existen tres vías distintas para la producción de melanina: la vía DHN-melanina, la vía DOPA-melanina y la vía de degradación de L-tirosina (Chen et al., 2014). En *E. dermatitidis*, aunque se encuentran genes asociados con las tres vías biosintéticas, la melanina se sintetiza predominantemente a través de la vía DHN-melanina (Chen et al., 2014; Geis et al., 1984), en la cual la síntesis de melanina ocurre a partir de 1,8-dihidroxinaftaleno (1,8-DHN), por la actividad de la enzima poliquetide sintasa. Esta vía puede ser inhibida por el triciclazol (5-metil-1,2,4-triazolo[3,4-b]benzotiazol), un fungicida que actúa sobre la biosíntesis de melanina (Chen et al., 2014; Geis et al., 1984).

El papel potencial de la melanina en la poliextremotolerancia entre las cinco cepas seleccionadas de *E. dermatitidis*, se evaluó mediante el crecimiento de las cepas en diferentes condiciones de estrés tras la adición de triciclazol (Figura 8). El impacto variable del triciclazol en el crecimiento de las levaduras bajo diferentes condiciones de estrés entre las cepas resalta su diversidad intraespecífica en la respuesta a perturbaciones ambientales. Específicamente, la cepa EXF-13310 mostró un menor crecimiento a 37 °C en presencia del inhibidor. Además, el crecimiento de EXF-13310 se vio negativamente afectado por el triciclazol en NaCl a 5% y 10%, y a pH 2.5, 10.0 y 12.5. Además, el crecimiento de las cepas EXF-5586 y EXF-8193 se redujo bajo condiciones hipersalinas (10% y 15%, respectivamente) cuando se inhibió la síntesis de melanina. En general, la melanina no pareció jugar un papel significativo a 15% de NaCl, ya que solo una cepa se vio afectada por el triciclazol bajo esta condición. Estos hallazgos sugieren que la melanina desempeña un papel protector en la supervivencia bajo ciertas condiciones de estrés, lo que es consistente con estudios previos (Kirchhoff et al., 2019). Es importante destacar que la cepa EXF-13310 mostró sensibilidad al triciclazol en varios parámetros de estrés (temperatura, concentraciones de NaCl y pH), lo que sugiere un vínculo potencial en esta especie entre la biosíntesis de melanina y otros mecanismos de respuesta al estrés, como la participación del factor de transcripción PacC en la adaptación al pH alcalino y altas concentraciones de NaCl (Wang and Szaniszlo, 2009). En contraste, las cepas EXF-10123 y EXF-9187 no mostraron un impacto significativo en el crecimiento en presencia del inhibidor bajo las condiciones de estrés evaluadas (Figura 8).

En cultivos suplementados con neurotransmisores e hidrocarburos poliaromáticos, específicamente con 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono, la adición de triciclazol resultó en un aumento del crecimiento celular (medido por densidad óptica) de las cepas EXF-8193 y EXF-9187. Esto sugiere un posible efecto sinérgico entre el triciclazol y el 1,2,4-bencenotriol, lo que favorece el crecimiento fúngico. Además, en cultivos de las cinco cepas de *E. dermatitidis* cultivadas con neurotransmisores y PAHs en presencia de triciclazol presentaron una diferenciación distintiva, con menos levaduras geminadas y más células en forma de pseudohifas en comparación con los cultivos sin triciclazol. Esta observación resalta la importancia de la producción de DHN melanina (Poyntner et al., 2018) y la transición de formas hifales a levaduriformes durante la infección dérmica (Kirchhoff et al., 2019), sugiriendo una posible conexión entre estas respuestas activadas por compuestos poliaromáticos.

En el contexto de las levaduras negras, que presentan melanina prominente en sus paredes celulares, comprender la influencia de la melanina en la adaptabilidad y patogenicidad es de suma importancia (Schnitzler et al., 1999). Las levaduras negras, incluidas especies como *E. dermatitidis*, exhiben una excepcional resistencia en diversos entornos, a menudo caracterizados por condiciones extremas. La producción de melanina en estos hongos se ha asociado con una mayor resistencia a agentes antifúngicos, fagocitosis por células inmunitarias y estrés ambiental, como altas temperaturas y radiación ultravioleta (Paolo et al., 2006; Romsdahl et al., 2021; Smith and Casadevall, 2019). Además, el papel de la melanina en la modulación de respuestas inmunológicas e interacciones huésped-patógeno resalta su importancia en la patogenicidad fúngica. Un entendimiento más profundo de cómo la melanina contribuye a la adaptabilidad y virulencia de las levaduras negras es fundamental para desarrollar estrategias dirigidas para controlar las infecciones fúngicas y mitigar su impacto en la salud humana y la agricultura. Aprovechar los conocimientos sobre los mecanismos de la melanina asociados con la poliextremotolerancia y la patogenicidad

podría abrir el camino a enfoques innovadores en el desarrollo de medicamentos antifúngicos, bioremediación y gestión ambiental, destacando la importancia de comprender plenamente los roles multifacéticos de la melanina en las estrategias adaptativas y la virulencia en levaduras melanizadas.

9-Conclusiones Capítulo 1

1-El análisis filogenético de *E. dermatitidis* reveló dos grupos principales sin correlación clara con los sitios de aislamiento, sugiriendo que un solo gen no es suficiente para comprender su diversidad y evolución y sugiriendo los tres posibles genotipos (A, B y C) de las cepas estudiadas.

2-Las cepas de *E. dermatitidis* mostraron una notable poliextremotolerancia, con crecimiento óptimo a 28 °C, tolerancia a NaCl hasta 17% y adaptabilidad a pH extremos. Estos hallazgos resaltan su capacidad para prosperar en diversos entornos independientemente del sitio de aislamiento.

3- Las cepas de *E. dermatitidis* presentaron alta formación de biopelículas y resistencia a múltiples antifúngicos, con predominancia de hemólisis α. No obstante, ketoconazol y terbinafina demostraron ser efectivos para inhibir su crecimiento.

4-El estudio mostró que *E. dermatitidis* crece mejor con neurotransmisores como única fuente de carbono que con compuestos poliaromáticos. Destaca particularmente el crecimiento en presencia de 1,2,4-bencenetriol como única fuente de carbono. Se observaron correlaciones positivas entre neurotransmisores y compuestos poliaromáticos, pero no se encontró una relación entre el crecimiento y el origen de las cepas.

5-Las cepas de *E. dermatitidis* mostraron variabilidad en su capacidad para oxidar y asimilar diferentes sustratos. Las cepas EXF-8193 y EXF-13310 tuvieron un rendimiento superior, mientras que EXF-5586 y EXF-9187 presentaron un rendimiento más bajo. Los resultados indican que la oxidación y asimilación de sustratos no siempre están correlacionadas y dependen del ecotipo de cada cepa.

6-La inhibición de la melanina en *E. dermatitidis* no afectó significativamente el crecimiento en la mayoría de las condiciones de estrés, pero redujo el crecimiento en salinidad alta, pH extremos y a 37 °C en algunas cepas. Además, promovió el crecimiento en presencia de ciertos compuestos, pero no afectó la formación de biopelículas. Morfológicamente, indujo una transición de crecimiento pseudohifal a unicelular en algunas cepas.

10-Referencias Capítulo 1

Arikan, S., Ostrosky-Zeichner, L., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., Gordon, D., Wallace, T., Rex, J.H., 2002. In Vitro Activity of Nystatin Compared with Those of Liposomal Nystatin, Amphotericin B, and Fluconazole against Clinical *Candida* Isolates. J Clin Microbiol 40, 1406–1412. https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1406-1412.2002

Babič, M.N., Zupančič, J., Gunde-Cimerman, N., de Hoog, S., Zalar, P., 2018. Ecology of the Human Opportunistic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. Mycopathologia 183, 201–212. https://doi.org/10.1007/s11046-017-0134-8

Badali, H., De Hoog, G.S., Sudhadham, M., Meis, J.F., 2011. Microdilution *in vitro* antifungal susceptibility of *Exophiala dermatitidis*, a systemic opportunist. Med Mycol 49, 819–824. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.583285

Bahadori, T., Didehdar, M., Khansarinezhad, B., Shokohi, T., 2020. Identification of opportunistic and nonopportunistic *Exophiala* species using high resolution melting analysis. Med Mycol 58, 938–945. https://doi.org/10.1093/mmy/myz136

Barbara D. Alexander, 2017. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Fourth. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Baron, N.C., Pagnocca, F.C., Otsuka, A.A., Prenafeta-Boldú, F.X., Vicente, V.A., Attili de Angelis, D., 2021. Black Fungi and Hydrocarbons: An Environmental Survey for Alkylbenzene Assimilation. Microorganisms 9, 1008. https://doi.org/10.3390/microorganisms9051008

Blasi, B., Tafer, H., Tesei, D., Sterflinger, K., 2015. From Glacier to Sauna: RNA-Seq of the Human Pathogen Black Fungus *Exophiala dermatitidis* under Varying Temperature Conditions Exhibits Common and Novel Fungal Response. PLoS One 10, e0127103. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127103

Boral, H., Metin, B., Döğen, A., Seyedmousavi, S., Ilkit, M., 2018. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. Fungal Genetics and Biology. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.10.008

Branda, E., Turchetti, B., Diolaiuti, G., Pecci, M., Smiraglia, C., Buzzini, P., 2010. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). FEMS Microbiol Ecol 72, 354–369. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x

Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N., 2005. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. Botanica Marina 48. https://doi.org/10.1515/BOT.2005.007

Buxton, R., 2005. Blood agar plates and hemolysis protocols. Am. Soc. Microbiol. 15, 1–9.

Černoša, A., Sun, X., Gostinčar, C., Fang, C., Gunde-Cimerman, N., Song, Z., 2021. Virulence Traits and Population Genomics of the Black Yeast *Aureobasidium melanogenum*. Journal of Fungi 7, 665. https://doi.org/10.3390/jof7080665

Chen, Z., Martinez, D.A., Gujja, S., Sykes, S.M., Zeng, Q., Szaniszlo, P.J., Wang, Z., Cuomo, C.A., 2014. Comparative Genomic and Transcriptomic Analysis of *Wangiella dermatitidis* , A Major Cause of Phaeohyphomycosis and a Model Black Yeast Human Pathogen. G3 Genes|Genomes|Genetics 4, 561–578. https://doi.org/10.1534/g3.113.009241

de Hoog, G.S., Haase, G., 1993. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. Antonie Van Leeuwenhoek 64, 17–26. https://doi.org/10.1007/BF00870917

de Hoog, G.S., Matos, T., Sudhadham, M., Luijsterburg, K.F., Haase, G., 2005. Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* in healthy and impaired individuals. Mycoses 48, 142–145. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01083.x

De Mendiburu F, Simon R, 2015. Agricolae - Ten years of an Open source Statistical tool forexperiments in Breeding, agriculture and biology. PeerJ Prepr 3, e1404v1.

Döğen, A., Kaplan, E., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2013a. Massive Contamination of *Exophiala dermatitidis* and *E. phaeomuriformis* in Railway Stations in Subtropical Turkey. Mycopathologia 175, 381–386. https://doi.org/10.1007/s11046-012-9594-z

Döğen, A., Kaplan, E., Öksüz, Z., Serin, M.S., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2013b. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol 51, 493–498. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738313

dos Santos, A.G., Marquês, J.T., Carreira, A.C., Castro, I.R., Viana, A.S., Mingeot-Leclercq, M.-P., de Almeida, R.F.M., Silva, L.C., 2017. The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition. Physical Chemistry Chemical Physics 19, 30078–30088. https://doi.org/10.1039/C7CP05353C

Dreyer, D.R., Miller, D.J., Freeman, B.D., Paul, D.R., Bielawski, C.W., 2013. Perspectives on poly(dopamine). Chem Sci 4, 3796. https://doi.org/10.1039/c3sc51501j

Duarte, A.W.F., de Menezes, G.C.A., e Silva, T.R., Bicas, J.L., Oliveira, V.M., Rosa, L.H., 2019. Antarctic Fungi as Producers of Pigments, in: Fungi of Antarctica. Springer International Publishing, Cham, pp. 305–318. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_14

Fernández-López, M.G., Batista-García, R.A., Aréchiga-Carvajal, E.T., 2023. Alkaliphilic/Alkali-Tolerant Fungi: Molecular, Biochemical, and Biotechnological Aspects. Journal of Fungi 9, 652. https://doi.org/10.3390/jof9060652

Geis, P.A., Wheeler, M.H., Szaniszlo, P.J., 1984. Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. Arch Microbiol 137, 324–328. https://doi.org/10.1007/BF00410729

Gostinčar, C., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2022. No need for speed: slow development of fungi in extreme environments. Fungal Biol Rev 39, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.002

Grube, M., Muggia, L., Gostinčar, C., 2013. Niches and Adaptations of Polyextremotolerant Black Fungi. pp. 551–566. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_25

Gümral, R., Özhak-Baysan, B., Tümgör, A., Saraçlı, M.A., Yıldıran, Ş.T., Ilkit, M., Zupančič, J., Novak-Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G.S., 2016. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. Fungal Divers 76, 1–9. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0327-8

Jari Oksanen, Gavin L. Simpson, F. Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Peter R. Minchin, R.B. O'Hara, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs, Helene Wagner, Matt Barbour, Michael Bedward, Ben Bolker, Daniel Borcard, Gustavo Carvalho, Michael Chirico, Miquel De Caceres, Sebastien Durand, Heloisa Beatriz Antoniazi Evangelista, Rich FitzJohn, Michael Friendly, Brendan Furneaux, Geoffrey Hannigan, Mark O. Hill, Leo Lahti, Dan McGlinn, Marie-Helene Ouellette, Eduardo Ribeiro Cunha, Tyler Smith, Adrian Stier, Cajo J.F. Ter Braak, James Weedon, 2022. Vegan: Community ecology package [WWW Document].

Kejžar, A., Gobec, S., Plemenitaš, A., Lenassi, M., 2013. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. Fungal Biol 117, 368–379. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.006

Kirchhoff, L., Olsowski, M., Rath, P.-M., Steinmann, J., 2019. *Exophiala dermatitidis* : Key issues of an opportunistic fungal pathogen. Virulence 10, 984–998. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1596504

Kulesza, K., Biedunkiewicz, A., Nowacka, K., Dynowska, M., Urbaniak, M., Stępień, Ł., 2021. Dishwashers as an Extreme Environment of Potentially Pathogenic Yeast Species. Pathogens 10, 446. https://doi.org/10.3390/pathogens10040446

Kumari, A., Mihooliya, K.N., Sahoo, D.K., Bhattacharyya, M.S., Prasad, G.S., Pinnaka, A.K., 2023. Description of lipase producing novel yeast species *Debaryomyces apis* f.a., sp. nov. and a modified pH indicator dye-based method for the screening of lipase producing microorganisms. Sci Rep 13, 11819. https://doi.org/10.1038/s41598-023-38241-3

Lavrin, T., Konte, T., Kostanjšek, R., Sitar, S., Sepčič, K., Prpar Mihevc, S., Žagar, E., Županski, V., Lenassi, M., Rogelj, B., Gunde Cimerman, N., 2020. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. Cells 9, 963. https://doi.org/10.3390/cells9040963

Lazardi, K., Urbina, J.A., de Souza, W., 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi.* Antimicrob Agents Chemother 34, 2097–2105. https://doi.org/10.1128/AAC.34.11.2097

Malo, M.E., Schultzhaus, Z., Frank, C., Romsdahl, J., Wang, Z., Dadachova, E., 2021. Transcriptomic and genomic changes associated with radioadaptation in *Exophiala dermatitidis*. Comput Struct Biotechnol J 19, 196–205. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.013

Matos, T., Haase, G., Gerrits van den Ende, A., 2003. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. Antonie Van Leeuwenhoek 83, 293–303. https://doi.org/10.1023/A:1023373329502

Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S.K., Shah, D., 2017. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. pp. 71–87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7

Najafzadeh, M.J., Sutton, D.A., Keisari, M.S., Zarrinfar, H., De Hoog, G.S., Chowdhary, A., Meis, J.F., 2014. In vitro activities of eight antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans*. Antimicrob Agents Chemother 58, 5629–5631. https://doi.org/10.1128/AAC.03095-14

Nayak, A.P., Green, B.J., Beezhold, D.H., 2013. Fungal hemolysins. Med Mycol. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.698025

North, M., Tandon, V.J., Thomas, R., Loguinov, A., Gerlovina, I., Hubbard, A.E., Zhang, L., Smith, M.T., Vulpe, C.D., 2011. Genome-Wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. PLoS One 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024205

Paolo, W.F., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szaniszlo, P.J., Nosanchuk, J.D., 2006. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. BMC Microbiol 6, 55. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-55

Pasko M. T., Stephen C. Piscitelli, Andrea D. Van Slooten, 1990. Fluconazole: A New Triazole Antifungal Agent. DICP 24, 860–867.

Peñalva, M.A., Arst, Jr., H.N., 2004. Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts. Annu Rev Microbiol 58, 425–451. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123715

Poyntner, C., Mirastschijski, U., Sterflinger, K., Tafer, H., 2018. Transcriptome Study of an *Exophiala dermatitidis* PKS1 Mutant on an ex Vivo Skin Model: Is Melanin Important for Infection? Front Microbiol 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01457

Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Sybren de Hoog, G., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev 30, 109–130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x

R Core Team, 2022. R version 4.2. 2. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Raghupathi, P.K., Zupančič, J., Brejnrod, A.D., Jacquiod, S., Houf, K., Burmølle, M., Gunde-Cimerman, N., Sørensen, S.J., 2018. Microbial Diversity and Putative Opportunistic Pathogens in Dishwasher Biofilm Communities. Appl Environ Microbiol 84. https://doi.org/10.1128/AEM.02755-17

Ren, D., Madsen, J.S., Sørensen, S.J., Burmølle, M., 2015. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. ISME J 9, 81–89. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.96

Rico, A., Preston, G.M., 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. Molecular Plant-Microbe Interactions® 21, 269–282. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0269

Romsdahl, J., Schultzhaus, Z., Cuomo, C.A., Dong, H., Abeyratne-Perera, H., Hervey, W.J., Wang, Z., 2021. Phenotypic Characterization and Comparative Genomics of the Melanin-Producing Yeast *Exophiala lecanii-corni* Reveals a Distinct Stress Tolerance Profile and Reduced Ribosomal Genetic Content. Journal of Fungi 7, 1078. https://doi.org/10.3390/jof7121078

Sav, H., Ozakkas, F., Altınbas, R., Kiraz, N., Tümgör, A., Gümral, R., Döğen, A., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2016. Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*. Mycoses 59, 343–350. https://doi.org/10.1111/myc.12478

Schnitzler, N., Peltroche-Llacsahuanga, H., Bestier, N., Zündorf, J., Lütticken, R., Haase, G., 1999. Effect of Melanin and Carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* on Phagocytosis, Oxidative Burst, and Killing by Human Neutrophils. Infect Immun 67, 94–101. https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.94-101.1999

Schultzhaus, Z., Chen, A., Shuryak, I., Wang, Z., 2021. The Transcriptomic and Phenotypic Response of the Melanized Yeast *Exophiala dermatitidis* to Ionizing Particle Exposure. Front Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609996

Seneviratne, C.J., Fong, P.H., Wong, S.S., Lee, V.H., 2015. Antifungal susceptibility and phenotypic characterization of oral isolates of a black fungus from a nasopharyngeal carcinoma patient under radiotherapy. BMC Oral Health 15, 39. https://doi.org/10.1186/s12903-015-0023-9

Smith, D.F.Q., Casadevall, A., 2019. The Role of Melanin in Fungal Pathogenesis for Animal Hosts. pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/82_2019_173

Snyder, R., 2004. Xenobiotic Metabolism and the Mechanism(s) of Benzene Toxicity. Drug Metab Rev 36, 531–547. https://doi.org/10.1081/DMR-200033445

Song, Y., Laureijssen-van de Sande, W.W.J., Moreno, L.F., Gerrits van den Ende, B., Li, R., de Hoog, S., 2017. Comparative Ecology of Capsular *Exophiala* Species Causing Disseminated Infection in Humans. Front Microbiol 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02514

Sudhadham, M., Prakitsin, S., Sivichai, S., Chaiyarat, R., Dorrestein, G.M., Menken, S.B.J., de Hoog, G.S., 2008. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. Stud Mycol 61, 145–155. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.15

Teixeira, M.M., Moreno, L.F., Stielow, B.J., Muszewska, A., Hainaut, M., Gonzaga, L., Abouelleil, A., Patané, J.S.L., Priest, M., Souza, R., Young, S., Ferreira, K.S., Zeng, Q., da Cunha, M.M.L., Gladki, A., Barker, B., Vicente, V.A., de Souza, E.M., Almeida, S., Henrissat, B., Vasconcelos, A.T.R., Deng, S., Voglmayr, H., Moussa, T.A.A., Gorbushina, A., Felipe, M.S.S., Cuomo, C.A., de Hoog, G.S., 2017. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (*Chaetothyriales* , *Ascomycota*). Stud Mycol 86, 1–28. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.01.001

Tesei, D., Marzban, G., Marchetti-Deschmann, M., Tafer, H., Arcalis, E., Sterflinger, K., 2015. Proteome of tolerance fine-tuning in the human pathogen black yeast *Exophiala dermatitidis*. J Proteomics 128, 39–57. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.007

Toledo, A.V., Franco, M.E.E., Yanil Lopez, S.M., Troncozo, M.I., Saparrat, M.C.N., Balatti, P.A., 2017. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. Physiol Mol Plant Pathol 99, 2–6. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004

Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco, M., Villarreal, P., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M., 2017. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. Polar Biol 40, 649–658. https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9

Van Dover, C.L., Ward, M.E., Scott, J.L., Underdown, J., Anderson, B., Gustafson, C., Whalen, M., Carnegie, R.B., 2007. A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. Marine Ecology 28, 54–62. https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2006.00121.x

Vitale, R.G., De Hoog, G.S., Verweij, P.E., 2003. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, terbinafine and 5-fluocytosine against *Exophiala spinifera* and evaluation of post-antifungal effects. Med Mycol 41, 301–307. https://doi.org/10.1080/13693780310001600822

Wang, Q., Szaniszlo, P.J., 2009. Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. Fungal Genetics and Biology 46, 657–666. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.004

Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., Gunde-Cimerman, N., 2019a. Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. Genes (Basel) 10, 42. https://doi.org/10.3390/genes10010042

Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., Gunde-Cimerman, N., 2019b. Stress-tolerant yeasts: Opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. Genes (Basel) 10. https://doi.org/10.3390/genes10010042

Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N., 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol 115, 997–1007. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007

Zupančič, J., Novak Babič, M., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. PLoS One 11, e0148166. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148166

Capítulo 2: Análisis genómico y pangenómico

11- Introducción Capítulo 2

La mayoría de los miembros del orden *Chaetothyriales* son oportunistas más que patógenos con excepción de los agentes de cromoblastomicosis (Song et al., 2020). Muchas de sus capacidades oportunistas se atribuyen principalmente a su poliextremotolerancia complementada con una eficiente captación de nutrientes sumada a su capacidad de tolerar y detoxificar compuestos tóxicos del ambiente (Gostinčar et al., 2018). El sitio de aislamiento puede ser un factor determinante para entender los mecanismos de adaptación a la poliextremotolerancia en el género de *Exophiala* ya que en especies como *E. spinifera* derivada de un paciente con deficiencia de CARD9, se encontraron diferencias genómicas con respecto a las cepas ambientales (Song et al., 2020). Song et al. (2017) confirma estos resultados tanto para *E. spinifera* como para *E. dermatitidis* en donde se registraron intervalos de supervivencia más cortos para los aislamientos clínicos en comparación con los aislamientos ambientales.

La plasticidad del genoma es una característica distintiva del género, con especies como *E. dermatitidis* que exhiben estados haploides y diploides (Metin et al., 2019). Esta variación en la ploidía podría mejorar la adaptabilidad a entornos fluctuantes (Kurbessoian et al., 2023). Los estudios sobre eventos de duplicación génica y duplicaciones del genoma completo (WGDs) podrían ofrecer información sobre cómo el género *Exophiala* evoluciona para adaptarse a condiciones extremas, como ocurre en la levadura negra halotolerante *Hortaea werneckii* (Gostinčar et al., 2018). Otra característica importante de las especies del género es su notable versatilidad fisiológica y metabólica, que les permite degradar y utilizar una amplia gama de fuentes complejas de carbono para su crecimiento y energía. Esta capacidad se extiende a sustratos como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, materiales derivados de plantas y residuos agrícolas (Carr et al., 2023; Ide-Pérez et al., 2024, 2020; Kirchhoff et al., 2019; Rene et al., 2012; Thitla et al., 2022).

La capacidad neurotrópica de *E. dermatitidis* podría encontrarse asociada a su aislamiento en sitios que presentan de contaminantes monoaromáticos, alcanos y creosotas (Lavrin et al., 2020; Prenafeta-Boldú et al., 2006). En el genoma de esta especie se han identificado genes que codifican para enzimas relacionadas a vías relacionadas con el metabolismo de compuestos aromáticos, así como dominios virulentos que podrían estar potencialmente implicados en la degradación de este tipo de compuestos (Song et al., 2020). Así como su probada habilidad de crecer en presencia de compuestos poliaromáticos y neurotransmisores como se abordó en el capítulo previo y también ha sido previamente estudiado por Lavrin et al. (2020), lo que sugiere un posible vínculo entre sus rutas metabólicas y su afinidad por tejidos del sistema nervioso.

En este capítulo se presentan los resultados del análisis genómico comparativo y del pangenoma de cepas de *E. dermatitidis* aisladas de ambientes clínicos, naturales y domésticos que permiten sustentar los resultados obtenidos en el capítulo 1. Se identificaron en el genoma de esta especie enzimas activas de carbohidratos (CAZymes), vías metabólicas involucradas en el catabolismo de xenobióticos y neurotransmisores, así como dominios asociados a virulencia en cepas seleccionadas que podría estar directamente implicadas en su metabolismo versátil lo que reafirma el carácter dual de esta especie como patógeno oportunista y poliextremófilo. Además, se realiza un análisis pangenómico con cepas aisladas de diferentes sitios para comparar los genes core, accesorios y no escenciales entre estas, con el fin de explorar la variabilidad genómica y su posible relación con la adaptación a condiciones extremas y potencial patogénico de la especie. Estos resultados nos permitieron entender como su genoma se adapta a los nuevos nichos ambientales como los lavavajillas y convirtiéndose en un importante especialista de ambientes urbanos.

12-Metodología Capítulo 2

12.1 Análisis de los genomas de las cepas EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310 de *Exophiala dermatitidis.*

Secuenciación de genomas y análisis de las cepas seleccionadas de *E. dermatitidis*

Los genomas de las cepas de *E. dermatitidis* EXF-10123, EXF-8193-EXF-13310, EXF-5586 y EXF-9187 se secuenciaron y analizaron. El ADN genómico se extrajo de la biomasa de los cultivos en la fase exponencial de crecimiento crecidos en presencia en medio MEB (Anexo 2), agitado a 180 °C e incubado a 24 °C. El aislamiento de ADN se realizó como se describe anteriormente en Gostinčar et al. (2018). La biomasa se congeló en nitrógeno líquido y mantuvo a –80 °C hasta el aislamiento de ADN utilizando *UltraClean Microbial DNA isolation kit* (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Las células se homogenizaron con mortero y pistilo en nitrógeno líquido y con 1 minuto de agitación en *Retsch Mixer Mill* 301 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 20 Hz. El ADN aislado se trató con RNAse A (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). El ADN final fue evaluado utilizando una electroforesis de agarosa y por fluorometría (Qubit; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

La secuenciación del genoma se realizó en Novogene Europe on Illumina NovaSeq 6000, con librerías de 2×150-bp. La calidad de las lecturas fue evaluada con FastQC. El bbduk' se utilizó para recortar cualquier adaptador y los extremos 3' con un puntaje de calidad Phred inferior a 20. Las lecturas menores a 50 bp después del recorte se descartaron. Las lecturas del genoma secuenciado se ensamblaron con SPAdes 3.13.0 (Prjibelski et al., 2020), utilizando la opción "--careful" y dejando los demás parámetros en sus valores predeterminados. Se intentó un ensamblaje adicional mediante scaffolding con Ragtag 2.1.0 (Alonge et al., 2022), utilizando el genoma de *E. dermatitidis* (GenBank GCA_023621285.1) como referencia. Los contigs y scaffolds menores a 500 bp se removieron del ensamble final. El genoma fue anotado con Augustus 3.4 (Stanke and Morgenstern, 2005) después de enmascarar las repeticiones con RepeatMasker 4.0.9 (Smit et al., 2015). Los parámetros de la anotación se optimizaron con el script proporcionado por los autores de Augustus utilizando transcriptos y proteínas predichas de *E. dermatitidis* GenBank GCA_023621285.1) como pistas (*hints*). Estos *hints* también se utilizaron para la anotación final. La predicción del proteoma se evaluó con BUSCO 4.1.1 (Simão et al., 2015) utilizando parámetros por defecto y el conjunto de datos de ortólogos universales de copia única (BUSCOs) para *Chaetothyriales* (Kriventseva et al., 2015).

Las secuencias de los genomas anotados se depositaron en GenBank y se encuentran accesibles en BioProject **PRJNA1110056**.

Los motivos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy) se identificaron en los proteomas predichos de *E. dermatitidis* mediante el servidor independiente dbCAN2 (Zhang et al., 2018), utilizando DIAMOND (Buchfink et al., 2021), HMMer (Eddy, 2011) y Hotpep (Busk et al., 2017). Solo se consideró para los análisis posteriores las identificaciones respaldadas por al menos dos de los tres programas.

La anotación en *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) se realizó con la versión estándar de KofamKOALA ('kofam_scan' 1.3.0) (Aramaki et al., 2020). Los componentes de los módulos KEGG identificados como homólogos de la "Degradación de Xenobióticos" se extrajeron, contaron y visualizaron, así como los genes relacionados con la degradación de neurotransmisores. La anotación de los dominios virulentos del gen se realizó mediante el paquete HAMMER con la base de datos Pfam.

12.2- Análisis del pangenoma entre las cepas seleccionadas de ***Exophiala dermatitidis*** y los genomas de referencia disponibles en NCBI.

El análisis del pangenoma de *E. dermatitidis* se realizó con las cepas EXF-8193, EXF-5586, EXF-9187, EXF-13310 y EXF-10123 (Tabla I) y con 23 genomas disponibles en el NCBI (Anexo: Tabla 1). Para la identificación de ortogrupos en el pangenoma, se utilizó OrthoFinder v. 2.5.2. El análisis se realizó utilizando archivos FASTA de proteínas, ejecutando OrthoFinder con la opción -op para realizar búsquedas de similitud de forma

paralela en un clúster de computación de alto rendimiento (HPC). Se utilizó la opción -S diamond_ultra_sens para llevar a cabo las búsquedas de secuencias con DIAMOND, asegurando alta sensibilidad en la detección de ortólogos.

Los resultados de agrupamiento del pangenoma fueron analizados en R utilizando scripts personalizados. Los ortogrupos core fueron definidos como aquellos presentes en el 100% de los genomas, los ortogrupos accesorios como aquellos presentes en ≥3 pero <28 genomas, los ortogrupos no esenciales (presentes en <3 genomas) y los ortogrupos únicos (singletons) como aquellos presentes en un solo genoma.

Para caracterizar funcionalmente el pangenoma de *E. dermatitidis*, se realizó una anotación genómica utilizando el servidor web GhostKOALA (Kanehisa et al., 2016). La anotación se realizó por separado para los genomas core, accesorios y no esenciales, con el fin de identificar las rutas metabólicas y las categorías funcionales asociadas a cada fracción genómica.

Para anotar genes únicos que no fueron asignados a ortogrupos se realizó una búsqueda BLASTp contra la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI (NR) utilizando un umbral de valor e de 1e-5. Además, se llevó a cabo una anotación funcional utilizando InterProScan para identificar dominios proteicos conservados y predecir posibles funciones. Los términos de ontología génica (GO) y las anotaciones de rutas KEGG fueron recuperadas cuando estaban disponibles. Las proteínas que no tuvieron *hits* significativos en estas bases de datos fueron clasificadas como proteínas hipotéticas.

El análisis de enriquecimiento de rutas metabólicas se realizó utilizando *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) aplicado al genoma accesorio, utilizando la base de datos KEGG y los identificadores de ortología KEGG (KO). Se utilizó la función gseKEGG del paquete clusterProfiler en R (Yu G., 2012) para este análisis. Solo se consideraron las rutas con al menos 10 KO y no más de 500 KO por categoría. Se aplicó un umbral de significancia de $p < 0.05$ para retener solo las rutas significativamente enriquecidas. Este enfoque nos permitió inferir procesos metabólicos clave que diferencian el genoma accesorio, los cuales podrían contribuir a la flexibilidad ecológica de *E. dermatitidis*.

12.3- Análisis estadísticos

Todas las figuras se realizaron utilizando R version 4.2.2 (R Core Team, 2022) en RStudio IDE (version 2022.07.1).

13-Resultados Capítulo 2

13.1 Identificación de enzimas activas de carbohidratos y vías metabólicas de catabolismo de xenobióticos y neurotransmisores mediante análisis genómico de cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis*

Tres de los genomas secuenciados de *E. dermatitidis* tenían tamaños cercanos a 25 Mbp (EXF-8193: 26.43 Mbp, EXF-10123: 26.38 Mbp, EXF-13310: 26.69 Mbp), mientras que dos genomas presentaron casi el doble de ese tamaño (EXF-5586: 51.73 Mbp, EXF-9187: 51.74 Mbp), lo que indica que estas dos cepas podrían ser diploides. El número de *scaffolds* varió entre 23 y 31 para las cepas haploides y casi 600 para las cepas diploides. Todos los proteomas predichos contenían más del 97% de los BUSCOs completos de *Chaetothyriales*, con un 88% de representaciones presentes en dos copias en las cepas presumiblemente diploides y más del 97% en una sola copia en las cepas haploides (Anexo: Figura A).

Se estudió el repertorio de enzimas CAZy (CAZyme) (Figura 9) y los genes involucrados en las vías de detoxificación de xenobióticos (Figura 10) en las cinco cepas seleccionadas de *E. dermatitidis* (EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123 y EXF-13310).

La abundancia de CAZyme en las cepas de *E. dermatitidis* correspondió con el tamaño del genoma. El número de genes en EXF-5586 y EXF-9187 fue casi el doble que en las otras cepas. Para compensar esta presumible diferencia en la ploidía (como se discute más adelante), los números de genes utilizados en los análisis posteriores se dividieron entre dos para las cepas EXF-5586 y EXF-9187 (Figura 9). Como se muestra en la Figura 9, en todas las cepas, las CAZyme más abundantes fueron los que codifican para algunas familias de glicosil hidrolasas (GH), glicosil transferasas (GT) y enzimas de actividad auxiliar (AA). Los genes que codifican para esterasas de carbohidratos (CE), módulos de unión a carbohidratos (CBM) y liasas de polisacáridos (PL) estaban menos representados. La familia de transferasas de glicosilo 2 (GT2) fue la más prevalente entre los genomas de *E. dermatitidis*, seguida por las familias de transferasas de glicosilo 4 (GT4), hidrolasas de glicosil 16 (GH16), hidrolasas de glicosil 13 (GH13), actividad auxiliar 1 (AA1), actividad auxiliar 3 (AA3), hidrolasas de glicosil 5 (GH5) y transferasas de glicosilo 22 (GT22). La distribución de CAZyme de las cepas de *E. dermatitidis* fue generalmente similar en todos los genomas. Sin embargo, a partir del contenido CAZyme de cada proteoma predicho, las cepas se agruparon en dos grupos distintos: uno compuesto por EXF-5586 y EXF-9187, ambas aisladas de lavavajillas domésticos, y otro grupo formado por EXF-10123, EXF-13310 y EXF-8193.

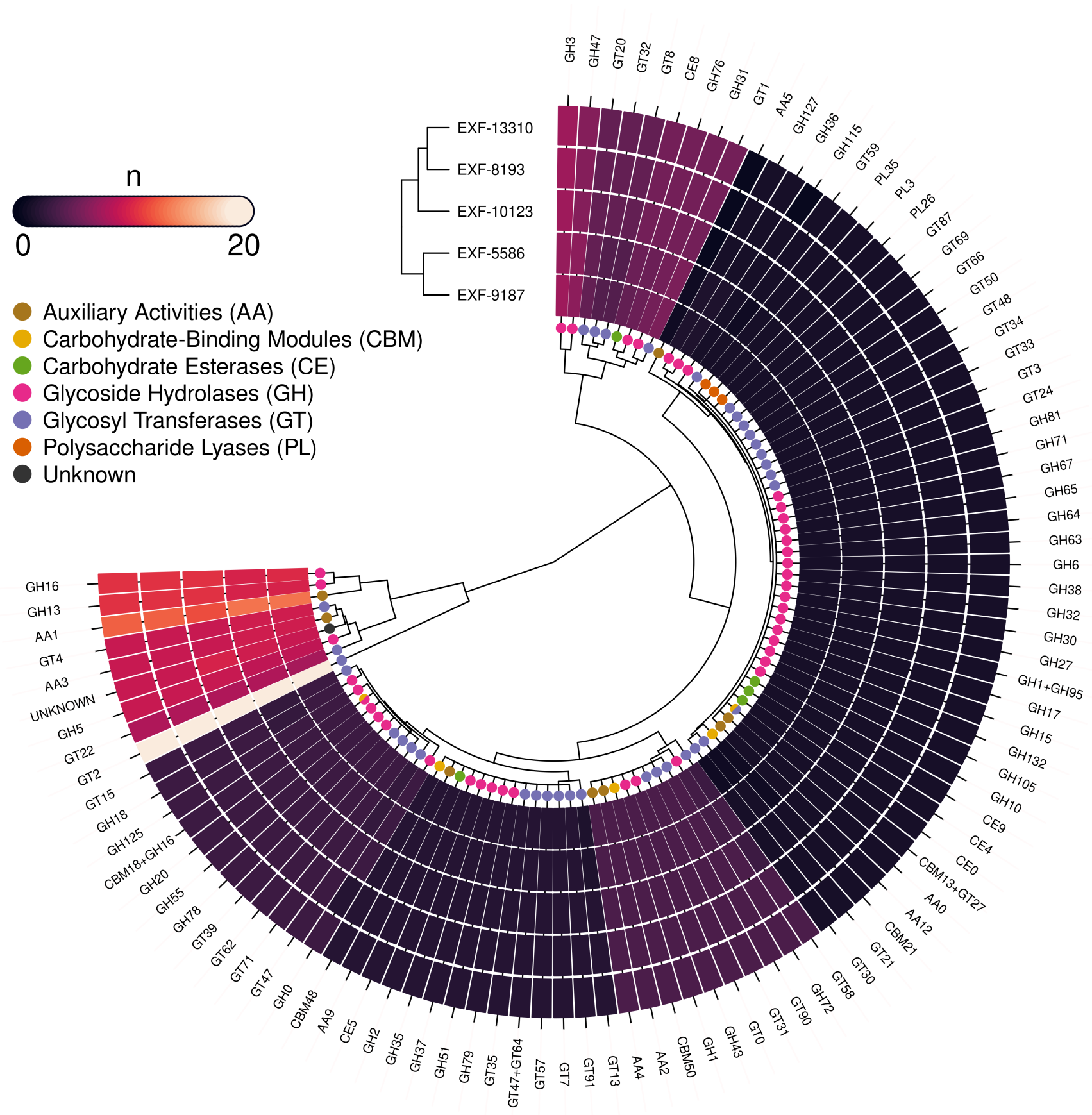


Figura 9. Mapa de calor que muestra la abundancia de las familias CAZy en cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* (EXF-5586, EXF-9187, EXF-13310, EXF-8193 y EXF-10123). Las familias CAZy incluyen GH (glicosidasas), AA (actividades auxiliares), GT (glicosiltransferasas), CE (carbohidrato esterasa), PL (polisacárido liasas) y CBM (módulos de unión a carbohidratos).

Las cepas de *E. dermatitidis* exhibieron una amplia diversidad de genes asociados con 17 rutas bioquímicas de degradación de xenobióticos, incluidos los de la biodegradación de PAH (Figura 10A). Aunque las cepas seleccionadas mostraron números de copias similares para la mayoría de los genes relacionados con la degradación de PAH, indicando un alto grado de conservación en estas rutas, dos grupos de genes, las glutatión S-transferasas (K00799) y las amidasas K01426, estuvieron notablemente enriquecidos. Estas enzimas desempeñan papeles cruciales en varias de las rutas de desintoxicación estudiadas. Los genes para la carbonilo reductasa 1 (K00079) se encontraron solo en dos de las cinco cepas.

Dado nuestro interés en investigar el metabolismo de neurotransmisores e hidrocarburos por las cepas de *E. dermatitidis*, identificamos posibles vías metabólicas para el catabolismo de estos compuestos mediante la anotación de genes involucrados en estas vías metabólicas dentro de los genomas estudiados (Figura 10B). Identificamos genes clave responsables de la degradación de compuestos aromáticos como el fenol, fenantreno, 1,2,4-bencenotriol y naftaleno, junto con genes involucrados en las vías biodegradativas de neurotransmisores como dopamina, epinefrina y norepinefrina. Por ejemplo, los genomas de *E. dermatitidis* contienen un repertorio completo de genes que codifican para la citocromo P450 que codifican varias oxidorreductasas que actúan sobre donantes con grupos CH-OH y CH-CH, así como transferasas. Estos

incluyen reductasa de carbonilo, reductasa de aldehído, deshidrogenasa de glutatión, transferasa S de glutatión, deshidrogenasa de dihidrodiol, deshidrogenasa alcohólica, glutationilasa de hidroxihidronaftaleno-1,2, dihidro-4-hidroxi-5-S-glutationil-benzo[a]pireno y hidrolasa de 7,8-dihidro-7-hidroxi-8-S-glutationil-benzo[a]pireno. Además, se identificaron otros genes que codifican para enzimas como la hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa (K04098) y la salicilato hidroxilasa (K00480), que desempeñan un papel directo en la biotransformación de hidrocarburos aromáticos. Estas enzimas están involucradas en la síntesis y escisión de catecol, derivados de catecol y varios dioles y compuestos dihidroxilados, que son intermediarios críticos en la biotransformación de los PAHs. Además, se identificaron genes que codifican para catecol O-metiltransferasa (K00545) y monoamino oxidasa (K00274), los cuales son fundamentales para la biotransformación de neurotransmisores, en los genomas estudiados de *E. dermatitidis*. La catecol O-metiltransferasa facilita la transferencia de grupos metilo, mientras que la monoamino oxidasa es responsable de la desaminación oxidativa de neurotransmisores y aminas biógenas, desempeñando un papel clave en el catabolismo de neurotransmisores.

Para corroborar el potencial genómico predicho para estas cepas estudiamos la cinética de crecimiento celular de las cinco cepas seleccionadas al cultivarlas en neurotransmisores (dopamina, adrenalina, noradrenalina y serotonina) y compuestos poliaromáticos (fenol, fenantreno, naftaleno y 1,2,4-bencenetriol) (Figura 10C). A pesar de compartir el mismo trasfondo genético, se observaron diferencias notables en el crecimiento sobre estos diversos sustratos aromáticos entre las diferentes cepas de *E. dermatitidis* diferencias que pudieran estar relacionadas con adaptaciones específicas a su sitio de aislamiento. Por ejemplo, las cepas mostraron patrones de crecimiento distintos en respuesta a varios neurotransmisores. Mientras que la serotonina favoreció un crecimiento discreto, otros neurotransmisores fueron más propicios para el crecimiento de las cepas de levadura negra. Notablemente, la cepa derivada clínicamente, EXF-10123, mostró su mejor crecimiento en epinefrina, pero no en norepinefrina, a pesar de su alta similitud estructural. Las cepas EXF-5586 y EXF-8193 mostraron un crecimiento excepcional en presencia de dopamina, con EXF-8193 también mostrando un crecimiento notable en norepinefrina. En cuanto a los compuestos aromáticos, el fenol y el naftaleno fueron los sustratos menos favorables para el crecimiento de las cepas, mientras que el 1,2,4-bencenetriol se identificó como el sustrato más favorable para el crecimiento de la levadura. Curiosamente, aunque estructuralmente similares con solo una diferencia de un grupo hidroxilo, EXF-5586 mostró un crecimiento robusto en dopamina y un crecimiento mínimo en 1,2,4-bencenetriol. De manera similar, EXF-8193 alcanzó niveles de crecimiento comparables en estos sustratos, aunque con cinéticas diferentes. Estos resultados demuestran la gran plasticidad fenotípica de las cepas de *E. dermatitidis*.

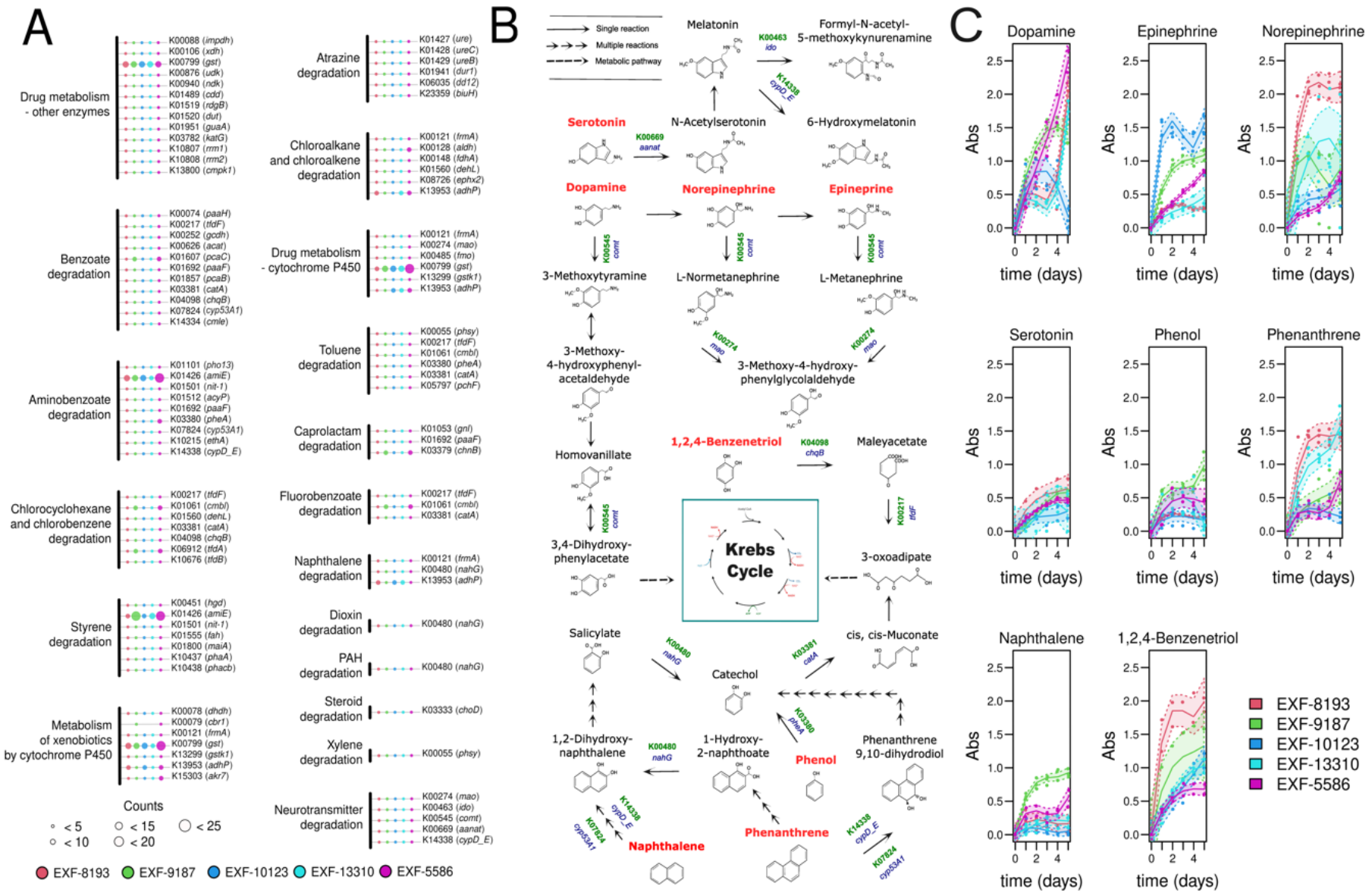


Figure 10. (A) Capacidades genómicas asociadas con el metabolismo de xenobióticos, que abarcan hidrocarburos y compuestos aromáticos, y la transformación de neurotransmisores, en cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis*. KO asociadas con el catabolismo de: Aminobenzoato (K14338: citocromo P450; K10215: monooxigenasa; K07824: benzoato 4-monooxigenasa; K03380: fenol 2-monooxigenasa (NADPH); K01692: enoil-CoA hidratasa; K01512: acilfosfatasa; K01501: nitrilasa; K01426: amidasa; K01101: fosfatasa de 4-nitrofenilo), Atrazina (K23359: biuret amidohidrolasa; K06035: cianamida hidratasa; K01941: urea carboxilasa; K01429: subunidad beta de ureasa; K01428: subunidad alfa de ureasa; K01427: ureasa), Benzoato (K14334: carboxi-cis,cis-muconato ciclasa; K07824: benzoato 4-monooxigenasa; K04098: hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa; K03381: catecol 1,2-dioxigenasa; K01857: 3-carboxi-cis,cis-muconato cicloisomerasa; K01692: enoil-CoA hidratasa; K01607: 4-carboximuconolactona descarboxilasa; K00626: acetil-CoA C-acetiltransferasa; K00252: glutaril-CoA deshidrogenasa; K00217: maleilacetato reductasa; K00074: 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa), Caprolactama (K03379: ciclohexanona monooxigenasa; K01692: enoil-CoA hidratasa; K01053: gluconolactonasa), Cloroalcano y cloroalqueno (K13953: alcohol deshidrogenasa; K08726: epóxido hidrolasa soluble; K01560: 2-haloácido deshalogenasa; K00148: formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión; K00128: aldehído deshidrogenasa (NAD^+); K00121: S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa), Clorociclohexano y clorobenceno (K10676: 2,4-diclorofenol 6-monooxigenasa; K06912: dioxygenasa alfa-cetoglutarato-dependiente 2,4-diclorofenoxiacetato; K04098: hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa; K03381: catecol 1,2-dioxigenasa; K01560: 2-haloácido deshalogenasa; K01061: carboximetilenbutenolidasa; K00217: maleilacetato reductasa), Dioxina (K00480: salicilato hidroxilasa), Metabolismo de fármacos (K13953: alcohol deshidrogenasa; K13299: glutatión S-transferasa kappa 1; K00799: glutatión S-transferasa; K00485: dimetilanilina monooxigenasa (formación de N-óxido); K00274: monoamino oxidasa; K00121: S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa), Metabolismo de fármacos - otras enzimas (K13800: UMP-CMP quinasa; K10808: subunidad M2 de ribonucleósido-difosfato reductasa; K10807: subunidad M de ribonucleósido-difosfato reductasa; K03782: catalasa-peroxidasa; K01951: GMP sintetasa (hidrólisis de glutamina); K01520: dUTP difosfatasa; K01519: XTP/dITP difosfohidrolasa; K01489: citidina desaminasa; K00940: nucleósido-difosfato quinasa; K00876: uridina quinasa; K00799: glutatión S-transferasa; K00106: xantina deshidrogenasa; K00088: IMP deshidrogenasa), Fluorobenzoato (K03381: catecol 1,2-dioxigenasa; K01061: carboximetilenbutenolidasa; K00217: maleilacetato reductasa), Metabolismo de xenobióticos (K15303: aflatoxina B1 aldehído reductasa; K13953: alcohol deshidrogenasa; K13299: glutatión S-transferasa kappa 1; K00799: glutatión S-transferasa; K00121: S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa; K00079: carbonil reductasa 1; K00078: dihidrodiol deshidrogenasa), Naftaleno (K13953: alcohol deshidrogenasa; K00480: salicilato hidroxilasa; K00121: S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa), HAPs (K00480: salicilato hidroxilasa), Esteroides (K03333: colesterol oxidasa), Estireno (K10438: 3-hidroxifenilacetato 6-hidroxilasa; K10437: fenilacetato 2-hidroxilasa; K01800: maleilacetoacetato isomerasa; K01555: fumarilacetoacetasa; K01501: nitrilasa; K01426: amidasa; K00451: homogentisato 1,2-

dioxigenasa), Tolueno (K05797: 4-cresol deshidrogenasa (hidroxilante) subunidad flavoproteína; K03381: catecol 1,2-dioxigenasa; K03380: fenol 2-monooxigenasa (NADPH); K01061: carboximetilenbutenolidasa; K00217: reductasa de maleilacetato; K00055: aril-alcohol deshidrogenasa), Xileno (K00055: aril-alcohol deshidrogenasa), Tirosina (K00545: catecol O-metiltransferasa; K00274: monoamina oxidasa). Degradación de neurotransmisores (K14338: citocromo P450; K00669: arilalquilamina N-acetiltransferasa; K00545: catecol O-metiltransferasa; K00463: indolamina 2,3-dioxigenasa; K00274: monoamina oxidasa). (B) Representación de las principales rutas involucradas en la degradación de compuestos aromáticos como fenol, fenantreno, 1,2,4-bencenetriol y naftaleno, así como neurotransmisores como dopamina, epinefrina y norepinefrina, con las correspondientes anotaciones KO (KEGG *Orthology*) en los genomas de las cepas seleccionadas. (C) Cinética de crecimiento celular para las cepas seleccionadas cultivadas en presencia de neurotransmisores (dopamina, epinefrina, norepinefrina y serotonina) y compuestos aromáticos (fenol, fenantreno, naftaleno y 1,2,4-bencenetriol).

13.2- Identificación de dominios virulentos en cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis.*

Se identificaron familias de proteínas previamente asociadas a dominios funcionales virulentos mediante la base de datos Pfam (Figura 11). La anotación reveló la presencia de 10 dominios asociados con virulencia en los genomas de las cepas de *E. dermatitidis* EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123, EXF-13310 y EXF-5586. Todos los dominios identificados se encontraron al menos una vez en cada genoma. Entre ellos, los más abundantes fueron la proteína hsp70, la enzima decapadora de ARNm con unión al término, y la familia de la ubiquitina.

Las cepas EXF-5586 y EXF-9187, aisladas de máquinas de lavavajillas, presentaron un mayor número de copias de dominios de virulencia, lo cual podría estar relacionado con su posible naturaleza diploide. Estas familias génicas anotadas en Pfam están asociadas con virulencia y han sido previamente identificadas en cepas de *E. dermatitidis* y *E. spinifera* (Song et al., 2020). Además, los genes y dominios relevantes fueron contrastados con los genomas de *E. spinifera* y *E. dermatitidis* mediante herramientas de la literatura y confirmación funcional en bases de datos como InterPro.

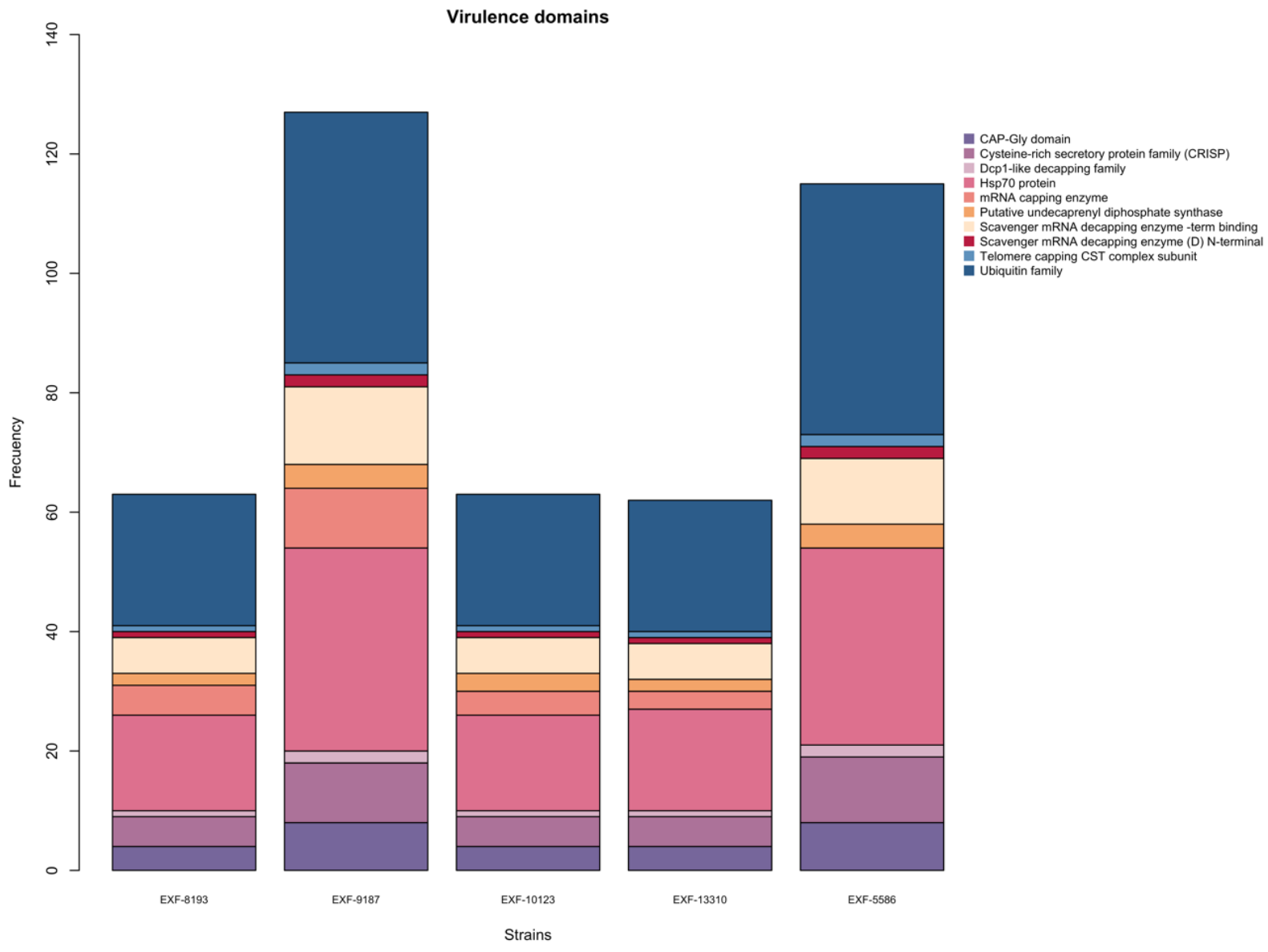


Figura 11. Gráfico de barras que muestra la identificación de dominios virulentos en las cepas *Exophiala dermatitidis* EXF-8193, EXF-9187, EXF-10123, EXF-13310 y EXF-5586, anotados mediante la base de datos Pfam.

13.3- Análisis del pangenoma entre las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* y los genomas de referencia disponibles en NCBI.

El análisis del pangenoma de *E. dermatitidis* se realizó utilizando las cepas EXF-8193, EXF-10123, EXF-13310, EXF-5586 y EXF-9187 de este estudio, junto con genomas de referencia disponibles en NCBI (Tabla III) (Anexo: Tablas 2-4). Como se muestra en la Figura 12A y B, un árbol filogenómico construido con OrthoFinder, basado en las 28 cepas analizadas de *E. dermatitidis*, reveló tres grupos principales. Un grupo comprende todas las cepas que representan aislamientos clínicos, incluida la cepa EXF-13310, que fue aislada de una mezcla de aceite y agua. La estrecha relación entre estas cepas clínicas podría reflejar sus presiones evolutivas compartidas, ya que los árboles filogenómicos construidos con OrthoFinder se basan en el contenido génico ortólogo, lo que puede agrupar cepas con adaptaciones ecológicas y presiones selectivas similares.

Otro grupo distinto incluye las cepas EXF-5586 y EXF-9187, ambas aisladas de ambientes de lavavajillas y previamente sugerida su posible diploidía. Estas cepas presentan la mayor similitud de secuencias y una mínima divergencia, lo que sugiere un ancestro común reciente o adaptación a un nicho antropogénico altamente selectivo. En contraste, EXF-8193, aislada de sedimento subglacial, forma una línea evolutiva separada del resto de las cepas analizadas. Esta cepa muestra una mayor divergencia genética y características evolutivas únicas, lo que probablemente refleja adaptaciones a su frío entorno natural que difiere significativamente de los hábitats antropogénicos y clínicos de las otras cepas.

Estos hallazgos sugieren que podríamos estar observando la especiación en tiempo real dentro de *E. dermatitidis*. Los aislamientos clínicos muestran diferentes grados de expansión del genoma, lo que indica posibles diferencias en sus estrategias adaptativas o historias evolutivas. Las cepas aisladas de lavavajillas (EXF-5586 y EXF-9187) tienen genomas significativamente más grandes que el resto de las cepas, un patrón observado exclusivamente en estos dos aislamientos. Esta expansión pronunciada del genoma podría ser un signo de adaptación al ambiente de lavavajillas, posiblemente impulsada por presiones selectivas únicas de este nicho antropogénico.

El diagrama de *Flower Plot* ilustra la distribución de genes entre las cepas analizadas (Figura 12C). El genoma core, definido como los ortogrupos presentes en el 100% de las cepas de *E. dermatitidis* (28 genomas), comprende un total de 6929 ortogrupos. Además, se identificaron genes accesorios (presentes en ≥3 pero <28 genomas) y genes no esenciales (presentes en <3 genomas), que podrían desempeñar roles adaptativos o especializados, proporcionando ventajas en ambientes específicos (Tabla III) (Anexo: Tabla 4).

Las cepas estudiadas, incluidos los aislamientos clínicos EXF-10123, EXF-8193 y EXF-13310, exhiben un pangenoma con proporciones de genes core y accesorios similares a los genomas de referencia disponibles de NCBI (aislamientos clínicos). Sin embargo, los aislamientos de lavavajillas EXF-5586 y EXF-9187 contienen un número sorprendentemente alto de ortogrupos no esenciales, sumando 3716 y 3714, respectivamente. Esto sugiere que estas dos cepas comparten la mayoría de estos ortogrupos entre sí, pero no con el resto de las cepas, lo que podría indicar una adaptación específica a las condiciones extremas encontradas en los ambientes de lavavajillas.

La curva del pangenoma revela que el número de genes del genoma core disminuye a medida que se añaden más genomas, lo que sugiere que el pangenoma está abierto (Figura 12D). Un pangenoma abierto indica que la secuenciación de cepas adicionales sigue descubriendo nuevos genes accesorios, lo que resalta la sustancial diversidad genética dentro de la especie (Lofgren et al., 2022). Este fenómeno es comúnmente observado en microorganismos con alta capacidad para adaptarse a diversos nichos ecológicos o aquellos que exhiben un extenso intercambio horizontal de genes (McCarthy and Fitzpatrick, 2019).

La Figura 12E ilustra el porcentaje máximo de genes por cepa en cada ortogrupo, revelando tres grupos principales. El grupo central muestra una alta representación de ortogrupos presentes en todos los genomas. En el grupo inferior, las cepas EXF-5586 y EXF-9187 muestran una

representación significativamente mayor de ortogrupos en comparación con las otras cepas. En contraste, el grupo superior muestra claramente que estas dos cepas comparten un conjunto distinto de ortogrupos ausentes en las demás cepas analizadas.

Las cepas EXF-5586 y EXF-9187 poseen un número significativamente mayor de genes (~17,380) en comparación con otras cepas (~9,000–10,000). Además, presentan una mayor cantidad de genes no asignados a ortogrupos (118 y 85, respectivamente), lo que sugiere la presencia de genes únicos o duplicaciones génicas (Anexo: Tabla 3 y 4). Esto podría sugerir posibles eventos de duplicación génica, un aspecto que aún debe ser explorado en el contexto de la variación en el número de cromosomas, como se ha señalado en el epígrafe anterior. El número mayor de genes en estas dos cepas podría reflejar una expansión del genoma, posiblemente impulsada por la adaptación a su entorno específico (Anexo: Tabla 3 y 4).

Existen diferencias notables entre las cepas con respecto al número total de genes. Por ejemplo, EXF-5586 alberga 17,380 genes, mientras que EXF-10123 contiene solo 8,945 (Anexo: Tabla 3). Esta discrepancia podría indicar variaciones en el número de cromosomas, tamaño del genoma o precisión de la anotación. Mientras que la mayoría de los genes se agrupan en ortogrupos (~99–100%), existen algunas excepciones, como NIH:UT8656, que tiene el 2.8% (55) de sus genes no asignados, anotados como proteínas hipotéticas (Anexo: Tabla 4).

Esta observación sugiere que EXF-5586 y EXF-9187 poseen características genéticas únicas que podrían conferir ventajas adaptativas o funciones especializadas no encontradas en las otras cepas. Este conjunto exclusivo de ortogrupos podría estar asociado con rasgos fenotípicos particulares, como la capacidad de sobrevivir en ambientes específicos, resistencia a ciertos factores de estrés o incluso mecanismos de virulencia. Además, esta unicidad genética podría ser el resultado de adaptaciones evolutivas que no han ocurrido en las otras cepas analizadas.

Tabla III. Porcentaje de representación de la clasificación de ortogrupos en las cepas de *Exophiala dermatitidis.*

Clasificación de ortogrupos	Conteo de ortogrupos	Porcentage de representación (%)
Core	6929	49
Accesorios	3198	22.8
No escenciales	3864	27.6
Únicos	27	0.193

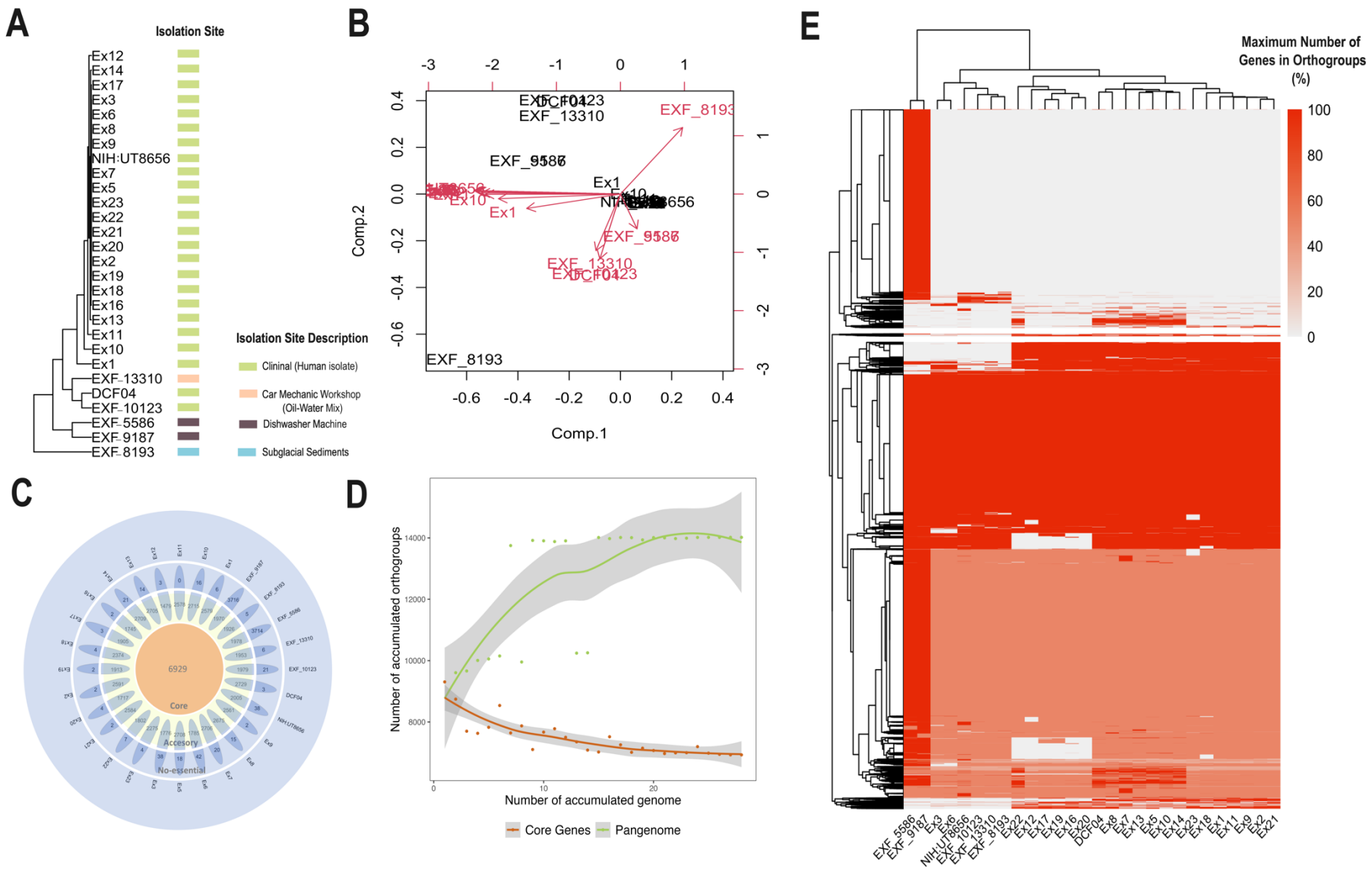


Figura 12. Análisis del pangenoma de las cepas *Exophiala dermatitidis* EXF-8193, EXF-10123, EXF-13310, EXF-5586, EXF-9187 y los genomas de referencia disponibles en NCBI. (A) Diagrama tipo *Flower Plot* que muestra la distribución de los genes: genes core (presentes en los 28 genomas analizados), genes accesorios (presentes en al menos 3 pero menos de 28 genomas) y genes no esenciales (presentes en menos de 3 genomas). (B) Gráfico generado con *geom_smooth* que indica si el pangenoma es abierto o cerrado. (C) Árbol filogenómico construido con OrthoFinder utilizando las 28 cepas analizadas. (D) *Heatmap* que representa el porcentaje máximo de genes por cepa en cada ortogrupo.

El análisis del enriquecimiento de vías metabólicas en el pangenoma de *E. dermatitidis*, para la clasificación de los genes core, accesorios y no esenciales, reveló diferencias significativas en las vías KEGG enriquecidas para cada clasificación (Figura 13). En particular, algunas vías enriquecidas en el genoma core están más estrechamente relacionadas con la extremotolerancia y la patogenicidad.

Entre las vías más asociadas con la extremotolerancia destaca la vía de las pentosas fosfato, que proporciona NADPH, un cofactor esencial para la defensa contra el estrés oxidativo. En hongos poliextremotolerantes esta vía permite contrarrestar el daño inducido por ROS. Asimismo, el enriquecimiento de diversas rutas metabólicas en ambientes extremos sugiere una alta plasticidad metabólica, lo que facilitaría la adaptación a variaciones en la disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés.

Por otro lado, la degradación de ácidos grasos permite la utilización de lípidos como fuente de energía en entornos con limitación de carbono, contribuyendo a la supervivencia en condiciones adversas como desecación o estrés osmótico. De manera similar, la degradación de compuestos aromáticos facilita la descomposición de moléculas recalcitrantes, como hidrocarburos y xenobióticos, lo que podría estar relacionado con la resistencia a contaminantes y la colonización de hábitats extremos.

Algunas vías enriquecidas en el genoma core del pangenoma de *E. dermatitidis* están implicadas tanto en la extremotolerancia como en la patogenicidad. Entre ellas destaca el metabolismo de la tirosina, que participa en la biosíntesis de melanina, un factor clave en la protección contra el estrés ambiental y en la evasión del sistema inmune del huésped. Asimismo, la biosíntesis de metabolitos secundarios podría cumplir un papel dual, facilitando la adaptación a condiciones extremas y la producción de factores de virulencia. Estas rutas también se encontraron enriquecidas en el genoma accesorio y no esencial. En este último, se identificaron funciones asociadas a una mayor versatilidad metabólica, como aquellas involucradas en la adaptación microbiana a distintos entornos.

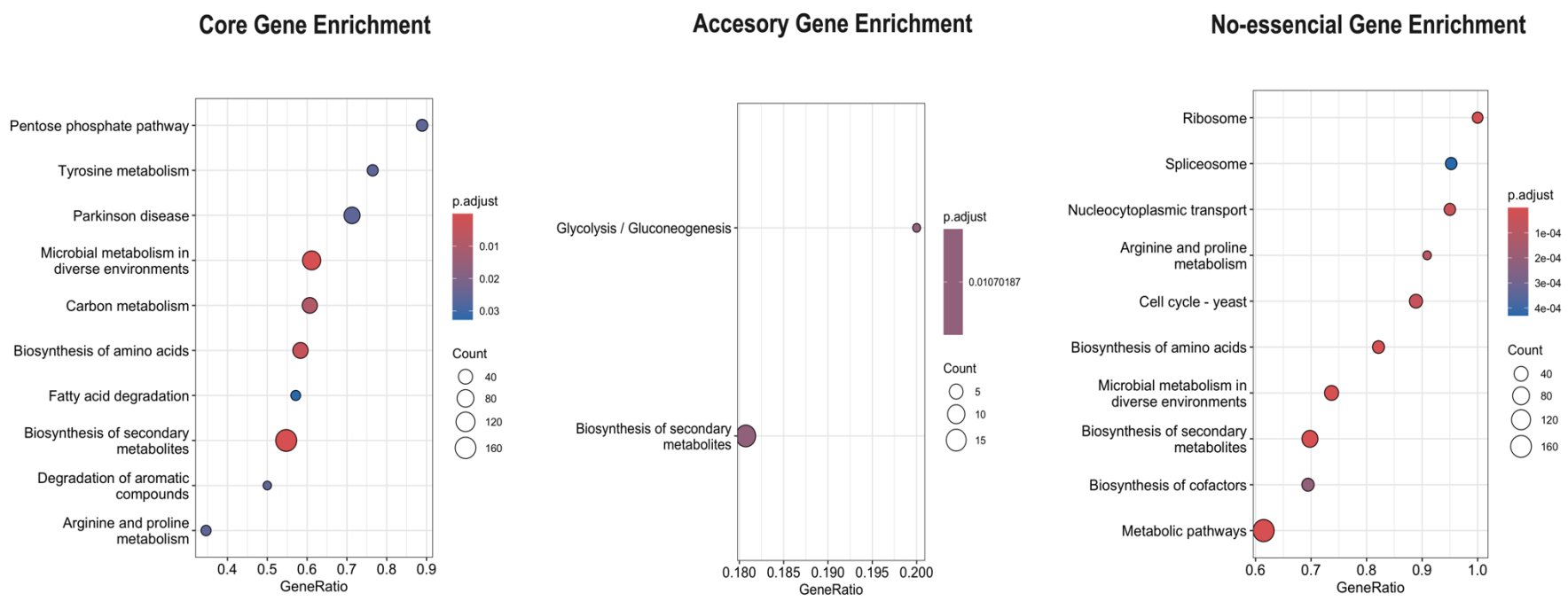


Figura 13. Enriquecimiento de vías del pangenoma de las cepas *Exophiala dermatitidis* EXF-8193, EXF-10123, EXF-13310, EXF-5586, EXF-9187 y los genomas de referencia disponibles en NCBI.

14-Discusión Capítulo 2

Presencia de genes que codifican enzimas para la degradación de carbohidratos, el metabolismo de compuestos poliaromáticos y el procesamiento de neurotransmisores en el genoma de *Exophiala dermatitidis*

Se realizó un análisis genómico de cinco cepas seleccionadas de *E. dermatitidis* para identificar repertorios de CAZyme y vías metabólicas involucradas en la degradación de PAHs y neurotransmisores.

Los cinco genomas secuenciados variaron en tamaño desde 26.38 Mbp hasta 51.74 Mbp. Es destacable que los genomas de las cepas EXF-5586 y EXF-9187 fueron casi el doble de grandes (aproximadamente 51 Mbp) que los de EXF-10123, EXF-13310 y EXF-8193 (aproximadamente 26 Mbp), lo que sugiere que estas dos cepas podrían ser diploides. Basado en la presencia de ortólogos de copia única presentes en en el orden *Chaetothyriales*, los cinco genomas fueron anotados con un alto nivel de completitud. Las dos cepas presuntamente diploides fueron aisladas de lavavajillas (Tabla I). Aunque típicamente haploides, algunas especies de levaduras melanizadas han sido reportadas previamente diploides (Gostinčar et al., 2022). Sin embargo, con solo dos diploides presumibles conocidos en *E. dermatitidis* y un número relativamente pequeño de genomas secuenciados, el tamaño de la muestra es actualmente demasiado pequeño para estimar la variabilidad de la ploidía dentro de la especie. De manera similar, aún es temprano para especular sobre posibles vínculos entre diferentes ploidías y hábitats específicos, como el interior de los lavavajillas, que parecen particularmente favorables para *E. dermatitidis* (Zalar et al., 2011).

Los genomas mostraron una amplia gama de CAZyme y genes que codifican para enzimas relacionadas con la degradación de compuestos poliaromáticos y neurotransmisores (Figura 10 y Figura 11), lo que ilustra la capacidad del hongo para utilizar diversas fuentes complejas de carbono. Esta diversidad genética señala la adaptabilidad de *E. dermatitidis* a diversos nichos ecológicos y su potencial patogénico tanto en contextos ambientales como clínicos. En términos de adaptabilidad metabólica, la diversidad de las familias de CAZyme es crucial, ya que favorece el crecimiento en diversos nichos ambientales (Benoit et al., 2015; Moreno et al., 2019; Pasko M. T. et al., 1990). Las CAZyme identificadas en estas cepas de *E. dermatitidis* corroboran nuestros hallazgos de fenotipificación de Biolog (Figura 4), donde las hidrolasas de glucósidos (GH), las transferasas de glucósidos (GT) y las actividades auxiliares (AA) fueron las más prevalentes (Figura 5). En este contexto, las cepas demostraron que en particular, familias de Cazyme como las hidrolasas de glucósidos (GH13), transglucosiladas (GH16), flavoproteínas con dominios de unión a FAD (AA3) y oxidorreductasas (AA1), incluidas las lacasas, proporcionan un conjunto de herramientas metabólicas para la biotransformación y asimilación de fuentes complejas de carbono, como los compuestos fenólicos (Matsumoto et al., 2023; Rafiei et al., 2021; Reyre et al., 2022).

Las familias de genes que codifican CAZyme y la cantidad de sus representantes fueron en su mayoría similares entre las cepas. Esto no es sorprendente, dado el estrecho parentesco entre las cepas y la observación cada vez más común de que el contenido de CAZyme está principalmente influenciado por la historia filogenética, más que por los requisitos del hábitat (López-Mondéjar et al., 2022). No obstante, según el contenido de los genes CAZy, se formaron dos grupos distintos: uno compuesto por las cepas diploides EXF-5586 y EXF-9187, aisladas de lavavajillas domésticos, y otro compuesto por EXF-10123, EXF-13310 y EXF-8193. Este agrupamiento podría sugerir capacidades enzimáticas específicas seleccionadas por el hábitat del lavavajillas o indicar diferencias evolutivas entre cepas diploides y haploides. La diferencia también podría ser un artefacto de la ploidía del genoma, ya que las cepas diploides presentan un desafío mucho mayor para el ensamblaje genómico. Esto se ilustra por la naturaleza fragmentada de los ensamblajes genómicos de las cepas diploides, que contienen aproximadamente 20 veces más andamiajes que las cepas haploides. La identificación de genes asociados con rutas para la degradación de hidrocarburos monoaromáticos y otros contaminantes volátiles resalta aún más la versatilidad metabólica de las cepas de *E. dermatitidis*. Estos genes están involucrados en

procesos metabólicos diversos, incluida la degradación de benzoato, PAHs y otros xenobióticos, los cuales son cruciales para la adaptación y supervivencia fúngica en distintos nichos ecológicos (Song et al., 2020).

Específicamente, el análisis genómico de cinco cepas de *E. dermatitidis* reveló genes que codifican enzimas como catecol O-metiltransferasa, monoaminooxidasa, catecol 1,2-dioxigenasa, salicilato hidroxilasa e hidroxiquinol 1,2-dioxigenasa. Estas enzimas están involucradas en la degradación de compuestos poliaromáticos y neurotransmisores, los cuales pueden ser utilizados como fuentes de carbono para el crecimiento celular (Figura 11B). La presencia constante de estos genes en todas las cepas sugiere una capacidad compartida para utilizar PAHs y neurotransmisores como fuentes de carbono para el crecimiento. Las diferencias en el crecimiento celular observadas entre las cepas (Figura 11C) pueden atribuirse a otras respuestas celulares, como la regulación transcripcional. Estos hallazgos resaltan la versatilidad metabólica y las estrategias adaptativas de las cepas de *E. dermatitidis*, contribuyendo a su patogenicidad y éxito ecológico en diversos ambientes.

Análisis del pangenoma entre las cepas seleccionadas de *Exophiala dermatitidis* y los genomas de referencia disponibles en NCBI.

Se realizó un análisis de tipo pangenoma en *E. dermatitidis*, el cual constituye el primer análisis de este tipo en su especie. Los resultados indican que el pangenoma es abierto por lo tanto el radio de genes core/accesorios decrece con el incremento del número de genes analizados (Figura 12D) (Lofgren et al., 2022). Se asume que especies generalistas (que pueden vivir en una amplia variedad de ambientes) y con poblaciones grandes tienden a tener pangenomas más diversos y contiene más genes únicos entre diferentes cepas de la misma especie (Lofgren et al., 2022). Esto se debe a que, con más individuos y mayor dispersión, es más probable que haya intercambio de genes y adquisición de nuevos genes a lo largo del tiempo (Lofgren et al., 2022). Sin embargo, se identificaron escasos genes únicos a lo largo del pangenoma de *E. dermatitidis*, donde solamente la cepa NIH/UT8656 contiene 2.8% de genes únicos (Anexo: Tabla 4). En contraste con el resto de las cepas de *E. dermatitidis* analizadas, las cepas EXF-5586 y EXF-9187 presentan de forma respectiva el 29.5% y 29.4% de ortogrupos no esenciales con respecto al total de sus genomas de cual los resultados revelan que comparten entre las dos una parte significativa de estos ortogrupos no esenciales identificados en todo el pangenoma (Figura 12C).

En otras especies fúngicas como *Aspergillus fumigatus* se cree que la heterogeneidad de la virulencia está estructurada, al menos parcialmente, por la variación genética entre cepas (Lofgren et al., 2022). Sin embargo, en este contexto es relevante que dentro de la muestra estudiada las cepas EXF-5586 y EXF-9187 son las únicas aisladas de lavavajillas. Esto puede deberse a una adaptación a las condiciones dentro de los lavavajillas las cuales no solo permiten la supervivencia de ciertas especies de hongos, sino que también favorecen el enriquecimiento selectivo de hongos poliextremotolerantes capaces de resistir pH extremos, temperaturas de 60°C a 80°C, deshidratación ocasional, altas cargas orgánicas, elevadas concentraciones de NaCl y el estrés mecánico generado por los inyectores de agua (Zupančič et al., 2016b).

Estos resultados sugieren que, en lugar de un cambio en la ploidía como se propuso inicialmente en el análisis de sus genomas (Subepígrafe 13.1), las cepas EXF-5586 y EXF-9187 podrían presentar una amplificación de ciertos ortogrupos a través de duplicaciones génicas dentro del mismo genoma, lo que incrementa el número total de genes sin modificar la ploidía. Este fenómeno es similar al observado en otras especies, como *E. phaeomuriformis* de *E. dermatitidis* y *E. oligosperma* de *E. spinifera*, donde se notaron considerables ganancias y expansiones génicas (Song et al., 2020). En estos casos, se observó una desviación significativa (3109.8 genes en promedio) de los cambios intra-específicos, lo que sugiere que los mecanismos de expansión génica en *E. dermatitidis* podrían implicar una dinámica genética diferente, caracterizada por la duplicación o expansión de ortogrupos específicos sin cambios en la ploidía (Song et al., 2020). En línea con estos hallazgos, el análisis de las cepas EXF-5586 y EXF-9187 podría indicar que un proceso similar de amplificación génica podría estar contribuyendo a la expansión de su genoma, lo cual explicaría el mayor tamaño del genoma observado en comparación con otras cepas de *E. dermatitidis*. Este proceso podría

estar relacionado con mecanismos evolutivos como la duplicación génica, que facilita la diversificación y adaptación sin requerir una variación en el número de cromosomas.

Lofgren et al. (2022) subrayan las limitaciones de utilizar un solo genoma de referencia para evaluar la variabilidad intraespecífica, destacando la importancia de enfoques genómicos combinados que permitan una comprensión más profunda de la estructura poblacional, la diversidad genética y los factores ecológicos que impulsan la variación en hongos clínicamente relevantes. Este enfoque integrado puede ofrecer una visión más precisa de las dinámicas genéticas y ecológicas, facilitando la identificación de patrones de variabilidad que no serían detectados mediante la comparación con un solo genoma de referencia.

15-Conclusiones Capítulo 2

1-Las cepas de *E. dermatitidis* muestran variabilidad en tamaño de genoma y repertorio de CAZyme, con las cepas presumiblemente diploides presentando mayor abundancia de genes. Estas diferencias sugieren adaptaciones metabólicas específicas según el entorno de aislamiento.

2- Las cepas de *E. dermatitidis* independientemente del sitio de aislamiento muestran una notable diversidad en las rutas de degradación de xenobióticos y neurotransmisores, con diferencias en la capacidad de crecimiento sobre diversos sustratos. La variabilidad fenotípica observada sugiere una plasticidad adaptativa que puede ser clave para su supervivencia en diferentes ambientes.

3-Todas las cepas de *E. dermatitidis* muestran dominios virulentos clave asociados con la invasión de tejidos, con una mayor abundancia de estos dominios en cepas presumiblemente diploides, lo que sugiere un posible vínculo entre la ploidía y la virulencia.

4-El análisis del pangenoma abierto de *E. dermatitidis* muestra una notable diversidad genética, con adaptaciones específicas a nichos ecológicos como ambientes clínicos y de lavavajillas. Las cepas de lavavajillas presentan una expansión génica significativa, mientras que otras cepas muestran características evolutivas únicas, sugiriendo especiación en tiempo real y destacando la capacidad de adaptación de la especie.

16-Referencias Capítulo 2

Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., Wang, X., Lippman, Z.B., Schatz, M.C., Soyk, S., 2022. Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. Genome Biol 23, 258. https://doi.org/10.1186/s13059-022-02823-7

Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., Ogata, H., 2020. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. Bioinformatics 36, 2251–2252. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859

Benoit, I., Culleton, H., Zhou, M., DiFalco, M., Aguilar-Osorio, G., Battaglia, E., Bouzid, O., Brouwer, C.P.J.M., El-Bushari, H.B.O., Coutinho, P.M., Gruben, B.S., Hildén, K.S., Houbraken, J., Barboza, L.A.J., Levasseur, A., Majoor, E., Mäkelä, M.R., Narang, H.-M., Trejo-Aguilar, B., van den Brink, J., vanKuyk, P.A., Wiebenga, A., McKie, V., McCleary, B., Tsang, A., Henrissat, B., de Vries, R.P., 2015. Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. Biotechnol Biofuels 8, 107. https://doi.org/10.1186/s13068-015-0285-0

Buchfink, B., Reuter, K., Drost, H.-G., 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. Nat Methods 18, 366–368. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x

Busk, P.K., Pilgaard, B., Lezyk, M.J., Meyer, A.S., Lange, L., 2017. Homology to peptide pattern for annotation of carbohydrate-active enzymes and prediction of function. BMC Bioinformatics 18, 214. https://doi.org/10.1186/s12859-017-1625-9

Carr, E.C., Barton, Q., Grambo, S., Sullivan, M., Renfro, C.M., Kuo, A., Pangilinan, J., Lipzen, A., Keymanesh, K., Savage, E., Barry, K., Grigoriev, I. V, Riekhof, W.R., Harris, S.D., 2023. Characterization of a novel polyextremotolerant fungus, *Exophiala viscosa* , with insights into its melanin regulation and ecological niche. G3: Genes, Genomes, Genetics 13. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad110

Eddy, S.R., 2011. Accelerated Profile HMM Searches. PLoS Comput Biol 7, e1002195. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195

Gostinčar, C., Stajich, J.E., Zupančič, J., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2018a. Genomic evidence for intraspecific hybridization in a clonal and extremely halotolerant yeast. BMC Genomics 19, 364. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4751-5

Gostinčar, C., Zajc, J., Lenassi, M., Plemenitaš, A., de Hoog, S., Al-Hatmi, A.M.S., Gunde-Cimerman, N., 2018b. Fungi between extremotolerance and opportunistic pathogenicity on humans. Fungal Divers 93, 195–213. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0414-8

Gostinčar, C., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2022. No need for speed: slow development of fungi in extreme environments. Fungal Biol Rev 39, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.002

Ide-Pérez, M.R., Fernández-López, M.G., Sánchez-Reyes, A., Leija, A., Batista-García, R.A., Folch-Mallol, J.L., Sánchez-Carbente, M. del R., 2020. Aromatic Hydrocarbon Removal by Novel Extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* Spp. from an Oil Polluted Site in Mexico. Journal of Fungi 6, 135. https://doi.org/10.3390/jof6030135

Ide-Pérez, M.R., Sánchez-Reyes, A., Folch-Mallol, J.L., Sánchez-Carbente, M. del R., 2024. *Exophiala chapopotensis* sp. nov., an extremotolerant black yeast from an oil-polluted soil in Mexico; phylophenetic approach to species hypothesis in the Herpotrichiellaceae family. PLoS One 19, e0297232. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297232

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K., 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. J Mol Biol 428, 726–731. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006

Kirchhoff, L., Olsowski, M., Rath, P.-M., Steinmann, J., 2019. *Exophiala dermatitidis*: Key issues of an opportunistic fungal pathogen. Virulence 10, 984–998. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1596504

Kriventseva, E. V., Tegenfeldt, F., Petty, T.J., Waterhouse, R.M., Simão, F.A., Pozdnyakov, I.A., Ioannidis, P., Zdobnov, E.M., 2015. OrthoDB v8: update of the hierarchical catalog of orthologs and the underlying free software. Nucleic Acids Res 43, D250–D256. https://doi.org/10.1093/nar/gku1220

Kurbessoian, T., Murante, D., Crocker, A., Hogan, D.A., Stajich, J.E., 2023. In host evolution of *Exophiala dermatitidis* in cystic fibrosis lung micro-environment. G3: Genes, Genomes, Genetics 13. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad126

Lavrin, T., Konte, T., Kostanjšek, R., Sitar, S., Sepčič, K., Prpar Mihevc, S., Žagar, E., Županski, V., Lenassi, M., Rogelj, B., Gunde Cimerman, N., 2020. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. Cells 9, 963. https://doi.org/10.3390/cells9040963

Lofgren, L.A., Ross, B.S., Cramer, R.A., Stajich, J.E., 2022. The pan-genome of *Aspergillus fumigatus* provides a high-resolution view of its population structure revealing high levels of lineage-specific diversity driven by recombination. PLoS Biol 20, e3001890. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001890

López-Mondéjar, R., Tláskal, V., da Rocha, U.N., Baldrian, P., 2022. Global Distribution of Carbohydrate Utilization Potential in the Prokaryotic Tree of Life. mSystems 7. https://doi.org/10.1128/msystems.00829-22

Matsumoto, R., Mehjabin, J.J., Noguchi, H., Miyamoto, T., Takasuka, T.E., Hori, C., 2023. Genomic and Secretomic Analyses of the Newly Isolated Fungus *Perenniporia fraxinea* SS3 Identified CAZymes Potentially Related to a Serious Pathogenesis of Hardwood Trees. Appl Environ Microbiol 89. https://doi.org/10.1128/aem.00272-23

McCarthy, C.G.P., Fitzpatrick, D.A., 2019. Pan-genome analyses of model fungal species. Microb Genom 5. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000243

Metin, B., Döğen, A., Yıldırım, E., de Hoog, G.S., Heitman, J., Ilkit, M., 2019. Mating type (MAT) locus and possible sexuality of the opportunistic pathogen *Exophiala dermatitidis*. Fungal Genetics and Biology 124, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.12.011

Moreno, L.F., Mayer, V., Voglmayr, H., Blatrix, R., Benjamin Stielow, J., Teixeira, M.M., Vicente, V.A., de Hoog, S., 2019. Genomic analysis of ant domatia-associated melanized fungi (Chaetothyriales, Ascomycota). Mycol Prog 18, 541–552. https://doi.org/10.1007/s11557-018-01467-x

Pasko M. T., Stephen C. Piscitelli, Andrea D. Van Slooten, 1990. Fluconazole: A New Triazole Antifungal Agent. DICP 24, 860–867.

Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Sybren de Hoog, G., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev 30, 109–130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A., 2020. Using SPAdes De Novo Assembler. Curr Protoc Bioinformatics 70. https://doi.org/10.1002/cpbi.102

R Core Team, 2022. R version 4.2. 2. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rafiei, V., Vélëz, H., Tzelepis, G., 2021. The Role of Glycoside Hydrolases in Phytopathogenic Fungi and Oomycetes Virulence. Int J Mol Sci 22, 9359. https://doi.org/10.3390/ijms22179359

Rene, E.R., Bernat, P., Długoński, J., Veiga, M.C., Kennes, C., 2012. Use of Styrene as Sole Carbon Source by the Fungus *Exophiala oligosperma*: Optimization and Modeling of Biodegradation, Pathway Elucidation, and Cell Membrane Composition. Appl Biochem Biotechnol 168, 1351–1371. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9862-x

Reyre, J.-L., Grisel, S., Haon, M., Navarro, D., Ropartz, D., Le Gall, S., Record, E., Sciara, G., Tranquet, O., Berrin, J.-G., Bissaro, B., 2022. The Maize Pathogen Ustilago maydis Secretes Glycoside Hydrolases and Carbohydrate Oxidases Directed toward Components of the Fungal Cell Wall. Appl Environ Microbiol 88. https://doi.org/10.1128/aem.01581-22

Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31, 3210–3212. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351

Smit, A., Hubley, R., Grenn, P., 2015. RepeatMasker Open-4.0.

Song, Y., da Silva, N.M., Weiss, V.A., Vu, D., Moreno, L.F., Vicente, V.A., Li, R., de Hoog, G.S., 2020a. Comparative Genomic Analysis of Capsule-Producing Black Yeasts *Exophiala dermatitidis* and *Exophiala spinifera*, Potential Agents of Disseminated Mycoses. Front Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00586

Song, Y., Du, M., Menezes da Silva, N., Yang, E., Vicente, V.A., Sybren de Hoog, G., Li, R., 2020b. Comparative Analysis of Clinical and Environmental Strains of *Exophiala spinifera* by Long-Reads Sequencing and RNAseq Reveal Adaptive Strategies. Front Microbiol 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01880

Song, Y., Laureijssen-van de Sande, W.W.J., Moreno, L.F., Gerrits van den Ende, B., Li, R., de Hoog, S., 2017. Comparative Ecology of Capsular Exophiala Species Causing Disseminated Infection in Humans. Front Microbiol 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02514

Stanke, M., Morgenstern, B., 2005. AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. Nucleic Acids Res 33, W465–W467. https://doi.org/10.1093/nar/gki458

Thitla, T., Kumla, J., Khuna, S., Lumyong, S., Suwannarach, N., 2022. Species Diversity, Distribution, and Phylogeny of *Exophiala* with the Addition of Four New Species from Thailand. Journal of Fungi 8, 766. https://doi.org/10.3390/jof8080766

Yu G., 2012. Statistical analysis and visualization of functional profiles for genes and gene clusters. J. Integr. Biol 16, 284–287.

Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N., 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol 115, 997–1007. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007

Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P.K., Xu, Y., Yin, Y., 2018. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res 46, W95–W101. https://doi.org/10.1093/nar/gky418

Zupančič, J., Novak Babič, M., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. PLoS One 11, e0148166. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148166

Capítulo 3: Metabolismo en presencia de compuestos aromáticos

17-Introducción Capítulo 3

Los neurotransmisores monoaromáticos de catecolamina presentes en el cerebro como la dopamina, se acumulan y polimerizan para formar el característico pigmento negro de neuromelanina también llamado *substantia nigra* (Bahena-Trujillo1 et al., 2000). Este neurotransmisor es catabolizado en el cerebro en dos pasos principales que involucran a las enzimas monoaminooxidasas y catecol-*orto*-metiltransferasas. Estas reacciones conducen a la formación de ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido homovanílico. Que también son intermediarios en la degradación de la lignina. De forma similar el ácido vaníllico es un producto intermediario de la descomposición de la lignina y se ha detectado en el cerebro humano y el fluído cerebro espinal, (figura 14), (Prenafeta-Boldú et al., 2019, 2006).

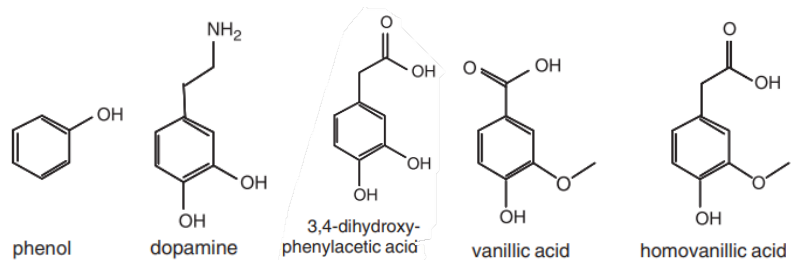


Figura 14. Estructura química de la dopamina, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido homovanílico y el ácido vanílico. Tomado de (Prenafeta-Boldú et al., 2006).

Varios neurotransmisores son un excelente sustrato para el crecimiento de *E. dermatitidis* EXF-10123 (Lavrin et al., 2020). Esto es sumamente importante ya que se conoce que los neurotransmisores monoaromáticos y aminoalcoholes alifáticos presentes en el sistema nervioso central (SNC) pueden ser utilizados como sustratos potenciales para hongos neurotrópicos (Lavrin et al., 2020). Además, se especula que estos hongos capaces de colonizar el tejido cerebral podrían disminuir los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) lo que conlleva a una disminución progresiva de la transmisión colinérgica, una de las características típicas asociadas al Alzheimer (Lavrin et al., 2020).

Los hongos lignolíticos han sido estudiados debido a su capacidad de degradar hidrocarburos (Batista-García et al., 2014). Esta capacidad se debe a que producto de la estructura irregular de la lignina, estos hongos producen enzimas extracelulares con una baja especificidad hacia su sustrato, lo que las hace adecuadas para degradar una amplia variedad de compuestos (Peidro-Guzmán et al., 2020).

Algunos estudios sugieren que en hongos la capacidad de asimilar compuestos fenólicos e hidrocarburos representa un factor importante de virulencia que favorece las infecciones en el SNC (Černoša et al., 2021; Lavrin et al., 2020). La competencia entre hongos para crecer en el tejido cerebral viene dada por el vínculo entre el neurotropismo y la asimilación de compuestos aromáticos como hidrocarburos y sustratos fenólicos (Lavrin et al., 2020). Esto se debe a que muchos hongos degradadores de compuestos aromáticos presentan adaptaciones que les permiten crecer en condiciones extremas, como los ambientes contaminados de forma artificial con alquibencenos. Estas mismas adaptaciones permiten colonizar otros ambientes como el cuerpo humano, colonizando incluso el tejido cerebral. En términos de estructura química, muchos componentes cerebrales son similares o iguales a algunos intermediarios de la degradación de alquibencenos y de la lignina. Un ejemplo de esto son compuestos fenólicos como el fenol y el 1,2,4-bencenotriol, con estructuras químicas similares a los neurotransmisores de catecolaminas como la dopamina (Gostinčar et al., 2011; Prenafeta-Boldú et al., 2006).

Especies del género *Exophiala* se han aislado de sitios contaminados con compuestos aromáticos y en muchos casos se ha comprobado su capacidad de asimilar estos compuestos (Isola et al., 2021; Prenafeta-Boldú et al., 2005; Zhang et al., 2019). Por ejemplo, *E. xenobiotica*, aislada de sitios contaminados con hidrocarburos, ha demostrado una capacidad única para asimilar diésel y gasolina (tanques de automóviles, dispensadores de combustible y surtidores de gasolina) como fuentes de carbono (Isola et al., 2021). De manera similar, *E. jeanselmei*, *E. lecanii-corni* y *E. oligosperma* han sido aisladas de sistemas de filtración de aire diseñados para tratar gases contaminados con hidrocarburos, lo que resalta su potencial para degradar contaminantes volátiles (Prenafeta-Boldú et al., 2005). Además, *E. macquariensis* sp. nov. también ha sido identificada en suelos subantárticos contaminados con tolueno (Zhang et al., 2019). Adicionalmente, en la cepa *E. dermatitidis* EXF-10123 se ha observado la capacidad de asimilar tolueno volátil y otros hidrocarburos aromáticos o fenólicos como únicas fuentes de carbono (Lavrin et al., 2020).

En este capítulo, se caracterizó el metabolismo de *E. dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como únicas fuentes de carbono, abordando su capacidad de crecimiento, los cambios en su estructura celular y su perfil metabólico en estas condiciones. Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre la adaptación de esta cepa a compuestos aromáticos tóxicos, destacando su potencial para metabolizar estos sustratos y su respuesta mitocondrial específica. Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos involucrados en la degradación de compuestos aromáticos, con implicaciones tanto en su ecología como en su posible aplicación biotecnológica.

18-Metodología Capítulo 3

18.1- Caracterización de la curva de crecimiento de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

El ensayo del metaboloma de la cepa EXF-10123 se seleccionó en el tiempo correspondiente a la mitad de la fase de crecimiento exponencial. La obtención de las muestras de cada condición se realizó a partir de su crecimiento en medio mínimo a pH 7, a 37 ◦C, a 150 rpm y DO_{600nm} = 0.5. Utilizando 30 ml de medio mínimo suplementado con dopamina (0.01 M) y/o 1,2,4-bencenotriol (0.01 M). Se utilizaron controles negativos sin inocular para cada condición. Se utilizó un control con MM (Anexo 3) + glucosa (20%) como única fuente de carbono y otro control con medio de cultivo MEB (Anexo 2). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las mediciones se realizaron cada tres horas durante siete días hasta obtener una curva de crecimiento.

18.2- Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

Se observaron las muestras en las mismas condiciones previamente descritas previamente para caracterizar la curva de crecimiento. Cada muestra se montó en un portaobjetos de vidrio y se observó mediante un CLSM (Carl Zeiss, LSM800, Alemania) acoplado a una AxioCam HD color (Carl Zeiss, Modelo 305, Alemania). Se utilizó el software ZEN (Zeiss efficient navigation) versión 2.6 Blue edition. Se adquirieron las micrografías con objetivo apocromático de 5X, 10X, 20X y 40X, apertura numérica de 0.4, 0.8 y 1.3 respectivamente (valores adimensionales), todas se almacenaron en formato TIFF con una resolución de 2048 × 2048 píxeles. Todas las imágenes fueron tomadas a tercer día de cultivo.

Adicionalmente, el crecimiento de los cultivos suplementado con 0.01 M de dopamina y 0.01 M de 1,2,4-bencenotriol se monitoreó utilizando un microscopio de contraste de fases (AmScope T720) with an Apo100×/1.25 N.A. objetivo (AmScope, Irvine, CA, USA). La adquisición de datos se realizó utilizando la cámara de AmScope MU1000 para todas las observaciones. Todas las imágenes fueron tomadas a séptimo día de cultivo.

18.3- Análisis de los metabolomas de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-becenotriol como única fuente de carbono.

La cuantificación de dopamina y el 1,2,4-bencenotriol en el sobrenadante del medio de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente se realizó utilizando un sistema HPLC Agilent 1200 (Waldbronn, Alemania), equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD; 190–700 nm) y una columna Synergy Fusion RP C18 (4 µm, 4.6 × 150 mm; Phenomenex®, Madrid, España). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 25 °C. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µL, y la elución se llevó a cabo con una fase móvil compuesta por 0.1% de ácido fosfórico en agua (A) y acetonitrilo (B), utilizando un método isocrático con 5% de B y un flujo de 1 mL min−1. Los picos se detectaron a una longitud de onda de 280 nm, correspondiendo a dopamina a los 2.17 minutos y a 1,2,4-bencenotriol a los 3.9 minutos. Las concentraciones se determinaron como porcentajes mediante una curva de calibración construida con estándares puros.

Para la extracción de metabolitos intracelulares, las células de levadura se resuspendieron en 3 mL de agua de calidad MS hasta lograr una homogenización completa, seguida de sonicación durante 10 minutos. Para la disrupción de las paredes celulares y membranas citoplasmáticas, se emplearon tubos Lysis Matrix E (MP Biomedicals™, California, EE. UU., Catálogo 116914050-CF) y un homogenizador FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™, California, EE. UU.). Posteriormente, se mezclaron 2 mL de las muestras celulares lisadas con 10 mL de acetona de calidad MS

durante 20 minutos. Tras ajustar el pH a 2.0 (usando HCl 1 N), las muestras se sonicaron durante 10 minutos y se centrifugaron a 14,000 g durante 10 minutos. La eliminación del solvente se realizó utilizando un evaporador rotatorio, y las muestras se recolectaron según lo descrito previamente, empleando 1 mL de metanol.

Los metabolitos fueron analizados utilizando un sistema Agilent UHPLC 1260 Infinity II acoplado a un sistema Agilent 6530 Q-TOF/MS equipado con ionización por electrospray (ESI) (Agilent, EE. UU.). La columna utilizada para la separación cromatográfica fue una InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (diámetro interno de 3 mm x longitud de 150 mm, 2.7 µm, Agilent, EE. UU.). Los tampones utilizados fueron A: agua con 0.1% de ácido fórmico y B: acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico. El volumen de inyección fue de 10 µL, y la tasa de flujo de elución se configuró en 300 µL/min (0 min = 0 %B, 14 min = 100 %B, 15 min = 100 %B, 15.1 min = 0 %B, 17 min = 0 %B).

Para la espectrometría de masas, se utilizaron los siguientes parámetros: voltaje del capilar: 4000 V, voltaje del fragmentador: 200 V, temperatura del gas de secado (N2): 325 °C, flujo del gas de secado: 10 L/min, presión del nebulizador: 20 psi. El instrumento fue calibrado en modo ESI positivo y negativo con valores de m/z en el rango de 100–1700 en modo de alta resolución. El análisis de los metabolitos, los valores de m/z y el cálculo del error, así como el control del equipo, se realizaron utilizando el software Mass Hunter Qualitative Analysis (versión 10.0, Agilent, EE. UU.).

18.4- Caracterización de la utilización mitocondrial de sustratos por *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 mediante MitoPlate™ S-1 de Biolog crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo recomendado para la caracterización mitocondrial por MitoPlate™ S-1 de Biolog. Se preparó previamente 2x Biolog MAS (Mitochondrial Assay Solution, Biolog cat# 72303), 6x Redox Dye MC (Biolog cat# 74353) y 24x de saponina (e.g. 720ug/ml for 30ug/ml; 2400ug/ml for 100ug/ml) en agua estéril. La suspensión celular de *E. dermatitidis* se preparó a 2X de células en 1X de Biolog MAS, para una densidad final de 20 000 células por pocillo. Adicionalmente, se añadieron soluciones de 1,2,4-bencenotriol y dopamina para una concentración final de 0.01 M en cada pocillo. Se utilizó como control la solución sin añadir ningún compuesto adicional (1,2,4-bencenotriol y dopamina). Primeramente, 30 ul del Assay Mix (Tabla IV) se añadieron en cada pocillo y se incubó durante una hora a 37 °C para lograr la completa disolución del sustrato. Posteriormente, 30 ul de la suspensión celular previamente preparada se añadió a cada pocillo. Finalmente, se realizó una cinética de crecimiento durante seis horas a una DO_{595nm} utilizando un lector de microplacas. MitoPlate presenta triplicados de 31 sustratos (de la fila A-B citoplasmáticos y de la fila C-H mitocondriales) secados y colocados en los pocillos. Los resultados fueron analizados y graficados en Rstudio, a los cuales se les calculó el promedio y la desviación estándar (Figura 15).

A1 **No Substrate**	**A2** **α-D-Glucose**	**A3** **Glycogen**	**A4** **D-Glucose-1-PO4**	**A5** **No Substrate**	**A6** **α-D-Glucose**	**A7** **Glycogen**	**A8** **D-Glucose-1-PO4**	**A9** **No Substrate**	**A10** **α-D-Glucose**	**A11** **Glycogen**	**A12** **D-Glucose-1-PO4**
B1 **D-Glucose-6-PO4**	**B2** **D-Gluconate-6-PO4**	**B3** **D,L-α-Glycerol-PO4**	**B4** **L-Lactic Acid**	**B5** **D-Glucose-6-PO4**	**B6** **D-Gluconate-6-PO4**	**B7** **D,L-α-Glycerol-PO4**	**B8** **L-Lactic Acid**	**B9** **D-Glucose-6-PO4**	**B10** **D-Gluconate-6-PO4**	**B11** **D,L-α-Glycerol-PO4**	**B12** **L-Lactic Acid**
C1 **Pyruvic Acid**	**C2** **Citric Acid**	**C3** **D,L-Isocitric Acid**	**C4** **cis-Aconitic Acid**	**C5** **Pyruvic Acid**	**C6** **Citric Acid**	**C7** **D,L-Isocitric Acid**	**C8** **cis-Aconitic Acid**	**C9** **Pyruvic Acid**	**C10** **Citric Acid**	**C11** **D,L-Isocitric Acid**	**C12** **cis-Aconitic Acid**
D1 **α-Keto-Glutaric Acid**	**D2** **Succinic Acid**	**D3** **Fumaric Acid**	**D4** **L-Malic Acid**	**D5** **α-Keto-Glutaric Acid**	**D6** **Succinic Acid**	**D7** **Fumaric Acid**	**D8** **L-Malic Acid**	**D9** **α-Keto-Glutaric Acid**	**D10** **Succinic Acid**	**D11** **Fumaric Acid**	**D12** **L-Malic Acid**
E1 **α-Keto-Butyric Acid**	**E2** **D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid**	**E3** **L-Glutamic Acid**	**E4** **L-Glutamine**	**E5** **α-Keto-Butyric Acid**	**E6** **D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid**	**E7** **L-Glutamic Acid**	**E8** **L-Glutamine**	**E9** **α-Keto-Butryric Acid**	**E10** **D,L-β-Hydroxy-Butyric Acid**	**E11** **L-Glutamic Acid**	**E12** **L-Glutamine**
F1 **Ala-Gln**	**F2** **L-Serine**	**F3** **L-Ornithine**	**F4** **Tryptamine**	**F5** **Ala-Gln**	**F6** **L-Serine**	**F7** **L-Ornithine**	**F8** **Tryptamine**	**F9** **Ala-Gln**	**F10** **L-Serine**	**F11** **L-Ornithine**	**F12** **Tryptamine**
G1 **L-Malic Acid 100uM**	**G2** **Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G3** **Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G4** **Palmitoyl-D,L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G5** **L-Malic Acid 100uM**	**G6** **Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G7** **Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G8** **Palmitoyl-D,L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G9** **L-Malic Acid 100uM**	**G10** **Acetyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G11** **Octanoyl-L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**	**G12** **Palmitoyl-D,L-Carnitine + L-Malic Acid 100uM**
H1 **Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H2** **γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H3** **α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H4** **L-Leucine + L-Malic Acid 100uM**	**H5** **Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H6** **γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H7** **α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H8** **L-Leucine + L-Malic Acid 100uM**	**H9** **Pyruvic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H10** **γ-Amino-Butyric Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H11** **α-Keto-Isocaproic Acid + L-Malic Acid 100uM**	**H12** **L-Leucine + L-Malic Acid 100uM**

Figura 15. Fuentes de carbono en la microplaca MitoPlateTM S-1 de Biolog

Tabla IV. Assay Mix recomendado por MitoPlate™ S-1 de Biolog

Assay Mix:		Volumes per well	Volumes per plate	1.4x extra for pipetting
Combine	2x Biolog MAS	15ul	1500ul	2100ul
	6x Redox Dye MC	10ul	1000ul	1400ul
	24x saponin	2.5ul	250ul	350ul
	sterile water	2.5ul	250ul	350ul
Add to wells	TOTAL	30ul	3000ul	4200ul

19-Resultados Capítulo 3

19.1- Caracterización de la curva de crecimiento de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

La gráfica de la curva de crecimiento de *E. dermatitidis* EXF-10123 (Figura 16) mostró un carácter exponencial entre los días uno y cinco de cultivo cuando la dopamina es la única fuente de carbono y entre los días dos y cuatro cuando el 1,2,4-bencenotriol es la única fuente de carbono, lo cual se comprobó mediante un ajuste a una curva exponencial en los intervalos de tiempo mostrados en la tabla V, siendo estas regiones las que mejor se ajustan a este tipo de comportamiento. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó para la extracción de metabolitos y futuros análisis el día tres del cultivo, correspondiente a la mitad de la fase exponencial del crecimiento. 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 utilización de los compuestos dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

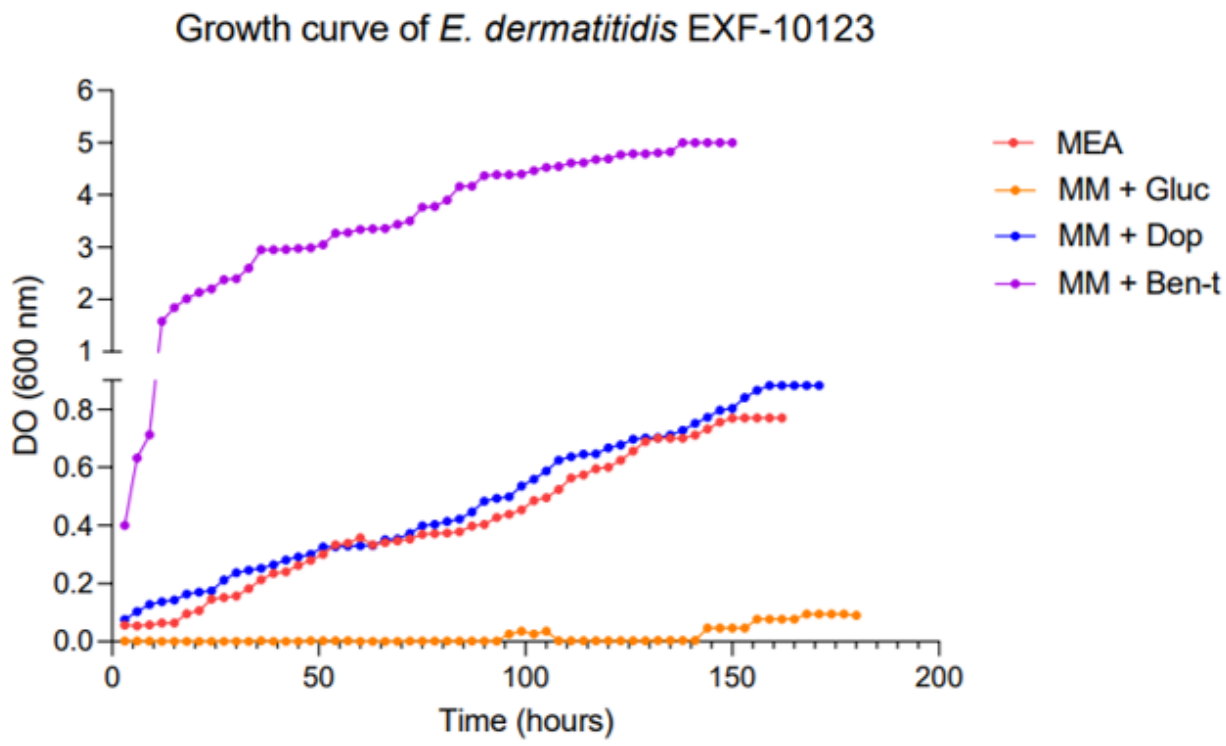


Figura 16. Curvas de crecimiento de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 cultivadas en medio de cultivo MEA, en medio mínimo más glucosa (MM + Gluc), en medio mínimo más dopamina (MM + Dop) y en medio mínimo más 1,3,4-bencenotriol (Ben-t). Ver medios de cultivo en Anexos.

Tabla V. Intervalos en días de los valores de absorbancia a DO_{600nm} de los cultivos de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 crecida en medio mínimo (MM) con dopamina (Dop) y 1,2,4-bencenotriol (BT) como única fuente de carbono. 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.

Intervalos (días)	R^2 -MM + Dop	R^2 -MM+ BT
1-2	0.9173	0.8248
1-3	0.909	0.8855
1-4	0.9732	0.9661
1-5	0.9878	0.9525
1-6	0.9745	0.9268
1-7	0.9666	0.7989

2-3	0.8668	0.8774
2-4	0.9659	0.9681
2-5	0.9842	0.9408
2-6	0.9683	0.9166
2-7	0.9647	0.9081
3-4	0.9618	0.9293
3-5	0.9791	0.8721
3-6	0.948	0.8909
3-7	0.9568	0.882
4-5	0.9156	0.9755
4-6	0.93	0.9721
4-7	0.9651	0.9671
5-6	0.9407	0.8634
5-7	0.9652	0.8634
6-7	0.8115	0.7811

19.2- Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) de la cepa *Exophiala dermatititids* EXF-10123 crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

Se analizaron las microfotografías obtenidas mediante CLSM, para identificar diferencias morfológicas en la cepa *E. dermatitidis* EXF-10123, cultivada en medio MEB (Anexo 2) (control), MM suplementado con 0.01 M de dopamina y MM con 0.01 M de 1,2,4-bencenotriol (Anexo 3) (Figura 17). Los resultados indican que las variaciones observadas en presencia de estos tratamientos se relacionan principalmente con la abundancia celular, más que con cambios significativos en la morfología de las pseudohifas y células levaduriformes. La formación de pseudohifas es escasa en presencia de dopamina a 37 °C y de 1,2,4-bencenotriol a 28 °C y 37 °C. A 28 °C se observan racimos y pseudohifas en presencia de dopamina. Mientras que a 28 °C en medio sólido se observa una mayor formación de pseudohifas en el control, seguido de en presencia de 1,2,4-bencenotriol.

Las imágenes obtenidas mediante el microscopio de contraste de fases muestran que en medio líquido a 28 °C tanto en el control como en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol se forman pseudohifas y racimos celulares. Sin embargo, en la condición control se observa una mayor densidad celular en comparación con los tratamientos (Figura 17).

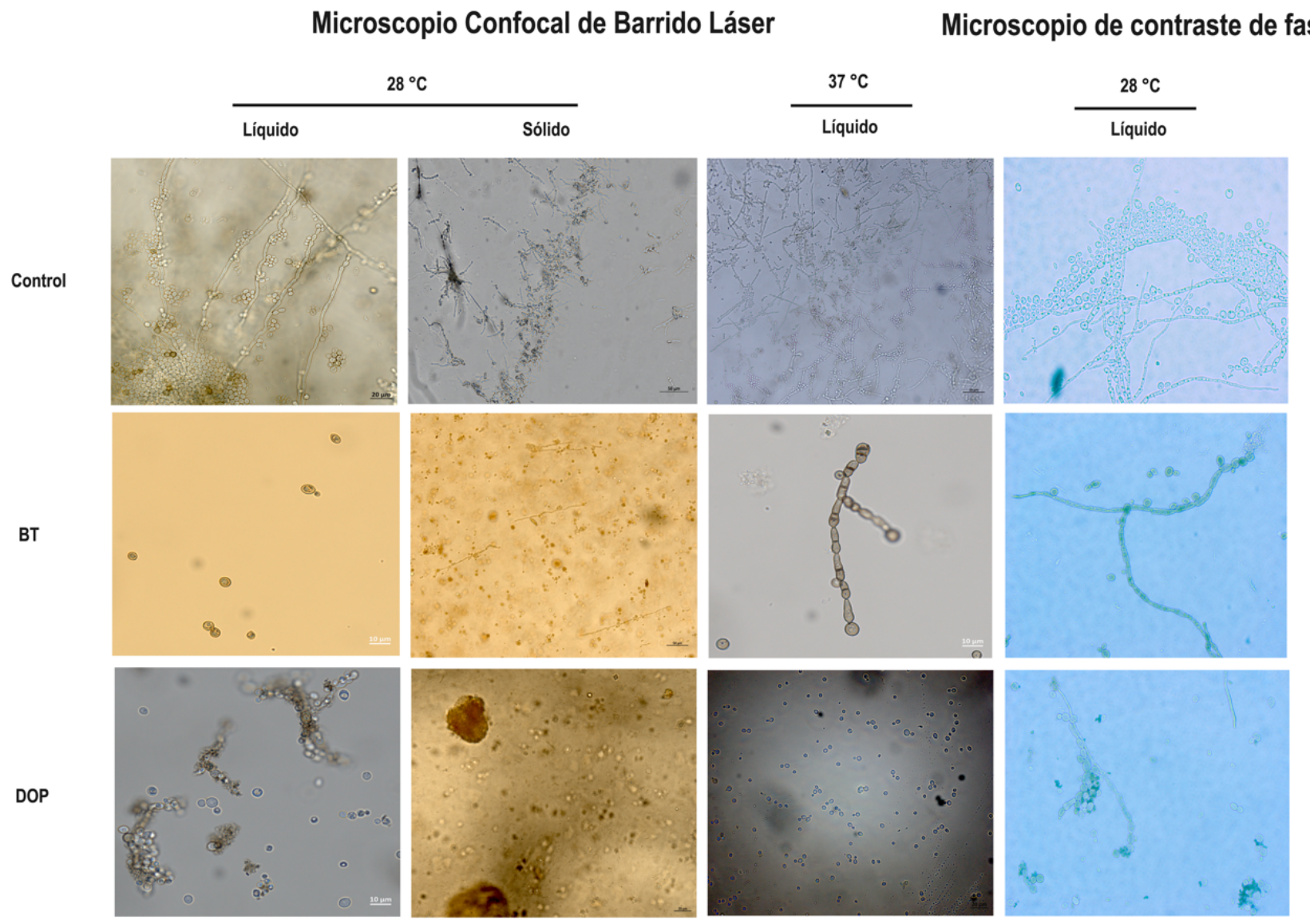


Figura 17. Imágenes de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 obtenidas mediante Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM) y Microscopía de Contraste de Fases. Las microfotografías muestran la cepa cultivada en medio mínimo líquido (MM) con 0.01 M de dopamina o 0.01 M de 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono, así como en medio MEB como control, a temperaturas de 28 °C y 37 °C. También se incluyen imágenes de cultivos en medio sólido (MEA) bajo las mismas condiciones a 28 °C. Las imágenes con microscopio de contraste de fases corresponden a cultivos en medio mínimo líquido (MM) con dopamina, 1,2,4-bencenotriol y MEB como control, a 28 °C. Todas las muestras fueron tomadas al tercer día de cultivo. Ver medios de cultivo en Anexos.

19.3- Análisis de los metabolomas de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 en presencia de dopamina y 1,2,4-becenotriol como única fuente de carbono.

El análisis de los metabolomas de *E. dermatitidis* EXF-10123 permitió identificar y cuantificar el metabolismo de la dopamina y 1,2,4-bencenotriol basándose en su tiempo de retención y la intensidad de absorción a 280 nm, utilizando una curva de calibración como referencia, lo que nos da una medida de la manera en la que estos compuestos son utilizados.

Como se observa en la Tabla VI ni el 1,2,4-bencenotriol ni la dopamina fueron detectados en el medio ni en las células cultivadas en medio MEB (Anexo 2). Esto sugiere que estos compuestos no están presentes o no se sintetizan/metabolizan en estas condiciones. En cuanto al crecimiento en presencia de dopamina en las muestras del sobrenadante y de la biomasa no se detectó la presencia de 1,2,4-bencenotriol. Dado que el tratamiento con 1,2,4-bencenotriol fue independiente del tratamiento con dopamina, no se espera su detección en esta última condición. Una concentración muy alta (3812 mg/L) de dopamina se detectó en el tratamiento suplementado con dopamina (0.01 M). La alta concentración extracelular podría corresponder parcialmente a la dopamina añadida como suplemento, pero al ser más del doble de lo esperado, no se puede asegurar que provenga exclusivamente de la fuente externa. Esto sugiere como posibilidad adicional que *E. dermatitidis* podría sintetizar dopamina de manera endógena, posiblemente a partir de precursores como la tirosina, en rutas asociadas a la biosíntesis de melanina. Se detectó dopamina intracelular (54.8 mg/L ± 2.8), lo que indica que las células son capaces de absorber dopamina del medio. Además, el

crecimiento observado en este tratamiento indica que *E. dermatitidis* no solo tolera dopamina, sino que posiblemente es capaz de metabolizarla. Esto sería consistente con su capacidad para utilizar compuestos aromáticos complejos como fuente de carbono y con su estilo de vida poliextremotolerante. Estos hallazgos sugieren una interacción compleja entre la dopamina exógena y el metabolismo fúngico, por lo que se requieren estudios adicionales para confirmar si *E. dermatitidis* es capaz de sintetizar dopamina *de novo* o si existen rutas metabólicas activas para su transformación o acumulación intracelular.

El 1,2,4-bencenotriol inicialmente suplementado (0.01M) podría haber sido completamente metabolizado debido a que no fue detectado ni en el sobrenadante ni en la biomasa. En este caso, es posible que las células hayan procesado el compuesto y lo hayan convertido en productos de metabolismo que no son detectados en las condiciones experimentales, es decir, los productos secundarios generados no fueron analizados o no se acumularon en cantidades detectables. Si estos compuestos fueron completamente metabolizados, eso indica que la cepa EXF-10123 utilizada tiene las rutas metabólicas necesarias para descomponer estos compuestos, pero los productos finales podrían no ser los analizados en este ensayo. Esto podría ocurrir si los metabolitos finales no son fácilmente detectables por el sistema analítico utilizado (por ejemplo, si se generan productos volátiles o de bajo peso molecular que no son captados por el método de análisis).

Tabla VI. Resultados del análisis metabolómico de *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 en presencia de los compuestos, 1,2,4-bencenotriol y dopamina, medidos en diferentes condiciones experimentales. Controles: MEB Sobrenadante y MEB Biomasa, Medio MEB (Anexo I). Condiciones: MM+DOP Sobrenadante, MM+DOP Biomasa, MM+BT Sobrenadante y MM+BT Biomasa. Medio mínimo (MM, Anexo I). DOP = dopamina, BT = 1,2,4-bencenotriol y n.d = no detectado.

CONDICIONES	1,2,4-BENCENOTRIOL (mg/L)	DOPAMINA (mg/L)
MEB SOBRENADANTE	n.d.	n.d.
MEB BIOMASA	n.d.	n.d.
MM+DOP SOBRENADANTE	n.d.	3812±0
MM+DOP BIOMASA	n.d.	54.8±2.8
MM+BT SOBRENADANTE	n.d.	n.d.
MM+BT BIOMASA	n.d.	n.d.

Los picos se detectaron a una longitud de onda de 280 nm, correspondiendo a dopamina a los 2.17 minutos y a 1,2,4-bencenotriol a los 3.9 minutos. Las concentraciones se determinaron como porcentajes mediante una curva de calibración construida con estándares puros (Figura 18).

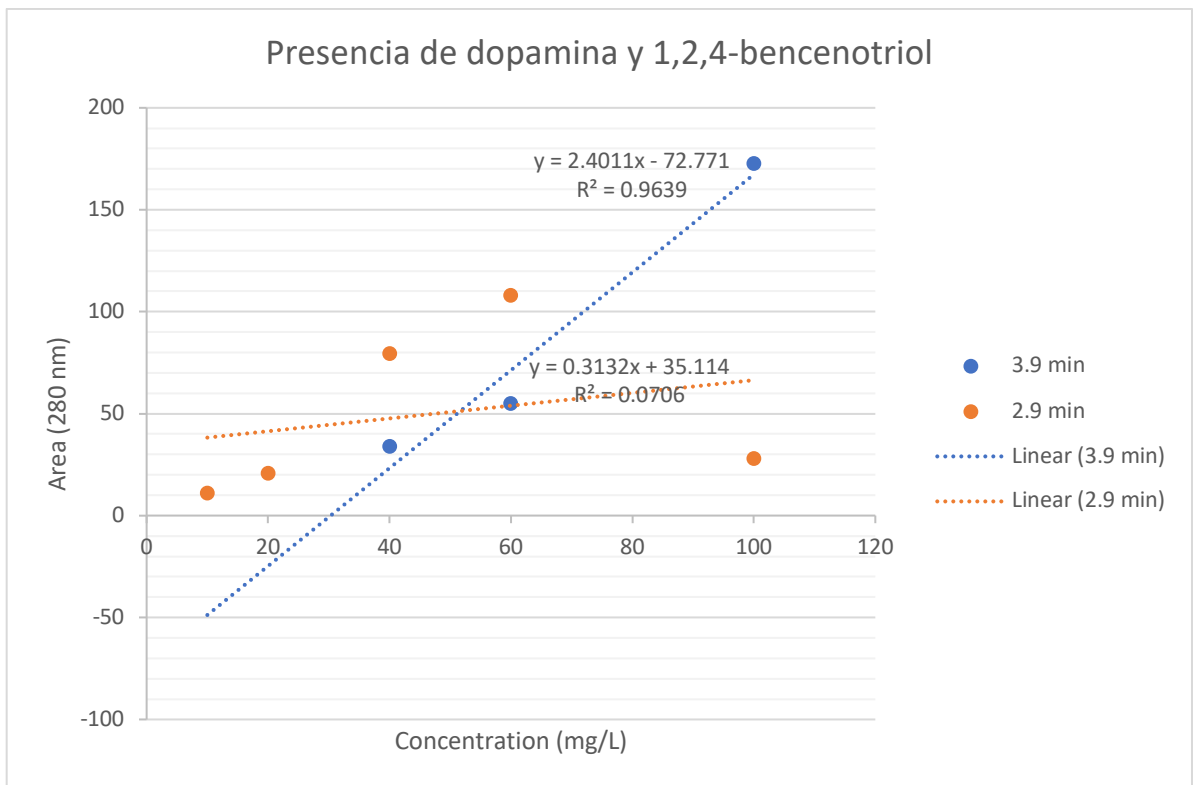
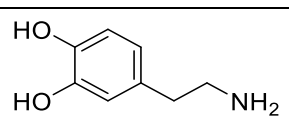
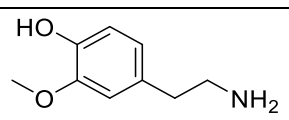
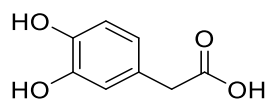
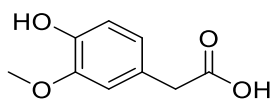
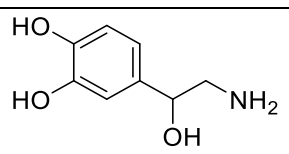
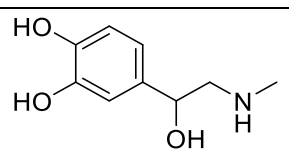
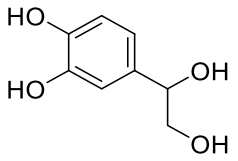
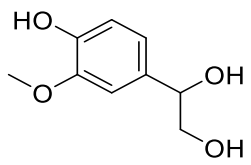
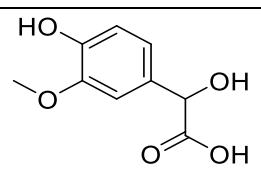
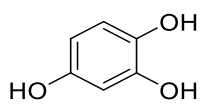
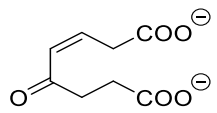
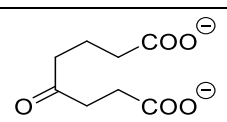
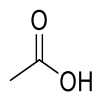
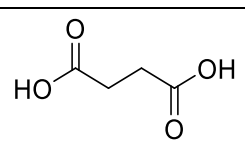


Figura 18. Cuantificación de la presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol de la cepa EXF-10123 de *Exophiala dermatitidis*.

En el presente ensayo, se analizaron los metabolitos derivados de la biotransformación de dopamina y 1,2,4-bencenotriol en diferentes condiciones experimentales utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (UHPLC-MS). Los resultados revelaron la presencia de varios metabolitos en las muestras tratadas, con particular énfasis en la dopamina. En las muestras tratadas con dopamina (MM+DOP sobrenadante y MM+DOP biomasa) (Tabla VII), se detectaron intensamente los metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido homovanílico, con áreas relativas de 18800 (80.86%) y 66962 (90.38%) respectivamente en el sobrenadante y 49301 (92.82%) en la fracción extracelular. Estos metabolitos son productos típicos de la biotransformación de dopamina, lo que sugiere que la dopamina fue convertida en dichos compuestos en las condiciones experimentales. Por otro lado, el compuesto 1,2,4-bencenotriol no fue detectado en ninguna de las fracciones de las muestras tratadas con este compuesto, lo que sugiere que, en estas condiciones, no se produjo su acumulación intracelular ni su metabolización, o que fue completamente metabolizado y transformado en otros compuestos no detectados por los métodos utilizados. En cuanto a los metabolitos secundarios, se detectaron ácidos como el ácido acético y ácido succínico en varias muestras, lo que indica que estos compuestos podrían estar involucrados en rutas metabólicas comunes, posiblemente relacionadas con la producción de energía o como subproductos de la biotransformación de los compuestos iniciales. Estos resultados proporcionan información clave sobre el metabolismo de dopamina y 1,2,4-bencenotriol bajo las condiciones experimentales planteadas, sugiriendo diferentes rutas de transformación para cada compuesto.

Table VII. Metabolitos producidos por EXF-10123 de *Exophiala dermatitidis* producto de la biotransformación en las diferentes muestras con (puntuación) y área. m/z (relación masa/carga). RT (Tiempo de Retención). Valor en el paréntesis: Los valores entre paréntesis representan el área (en unidades relacionadas con la respuesta del detector, como mV o unidades de área relativa) detectada para cada compuesto en la muestra correspondiente. Condiciones: MM+DOP Sobrenadante, MM+DOP Biomasa, MM+BT Sobrenadante y MM+BT Biomasa. Medio mínimo (MM, Anexo I). DOP = dopamina, BT = 1,2,4-bencenotriol. MEA S (Medio MEA + Sobrenadante); MEA B (Medio MEA + Biomasa). Medio MEA (Anexo I).

Compuestos	**Estructura**	**Composición elemental**	**m/z**	**RT**	**Ion**	**Condiciones**					
						MEA S	MEA B	DOP S	DOP B	BT S	BT B
Dopamina		C8H11NO2	153.08	5.15	-			(97.18) 20769	(97.55) 15493		

3-metoxitiramina		C9H13NO2	167.21								
ácido 3,4-dihidroxifenilacético		C8H8O4	168.04	5.99	-			(67.45) 18800	(80.86) 81135	(81.59) 68479	(92.82) 49301
ácido homovanílico		C9H10O4	182.06	6.97	-			(84.53) 66962	(90.38) 28007	(97.05) 13817	
norepinefrina		C8H11NO3	169.07	2.504	-			(98.79) 60492			
epinefrina		C9H13NO3	183.09	4.97	-			(72.92) 84627	(64.42) 48320		
dihidroxifenilglicol		C8H10O4	170.06								
3-metoxi-4-hidroxifenilglicol		C9H12O4	184.07	5.33	-			(64.62) 20251			
ácido vainillín-mándelico		C9H10O5	198.05	5.56	-			(53.95) 10249			(72.35) 56996
1,2,4-bencenotriol		C6H6O3	126.03	7.07	-			(76.88) 21032		(99.3) 14514	(92.51) 25636
(Z)-5-oxo-oct-3-enedioato		C8H8O5-2	184.04	6.44	-			(71.92) 24183		(85.87) 52923	
4-oxo-octanedioato		C8H10O5-2	186.16	2.36	-			(71.07) 14564	(82.1) 66945		
ácido acético		C2H4O2	60.02	7.462	-			(71.03) 38414		(68.62) 46311	(81.55) 33313
Ácido succínico		C4H6O4	118.03	4.91	-			(84.53) 72529		(86.32) 12199	

19.4- Caracterización de la utilización mitocondrial de sustratos por *Exophiala dermatitidis* EXF-10123 mediante MitoPlate™ S-1 de Biolog crecida en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol como única fuente de carbono.

La utilización de sustratos por las mitocondrias se evaluó mediante la matriz metabólica fenotípica MitoPlate™ S-1 de Biolog (Figura 15). Esta tecnología innovadora permitió medir las tasas de producción de NADH y $FADH_2$ a partir de 31 sustratos energéticos mitocondriales por la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis* en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol. Los sustratos fueron clasificados en citoplasmáticos, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), otros sustratos mitocondriales y sustratos combinados con 100 µM de ácido L-málico. Las curvas de crecimiento pueden observarse en los Anexos Figura B. Los resultados indicaron que ni el tratamiento con 0.01 M de dopamina

ni el control mostraron un aumento significativo en la utilización de la mayoría de los sustratos evaluados (Figura 19). En contraste, el tratamiento con 1,2,4-bencenotriol indujo un incremento significativo en la absorbancia a lo largo del tiempo, lo que sugiere una mayor actividad metabólica en respuesta a este compuesto (Figura 19A) (Anexo: Figura B).

Como se observa en la Figura 19B, la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis* exhibió su mayor velocidad de crecimiento en presencia de 1,2,4-bencenotriol, independientemente del grupo de sustratos mitocondriales evaluados. En contraste, en presencia de los sustratos citoplasmáticos, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre el control y el tratamiento con dopamina, lo que sugiere que la dopamina no afecta significativamente el metabolismo energético mitocondrial en estas condiciones.

El análisis del área bajo la curva (AUC) muestra que el tratamiento con 1,2,4-bencenotriol resultó en una mayor producción de señal metabólica en comparación con el resto de los tratamientos, lo que indica un mayor uso de los sustratos mitocondriales y, posiblemente, una mayor eficiencia en la generación de energía (Figura 19C). Además, los valores de AUC fueron estadísticamente diferentes entre los distintos tratamientos, lo que sugiere que el efecto del 1,2,4-bencenotriol es significativamente distinto del de la dopamina y del control. El AUC es un parámetro cuantitativo utilizado para evaluar la actividad metabólica a lo largo del tiempo (Figura 19C). En este contexto, un AUC mayor indica una mayor tasa de utilización del sustrato por la mitocondria y, por lo tanto, una mayor producción de NADH y $FADH_2$, reflejándose en una mayor absorción de señal en la placa MitoPlate™.

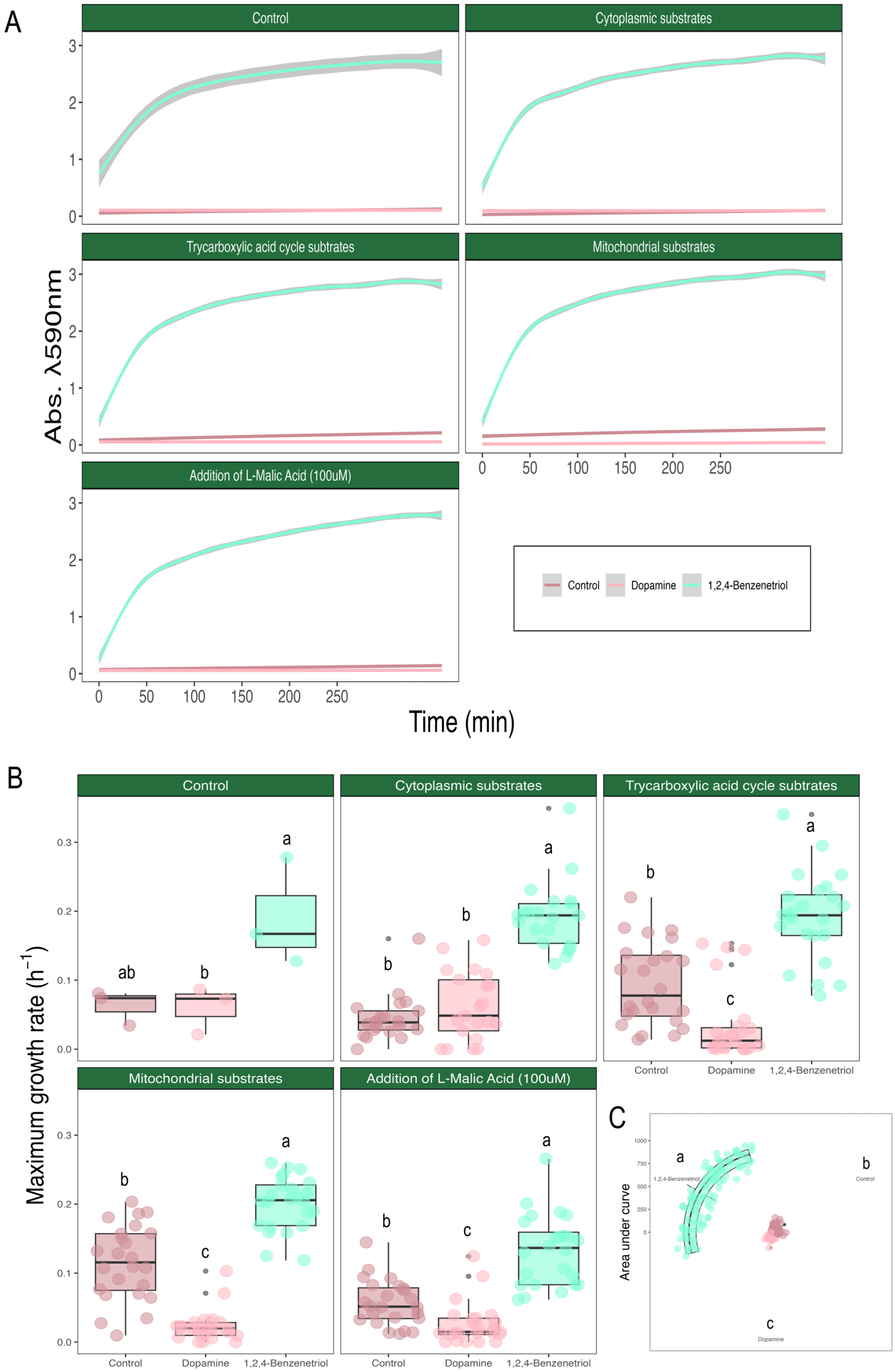


Figura 19. Actividad metabólica mitocondrial de *Exophila dermatitidis* EXF-10123 mediante la MitoPlateTM S-1 de Biolog, crecido en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol. (A) Curvas de crecimiento. (B) Gráficos de caja y bigote con las diferencias entre la velocidad máxima alcanzada por la cepa en cada tratamiento ($p < 0.05$). (C) Gráficos de caja y bigote con las diferencias entre el área bajo la curva para en cada tratamiento ($p < 0.05$).

20-Discusión Capítulo 3

Los resultados presentados en este estudio resultan novedosos para la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis*. Lavrin et al. (2020), reportan que la cepa EXF-10123 de *E. dermatitidis* utilizada en este estudio crece más vigorosamente en medio MEA, (Anexo 1), a temperatura ambiente y a 37 °C. Las tres formas típicas del crecimiento se encontraron presentes: conidios, pseudohifas e hifas. En la temperatura de 37 °C prevalecieron las células de levadura, mientras que a temperatura ambiente prevaleció la forma filamentosa. Adicionalmente, demostraron que esta cepa crece en presencia de dopamina e hidrocarburos aromáticos (tolueno, aceite mineral y n-hexadecano) como única fuente de carbono.

La dopamina y el 1,2,4-bencenotriol tienen estructuras químicas que comparten algunas similitudes, pero también presentan diferencias significativas. La dopamina es un neurotransmisor catecolamina que consta de un anillo bencénico (aromático) con dos grupos hidroxilo (OH) en las posiciones 1 y 2 del anillo, y una cadena lateral con un grupo amino (NH_2) (Tabla VII). Su estructura consta de un anillo bencénico (C_6) unido a dos grupos hidroxilo (-OH) y una cadena lateral con un grupo amino (NH_2) (Cannon, 1985; Marín-Valencia et al., 2008a). El 1,2,4-bencenotriol es un compuesto aromático con tres grupos hidroxilo (-OH) en las posiciones 1, 2 y 4 del anillo bencénico, sin una cadena lateral con grupo amino (Hou et al., 2006; Ju and Parales, 2010; Li et al., 2001). Ambos compuestos contienen un anillo bencénico (aromático) y tienen grupos hidroxilo (-OH) en sus estructuras. En resumen, aunque comparten el anillo bencénico y tienen grupos hidroxilo en común, la dopamina tiene una cadena lateral con un grupo amino, lo que la hace estructuralmente distinta al 1,2,4-bencenotriol, que no posee esa cadena ni el grupo amino.

Sus funciones biológicas y los grupos funcionales específicos presentes en cada uno sugieren que sus mecanismos de degradación serán probablemente distintos. La dopamina, siendo un neurotransmisor, se degrada mediante rutas metabólicas específicas vinculadas a su papel biológico (Gao et al., 2020; Klein et al., 2019), mientras que el 1,2,4-bencenotriol podría seguir rutas de biotransformación más orientadas a la eliminación de compuestos fenólicos o aromáticos (Min et al., 2019). Por lo tanto, no es seguro asumir que compartirán mecanismos de degradación similares solo debido a su similitud estructural.

La presencia de metabolitos comunes, como ácidos fenólicos o derivados de catecolaminas (por ejemplo, el 3,4-dihidroxiácido fenilacético o el ácido homovanílico), podría indicar la existencia de rutas metabólicas compartidas para la dopamina y el 1,2,4-bencenotriol. Estas rutas podrían involucrar enzimas como la monoaminooxidasa (MAO) o la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que actúan sobre compuestos fenólicos y producen productos de biotransformación similares. Además, enzimas oxidativas como lacasas o peroxidasas, que catalizan la oxidación de fenoles, podrían facilitar una vía común inicial de degradación. Sin embargo, la ausencia de productos de degradación específicos del 1,2,4-bencenotriol, como ácidos fenólicos o compuestos metilados, sugiere que las rutas de degradación de ambos compuestos podrían diferir o que la vía para el 1,2,4-bencenotriol no se haya activado bajo las condiciones experimentales evaluadas. Por lo tanto, aunque puede existir un mecanismo inicial compartido, como la oxidación de los grupos fenólicos, los compuestos probablemente sigan rutas de degradación diferentes en etapas posteriores. En conclusión, los resultados actuales no permiten afirmar con certeza que exista una vía común completa de degradación para ambos compuestos; se requieren análisis adicionales para esclarecer estos procesos y determinar las rutas metabólicas específicas involucradas.

Es interesante que se detectó la presencia de 1,2,4-bencenotriol en el sobrenadante de las muestras cultivadas con dopamina como única fuente de carbono, lo que sugiere que este compuesto podría ser un producto de biotransformación derivado de la dopamina (Tabla VII). La detección exclusiva en el sobrenadante y no en la fracción celular indica que el 1,2,4-bencenotriol no se acumula intracelularmente, sino que

es liberado al medio como un subproducto o metabolito intermedio (Figura 20). La Figura 20 muestra la ruta de degradación del 1,2,4-bencenotriol, apoyando la idea de que este compuesto es metabolizado y transformado posteriormente una vez liberado al medio. Esto sugiere que, aunque no se acumule dentro de la célula, el 1,2,4-bencenotriol forma parte de una vía metabólica activa que continúa su degradación extracelular o en el medio circundante. Este hallazgo sugiere la posible existencia de una vía metabólica compartida, donde enzimas oxidativas podrían estar implicadas en la transformación de dopamina hacia compuestos fenólicos como el 1,2,4-bencenotriol. Aunque no se observe acumulación intracelular del 1,2,4-bencenotriol, su presencia en el sobrenadante indica que es un metabolito transitorio en la biotransformación de la dopamina, destacando una conexión metabólica entre ambos compuestos.

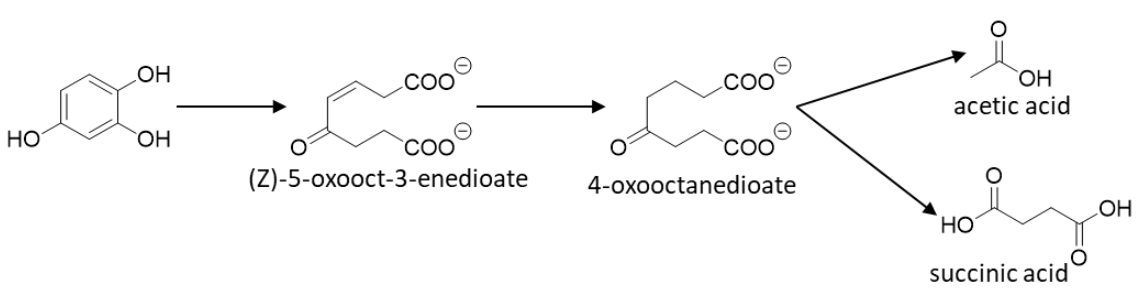


Figura 20. Ruta de degradación 1,2,4-bencenotriol (Ju and Parales, 2010).

El ácido acético fue detectado tanto en el sobrenadante como en la fracción obtenida tras la extracción. Sin embargo, el ácido succínico solo lo encontramos en el sobrenadante. Además el 1,2,4-bencenotriol se degrada siguiendo la ruta de TCA (Figura 10B, Capítulo 2). En este caso existe dos rutas de degradación una que se observa en el sobrenadante donde se obtiene norepinefrina, y otra intracelular a través de 3,4-dihidroxifenilacético hasta ácido homovanílico (Figura 21).

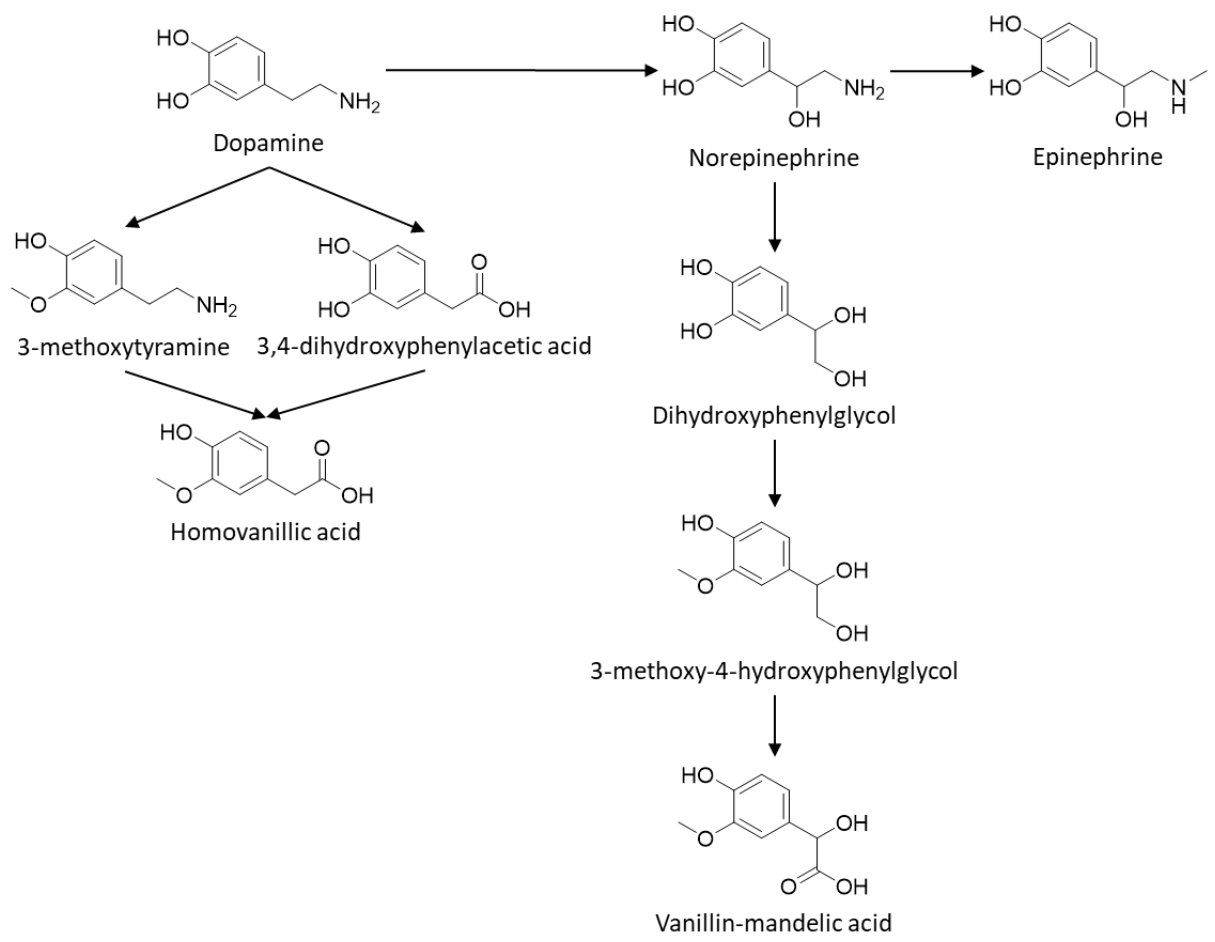


Figure 21. Ruta de degradación dopamina (Marín-Valencia et al., 2008).

El estudio del metabolismo mitocondrial en hongos mediante la metodología de MitoPlate™ S-1 de Biolog en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol resultan novedoso. La mayoría de los estudios están enfocados en líneas celulares cancerígenas. Se ha evaluado el efecto de la Pseudotina D, un metabolito secundario de hongos, en líneas celulares MEC-1 (células B de leucemia crónica humana representativas), utilizando la metodología de MitoPlate™ S-1y MitoPlate™ I-1 de Biolog (Mosejová et al., 2021).

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la dopamina podría no ser un sustrato energético directo para la mitocondria o no estar siendo metabolizada en cantidades suficientes para impactar la producción de NADH y $FADH_2$. Además, la dopamina es susceptible a autooxidarse, generando ROS, lo que podría activar mecanismos antioxidantes sin necesariamente alterar la producción de NADH/$FADH_2$. En este caso, la mitocondria podría estar metabolizando la dopamina a través de la MAO, pero sin aumentar significativamente su actividad respiratoria. Mientras que el 1,2,4-bencenotriol es un derivado fenólico que puede autooxidarse, generando radicales libres y aumentando la producción de ROS. Esto podría inducir una respuesta mitocondrial compensatoria, incrementando el flujo a través del ciclo TCA para satisfacer la demanda energética de los mecanismos antioxidantes. Por otro lado, algunos derivados fenólicos pueden actuar como donadores de electrones o afectar la actividad de enzimas clave del TCA. Si el 1,2,4-bencenotriol se metaboliza dentro de la mitocondria o interactúa con transportadores de electrones, podría aumentar la producción de NADH y $FADH_2$, reflejándose en una mayor absorbancia.

21-Conclusiones Capítulo 3

1-La microscopía confocal mostró que, en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol, *E. dermatitidis* EXF-10123 experimentó cambios en la abundancia celular, sin alteraciones significativas en la morfología de pseudohifas.

2-El análisis metabolómico de *E. dermatitidis* EXF-10123 mostró que la dopamina no se metabolizó completamente yse transformó en metabolitos típicos, como ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido homovanílico. Mientras que el 1,2,4-bencenotriol podría haberse metabolizado completamente sin productos detectables.

3- *E. dermatitidis* EXF-10123 presenta una mayor actividad metabólica mitocondrial en respuesta al 1,2,4-bencenotriol, lo que sugiere una adaptación diferencial a este compuesto en comparación con la dopamina, que no mostró un impacto significativo en la utilización de sustratos energéticos.

22-Referencias Capítulo 3

Bahena-Trujillo1, R., Flores2, G., José A. Arias-Montaño1, 2000. PSPDN o kaishita LANkan sōgo setsuzoku shiken jisshi gaidorain : TCP IP kei. Revista Biomédica 11, 39–60.

Batista-García, R.A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., Folch-Mallol, J., 2014. Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. PLoS One 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105893

Cannon, J.G., 1985. Dopamine agonists: structure-activity relationships, in: Progress in Drug Research. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 303–414. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9315-2_9

Černoša, A., Sun, X., Gostinčar, C., Fang, C., Gunde-Cimerman, N., Song, Z., 2021. Virulence traits and population genomics of the black yeast *Aureobasidium melanogenum*. Journal of Fungi 7. https://doi.org/10.3390/JOF7080665

Gao, T., Liu, X., Shan, L., Wu, Q., Liu, Y., Zhang, Z., Ma, F., Li, C., 2020. Dopamine and arbuscular mycorrhizal fungi act synergistically to promote apple growth under salt stress. Environ Exp Bot 178, 104159. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104159

Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., 2011. Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. Adv Appl Microbiol 77, 71–96. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00003-0

Hou, R.C.-W., Chen, Y.-S., Chen, C.-H., Chen, Y.-H., Jeng, K.-C.G., 2006. Protective effect of 1,2,4-benzenetriol on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. J Biomed Sci 13, 89–99. https://doi.org/10.1007/s11373-005-9039-5

Isola, D., Scano, A., Orrù, G., Prenafeta-Boldú, F.X., Zucconi, L., 2021. Hydrocarbon-Contaminated Sites: Is There Something More Than *Exophiala xenobiotica*? New Insights into Black Fungal Diversity Using the Long Cold Incubation Method. Journal of Fungi 7, 817. https://doi.org/10.3390/jof7100817

Ju, K.-S., Parales, R.E., 2010. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74, 250–272. https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-10

Ju, K.-S., Parales, R.E., 2010. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74, 250–272. https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-10

Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., Correa, R.G., 2019. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. Cell Mol Neurobiol 39, 31–59. https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3

Lavrin, T., Konte, T., Kostanjšek, R., Sitar, S., Sepčič, K., Prpar Mihevc, S., Žagar, E., Župunski, V., Lenassi, M., Rogelj, B., Gunde Cimerman, N., 2020. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. Cells 9. https://doi.org/10.3390/cells9040963

Li, A.S.-H., Bandy, B., Tsang, S.-S., Davison, A.J., 2001. DNA breakage induced by 1,2,4-benzenetriol: relative contributions of oxygen-derived active species and transition metal ions. Free Radic Biol Med 30, 943–956. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00478-6

Marín-Valencia, I., Serrano, M., Ormazabal, A., Pérez-Dueñas, B., García-Cazorla, A., Campistol, J., Artuch, R., 2008a. Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: Analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. Clin Biochem 41, 1306–1315. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.077

Marín-Valencia, I., Serrano, M., Ormazabal, A., Pérez-Dueñas, B., García-Cazorla, A., Campistol, J., Artuch, R., 2008b. Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: Analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. Clin Biochem 41, 1306–1315. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.077

Min, J., Xu, L., Fang, S., Chen, W., Hu, X., 2019. Molecular and biochemical characterization of 2-chloro-4-nitrophenol degradation via the 1,2,4-benzenetriol pathway in a Gram-negative bacterium. Appl Microbiol Biotechnol 103, 7741–7750. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09994-7

Mosejová, E., Bosnjakovic, R., Kubala, L., Vašíček, O., 2021. Pseurotin D Induces Apoptosis through Targeting Redox Sensitive Pathways in Human Lymphoid Leukemia Cells. Antioxidants 10, 1576. https://doi.org/10.3390/antiox10101576

Peidro-Guzmán, H., Pérez-Llano, Y., González-Abradelo, D., Fernández-López, M.G., Dávila-Ramos, S., Aranda, E., Hernández, D.R.O., García, A.O., Lira-Ruan, V., Pliego, O.R., Santana, M.A., Schnabel, D., Jiménez-Gómez, I., Mouriño-Pérez, R.R., Aréchiga-Carvajal, E.T., del Rayo Sánchez-Carbente, M., Folch-Mallol, J.L., Sánchez-Reyes, A., Vaidyanathan, V.K., Cabana, H., Gunde-Cimerman, N., Batista-García, R.A., 2020. Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. Environ Microbiol 00. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15166

Prenafeta-Boldú, F., Hoog, X., G., Summerbell, R.C., 2005. Biosystematics and ecology of hydrocarbon-degrading fungi from air biofilters.

Prenafeta-Boldú, F.X., de Hoog, G.S., Summerbell, R.C., 2019. Fungal Communities in Hydrocarbon Degradation, Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60063-5_8-2

Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Sybren De Hoog, G., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: Biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev 30, 109–130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x

Zhang, C., Sirijovski, N., Adler, L., Ferrari, B.C., 2019. *Exophiala macquariensis* sp. nov., a cold adapted black yeast species recovered from a hydrocarbon contaminated sub-Antarctic soil. Fungal Biol 123, 151–158. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.011

Capítulo 4: Impacto del estrés osmótico en el metabolismo

23-Introducción Capítulo 4

El mantenimiento de la integridad celular puede verse comprometido por condiciones ambientales, dado que depende de la interacción de diferentes variables abióticas, como la temperatura, la presión, el efecto caotrópico/cosmotrópico de los iones y la actividad del agua, las cuales imponen limitaciones biofísicas (Stevenson et al., 2015). Los hongos xerotolerantes son capaces de continuar su crecimiento en condiciones de estrés impuestas por altos niveles de sales o azúcares que reducen la actividad del agua (aw) (Pitt and Hocking, 2022). La aw cuantifica la cantidad de agua disponible en una solución y es un factor crítico que restringe el crecimiento de los microorganismos (Jiménez-Gómez et al., 2020). La osmorregulación a través de modificaciones en la membrana, la detección de baja actividad del agua mediada por osmosensores, la estrategia de síntesis y acumulación de solutos compatibles y las modificaciones de la pared celular permiten que muchos hongos se adapten fisiológicamente a condiciones xerofílicas (Fernando et al., 2023; Sarkar et al., 2022; Zajc et al., 2014).

La presencia de NaCl en el medio es ampliamente utilizada para evaluar cómo los hongos se adaptan al estrés inducido por la alta salinidad. No obstante, sales como KCl, $MgCl_2$ y $CaCl_2$ se encuentran también presentes en los ambientes hipersalinos (Oren, 2013, 2002). Además, altas concentraciones de iones tóxicos pueden encontrarse entre los cristales de hielo de glaciares (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2023). Estudiar los desafíos planteados por las altas concentraciones de sales es relevante para la astrobiología, especialmente en el planeta Marte, en donde abundan iones como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Cockell et al., 2020).

El tipo de sal presente en el medio de cultivo, ya sea desestabilizadora (caotrópica) o estabilizadora (cosmótropa), afecta la supervivencia del hongo porque algunos cationes pueden inducir la precipitación o solubilización de proteínas, según la serie de Hofmeister ($K^+ > Na^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$; $SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > Cl^- > NO_3^- > Br^- > ClO_3^- > I^- > ClO_4^-$). Las sales caotrópicas (Mg^{2+}; Ca^{2+}) reducen conexiones electrostáticas y desestabilizan macromoléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos, en contraste con las sales cosmótropas (K^+; Na^+) (Hofmeister, 1888; Zajc et al., 2014). Los mecanismos de la actividad caotrópica dependen del compuesto caotrópico específico. Sin embargo, los procesos moleculares detrás de los factores de estrés caotrópicos no han sido ampliamente investigados (Eardley et al., 2019). A pesar de las implicaciones biotecnológicas y la presencia ambiental de diferentes tipos de sales, el conocimiento sobre el crecimiento fúngico en concentraciones extremadamente altas de sales cosmótropas y caotrópicas es muy limitado (Moreno-Perlin et al., 2023).

Los hongos xerofílicos presentan un grado de tolerancia al estrés hídrico superior al de cualquier otro organismo (Williams and Hallsworth, 2009). Los xerófilos fúngicos, como *Aspergillus penicillioides*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium echinulatum*, *Eurotium halophilicum*, *Eurotium repens*, *Xerochrysium xerophilum* y *Xeromyces bisporus*, son microorganismos que habitan en los límites extremos de la biosfera microbiana gracias a su capacidad excepcional para sobrevivir en ambientes con una actividad de agua muy baja (Hamill et al., 2020). Moreno-Perlin et al. (2023) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de agentes caotrópicos ($MgCl_2$, LiCl, $CaCl_2$ y glicerol) y cosmotrópicos (NaCl, KCl y sorbitol) en el medio de cultivo sobre el crecimiento del hongo halófilo obligado *Aspergillus atacamensis*. Encontraron que *A. atacamensis* puede crecer hasta niveles saturantes de NaCl y tolerar concentraciones de hasta 2.0 M de $MgCl_2$, un agente caotrópico previamente considerado incompatible con la vida eucariota. El estudio también observó la formación de fiálides y conidios mediante estereoscopía y microscopía láser confocal, lo que indica que el hongo no solo crece, sino que también desarrolla estructuras reproductivas bajo condiciones extremas. Zajc et al. (2014) evaluaron el crecimiento de hongos extremófilos en presencia de varias sales (NaCl, KCl, NaBr, MgSO4, $MgCl_2$, $CaCl_2$).

Exophiala dermatitidis demostró la capacidad de proliferar en medios con altas concentraciones de diversas sales, incluyendo $CaCl_2$, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$, NaBr y NaCl.

A pesar de estos resultados, aún se desconoce cómo se ve afectado el metabolismo de *E. dermatitidis* frente a diferentes tipos de sales caotrópicas y cosmotrópicas. Para abordar esta pregunta, evaluamos el crecimiento de la cepa *E. dermatitidis* EXF-8193, un aislado ambiental proveniente de un glaciar, en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas utilizando la tecnología Biolog YT MicroPlate. Esta cepa fue seleccionada entre cinco aislados con genoma secuenciado debido a su origen en un ambiente extremo, caracterizado por bajas temperaturas, alta radiación UV y condiciones osmóticas variables que incluyen la presencia natural de sales. Dichas condiciones promueven adaptaciones moleculares únicas que podrían conferirle una tolerancia diferencial a estos solutos. Además, los análisis filogenómicos basados en ortogrupos compartidos (OrthoFinder) (Capítulo 2) revelaron que EXF-8193 se encuentra filogenéticamente distante del resto de las cepas estudiadas, lo cual sugiere una historia evolutiva diferenciada y potenciales mecanismos únicos de adaptación a condiciones extremas.

24-Metodología Capítulo 4

Preservación y condiciones de cultivo de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis*

La cepa *E. dermatitidis* EXF-8193 utilizada en este estudio fue obtenida de sedimentos glaciares profundos del glaciar Calderone, Abruzzo, Italia, en 2007 (Tabla I). Las cepas fueron crioconservadas a -80 °C en una solución al 20% de glicerol en la Colección de Cultivos Microbianos Ex del Centro de Infraestructura Mycosmo, Departamento de Biología, Facultad Biotécnica, Universidad de Ljubljana, Eslovenia. La cepa de *E. dermatitidis* se cultivaron y mantuvieron rutinariamente en MEA (Anexo 1) a 37 °C durante 7 días. Para todos los experimentos, se prepararon preinóculos de cinco días en MEB (Anexo 2) a 37 °C con agitación a 150 rpm.

24.1. Caracterización de la capacidad osmotolerante de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas.

24.1.1. Crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en medio sólido.

Para explorar el potencial osmotolerante de *E. dermatitidis* EXF-8193, se evaluó el crecimiento de la levadura en diferentes molaridades de sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl) así como en sales cosmotrópicas (NaCl y KCl). Para ello se inoculó 5 ul de suspensión celular a 0.1 de absorbancia a 600 nm en placas de Petri que contenían MEA (Anexo 1) adicionado con concentraciones de 0 M, 1 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M para cada sal evaluada. La suspensión celular de siete días previamente homogeneizada fue previamente lavada con una solución salina de NaCl al 1%. Las placas se incubaron a 28 °C. El área media de las colonias, expresada en mm^2, se calculó utilizando el Photoshop. Se tomaron fotos del crecimiento en el tercer, quinto, séptimo y décimo día de la inoculación de la levadura.

24.1.2. Perfil metabólico de alto rendimiento utilizando tecnología Biolog en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis.*

Utilizamos la tecnología de microplacas Biolog YT (YeasT) de Phenotype MicroArrays (Biolog, Hayward, CA, EE.UU.) para analizar los perfiles metabólicos de *E. dermatitidis* EXF-8193 en presencia de varias sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) a 1 M. La tecnología YT MicroPlateTM abarca 94 ensayos simultáneos de oxidación y asimilación para generar un perfil de huella fenotípica del metabolismo de las levaduras. En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, se precargan y desecan nutrientes esenciales y productos bioquímicos, incluidos aminoácidos, ácidos orgánicos, polialcoholes y azúcares (mono-, di- y polisacáridos). Las fuentes de carbono fueron agrupadas según su estructura química en azúcares y derivados, ácidos orgánicos, alcoholes y polioles, y compuestos con D-xylose. Se asignan pocillos específicos para las pruebas de oxidación, donde se realiza un ensayo de oxidación de fuentes de carbono altamente sensible mediante indicadores de color y un tinte redox de tetrazolio violeta. En cambio, los pocillos de asimilación no contienen tinte redox y se utilizan para evaluar la utilización de sustratos. Se añadieron suspensiones de levadura (OD_{600} nm = 0.1) obtenidas de preinóculos de cinco días de cepas de *E. dermatitidis* al fluido inoculante YT siguiendo el protocolo de Biolog, con sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) a concentraciones finales de 1 M. En cada pocillo de la YT MicroPlate, se añadieron 200 μL del fluido inoculante YT que contenía las levaduras. Después de la inoculación, las YT MicroPlates se incubaron a 28 °C y 100 rpm durante 10 días, con monitoreo espectrofotométrico a 590 nm usando un espectrofotómetro de microplaca Epoch (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, EE. UU.) para determinar la oxidación o asimilación de las diferentes fuentes de carbono probadas (Troncoso et al., 2017). Las reacciones de oxidación positivas se identificaron por un cambio de color púrpura debido a la reducción del tetrazolio violeta, mientras que el aumento de turbidez indicó la asimilación de la fuente de carbono. Las reacciones metabólicas negativas no mostraron cambio de color en las pruebas de oxidación ni aumento de turbidez en los pocillos de

asimilación (Kumari et al., 2023). Se consideraron positivas las reacciones con valores de absorbancia ≥ 0.2 (Rico and Preston, 2008). Las YT MicroPlates no inoculadas se utilizaron como controles negativos, con pocillos adicionales de control que contenían tween 80 y agua. Los experimentos se realizaron por triplicado.

24.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones extremas de sales caotrópicas y cosmotrópicas a diferentes temperaturas.

Se examinó la tolerancia de *E. dermatitidis* EXF-8193 a varias concentraciones de sales caotrópicas ($CaCl_2$ y $MgCl_2$) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) (1 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M) incubadas a 4 °C, 28 °C y 37 °C, utilizando microplacas de 96 pocillos. La inoculación de las microplacas se realizó con una suspensión celular de siete días previamente homogeneizada y lavada con solución salina de NaCl al 1%. Cada pocillo fue inoculado con 250 µL de MEB suplementado con las concentraciones de sal, con una densidad celular inicial de 0.1 (OD_{600} = 0.1). Luego, las microplacas se incubaron durante siete días a 150 rpm. El crecimiento de la levadura se monitoreó espectrofotométricamente a 600 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca Epoch (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, EE. UU.). Se incluyeron controles abióticos en los experimentos, así como un control biótico sin sal. El experimento se realizó dos veces con muestras triplicadas en cada ocasión.

24.2. Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticas en el crecimiento de las cepas de *E. dermatitidis* para determinar su asimilación en diferentes sustratos de Biolog fueron realizadas mediante el test para datos paramétricos de Anova de dos vías. Posteriormente, se utilizó el test Tukey *post hoc* test para determinar las diferencias entre las sales, sirviendo como variable exploratoria, utilizando la absorbancia como variable dependiente ($p \geq 0.05$). Estos análisis se realizaron utilizando el paquete agricolae R package (De Mendiburu F and Simon R, 2015). Para evaluar los perfiles de utilización de fuentes de asimilación se realizó un análisis de componentes principales (PCA) mediante el paquete Vegan R package (Jari Oksanen et al., 2022), incorporando los sustratos como una variable exploratoria. Además, para determinar la oxidación de los sustratos de Biolog se realizó una correlación de Pearson. En el experimento de Biolog YT MicroPlate, y el experimento de la influencia de la temperatura en el crecimiento en presencia de sales los datos de la absorbancia de los ensayos fueron ajustados mediante la substracción de la absorbancia del tiempo cero de los subsecuentes valores de absorbancia de cada uno de los pocillos a lo largo del tiempo. Todos los análisis estadísticos y las figuras se realizaron utilizando R version 4.2.2 (R Core Team, 2022) en RStudio IDE (version 2022.07.1).

25-Resultados Capítulo 4

25.1. Caracterización de la capacidad osmotolerante de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas.

25.1.1. Crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en medio sólido.

Como se muestra en la Figura 21, *E. dermatitidis* EXF-8193 creció en presencia de sales caotrópicas ($CaCl_2$ y $MgCl_2$), así como de sales cosmotrópicas (NaCl y KCl) a una concentración de 1 M. Además, EXF-8193 creció en presencia de KCl a 1.5 M y 1.7 M a partir del séptimo día de incubación, pero no puede crecer a 2 M. Sin embargo, EXF-8193 no crece en ninguna de las molaridades de LiCl que fueron evaluadas. Tampoco crece en concentraciones de 1.5 M, 1.7 M o 2 M de NaCl, $CaCl_2$ o $MgCl_2$.

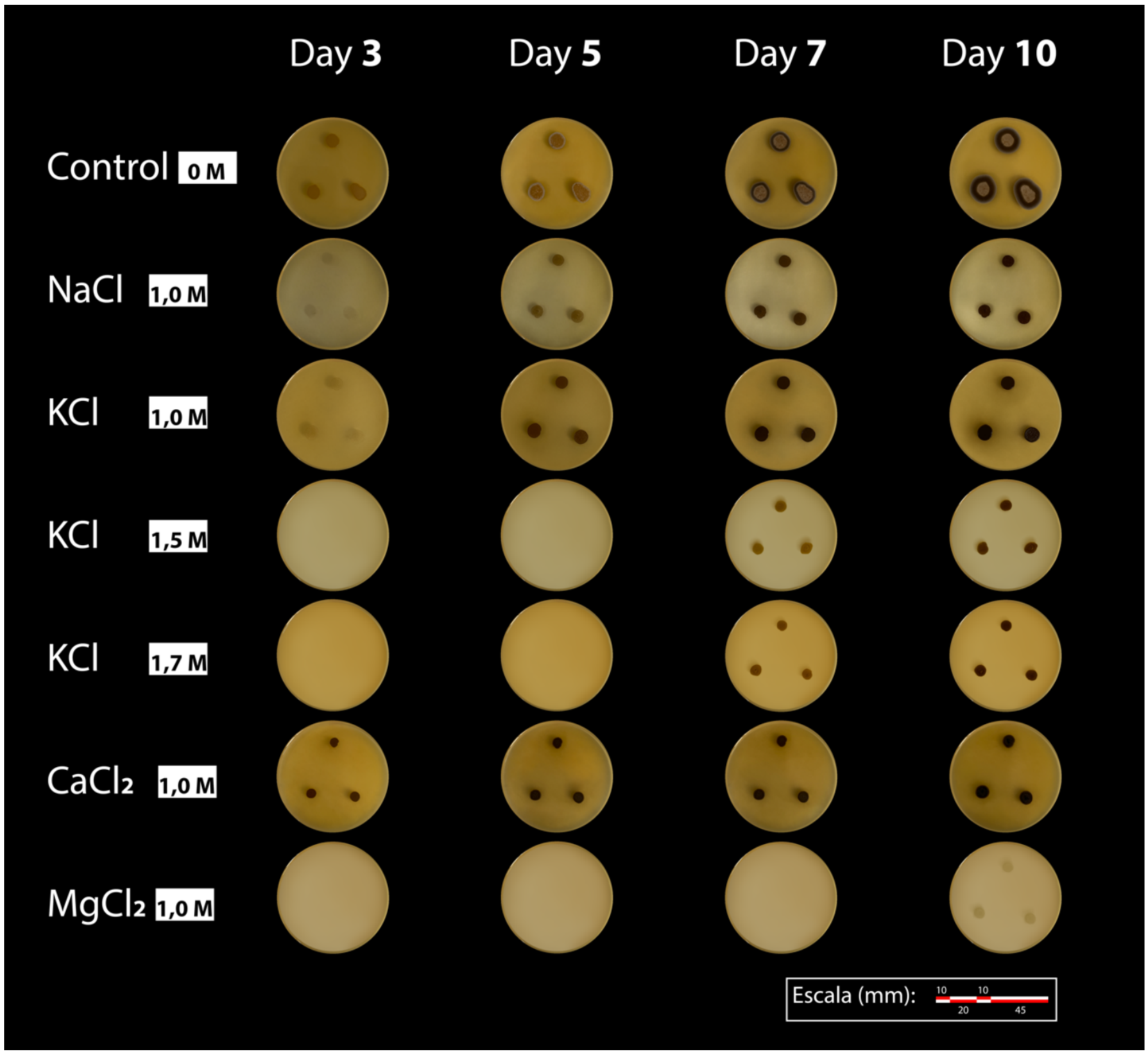


Figura 21. Crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas en MEA (Anexo 1).

El análisis macromorfológico de las colonias de *E. dermatitidis* EXF-8193 reveló cambios estructurales notables, como tamaño, color, tipo de margen, topografía y textura (Tabla VIII). El mayor diámetro de colonia (22.38 mm^2) corresponde al control en 0 M, lo que indica que no se requiere sal para un crecimiento óptimo, seguido del crecimiento en presencia de KCl 1 M y $CaCl_2$ 1 M con diámetros de 11.48 mm^2 y 10.34 mm^2, respectivamente. Los diámetros de colonia más pequeños de la cepa EXF-8193 se observaron en presencia de $MgCl_2$ 1 M (8.22 mm^2) y KCl 1.7 M (8.0 mm^2) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Características morfológicas de *Exophiala dermatitidis* EXF-8193 en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl después de 10 días de crecimiento a 28 °C en MEA (Anexo 1).

	Control	**NaCl**	**KCl**	**$CaCl_2$**	**$MgCl_2$**	**LiCl**
Molaridad	0 M	1.0 M	1.0 M, 1.5 M and 1.7 M	1.0 M	1.0 M	No growth
Diámetro (mm)	22.38	9.63	1 M-11.48 1.5 M-9.35 1.7 M-8.0	10.34	8.22	No growth
Color	Dark brown	Dark brown	Dark brown	Dark brown	Light brown	No growth
Topografía	Radially	Radially	Radially	Radially	Radially	No growth
Textura	Velvety	Oily	Oily	Oily	Oily	No growth

25.1.2. Perfil metabólico de alto rendimiento utilizando tecnología Biolog en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis*

Para comprender como la osmotolerancia afecta el metabolismo de la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis* se utilizó la tecnología de YT de Biolog. Este análisis involucra la medición de 94 test bioquímicos, utilizando fuentes específicas de carbono y adicionalmente se agregaron diferentes sales tanto caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$, and LiCl) como cosmotrópicas (NaCl and KCl) a una concentración final de 1 M. Las fuentes de carbono fueron agrupadas según su estructura química en azúcares y derivados, ácidos orgánicos, alcoholes y polioles, y diferentes compuestos adicionados con D-xylose.

Perfiles de Asimilación

La figura 22 mostró los perfiles de asimilación de la cepa EXF-8193. Las curvas de crecimiento demuestran la influencia de las sales evaluadas en el incremento de la absorbancia a lo largo del tiempo (Figura 22A). El tipo de sal presente en el medio influye en la asimilación de las fuentes de carbono. La adición de las sales NaCl, KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$ no inhibió de forma global la asimilación de las diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, para todos los grupos de substratos evaluados la presencia de LiCl afecta de forma negativa el incremento de la absorbancia en el tiempo. No obstante, la presencia de una mezcla de sustratos con D-xilosa favorece el crecimiento en presencia de las diferentes sales, incluso en presencia de LiCl (Figura 22A).

La osmotolerancia de la cepa EXF-8193 se evidencia en su mayor crecimiento sin sal añadida en presencia de los diferentes grupos de sustratos (Figura 22B). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el control sin sal y la presencia de 1 M de KCl utilizando como fuente de carbono los alcoholes y polioles, siendo estos los mejores tratamientos en este caso. Los valores analizados en la figura 22B hacen referencia a las 250 horas de muestreo.

En la figura 22C, podemos observar que en presencia de las sales KCl y $CaCl_2$, así como en la condición sin sal se observaron las mayores densidades indicando que las desviaciones estándar del conjunto de mediciones se encuentran por encima de la media del conjunto de datos por lo tanto hay altos picos de asimilación. Sin embargo, esto no sucede para todos los sustratos evaluados lo que sugiere que tanto la sal como el tipo de sustrato influye en la asimilación por parte de la cepa EXF-8193. Para el control la máxima tasa de asimilación de observó utilizando

ácidos orgánicos como única fuente de carbono y en presencia de KCl utilizando de alcoholes y polioles como única fuente de carbono. De forma interesante en presencia de $CaCl_2$ utilizando el control (que contiene agua y tween 80), lo que sugiere que la presencia de $CaCl_2$ pudiera favorecer el oligotropismo de la cepa. En este sentido, también utilizando el control (que contiene agua y tween 80) y en presencia NaCl se han observado las mayores velocidades de crecimiento (figura 22D). Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para comprender el papel de estas sales en el oligotropismo de *E. dermatitidis*. En presencia de NaCl, se han observado también la mayor velocidad de crecimiento utilizando ácidos orgánicos como fuente de carbono y también en presencia de KCl utilizando la presencia de una mezcla de sustratos con D-xilosa (Figura 22D).

El gráfico de la figura 22E, nos permite identificar patrones metabólicos globales en la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis*, destacando similitudes y diferencias entre las diferentes fuentes de carbono utilizadas. Es notable que el tipo de sal influye en el patrón de asimilación de las diferentes fuentes de carbono. En el control sin sal se identificó un patrón opuesto de consumo entre los polioles y diferentes grupos de azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos/oligosacáridos y polisacáridos). Sin embargo, el patrón de asimilación ocurre de manera diferente para cada una de las sales evaluadas. En presencia de NaCl el control (agua y tween 80) mostró una asimilación opuesta a la utilización de azúcares (disacáridos y trisacáridos/oligosacáridos) y ácidos orgánicos (aminoácidos y ácidos carboxílicos). Mientras la asimilación de monosacáridos fue opuesta a la asimilación de alcoholes. Por otro lado, en presencia de la sal KCl los disacáridos mostraron un patrón de asimilación opuesto a la asimilación de ácidos orgánicos (aminoácidos y ácidos carboxílicos), el control (agua y tween 80) y trisacáridos/oligosacáridos. Mientras que, en presencia de $CaCl_2$ los trisacáridos mostraron una asimilación opuesta a los polisacáridos y al control (agua y tween 80). En el caso de la presencia de $MgCl_2$ para los polioles y el control se observó una variación opuesta en la asimilación de azúcares (monosacáridos, disacáridos, polisacáridos y derivados de azúcares); y también se observó un consumo antagónico entre mezcla de sustratos con D-xilosa y alcoholes. Por su parte en presencia de LiCl polialcoholes y disacáridos mostró una asimilación contrastante con alcoholes y de aminoácidos con mezcla de sustratos con D-xilosa. Estos resultados sugieren que el efecto que causa la presencia de 1 M de las sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$, y LiCl) como cosmotrópicas (NaCl y KCl) influye en el patrón metabólico de asimilación de la cepa EXF-8193.

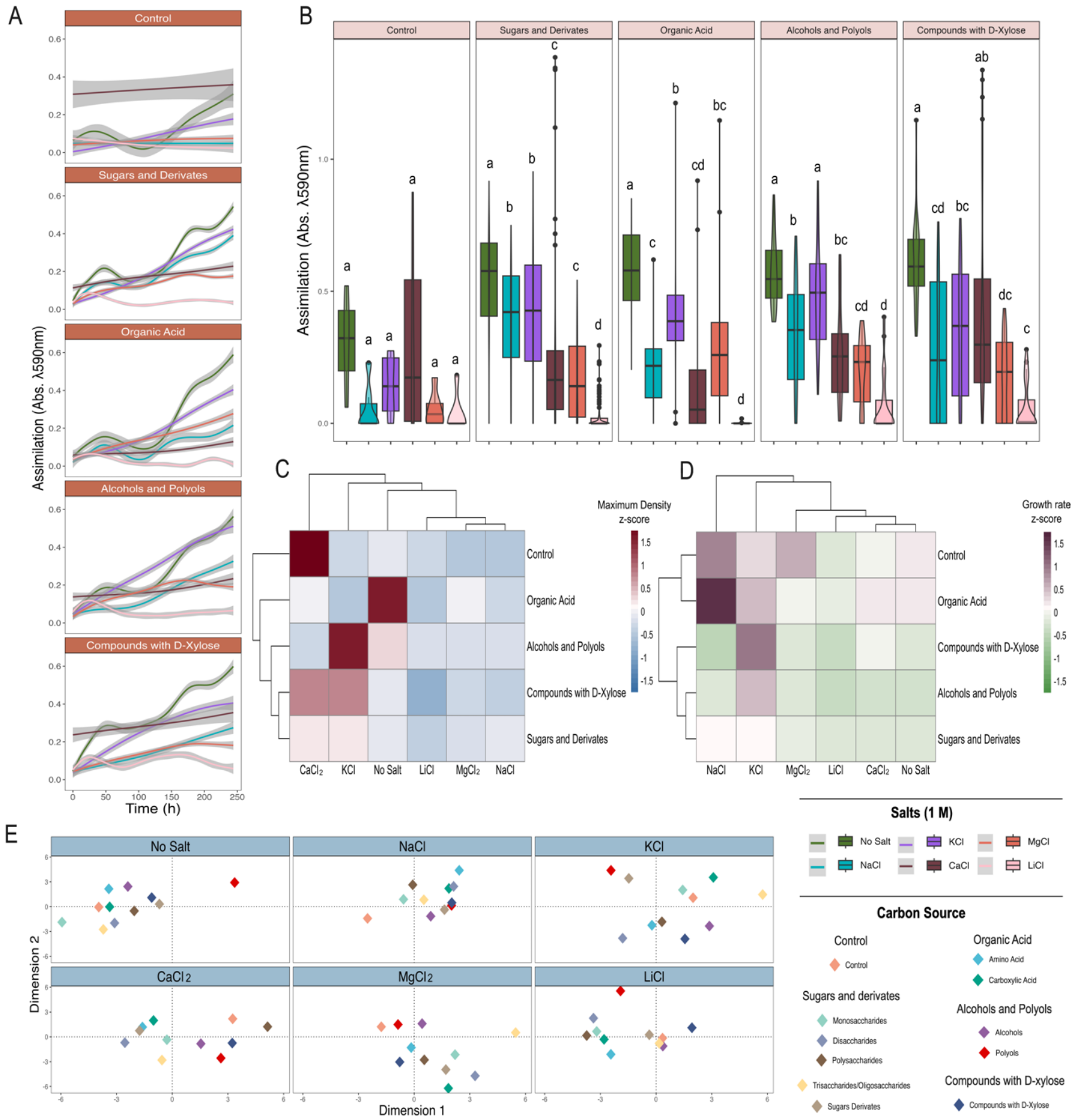


Figura 22. Perfiles de asimilación de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de las sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$, y LiCl) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) utilizando como fuente de carbono los sustratos de YT Biolog. (A) Curvas de asimilación de sustratos (B) Gráficos de caja y bigote de las diferencias en la absorbancia a las 250 horas de muestreo. Diferencias estadísticas mediante ANOVA, (p.value >=0.05). Mapas de calor que muestra los índices de z score para parámetros cinéticos de la curva de asimilación (C) densidad máxima (D) velocidad de crecimiento. (E) Análisis de reducción de dimensiones.

Perfiles de Oxidación

La Figura 23 muestra el perfil de oxidación de la cepa EXF-8193 en presencia de sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl), así como de sales cosmotrópicas (NaCl y KCl). Existe una influencia de la sal en la oxidación de los sustratos evaluados. En el gráfico de la figura 23A se observa que la correlación en cuanto a la oxidación de sustratos en presencia de las sales evaluadas. La correlación fue positiva para todas las sales con excepción de la sal $CaCl_2$, en donde se observó una correlación negativa con el resto de los tratamientos (Control a 0M, NaCl, KCl, $MgCl_2$ y LiCl). Se observó una correlación con un coeficiente de 0.99 entre el control y la sal NaCl. Además, se identificó un coeficiente de correlación superior a 0.90 entre el NaCl y el control con la sal $MgCl_2$. Sin embargo, las distancias entre la absorbancia muestran diferencias entre que el perfil metabólico de oxidación de sustratos para el control sin el control a 0 M y la presencia de sales, lo que sugiere el impacto de la presencia de sales en el metabolismo de la cepa EXF-8193 (Figura 23B). La figura 23C representa el desempeño total de la cepa EXF-8193 durante el experimento. Estos resultados muestran que el control a 0 M fue la condición más favorable para la cepa indicando que tuvo una oxidación más intensa durante el tiempo evaluado en comparación con el resto de las sales en los sustratos examinados.

La figura 23D indica el tiempo en el cual la cepa EXF-8193 alcanza la máxima tasa de oxidación de los sustratos indicando si el sustrato no se utiliza, si tiene una baja adaptación, una alta adaptación que indica la velocidad óptima alcanzada o un bajo consumo. En el control a 0 M más del 90 % de los azúcares y derivados se oxidaron en el tiempo con alta utilización, indicando la preferencia de este tipo de compuestos en relación a los ácidos orgánicos y alcoholes y polioles estudiados. Sin embargo, esta observación es diferente en presencia de las sales evaluadas sugiriendo que la presencia de las sales inhibe la oxidación de ciertos azúcares y derivados. En presencia de 1 M de NaCl se encontró una alta utilización de monosacáridos como D-galactosa y a-D-glucosa, de disacáridos como D-galactosa y sucrosa y del trisacárido rafinosa. En presencia del 1 M de KCl se encontró una alta utilización de monosacáridos como la D-galactosa y la L-sorbosa, de disacáridos como la celobiosa y la sucrosa y de oligosacáridos como la estaquiosa. En presencia del 1 M de $CaCl_2$ se encontró una alta utilización del monosacárido D-picosa y de disacáridos como sucrosa, trealosa y maltosa y del oligosacárido rafinosa. En presencia de 1 M de MgCl2 solamente el disacárido malibiosa y el oligosacárido maltotriosa presentaron alta utilización. Interesantemente, en presencia de 1 M de LiCl se encontró una alta utilización de monosacáridos como a-D-glucosa y D-picosa, de del disacárido maltosa y del oligosacárido estaquiosa. La mayor utilización de ácidos orgánicos se observó en presencia de $CaCl_2$. Mientras que se observó un incremento en la utilización de alcoholes y polioles en presencia de las sales $CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl.

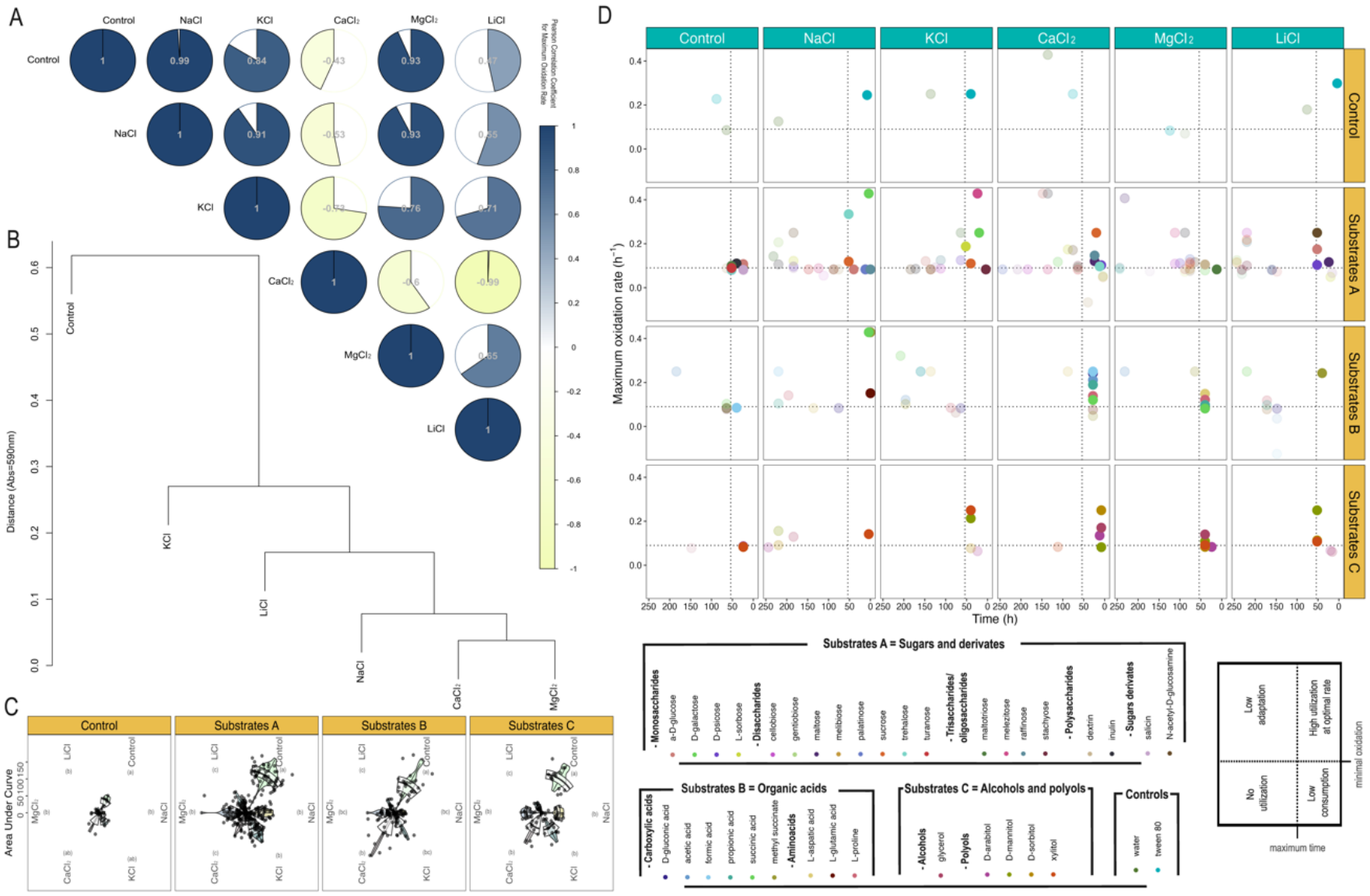


Figura 23. Perfiles de oxidación de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en presencia de las sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$, y LiCl) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) utilizando como fuente de carbono los sustratos de YT Biolog. (A) Correlación de Pearson entre la oxidación global de sustratos en presencia de las sales evaluadas. (B) Árbol de distancias entre la oxidación global de sustratos en presencia de las sales evaluadas. (C) Área bajo la curva de la oxidación de azúcares y derivados, ácidos orgánicos y alcoholes y polioles en presencia de las sales evaluadas. (D) Gráfico de puntos que muestra el tiempo en el que la cepa EXF-8193 alcanza su máxima velocidad de oxidación.

25.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones extremas de sales caotrópicas y cosmotrópicas a diferentes temperaturas.

La temperatura influye en la osmotolerancia de la cepa EXF-8193 (Figura 24). La incubación a 4 °C mostró un menor aumento en la absorbancia a lo largo del tiempo en comparación con las incubaciones a 28 °C y 37 °C. A 28 °C en el tratamiento del control sin sal se observó el mayor

incremento de la absorbancia en comparación con el resto de los tratamientos, indicando que es la condición óptima de crecimiento y sugiriendo que el crecimiento observado en presencia de las sales (NaCl, KCl, CaCl2 y MgCl2) en las diferentes molaridades evaluadas (1 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M) se debe a la osmotolerancia de la cepa estudiada. La figura 24B indica que existe una correlación negativa entre la incubación a 28 °C y 37 °C con la temperatura a 4 °C. Mientras que la correlación entre las temperaturas de 28 °C y 37 °C mostraron un coeficiente de correlación de 0.45 indicando una correlación positiva pero no fuerte. Esto sugiere que cada temperatura tiene un impacto diferente en el crecimiento de la cepa EXF-8193. La separación entre los tratamientos mostrados en la figura 24C indica que los tratamientos son distinguibles en función de las variables evaluadas. Se observan tres grupos principales en donde el $MgCl_2$ presenta características distintivas sin una influencia de la temperatura. A todas las temperaturas evaluadas, las condiciones con $MgCl_2$ a 1 M y 1.5 M se agrupan cercanamente entre sí en el espacio discriminante, lo que indica similitudes en los patrones de crecimiento bajo estas concentraciones. Mientras que las mayores densidades se observaron en el control a 0 M y en presencia de NaCl a 1 M a 28 °C, seguido por el crecimiento en 1 M de $MgCl_2$ a 37 °C. También se encontraron los valores de máxima densidad por encima de la media para las condiciones de NaCl a 1.7 M (a 37 °C), $CaCl_2$ a 2 M (a 37 °C), $MgCl_2$ a 1 M y 1.7 M (a 28 °C para cada molaridad) y 1.5 M (a 28 °C y 37 °C), así como para KCl 1 M (a 28 °C y 37 °C) y para las molaridades de 1.5 M, 1.7 M y. M (a 28 °C). A la temperatura de 4 °C todos los valores de densidad máxima se encontraron por debajo de la media.

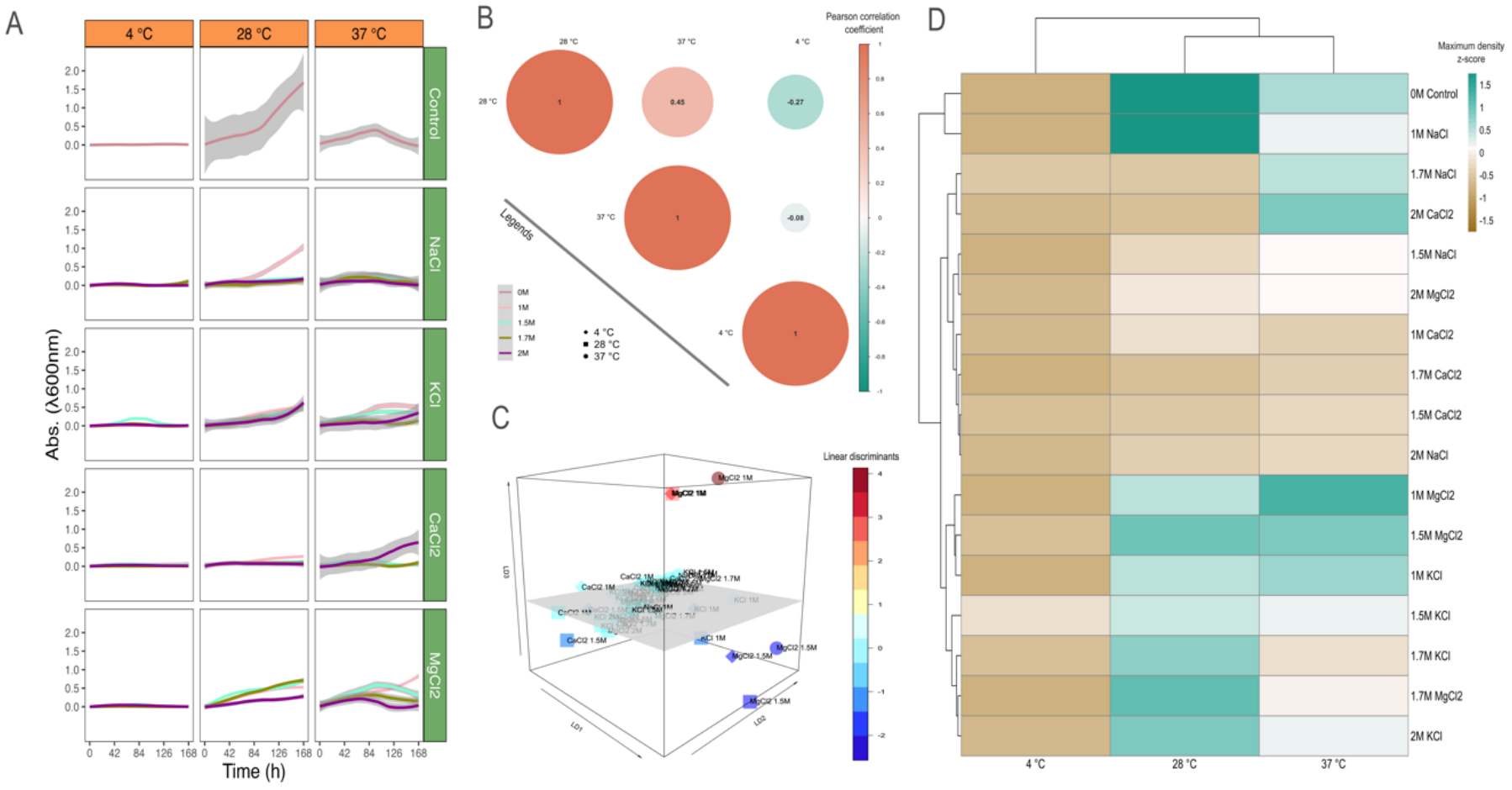


Figura 24. Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa EXF-8193 de *Exophiala dermatitidis* en diferentes concentraciones de sales caotrópicas ($CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl) y cosmotrópicas (NaCl y KCl) (1 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M) a las temperaturas de 4 °C, 28 °C y 37 °C. (A) Curvas de crecimiento. (B) Correlación de Pearson entre las temperaturas evaluadas. (C) Gráfico de Análisis Discriminante Lineal (LDA) entre los diferentes tratamientos y temperaturas evaluadas. (D) Mapa de calor entre los diferentes tratamientos y temperaturas evaluadas.

26-Discusión Capítulo 4

Es crucial investigar las capacidades osmoadaptativas de *E. dermatitidis* porque es una característica asociada de los sitios donde se encuentra esta especie como los ambientes interiores y hábitats naturales. En este capítulo se estudiaron las respuestas fisiológicas, metabólicas y morfológicas de *E. dermatitidis* EXF-8193 cuando se expone a concentraciones variadas de sales cosmotrópicas y caotrópicas.

Sudhadham et al. (2008) sugieren que la levadura negra *E. dermatitidis* pudo haberse originado en los bosques tropicales debido a sus diversas capacidades fisiológicas, incluyendo el polimorfismo, la termotolerancia, la diversidad nutricional, la producción de polisacáridos extracelulares y la osmoadaptación. No obstante, los principales entornos donde este patógeno se encuentra significativamente abundante son los espacios interiores, como baños, cocinas y lavavajillas (Kulesza et al., 2021; Zalar et al., 2011a; Zupančič et al., 2016). Las circunstancias poliextremotolerantes que ocurren en entornos como los lavavajillas están marcadas por una amplia gama de tolerancia, que incluye niveles bajos y altos de pH, temperaturas que alcanzan hasta 60°C o 80°C, estrés mecánico causado por la expulsión de agua, deshidratación periódica, altas cantidades de materia orgánica y concentraciones elevadas de NaCl (Zupančič et al., 2016).

La investigación sobre la capacidad de los hongos para tolerar ambientes caotrópicos es aún limitada (Oren, 2013) y la mayoría de los hongos muestran una tendencia hacia concentraciones relativamente altas de cosmótropos (Zajc et al., 2014). A pesar de que la mayoría de los estudios sobre *E. dermatitidis* se centran en sales cosmótropas como NaCl (Döğen et al., 2013; Gümral et al., 2016; Zalar et al., 2011), esta especie tiene la capacidad de crecer en sales caotrópicas (Zajc et al., 2014). Zajc et al. (2014), probaron la capacidad del aislamiento de agua dulce *E. dermatitidis* EXF-5573 para crecer en medio líquido de extracto de malta suplementado con diversas sales cosmótropas (NaCl 2.5 M, KCl 2.5 M y $MgSO_4$ 3 M) y sales caotrópicas (NaBr 0.75 M, $MgCl_2$ 0.75 M y $CaCl_2$ 0.5 M) (Zajc, 2014). En nuestro estudio, se utilizó la cepa EXF-8193, aislada de un glaciar, lo que representa un ambiente extremo distinto. Ambas cepas mostraron tolerancia a diferentes tipos de sales, sin embargo, mientras EXF-5573 toleró concentraciones más bajas de sales caotrópicas, EXF-8193 mostró crecimiento incluso en concentraciones elevadas de $MgCl_2$ (hasta 1.5 M), aunque con reducción en el diámetro de colonia. Estos resultados sugieren que, aunque ambas cepas son tolerantes a condiciones osmóticas, podrían existir diferencias en su capacidad adaptativa relacionadas con su origen ambiental y posiblemente con su dotación genética.

Nuestros hallazgos demuestran que el aislamiento *E. dermatitidis* EXF-8183 proveniente de sedimentos glaciares profundos puede prosperar en un medio sólido de MEA (Anexo 1) en presencia de sales de NaCl, KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$ a 1 M. Destacando su capacidad para prosperar en presencia de altas concentraciones de KCl (1.5 M y 1.7 M). Thomé-Oritz et al. (1998) sugirieron un mecanismo de intercambio de cationes de baja afinidad para la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii*. Este mecanismo permite el intercambio de cationes entre el interior y el exterior de la célula, incluso cuando hay grandes cantidades de cationes presentes (Thomé-Oritz et al., 1998). En *E. dermatitidis* EXF-8193, parece haber un proceso altamente efectivo de intercambio catiónico que le permite sobrevivir en ambientes con altos niveles tanto de sales caotrópicas como cosmótropas. Sin embargo, la proliferación de microorganismos está influenciada por el tipo de sal en el medio, ya que diferentes sales tienen distintos niveles de toxicidad. Por ejemplo, el NaCl es más tóxico que el KCl cuando están presentes en la misma concentración (Kumar et al., 2008). Los resultados de nuestro estudio validan que la inclusión de una concentración de 1 M de LiCl en el medio de cultivo suprime efectivamente el crecimiento de *E. dermatitidis* EXF-8193. De manera similar, para la especie de levadura *Debaryomyces hansenii*, sales como LiCl son tóxicas (Kumar et al., 2008).

A pesar del posible efecto tóxico causado por altas concentraciones de sales cosmótropas y caotrópicas, *E. dermatitidis* EXF-8193 demostró una notable adaptabilidad bioquímica, como lo evidencia su diversa oxidación y asimilación en presencia de concentraciones de 1 M de NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl. La mayoría de los grupos de sustratos examinados en presencia de sales de NaCl, KCl, $CaCl_2$ y $MgCl_2$ mostraron oxidación y

asimilación. Sin embargo, cuando se utilizó LiCl, solo se observó crecimiento en presencia del disacárido D-melibiosa (a-D-Galp-1,6-D-Glcp) como única fuente de carbono. Esto pudiera deberse a una similitud con lo observado en bacterias previamente identificadas como transportadoras de melibiosa, las cuales poseen un cotransportador que simultáneamente transporta iones de nitrógeno (N^+), hidrógeno (H^+) o litio (Li^+); ya que transportadores similares también se han encontrado en hongos, incluyendo *Colletotrichum graminicola*. Sin embargo, estos transportadores fúngicos no tienen una similitud secuencial significativa con los transportadores encontrados en bacterias (Lingner et al., 2011). Aunque el Li^+ tuvo un impacto considerable en la supervivencia de varios hongos, incluyendo *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium simplicissimum*, a una concentración de 5.9 mM (250 mg/L), incluso aunque *A. atacamensis* fue fuertemente suprimido por LiCl, se encontraron pequeñas colonias cuando se expuso a concentraciones de LiCl que iban de 0.5 a 1.5 M (Moreno-Perlin et al., 2023).

Nuestros resultados indican que *E. dermatitidis* EXF-8193 muestran una mejor tolerancia a la sal KCl, siendo estadísticamente relevante en la oxidación y asimilación en presencia del sustrato evaluado. Los resultados observados pueden atribuirse al hecho de que la presencia de KCl mejora la barrera de permeabilidad de la membrana plasmática y protege la integridad de la membrana. En *Saccharomyces pastorianus*, la adición de 4 o 10 g/L de KCl reduce la liberación de nucleótidos bajo condiciones de estrés hiperosmótico (Xu et al., 2020). Además, la inclusión de potasio tiene un efecto significativo sobre la despolarización de las células que metabolizan glucosa y disminuye la liberación de nucleótidos (Xu et al., 2020). Además, la regulación efectiva de la presión osmótica se logra mediante un control meticuloso de los niveles intracelulares de iones inorgánicos. Típicamente, esto se refiere al proceso de mantener niveles adecuados de K^+ dentro de las células mientras se eliminan cantidades excesivas de Na^+ y otros iones dañinos (como Mg^{2+}, Li^+ u otros, dependiendo del entorno) (Gostinčar et al., 2023).

Babič et al. (2018), proporcionan evidencia que respalda el carácter oligotrófico de *E. dermatitidis*. Esto se debe a que la especie se encuentra predominantemente en ambientes con disponibilidad limitada de nutrientes, como aguas dulces, sedimentos de aguas profundas, respiradores hidrotermales de aguas profundas, arena de playa, aguas termales naturales y glaciares. Es importante señalar que nuestros resultados indican que la cepa EXF-8193 exhibe características oligotróficas al prosperar tanto en agua sin sal como enconcentraciones de 1 M de KCl y $CaCl_2$. Estos resultados son interesantes debido a que *E. dermatitidis* EXF-8193 fue aislada de sedimentos glaciares que generalmente se caracterizan como ambientes con poca disponibilidad de nutrientes.

Nuestros resultados sobre el metabolismo de las cepas de *E. dermatitidis* demostraron una amplia gama de capacidades metabólicas en diferentes sustratos como aminoácidos, ácidos orgánicos, polialcoholes y azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), resaltando el metabolismo versátil de las cepas de *E. dermatitidis* (EXF-10123, EXF-5586, EXF-8193, EXF-9187 y EXF-13310) mediante huellas metabólicas utilizando sistemas de fenotipificación de alto rendimiento Biolog (Consultar Capitulo 1). Además, Prenafeta-Boldú et al. (2006), evaluaron la habilidad de *E. dermatitidis* para metabolizar varios carbohidratos como D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, L-arabinoso, sacarosa, maltosa, α-trehalosa, celobiosa, salicina, rafinosa y melezitosa. Además, los aislamientos clínicos mostraron crecimiento en varios alcoholes, incluyendo glicerol, mesoeritritol, xilitol, D-glucitol y etanol, así como en etilamina, lisina y cadaverina (Babič et al., 2018). Sin embargo, hasta el momento los estudios sobre las capacidades metabólicas de *E. dermatitidis* no habían considerado la presencia de altas concentraciones de sales cosmotrópicas y caotrópicas en el medio. Este vacío de conocimiento comienza a ser abordado en el presente estudio, lo que permite explorar cómo este microorganismo podría responder a condiciones hipotéticas que reflejen los entornos de los que ha sido aislado.

La actividad metabólica de *Aspergillus* sp. fue examinada en presencia de NaCl utilizando varios sustratos de carbono encontrados en las placas Biolog. La cepa *A. atacamensis* EXF-6660 demostró una significativa adaptabilidad bioquímica, como lo reveló su diverso metabolismo en tratamientos que contenían 0.85 M y 2.0 M de NaCl (Moreno-Perlin et al., 2023). *Aspergillus terreus* NTOU4989 demostró la capacidad de metabolizar la mayoría de los sustratos de carbono encontrados en las placas Biolog, bajo una concentración de NaCl de 0.5 M (Chou et al., 2022).

Los hallazgos de nuestro estudio demuestran que *E. dermatitidis* EXF-8193 exhibe osmotolerancia y posee una resistencia significativa a altos niveles de sal. La cepa es capaz de prosperar en altas concentraciones de KCl, específicamente a 1 M, 1.5 M, 1.7 M y 2 M, así como en 1 M de NaCl, cuando la temperatura se mantiene a 28 °C. Bajo condiciones de temperatura idénticas, exhibe crecimiento en soluciones que contienen $MgCl_2$ a concentraciones de 1 M, 1.5 M y 1.7 M, así como en una solución que contiene 1 M de $CaCl_2$. Sin embargo, el crecimiento se ve afectado por la temperatura en presencia de sales tanto caotrópicas como cosmotrópicas. Los hallazgos sugieren que la incubación a 4 °C afecta negativamente el crecimiento de la cepa EXF-8193. Los compuestos anticongelantes sirven para proteger contra el daño causado por la formación de cristales de hielo dentro de las células, sin embargo, los procesos enzimáticos aún se ven impedidos por las bajas temperaturas. En consecuencia, la proliferación de especies extremotolerantes y extremofílicas tiende a ser lenta. Además, la temperatura reducida y el aumento de la salinidad modifican la flexibilidad de las membranas lipídicas e interfieren con los procesos que ocurren dentro de la membrana. Los transportadores de membrana, junto con otras proteínas unidas a la membrana celular, dependen de una fluidez suficiente de la membrana celular para su correcto funcionamiento y el mantenimiento de la integridad celular. Los hongos psicrófilos reducen la saturación y la longitud promedio de los ácidos grasos y disminuyen la proporción de esteroles a fosfolípidos a bajas temperaturas (Gostinčar et al., 2023). Además, una célula típica experimenta una acumulación de especies reactivas de oxígeno cuando se ve sometida a circunstancias de estrés causadas por la alta osmolaridad y las bajas temperaturas (Gostinčar et al., 2023). Sin embargo, se sabe que varios mecanismos celulares están involucrados en la adaptación a estos tipos de estrés.

La vía de transducción de señales de alta osmolaridad de glicerol (HOG) es reconocida por su capacidad para reaccionar ante diversas situaciones de estrés, como la alta osmolaridad y las bajas temperaturas, alterando los procesos de transcripción, transducción y ubiquitinación. Además, la acumulación de glicerol no solo sirve como una reacción al estrés osmótico, sino también como un mecanismo crioprotector (Gostinčar et al., 2023)

Nuestros resultados sugieren que la cepa EXF-8193 de *E. dermatitidis* es osmotolerante debido a que no requiere de la presencia de sales para continuar su crecimiento. Sin embargo, es capaz de adaptarse y sobrevivir bajo el estrés impuesto por altas concentraciones de sales tanto cosmotrópicas y caotrópicas esto sugiere que presenta la maquinaria molecular necesaria para adaptarse a estas condiciones. Además, la temperatura afecta su crecimiento en presencia de sales. El tipo de nutriente disponible influye en su osmotolerancia, asi como la posible relación entre su oligotropismo y la presencia de sales en el medio.

27-Conclusiones Capítulo 4

1-En medio sólido, *E. dermatitidis* EXF-8193 creció en presencia de sales caotrópicas y cosmotrópicas a 1 M, con mejor desarrollo en KCl y $CaCl_2$. El crecimiento fue inhibido a concentraciones más altas de KCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ y LiCl. Las colonias más grandes se observaron en el control sin sal y en KCl 1 M.

2- La cepa *E. dermatitidis* EXF-8193 muestra que las sales afectan la asimilación de fuentes de carbono, siendo LiCl inhibitorio y KCl y $CaCl_2$ favorecedores. El crecimiento es óptimo sin sal o con KCl, y los patrones de asimilación varían según la sal presente, lo que sugiere que las sales influyen en los procesos metabólicos.

3- La presencia de diferentes sales afecta la oxidación de sustratos en *E. dermatitidis* EXF-8193, siendo el control sin sal el tratamiento más favorable. Sales como NaCl y KCl favorecen la oxidación de azúcares, mientras que $MgCl_2$ y LiCl tienen efectos variables, indicando que las sales influyen en el perfil metabólico de la cepa.

4-La temperatura afecta la osmotolerancia de *E. dermatitidis* EXF-8193, con un crecimiento óptimo a 28 °C. Las sales caotrópicas y cosmotrópicas influyen de manera diferente, destacando el $MgCl_2$. A 4 °C, el crecimiento es limitado, mientras que a 28 °C y 37 °C se observan mayores densidades.

28-Referencias Capítulo 4

Babič, M.N., Zupančič, J., Gunde-Cimerman, N., de Hoog, S., Zalar, P., 2018. Ecology of the Human Opportunistic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Indicates Preference for Human-Made Habitats. Mycopathologia 183, 201–212. https://doi.org/10.1007/s11046-017-0134-8

Chou, H.-Y., Chiang, M.W.-L., Lin, W.-R., Hsieh, S.-Y., Jones, E.B.G., Guo, S.-Y., Pang, K.-L., 2022. Metabolic activity on Biolog FF MicroPlate suggests organic substrate decomposition by *Aspergillus terreus* NTOU4989 isolated from Kueishan Island Hydrothermal Vent Field, Taiwan. Fungal Ecol 60, 101157. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101157

Cockell, C.S., Osinski, G., Sapers, H., Pontefract, A., Parnell, J., 2020. Microbial Life in Impact Craters. Curr Issues Mol Biol 75–102. https://doi.org/10.21775/cimb.038.075

De Mendiburu F, Simon R, 2015. Agricolae - Ten years of an Open source Statistical tool forexperiments in Breeding, agriculture and biology. PeerJ Prepr 3, e1404v1.

Döğen, A., Kaplan, E., Öksüz, Z., Serin, M.S., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2013. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol 51, 493–498. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738313

Eardley, J., Dedi, C., Dymond, M., Hallsworth, J.E., Timson, D.J., 2019. Evidence for chaotropicity/kosmotropicity offset in a yeast growth model. Biotechnol Lett 41, 1309–1318. https://doi.org/10.1007/s10529-019-02737-8

Fernando, L.D., Pérez-Llano, Y., Dickwella Widanage, M.C., Jacob, A., Martínez-Ávila, L., Lipton, A.S., Gunde-Cimerman, N., Latgé, J.-P., Batista-García, R.A., Wang, T., 2023. Structural adaptation of fungal cell wall in hypersaline environment. Nat Commun 14, 7082. https://doi.org/10.1038/s41467-023-42693-6

Gostinčar, C., Gunde-Cimerman, N., 2023. Understanding Fungi in Glacial and Hypersaline Environments. Annu Rev Microbiol 77, 89–109. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032521-020922

Gostinčar, C., Stajich, J.E., Gunde-Cimerman, N., 2023. Extremophilic and extremotolerant fungi. Current Biology 33, R752–R756. https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.06.011

Gümral, R., Özhak-Baysan, B., Tümgör, A., Saraçlı, M.A., Yıldıran, Ş.T., Ilkit, M., Zupančič, J., Novak-Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G.S., 2016. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. Fungal Divers 76, 1–9. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0327-8

Hamill, P.G., Stevenson, A., McMullan, P.E., Williams, J.P., Lewis, A.D.R., S, S., Stevenson, K.E., Farnsworth, K.D., Khroustalyova, G., Takemoto, J.Y., Quinn, J.P., Rapoport, A., Hallsworth, J.E., 2020. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. Sci Rep 10, 5948. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4

Hofmeister, F., 1888. Zur lehre von der wirkung der salze: zweite mittheilung.

Jari Oksanen, Gavin L. Simpson, F. Guillaume Blanchet, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Peter R. Minchin, R.B. O'Hara, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs, Helene Wagner, Matt Barbour, Michael Bedward, Ben Bolker, Daniel Borcard, Gustavo Carvalho, Michael Chirico, Miquel De Caceres, Sebastien Durand, Heloisa Beatriz Antoniazi Evangelista, Rich FitzJohn, Michael Friendly, Brendan Furneaux, Geoffrey Hannigan, Mark O. Hill, Leo Lahti, Dan McGlinn, Marie-Helene Ouellette, Eduardo Ribeiro Cunha, Tyler Smith, Adrian Stier, Cajo J.F. Ter Braak, James Weedon, 2022. Vegan: Community ecology package [WWW Document].

Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R.R., Sánchez-Carbente, M. del R., Folch-Mallol, J.L., Pérez-Llano, Y., Gunde-Cimerman, N., Sánchez, N. del C., Batista-García, R.A., 2020. Haloadaptative Responses of *Aspergillus sydowii* to Extreme Water Deprivation: Morphology, Compatible Solutes, and Oxidative Stress at NaCl Saturation. Journal of Fungi 6, 316. https://doi.org/10.3390/jof6040316

Kulesza, K., Biedunkiewicz, A., Nowacka, K., Dynowska, M., Urbaniak, M., Stępień, Ł., 2021. Dishwashers as an Extreme Environment of Potentially Pathogenic Yeast Species. Pathogens 10, 446. https://doi.org/10.3390/pathogens10040446

Kumar, S., Lal, P., Gummadi, S.N., 2008. Growth of Halotolerant Food Spoiling Yeast *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 Under the Influence of pH and Salt. Curr Microbiol 57, 598–602. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9249-y

Kumari, A., Mihooliya, K.N., Sahoo, D.K., Bhattacharyya, M.S., Prasad, G.S., Pinnaka, A.K., 2023. Description of lipase producing novel yeast species *Debaryomyces apis* f.a., sp. nov. and a modified pH indicator dye-based method for the screening of lipase producing microorganisms. Sci Rep 13, 11819. https://doi.org/10.1038/s41598-023-38241-3

Lingner, U., Münch, S., Sode, B., Deising, H.B., Sauer, N., 2011. Functional Characterization of a Eukaryotic Melibiose Transporter. Plant Physiol 156, 1565–1576. https://doi.org/10.1104/pp.111.178624

Moreno-Perlin, T., Valdés-Muñoz, G., Jiménez-Gómez, I., Gunde-Cimerman, N., Yarzábal Rodríguez, L.A., Sánchez-Carbente, M. del R., Vargas-Fernández, A., Gutiérrez-Cepeda, A., Batista-García, R.A., 2023. Extremely chaotolerant and kosmotolerant *Aspergillus atacamensis* – a metabolically versatile fungus suitable for recalcitrant biosolid treatment. Front Microbiol 14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1191312

Oren, A., 2013. Life in Magnesium- and Calcium-Rich Hypersaline Environments: Salt Stress by Chaotropic Ions. pp. 215–232. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_8

Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol 28, 56–63. https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2022. Xerophiles, in: Fungi and Food Spoilage. Springer International Publishing, Cham, pp. 441–463. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3_9

Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Sybren de Hoog, G., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol Rev 30, 109–130. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x

R Core Team, 2022. R version 4.2. 2. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Rico, A., Preston, G.M., 2008. Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. Molecular Plant-Microbe Interactions® 21, 269–282. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0269

Sarkar, S., Singh, N.A., Rai, N., 2022. Xerophilic Fungi: Physiology, Genetics and Biotechnology, in: Extremophilic Fungi. Springer Nature Singapore, Singapore, pp. 253–270. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4907-3_13

Stevenson, A., Burkhardt, J., Cockell, C.S., Cray, J.A., Dijksterhuis, J., Fox-Powell, M., Kee, T.P., Kminek, G., McGenity, T.J., Timmis, K.N., Timson, D.J., Voytek, M.A., Westall, F., Yakimov, M.M., Hallsworth, J.E., 2015. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. Environ Microbiol 17, 257–277. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12598

Sudhadham, M., Prakitsin, S., Sivichai, S., Chaiyarat, R., Dorrestein, G.M., Menken, S.B.J., de Hoog, G.S., 2008. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. Stud Mycol 61, 145–155. https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.15

Thomé-Oritz, P.E., Peña, A., Ramírez, J., 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. Yeast 14, 1355–1371. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199811)14:15<1355::AID-YEA331>3.0.CO;2-0

Troncoso, E., Barahona, S., Carrasco, M., Villarreal, P., Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M., 2017. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. Polar Biol 40, 649–658. https://doi.org/10.1007/s00300-016-1988-9

Williams, J.P., Hallsworth, J.E., 2009. Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function? Environ Microbiol 11, 3292–3308. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02079.x

Xu, Y., Yang, H., Brennan, C.S., Coldea, T.E., Zhao, H., 2020. Cellular mechanism for the improvement of multiple stress tolerance in brewer's yeast by potassium ion supplementation. Int J Food Sci Technol 55, 2419–2427. https://doi.org/10.1111/ijfs.14491

Zajc, J., DÅ¾eroski, S., Kocev, D., Oren, A., Sonjak, S., Tkavc, R., Gunde-Cimerman, N., 2014. Chaophilic or chaotolerant fungi: a new category of extremophiles? Front Microbiol 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00708

Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S., Gunde-Cimerman, N., 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol 115, 997–1007. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.007

Zupančič, J., Novak Babič, M., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., 2016. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. PLoS One 11, e0148166. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148166

29-Perspectivas futuras

Respuesta al estrés

A pesar de los avances en la comprensión de las respuestas al estrés en *E. dermatitidis*, aún existen áreas críticas poco exploradas que requieren mayor atención. En particular, los mecanismos celulares y moleculares que permiten la supervivencia en condiciones de oligotrofía extrema siguen siendo desconocidos. Dado que estos ambientes presentan una disponibilidad de nutrientes sumamente limitada, es fundamental investigar las estrategias metabólicas que *E. dermatitidis* emplea para persistir en tales condiciones.

Otro aspecto crucial es el estudio de respuestas combinadas a múltiples estresores. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios han evaluado los efectos de factores individuales, como temperatura extrema, radiación o salinidad. Sin embargo, en ambientes naturales estos factores suelen actuar en conjunto, por lo que es necesario caracterizar cómo *E. dermatitidis* ajusta su metabolismo y su expresión génica ante combinaciones de condiciones adversas. En este contexto, el análisis de la respuesta diferencial a distintos tipos de estrés por baja actividad de agua, incluyendo sales caotrópicas, cosmotrópicas y compuestos orgánicos como el glicerol o el sorbitol, podría aportar información clave sobre los mecanismos específicos de adaptación.

Las aproximaciones ómicas, como la transcriptómica, proteómica y metabolómica, son herramientas esenciales para descifrar los cambios a nivel global en *E. dermatitidis* bajo condiciones poliextremófilas. No obstante, estos estudios deben complementarse con experimentos fisiológicos detallados para validar las hipótesis generadas. Asimismo, el desarrollo de herramientas genéticas avanzadas, como la mutagénesis dirigida y la edición génica, permitiría evaluar la función de genes clave involucrados en la respuesta al estrés y en la regulación de la homeostasis celular.

La regulación genética de la respuesta al estrés en *E. dermatitidis* sigue siendo un campo poco explorado. En particular, se desconoce el papel de elementos reguladores como microARNs, ARN circulares y otras formas de ARN no codificante en la modulación de genes críticos para la adaptación a ambientes extremos. Además, la interacción entre redes de señalización, como la vía HOG, y estos mecanismos reguladores podría revelar nuevas estrategias de adaptación.

Otro campo de interés es la modulación del proteoma a través de modificaciones postraduccionales (PTMs). Estas modificaciones pueden desempeñar un papel clave en la estabilidad y función de proteínas bajo estrés por oligotrofia, temperatura extrema o salinidad elevada, proporcionando una capa adicional de regulación en la respuesta celular.

Desde un punto de vista biotecnológico, la exploración del metabolismo secundario de *E. dermatitidis* es prometedora. Se ha identificado que ciertos grupos de genes biosintéticos (BGCs) podrían estar involucrados en la producción de metabolitos especializados en la adaptación a condiciones extremas en *Exophiala*. Identificar y activar estos clusters podría revelar nuevos compuestos con aplicaciones ecológicas y biotecnológicas. Asimismo, la producción de metabolitos protectores, como trehalosa, polialcoholes y carotenoides, bajo estrés oxidativo o radiación iónica, representa otra línea de investigación con alto potencial.

Finalmente, la regulación y reprogramación de transportadores de membrana en *E. dermatitidis* es un área poco estudiada. La capacidad de estos hongos para mantener el equilibrio iónico y detoxificar iones caotrópicos sugiere la presencia de mecanismos especializados de homeostasis. Comprender estos procesos podría proporcionar información valiosa sobre la capacidad de *E. dermatitidis* para habitar ambientes altamente inestables.

Abordar estas lagunas de conocimiento mediante estudios integrados permitirá avanzar en la comprensión de las estrategias adaptativas de *Exophiala*, con implicaciones tanto en ecología microbiana como en aplicaciones biotecnológicas.

Papel de la melanina

Las futuras investigaciones sobre la melanina en *E. dermatitidis* deben abordar múltiples aspectos aún desconocidos, ampliando nuestra comprensión de su función ecológica y fisiológica más allá de su papel protector contra el estrés oxidativo, la radiación UV y la desecación. Aunque la melanina tipo DHN ha sido la más estudiada, otros tipos como la DOPA-melanina y la piomelanina han recibido poca atención, a pesar de que podrían desempeñar funciones diferenciadas en la resistencia a condiciones extremas como variaciones de pH, baja disponibilidad de agua y temperaturas extremas.

Es fundamental explorar los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de melanina en respuesta a factores ambientales y cómo las rutas biosintéticas se ajustan a distintos tipos de estrés. Además, la secreción de melanina al medio extracelular en otras especies, como *E. viscosa*, plantea interrogantes sobre su posible función adaptativa y los factores que regulan este proceso.

Asimismo, se requiere un enfoque más específico para evaluar el impacto de la melanina en la supervivencia y resistencia de *E. dermatitidis*, dado que su efecto podría no ser universal en todas las especies del género. Para ello, estudios utilizando técnicas avanzadas de imagen, como la resonancia magnética nuclear en estado sólido, permitirían analizar la arquitectura de la pared celular bajo distintas condiciones de estrés y en cepas silvestres y mutantes deficientes en melanina. Estos estudios proporcionarían información clave sobre la relación entre la melanina, la integridad de la pared celular y la adaptación de *E. dermatitidis* a ambientes extremos.

Anexos

Medios de cultivo utilizados en este estudio:

Anexo 1. Malt extract agar (MEA)

Agua desionizada	1 L
Extracto de malta	20 g
Dextrosa	20 g
Peptona de caseína	1 g
Agar	20 g
pH	7

Anexo 2. Malt extract broth (MEB)

Agua desionizada	1 L
Extracto de Malta	20 g
Dextrosa	20 g
Peptona de caseína	1 g
pH	7

Anexo 3. Minimum Medium (MM)

Agua desionizada	800 mL
$CuSO_4$ x $5H_2O$	6.24 mg
$FeSO_4$ x $7H_2O$	14.4 mg
$MgSO_4$ x $7H_2O$	400 mg
$ZnSO_4$	8 mg
KCl	40 mg
K_2HPO_4	800 mg
NH_4NO_3	1.6 g
pH	7

Anexo 4. Müeller - Hinton Agar (*Antifungal Susceptibility*)

Agua desionizada	1000 mL
Extracto de malta	2 g
Caseína hidrolizada	17.5 g

Almidón	1.5 g
Agar	17 g
pH	7.3 ± 8

Todos los medios de cultivo y el material de trabajo fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras durante 20 minutos.

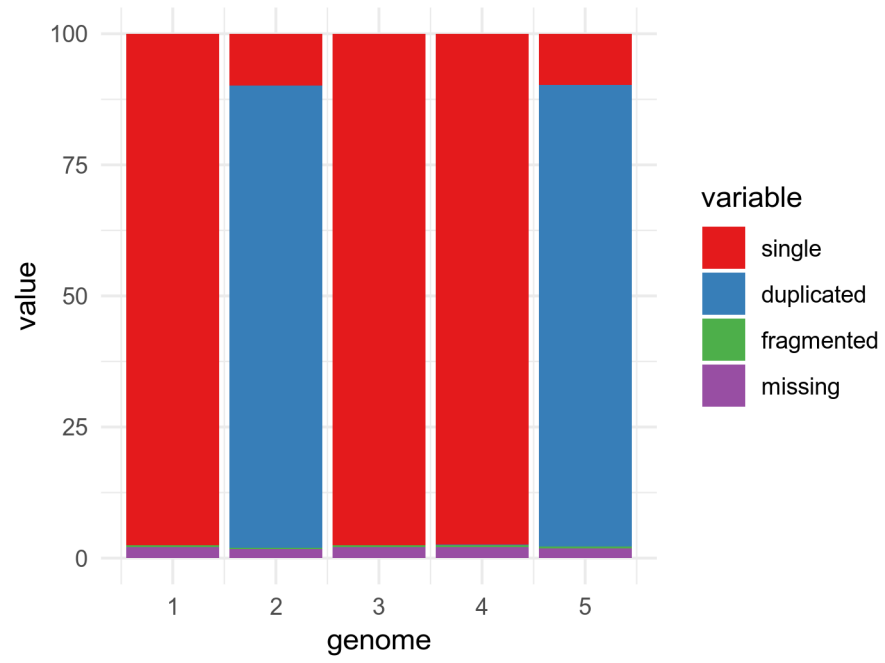


Figura A. Gráfico de barras que muestra las estadísticas de integridad del genoma generados mediante el software BUSCO para las cepas (1) EXF-8193, (2) EXF-9187, (3) EXF-10123, (4) EXF-13310 y (5) EXF-5586 de *Exophiala dermatitidis*.

Tabla 1. Cepas de *Exophiala dermatitidis* obtenidas del NCBI utilizadas en el estudio del pangenoma.

Cepas de *E. dermatitidis*	Tamaño del Genoma	Tipo de ensamblaje	Sitio de aislamiento	Enfermedad en el huésped	Número de acceso	BioSample ID
NIH/UT8656	26.4 Mb	haploide	*Homo sapiens*	-	GCA_000230625.1	SAMN00760826
DCF04	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028024355.1	SAMN15064405
Ex23	25.8 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028025295.1	SAMN15064424
Ex22	24.1 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_030028065.1	SAMN15064423
Ex21	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028025565.1	SAMN15064422
Ex20	24.4 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028026005.1	SAMN15064421
Ex19	24.8 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028026235.1	SAMN15064420
Ex18	26.2 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028027445.1	SAMN15064419
Ex17	24.8 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028026935.1	SAMN15064418

Ex16	24.3 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028027435.1	SAMN15064417
Ex14	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028027445.1	SAMN15064415
Ex13	26.7 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028027615.1	SAMN15064414
Ex12	23.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028027665.1	SAMN15064413
Ex11	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028028135.1	SAMN15064412
Ex10	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028028245.1	SAMN15064411
Ex9	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028028305.1	SAMN15064410
Ex8	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_030028025.1	SAMN15064409
Ex7	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028028335.1	SAMN15064408
Ex6	26.7 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028023995.1	SAMN15064407
Ex5	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028024125.1	SAMN15064406
Ex3	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028024475.1	SAMN15064404
Ex2	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028024505.1	SAMN15064403
Ex1	26.6 Mb	haploide	*Homo sapiens*	Fibrosis quística / Esputo respiratorio	GCA_028025245.1	SAMN15064402

Tabla 2. Estadística general de los genomas de cepas de *Exophiala dermatitidis* analizadas mediante OrthoFinder.

Número de cepas de *E. dermatitidis*	**28**
Número de genes	277819
Número de genes en ortogrupos	277132
Número de genes no asignados	687
Porcentaje de genes en ortogrupos	99.8
Porcentaje de genes no asignados	0.2

Número de ortogrupos	14018
Número de ortogrupos específicos por especies	27
Número de genes en ortogrupos específicos por especies	57
Porcentaje de genes en ortogrupos específicos por especie	0.0
Tamaño medio de ortogrupo	19.8
Tamaño mediano de ortogrupo	28.0
G50 (genes asignados)	28
G50 (todos los genes)	28
O50 (genes asignados)	4556
O50 (todos los genes)	4569
Número de ortogrupos con presencia de todas las especies	6929
Número de ortogrupos de copia única	2813

Tabla 3. Estadísticas por especie de los genomas de cepas de *Exophiala dermatitidis* analizadas mediante OrthoFinder. La sobre azul en la tabla corresponde con las cepas EXF-10123, EXF-13310, EXF-5586, EXF-8193 y EXF9187 utilizadas en este estudio, el resto corresponden a las cepas de *E. dermatitidis* descargadas del NCBI.

	DCF04	**EXF_10123**	**EXF_13310**	**EXF_5586**	**EXF_8193**	**EXF_9187**	**Ex10**	**Ex11**	**Ex12**	**Ex13**	**Ex14**	**Ex16**	**Ex17**	**Ex18**	**Ex19**	**Ex20**	**Ex21**	**Ex22**	**Ex23**	**Ex3**	**Ex5**	**Ex6**	**Ex7**	**Ex8**	**Ex9**	**NIH:UT8656**
Número de genes	10027	8945	8913	17380	8896	17337	9536	10048	9525	8436	10037	10007	8694	8859	9353	8864	9536	8674	9536	9057	9246	8771	10024	8798	10252	9975	9515	9578
Núemro de genes en ortogrupos	10026	8942	8909	17262	8887	17252	9533	10036	9524	8426	10019	9994	8694	8857	9331	8861	9536	8669	9530	9057	9229	8766	10014	8785	10236	9939	9509	9309
Número de genes	1	3	4	118	9	85	3	12	1	10	18	13	0	2	22	3	0	5	6	0	17	5	10	13	16	36	6	269

no asignados																											
Porcentaje de genes en ortogrupos	100.0	100.0	100.0	99.3	99.9	99.5	100.0	99.9	100.0	99.9	99.8	99.9	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	99.9	99.9	100.0	99.8	99.9	99.9	99.9	99.8	99.6	99.9	97.2
Porcentaje de genes no asignados	0.0	0.0	0.0	0.7	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1	2.8
Número de ortogrupos que contienen especies	9661	8929	8888	12621	8860	12615	9514	9660	9507	8411	9648	9659	8676	8837	9307	8844	9522	8650	9515	8738	9208	8743	9655	8756	9655	8619	9492	8999
Porcentaje de ortogrupos que contienen especies	68.9	63.7	63.4	90.0	63.2	90.0	67.9	68.9	67.8	60.0	68.8	68.9	61.9	63.0	66.4	63.1	67.9	61.7	67.9	62.3	65.7	62.4	68.9	62.5	68.9	68.6	67.7	64.2
Número de ortogrupos específicos de especie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
Número de genes en ortogrupos específico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57

s de especie																												
Porcentaje de genes en ortogrupos específicos de especie	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6

Tabla 4. Clasificación de ortogrupos presentes en los genomas estudiados del pangenoma de *Exophiala dermatitidis*.

Cepas	Accesorios	No escenciales	Únicos
EXF_10123	1979	21	0
EXF_13310	1953	6	0
EXF_5586	1978	3714	0
EXF_8193	1926	5	0
EXF_9187	1970	3716	0
Ex1	2579	6	0
Ex10	2715	16	0
Ex11	2578	0	0
Ex12	1479	3	0
Ex13	2705	14	0
Ex14	2709	21	0
Ex16	1745	2	0
Ex17	1905	3	0
Ex18	2374	4	0
Ex19	1913	2	0
Ex2	2591	2	0
Ex20	1717	4	0
Ex21	2584	2	0
Ex22	1802	7	0
Ex23	2275	4	0
Ex3	1776	38	0
Ex5	2708	18	0
Ex6	1785	42	0
Ex7	2706	20	0

Ex8	2675	15	0
Ex9	2561	2	0
NIH:UT8656	2005	38	27

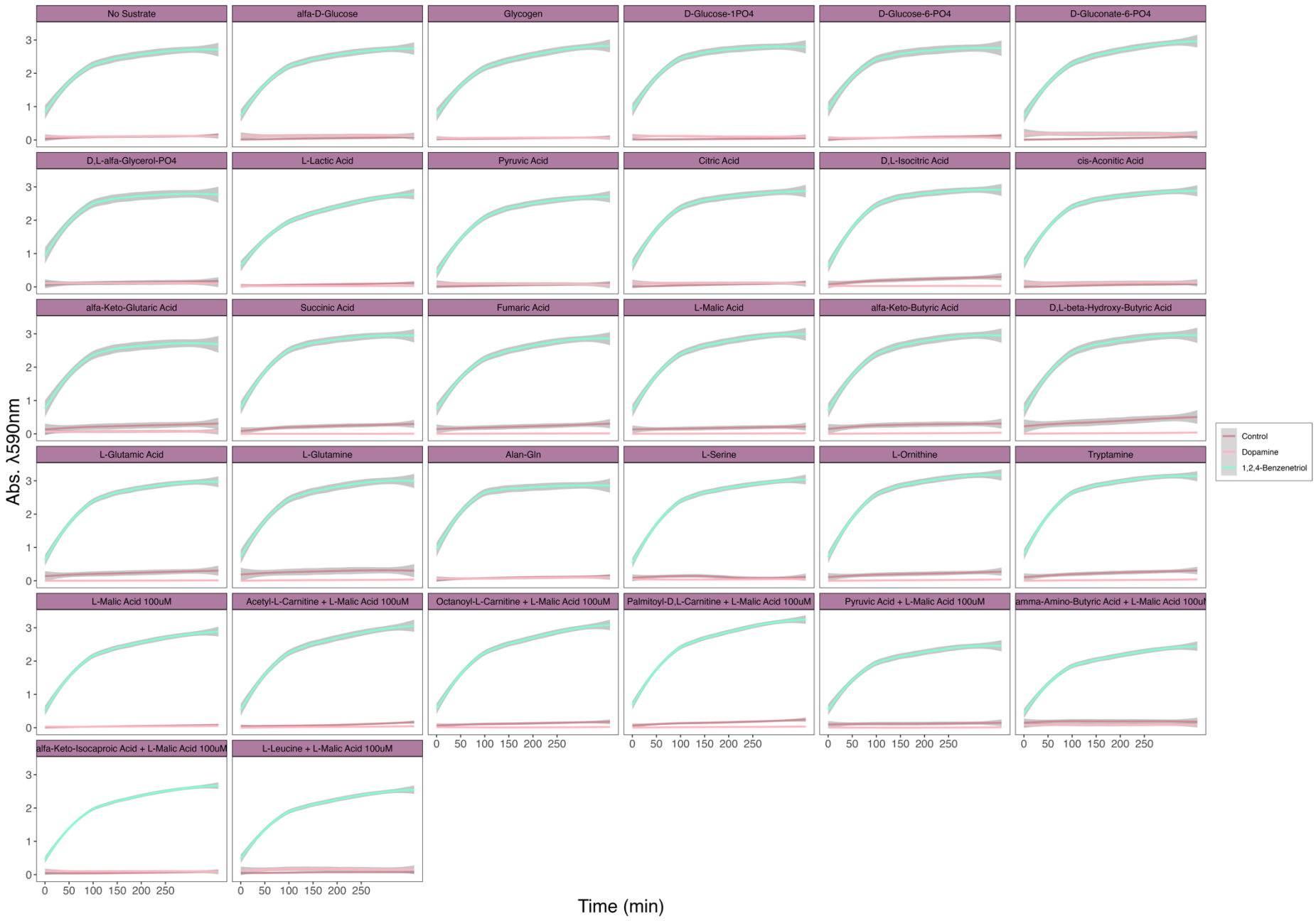


Figura B. Curvas de crecimiento de la actividad metabólica mitocondrial de *Exophila dermatitidis* EXF-10123 mediante la MitoPlateTM S-1 de Biolog, crecido en presencia de dopamina y 1,2,4-bencenotriol

Cuernavaca, Morelos, a 27 de febrero del 2025

AVISO

He recibido copia de la tesis titulada: "Análisis polifásico de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de diferentes ambientes en condiciones de estrés" , elaborada por la M. en C. Lyselle Ruiz de León, candidata a Doctorado en Ciencias.

JURADO	NOMBRE	ADSCRIPCIÓN	LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	FIRMA	FECHA
PRESIDENTE	Dr. Armando Hernández Mendoza	CIDC-UAEM	Estructura y Función de Macromoléculas		
SECRETARIO	Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla	CIDC-UAEM	Estructura y Función de Macromoléculas		
VOCAL	Dra. Heidy Peidro Guzman	Universidad de Michigan	Biología Molecular de Hongos Extremófilos e Ingeniería Ambiental		
VOCAL	Dr. Jorge Luis Folch Mallol	CEIB - UAEM	Biología Molecular de Hongos Extremófilos		
VOCAL	Dra. Verónica Lira Ruan	CIDC-UAEM	Dinámica Celular		
SUPLENTE	Dr. Luis Andrés Yarzábal Rodríguez	Universidad Católica de Cuenca (UCACUE)	Microbiología Molecular		
SUPLENTE	Dra. Sonia Dávila Ramos	CIDC-UAEM	Dinámica Celular		

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

JEFATURA DE POSGRADO EN CIENCIAS

Atentamente
Por una humanidad culta

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
(FIRMA ELECTRÓNICA

C.e.p. Archivo.
LARA/MCAS/dvfss

Cuernavaca, Morelos, a 27 de febrero de 2025.
PC/045/2025

Dr. Armando Hernández Mendoza
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla
Dra. Heidy Peidro Guzman
Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Dra. Verónica Lira Ruan
Dr. Luis Andrés Yarzábal Rodríguez
Dra. Sonia Dávila Ramos

P R E S E N T E

Me es grato informarle que la Comisión Académica Interna del Posgrado en Ciencias (CAIP), en su reunión del día 06 de noviembre de 2024, autorizó que la M. en C. Lyselle Ruiz de León, presente examen para optar por el grado académico de Doctorado en Ciencias, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Análisis polifásico de una colección de cepas de *Exophiala dermatitidis* aisladas de diferentes ambientes en condiciones de estrés", realizado bajo la dirección de la Dra. Sonia Dávila Ramos.

Adjuntamos copia de la tesis y el documento donde usted registrará su aprobación si la tesis cumpliera con los requisitos para la obtención del grado. Solicito atentamente realizar la revisión de la tesis ***en un plazo no mayor a 20 días hábiles de acuerdo al Artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM.***

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.



Atentamente
Por una humanidad culta

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
(FIRMA ELECTRÓNICA)

C.e.p. Archivo.
LARA/MCAS/dvfss*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | **Fecha:2025-02-28 11:40:05** | **FIRMANTE**

vp2PfsoFiqAH7v/3OAyqWUypiR7EEiETpZHsGgF9Ywm2eXilKIesQkExq4Nn1ADZmgfpodZrs0bG8f5DiBRVCY+2rl/CCCCiHBU2xKBbVt38HpAPdrZb0GTEbcjv1EI9EU/B2JbPHttZzIvr52KOA060CAhBneU3RNPfWTP5WtkosGtCCgiZFOaeN5Kd5CUOiJBV82SDPv/8bMse1zAXk14nCqPvOaz6qtB0VwSrCd8cWWmRRrM56axLqHyaChp+dTfONpLpKADS81k/zjQuIPLrwYcN6rwrdQdbqUyNpQSMLeIj7tpa5YkdET3gECQR6SGEUc7B5zYDG7ORBOpxzg==

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

meFBoysar

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7aaETCIVwYI5uVf0DRGcWGjSDU0UE07g

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2025-03-31 11:50:46 | FIRMANTE

VElhLIYWSQDZ3M9uQ5HZf6vufS8c5VDDOP/pau3veD2oT8henh9rrWTQReJwKhfGZj2Q6g7dZLMpWBA82RQ9EI2xvblcWCrPpkeKCfBZhgB5LAFrkK6yd3gU11eiZ/vjyMWxzzWeMqcwbAYbJrKCiCB5C0Nr3vZWlf7F0dHQ6bH7gyWDi0CEMSMJRhp28Ek01TKXUi6X9Z77Nyf9tQFU7EtTMo4acjziO5rMTRNZuG3LVESxjpBoS9FFiHEn6agoRS72k2vCRmgAERTw49gQtM9MeicTbBtq061HTrPVONREdpQ7v00aZvUIEKqrHY1DBngiDwToKOiGhtla26KTnw==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2025-03-31 11:54:58 | FIRMANTE

eJwxLicHAzvAVR5B7k88VmDw1UN3xvjerpVCjy51MxGiZoggqywNsK0P3PsAoWmhGtmt2L6efLZqkbIZavYzkiWMG1/xMDEEsBHRFHgCflshZFWAANbQSosX64LCIU8WkhMs023QjskGamdYTDTNvnbJIqk3Fwv44fos8311w/5nWTUspmlaEoELEtuIy7ZHc8Q8+0X7/9/XuoO/RLf1UBmiCD+yJKnN6pAMBR+iyuAX2N25WglX3eFqVMyUWIiqshI75LrzuUlNvGMP/B2UPgY1saKZUFeNw/rNy72JYdQJt2EoNE4sSaL4kuU0dHbAgN7+i948fC55OSx9EgPrQA==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2025-03-31 12:38:43 | FIRMANTE

gToOELtpncCllzw7ea/E3Jvgz3WRCXIiYszijhUOyKt0P8LEAPt1V7unh2od5Na8RYqf0iYPnI09I3v7fP3wRKzCmwKYB7uqwUcsSDSy+G7eJ4WgxynW6bAQLFrWTV5eA82OS5MAg6QlOOL3Zy5H4rHpiE007DmsXtd9X4AIoYcEiFiLcHycAubDXpulkc3HYWJ+Vd1R/px05gL46/+2vPKkQcFdwrcRJyQCoytPJ/CehSOsLQn0ooVI2caXzDqSkhXHXdQL4n+QA4hykrZfGwy/hweL6yl4ooA797reE6ziJmIv+ClrEHiUt2U7G6SJ7aaS+4GMxyPhUC0FNMtxYw==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2025-03-31 13:27:04 | FIRMANTE

aaY8kuyBOQL8L1Qc+SutRNjy2YIGR5HON6g4DlIEF8EtDLCJ4lQ2MFHjClO13Jhl80HuIIZymJK/OmUN1bsmluZT/b78lgqoNYvLxLeXF0yPwdwYTyrbGty4HH+m6iXvJUCbDCeMbkb+sIbqI+ErRUluQrTR9WGWwsmPfFkaYaPgn33dlUUo1TwFOt8dj1TztfCRRbnLjiQBy2pncFlDVWqipde8noaqypvu/UbqsMMMfyGXzbfXJKWIuV/8I3vb/VJXpj0FQUhrq1Ed3DkQPksmz9xAd9Qy3HeB3djOFpo3zIRRhKx0u2xt0KX+R9yofu2Zz16CwI5I/xedwVTxjQ==

LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ | Fecha:2025-03-31 14:45:58 | FIRMANTE

Kv+MUsmTMH1x0EH4ExRci9SXKhkgOeoxqLvVzTTi0px39n5w46ORVy/YuJIaLwTk6cH3w2ZUU7B3Pf4E5kYa0eJ1BQqEi8AMPz/xDrOLR2k9Rad887uZsFgZapD/7Vn4gt92eDlegNeKTv4Jh02U1idFHmZ5c5KB4ti7mThGaGpsoD8YmRJKlhoEWxzM+YrHTYwem39WJ5ifD5gDKhp6DdZwcEAf23LpmvETbtzIAqv+HPQ31SBy4whytgQp/edYRQros5cph1oZfeEMl119lkNQv3VhU/2sW8cd5dmPxVHPXjQ32kIazuW06Pxj4NjuFG2hgKZ04mR75bmVtqnrJA==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2025-03-31 15:46:54 | FIRMANTE

opN+YtbWYLlrrD4gj2tA3xzxV6g7pFUZKXS9sTIpIZ/vqyPwx1Uxn9WnXLvAmzS0y6ReG90HIl0HJbJwZRA/d11toO3Z988WRFc8xM3tfFeWwDHlOnk7Kuyb7j0tHJTm65PAeGm7svVdGdAEefDuLDfXJLPl9XykrMynoHr9XS5F8RX2qgEKpsa1lfl/Y20VKt4QygCuBkksM9He9H45S73an2TiEGVapjPf6W1QzS7OQZ5/43UIFSslMXKJEcVhFSOCCBklw+PVytTwmfdOu4fLuJtbE8UYqSrwdfYbWPbC9JiDWjVGYwhwh6P0blQEp0hhQLk9yFjzpFvv9ycbng==

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

n3jNmdFC9

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QrpaHccXjbakiTZpwSqZeu2IgdY5Atud