



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Identificación de Factores de Virulencia
en la Mucormicosis

D^a María Isabel Navarro Mendoza

2020

Identificación de factores de virulencia en la mucormicosis

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología (Área de Genética) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia bajo la dirección de D. Victoriano Garre Mula y D. Francisco Nicolás Molina, para optar al grado de Doctora en Biología Molecular y Biotecnología con Mención de Doctorado Internacional, por la Graduada María Isabel Navarro Mendoza.

Esta memoria ha sido concebida como compendio de las siguientes publicaciones:

Binder, U., Navarro-Mendoza, M.I., Naschberger, V., Bauer, I., Nicolas, F.E., Pallua, J.D., Lass-Flörl, C., and Garre, V. (2018). Generation of a *Mucor circinelloides* reporter strain—A promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis. *Genes*. 9, 613. doi:10.3390/genes9120613

Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F.E., and Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific Reports*. 8, 7660. doi:10.1038/s41598-018-26051-x

Trieu, T.A., Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., Sanchis, M., Capilla, J., Navarro Rodríguez, P., Lopez-Fernandez, L., Torres-Martínez, S., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R.M., and Nicolás, F.E. (2017). RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLOS Pathogens*. 13, e1006150. doi:10.1371/journal.ppat.1006150

Otras publicaciones producidas durante la tesis doctoral

Pérez-Arques C. #, Navarro-Mendoza M.I. #, Murcia L., Navarro E., Garre V., Nicolás F.E. (2020). A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLOS Genetics*. 16: e1008611. 10.1371/journal.pgen.1008611. #Los autores han realizado contribuciones equivalentes

Nicolás F.E., Murcia L., Navarro E., Navarro-Mendoza M.I., Pérez-Arques C., Garre V. (2020). Mucorales species and macrophages. *Journal of Fungi* 6: 94. 10.3390/jof6020094

Lax, C., Pérez-Arques, C., Navarro-Mendoza, M.I., Cánovas-Márquez, J.T., Tahiri, G., Pérez-Ruiz, J.A., Osorio-Concepción, M., Murcia-Flores, L., Navarro, E., Garre, V., Nicolás, F.E. (2020). Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes*, 11, 317. doi: 10.3390/genes11030317

Navarro-Mendoza, M.I. #, Pérez-Arques, C. #, Panchal, S., Nicolás, F.E., Mondo, S.J., Ganguly, P., Pangilinan, J., Grigoriev, I. V., Heitman, J., Sanyal, K., Garre, V. (2019). Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Current Biology*. 29, 1–12. doi:10.1016/j.cub.2019.09.024. #Los autores han realizado contribuciones equivalentes

- Pérez-Arques, C.[#], Navarro-Mendoza, M.I.[#], Murcia, L., Lax, C., Martínez-García, P., Heitman, J., Nicolás, F.E., and Garre, V. (2019). *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *mBio*. 10, 1–15. doi:10.1128/mBio.02765-18. [#]Los autores han realizado contribuciones equivalentes
- Nicolás, F.E., Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., López-García, S., Navarro, E., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2018). Molecular tools for carotenogenesis analysis in the mucoral *Mucor circinelloides*. In *Microbial Carotenoids. Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 13, 221 - 237. doi:10.1007/978-1-4939-8742-9_13
- López-Muñoz, A., Nicolás, F.E., García-Moreno, D., Pérez-Oliva, A.B., Navarro-Mendoza, M.I., Hernández-Oñate, M.A., Herrera-Estrella, A., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M., Garre, V., and Mulero, V. (2018). An adult zebrafish model reveals that mucormycosis induces apoptosis of infected macrophages. *Scientific Reports*. 8, 12802 doi:10.1038/s41598-018-30754-6
- Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M.I., García, A., Murcia, L., Pérez-Arques, C., Garre, V., Nicolás, F.E., and Lee, S.C. (2018). *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current Protocols in Microbiology*. 49, e53. doi:10.1002/cpmc.53
- López-Fernández, L., Sanchis, M., Navarro-Rodríguez, P., Nicolás, F.E., Silva-Franco, F., Guarro, J., Garre, V., Navarro-Mendoza, M.I., Pérez-Arques, C., and Capilla, J. (2018). Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*. 9, 707-720. doi:10.1080/21505594.2018.1435249

Esta tesis se ha desarrollado dentro de los proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (BFU2015-65501-P cofinanciado por FEDER), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PGC2018-097452-B-I00 cofinanciado por FEDER) y la Fundación Séneca Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (19339/PI/14).

María Isabel Navarro Mendoza ha realizado la tesis doctoral financiada por una ayuda para la formación de profesorado universitario por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (FPU14/01832), y opta a la mención de doctorado internacional gracias a la estancia realizada en la Universidad de Duke en Estados Unidos financiada por una ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales de beneficiarios FPU (EST16/00496).

A Carlos

"Do or do not. There is no try."

Yoda

Agradecimientos

Todos los que estéis leyendo estas palabras, estos agradecimientos van para vosotros. Por el interés que mi investigación haya podido despertar, que para mí forma parte del apoyo necesario para continuar en este mundo. Gracias.

A mis directores Victoriano Garre y Francisco Nicolás. A Víctor, por su ayuda desde el principio, porque siempre ha estado para calmar mis agobios e incertidumbres y me ha apoyado para poder construir una carrera científica en el futuro. Gracias por ser un padre científico, espero continuar la escuela de buena ciencia que tanto nos has inculcado. A Curro, por estar a mi lado siempre (literalmente mesa con mesa) animándome, no solo como científico si no como humano, sabiendo guiarme para conseguir lo mejor de mí en cada momento. No encuentro palabras para agradecer lo que tu apoyo ha supuesto para que esta etapa llegue a su fin. Ojalá algún día podamos volver a trabajar juntos en todos los proyectos locos que se te ocurran, porque tu creatividad no tiene límites.

Quiero agradecer a mis directores de tesis “no canónicos” Rosa y Santi, por ser un ejemplo que seguir en mi carrera científica, porque su ayuda ha sido fundamental para mi carrera. También a Paco Murillo, por creer en mí cuando nadie más lo hizo.

A Joe Heitman, por darme la oportunidad maravillosa de visitar su laboratorio y a todos los miembros de su equipo por dejarme aprender tanto de ellos y poder vivir un trocito del sueño americano. Mi estancia en Duke cambió mi forma de ver la ciencia para siempre. Estoy deseando trabajar codo con codo con todos vosotros.

A todo el grupo de Josep Guarro y Xavi Capilla, por su hospitalidad cada vez que los he visitado en Reus y por la colaboración tan exitosa que hemos tenido en este proyecto.

A Sebi, porque su calidad humana es indiscutible, porque siempre estás ahí para todos nosotros. A Laura, por ser un ejemplo para todas las científicas, por saber encontrar el tiempo para continuar en esta carrera a pesar de todos los obstáculos que nos pone la sociedad. Gracias por inspirarme. A Ulli, por ser una científica aventurera y una persona increíble. Agradezco el día que te acercaste para colaborar conmigo y todo lo que ha venido después.

A todos los miembros del grupo y compañeros de laboratorio que han compartido días y días conmigo durante estos años, todo este tiempo me ha parecido corto gracias a vosotros. A todos, tanto del ala A como del ala B, como visitantes de otros países, o de otros departamentos, a los que estuvieron y a los que acaban de llegar. Gracias por

cada minuto que habéis empleado para ayudarme y aguantarme, por los ánimos cuando algo no salía bien, por los consejos, por los abrazos y por las risas delante de un café. Gracias por todos los momentos que salpimentan el camino y que son vitales para despejar la mente, por los debates sobre Star Wars, por los partidos de fútbol, por las comidas en el seminario, por los concursos de postres y por los calderos en la playa. No necesito nombrar a cada uno de ellos y ellas porque ya saben quiénes son, pero me gustaría agradecer especialmente a Jose, que ya es un amigo que espero que esté ahí para siempre, porque nuestros cafés y confesiones han sido el combustible del día a día para seguir adelante. También a mi primer alumno interno y mi Padawan Carlos Lax, recuerdo el día que intentando aparentar ser “tu maestra” hice un destrozo de un northern blot y todavía seguiste confiando en mí, espero que consigas todo lo que te propongas. Y a Sergio, por ser mi Obi-Wan Kenobi cuando era su alumna interna, por tu paciencia infinita y por haber confiado en mí cuando cogí por primera vez una pipeta.

A mis profesores del instituto, Maysé y Alejandro, por descubrir mi vocación por la biología; y a todos mis profesores de la universidad cuya experiencia ha contribuido a lo que soy.

Quiero agradecer a mis amigos, por todos esos dramas que se han tragado, porque saben que “la ciencia no se hace sola hay que hacerla” y porque, aunque suene a cliché, han estado ahí en todos los momentos, en los buenos y en los malos. Mi vida sin vosotros no sería la misma. Gracias Polina, PJ, Pablo, Lorena, Pili y Mari. También a Francisco y Ana, a Emilio, Miguel, Elena y David, y a todos los que, por muy lejos que vivamos, con un solo mensaje están.

Por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, cuyo esfuerzo ha hecho posible que persiga mi sueño y lo consiga. Gracias a mi madre Isabel, a mi padre Juan y a mi hermano Fernando. Gracias por dejarme ser quien soy, por apoyarme en todas mis decisiones y estar ahí cada vez que me he equivocado. Gracias a vosotros puedo ser una científica de Las Palas. Os quiero. También gracias a toda mi familia que, sin entender muy bien a qué me dedico, se han preocupado por mí, no me olvido de mis abuelos, mis tíos, mis cuñados y mis suegros.

A Carlos, por ser mi constante en todo este caos que es la vida. Te quiero y lo sabes.

Índice de contenidos

Resumen en inglés	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.1. Mucormicosis, una enfermedad emergente	5
I.1.1. Agentes causales y epidemiología	5
I.1.2. Factores de virulencia en la mucormicosis	7
I.1.2.1. Interacción de los Mucorales con el sistema inmune del hospedador	7
I.1.2.2. Resistencia intrínseca a azoles de cadena corta.....	9
I.1.2.3. Reconocimiento de la pared celular	11
I.1.2.4. Potencial de virulencia en las distintas fases dimórficas	11
I.2. La captación de hierro como factor de virulencia en hongos patógenos	14
I.2.1. Sistemas de captación de hierro.....	14
I.2.1.1. Sistema reductor de captación de hierro.....	14
I.2.1.2. Captación de hierro mediada por sideróforos.....	20
I.2.1.3. Captación de hierro del grupo hemo	23
I.2.2. Almacenamiento de hierro intracelular	23
I.2.3. Regulación de la captación de hierro.....	24
I.2.4. Estudio del metabolismo del hierro en la mucormicosis.....	25
I.3. <i>Mucor circinelloides</i> como organismo modelo de mucormicosis	26
I.3.1. Clasificación, morfología y ciclo de vida	26
I.3.2 <i>M. circinelloides</i> como organismo modelo	30
I.3.3 Mecanismos de silenciamiento génico en <i>M. circinelloides</i>	32
I.3.3.1. Mecanismo de silenciamiento génico canónico dependiente de Dicer	35
I.3.3.2. Mecanismo de silenciamiento génico no canónico o independiente de Dicer (NCRIP).....	37
I.3.3.3. Los mecanismos de silenciamiento génico en la patogénesis de <i>M. circinelloides</i>	38
I.3.3.4. Aplicaciones del silenciamiento génico en la búsqueda y control de nuevos factores de virulencia.....	39
II. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS Y OBJETIVOS.....	41

II. Justificación y objetivos	43
III. REFERENCIAS	47
III. Referencias	49
IV. PUBLICACIONES	67
IV.1. RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis	69
IV.2. Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism	71
IV.3. Generation of a <i>Mucor circinelloides</i> reporter strain—A promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis.....	73
V. CONCLUSIONES.....	75
V. Conclusions.....	77

Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia de mucormicosis en función de género de Mucorales y la manifestación de la infección.	5
Figura 2. Interacción de esporas de <i>M. circinelloides</i> con macrófagos de ratón.	8
Figura 3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las 14 α -desmetilasas de lanosterol de hongos.	10
Figura 4. Regulación del dimorfismo en Mucorales.	13
Figura 5. Respuesta de <i>S. cerevisiae</i> a la deprivación de hierro.	15
Figura 6. Estructura y topología del plegamiento de la ferroxidasa Fet3 de <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 7. Mecanismos de captación de hierro en condiciones de alta disponibilidad de hierro en suero propuestos para <i>R. oryzae</i>	22
Figura 8. Esquema de la regulación por hierro mediada por SreA y HapX en <i>Aspergillus</i> spp.	25
Figura 9. Árbol filogenético del reino de los hongos.	27
Figura 10. Diversidad morfológica de Mucorales.	28
Figura 11. Ciclo de vida de <i>Mucor</i> spp.	29
Figura 12. Los genes de la carotenogénesis de <i>M. circinelloides</i> como marcadores de silenciamiento génico.	33
Figura 13. Rutas de silenciamiento génico caracterizadas en <i>M. circinelloides</i>	36
Figura 14. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras.	40

Listado de abreviaturas

Ago: argonauta o *argonaute*

AMB: anfotericina B o *amphotericin B*

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina o *cyclic adenosine monophosphate*

aRNA: RNA aberrante o *aberrant RNA*

CFU: unidades formadoras de colonias o *colony forming unit*

CLASP: proteína asociada a la unión del citoplasma o *cytoplasmic linker-associated protein*

CotH: proteína H de la cubierta de la espora o *spore coat protein H*

CRZ1: dedo de zinc en respuesta a calcineurina o *calcineurin-responsive zinc finger*

CsA: ciclosporina A o *cyclosporin A*

Ct: umbral de ciclos o *cycle threshold*

CypA: ciclofilina A o *cyclophilin A*

Dcl: proteína similar a Dicer o *Dicer-like protein*

DKA: cetoacidosis diabética o *diabetic ketoacidosis*

dsRNA: RNA de doble cadena o *double-stranded RNA*

EGFR: receptor de crecimiento epidérmico o *epidermal growth factor receptor*

esRNA: pequeños RNA endógenos o *endogenous small RNA*

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

exsiRNA: esRNAs derivados de exones o *esRNA derived from exons*

Fit: facilitador del transporte de hierro o *facilitator of iron transport*

Fob: proteína de unión a ferrioxamina o *ferrioxamine binding*

GRP78: proteína 78 regulada por glucosa o *glucose-regulated protein 78*

HIGS: inducción de silenciamiento génico en el hospedador o *host-induced gene silencing*

HMG: grupo de alta movilidad o *high mobility group*

HRG: crecimiento muy reducido o *highly reduced growth*

ISA: isavuconazol o *isavuconazole*

ITRA: itraconazol o *itraconazole*

lncRNA: RNAs largos no codificantes o *long non-coding RNA*

LVS: falta de esporulación vegetativa o *lack of vegetative sporulation*

MCS: múltiples sitios de clonación o *multiple cloning site*

MIC: concentración mínima inhibitoria o *minimum inhibitory concentration*

miRNA: microRNA

MMC: medio mínimo con casaminoácidos o *minimal medium with casamino acids*

mRNA: RNA mensajero o *messenger RNA*

Myo5: miosina 5 o *myosin 5*

NCRIP: mecanismo no canónico de silenciamiento génico o *non-canonical RNAi pathway*

nt: nucleótidos

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas o *platelet derived growth factor receptor*

PKA: quinasa A de proteínas o *protein kinase A*

PLD: fosfolipasa D o *phospholipase D*

POS: posaconazol o *posaconazole*

rdRNAs: RNAs degradados dependientes de RdRP o *RdRP-dependent degraded RNAs*

RdRP: polimerasa de RNA dependiente de RNA o *RNA dependent RNA polymerase*

RE: retículo endoplásmico o *endoplasmic reticulum*

Rfs: sintetasa de rhizoferrina o *rhizoferrin synthetase*

RG: crecimiento reducido o *reduced growth*

RISC: complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA o *RNA-induced silencing complex*

RLU: unidades relativas de luz o *relative light units*

RNAi: RNA interferente o *RNA interference*

RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa o *reverse transcription quantitative PCR*

SG: crecimiento en satélite o *satellite growth*

shRNA: horquillas pequeñas de RNA o *short hairpin RNAs*

SIGS: inducción de silenciamiento génico con aerosoles o *spray-induced gene silencing*

siRNA: pequeños RNAs interferentes o *small interfering RNA*

ssRNA: RNA de una cadena o *single-stranded RNA*

TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos o *tricarboxylic acid cycle*

TGN: red del trans Golgi o *trans-Golgi network*

YLG: crecimiento tipo levaduriforme o *yeast-like growth*

YNB: medio con bases nitrogenadas para levaduras o *medium yeast nitrogen base*

YPG: medio de extracto de levadura, peptona y glucosa o *medium yeast extract-peptone-glucose*

Resumen en inglés

Mucormycosis is an emergent life-threatening infection caused by fungi of the order Mucorales. This infectious disease is characterized by high morbidity and mortality rates, mainly because of the scarcity of successful clinical treatments. This infection affects predominantly immunocompromised patients, including those with cancer, chemotherapy, or immunosuppression for organ or bone marrow transplants. Other patients at increased risk of infection are those with diabetes, iron overload syndromes, trauma, burns, or neutropenia. The fungal agents of mucormycosis are resistant to most of the antifungal drugs available; thus, clinical treatments are limited by toxicity and resistance. Overall, this emergent infection is becoming a challenge to public health, hence the need to develop new therapies to treat this disease.

Mucorales are a group of understudied basal fungi, mainly because they are reluctant to classical molecular tools. *Mucor circinelloides* is one of the causal agents of mucormycosis and is the only model to properly study the infection at a molecular level. In this work, we propose the use of *M. circinelloides* to identify new virulent factors in mucormycosis, generate new tools to characterize virulent phenotypes, and deeply analyze critical mechanisms involved in the infection.

The characterization of the gene silencing mechanism in *M. circinelloides* has allowed the design of an RNAi-based functional genomics platform to study virulence processes. This library consists of high-throughput plasmids that synthesize double-stranded RNAs targeting any possible gene in the fungal genome. Thanks to this new genetic tool, we obtained a collection of silenced transformants that represented the whole genome, showing a broad variety of phenotypes related to virulence processes. Using this platform, two genes involved in *M. circinelloides* pathogenesis were identified: *mcp1D*, which encodes a Phospholipase D; and *mcm5*, encoding a cargo transporter of the Myosin V family.

Iron acquisition during mucormycosis is a critical factor that shapes the outcome of the infection. The high-affinity system is the most important iron uptake mechanism during the host invasion and consists of a permease-ferroxidase complex. In this work, three genes coding for ferroxidases, named *fet3a*, *fet3b*, and *fet3c*, have been identified as part of this high-affinity iron uptake mechanism. This family of ferroxidases is expressed both under iron-depleted conditions and during *in vivo* infection in a mouse model. A combination of single and double mutants of the three genes revealed that *fet3c* is the most important for virulence, although there is a functional redundancy among the members of the gene family during both *in vitro* growth with low iron and

mouse infection. Also, *fet3a* is only expressed during yeast growth, suggesting a functional specialization of the high-affinity iron uptake mechanism in the dimorphic yeast-mycelium transition.

Aiming at the improvement of the molecular tools to study Mucorales pathogenesis, this work produced a reporter strain of *M. circinelloides* for *in vivo* monitoring of the infection. For the first time, we generated a strain expressing the firefly luciferase driven by a strong promoter that ensured a stable light emission. The two reporter strains obtained had no phenotypical differences in virulence and antifungal sensitivity compared to the wild-type control.

Altogether, our strategy to identify virulence factors followed three key steps: first, the development of an RNAi-based functional genomics platform that allows the screening of phenotypes related to pathogenesis; second, the deep analysis of the iron uptake mechanism during the infection using *M. circinelloides* as a model for the genetic characterization of three ferroxidases genes; and third, the generation of the first bioluminescent reporter strain in *M. circinelloides* that facilitates *in vivo* monitorization of the infection in live animal models, allowing future functional studies related to pathogenesis and drug susceptibility.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Mucormicosis, una enfermedad emergente

I.1.1. Agentes causales y epidemiología

La mucormicosis es una enfermedad infecciosa causada por hongos del orden Mucorales. Las especies de Mucorales patógenas más frecuentes son las de los géneros *Rhizopus*, *Lichtheimia* y *Mucor*, siendo este último el que da nombre al orden y a la enfermedad (Figura 1). Especies de otros géneros como *Rhizomucor*, *Saksenaea*, *Cunninghamella* y *Apophysomyces* también han sido aisladas de muestras clínicas, pero en baja frecuencia (Petrikkos *et al.*, 2012).

Los hongos Mucorales son patógenos oportunistas que infectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos; en particular, aquellos que sufren diabetes descontroladas, trasplantes de órganos o de médula ósea, neoplasias hematológicas, tratamiento con corticosteroides, y trauma (Spellberg *et al.*, 2005; Cornely *et al.*, 2019). A pesar de su carácter oportunista, no solo afecta a individuos con deficiencias en el sistema inmune. Los brotes epidemiológicos de estas infecciones están asociados al aumento de la población con factores de riesgo, pero también afectan a pacientes inmunocompetentes en situaciones donde se incrementa el contacto con estos hongos ubicuos, como ocurrió durante el tornado de Missouri (Neblett Fanfair *et al.*, 2012) o en la contaminación de Mucorales en sábanas de hospital (Duffy *et al.*, 2014). Las manifestaciones clínicas de la mucormicosis más habituales son la rinoorbitocerebral, pulmonar, cutánea, gastrointestinal y diseminada; siendo los casos más graves y con mayores tasas de mortalidad las infecciones diseminadas (Jeong *et al.*, 2019).

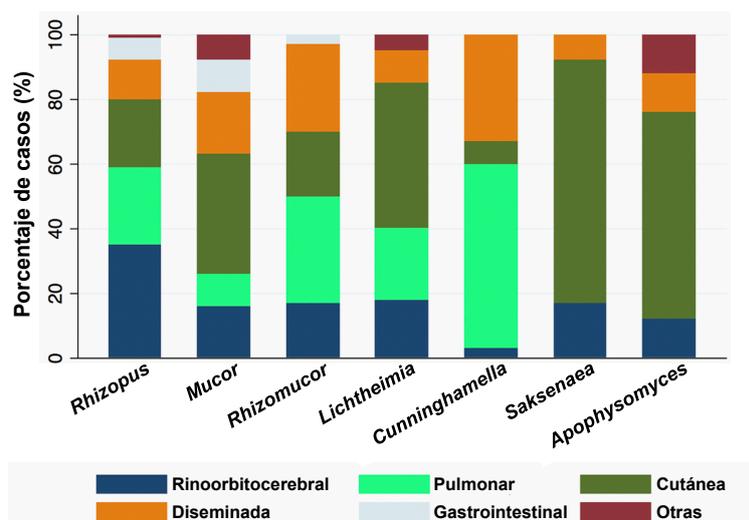


Figura 1. Prevalencia de mucormicosis en función de género de Mucorales y la manifestación de la infección. Cada cuadro clínico se indica con un color diferente. Se muestran los géneros de Mucorales que provocan mayor número de casos de mucormicosis (Jeong *et al.*, 2019).

El diagnóstico precoz, la administración de antifúngicos eficaces a la concentración óptima y el desbridamiento de tejidos infectados son los factores clave para disminuir la tasa de mortalidad de la infección. Las guías globales para el diagnóstico y control de la mucormicosis aconsejan una terapia de primera línea con formulaciones lipídicas de anfotericina B, seguido de un tratamiento con azoles de amplio espectro como el posaconazol (Cornely *et al.*, 2019). La anfotericina B se une al ergosterol, el principal esteroles de la membrana plasmática de hongos, y forma poros que alteran la permeabilidad de la membrana y ocasionan la muerte celular. Los azoles tienen como diana la síntesis del ergosterol, por lo que su acción antifúngica ocasiona pérdida de fluidez y movilidad de la membrana además de la acumulación de esteroides nocivos. Otros antifúngicos como las equinocandinas y los análogos de pirimidinas, que afectan a la construcción de la pared celular y a la síntesis de DNA, no son efectivos en el tratamiento de la mucormicosis ya que no presentan actividad *in vitro* contra las especies patógenas de Mucorales (Schwarz *et al.*, 2019). No obstante, el tratamiento contra la mucormicosis disponible es obsoleto y puede provocar efectos secundarios nocivos en los pacientes, especialmente cuando se suministra anfotericina B en etapas tardías de la infección, puesto que se utiliza la concentración máxima tolerada pudiendo provocar efectos nefrotóxicos (Katragkou *et al.*, 2014). Por consiguiente, el control clínico de la enfermedad está limitado por sus diversas manifestaciones clínicas, el amplio número de especies implicadas y la escasez de tratamientos eficaces. De hecho, un estudio sobre la susceptibilidad a antifúngicos *in vitro* de 66 estirpes patógenas, reveló un patrón específico de taxón relacionado directamente con la sensibilidad a las drogas empleadas en clínica (Skiada *et al.*, 2018).

En términos generales, estas infecciones son poco frecuentes en la población, pero el aumento en su incidencia las convierte en enfermedades emergentes (Bitar *et al.*, 2009). El auge de los casos de mucormicosis se explica por el aumento de pacientes con factores de predisposición a padecer la infección y por la alta resistencia que ofrecen estos hongos mucorales a los antifúngicos disponibles en clínica. Esto ocasiona que las tasas de mortalidad rondan el 55%, llegando a alcanzar valores del 90% cuando la infección es diseminada (Hassan & Voigt, 2019). El aumento de la incidencia de la mucormicosis, la ausencia de tratamientos efectivos y las altas tasas de morbilidad y de mortalidad contribuyen a la emergencia clínica de esta infección, siendo crítico el estudio de nuevos factores de virulencia que ayuden a descubrir dianas terapéuticas para poder prevenir y controlar las infecciones.

I.1.2. Factores de virulencia en la mucormicosis

La interacción patógeno-hospedador es crítica para la patogénesis de la mucormicosis. Para causar la infección, las esporas del hongo penetran en el hospedador, bien inhaladas o a través de heridas, evadiendo el sistema inmune y germinando, dando lugar a una angioinvasión y diseminación. Debido al carácter emergente de la infección, numerosas investigaciones han tenido como objetivo descifrar los factores de virulencia de los hongos mucorales, para entender las etapas clave de la infección que pueden ser dianas de nuevos antifúngicos (Lax *et al.*, 2020). Estos trabajos han ido encaminados tanto a la identificación de nuevos factores de virulencia como a la búsqueda de nuevos fármacos contra la infección. Cabe destacar que las principales dificultades en la investigación de la mucormicosis es la aplicación de técnicas de biología molecular desarrolladas en otros modelos, ya que estos hongos son refractarios a la mayoría de las herramientas empleadas con otros hongos patógenos. Por lo tanto, muchos proyectos se centran especialmente en el desarrollo de nuevas metodologías para identificar factores de virulencia. Otro aspecto deficiente para el estudio de los Mucorales es el uso de sistemas de monitorización *in vivo* de la infección en animales modelo, que permita caracterizar la virulencia de estirpes mutantes en factores de patogenicidad o la susceptibilidad a fármacos, como los desarrollados para otros hongos patógenos (Papon *et al.*, 2014). Este sistema se basa en la generación de estirpes bioluminiscentes, gracias a la expresión del gen de la luciferasa, que emiten luz cuando se suministra el sustrato luciferina al medio. Usando técnicas de imagen y estirpes bioluminiscentes se ha podido identificar la evolución de la infección, la efectividad de tratamientos y la patogénesis de estirpes mutantes en hongos patógenos como *Aspergillus* spp. (Brock *et al.*, 2008) y *Candida* spp. (Enjalbert *et al.*, 2009).

A pesar de las dificultades para identificar factores de virulencia en Mucorales, se han identificado algunos que han contribuido al conocimiento de su patogénesis y al tratamiento de la infección.

I.1.2.1. Interacción de los Mucorales con el sistema inmune del hospedador

Una vez originada la infección por inhalación de esporas o por contacto con heridas abiertas, las esporas del hongo deben sobrevivir al sistema inmune innato para germinar y desarrollar la forma angioinvasiva de la infección. Durante esta etapa, macrófagos y neutrófilos son reclutados al foco de la infección para proteger al hospedador. Los fagocitos internalizan las esporas, formando granulomas que paralizan la germinación y el crecimiento de la hifa (Inglesfield *et al.*, 2018). Por consiguiente, el enfrentamiento patógeno-hospedador determina de forma crítica el éxito de la

colonización del hongo, y explica por qué defectos en el sistema inmune ocasionan que el paciente presente una mayor predisposición a padecer la infección. Los hongos mucorales muestran diversas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador y diseminar la infección. Las esporas virulentas de *Mucor* spp. son capaces de sobrevivir y germinar tras la fagocitosis por macrófagos de ratón, al contrario que las esporas de estirpes avirulentas que permanecen latentes (Li *et al.*, 2011; López-Fernández *et al.*, 2018; Nicolás *et al.*, 2020) (Figura 12). De forma similar, las esporas de *Rhizopus* spp. son capaces de sobrevivir a la fagocitosis, conteniendo la maduración del fagosoma por la síntesis de melanina en su pared celular (Andrianaki *et al.*, 2018). Estudios transcriptómicos a gran escala de la interacción patógeno-hospedador identificaron la compleja red de regulación génica que está detrás de la capacidad de los Mucorales de evadir el sistema inmune innato. La comparación de patrones de expresión de diferentes patotipos de *M. circinelloides* enfrentados a macrófagos de ratón reveló una red de genes coordinada por dos factores de transcripción de tipo Atf (Pérez-Arques *et al.*, 2019). En esta respuesta virulenta están involucrados cambios metabólicos para la adaptabilidad del hongo al ambiente hostil del fagosoma y para la remodelación del citoesqueleto y la pared celular.

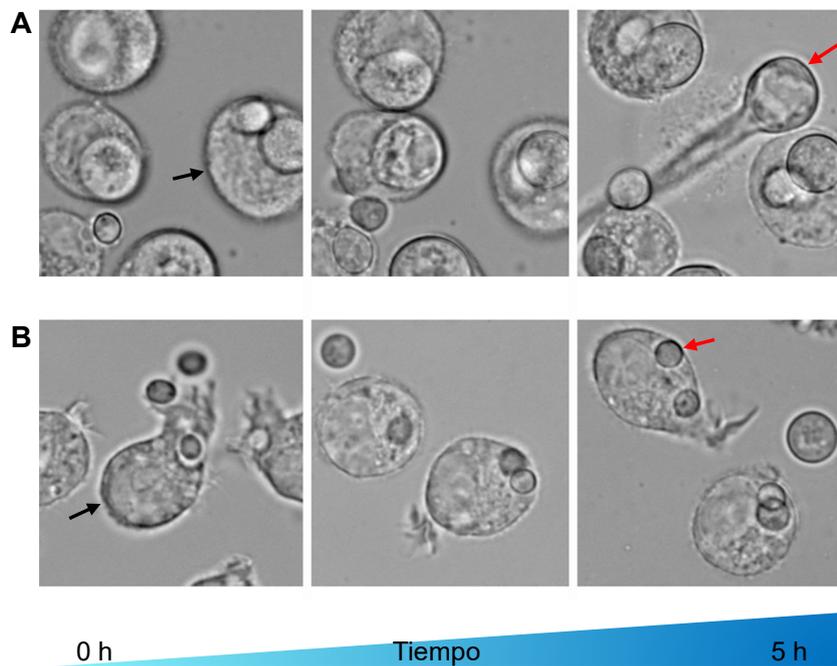


Figura 2. Interacción de esporas de *M. circinelloides* con macrófagos de ratón. Fotografías secuenciales de esporas de dos patotipos de *M. circinelloides* fagocitadas por macrófagos de ratón. **(A)** Esporas virulentas grandes (estirpe R7B) germinan en el interior del macrófago hasta su lisis. **(B)** Esporas avirulentas pequeñas (estirpe NRRL3631) se mantienen en fase latente en el interior del macrófago. La secuencia en el tiempo se muestra de izquierda a derecha. Las flechas negras indican los macrófagos y las flechas rojas las esporas de ambas estirpes de *M. circinelloides* (Li *et al.*, 2011).

Otros estudios transcriptómicos desde el punto de vista del hospedador también confirmaron que la presencia de esporas de Mucorales activa una respuesta inmunológica específica. En células epiteliales humanas, esta respuesta incluye la activación de la ruta de angiogénesis iniciada por el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, del inglés *platelet derived growth factor receptor*), favoreciendo la invasión diseminada de la infección (Chibucos *et al.*, 2016). El bloqueo de la ruta de PDGFR redujo de forma significativa los daños en las células epiteliales provocados por *Rhizopus* spp., indicando que el hongo aprovecha esa maquinaria para invadir tejidos. Otro estudio con líneas celulares del epitelio pulmonar indicó que la infección por Mucorales activa el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*), y por consiguiente, el uso de fármacos como gefitinib (inhibidores de la ruta de EGFR) promueven un descenso de la virulencia en modelos de ratón de la mucormicosis (Watkins *et al.*, 2018). Investigaciones en sistemas modelo más cercanos a la situación *in vivo*, incluyendo adultos de pez cebra, revelaron que, en efecto, las esporas de diferentes estirpes de *M. circinelloides* son capaces de reclutar células fagocitarias y provocar la apoptosis de macrófagos en el foco de la infección (López-Muñoz *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los hongos Mucorales son capaces de controlar los sistemas de defensa del hospedador con la finalidad de diseminar la infección.

I.1.2.2. Resistencia intrínseca a azoles de cadena corta

Los azoles son compuestos heterocíclicos aromáticos de amplio espectro empleados en clínica para el tratamiento de infecciones fúngicas. Se consideran triazoles aquellos que contienen tres átomos de nitrógeno en el anillo y una cadena de tamaño variable. El mecanismo de acción de estos fármacos radica en la inactivación de la enzima 14 α -desmetilasa de lanosterol dependiente de citocromo P450 (CYP), impidiendo la síntesis de ergosterol y acumulando esteroides anómalos, lo que da lugar a alteraciones en la permeabilidad de la membrana y a la pérdida de viabilidad celular (Groll *et al.*, 2003). A pesar de su extendido uso clínico en tratamientos de primera línea contra infecciones fúngicas, los Mucorales presentan una resistencia intrínseca a algunos azoles. Un estudio de susceptibilidad de un grupo representativo de especies patógenas mostró que los Mucorales son resistentes a los triazoles de cadena corta, incluyendo fluconazol y voriconazol (Caramalho *et al.*, 2017). Sin embargo, los azoles de cadena larga, como el posaconazol, sí que mantienen una actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* significativa contra estos hongos, aunque es altamente variable según la especie a estudio (Dannaoui, 2017). Los hongos mucorales presentan dos genes que cifran la 14 α -desmetilasa de lanosterol, *CYP51 F1* y *CYP51 F5* (Caramalho *et al.*, 2017). Un

amplio análisis de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas de 6 especies Mucorales patógenas, comparadas con la de otros hongos, reveló una mutación puntual en el gen *CYP51 F5* (Figura 3). Esta mutación intrínseca de los Mucorales consiste en una sustitución de la tirosina 129 por una fenilalanina. Cuando se realiza esta sustitución en *Saccharomyces cerevisiae*, el sitio activo de la enzima cambia, resultando en una resistencia al antifúngico (Sagatova *et al.*, 2016). Por lo tanto, este cambio conservado en Mucorales podría ser el responsable de la resistencia a azoles de cadena corta. Los resultados de esta investigación han sido considerados en la elaboración de las guías globales para el tratamiento de la mucormicosis, que recomiendan el uso de azoles de cadena larga, como el posaconazol, en tratamientos de rescate (Cornely *et al.*, 2019).

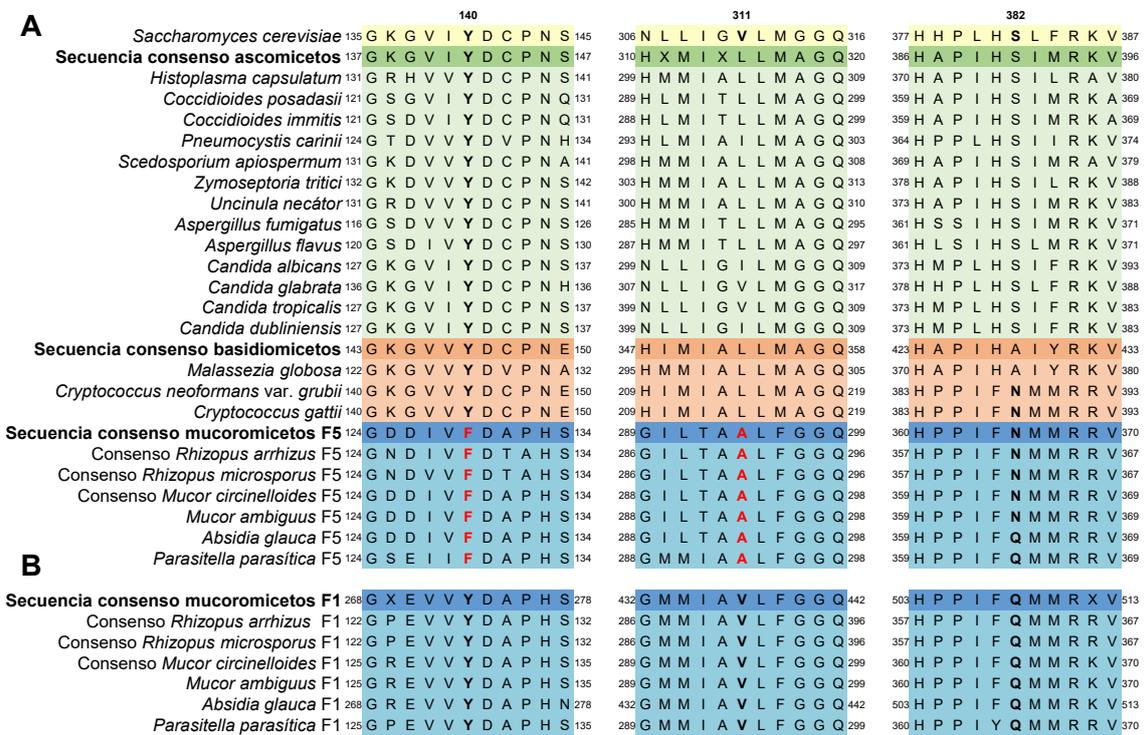


Figura 3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las 14α-desmetilasas de lanosterol de hongos. Las proteínas pertenecen a 22 especies de hongos, incluyendo 6 Mucorales. Se muestra la secuencia consenso de cada clase con un color de fondo más oscuro en cada caso. En verde los ascomicetos, naranja basidiomicetos y azul mucoromicetos. Se agrupan como secuencias consenso las proteínas de *Rhizopus arrhizus* (n=3), *Rhizopus microsporus* (n=13), y *M. circinelloides* (n=18). La secuencia de *S. cerevisiae* se usó como referencia y se muestra en fondo amarillo. **(A)** Comparación con las proteínas CYP51 F5 de mucoromicetos. Los cambios específicos de mucoromicetos se muestra en rojo. El cambio de tirosina (en negrita) a fenilalanina (en rojo) se indica en cada secuencia y es el responsable de la resistencia a azoles de cadena corta. **(B)** Comparación de las proteínas de CYP51 F1 de mucoromicetos, donde no aparece el cambio en el residuo de tirosina. Figura modificada de Caramalho *et al.*, 2017.

I.1.2.3. Reconocimiento de la pared celular

A pesar de la variedad de manifestaciones clínicas de la infección, la mucormicosis se caracteriza por la tendencia de los hongos mucorales a invadir el sistema vascular, ocasionando trombosis y necrosis tisular (Spellberg *et al.*, 2005). Por lo tanto, la investigación de los factores implicados en la angiоinvasión mediada por el reconocimiento de la espора por las células del hospedador es clave en el estudio de la patogénesis de la mucormicosis. Trabajos primarios sobre el reconocimiento celular del hongo, utilizando estirpes patógenas de *Rhizopus* spp., han estudiado el mecanismo de adhesión e invasión de las células endoteliales del hospedador inducido por endocitosis. Esta interacción es mediada por una proteína de la pared celular fúngica, la proteína H de la cubierta de la espора (CotH, en inglés *spore coat protein H*) (Gebremariam *et al.*, 2014). CotH es reconocida por la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78, del inglés *glucose-regulated protein 78*) presente en la superficie de las células endoteliales (Liu *et al.*, 2010). El análisis de 41 genomas de hongos basales reveló que las invasinas CotH son exclusivas de Mucorales (Chibucos *et al.*, 2016). Además, la virulencia de las especies mucorales se correlaciona con el número de genes que cifran CotH. Así, estirpes de los géneros patógenos más frecuentes, *Rhizopus*, *Mucor* y *Lichtheimia*, presentan de 3 a 7 copias, al contrario que otros géneros menos virulentos como *Apophysomyces* o *Cunninghamella* que sólo tienen 1 o 2 copias.

Las condiciones presentes en pacientes con susceptibilidad, como elevadas concentraciones de glucosa, hierro o cuerpos cetónicos, aumentan la expresión de los genes *GRP78* y *CotH*, provocando un aumento de la invasión fúngica y daño del endotelio en modelos de ratón. Asimismo, la pérdida de función de CotH, particularmente de CotH3, reduce la virulencia de *Rhizopus delemar* en ratones (Gebremariam *et al.*, 2014). Como consecuencia, la inmunoterapia con anticuerpos anti-CotH3 aumenta la defensa del hospedador, favoreciendo el control de las esporas del hongo por opsonización (Gebremariam *et al.*, 2019). Este tratamiento con anticuerpos monoclonales es un paso prometedor para el control de la infección.

I.1.2.4. Potencial de virulencia en las distintas fases dimórficas

El dimorfismo, definido como la capacidad de transición levadura-micelio, está relacionado directamente con la virulencia en numerosos hongos patógenos pertenecientes a distintos linajes filogenéticos (Klein & Tebbets, 2007). Algunas especies de hongos dimórficos suelen crecer en forma de micelio en el suelo a temperatura ambiente y cuando las esporas son inhaladas o entran en contacto con el hospedador, son capaces de alternar a crecimiento levaduriforme a 37°C. Por lo tanto, la forma patogénica asociada con la infección es la de levadura. Entre estos hongos

dimórficos se incluyen *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* y *Talaromyces marneffeii*, entre otros (Nemecek *et al.*, 2006). Otro hongo patógeno muy prevalente en la población, *Candida albicans*, también depende de su capacidad dimórfica para desarrollar la infección, siendo avirulentas estirpes bloqueadas en fase de micelio o en fase de levadura (Jacobsen *et al.*, 2012). En el caso de *Cryptococcus neoformans*, la forma de levadura es la prioritaria en la etapa infectiva, mientras que la forma de micelio está asociada a la reproducción sexual (Zhao *et al.*, 2019).

M. circinelloides es dimórfico, pudiendo alternar entre crecimiento en forma de hifa o de levadura en función de las condiciones ambientales. Hay dos factores que inducen el crecimiento levaduriforme: la anaerobiosis (bien por la baja concentración de oxígeno o la alta concentración de dióxido de carbono) y la disponibilidad de una fuente de carbono fermentable (Orlowski, 1991). Sin embargo, la concentración de gases atmosféricos y la cantidad de hexosas en el medio influyen de forma diferente en función de la especie. En Mucorales, el crecimiento como levadura se ha relacionado inversamente con la virulencia, ya que aquellas estirpes que no pueden crecer como micelio muestran una menor capacidad infectiva (Lee *et al.*, 2013). El bloqueo de las distintas rutas de transducción implicadas en el dimorfismo y la generación de mutantes en las proteínas implicadas han demostrado consistentemente esta relación entre el crecimiento micelial y la virulencia, revelando qué rutas pueden ser dianas de antifúngicos.

La ruta de la quinasa A de proteínas (PKA, del inglés *protein kinase A*) regula el dimorfismo en especies de *Mucor*, por lo que la adición de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) al medio de cultivo induce la transición a levadura (Wolff *et al.*, 2002; Ocampo *et al.*, 2009, 2012) (Figura 4). Esta ruta interacciona a su vez con la calcineurina, que controla el dimorfismo en Mucorales de manera opuesta (Lee *et al.*, 2013). La calcineurina es una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina implicada en el control de la transición micelio-levadura en hongos patógenos, incluyendo *Mucor* spp. Esta enzima es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (cifrada por los genes *cnaA*, *cnaB* y *cnaC*) y otra reguladora (cifrada por el gen *cnbR*), siendo ambas necesarias para su correcto funcionamiento (Lee *et al.*, 2013). Estirpes mutantes en el gen *cnaA*, presentan un crecimiento mixto en aerobiosis, con esporas hinchadas, lo que provoca un fenotipo más virulento (Lee *et al.*, 2013). Por el contrario, los mutantes en la subunidad reguladora de la calcineurina presentan un fenotipo bloqueado en fase de levadura, lo que ocasiona que sean menos virulentos y más susceptibles a antifúngicos como el posaconazol (Lee *et al.*, 2015) (Figura 4). El receptor celular para la calcineurina

es FKBP12, una inmunofilina con actividad *cis-trans* propil isomerasa, que en *M. circinelloides* está codificado por el gen *fkpA* (Bastidas *et al.*, 2012). Considerando la relación entre el dimorfismo y la virulencia, existen fármacos cuya diana es FKBP12 y que resultan en un fenotipo bloqueado en levadura y, por tanto, avirulento. El FK506 (o tacrolimus) es un inmunosupresor que se une a FKBP12 y bloquea la actividad fosfatasa de la calcineurina. La rapamicina es otro inmunosupresor que también se une a FKBP12, inhibiendo la vía TOR (Bastidas *et al.*, 2012). Otra inmunofilina, la ciclofilina A (CypA o *cyclophilin A*), actúa como receptor celular del fármaco ciclosporina A (CsA o *cyclosporin A*) (Liu *et al.*, 1991). El complejo CypA-CsA inhibe la calcineurina de una forma análoga al FKBP12-FK506. Ambos fármacos son usados como inmunosupresores en clínica, aunque su capacidad antifúngica es objeto de estudio para la comunidad científica.

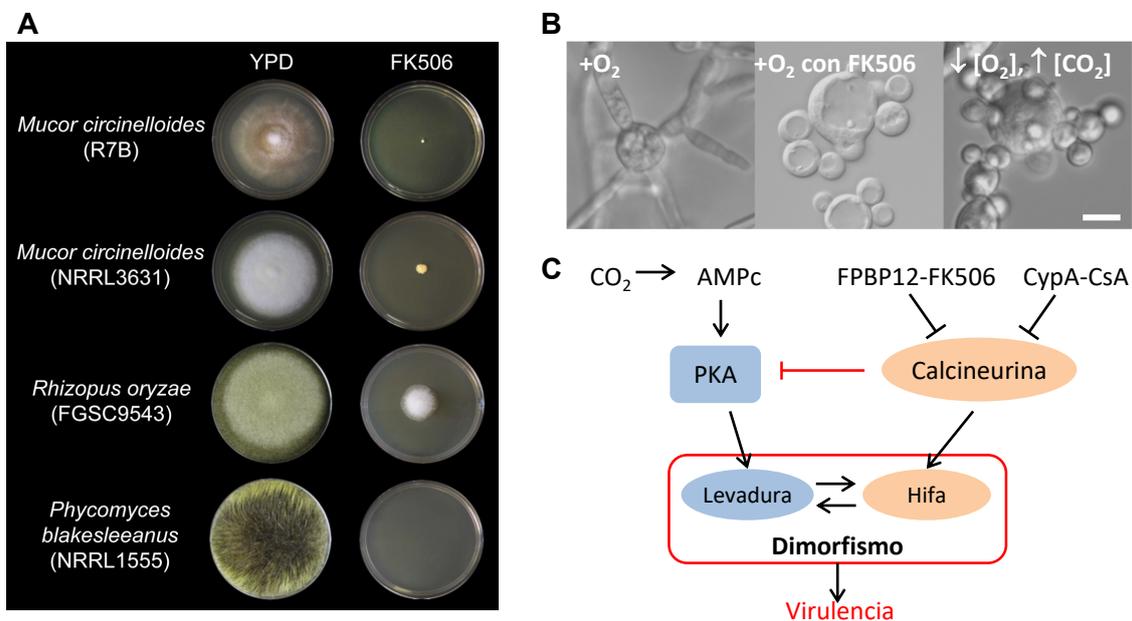


Figura 4. Regulación del dimorfismo en Mucorales. (A) El crecimiento de especies representativas de Mucorales se ve afectado en presencia del inhibidor de la calcineurina FK506. Esporas de cada estirpe crecieron en medio rico YPD y YPD con 1 $\mu\text{g/ml}$ de FK506 durante 72 h a 25°C (Bastidas *et al.*, 2012). (B) La presencia de FK506 o las bajas concentraciones de oxígeno, junto con altas concentraciones de dióxido de carbono, provocan el crecimiento levaduriforme de *M. circinelloides*. (C) Esquema de las rutas de transducción implicadas en el dimorfismo de *M. circinelloides*. La calcineurina es necesaria para el crecimiento en hifa y se inhibe por dos complejos, FKBP12-FK506 dando lugar a un fenotipo de levadura, y CypA-CsA, ocasionando defectos en el crecimiento. Durante el crecimiento en levadura la actividad de PKA aumenta, y es estimulada, a su vez, por el aumento de la concentración de AMPc y CO₂. Figuras 4B y 4C modificadas de Lee *et al.*, 2013.

Un trabajo reciente caracterizó la capacidad antifúngica de un análogo de FK506, APX87, reduciendo su efecto inmunosupresor con la finalidad de poder emplearse en

clínica para contener la infección de hongos patógenos (Juvvadi *et al.*, 2019). A pesar del éxito de este fármaco contra *C. neoformans*, en *M. circinelloides* no se observó una mejora en su actividad antifúngica. La conexión entre fenotipos avirulentos en estirpes de Mucorales y el bloqueo de la capacidad dimórfica, por modificaciones del genoma o por fármacos, hace del dimorfismo un factor de virulencia importante para la búsqueda de antifúngicos funcionales contra la mucormicosis.

I.2. La captación de hierro como factor de virulencia en hongos patógenos

El hierro es un elemento fundamental para numerosas funciones biológicas debido principalmente a sus dos estados de ionización, lo que lo convierte en un excelente cofactor para reacciones de oxidación-reducción. A pesar de su papel esencial, la biodisponibilidad de este elemento en la naturaleza es escasa. En condiciones aeróbicas el hierro se encuentra en su forma oxidada, forma férrica, que es insoluble en agua y, por tanto, inaccesible para la mayoría de los microorganismos. Por el contrario, el ion ferroso es más soluble, pero tiende a inducir toxicidad mediante la generación de radicales libres (Howard, 1999). Como consecuencia, los hongos han tenido que desarrollar sistemas sofisticados que aseguren la solubilidad, adquisición, acumulación y distribución de hierro para sobrevivir en condiciones donde este elemento es limitante, manteniendo los niveles homeostáticos a concentraciones seguras para prevenir su toxicidad.

I.2.1. Sistemas de captación de hierro

Tres mecanismos generales de captación de hierro se han identificado en hongos: la captación de hierro por sistemas reductores de alta afinidad, de baja afinidad y la captación de hierro no reductora, que incluye la síntesis y uso de sideróforos y la adquisición de hierro del grupo hemo. En la Figura 5 se resumen los mecanismos descritos en *S. cerevisiae*.

I.2.1.1. Sistema reductor de captación de hierro

El hierro debe atravesar la pared celular de los hongos antes de penetrar al citosol. En los hongos, la pared celular es una estructura dinámica compuesta por un entramado de glucanos, quitina y quitosano a la que están unidas covalentemente manoproteínas, cuya composición varía en función de las condiciones de crecimiento. Esta composición afectará al paso de nutrientes a través de la pared celular. En *S. cerevisiae*, bajas concentraciones de hierro inducen la expresión de tres manoproteínas de la pared celular: *Fit1p*, *Fit2p* y *Fit3p* (de las siglas en inglés *facilitator of iron transport*)

(Protchenko *et al.*, 2001) (Figura 5 y Tabla 1). Estas proteínas aumentan la retención de moléculas transportadoras de hierro (sideróforos) en la pared celular (Philpott & Protchenko, 2008).

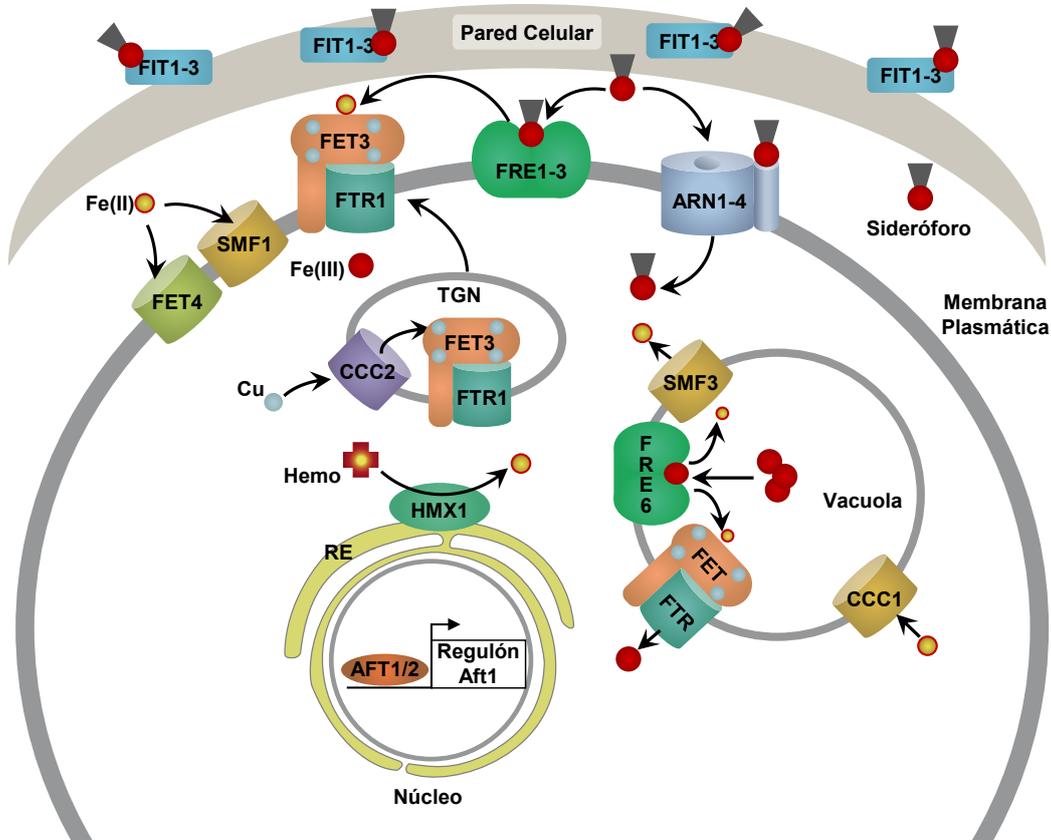


Figura 5. Respuesta de *S. cerevisiae* a la privación de hierro. Se muestran los complejos de proteínas de los sistemas reductores de captación de hierro de alta y baja afinidad, captación de hierro mediada por sideróforos y captación de hierro del grupo hemo. También las proteínas que participan en el almacenamiento de hierro en la vacuola. La expresión de los genes es sensible a hierro y está controlada por factores de transcripción Aft1 y Aft2. Se indica el retículo endoplasmático (RE) y la red del trans Golgi (TGN, *Trans-Golgi Network* en inglés). Figura modificada y traducida de Philpott & Protchenko, 2008. Las proteínas de esta figura se enumeran en la Tabla 1.

La captación de hierro en hongos suele incluir un paso de reducción extracelular mediado por metalorreductasas de la familia FRE. Dos reductasas principales de membrana han sido descritas en la pared celular de *S. cerevisiae*, *FRE1* y *FRE2* (Schröder *et al.*, 2003) (Figura 5 y Tabla 1). Ambas proteínas mantienen el 99% de la actividad reductasa *in vitro*, aunque se han detectado hasta 7 posibles genes homólogos en el genoma de levadura. Cada metalorreductasa presenta una subespecialización en función de sustrato, pudiendo reducir hierro de quelantes o de sideróforos. Algunas se encuentran en otras localizaciones subcelulares, como *FRE6* que reduce el hierro del interior de la vacuola para su transporte al citosol (Philpott & Protchenko, 2008). El

número de metalorreductasas varía a lo largo del reino de los hongos. Por ejemplo, en los patógenos *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus* se han identificado 15 y 16 homólogos, respectivamente (Knight *et al.*, 2005; Blatzer *et al.*, 2011), pero a pesar de su estudiado papel en la adquisición de hierro, no se han visto relacionadas con la virulencia. En *C. neoformans* se han identificado hasta 8 metalorreductasas, siendo Fre2 importante para la virulencia en modelos de ratón (Saikia *et al.*, 2014).

Tabla 1. Proteínas funcionales identificadas en el metabolismo del hierro de hongos.

Proteína	Función	Especie	Referencia
CAPTACIÓN REDUCTORA DE HIERRO			
Fre1-3	Reductasa de hierro	<i>S. cerevisiae</i>	(Schröder <i>et al.</i> , 2003)
Fre6	Reductasa de hierro vacuolar	<i>S. cerevisiae</i>	(Philpott & Protchenko, 2008)
Fre2	Reductasa de hierro	<i>C. neoformans</i>	(Saikia <i>et al.</i> , 2014)
Fet4	Ferroxidasa de baja afinidad	<i>S. cerevisiae</i>	(Hassett <i>et al.</i> , 2000)
Smf1	Transportador de cationes divalentes	<i>S. cerevisiae</i>	(Chen <i>et al.</i> , 1999)
Smf3	Transportador de cationes divalentes	<i>S. cerevisiae</i>	(Portnoy <i>et al.</i> , 2000)
Fet3	Ferroxidasa	<i>S. cerevisiae</i>	(Askwith <i>et al.</i> , 1994)
CaFet3	Ferroxidasa	<i>C. albicans</i>	(Eck <i>et al.</i> , 1999)
FetC	Ferroxidasa	<i>A. fumigatus</i>	(Schrettl <i>et al.</i> , 2004)
Cfo1	Ferroxidasa	<i>C. neoformans</i>	(Lian <i>et al.</i> , 2005)
Cfo2	Ferroxidasa	<i>C. neoformans</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2009)
Fer1	Ferroxidasa	<i>U. maydis</i>	(Eichhorn <i>et al.</i> , 2006)
Fet1	Ferroxidasa	<i>F. graminearum</i>	(Park <i>et al.</i> , 2007)
Fet2	Ferroxidasa	<i>F. graminearum</i>	(Park <i>et al.</i> , 2007)
Ftr1	Permeasa de hierro	<i>S. cerevisiae</i>	(Stearman <i>et al.</i> , 1996)
CaFtr1	Permeasa de hierro	<i>C. albicans</i>	(Ramanan & Wang, 2000)
CaFtr2	Permeasa de hierro	<i>C. albicans</i>	(Ramanan & Wang, 2000)
FtrA	Permeasa de hierro	<i>A. fumigatus</i>	(Schrettl <i>et al.</i> , 2004)
Cft1	Permeasa de hierro	<i>C. neoformans</i>	(Lian <i>et al.</i> , 2005)
Cft2	Permeasa de hierro	<i>C. neoformans</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2009)
Fer2	Permeasa de hierro	<i>U. maydis</i>	(Eichhorn <i>et al.</i> , 2006)
Fgftr1	Permeasa de hierro	<i>F. graminearum</i>	(Park <i>et al.</i> , 2007)
Fgftr2	Permeasa de hierro	<i>F. graminearum</i>	(Park <i>et al.</i> , 2007)
Ftr1	Permeasa de hierro	<i>R. oryzae</i>	(Fu <i>et al.</i> , 2004)
Ccc2	Transportador de cobre microsomal	<i>S. cerevisiae</i>	(Yuan <i>et al.</i> , 1995)
CAPTACIÓN DE HIERRO POR SIDERÓFOROS			
Fit1p	Manoproteína de pared celular	<i>S. cerevisiae</i>	(Protchenko <i>et al.</i> , 2001)
Arn1-4	Transportador de sideróforos	<i>S. cerevisiae</i>	(Heymann <i>et al.</i> , 2000)
Rfs	Sintetasa de rhizoferrina	<i>R. delemar</i>	(Carroll <i>et al.</i> , 2017)
Fob1-2	Receptores de ferrioxamina	<i>R. oryzae</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2015)

Tabla 1. Continuación.

Proteína	Función	Especie	Referencia
CAPTACIÓN DE HIERRO DEL GRUPO HEMO			
Hmx1	Hemo oxigenasa	<i>S. cerevisiae</i>	(Protchenko & Philpott, 2003)
CaHmx1	Hemo oxigenasa	<i>C. albicans</i>	(Santos <i>et al.</i> , 2003)
Cig1	Hemóforo	<i>C. neoformans</i>	(Cadieux <i>et al.</i> , 2013)
ALMACENAMIENTO DE HIERRO INTRACELULAR			
Ccc1	Transportador de hierro vacuolar	<i>S. cerevisiae</i>	(Li <i>et al.</i> , 2001)
REGULACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE HIERRO			
SreA	Factor GATA represor	<i>A. fumigatus</i>	(Schrettl <i>et al.</i> , 2008)
HapX	Factor bZIP activador	<i>A. fumigatus</i>	(Schrettl <i>et al.</i> , 2010)
Cir1	Factor GATA activador/represor	<i>C. neoformans</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2006)
HapX	Factor bZIP activador	<i>C. neoformans</i>	(Jung & Kronstad, 2008)
SreA	Factor GATA represor en hifa	<i>T. marneffeii</i>	(Pasricha <i>et al.</i> , 2016)
Aft1	Factor de transcripción activador	<i>S. cerevisiae</i>	(Casas <i>et al.</i> , 1997)
Aft2	Factor de transcripción activador	<i>S. cerevisiae</i>	(Blaiseau <i>et al.</i> , 2001)

Una vez el hierro se encuentra en su forma reducida, puede entrar en el citosol a través de un mecanismo de captación de hierro que se clasifica en baja o alta afinidad según su especificidad por la concentración de hierro presente en el medio. Los sistemas de baja afinidad (K_m de 40 μM) funcionan en medios ricos como transportadores de hierro, pero también de otros elementos como magnesio y calcio. Estos mecanismos han sido descritos en numerosas especies, siendo los más estudiados la permeasa Fet4 de *S. cerevisiae* (Hassett *et al.*, 2000) y los transportadores de metales divalentes de la familia Nramp llamados Smf (Chen *et al.*, 1999) (Figura 5 y Tabla 1). Sin embargo, los mecanismos más habituales de captación de hierro en hongos patógenos y con una regulación sofisticada son aquellos de alta afinidad, que están especializados en la captación de hierro cuando su disponibilidad es limitada. Este sistema permite captar hierro a partir de las proteínas transportadoras de hierro en el suero del hospedador, transferrina y lactoferrina. El hierro reducido es transportado al interior celular por el sistema de transporte de alta afinidad (K_m de 0,2 μM) formado por dos proteínas acopladas que actúan secuencialmente: una ferroxidasa multicobre (Fet3) (Askwith *et al.*, 1994) y una permeasa de hierro transmembrana (Ftr1) (Stearman *et al.*, 1996). Brevemente, el ion ferroso es oxidado por la ferroxidasa en una reacción dependiente de cobre y de oxígeno molecular. Después, el ion férrico es transportado al interior del citosol a través de la permeasa Ftr1. A pesar de que se desconocen las ventajas del acoplamiento de ambas proteínas, el paso de oxidación

previo al transporte es obligatorio, ya que el déficit de actividad oxidasa reduce la captación de hierro (Wang *et al.*, 2003) (Figura 5 y Tabla 1).

Las ferroxidasas pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre, donde se incluyen las lacasas o la ceruloplasmina (Hassett *et al.*, 1998). Estas proteínas contienen cuatro átomos de cobre organizados en tres sitios según sus características espectrofotométricas: tipo 1, tipo 2 y tipo 3 (formado por dos átomos de cobre acoplados) (Figura 6). Tanto la oxidación de hierro como la reducción de oxígeno molecular a agua ocurre en distintos sitios de cobre, teniendo lugar la oxidación del ion ferroso en el sitio de cobre tipo 1. Los cuatro átomos de cobre son necesarios para la actividad oxidasa de la ferroxidasa y, para ello, la ferroxidasa sufre modificaciones postraduccionales donde el transportador de cobre microsomal Ccc2 incorpora el cobre necesario (Yuan *et al.*, 1995) (Figura 5 y Tabla 1). Aunque la mayoría de las oxidasas multicobre presentan especificidad por una gran variedad de sustratos orgánicos, la actividad de las ferroxidasas es exclusiva de la oxidación de hierro.

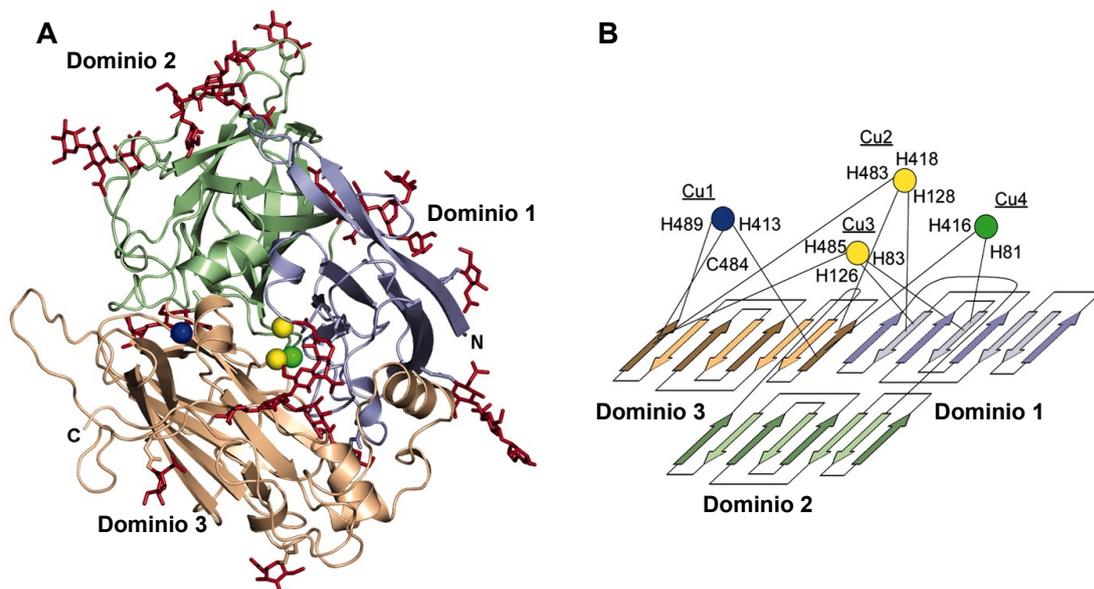


Figura 6. Estructura y topología del plegamiento de la ferroxidasa Fet3 de *S. cerevisiae*. (A) Diagrama de cintas de Fet3. Los sitios de cobre tipo 1, tipo 2 y tipo 3 se muestran en azul, verde y amarillo, respectivamente. Los tres dominios tipo plastocianina (tipo barril β en forma greca) se muestran coloreados en azul, verde y marrón. En rojo se indican los residuos de carbohidratos identificados en el mapa de densidad electrónica. (B) Esquema de la topología de Fet3. Se muestran los aminoácidos que actúan como ligandos de los cuatro átomos de cobre (Taylor *et al.*, 2005).

Los hongos presentan multitud de oxidasas multicobre en su genoma. La diferencia importante entre las ferroxidasas y el resto de las oxidasas multicobre es la presencia de dos residuos ácidos, E185 y D409, en su secuencia proteica (Kosman,

2010). Ambos residuos forman parte del sitio funcional donde se oxida el ion ferroso. El papel de las ferroxidasas en el transporte de hierro es clave, pero no pueden actuar como transportadoras ya que presentan un único dominio transmembrana en su extremo carboxilo terminal (Taylor *et al.*, 2005). Para el correcto funcionamiento del mecanismo de captación de hierro es necesaria la permeasa de hierro de alta afinidad Ftr1. Esta permeasa tiene 7 hélices transmembrana, con una orientación generalmente en N-terminal externo C-terminal interno, y el motivo REGLE transmembrana, que es esencial para su unión a hierro (Stearman *et al.*, 1996).

El sistema de captación de hierro ferroxidasa-permeasa ha sido caracterizado en varios hongos patógenos. En *C. albicans* se han identificado dos permeasas de hierro CaFTR1 y CaFTR2. La expresión de *CaFTR1* se induce a bajas concentraciones de hierro, mientras que la expresión de *CaFTR2* es opuesta, siendo los mutantes en *CaFTR1* menos virulentos en modelos de infección de ratón (Ramanan & Wang, 2000). Por el contrario, mutantes en la ferroxidasa CaFet3 no presentan cambios de patogenicidad (Eck *et al.*, 1999). En *A. fumigatus* se han identificado la ferroxidasa FetC y la permeasa FtrA en la captación de hierro de alta afinidad, pero sus funciones no son esenciales para desarrollar la infección (Schrettl *et al.*, 2004). En *C. neoformans* se han caracterizado dos parejas de proteínas del sistema, la ferroxidasa CFO1 y la permeasa de hierro CFT1 (Lian *et al.*, 2005), y sus homólogas CFO2 y CFT2. La pareja CFO1-CFT1 es la más relevante en la captación de hierro durante la infección, ya que mutaciones en la ferroxidasa CFO1 provocan un descenso en la virulencia y una mayor sensibilidad a antifúngicos (Jung *et al.*, 2009). En patógenos de plantas este sistema de captación de hierro también se ha estudiado como factor de virulencia, por ejemplo, en *Ustilago maydis* la permeasa Fer2 y la ferroxidasa Fer1 están implicadas en la patogénesis (Eichhorn *et al.*, 2006); mientras que en *Fusarium graminearum* dos parejas de ferroxidasa/permeasa, FgFtr1/FgFet1 y FgFtr2/FgFet2 (Park *et al.*, 2007), están implicadas en la captación de hierro pero no son esenciales para la virulencia (Greenshields *et al.*, 2007).

En Mucorales, la captación de hierro por el mecanismo de alta afinidad fue descrita por primera vez en *Rhizopus oryzae* con la caracterización del gen *Ftr1* (Fu *et al.*, 2004), cuya expresión está determinada por la baja concentración de hierro en el medio. Posteriormente, se confirmó el papel clave de Ftr1 para la infección de *R. oryzae* en un modelo de ratón diabético, ya que el gen se sobreexpresaba *in vivo* durante la infección y estirpes mutantes heterocariontes con copias limitadas del gen mostraban una virulencia reducida (Ibrahim *et al.*, 2010). Además, la inmunización pasiva de ratones diabéticos con anticuerpos anti-Ftr1 protegía a los animales de la infección. El sistema

de captación de hierro de alta afinidad es tan relevante en Mucorales que el silenciamiento de la permeasa *Ftr1* provoca apoptosis mediada por caspasas en esporas de *R. oryzae* cuando los niveles de hierro en el medio son escasos (Shirazi *et al.*, 2015). De hecho, la privación de hierro en el fagosoma de macrófagos ocasiona la inducción de genes de captación de hierro en *R. oryzae*, incluyendo el gen *Ftr1*. Por lo tanto, cuando hay defectos en el sistema de captación de hierro las esporas del hongo no son capaces de germinar dentro del fagosoma (Andrianaki *et al.*, 2018). En otros hongos mucorales la investigación del sistema de captación de hierro de alta afinidad sólo ha llegado a la identificación genómica de supuestos genes a participar en el mecanismo reductivo. En el genoma de *Lichtheimia corymbifera* se han identificado cuatro copias de *Ftr1* y tres de ellas están dispuestas en tándem junto a un gen que cifra una oxidasa multicobre. De todas estas copias de la permeasa, solo dos se expresan a bajas concentraciones de hierro, con el mismo patrón de expresión que las ferroxidasas asociadas; mientras que las dos copias restantes se expresan de forma constitutiva (Schwartz *et al.*, 2014).

I.2.1.2. Captación de hierro mediada por sideróforos

Los sideróforos son pequeños compuestos orgánicos que unen hierro con alta afinidad y especificidad. Por tanto, la captación de hierro mediada por sideróforos es esencial para la virulencia en hongos patógenos. La mayoría de los hongos son capaces de sintetizar y secretar sideróforos o secuestrar sideróforos generados por otros organismos, llamados en este caso xenosideróforos. Los sideróforos identificados son muy numerosos y estructuralmente diferentes (Winkelmann, 2007). Los más comunes en hongos son los hidroxamatos, caracterizados en las especies patógenas de *Ustilago* y *Aspergillus*, donde se incluyen los ferricromos, fusarinas y coprógenos (Haas, 2003). Existen estirpes patógenas que no producen sideróforos, como *C. albicans* (Heymann *et al.*, 2002) y *C. neoformans* (Tangen *et al.*, 2007), pero que son capaces de captar xenosideróforos de otros microorganismos usando receptores específicos en sus membranas.

Durante la infección, los sideróforos pueden ser intracelulares, almacenando hierro durante la invasión, o extracelulares, para captar el hierro del medio. Por lo tanto, para la captación de hierro a través de sideróforos existen transportadores específicos. En muchas ocasiones, cuando el hongo es incapaz de sintetizar sus propios sideróforos, estos transportadores son particulares para xenosideróforos. Las enzimas responsables de la biosíntesis de sideróforos y su transporte están compartimentalizadas, y la expresión de los genes correspondientes está coordinada y regulada por la disponibilidad de hierro. En *S. cerevisiae*, las manoproteínas Fit aumentan la retención

de sideróforos en la pared celular y son los transportadores de la familia ARN/SIT los encargados de transportar, mediante endocitosis, el complejo sideróforo-hierro al interior celular (Heymann *et al.*, 2000) (Figura 5 y Tabla 1). Hasta la fecha, se han identificado transportadores de sideróforos en numerosos hongos, donde cada transportador exhibe una especificidad hacia un grupo particular de sideróforos (Philpott, 2006).

La captación de hierro mediante sideróforos es crucial para la infección en algunos hongos patógenos, como especies de *Aspergillus* y de *Fusarium* donde incluso la inhibición de la síntesis de sideróforos mediante el uso de estatinas afecta al potencial virulento de estos hongos en modelos de ratón (Leal *et al.*, 2013). No obstante, la síntesis endógena de sideróforos en Mucorales no se ha visto estrechamente relacionada con la virulencia. Los Mucorales, a diferencia de otros hongos patógenos, no producen hidroxamatos, sino que sus sideróforos son carboxilatos. La rhizoferrina (Thieken & Winkelmann, 1992) es el sideróforo endógeno de numerosas especies de Mucorales, que es generado por la enzima sintetasa de rhizoferrina (Rfs) (Carroll *et al.*, 2017). Aunque su biosíntesis y transporte está implicado en la captación de hierro del medio, no se ha relacionado con el proceso de patogénesis, ya que es incapaz de captar hierro del suero sanguíneo (de Locht *et al.*, 1994). Sin embargo, las especies patógenas de Mucorales pueden usar xenosideróforos durante la infección, agravando su virulencia. La deferoxamina es un sideróforo clínico empleado en tratamientos de diálisis, y se considera el xenosideróforo más frecuente relacionado con la mucormicosis, puesto que tratamientos prolongados con deferoxamina aumentan la predisposición a padecer la infección (Boelaert *et al.*, 1993). La captación de deferoxamina se ha estudiado en *Rhizopus* spp., que son capaces de emplear la ferrioxamina (complejo deferoxamina/hierro) como xenosideróforo (de Locht *et al.*, 1994). La ferrioxamina se une a la pared celular de las esporas gracias a los receptores Fob1 y Fob2 (Fob del inglés *Ferrioxamine binding*), donde es transportada al interior de la célula a través del sistema de captación de alta afinidad (Liu *et al.*, 2015) (Figura 7 y Tabla 1). Así, estirpes de *R. oryzae* donde se silencian los genes *fob1* y *fob2* son menos virulentas en modelos de ratón tratados con deferoxamina. La presencia de genes homólogos a *fob1* y *fob2* en otras estirpes patógenas de Mucorales ha hecho que el uso de deferoxamina se considere un factor de virulencia crítico para la mucormicosis.

Algunas de las estrategias diseñadas para prevenir la mucormicosis en pacientes de susceptibilidad incluyen la sustitución de la deferoxamina por otros quelantes de hierro que no puedan ser empleados como xenosideróforos. La incapacidad de estirpes patógenas de Mucorales de desarrollar la infección en ratones tratados con quelantes

sustitutos, como deferiprone (Ibrahim *et al.*, 2006) o deferasirox (Ibrahim *et al.*, 2007), ha planteado el uso de estos quelantes en terapias combinadas con antifúngicos para el tratamiento de la infección. Sin embargo, estudios recientes indican que la terapia combinada usando deferasirox y anfotericina B no mejora el pronóstico de la mucormicosis en algunos modelos de ratón (Schwarz *et al.*, 2019), por lo que es necesaria la investigación de nuevas combinaciones para el uso de sideróforos como terapia complementaria.

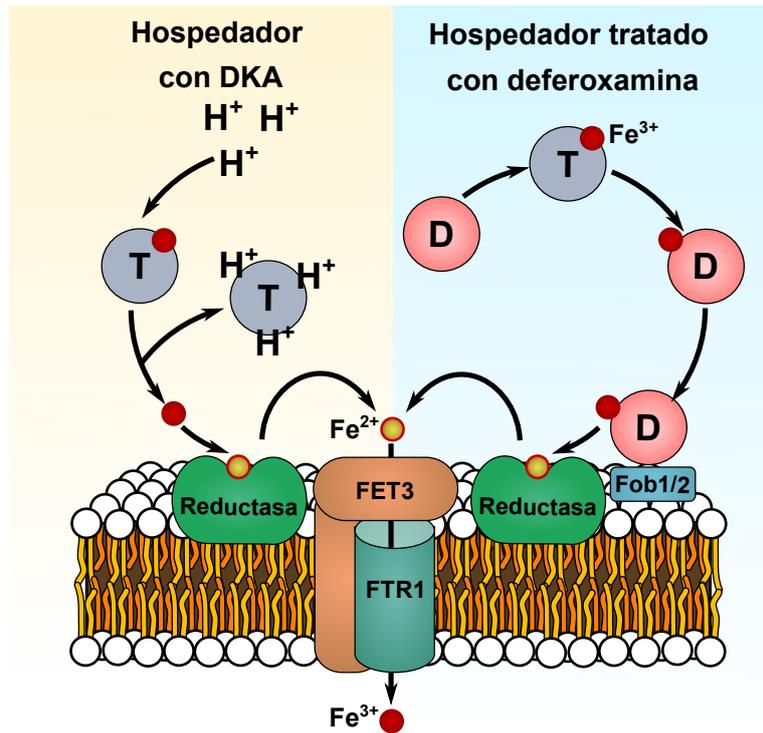


Figura 7. Mecanismos de captación de hierro en condiciones de alta disponibilidad de hierro en suero propuestos para *R. oryzae*. En pacientes con cetoacidosis diabética (del inglés *diabetic ketoacidosis* DKA), el ambiente ácido causa un desplazamiento mediado por protones del ion férrico (Fe^{3+}) desde las moléculas transportadoras de hierro, incluyendo la transferrina (T). El ion férrico es reducido a ion ferroso (Fe^{2+}) por reductasas de la membrana. Por el contrario, la deferoxamina (D) quelata el hierro directamente de la transferrina, dando lugar a la ferrioxamina ($\text{D}+\text{Fe}^{3+}$). Esta se une a los receptores de membrana Fob1 y Fob2, donde el hierro es reducido por las reductasas de membrana y se libera de la ferrioxamina para entrar a la célula. En ambos casos participa el mecanismo reductor de captación de hierro, ya que la oxidasa multicobre oxida el hierro a ion férrico, que atraviesa la membrana por la permeasa de alta afinidad (Ftr1). Figura modificada de Ibrahim *et al.*, 2008 y de Liu *et al.*, 2015.

I.2.1.3. Captación de hierro del grupo hemo

La mayor fuente de hierro en hospedadores mamíferos está presente en forma de grupo hemo. Numerosos hongos patógenos son capaces de secretar hemolisinas para lisar los eritrocitos y acceder al grupo hemo como estrategia para captar hierro durante la infección. *H. capsulatum* (Foster, 2002), *C. albicans* (Manns *et al.*, 1994) y *C. neoformans* (Jung & Kronstad, 2008) tienen actividad hemolítica y pueden crecer en medios donde la única fuente de hierro es la hemoglobina. En *C. albicans* se han identificado varios factores hemolíticos y receptores de superficie específicos de unión al grupo hemo que participan en la captación de hierro rápida del hospedador. La posterior degradación del grupo hemo la catalizan hemo oxigenasas como CaHmx1, en una etapa de asimilación más lenta (Santos *et al.*, 2003). En *C. neoformans*, aunque no se han identificado hemolisinas, se ha caracterizado un hemóforo, la manoproteína Cig1, implicada en la captación de hierro del grupo hemo durante la infección (Cadieux *et al.*, 2013) (Tabla 1). En Mucorales no se ha caracterizado ningún mecanismo hemolítico o de captación de hierro a partir del grupo hemo de mamíferos. Durante el proyecto de secuenciación de los genomas de *Rhizopus* spp. se identificaron genes homólogos a la oxigenasa de hemo CaHmx1 de *C. albicans* (Ma *et al.*, 2009). La identificación de genes involucrados en este mecanismo de captación de hierro podría explicar la capacidad angioinvasiva de los Mucorales durante la mucormicosis.

I.2.2. Almacenamiento de hierro intracelular

Tras el transporte de hierro al interior celular, el almacenamiento es una etapa crítica para evitar la producción de radicales libres debido al hierro soluble en el citosol. Las vacuolas se consideran el depósito de hierro más abundante en hongos, donde se une a polifosfatos (Raguzzi *et al.*, 1988). En *S. cerevisiae* se identificó Ccc1 como la proteína transportadora que importa el hierro a la vacuola en condiciones ricas en hierro (Li *et al.*, 2001) (Figura 5 y Tabla 1). Cuando la concentración de hierro disponible disminuye, *S. cerevisiae* exporta el hierro vacuolar hacia el citosol usando un complejo de transporte de hierro muy similar al de ferroxidasa/permeasa (Stearman *et al.*, 1996). En hongos filamentosos como *A. fumigatus* y *U. maydis* se han identificado mecanismos similares para la distribución de hierro entre vacuola y citosol, algunos de ellos homólogos a los caracterizados en *S. cerevisiae* y otros con una función similar a los transportadores ABC (Howard, 1999).

Se han caracterizado proteínas de unión a hierro para su almacenamiento en animales (ferritina), plantas (fitoferritinas) y bacterias (bacterioferritinas) (Theil, 1987). Sin embargo, el único grupo de hongos donde se ha descrito este tipo de proteínas es en los Mucorales (LaBombardi *et al.*, 1982). Tres tipos de ferritinas se han identificado

en estos hongos: la microferritina, similar a las ferritinas de mamíferos; cigoferritina, una ferritina específica de Mucorales; y bacterioferritina, presente en *Absidia spinosa* (Carrano *et al.*, 1996). Estas proteínas similares a ferritina no se han encontrado en ningún miembro de los filos Ascomycota y Basidiomycota, donde el almacenamiento principal de hierro es mediante sideróforos. La presencia de ferritina únicamente en Mucorales como método de almacenamiento de hierro podría ser un mecanismo importante para el metabolismo del hierro en la mucormicosis ya que, al ser una característica única de esta infección, una investigación detallada podría resultar en nuevas dianas terapéuticas.

I.2.3. Regulación de la captación de hierro

La diversidad de mecanismos de captación de hierro caracterizados en un mismo organismo hace patente la actuación de un sistema de regulación que coordine la expresión y función de las proteínas implicadas, evitando redundancias en los mecanismos, y controlando la homeostasis intracelular del hierro. En hongos, tanto la captación como el almacenamiento de hierro están regulados por mecanismos de control transcripcional conservados, mediados por la disponibilidad de hierro. Este control es ejercido por activadores transcripcionales o represores transcripcionales tipo GATA (Hortschansky *et al.*, 2007). De estos, la mayoría de las especies presentan una regulación dependiente de hierro controlada por los represores GATA. Ante concentraciones altas de hierro estos reguladores reprimen la transcripción de sus genes diana, especialmente aquellos implicados en la ruta de captación de hierro de alta afinidad y otros genes asociados (Philpott, 2006).

En *Aspergillus* spp., la insuficiencia de hierro ocasiona una intensa remodelación transcripcional donde participan dos factores de transcripción interconectados: el factor GATA SreA (Schrettl *et al.*, 2008) y el factor tipo bZIP HapX (Schrettl *et al.*, 2010) (Figura 8). En ambientes ricos en hierro se activa SreA que reprime a los genes de captación de hierro, incluyendo los genes del sistema reductor y de generación de sideróforos. En medios pobres en hierro, HapX reprime las rutas de consumo de hierro intracelular, incluyendo la biosíntesis del grupo hemo y la respiración, e inhibe a SreA, creando un bucle de retroalimentación negativa. Defectos en HapX, pero no en SreA, atenúan la virulencia de *A. fumigatus* en un modelo de ratón de aspergilosis, lo que resalta la importancia de la regulación del metabolismo del hierro en la virulencia (Haas, 2012). En *C. neoformans* la regulación ocurre de forma contraria, el factor GATA Cir1 (Jung *et al.*, 2006) actúa como represor y activador de la captación de hierro en función de su disponibilidad, y es regulado de forma positiva por HapX (Jung & Kronstad, 2008). En el patógeno dimórfico *T. marneffeii* existe una sobreexpresión de los sistemas de captación

de hierro en crecimiento como levadura, que es reprimido por SreA durante el crecimiento micelial no patogénico (Pasricha *et al.*, 2016). En *S. cerevisiae*, la activación de más de 25 genes implicados en la captación de hierro (incluyendo reductasas, ferroxidasas y permeasas) es mediada por los factores de transcripción Aft1 (Casas *et al.*, 1997) y Aft2 (Blaiseau *et al.*, 2001) a través de la unión a una secuencia consenso que poseen los promotores de los genes que forman este “regulón de hierro” (Rutherford *et al.*, 2003) (Figura 5).

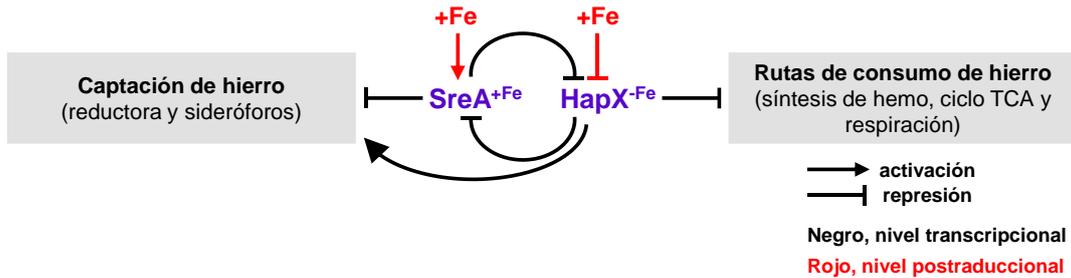


Figura 8. Esquema de la regulación por hierro mediada por SreA y HapX en *Aspergillus* spp. Los factores de transcripción SreA y HapX responden a la concentración de hierro en el medio. SreA es activado por la alta concentración de hierro e inhibe los sistemas de captación de hierro. HapX reprime las rutas de consumo de hierro y es reprimido por altas concentraciones de hierro. Ambos factores se reprimen mutuamente. TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos o, en inglés, *tricarboxylic acid cycle* (Haas, 2012).

En Mucorales no se ha caracterizado el mecanismo de regulación de captación de hierro. La única aproximación para desentrañar la red regulatoria de la captación de hierro en hongos basales se realizó en *L. corymbifera* donde se analizó el transcriptoma del hongo creciendo a bajas concentraciones de hierro, identificándose un gen sobreexpresado que mostraba una composición de dominios similar a los factores de transcripción tipo GATA (Schwartz *et al.*, 2014). En el mismo análisis se identificó otro factor de transcripción tipo CRZ1 (del inglés *Calcineurin-Responsive Zinc finger*) que podría estar regulado por la ruta de la calcineurina.

I.2.4. Estudio del metabolismo del hierro en la mucormicosis

A diferencia de otras infecciones fúngicas, un factor de susceptibilidad crítico en la mucormicosis es la presencia de hierro libre en el plasma, sintomatología frecuente en pacientes con diabetes descontroladas que incluyen cetoacidosis diabética (Artis *et al.*, 1982). Estos pacientes presentan altos niveles de hierro libre debido al pH ácido que disocia la transferrina (Figura 7). Los Mucorales aprovechan esta disociación del hierro de la transferrina para captarlo a través del mecanismo ferroxidasa/permeasa, lo que les permite un crecimiento rápido en estos pacientes que lleva a la angiоinvasión y

diseminación de la infección (Baldin & Ibrahim, 2017). Esto hace que la captación de hierro de alta afinidad se considere un factor de virulencia crucial en los Mucorales, ya que está implicada en la captación de hierro durante la infección.

A pesar de la importancia de la captación de hierro en Mucorales, la investigación en el campo es preliminar, ya que el principal obstáculo para estudiar modelos de mucormicosis es la incapacidad de transformar de forma eficiente estirpes de Mucorales. Estos estudios sobre el metabolismo del hierro en Mucorales, que incluyen la captación, almacenamiento y regulación del hierro, consisten principalmente en escrutinios bioinformáticos del genoma de algunas especies, donde han encontrado genes que podrían estar implicados en dichos procesos. La validación experimental de estos descubrimientos mediante análisis funcionales se ha basado en el uso de *R. oryzae* como modelo para el estudio de los mecanismos del metabolismo de hierro. De esta manera, se ha caracterizado una de las dos permeasas de hierro que presenta este hongo (*Ftr1*) (Fu *et al.*, 2004). En el mismo modelo se han identificado dos receptores de pared celular de unión a ferrioxamina, Fob1 y Fob2, cuya función ha sido caracterizada parcialmente mediante el silenciamiento de los genes que cifran los receptores, siendo inviable la generación de estirpes mutantes dobles en *R. oryzae*. Sin embargo, los protocolos de transformación de esta estirpe son poco exitosos, pudiendo generar sólo mutantes simples heterocariontes e inestables, ya que tras varios pases de crecimiento vegetativo pierden el alelo mutante (Ibrahim *et al.*, 2010). Por lo tanto, es clave en el estudio de la mucormicosis el uso de un modelo como *M. circinelloides*, donde se ha progresado más en el desarrollo de herramientas para la manipulación de su genoma (Nicolás *et al.*, 2018).

I.3. *Mucor circinelloides* como organismo modelo de mucormicosis

I.3.1. Clasificación, morfología y ciclo de vida

M. circinelloides, como se ha descrito anteriormente, es un hongo filamentososo que pertenece al orden Mucorales, donde se engloban los agentes causales de la mucormicosis. El orden Mucorales, junto con Endogonales y Umbelopsidales, forman el subfilo Mucoromycotina, que pertenece al filo Mucoromycota (Spatafora *et al.*, 2016). Tradicionalmente, los hongos de los filos Mucoromycota y los Zoopagomycota se agrupaban en los hongos cigomicetos, por la estructura de la espora sexual o cigospora. Sin embargo, se trata de un grupo polifilético y se ha actualizado su clasificación recientemente (Figura 9). Los hongos mucorales son considerados hongos basales

porque divergieron temprano del árbol filogenético, por lo que su posición filogenética es más cercana a los animales que la de los hongos del subreino Dikarya, y por lo tanto buenos organismos modelo para el estudio de procesos celulares conservados en los eucariotas.

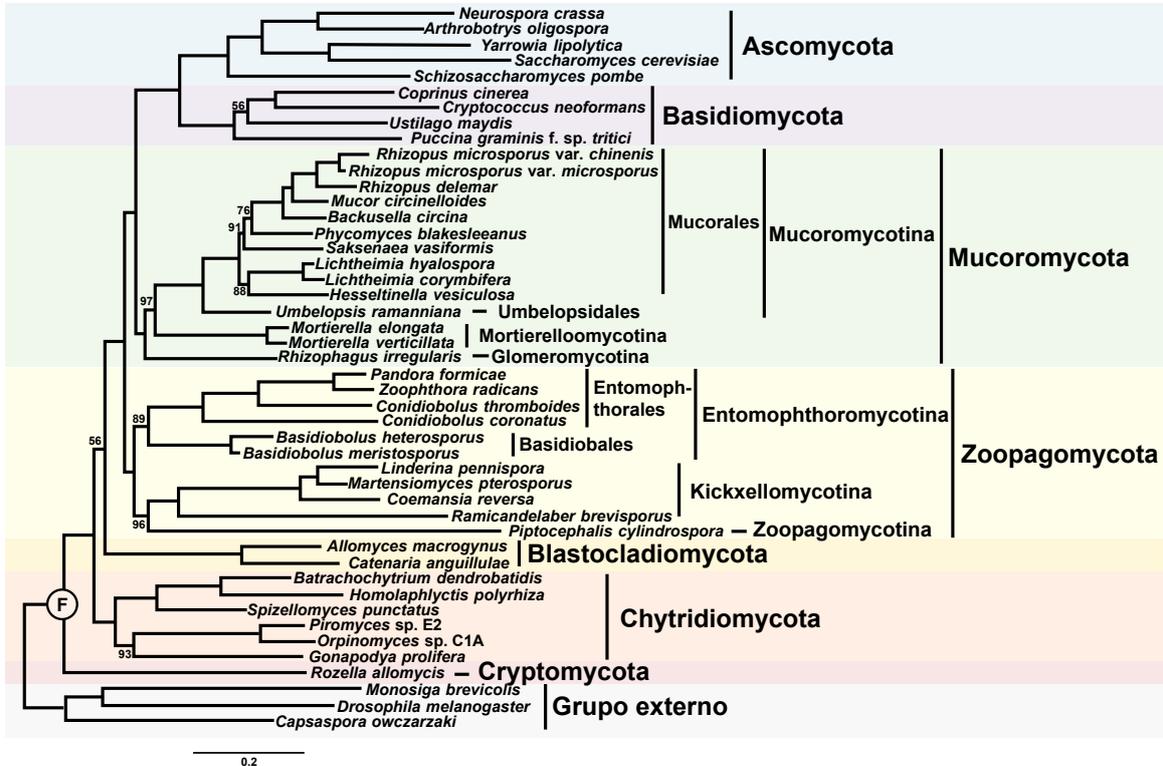


Figura 9. Árbol filogenético del reino de los hongos. Construido a partir del alineamiento de 192 proteínas ortólogas conservadas. Todas las ramas presentan un valor de soporte tipo *bootstrap* del 100%, excepto cuando se indica con otro valor. F marca el ancestro común de los hongos. Tres genomas de especies de holozoos (metazoos, coanozoos e ictiospóreos) se usaron como grupo externo (Spatafora *et al.*, 2016).

Morfológicamente, el filo Mucoromycota se caracteriza por la formación de la cigospora por fusión de gametangios durante el ciclo sexual (Figura 10) y micelio generalmente cenocítico (salvo excepciones donde pueden aparecer septos). Estos hongos producen esporas vegetativas aflageladas e inmóviles llamadas esporangiosporas, que se desarrollan de forma endógena en estructuras globosas o esporangios, sostenidos por hifas aéreas denominadas esporangióforos (Schipper, 1976). Los Mucorales se distinguen taxonómicamente por la presencia de una separación del esporangióforo y el esporangiom, que forma un septo pronunciado llamado columela.

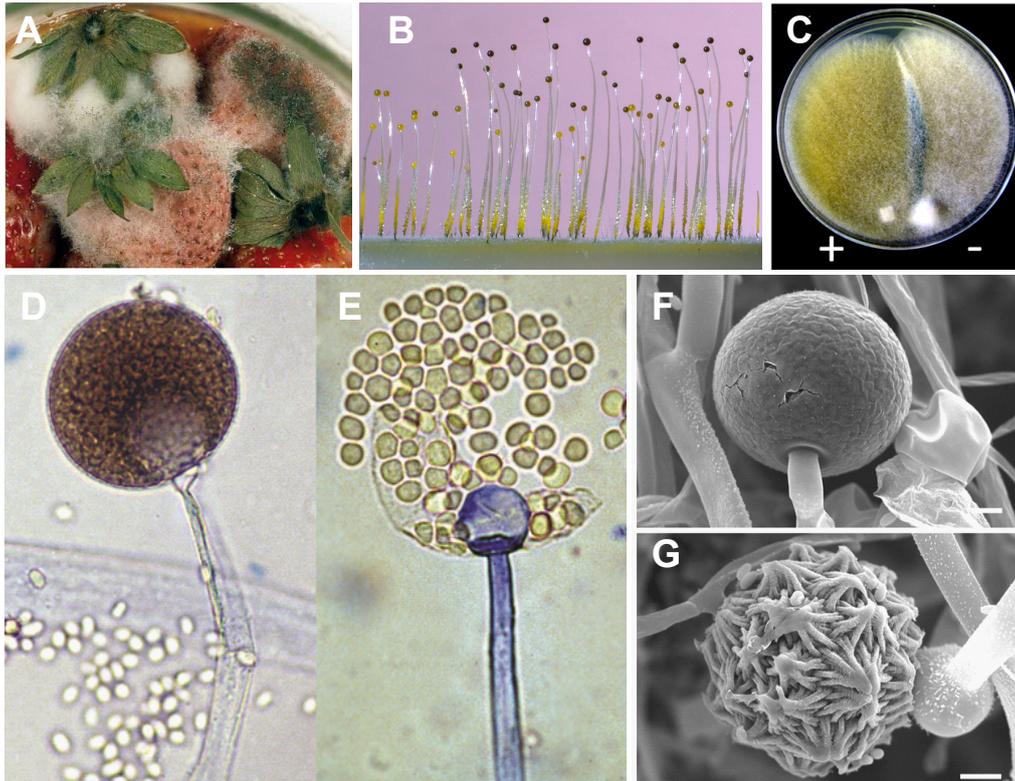


Figura 10. Diversidad morfológica de Mucorales. (A) Micelio de *Rhizopus stolonifer* creciendo sobre fresas (Hoffmann *et al.*, 2013). (B) Esporangióforos de *Phycomyces blakesleeenae* (Nguyen, 2018). (C) Micelios de *M. circinelloides* de distinto tipo sexual (+) y (-) cuyo cruzamiento produce una línea oscura que corresponde con la zona de producción de cigosporas (Li *et al.*, 2011). (D) Esporangióforo relleno de esporangiosporas melanizadas de *Mucor* spp. (de Hoog *et al.*, 2001). (E) Esporangiosporas saliendo del esporangióforo, se aprecia la columela teñida de azul de lactofenol (de Hoog *et al.*, 2001). (F) Esporangióforo y (G) cigospora de *M. circinelloides* al microscopio electrónico de barrido. La escala indica 10 μ m. (E), (F) y (G) son figuras tomadas de Li *et al.*, 2011.

Por lo general, *M. circinelloides* se reproduce de forma asexual, vía esporas que son liberadas de los numerosos esporangios (Figura 11). Estas esporas son multinucleadas, de forma redondeada y pigmentadas con melanina, pero varían en tamaño y número de núcleos en función de la estirpe (Li *et al.*, 2011). Estas esporas germinan pasando por una fase de crecimiento isotrópico, en la que se hinchan y posteriormente producen uno o varios tubos germinativos que formarán las hifas. El micelio, haploide y cenocítico donde no existen tabiques que separen los núcleos, crece rápidamente ramificándose y dando lugar a hifas aéreas que originarán los esporangióforos. Este ciclo de vida es corto y rápido, y es el que se utiliza para cultivar a *M. circinelloides* *in vitro*. Además, es el más frecuente en la naturaleza, siendo la vía infectiva en humanos a través de la inhalación o penetración de esporas en heridas (Cornely *et al.*, 2019).

Las especies del género *Mucor* son heterotálicas por lo que existen dos tipos sexuales (+) y (-), determinados por los genes *sexP* o *sexM* en el *locus MAT*, respectivamente. Estos genes cifran factores de transcripción con dominios del grupo de alta movilidad (HMG, del inglés *High Mobility Group*) (Idnurm *et al.*, 2008). Para la reproducción sexual deben encontrarse dos micelios de distinto tipo sexual, lo que induce la diferenciación de las hifas sexuales o cigóforos que se fusionan por plasmogamia (Figura 11) (Li *et al.*, 2011). Esta fusión forma los gametangios, separados del resto de la hifa por septos, donde se van acumulando esporolenina y melanina dando lugar a la cigospora. En la cigospora se produce la cariogamia de dos núcleos haploides y posterior meiosis. De los cuatro productos meióticos, solo uno sobrevive y el resto degeneran. Tras un periodo de latencia, la cigospora germina formando una hifa aérea que sustenta el germosporangio, donde se engloban las germosporas que darán lugar a un nuevo micelio (Gauger, 1965). Actualmente se desconoce el proceso adecuado para la germinación de la cigospora hasta la obtención de una progenie viable en condiciones de laboratorio entre estirpes de *M. circinelloides*, por lo que los experimentos de genética clásica realizando cruzamientos quedan descartados para esta especie.

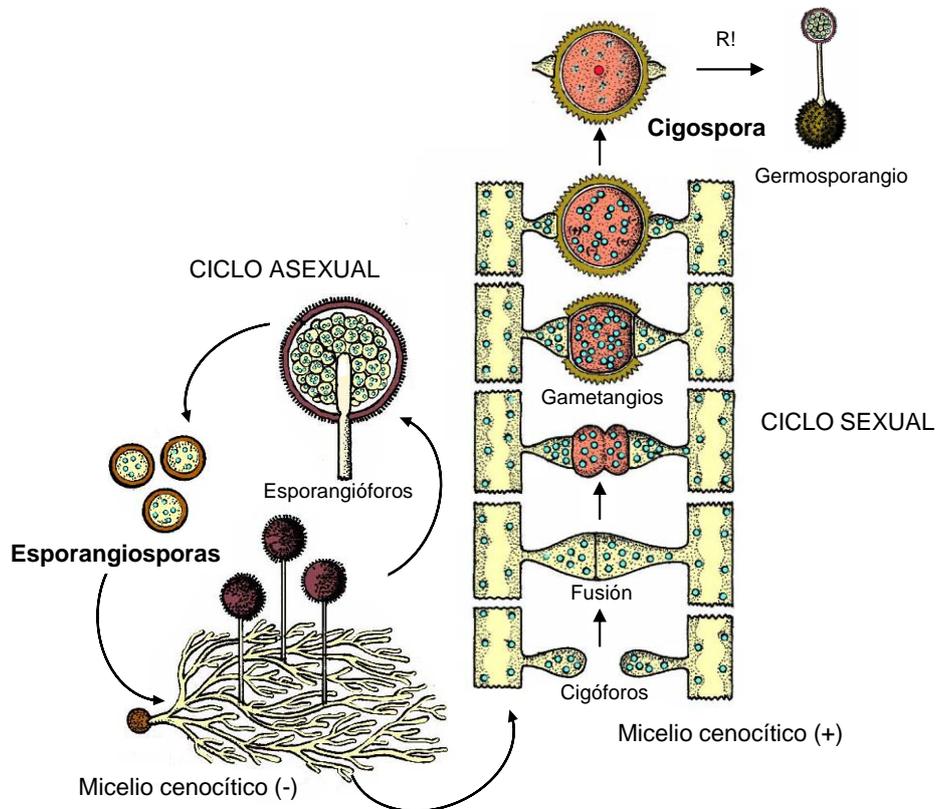


Figura 11. Ciclo de vida de *Mucor* spp. Se indican las estructuras morfológicas implicadas en la reproducción asexual y sexual. R! indica el punto donde ocurre la meiosis. Figura adaptada de Díaz González *et al.*, 2004.

1.3.2 *M. circinelloides* como organismo modelo

Los Mucorales son hongos filamentosos ubicuos, predominantemente saprófitos de materia orgánica en descomposición, pero también son patógenos de animales, plantas y otros hongos (Hoffmann *et al.*, 2013). De hecho, existen casos de contaminación de alimentos por Mucorales que han desencadenado problemas de salud pública (Lee *et al.*, 2014). Por lo tanto, la ecología de los Mucorales es tan diversa que su estudio ha dado lugar a numerosas aplicaciones biotecnológicas y a caracterizar procesos biológicos conservados en eucariotas.

Max Delbrück, ganador del premio Nobel en 1969 por sus estudios sobre la replicación y estructura genética de los virus, fue el primer investigador que consideró el mucoral *P. blakesleeanus* como un organismo modelo atractivo para el estudio de procesos biológicos de eucariotas, centrándose su nueva investigación en la caracterización de los sistemas de percepción y transducción de señales. Sin embargo, la investigación con hongos basales ha estado marcada por multitud de obstáculos hasta que se desarrolló un sistema de transformación genética eficaz en *M. circinelloides* (van Heeswijck & Roncero, 1984). Otras especies de Mucorales han sido empleadas como modelos, consiguiendo transformar *R. oryzae* (Skory, 2002) y *R. delemar* (Skory & Ibrahim, 2007). Sin embargo, la integración genética mediante recombinación homóloga es inestable en estas especies, por lo que tras varios ciclos de crecimiento vegetativo el alelo mutante se pierde recuperando el fenotipo silvestre (Ibrahim *et al.*, 2010). Por consiguiente, *M. circinelloides* f. *lusitanicus* es la especie mucoral que se ha conseguido transformar con éxito, empleando un protocolo mejorado que se basa en la electroporación de protoplastos (Gutiérrez *et al.*, 2011), lo que ha dado paso al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular. Estas técnicas incluyen el uso de vectores autorreplicativos que se mantienen por presión selectiva o la integración por recombinación homóloga para la delección o integración de fragmentos lineales de DNA (Nicolás *et al.*, 2018). La integración en *loci* diana de fragmentos específicos permite también la sobreexpresión estable de genes (Rodríguez-Frómata *et al.*, 2013), lo que es particularmente interesante desde el punto de vista biotecnológico. Tras el descubrimiento de la maquinaria de silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003), se han construido vectores capaces de silenciar genes diana mediante la generación de RNA de doble cadena. Actualmente, se están implementando nuevas técnicas para la mutación de genes basadas en el mecanismo de CRISPR-Cas9 en especies de Mucorales, como en *M. circinelloides* (Nagy *et al.*, 2017), *R. delemar* (Bruni *et al.*, 2019) y *L. corymbifera* (Ibragimova *et al.*, 2020). La principal limitación para el cultivo y transformación de *M. circinelloides* es su resistencia

a antifúngicos, por lo que es imprescindible el uso de marcadores de auxotrofia. Tres auxotrofías diferentes se han usado para la transformación genética: metionina (Anaya & Roncero, 1991), leucina (Roncero *et al.*, 1989) y uracilo (Benito *et al.*, 1992). La selección de transformantes es más eficaz en estirpes auxótrofas para leucina y uracilo, que se complementan con los genes *leuA1* y *pyrG*, respectivamente.

El genoma de la estirpe CBS277.49 de *M. circinelloides* se secuenció con éxito utilizando la plataforma de Illumina, dando lugar a un genoma de alta calidad de 36,6 Mb ensamblado en 19 supercántigos o *scaffolds* (Corrochano *et al.*, 2016). Recientemente, un proyecto de colaboración financiado por el *Joint Genome Institute* (JGI), donde participa el grupo de investigación de Genómica y Biotecnología Molecular de Hongos de la Universidad de Murcia, pretende caracterizar la metilación de adeninas en la regulación de la expresión génica en hongos basales. Esta colaboración ha permitido la secuenciación del genoma de la estirpe de *M. circinelloides* MU402 con la plataforma de lecturas largas de Pacific Biosciences (PacBio). Esta nueva secuenciación ha dado lugar a un ensamblado más completo, llegando a secuenciar elementos repetitivos del genoma. En un trabajo reciente (Navarro-Mendoza *et al.*, 2019) se ha logrado por primera vez la expresión de proteínas fusionadas a epítopos fluorescente en Mucorales, en el que se han marcado dos proteínas del cinetocoro de *M. circinelloides*, lo que ha permitido la inmunoprecipitación de la cromatina y la identificación de los centrómeros de esta especie. Este proyecto ha sido posible gracias a la secuenciación del nuevo genoma y al desarrollo de nuevas técnicas de manipulación de Mucorales. Los Mucorales son los únicos hongos que carecen de CENP-A, la proteína clave del cinetocoro en la unión directa con el DNA para formar los nucleosomas centroméricos que determinan la identidad del centrómero. Esta ausencia tan importante ha sido caracterizada por primera vez en *M. circinelloides*, describiendo una estructura centromérica en mosaico. Estos centrómeros, nunca antes descritos en hongos, tienen una estructura híbrida con características de los centrómeros puntuales de *S. cerevisiae* (ya que el sitio de unión del cinetocoro es una secuencia corta de DNA) y de los centrómeros regionales del resto de hongos (pues contienen secuencias pericentroméricas largas con retrotransposones Grem-LINE1) (Navarro-Mendoza *et al.*, 2019).

La disponibilidad de un genoma secuenciado y el desarrollo de técnicas de biología molecular para el manejo de *M. circinelloides* ha permitido investigar aspectos de su biología como son las respuestas a la luz y transducción de señales (Silva *et al.*, 2006, 2008; Navarro *et al.*, 2013), la determinación del sexo y su evolución (Idnurm *et al.*, 2008), el silenciamiento génico y la regulación de la expresión genética por

pequeños RNAs endógenos (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016), la acumulación de lípidos (Ratledge, 2004), la biosíntesis de carotenoides (Navarro *et al.*, 2001) y el estudio de la cromatina centromérica (Navarro-Mendoza *et al.*, 2019).

I.3.3 Mecanismos de silenciamiento génico en *M. circinelloides*

El descubrimiento del silenciamiento génico mediado por RNA o RNA de interferencia (RNAi) a finales del siglo XX causó un impacto en la investigación sobre la regulación de la expresión génica. Se describió por primera vez en plantas y hongos (Napoli *et al.*, 1990; Romano & Macino, 1992), y en nemátodos se clarificó el mecanismo desencadenante (Fire *et al.*, 1998). Estas investigaciones pioneras dieron lugar a numerosos trabajos describiendo la presencia de este mecanismo en eucariotas. El silenciamiento génico se caracterizó principalmente como un mecanismo de defensa contra ácidos nucleicos invasivos, basado en la producción de pequeños RNAs interferentes (*siRNAs*, del inglés *small interfering RNA*) (Hammond *et al.*, 2000). El mecanismo básico de RNAi se desencadena por la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA, del inglés *double-stranded RNA*). Estas moléculas son reconocidas por una ribonucleasa de tipo III (Dicer) que procesa dsRNA precursor en siRNAs de un tamaño entre 21 y 25 nucleótidos (nt) (Bernstein *et al.*, 2001). Estos siRNAs se incorporan al complejo proteico de silenciamiento inducido por RNA o RISC (*RNA-induced silencing complex*) donde la proteína Argonauta (Ago) usa el siRNA como guía para producir un corte endonucleolítico en los RNAs mensajeros (mRNAs) diana (Zamore *et al.*, 2000; Hammond, 2001). Adicionalmente, en algunos organismos participa una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRP) que genera dsRNA a partir de RNA de una sola cadena (ssRNA, del inglés, *single-stranded RNA*) para inducir o amplificar el silenciamiento génico en un proceso de retroalimentación (Sijen *et al.*, 2001; Makeyev & Bamford, 2002; Forrest *et al.*, 2004). La amplia investigación en el campo ha demostrado que este mecanismo está involucrado no solo en la defensa sino en la regulación de la fisiología y desarrollo del organismo y en el mantenimiento de la arquitectura cromosómica (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017). Además de los siRNAs, se ha demostrado que existen múltiples clases de pequeños RNAs endógenos (esRNA, del inglés *endogenous small RNA*), incluyendo los microRNAs (miRNAs), que actúan como reguladores de procesos celulares. La generación de estos esRNA suele compartir componentes con la maquinaria de silenciamiento génico canónica, como Dicer y Ago. Sin embargo, existen mecanismos alternativos no canónicos, en los que la actividad exonucleasa es independiente de Dicer (Trieu *et al.*, 2015).

El estudio del silenciamiento génico en hongos comenzó con el ascomiceto *Neurospora crassa* (Romano & Macino, 1992) y ha continuado con la búsqueda de los

componentes de la maquinaria en otras especies de ascomicetos, basidiomicetos y mucoromicetos (Nakayashiki *et al.*, 2006). No obstante, algunos hongos filamentosos carecen total o parcialmente de la maquinaria de silenciamiento génico, como es el caso de los basidiomicetos *U. maydis* y *Cryptococcus deuterogattii*. Los primeros indicios de que existía un mecanismo de silenciamiento génico funcional en *M. circinelloides* fueron descritos cuando transformantes con copias adicionales del gen regulador de la carotenogénesis *crgA* presentaban un fenotipo contrario al esperado de sobreexpresar el gen (Navarro *et al.*, 2001). Esta hipótesis se confirmó posteriormente usando genes involucrados en la síntesis de carotenos como marcadores visuales (Nicolás *et al.*, 2003) (Figura 12).

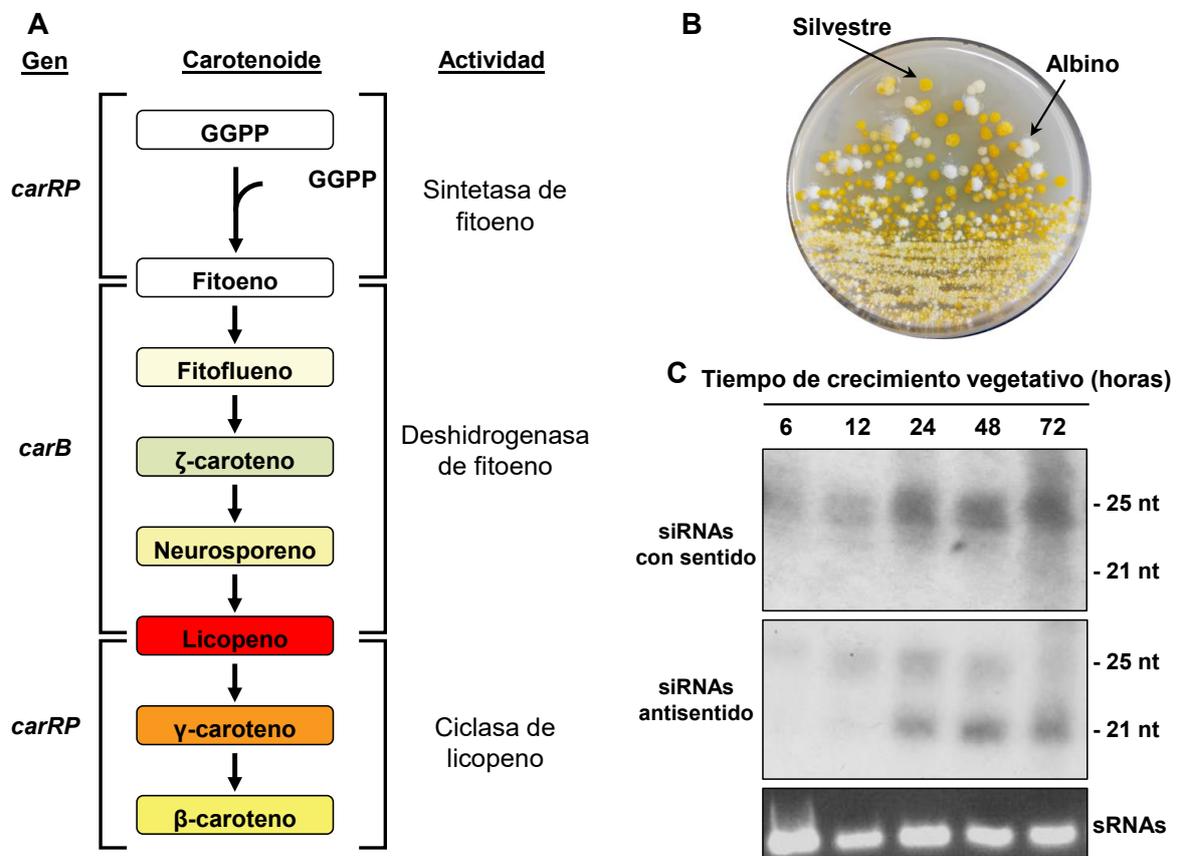


Figura 12. Los genes de la carotenogénesis de *M. circinelloides* como marcadores de silenciamiento génico. (A) Ruta de biosíntesis de carotenoides en *M. circinelloides*. La enzima CarRP con actividad sintetasa de fitoeno genera el primer caroteno a partir de dos moléculas de geranilgeranilpirofosfato (GGPP). El gen *carB* cifra una deshidrogenasa de fitoeno que cataliza las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno. La síntesis de β-caroteno se completa con la actividad ciclasa de licopeno de la enzima bifuncional CarRP. Se indica el color aproximado de cada carotenoide. **(B)** Colonias transformantes de *M. circinelloides* donde se está silenciando específicamente el gen *carB*, tras la transformación con un plásmido que sintetiza dsRNA homólogo al mRNA de *carB*. Las colonias albinas son el resultado de la acumulación de fitoeno (no coloreado) debido a la falta de función de CarB. **(C)** Acumulación

diferencial de siRNAs en colonias donde se está silenciando el gen *carB*. Cada calle pertenece a una muestra de cultivo crecida en el tiempo indicado en horas. Se muestra la membrana de hibridación de *northern* donde se aprecia la acumulación de siRNAs de 21 y 25 nt con sentido y antisentido a la transcripción del gen. Esta acumulación aumenta con el paso del tiempo y el crecimiento del hongo. Figura modificada de Nicolás *et al.*, 2003.

En *M. circinelloides*, la síntesis de carotenos está regulada por luz (Navarro *et al.*, 1995). Las estirpes silvestres tienen un micelio albino en la oscuridad que cambia a amarillento tras la iluminación con luz azul debido a la acumulación de β -caroteno. Esta respuesta está controlada a nivel transcripcional como refleja el hecho de que los niveles de los transcritos correspondientes a los genes estructurales involucrados en la biosíntesis de carotenoides sean extremadamente bajos en oscuridad, mientras que aumentan de forma extraordinaria en respuesta a la luz (Velayos *et al.*, 2000). La inactivación del gen *carB*, que cifra una deshidrogenasa fitoeno implicada en la carotenogénesis, provoca un micelio albino debido a la acumulación del precursor de fitoeno no coloreado (Figura 12). El RNAi inducido por transgenes en *M. circinelloides* se demostró introduciendo copias del gen *carB* en plásmidos autorreplicativos que provocaban el silenciamiento del gen *carB* endógeno, y que resultaban en un micelio albino en condiciones de iluminación (Nicolás *et al.*, 2003). Este trabajo fue pionero en el estudio de silenciamiento génico empleando *M. circinelloides* como organismo modelo. El interés por la diversidad del silenciamiento génico en hongos y el uso de *M. circinelloides* como organismo modelo han dado lugar a una amplia investigación sobre sus mecanismos de silenciamiento génico, siendo un referente en este campo de estudio.

M. circinelloides combina diferentes componentes de su maquinaria de RNAi para llevar a cabo funciones que van más allá de la defensa contra ácidos nucleicos invasivos. Se han caracterizado tres rutas de silenciamiento génico que han sido relacionadas con la regulación de funciones biológicas, como son el crecimiento vegetativo, la reproducción sexual, la resistencia antifúngicos y la virulencia (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016). En *M. circinelloides* los componentes canónicos de RNAi están altamente *conservados*. Se han identificado dos homólogos de la ribonucleasa III Dicer, Dcl1 y Dcl2 (*Dicer-like* 1 y 2) (Nicolás *et al.*, 2007; De Haro *et al.*, 2009), siendo Dcl2 la ribonucleasa principal para el procesamiento de los dsRNA en siRNAs de 21 y 25 nt. Tres genes cifran proteínas homólogas a Ago, *ago1*, *ago2* y *ago3*, de los que *ago1* cifra la proteína más importante del mecanismo de degradación de los mRNAs diana (Cervantes *et al.*, 2013). Además, se han identificado tres RdRPs con funciones diferenciadas en las distintas rutas de silenciamiento. RdRP1 es esencial para la inducción del silenciamiento génico cuando el precursor es una molécula de RNA de

una cadena, sintetizando dsRNA a partir de ella (Nicolas *et al.*, 2010). RdRP2 participa en el proceso de amplificación de silenciamiento donde se acumulan siRNAs secundarios (Calo *et al.*, 2012). Por otro lado, RdRP3 está involucrada en la ruta no canónica de silenciamiento génico o NCRIP (*non-canonical RNAi pathway*) (Calo *et al.*, 2017). Otros componentes de esta maquinaria de silenciamiento son Qip1, una exonucleasa homóloga a la proteína inducida por *quelling* de *N. crassa* (Xiao *et al.*, 2010); y RnhA, proteína similar a la helicasa SAD-3 (Calo *et al.*, 2017; Hammond *et al.*, 2011). Mutantes en ambas proteínas han sido relacionados con defectos en el silenciamiento génico, pero se desconoce su función concreta dentro del mecanismo. Además, se ha identificado a la proteína R3B2 como una nueva ribonucleasa que participa en el mecanismo no canónico de silenciamiento génico (Trieu *et al.*, 2015).

De forma general, se han clasificado los mecanismos de silenciamiento génico en función del papel de Dicer en la ruta como ribonucleasa principal (Figura 13).

I.3.3.1. Mecanismo de silenciamiento génico canónico dependiente de Dicer

Los mecanismos de silenciamiento canónico dependiente de Dicer se han clasificado en dos atendiendo a su función biológica: La ruta canónica de siRNA y la ruta de ex-siRNA (esRNAs derivados de exones) o epimutacional (Figura 13).

El mecanismo de silenciamiento de siRNA se desencadena por la presencia de ácidos nucleicos invasivos, como plásmidos, transposones y virus, por lo que es un mecanismo de defensa y control de la integridad genómica (Ruiz-Vázquez *et al.*, 2015). En este mecanismo RdRP1 genera moléculas de dsRNA a partir de ssRNA, que serán procesadas por Dcl2 en pequeños siRNAs de 21 a 25 nt (Nicolás *et al.*, 2003). Estos siRNAs son incorporados al RISC donde Ago1 dirige la degradación de los transcritos complementarios en colaboración con Qip1. En esta ruta la etapa de amplificación es controlada por RdRP2, que produce nuevas moléculas de dsRNA a partir de los transcritos degradados, que generarán siRNAs secundarios. La ribonucleasa R3B2 podría participar en la biogénesis de los siRNAs, aunque su función es desconocida. Mutantes en distintos componentes de la ruta presentan defectos en el crecimiento vegetativo, morfología de la hifa, esporulación y autólisis por estrés nutricional (Nicolás *et al.*, 2015).

La maquinaria de silenciamiento génico también participa en la regulación de la transcripción endógena. El mapeo genómico de los sRNAs producidos reveló que la mayoría eran esRNAs procedentes de exones (Nicolas *et al.*, 2010). Esta ruta también está involucrada en la adaptabilidad de *M. circinelloides* para silenciar determinados

genes en respuesta a un estrés transitorio, por lo que se ha definido como ruta epimutacional (Calo *et al.*, 2014). Las estirpes capaces de silenciar genes endógenos como respuesta a un estímulo transitorio fueron denominadas epimutantes, ya que presentan una flexibilidad fenotípica temporal independiente de cambios a nivel de secuencia de DNA. En este proceso participan los componentes de la vía canónica, pero con ciertas especificidades: RdRP2 es la polimerasa principal, Dcl1 es la proteína Dicer más relevante (Calo *et al.*, 2014) y la helicasa RnhA participa (Calo *et al.*, 2017).

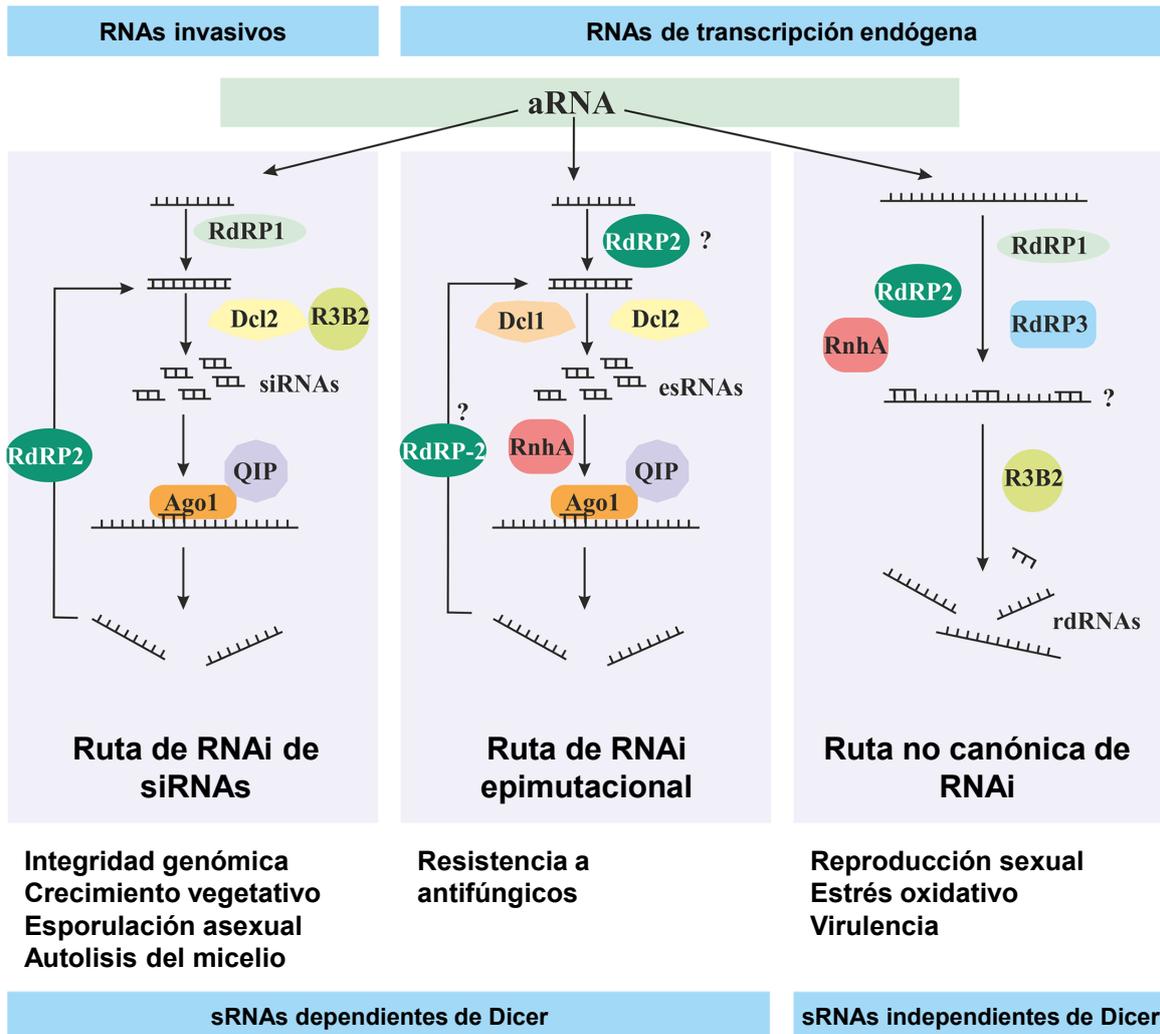


Figura 13. Rutas de silenciamiento génico caracterizadas en *M. circinelloides*. Según el origen del estímulo, el RNA aberrante (aRNA) es procesado por cada una de las tres rutas identificadas. Se muestran las dos rutas dependientes de Dicer: implicadas en la defensa de ácidos nucleicos invasivos (ruta de RNAi de siRNAs); y en la generación de epimutantes (que produce esRNAs). También se indican los componentes de la ruta no canónica de RNAi (independiente de Dicer) en la que se producen los rdRNAs. Se muestran cada una de las proteínas que podrían tener un papel en las rutas señaladas y las funciones caracterizadas de cada ruta. El signo de interrogación indica las etapas de cada ruta cuyos componentes están por confirmar. Figura adaptada de Calo *et al.*, 2017.

I.3.3.2. Mecanismo de silenciamiento génico no canónico o independiente de Dicer (NCRIP)

El análisis de secuenciaciones de esRNAs en estirpes mutantes en los componentes del sistema de RNAi canónico reveló que existían esRNAs que se producían de forma independiente a Dcl1, Dcl2 y Ago1, pero precisaban de la actividad de RdRP1, RdRP2 y RdRP3 (Trieu *et al.*, 2015; Calo *et al.*, 2017). En ese análisis, la acumulación de esRNAs específicos de un *locus* se correspondían con el descenso de los niveles de mRNA del que derivan, confirmando que se trataba de un mecanismo de silenciamiento génico. Estos esRNAs no presentan un tamaño definido, su orientación es predominantemente con sentido a la del transcrito diana y tienen preferentemente un uracilo en el penúltimo nucleótido de su extremo 5'. Esta nueva clase de esRNAs, también llamados rdRNAs (RNAs degradados dependientes de RdRP, en inglés *RdRP-dependent degraded RNAs*) eran generados por un mecanismo de degradación de transcritos mediado por una maquinaria de silenciamiento no descrita en otros organismos (Figura 13). Aunque la función específica de los componentes de la ruta se desconoce, estudios con estirpes mutantes donde la ruta está afectada han dado lugar a los primeros bocetos de este novedoso mecanismo. La ribonucleasa R3B2 podría participar en la degradación de los RNAs mensajeros, en sustitución a Dicer y/o Ago. Todavía se desconoce la función biológica de esta ruta en *M. circinelloides*, aunque mutantes en el mecanismo presentan defectos en la interacción sexual, la resistencia a estrés y la virulencia (Trieu *et al.*, 2015; Pérez-Arques *et al.*, 2020).

Existe una relación funcional entre los mecanismos de silenciamiento génico de *M. circinelloides*, ya que algunas proteínas participan de manera no exclusiva en más de una ruta (Figura 13). Además, la ruta epimutacional interacciona con la NCRIP, ya que mutantes en proteínas clave de la ruta no canónica presentan tasas de epimutación más altas en comparación con estirpes silvestres (Calo *et al.*, 2017). Este efecto represor de la NCRIP sobre la ruta epimutacional también se ha observado en el silenciamiento de los retrotransposones pericentroméricos (Grem-LINE1s), que está controlado por la vía canónica de silenciamiento (Pérez-Arques *et al.*, 2020). La ausencia de las proteínas implicadas en la NCRIP provoca una sobreacumulación de sRNAs canónicos contra los retrotransposones, lo que pone de manifiesto esta relación entre rutas. Las interacciones entre las distintas rutas de silenciamiento es un campo por estudiar que podría explicar la diversidad fenotípica de una misma estirpe, especialmente en la sensibilidad variable a antifúngicos, y la determinación de un estilo de vida como patógeno oportunista.

I.3.3.3. Los mecanismos de silenciamiento génico en la patogénesis de *M. circinelloides*

Uno de los factores clave en la mucormicosis es la resistencia a antifúngicos de las estirpes patógenas. Los Mucorales presentan resistencias intrínsecas a algunas clases de antifúngicos debido a cambios en la secuencia de los genes diana del fármaco (Caramalho *et al.*, 2017). Además de estas resistencias intrínsecas, los Mucorales pueden ser resistentes a antifúngicos por modificaciones epigenéticas que confieren una plasticidad fenotípica transitoria para responder a distintos estreses ambientales, incluyendo el estrés ocasionado por el fármaco.

Las modificaciones epigenéticas son aquellos cambios que no alteran la secuencia de DNA o la proteína codificante, pero sí modifican la expresión de los genes diana de forma reversible. Estas modificaciones epigenéticas se pueden categorizar en dos mecanismos fundamentales: los basados en RNA y las modificaciones de la cromatina. En hongos existen dos mecanismos basados en RNA que confieren resistencias epigenéticas a antifúngicos, la epimutación y el silenciamiento de cromatina vía RNAs largos no codificantes o lncRNA (del inglés, *long non-coding RNA*) (Chang *et al.*, 2019b).

La epimutación es una forma de resistencia novedosa basada en RNAi descrita por primera vez en *M. circinelloides* (Calo *et al.*, 2014). Algunas estirpes del hongo resistentes al antifúngico FK506 no presentaban mutaciones mendelianas en la secuencia del gen *fkbA* que cifra la proteína diana FKBP12, y revertían el fenotipo cuando crecían en ausencia del antifúngico. Estas estirpes producían esRNAs complementarios al gen *fkbA*, provocando la degradación de su mRNA. La secuenciación de esRNAs de las estirpes epimutantes reveló la presencia de esRNAs con sentido y antisentido complementarios al *locus fkbA*. La epimutación de estas estirpes era transitoria y reversible ya que, tras varios ciclos de crecimiento vegetativo en ausencia del estrés, el epimutante volvía a ser sensible al antifúngico. Posteriormente, se ha observado el mismo fenómeno al enfrentar al hongo a otros agentes antifúngicos, como el ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) por el silenciamiento transitorio de los genes *pyrG* o *pyrF* (Chang *et al.*, 2019a). Ambos genes cifran enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas y convierten el 5-FOA en un nucleótido análogo de pirimidinas tóxico (Boeke *et al.*, 1984). La resistencia por epimutación es estable *in vivo*, como se demostró en un modelo de ratón infectado con epimutantes resistentes a los antifúngicos FK506 y rapamicina. En este modelo, la tasa de epimutación y la tasa de reversión era más rápida en cerebro que en hígado, bazo, riñón o pulmón; mostrando

que el proceso de epimutación mediado por RNAi puede ser órgano-específico y estar relacionado con la infección por mucormicosis (Chang & Heitman, 2019).

El control de la expresión génica por RNAi también se ha relacionado con la patogénesis en *M. circinelloides*. El mecanismo de RNAi podría controlar la respuesta a la fagocitosis en un proceso regulado por la NCRIP. Los mutantes en genes clave para esta ruta, *rdrp1* y *r3b2*, no son capaces de controlar la respuesta a la fagocitosis como la estirpe silvestre, lo que resulta en un fenotipo menos virulento en un modelo de ratón. El estudio del transcriptoma de estos mutantes reveló una preexposición adaptativa al estrés del fagosoma, que estaba activa incluso en ausencia de macrófagos. Por tanto, la NCRIP controla la activación de la respuesta a la fagocitosis, silenciando los genes implicados en la misma durante el crecimiento vegetativo y liberando este control cuando las esporas son fagocitadas. El ambiente hostil del fagosoma debe inhibir la NCRIP para que la espora sea capaz de responder a la fagocitosis y desarrollar la infección (Pérez-Arques *et al.*, 2020).

La caracterización de los mecanismos de silenciamiento génico en Mucorales y de las respuestas biológicas controladas por los mismos será clave en el estudio de la mucormicosis. La relación de las diferentes rutas de silenciamiento durante la patogénesis podría explicar la plasticidad fenotípica de *M. circinelloides* ante varios estreses, la determinación de las vías infectivas, la invasión órgano-específica y las resistencias a antifúngicos.

I.3.3.4. Aplicaciones del silenciamiento génico en la búsqueda y control de nuevos factores de virulencia

El estudio de los mecanismos de silenciamiento génico de *M. circinelloides* abre un nuevo abanico de aplicaciones para la identificación y control de nuevos factores de virulencia. En algunos microorganismos patógenos, la manipulación del sistema de silenciamiento génico ha permitido el control de la infección, donde es imprescindible diseñar vectores que produzcan dsRNAs para activar y desencadenar el mecanismo (Figura 14). Esta aplicación es especialmente útil en hongos patógenos de plantas, ya que es muy frecuente el intercambio de moléculas de RNA entre patógeno y hospedador, un fenómeno denominado intercambio interreino (Wang *et al.*, 2015). Existen dos herramientas que usan RNAi para el control de fitopatógenos: una se basa en la inducción de silenciamiento génico en el hospedador (HIGS, del inglés *host-induced gene silencing*) donde se expresa un transgén que produce sRNAs contra factores de virulencia del patógeno; y la inducción de silenciamiento génico directamente con aerosoles (SIGS, *spray-induced gene silencing*) que contienen moléculas de dsRNA

que al ser aplicadas sobre la planta provocan el silenciamiento de genes de virulencia en los patógenos diana (Sang & Kim, 2020). Este intercambio de sRNAs también se ha identificado entre animales y parásitos, y entre animales y bacterias; por lo que podría ser clave en el control y estudio de las infecciones fúngicas humanas (Zeng *et al.*, 2019).

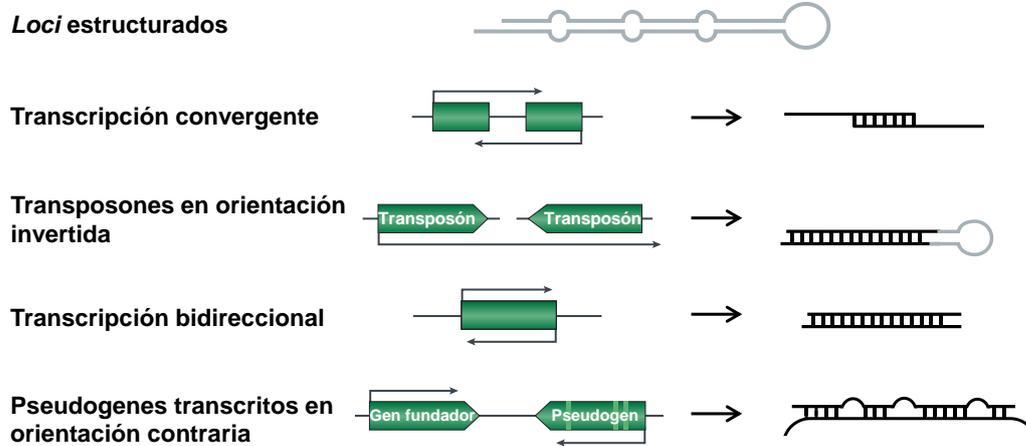


Figura 14. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras. Se muestran las secuencias dispuestas en el genoma (rectángulos verdes) y el sentido de la transcripción con flechas. La molécula de RNA donde se distinguen regiones de dsRNA se indican al lado de cada mecanismo. Figura modificada de Ghildiyal & Zamore, 2009.

Los sistemas de silenciamiento génico en microorganismos patógenos también se utilizan para la identificación a gran escala de factores de virulencia en estudios de genómica funcional. Estas estrategias se basan en el desarrollo de genotecas que desencadenan el mecanismo de silenciamiento génico en el organismo modelo. El primero fue desarrollado en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* donde se logró silenciar hasta el 80% del genoma alimentando a los nemátodos con bacterias que expresaban dsRNA y que activaban la ruta de RNAi (Kamath *et al.*, 2003). Otro estudio en *Drosophila melanogaster* (DasGupta *et al.*, 2005) identificó 238 reguladores de la ruta del desarrollo controlada por las proteínas Wnt/Wingless, transcribiendo *in vitro* dsRNAs y observando la activación/represión de la ruta con un marcador bioluminiscente. En cultivos celulares humanos también se han empleado librerías basadas en el RNAi para la identificación de genes, donde el silenciamiento génico se activaba empleando vectores que expresaban horquillas pequeñas de RNA (shRNAs, del inglés *short hairpin RNAs*) o mediante síntesis *in vitro* de los siRNAs (Silva *et al.*, 2004). En un estudio donde se analizaron los componentes de la ruta de la p53 se empleó una librería de vectores que producían shRNAs específicos (Berns *et al.*, 2004). La investigación para la identificación de nuevos factores de virulencia en la mucormicosis podría incluir el uso de genotecas basadas en el RNAi, aprovechando la amplia caracterización de los sistemas de silenciamiento génico de *M. circinelloides*.

II. JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS Y OBJETIVOS

II. Justificación y objetivos

La relevancia clínica de la mucormicosis como enfermedad emergente radica principalmente en la nula disponibilidad de tratamientos efectivos, lo que ocasiona altas tasas de morbilidad y mortalidad en los pacientes que sufren esta infección fúngica. El bajo éxito de las terapias usadas en clínica se agrava debido a la resistencia intrínseca que presentan estos hongos a antifúngicos de uso común, lo que provoca un mal pronóstico para pacientes de grupos de riesgo, como los inmunodeprimidos. La patogénesis de los hongos mucorales, causantes de la mucormicosis, está poco estudiada en comparación con otras especies patógenas pertenecientes a los ascomicetos o basidiomicetos. El principal obstáculo para estudiar las etapas de la infección, desde una visión molecular, es el difícil manejo en el laboratorio de estos hongos. Estudios con distintas especies de Mucorales han empleado sistemas de transformación que permiten la generación de mutantes y el estudio de procesos infecciosos de forma preliminar; sin embargo, las estirpes mutantes generadas son poco estables, llegando a perder la construcción integrada en el genoma tras varios pases de crecimiento vegetativo (Ibrahim *et al.*, 2010). A esta inestabilidad se une la escasez de marcadores de auxotrofia y de resistencia que permitan la producción de mutantes dobles o triples. Por lo tanto, el estudio de factores de virulencia en Mucorales ha estado limitado por la escasez de estirpes genéticamente manipulables. La única especie donde se ha desarrollado un sistema de transformación genética eficaz y estable es *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2011; Anaya & Roncero, 1991). Durante años se han mejorado las técnicas de transformación basadas en la electroporación y se han generado estirpes con dobles auxotrofías que han permitido la modificación de dos *loci* simultáneamente. Además, la conveniente secuenciación y ensamblado de su genoma permiten la identificación a nivel genómico de factores de virulencia relacionados con la infección. Estos avances han permitido el estudio de numerosos procesos esenciales para la biología de los hongos mucorales. Tradicionalmente, los estudios con *M. circinelloides* se han centrado en las respuestas a la luz, particularmente en la regulación de la carotenogénesis (Silva *et al.*, 2006, 2008; Navarro *et al.*, 2013); y en la caracterización de las dos rutas principales de silenciamiento génico, identificando los componentes del mecanismo canónico y no canónico (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2016; Trieu *et al.*, 2015).

En esta tesis se propone el uso de *M. circinelloides* y sus herramientas moleculares como sistema modelo para la caracterización en detalle de los procesos biológicos implicados en la mucormicosis. Uno de los factores de virulencia claves en esta infección es la competencia por la captación de hierro entre el hongo y el

hospedador (Ibrahim *et al.*, 2012). Los estudios previos sobre el metabolismo del hierro en Mucorales se han realizado con especies de *Rhizopus*, donde se ha caracterizado el papel de la permeasa de hierro Ftr1. No obstante, en estos trabajos muestran conclusiones preliminares debido a la comentada inestabilidad de las estirpes mutantes y a la necesidad de recurrir al silenciamiento parcial de genes (Ibrahim *et al.*, 2010). El uso de *M. circinelloides* como estirpe modelo puede permitir la caracterización en detalle de los componentes del sistema de captación de hierro y su regulación durante la interacción con el hospedador.

Otro aspecto clave en el estudio de la mucormicosis es la identificación de factores de virulencia novedosos y propios de Mucorales que expliquen la dualidad en el estilo de vida de estos hongos, especialmente aquellos que determinan su potencial patogénico. Una estrategia basada en estudios de genómica funcional puede permitir la identificación a gran escala de genes importantes durante la mucormicosis. Los estudios clásicos de genética funcional se fundamentan en técnicas como la mutagénesis insercional, utilizando transposones, o la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo, estas herramientas no se han desarrollado con éxito para hongos Mucorales. Una alternativa de genética inversa, empleada en *C. elegans* (Kamath *et al.*, 2003), *D. melanogaster* (DasGupta *et al.*, 2005) y células de mamíferos (Berns *et al.*, 2004) se basa en el uso de genotecas de silenciamiento. Por consiguiente, se planteó el diseño de una plataforma de genómica funcional en *M. circinelloides* que utilizará genotecas de silenciamiento que representen todo el genoma para identificar genes implicados en patogénesis y que, además, servirá como una herramienta para el estudio de cualquier otro proceso biológico en Mucorales.

La caracterización en detalle de los genes relacionados con la virulencia y el estudio de sensibilidad y resistencia a antifúngicos necesita de sistemas de detección y monitorización que permitan escrutar los fenotipos de las estirpes *in vivo*. En otros hongos patógenos se han desarrollado herramientas basadas en estirpes bioluminiscentes (Brock *et al.*, 2008; Enjalbert *et al.*, 2009), que permiten la monitorización de la infección del hongo *in vivo* a través de la detección de luz mediante técnicas de imagen. El desarrollo de esta herramienta en Mucorales permitiría analizar cómo ocurre la progresión de la infección en distintos tejidos, ya que la mucormicosis presenta diversas manifestaciones clínicas (Jeong *et al.*, 2019). Algunos estudios han demostrado que las esporas del hongo se comportan de forma diferente en cada tejido del hospedador, como por ejemplo, en la producción de epimutaciones por RNAi (Chang & Heitman, 2019). Caracterizar esta capacidad infectiva órgano-específica en Mucorales podría ser determinante para la identificación de factores de virulencia y diseño de

nuevas dianas terapéuticas, así como para mejorar las técnicas de diagnóstico que eviten una terapia tardía. Basándonos en estudios previos realizados con otros hongos, se propuso el desarrollo de un sistema de monitorización *in vivo* de la infección de Mucorales mediante la generación de estirpes bioluminiscentes. La expresión heteróloga de genes en *M. circinelloides* de una forma estable y duradera es un campo preliminar, con avances recientes que incluyen la expresión de proteínas de fusión fluorescentes para el estudio del cinetocoro (Navarro-Mendoza *et al.*, 2019).

De acuerdo con los antecedentes descritos, el objetivo general de la tesis doctoral es la identificación de factores de virulencia, rutas y procesos implicados en la capacidad de los hongos mucorales para producir mucormicosis, así como el desarrollo de herramientas que faciliten su análisis, utilizando como modelo de estudio *M. circinelloides* f. *lusitanicus*. Este objetivo general se desglosa en tres objetivos específicos:

1. Creación de una plataforma de genómica funcional basada en el mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides* para la identificación de nuevos factores de virulencia en la mucormicosis.

Los resultados obtenidos en este objetivo han sido publicados en el artículo:
T.A. Trieu, M. I. Navarro-Mendoza, *et al.* RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. 2017. PLoS Pathogens. 13(1):e1006150. doi:10.1371/journal.ppat.1006150

2. Caracterización de los sistemas de captación de hierro y su regulación en *M. circinelloides* en modelos de la infección *in vivo*.

Las evidencias de esta investigación se han publicado en el siguiente artículo:
M. I. Navarro-Mendoza, *et al.* Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. 2018. Scientific Reports. 8(1):7660. doi:10.1038/s41598-018-26051-x

3. Diseño de una herramienta de monitorización *in vivo* de la infección de Mucorales mediante la generación de estirpes bioluminiscentes de *M. circinelloides*.

Los resultados recogidos tras la culminación del objetivo han sido publicados en:
U. Binder, M. I. Navarro-Mendoza, *et al.* Generation of a *Mucor circinelloides* reporter strain - a promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis. 2018. Genes. 9(12), 613. doi:10.3390/genes9120613.

III. REFERENCIAS

III. Referencias

- Anaya N & Roncero MI (1991) Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 449-55
- Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, Baldin C, Drakos E, Soliman SSM, Shetty AC, McCracken C, Akoumianaki T, Stylianou K, Ioannou P, Pontikoglou C, Papadaki HA, Tzardi M, Belle V, Ettiene E, Beauvais A, Samonis G, Kontoyiannis DP, Andreakos E, et al. (2018) Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat. Commun.* **9**: 3333
- Artis WM, Fountain JA, Delcher HK & Jones HE (1982) A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: Transferrin and iron availability. *Diabetes* **31**: 1109-1114
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM & Kaplan J (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403-10
- Baldin C & Ibrahim AS (2017) Molecular mechanisms of mucormycosis — The bitter and the sweet. *PLoS Pathog.*: 1-9
- Bastidas RJ, Shertz CA, Lee SC, Heitman J & Cardenas ME (2012) Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryot. Cell* **11**: 270-81
- Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Iturriaga EA, Campuzano V & Eslava AP (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene* **116**: 59-67
- Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W, Cavet G, Linsley PS, Beijersbergen RL & Bernards R (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**: 431-7
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366
- Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, Dannaoui E, Che D, Dromer F, Desenclos J-C & Lortholary O (2009) Increasing incidence of Zygomycosis (Mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 1395-1401

III. Referencias

- Blaiseau PL, Lesuisse E & Camadro JM (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 34221-6
- Blatzer M, Binder U & Haas H (2011) The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genet. Biol.* **48**: 1027-33
- Boeke JD, LaCroute F & Fink GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-6
- Boelaert JR, De Locht M, Van Cutsem J, Kerrels V, Cantinieaux B, Verdonck A, Van Landuyt HW & Schneider YJ (1993) Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection: In vitro and in vivo animal studies. *J. Clin. Invest.* **91**: 1979-1986
- Brock M, Jouvion G, Droin-Bergère S, Dussurget O, Nicola M-A & Ibrahim-Granet O (2008) Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7023-35
- Bruni GO, Zhong K, Lee SC & Wang P (2019) CRISPR-Cas9 induces point mutation in the mucormycosis fungus *Rhizopus delemar*. *Fungal Genet. Biol.* **124**: 1-7
- Cadieux B, Lian T, Hu G, Wang J, Biondo C, Teti G, Liu V, Murphy MEP, Creagh AL & Kronstad JW (2013) The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Infect. Dis.* **207**: 1339-47
- Calo S, Nicolás FE, Lee SC, Vila A, Cervantes M, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM, Cardenas ME & Heitman J (2017) A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet.* **13**: e1006686
- Calo S, Nicolás FE, Vila A, Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2012) Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **83**: 379-394
- Calo S, Shertz-Wall C, Lee SC, Bastidas RJ, Nicolás FE, Granek JA, Mieczkowski P, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME & Heitman J (2014) Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature* **513**: 555-558
- Caramalho R, Tyndall JDA, Monk BC, Larentis T, Lass-Flörl C & Lackner M (2017)

- Intrinsic short-tailed azole resistance in mucormycetes is due to an evolutionary conserved aminoacid substitution of the lanosterol 14 α -demethylase. *Sci. Rep.* **7**: 3-12
- Carrano CJ, Böhnke R & Matzanke BF (1996) Fungal ferritins: the ferritin from mycelia of *Absidia spinosa* is a bacterioferritin. *FEBS Lett.* **390**: 261-4
- Carroll CS, Grieve CL, Murugathasan I, Bennet AJ, Czekster CM, Liu H, Naismith J & Moore MM (2017) The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the NIS gene family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **89**: 136-146
- Casas C, Aldea M, Espinet C, Gallego C, Gil R & Herrero E (1997) The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 621-37
- Cervantes M, Vila A, Nicolás FE, Moxon S, de Haro JP, Dalmay T, Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2013) A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS One* **8**: e69283
- Chang Z, Billmyre RB, Lee SC & Heitman J (2019a) Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet.* **15**: e1007957
- Chang Z & Heitman J (2019) Drug-resistant epimutants exhibit organ-specific stability and induction during murine infections caused by the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *mBio* **10**: 1-11
- Chang Z, Yadav V, Lee SC & Heitman J (2019b) Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **132**: 103253
- Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N & Hediger MA (1999) Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* **274**: 35089-94
- Chibucos MC, Soliman S, Gebremariam T, Lee H, Daugherty S, Orvis J, Shetty AC, Crabtree J, Hazen TH, Etienne KA, Kumari P, O'Connor TD, Rasko DA, Filler SG, Fraser CM, Lockhart SR, Skory CD, Ibrahim AS & Bruno VM (2016) An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nat. Commun.* **7**: 1-11
- Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, Hoenigl M, Jensen HE, Lagrou K, Lewis RE, Mellinshoff SC, Mer M, Pana ZD,

III. Referencias

- Seidel D, Sheppard DC, Wahba R, Akova M, Alanio A, Al-Hatmi AMS, Arikani-Akdagli S, et al. (2019) Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect. Dis.*
- Corrochano LM, Kuo A, Marcet-Houben M, Polaino S, Salamov A, Villalobos-Escobedo JM, Grimwood J, Álvarez MI, Avalos J, Bauer D, Benito EP, Benoit I, Burger G, Camino LP, Cánovas D, Cerdá-Olmedo E, Cheng JF, Domínguez A, Eliáš M, Eslava AP, et al. (2016) Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Curr. Biol.* **26**: 1577-1584
- Dannaoui E (2017) Antifungal resistance in mucorales. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**: 617-621
- DasGupta R, Kaykas A, Moon RT & Perrimon N (2005) Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway. *Science* **308**: 826-33
- Díaz González TE, Fernández-Carvajal Álvarez MC & Fernández Prieto JA (2004) Curso de botánica Gijón: Ediciones Trea S.L.
- Duffy J, Harris J, Gade L, Schulster L, Newhouse E, O'Connell H, Noble-Wang J, Rao C, Balajee SA & Chiller T (2014) Mucormycosis outbreak associated with hospital linens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **33**: 472-6
- Eck R, Hundt S, Härtl A, Roemer E & Künkel W (1999) A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: cloning, characterization and disruption. *Microbiology* **145**: 2415-22
- Eichhorn H, Lessing F, Winterberg B, Schirawski J, Kämper J, Müller P & Kahmann R (2006) A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**: 3332-45
- Enjalbert B, Rachini A, Vedyappan G, Pietrella D, Spaccapelo R, Vecchiarelli A, Brown AJP & D'Enfert C (2009) A Multifunctional, Synthetic *Gaussia princeps* Luciferase Reporter for Live Imaging of *Candida albicans* Infections. *Infect. Immun.* **77**: 4847-4858
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Forrest EC, Cogoni C & Macino G (2004) The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora*

- crassa*. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2123-8
- Foster L-AA (2002) Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. *Can. J. Microbiol.* **48**: 437-42
- Fu Y, Lee H, Collins M, Tsai H-F, Spellberg B, Edwards JE, Kwon-Chung KJ & Ibrahim AS (2004) Cloning and functional characterization of the *Rhizopus oryzae* high affinity iron permease (rFTR1) gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**: 169-76
- Gauger W (1965) The germination of zygospores of *Mucor hiemalis*. *Mycologia* **57**: 634
- Gebremariam T, Alkhazraji S, Soliman SSM, Gu Y, Jeon HH, Zhang L, French SW, Stevens DA, Edwards JE, Filler SG, Uppuluri P & Ibrahim AS (2019) Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Sci. Adv.* **5**: eaaw1327
- Gebremariam T, Liu M, Luo G, Bruno V, Phan QT, Waring AJ, Edwards JE, Filler SG, Yeaman MR & Ibrahim AS (2014) CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *J. Clin. Invest.* **124**: 237-250
- Ghildiyal M & Zamore PD (2009) Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 94-108
- Greenshields DL, Liu G, Feng J, Selvaraj G & Wei Y (2007) The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 411-21
- Groll AH, Gea-Banacloche JC, Glasmacher A, Just-Nuebling G, Maschmeyer G & Walsh TJ (2003) Clinical pharmacology of antifungal compounds. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**: 159-91, ix
- Gutiérrez A, López-García S & Garre V (2011) High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Methods* **84**: 442-446
- Haas H (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 316-30
- Haas H (2012) Iron - A key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **3**: 28
- Hammond SM (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146-1150
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D & Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-

- Hammond TM, Xiao H, Boone EC, Perdue TD, Pukkila PJ & Shiu PKT (2011) SAD-3, a putative helicase required for meiotic silencing by unpaired DNA, interacts with other components of the silencing machinery. *G3: Genes/Genomes/Genetics* **1**: 369-376
- De Haro JP, Calo S, Cervantes M, Nicolás FE, Torres-Martinez S & Ruiz-Vázquez RM (2009) A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1486-1497
- Hassan MIA & Voigt K (2019) Pathogenicity patterns of mucormycosis: Epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Med. Mycol.* **57**: S245-S256
- Hassett R, Dix DR, Eide DJ & Kosman DJ (2000) The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **351 Pt 2**: 477-84
- Hassett RF, Yuan DS & Kosman DJ (1998) Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J. Biol. Chem.* **273**: 23274-82
- van Heeswijck R & Roncero MIG (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**: 691-702
- Heymann P, Ernst JF & Winkelmann G (2000) Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 221-7
- Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G & Ernst JF (2002) The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect. Immun.* **70**: 5246-55
- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM & Voigt K (2013) The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **30**: 57-76
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J & Figueras MJ (2001) Atlas of Clinical Fungi
- Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M, Brakhage AA & Haas H (2007)

- Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex-a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* **26**: 3157-68
- Howard DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 394-404
- Ibragimova S, Szebenyi C, Sinka R, Alzyoud EI, Homa M, Vágvölgyi C, Nagy G & Papp T (2020) CRISPR-Cas9-based mutagenesis of the mucormycosis-causing fungus *Lichtheimia corymbifera*. *Int. J. Mol. Sci.* **21**:
- Ibrahim AS, Edwards JE, Fu Y & Spellberg B (2006) Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 1070-3
- Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, Schwartz J, Skory CD, Edwards JE & Spellberg BJ (2007) The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* **117**: 2649-57
- Ibrahim AS, Gebremariam T, Lin L, Luo G, Hussein MI, Skory CD, Fu Y, French SW, Edwards JE & Spellberg B (2010) The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **77**: 587-604
- Ibrahim AS, Spellberg B & Edwards J (2008) Iron acquisition: A novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**: 620-625
- Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ & Kontoyiannis DP (2012) Pathogenesis of mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* **54**: 1-7
- Idnurm A, Walton FJ, Floyd A & Heitman J (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* **451**: 193-6
- Inglesfield S, Jasiulewicz A, Hopwood M, Tyrrell J, Youlden G, Mazon-Moya M, Millington OR, Mostowy S, Jabbari S & Voelz K (2018) Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen *Mucor circinelloides* in innate granulomas in vivo. *mBio* **9**: e02010-17
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR & Hube B (2012) *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **10**: 85-93
- Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Kong DCM & Chen SC-A (2019) The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**: 26-34
- Jung WH, Hu G, Kuo W & Kronstad JW (2009) Role of ferroxidases in iron uptake and

III. Referencias

- virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1511-20
- Jung WH & Kronstad JW (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell. Microbiol.* **10**: 277-84
- Jung WH, Sham A, White R & Kronstad JW (2006) Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* **4**: e410
- Juvvadi PR, Iii DF, Bobay BG, Hoy MJ, Gobeil SMC, Venters RA, Chang Z, Lin JJ, Averette AF, Cole DC, Barrington BC, Wheaton JD, Ciofani M, Trzoss M, Li X, Lee SC, Chen Y, Mutz M, Spicer LD, Schumacher MA, et al. (2019) Harnessing calcineurin-FK506-FKBP12 crystal structures from invasive fungal pathogens to develop antifungal agents. *Nat. Commun.*: 1-18
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P & Ahringer J (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**: 231-7
- Katragkou A, Walsh TJ & Roilides E (2014) Why is mucormycosis more difficult to cure than more common mycoses? *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: 74-81
- Klein BS & Tebbets B (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 314-9
- Knight SAB, Vilaire G, Lesuisse E & Dancis A (2005) Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect. Immun.* **73**: 5482-92
- Kosman DJ (2010) Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**: 15-28
- LaBombardi VJ, Pisano MA & Klavins J V (1982) Isolation and characterization of *Phycomyces blakesleeenans* ferritin. *J. Bacteriol.* **150**: 671-5
- Lax C, Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Cánovas-Márquez JT, Tahiri G, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Murcia-Flores L, Navarro E, Garre V & Nicolás FE (2020) Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes (Basel)*. **11**:
- Leal SM, Roy S, Vareechon C, Carrion S deJesus, Clark H, Lopez-Berges MS, Di Pietro A, DiPietro A, Schrettl M, Beckmann N, Redl B, Haas H & Pearlman E (2013) Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog.* **9**: e1003436

- Lee SC, Billmyre RB, Li A, Carson S, Sykes SM, Huh EY, Mieczkowski P, Ko DC, Cuomo CA & Heitman J (2014) Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *mBio* **5**: e01390-14
- Lee SC, Li A, Calo S & Heitman J (2013) Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog* **9**: e1003625
- Lee SC, Li A, Calo S, Inoue M, Tonthat NK, Bain JM, Louw J, Shinohara ML, Erwig LP, Schumacher MA, Ko DC & Heitman J (2015) Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **97**: 844-865
- Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martinez SR, Heitman J & Lee SC (2011) Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* **7**: e1002086
- Li L, Chen OS, Ward DM & Kaplan J (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 29515-29519
- Lian T, Simmer MI, D'Souza CA, Steen BR, Zuyderduyn SD, Jones SJM, Marra MA & Kronstad JW (2005) Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **55**: 1452-72
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I & Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-15
- Liu M, Lin L, Gebremariam T, Luo G, Skory CD, French SW, Chou TF, Edwards JE & Ibrahim AS (2015) Fob1 and Fob2 proteins are virulence determinants of *Rhizopus oryzae* via facilitating iron uptake from ferrioxamine. *PLoS Pathog.* **11**: 1-33
- Liu M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, Edwards JE, Filler SG & Ibrahim AS (2010) The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* **120**: 1914-24
- de Locht M, Boelaert JR & Schneider YJ (1994) Iron uptake from ferrioxamine and from ferrirhizoferrin by germinating spores of *Rhizopus microsporus*. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1843-50
- López-Fernández L, Sanchis M, Navarro-Rodríguez P, Nicolás FE, Silva-Franco F, Guarro J, Garre V, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C & Capilla J (2018) Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and

III. Referencias

- phenotypical studies. *Virulence* **1**: 707-720
- López-Muñoz A, Nicolás FE, García-Moreno D, Pérez-Oliva AB, Navarro-Mendoza MI, Hernández-Oñate MA, Herrera-Estrella A, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Garre V & Mulero V (2018) An adult zebrafish model reveals that mucormycosis induces apoptosis of infected macrophages. *Sci. Rep.* **8**: 1-12
- Ma L-J, Ibrahim AS, Skory C, Grabherr MG, Burger G, Butler M, Elias M, Idnurm A, Lang BF, Sone T, Abe A, Calvo SE, Corrochano LM, Engels R, Fu J, Hansberg W, Kim J-M, Kodira CD, Koehrsen MJ, Liu B, et al. (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet.* **5**: e1000549
- Makeyev E V. & Bamford DH (2002) Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol. Cell* **10**: 1417-1427
- Manns JM, Mosser DM & Buckley HR (1994) Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **62**: 5154-6
- Nagy G, Szebenyi C, Csernetics Á, Vaz AG, Tóth EJ, Vágvölgyi C & Papp T (2017) Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci. Rep.* **7**: 1-10
- Nakayashiki H, Kadotani N & Mayama S (2006) Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *J. Mol. Evol.* **63**: 127-35
- Napoli C, Lemieux C & Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*: 279-289
- Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Panchal S, Nicolás FE, Mondo SJ, Ganguly P, Pangilinan J, Grigoriev I V., Heitman J, Sanyal K & Garre V (2019) Early diverging fungus *Mucor circinelloides* lacks centromeric histone CENP-A and displays a mosaic of point and regional centromeres. *Curr. Biol.*: 1-12
- Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolás FE, Garre V, Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol. Genet. Genomics* **266**: 463-70
- Navarro E, Peñaranda A, Hansberg W, Torres-Martínez S & Garre V (2013) A White Collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet. Biol.* **52**: 42-52

- Navarro E, Sandmann G & Torres-Martínez S (1995) Mutants of the carotenoid biosynthetic pathway of *Mucor circinelloides*. *Exp. Mycol.* **19**: 186-190
- Neblett Fanfair R, Benedict K, Bos J, Bennett SD, Lo Y-C, Adebanjo T, Etienne K, Deak E, Derado G, Shieh W-J, Drew C, Zaki S, Sugerman D, Gade L, Thompson EH, Sutton DA, Engelthaler DM, Schupp JM, Brandt ME, Harris JR, et al. (2012) Necrotizing cutaneous mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *N. Engl. J. Med.* **367**: 2214-25
- Nemecek JC, Wüthrich M & Klein BS (2006) Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**: 583-8
- Nguyen TA (2018) This fungus borrowed from ancient bacteria to defy gravity. *New York Times* Available at: <https://www.nytimes.com/2018/04/27/science/fungus-gravity-bacteria.html>
- Nicolás FE, de Haro JP, Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2007) Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 504-516
- Nicolas FE, Moxon S, de Haro JP, Calo S, Grigoriev I V., Torres-Martínez S, Moulton V, Ruiz-Vázquez RM & Dalmay T (2010) Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res.* **38**: 5535-5541
- Nicolás FE, Murcia L, Navarro E, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C & Garre V (2020) Mucorales species and macrophages. *J. Fungi* **6**: 94
- Nicolás FE, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, López-García S, Navarro E, Torres-Martínez S & Garre V (2018) Molecular tools for carotenogenesis analysis in the mucoral *Mucor circinelloides*. En *Microbial Carotenoids. Methods in Molecular Biology*, Barreiro C & Barredo JL (eds) Humana Press, New York, NY
- Nicolás FE, Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2003) Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J.* **22**: 3983-3991
- Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Cascales MD, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM & Garre V (2015) The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics* **16**: 237
- Ocampo J, McCormack B, Navarro E, Moreno S, Garre V & Rossi S (2012) Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: Essential role of *pkaR4*. *Eukaryot. Cell* **11**: 989-1002

III. Referencias

- Ocampo J, Nuñez LF, Silva F, Pereyra E, Moreno S, Garre V & Rossi S (2009) A subunit of protein kinase a regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryot. Cell* **8**: 933-944
- Orlowski M (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* **55**: 234-58
- Papon N, Courdavault V, Lanoue A, Clastre M & Brock M (2014) Illuminating fungal infections with bioluminescence. *PLoS Pathog.* **10**: 1-4
- Park Y-S, Kim J-H, Cho J-H, Chang H-I, Kim S-W, Paik H-D, Kang C-W, Kim T-H, Sung H-C & Yun C-W (2007) Physical and functional interaction of FgFtr1-FgFet1 and FgFtr2-FgFet2 is required for iron uptake in *Fusarium graminearum*. *Biochem. J.* **408**: 97-104
- Pasricha S, Schafferer L, Lindner H, Joanne Boyce K, Haas H & Andrianopoulos A (2016) Differentially regulated high-affinity iron assimilation systems support growth of the various cell types in the dimorphic pathogen *Talaromyces marneffeii*. *Mol. Microbiol.* **102**: 715-737
- Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Murcia L, Lax C, Martínez-García P, Heitman J, Nicolás FE & Garre V (2019) *Mucor circinelloides* thrives inside the phagosome through an Atf-mediated germination pathway. *mBio* **10**: 1-15
- Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Murcia L, Navarro E, Garre V & Nicolás FE (2020) A non-canonical RNAi pathway controls virulence and genome stability in Mucorales. *PLoS Genet.* **16**: e1008611
- Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ & Kontoyiannis DP (2012) Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* **54** **Suppl 1**: S23-34
- Philpott CC (2006) Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 636-45
- Philpott CC & Protchenko O (2008) Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **7**: 20-7
- Portnoy ME, Liu XF & Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7893-902
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D & Philpott CC (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 49244-50

- Protchenko O & Philpott CC (2003) Regulation of intracellular heme levels by HMX1, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 36582-7
- Raguzzi F, Lesuisse E & Crichton RR (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **231**: 253-258
- Ramanan N & Wang Y (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* **288**: 1062-4
- Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* **86**: 807-15
- Rodríguez-Frómata RA, Gutiérrez A, Torres-Martínez S & Garre V (2013) Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 3063-72
- Romano N & Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**: 3343-3353
- Roncero MIG, Jepsen LP, Strøman P & van Heeswijck R (1989) Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* **84**: 335-343
- Ruiz-Vázquez RM, Nicolás FE, Torres-Martínez S & Garre V (2015) Distinct RNAi Pathways in the Regulation of Physiology and Development in the Fungus *Mucor circinelloides*. En *Advances in Genetics* pp 55-102.
- Rutherford JC, Jaron S & Winge DR (2003) Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J. Biol. Chem.* **278**: 27636-43
- Sagatova AA, Keniya M V, Wilson RK, Sabherwal M, Tyndall JDA & Monk BC (2016) Triazole resistance mediated by mutations of a conserved active site tyrosine in fungal lanosterol 14 α -demethylase. *Sci. Rep.* **6**: 26213
- Saikia S, Oliveira D, Hu G & Kronstad J (2014) Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **82**: 839-850
- Sang H & Kim J-I (2020) Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnol. Rep.* **14**: 1-8
- Santos R, Buisson N, Knight S, Dancis A, Camadro J-M & Lesuisse E (2003) Haemin

III. Referencias

- uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. *Microbiology* **149**: 579-588
- Schipper MAA (1976) On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud. Mycol.* **12**: 1-40
- Schrettl M, Beckmann N, Varga J, Heinekamp T, Jacobsen ID, Jöchl C, Moussa TA, Wang S, Gsaller F, Blatzer M, Werner ER, Niermann WC, Brakhage AA & Haas H (2010) HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **6**: e1001124
- Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst HN, Haynes K & Haas H (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med.* **200**: 1213-9
- Schrettl M, Kim HS, Eisendle M, Kragl C, Nierman WC, Heinekamp T, Werner ER, Jacobsen I, Illmer P, Yi H, Brakhage AA & Haas H (2008) SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* **70**: 27-43
- Schröder I, Johnson E & De Vries S (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 427-447
- Schwartz VU, Winter S, Shelest E, Marcet-Houben M, Horn F, Wehner S, Linde J, Valiante V, Sammeth M, Riege K, Nowrousian M, Kaerger K, Jacobsen ID, Marz M, Brakhage AA, Gabaldón T, Böcker S & Voigt K (2014) Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: an evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial mucorales (Mucoromycotina). *PLoS Genet.* **10**: e1004496
- Schwarz P, Cornely OA & Dannaoui E (2019) Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective. *Mycoses*: 0-3
- Shirazi F, Kontoyiannis DP & Ibrahim AS (2015) Iron starvation induces apoptosis in *Rhizopus oryzae* in vitro. *Virulence* **6**: 121-126
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RHA & Fire A (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476
- Silva F, Navarro E, Peñaranda A, Murcia-Flores L, Torres-Martínez S & Garre V (2008) A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Mol. Microbiol.* **70**: 1026-1036
- Silva F, Torres-Martínez S & Garre V (2006) Distinct white collar-1 genes control specific

- light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1023-1037
- Silva J, Chang K, Hannon GJ & Rivas F V (2004) RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* **23**: 8401-9
- Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E & Petrikos G (2018) Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med. Mycol.* **56**: 93-101
- Skory C (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics* **268**: 397-406
- Skory CD & Ibrahim AS (2007) Native and modified lactate dehydrogenase expression in a fumaric acid producing isolate *Rhizopus oryzae* 99-880. *Curr. Genet.* **52**: 23-33
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, James TY, O'Donnell K, Roberson RW, Taylor TN, Uehling J, Vilgalys R, White MM & Stajich JE (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**: 1028-1046
- Spellberg B, Edwards J & Ibrahim A (2005) Novel perspectives on mucormycosis: Pathophysiology, presentation, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 556-569
- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD & Dancis A (1996) A Permease-Oxidase Complex Involved in High-Affinity Iron Uptake in Yeast. *Science* **271**: 1552-1557
- Tangen KL, Jung WH, Sham AP, Lian T & Kronstad JW (2007) The iron- and cAMP-regulated gene SIT1 influences ferrioxamine B utilization, melanization and cell wall structure in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **153**: 29-41
- Taylor AB, Stoj CS, Ziegler L, Kosman DJ & Hart PJ (2005) The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 15459-64
- Theil EC (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 289-315
- Thieken A & Winkelmann G (1992) Rhizoferrin: a complexone type siderophore of the Mucorales and entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiol. Lett.* **73**: 37-41
- Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2016) RNAi pathways in *Mucor*: A tale of

III. Referencias

- proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet. Biol.* **90**: 44-52
- Torres-Martínez S & Ruiz-Vázquez RM (2017) The RNAi universe in fungi: A varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**: 371-391
- Trieu TA, Calo S, Nicolás FE, Vila A, Moxon S, Dalmay T, Torres-Martínez S, Garre V & Ruiz-Vázquez RM (2015) A non-canonical RNA silencing pathway promotes mRNA degradation in basal fungi. *PLoS Genet.* **11**: e1005168
- Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA & Eslava AP (2000) Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* **210**: 938-946
- Wang M, Weiberg A & Jin H (2015) Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 219-23
- Wang T-P, Quintanar L, Severance S, Solomon EI & Kosman DJ (2003) Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**: 611-20
- Watkins TN, Gebremariam T, Swidergall M, Shetty AC, Graf KT, Alqarihi A, Alkhazraji S, Alsaadi AI, Edwards VL, Filler SG, Ibrahim AS & Bruno VM (2018) Inhibition of EGFR signaling protects from mucormycosis. *mBio* **9**:
- Winkelmann G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* **20**: 379-92
- Wolff AM, Appel KF, Petersen JB, Poulsen U & Arnau J (2002) Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Res.* **2**: 203-13
- Xiao H, Alexander WG, Hammond TM, Boone EC, Perdue TD, Pukkila PJ & Shiu PKT (2010) QIP, a protein that converts duplex siRNA into single strands, is required for meiotic silencing by unpaired DNA. *Genetics* **186**: 119-126
- Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T & Klausner RD (1995) The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 2632-6
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA & Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33

Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L & Zhu H (2019) Cross-Kingdom small RNAs among animals, plants and microbes. *Cells* **8**:

Zhao Y, Lin J, Fan Y & Lin X (2019) Life cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **73**: 17-42

IV. PUBLICACIONES

IV.1. RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis

Trung A. Trieu, María Isabel Navarro-Mendoza, Carlos Pérez-Arques, Marta Sanchis, Josep Capilla, Patricia Navarro-Rodríguez, Loida López-Fernández, Santiago Torres-Martínez, Victoriano Garre, Rosa M. Ruiz-Vázquez y Francisco E. Nicolás.

20 January 2017. **PLoS Pathogens**

doi:10.1371/journal.ppat.1006150

Abstract

Mucorales are an emerging group of human pathogens that are responsible for the lethal disease mucormycosis. Unfortunately, functional studies on the genetic factors behind the virulence of these organisms are hampered by their limited genetic tractability, since they are reluctant to classical genetic tools like transposable elements or gene mapping. Here, we describe an RNAi-based functional genomic platform that allows the identification of new virulence factors through a forward genetic approach firstly described in Mucorales. This platform contains a whole-genome collection of *Mucor circinelloides* silenced transformants that presented a broad assortment of phenotypes related to the main physiological processes in fungi, including virulence, hyphae morphology, mycelial and yeast growth, carotenogenesis and asexual sporulation. Selection of transformants with reduced virulence allowed the identification of *mcp1D*, which encodes a Phospholipase D, and *mcm5*, encoding a probably essential cargo transporter of the Myosin V family, as required for a fully virulent phenotype of *M. circinelloides*. Knock-out mutants for those genes showed reduced virulence in both *Galleria mellonella* and *Mus musculus* models, probably due to a delayed germination and polarized growth within macrophages. This study provides a robust approach to study virulence in Mucorales and as a proof of concept identified new virulence determinants in *M. circinelloides* that could represent promising targets for future antifungal therapies.

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006150#ack>

IV.2. Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism

María Isabel Navarro-Mendoza, Carlos Pérez-Arques, Laura Murcia, Pablo Martínez- García, Carlos Lax, Marta Sanchis, Javier Capilla, Francisco E. Nicolás y Victoriano Garre

16 May 2018. **Scientific Reports**

doi:10.1038/s41598-018-26051-x

Abstract

Mucormycosis is an emerging angio-invasive infection caused by Mucorales that presents unacceptable mortality rates. Iron uptake has been related to mucormycosis, since serum iron availability predisposes the host to suffer this infection. In addition, iron uptake has been described as a limiting factor that determines virulence in other fungal infections, becoming a promising field to study virulence in Mucorales. Here, we identified a gene family of three ferroxidases in *Mucor circinelloides*, *fet3a*, *fet3b* and *fet3c*, which are overexpressed during infection in a mouse model for mucormycosis, and their expression in vitro is regulated by the availability of iron in the culture media and the dimorphic state. Thus, only *fet3a* is specifically expressed during yeast growth under anaerobic conditions, whereas *fet3b* and *fet3c* are specifically expressed in mycelium during aerobic growth. A deep genetic analysis revealed partially redundant roles of the three genes, showing a predominant role of *fet3c*, which is required for virulence during in vivo infections, and shared functional roles with *fet3b* and *fet3c* during vegetative growth in media with low iron concentration. These results represent the first described functional specialization of an iron uptake system during fungal dimorphism.

<https://www.nature.com/articles/s41598-018-26051-x>

IV.3. Generation of a *Mucor circinelloides* reporter strain—A promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis

Ulrike Binder, María Isabel Navarro-Mendoza, Verena Naschberger, Ingo Bauer, Francisco E. Nicolás, Johannes D. Pallua, Cornelia Lass-Flörl y Victoriano Garre

7 December 2018. **Genes**

doi:10.3390/genes9120613

Abstract

Invasive fungal infections caused by Mucorales (mucormycosis) have increased worldwide. These life-threatening infections affect mainly, but not exclusively, immunocompromised patients, and are characterized by rapid progression, severe tissue damage and an unacceptably high rate of mortality. Still, little is known about this disease and its successful therapy. New tools to understand mucormycosis and a screening method for novel antimycotics are required. Bioluminescent imaging is a powerful tool for *in vitro* and *in vivo* approaches. Hence, the objective of this work was to generate and functionally analyze bioluminescent reporter strains of *Mucor circinelloides*, one mucormycosis-causing pathogen. Reporter strains were constructed by targeted integration of the firefly luciferase gene under control of the *M. circinelloides* promoter *Pzrt1*. The luciferase gene was sufficiently expressed, and light emission was detected under several conditions. Phenotypic characteristics, virulence potential and antifungal susceptibility were indifferent to the wild-type strains. Light intensity was dependent on growth conditions and biomass, being suitable to determine antifungal efficacy *in vitro*. This work describes for the first time the generation of reporter strains in a basal fungus that will allow real-time, non-invasive infection monitoring in insect and murine models, and the testing of antifungal efficacy by means other than survival.

<https://www.mdpi.com/2073-4425/9/12/613>

V. CONCLUSIONES

V. Conclusions

The results obtained in the publications that encompass this thesis led to the following conclusions:

1. An RNAi-based functional genomic platform generated a whole-genome collection of *M. circinelloides* silenced transformants that showed a broad assortment of phenotypes related to essential physiological processes in fungi, including virulence, hyphal morphology, mycelial and yeast-like growth, carotenogenesis, and asexual sporulation.
2. The approach of RNAi-based functional genomics resulted in the identification of three genes involved in pathogenesis: *mcp1D*, which encodes a Phospholipase D; *mcm5*, encoding a probably essential cargo transporter of the myosin V family; and *mcclasp*, encoding a CLIP-associated protein (CLASP). The knockout mutant strains for each gene reproduced the phenotypes observed in the silencing transformants, showing reduced growth and sporulation rates.
3. The *mcp1D* and *mcm5* genes are required for a fully virulent phenotype of *M. circinelloides* in both *Galleria mellonella* and *Mus musculus* models, probably due to delayed germination and altered polar growth within macrophages.
4. Two *M. circinelloides* bioluminescent strains were constructed by targeted integration of the firefly luciferase gene driven by the strong promoter *Pzrt1*: a prototroph and a uracil auxotroph. The latter was selected to facilitate subsequent disruption or introduction of other genes in the bioluminescent strain.
5. The luciferase gene was sufficiently expressed in all the bioluminescent strains. Light emission was dependent on growth conditions and biomass, being suitable to determine antifungal efficacy *in vitro*.
6. The phenotypic characteristics of the reporter strains, including virulence potential and antifungal susceptibility, were equal to the wild-type strains.
7. Three ferroxidases were identified in *M. circinelloides* genome: *fet3a*, *fet3b*, and *fet3c*. They belong to the high-affinity iron uptake mechanism because their expression is iron responsive, being expressed under low iron availability *in vitro* and during mouse infection.
8. Single and double mutants of all the *fet3* genes were affected in growth under iron limitation, especially the single mutants in *fet3b* and *fet3c* and, consequently, all the double mutant strains. The single mutant in *fet3c* and all the double mutant strains were significantly less virulent in a mouse model of infection compared to the wild-type strain. These phenotypic screenings revealed the redundant role of the three genes in the high-affinity iron uptake mechanism.

V. Conclusiones

9. The gene *fet3a* is specifically expressed during yeast growth, whereas *fet3b* is expressed only during mycelial growth. The iron uptake regulation in *M. circinelloides* depends on the dimorphic state, indicating a functional specialization of the three ferroxidase genes.

