

EFFECTO DEL REMODELADOR QUÍMICO DE CROMATINA 5-AZACITIDINA
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN EL
HONGO ANTÁRTICO *Pseudogymnoascus sp.*

LUISA FERNANDA SACRISTAN CARRILLO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2017

EFFECTO DEL REMODELADOR QUÍMICO DE CROMATINA 5-AZACITIDINA
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN EL
HONGO ANTÁRTICO *Pseudogymnoascus sp.*

LUISA FERNANDA SACRISTAN CARRILLO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Microbióloga

Tutor: Prof. Dr. Renato Chávez
Universidad de Santiago de Chile

Tutor: Prof. Dr. Ramón Ovidio García Rico
Universidad de Pamplona

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER
2017

Nota de aceptación

Firma Jurado 1.

Firma Jurado 2.

Pamplona, Junio de 2017

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto FONDECYT 1150894.

Al profesor Renato Chávez y a la profesora Inmaculada Vaca, por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de grado en el Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad de Santiago de Chile y por sus enseñanzas en esta etapa de mi carrera profesional. Así mismo, Agradezco al profesor Ovidio García, por su colaboración para que este trabajo fuese posible. También por sus enseñanzas, consejos y ayuda.

A Carlos Gil y Juan F. Rojas, del Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada de la USACH, por su ayuda, paciencia y enseñanzas.

Agradezco a mis padres Raúl y Alexandra y a mi hermano Juan Pablo, por sus consejos, su confianza, por el apoyo incondicional y por todo el cariño. Han sido la mayor motivación para sobrellevar mi carrera universitaria. Nada de esto hubiese sido posible sin ellos. A mi tía Esly y a Giovana por estar siempre dispuestas a ayudarme y escucharme, sus consejos y ayuda han sido muy importantes en esta etapa.

Agradezco a todos mis amigos, por compartir conmigo los buenos y malos momentos. En especial le agradezco a Carlos y Yessica mis amigos incondicionales por su apoyo y ayuda.

*Este trabajo está dedicado a
mis amados padres, a mi
hermano y a mi abuelo.*

*“Ver lo invisible
Soñar lo imposible
Buscar lo sensible
Vivir lo increíble
Sentir que eres uno”*

-Chris Morena.

Contenido

	Pag.
1. Introducción.....	14
2. Objetivos	16
2.2 General.....	16
2.3 Específicos	16
3. Justificación.....	17
4. Marco teórico.....	18
4.1 Hongos filamentosos	18
4.1.1 El género <i>Pseudogymnoascus sp.</i>	18
4.2 Metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos.....	19
4.2.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios	20
4.2.1.1 Policétidos	20
4.2.1.2 Péptidos no ribosomales	21
4.3 Regulación del metabolismo secundario	22
4.3.1 Regulación global.....	22
4.3.2 Regulación específica	23
4.3.3 Control epigenético	23
4.4 Identificación y activación de clústeres biosintéticos silenciados.....	23
4.4.1 Minería genómica.....	24
4.4.2 Condiciones de cultivo	24
4.4.3 Manipulación epigenética.....	24
5 Antecedentes	25
6 Metodología.....	26
6.1 Cepa y medios de cultivo.....	26
6.2 Extracción de ARN	26
6.4 RT-PCR	27
6.5 PCR	27
6.6 Remodelador de cromatina.....	28
6.7 Análisis de expresión.....	28
7 Plan de trabajo	30
8 Resultados	31
8.1 Extracción de ARN	31
9 Análisis de Resultados	37
10. Conclusiones.....	39

13. Bibliografía42
Anexos.....48

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Clústeres genéticos biosintéticos y enzimas PKS (izq.) y NRPS (der.). Tomado de (Brakhage, 2013).....	21
Ilustración 2. Gel de electroforesis. Extracción de ARN en medios CYA y CM a los 10 días de crecimiento.....	31
Ilustración 3. Gel de electroforesis. Extracción de ARN en medios CYA y CM a los 10 días de crecimiento.....	32
Ilustración 4. Gel de electroforesis. Extracción de ARN con el remodelador de cromatina a los 10 días de crecimiento. Carril 1: Condición 1; Carril 2: Condición 2; Carril 3: Condición 3; Carril 4: Condición 4; Carril 5: Control 1 ; Carril 6: Control 2.....	33
Ilustración 5. Gel de electroforesis para el análisis de la expresión de los genes bcl, dcl, pks, nrps en medio CYA y CM a los 10 días de crecimiento. El gen de la β -tubulina es tomado como control. Control positivo, ADN genómico (C+); Control negativo, sin ADN (C-).	33
Ilustración 6. Gel de electroforesis para el análisis de la expresión de los genes bcl, dcl, pks, nrps en medio CYA y CM a los 14 días de extracción de RNA. El gen de la beta-tubulina es tomado como control. Control positivo, ADN genómico (C+); Control negativo, sin ADN (C-).	34
Ilustración 7. Proteínas involucradas en la regulación global de la expresión de clústeres genéticos de metabolitos secundarios en diferentes hongos. Tomado de (Brakhage, 2013).	48
Ilustración 8. Crecimiento del hongo filamentosos <i>Pseudogymnoascus</i> sp. en medio PDA. Anverso (izq.) Reverso (Der.).....	50
Ilustración 9. Gel de electroforesis. Control 1: Adición de DMSO al inicio de la fermentación sin remodelador.....	52
Ilustración 10. Gel de electroforesis. Control 2: Adición de DMSO a los 7 días de la fermentación sin remodelador.	52
Ilustración 11. Gel de electroforesis. Control 3: Sin adición de DMSO ni remodelador.	52
Ilustración 12. Gel de electroforesis. Tratamiento 1 (izq.) Adición de de 50 μ M de remodelador al día cero de la fermentación	53

Ilustración 13. Gel de electroforesis. Tratamiento 1 (izq.) Adición de de 50 uM de remodelador al día siete de la fermentación..... 54

Ilustración 14. Gel de electroforesis. Tratamiento 3: Adición de 500 uL del remodelador al inicio de la fermentación. 54

Ilustración 15. Gel de electroforesis. Tratamiento 4: Adición de 500 uL del remodelador a los 7 días de la fermentación 54

Lista de Tablas

Tabla 1. Primers utilizados para PCR.....	27
Tabla 2. Condiciones de cultivo de <i>Pseudogymnoascus sp.</i> con el remodelador de cromatina 5-azacitidina	28
Tabla 3. Cronograma de actividades.	30
Tabla 4. Cuantificación de RNA en los medios CYA y CM a los 10 días.....	31
Tabla 5. Cuantificación de RNA en medios CYA y CM a los 14 días.....	32
Tabla 6. Cuantificación de RNA en medio CYA bajo diferentes concentraciones del remodelador de cromatina a los 10 días de crecimiento.	32
Tabla 7. Análisis de la expresión. Cantidad relativa valuada por medio del programa MyImageAnalysis. El gen β -tubulina es tomado como control.	35
Tabla 8. Composición medio de cultivo CYA.....	49
Tabla 9. Composición del medio de cultivo PDA	49

Lista de figuras

Figura 1. Expresión de los genes bcl, ccl y dcl a diferentes concentraciones de 5-AZA adicionado al día cero (0).....35

Figura 2. Expresión de los genes bcl, ccl y dcl a diferentes concentraciones de 5-AZA adicionado al día siete (7)36

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Fórmula para la determinación de las veces de cambio..... 29

Lista de abreviaturas y siglas

- 1. MS** Metabolitos Secundarios
- 2. BGC** Clústeres genéticos biosintéticos
- 3. PKS** Policétido Sintasa
- 4. AT** Acetil-transferasa
- 5. ACP** Proteína portadora de acilo
- 6. KS** Ceto-sintasa
- 7. KR** Ceto-reductasa
- 8. ER** Enoil -reductasa
- 9. DH** Deshidratasa
- 10. TE** Tioesterasa
- 11. NRPS** sintasas peptídicas no ribosomales
- 12. 5-AZA** 5-azacitidine

1. Introducción

Los microorganismos han sido una fuente importante de metabolitos secundarios con usos en la industria farmacéutica, alimentaria, textil y agrícola (Cragg y Newman, 2013). La producción de metabolitos secundarios a partir de hongos filamentosos es un área que ha sido ampliamente estudiada a través de las últimas décadas (Keller et al, 2005). Los metabolitos secundarios son sustancias de bajo peso molecular, no esenciales para el crecimiento de los microorganismos y son producidos durante la idiofase de su crecimiento (Ruiz et al., 2010). Estos compuestos son utilizados por hongos de manera natural como arma de defensa ante otros organismos, como hormonas sexuales, inductores de esporulación o para la comunicación intercelular (Fiechter y Blakebrough, 1979; Keller et al., 2005). Sin embargo, los metabolitos secundarios han presentado un gran impacto en la sociedad, debido a que a nivel clínico pueden presentar actividad antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena o antiinflamatoria (Atta-ur-Rahman, 2016) y a nivel industrial son usados como colorantes, endulzantes, entre otros (Avalos et al., 2014).

Durante los últimos años, el interés por el descubrimiento y optimización de la producción de nuevos metabolitos secundarios ha incrementado debido a la necesidad de combatir enfermedades e infecciones resistentes a los fármacos de la actualidad, en el área clínica y en la agricultura (Gerke y Braus, 2014). Por esta razón, diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios de hongos filamentosos a partir hábitats inexplorados bajo condiciones extremas, ya que como estrategia de adaptación y desarrollo a esos hábitats, los hongos habrían desarrollado la capacidad de generar moléculas novedosas (Ruiz et al., 2010).

Gracias al avance en las técnicas de biología molecular y a la bioinformática, se ha expuesto el potencial que tienen los hongos para la síntesis de metabolitos secundarios (MS) nuevos que no son expresados bajo condiciones normales de cultivo, dando lugar al uso de diferentes técnicas para la obtención de los mismos, donde se incluye la variación en las condiciones de crecimiento, manipulación genética en la transcripción y traducción, manipulación de reguladores globales y manipulación epigenética (Brakhage, 2013; Kaushal Kishore, 2015; Rutledge y Challis, 2015).

En nuestro laboratorio, actualmente se está estudiando el metabolismo secundario del hongo antártico *Pseudogymnoascus sp.* Este hongo fue aislado desde esponjas marinas antárticas, y sus extractos mostraron interesante actividad antimicrobiana (Henríquez et al., 2014). Asimismo, se ha visto que este género de hongos antárticos puede producir moléculas químicas con estructuras novedosas (Figueroa

et al. 2015). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios directos o indirectos que permitan evaluar el potencial biosintético de este hongo a nivel genético. Dentro de este marco general, los remodeladores de cromatina son una interesante alternativa para evaluar de forma rápida, el potencial epigenético de los organismos. Por tanto, este trabajo tiene como propósito evaluar el efecto de un remodelador químico de cromatina en la expresión de genes específicos de metabolitos secundarios en el hongo filamentoso *Pseudogymnoascus sp.*

2. Objetivos

2.2 General

Evaluar el efecto del remodelador de cromatina 5-azacitidina sobre la expresión de genes del metabolismo secundario del hongo filamentoso *Pseudogymnoascus sp.*

2.3 Específicos

- Verificar la expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl*, *pks* y *nrps* bajo condiciones normales de cultivo en medio CYA y CM a 10 días y 14 días.
- Analizar el efecto del remodelador de cromatina 5-azacitidina sobre la expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl*, *pks* y *nrps*.

3. Justificación

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas muy estudiados debido a su alto potencial de producción de metabolitos bioactivos con aplicaciones farmacéuticas, alimentarias y ambientales (Gupta et al., 2015). Entre los años 1981 y 2010, el 50% de nuevas entidades químicas aprobadas, eran provenientes o derivadas de productos naturales (Newman y Cragg, 2012). Según Demain (2014), aproximadamente 250.000 productos naturales son compuestos con actividad biológica y el 40% de estos son producidos por microorganismos. En particular, de 23.000 medicamentos naturales producidos por microorganismos, el 42% es producido por hongos filamentosos y han tenido gran impacto en la industria. En la actualidad, el descubrimiento de productos naturales a partir de plantas y microorganismos sigue siendo significativo, ya que son utilizados como base para el desarrollo de fármacos, bien sea en su forma natural o modificados sintéticamente (Newman y Cragg, 2012).

Entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) han advertido acerca de la rápida distribución de bacterias resistentes a antibióticos, lo cual ha generado una crisis de salud mundial (Ventola, 2015). Por lo tanto, la necesidad e importancia de descubrir nuevos compuestos bioactivos que ayuden a mitigar las infecciones resistentes a los fármacos actuales ha incrementado (Gerke y Braus, 2014). Además de esto, la importancia del estudio de metabolitos secundarios abarca otras áreas de la industria farmacéutica, donde se han encontrado y utilizado compuestos para el tratamiento de enfermedades cancerígenas e infecciosas como el VIH (Cragg y Newman, 2013).

Por otra parte, los MS a partir de hongos filamentosos son importantes en la industria agrícola, actuando como agentes de biocontrol de gran eficacia, desempeñándose como antagonistas restringiendo el crecimiento de patógenos en plantas (Karlovsy, 2008). Además de esto, con el creciente mercado de aditivos naturales en la industria de alimentos, los MS juegan un papel importante al ser utilizados como colorantes y antioxidantes (Kumar Gupta et al., 2015).

La exploración de nuevos hábitats ha sido de gran importancia para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios a partir de microorganismos que, muchas veces, no han sido caracterizados previamente. Dentro de estos microorganismos se destacan bacterias y hongos filamentosos encontrados en ambientes extremos como lo es la región Antártica, los cuales han desarrollado características únicas para su supervivencia. Estas características están basadas en modificaciones en sus rutas metabólicas y adaptaciones fisiológicas, y han sido fuente para encontrar metabolitos únicos, los cuales abarcan una gran variedad de

actividades biológicas como antioxidantes, antiparasitarias, antivirales, antibacteriales, anticancerígenas, entre otras (Chávez et al. , 2015; Tian et al., 2017).

4. Marco teórico

4.1 Hongos filamentosos

El reino Fungi es un grupo de organismos eucariota y está subdividido según su morfología en hongos filamentosos o mohos, levaduras y setas (Kumar Gupta et al., 2015). Poseen una pared celular cuyos componentes son principalmente la quitina y los glucanos (polímeros de glucosa con predominante enlaces β -1,3 y β -1,6) lo que los distinguen de los demás organismos, especialmente de las plantas, (Madigan et al., 2015). Los hongos filamentosos son quimiorganotrofos, absorben nutrientes simples solubles a través de la pared celular o pueden secretan enzimas extracelulares para degradar polímeros en monómeros y absorberlos para usarlos como fuente carbón y energía. Morfológicamente, los hongos filamentosos son multicelulares y conforman estructuras tubulares ramificadas denominadas hifas, estructuras que suelen ser septadas, con paredes que dividen cada una de células separadamente. El crecimiento de las hifas se da de manera apical, es decir, se extienden a partir de la punta y todas las hifas producidas generan una estructura macroscópica denominada micelio. Este crecimiento es clave para la degradación de diversos sustratos, la secreción de enzimas hidrolíticas y la asimilación de nutrientes, además del reconocimiento de señales ambientales (Borkovich y Ebbole, 2010; Deacon, 2006; Madigan et al., 2015).

Los hongos filamentosos han tenido un impacto importante en la sociedad, ya que, además de ser patógenos importantes de plantas y animales, han generado productos de amplio uso en las áreas de la medicina, la agricultura, la industria alimentaria y la biotecnología (May y Adams, 1997).

4.1.1 El género *Pseudogymnoascus* sp.

Las especies del género *Pseudogymnoascus* están distribuidas a nivel global en diferentes tipos de suelo y otros microambientes, especialmente en regiones frías (Minnis y Lindner, 2013; Reynolds et al., 2016). Desde el punto de vista taxonómico, el género *Pseudogymnoascus*, perteneciente a la familia Pseudeurotiaceae, es de reciente data, ya que se generó producto de la reclasificación de los hongos

antiguamente denominados *Geomyces*, y algunos otros organismos (Minnis y Lindner, 2013). Por esta razón, existe poca información sobre ellos, siendo la especie más estudiada *Pseudogymnoascus destructans*, anteriormente llamado *Geomyces destructans*, que es un hongo psicrófilo (Donoghue et al., 2015). Esta especie es muy estudiada ya que es el agente causal del síndrome de la nariz blanca de los murciélagos en hibernación, el cual se caracteriza por crecer como una capa blanca en el hocico, alas y orejas de los murciélagos en hibernación, ya que la temperatura interna corporal del hospedero se reduce ligeramente por encima de la temperatura ambiente (2°C y 10°C) y el sistema inmune del murciélago se encuentra suprimido.

En el ambiente, *P. destructans* es un saprófito competente ya que es capaz de persistir y propagarse en los sedimentos de cuevas (Lorch et al., 2013; Reynolds et al., 2016). Además se ha reportado que *P. destructans* es capaz de metabolizar diferentes fuentes de nitrógeno incluyendo nitrato, lo que sugiere que en el ambiente el patógeno posiblemente pueda metabolizar el nitrato presente en cuevas (Reynolds et al., 2016)

Bajo condiciones *in vitro*, *P. destructans* produce numerosas enzimas, entre ellas β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, fosfatasa ácido y alcalinas, superóxido dismutasa, esterasa, lipasa, varias proteinasas, ureasa, alpha/beta galactosidasa, β -glucoronidasa, entre otras. Notablemente, algunas de estas enzimas presentes en *P. destructans* (ureasa, proteinasa y superóxido dismutasa) pueden ser encontradas en otros hongos patógenos y son consideradas factores de virulencia duales (Raudabaugh y Miller, 2013).

A pesar de estar relacionado con el síndrome de la nariz blanca debido a su crecimiento blanco característico, se conoce poco acerca de la ecología o el ciclo de vida de este patógeno fúngico (Lorch et al., 2013).

Respecto a otras especies de *Pseudogymnoascus*, hay muy poca información y en general, se asume que comparten la mayoría de las características descritas para *P. destructans*.

4.2 Metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos

El término “metabolismo secundario” puede ser descrito como todas aquellas reacciones metabólicas cuyos productos no están asociados directamente con el crecimiento normal de los organismos y se generan después de que las reacciones relacionadas al crecimiento activo han disminuido (Deacon, 2006; Strauss y Reyes-Dominguez, 2011). Los metabolitos secundarios son moléculas pequeñas producidas por plantas y microorganismos que no están ligados directamente al

crecimiento de estos, pero juegan un papel importante durante su supervivencia (Demain, 1986). Dentro de los metabolitos producidos por hongos filamentosos se destacan micotoxinas, antimicrobianos, pigmentos, feromonas y metabolitos que activan la esporulación brindándoles ventajas en el ecosistema para sobrevivir (Calvo et al., 2002).

El estudio de los MS producidos por hongos inició a finales del siglo XIX con el descubrimiento del ácido micofenólico y, a inicios del siglo XX, con el descubrimiento de la penicilina, marcando el inicio de la búsqueda de nuevos metabolitos con actividad bioactiva y con diversas funciones que, debido al gran impacto que han tenido en la sociedad, siguen siendo producto de investigación en la actualidad. Dentro los productos naturales más importantes producidos por hongos se encuentran antibióticos beta-lactámicos, cefalosporinas, ácido clavulánico y carbapenems; productos farmacéuticos como los fármacos hipocolesterolémicos, donde se incluyen mevastatina, lovastatina y simvastatina, los fármacos anticancerígenos, como el taxol y la camptotecina, drogas inmunosupresoras como la ciclosporina A. Otros productos como los inhibidores enzimáticos, pigmentos y endulzantes también han sido de gran relevancia (Campbell, 1982; Deacon, 2006; Gerke y Braus, 2014).

4.2.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios

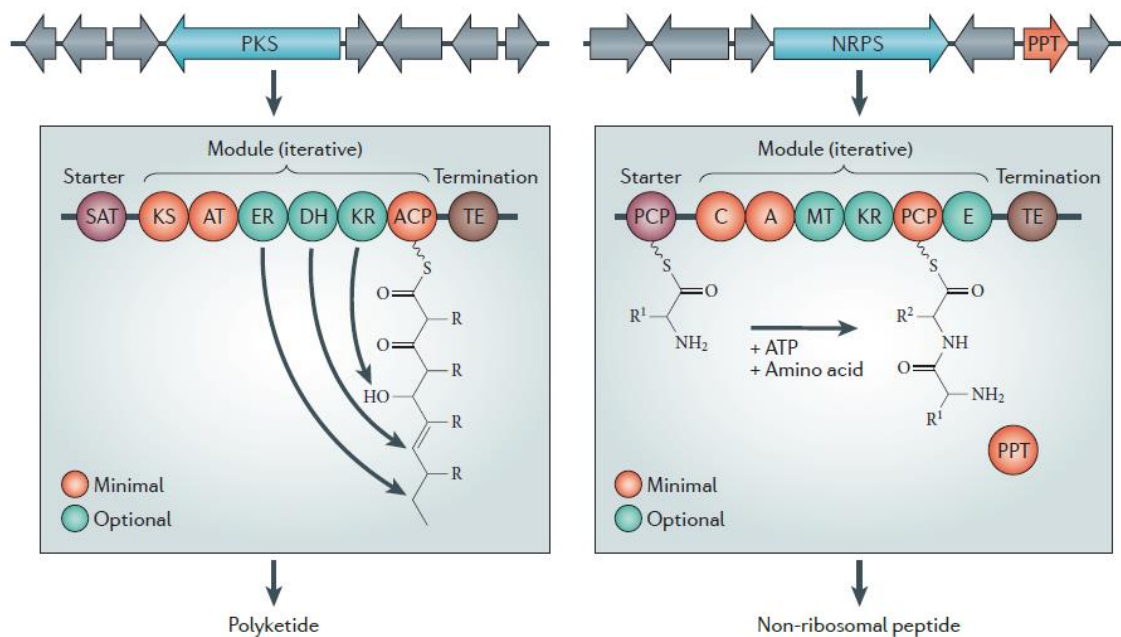
Los genes encargados de la biosíntesis de los metabolitos secundarios en hongos filamentosos están usualmente organizados en grupos denominados *clústeres de genes biosintéticos*, sus siglas en inglés (BGC). Los BGCs abarcan genes que codifican para diversas enzimas que se encargan de la construcción de MS, entre estas se encuentran las policétido sintasas (PKS), sintasas peptídicas no ribosomales (NRPS), híbridos (PKS-NRPS), entre otros (Keller et al., 2005; Sbaraini et al., 2016). Cabe destacar que la gran cantidad de actividades y funciones que presentan los MS están directamente relacionada con su gran diversidad estructural (Smith y Tsai, 2007).

4.2.1.1 Policétidos

Los policétidos constituyen una gran diversidad de MS con variabilidad estructural y diferentes actividades biológicas y farmacéuticas. Ésta diversidad es basada en las diferentes unidades de extensión, al número de unidades incorporadas, al estado de oxidación de los grupos β -ceto, entre otros. Las enzimas encargadas de su síntesis son las policétido sintasas (PKS), enzimas multifuncionales que están

conformadas de diferentes módulos que se encargan del alargamiento, el procesamiento y la terminación de la cadena (Ilustración 1). Cada módulo contiene proteína portadora de acilo (ACP), ceto-sintasa (KS) y acil-transferasa. Algunos presentan enzimas ceto reductasas (KR), deshidratasas (DH) y enoil reductasas (ER). Las unidades básicas o bloques para la síntesis de estos MS son acetil CoA y malonil CoA (Dutta et al., 2014; Keller et al., 2005; Macheleidt et al., 2016; Shen, 2003; Smith y Tsai, 2007; Staunton y Weissman, 2001). Dentro de los MS policétidos más representativos se encuentran las aflatoxinas, zearalenona, lovastatina fumonisina B1, muscimol, entre otras (Cox, 2007).

Ilustración 1. Clústeres genéticos biosintéticos y enzimas PKS (izq.) y NRPS (der.). Tomado de (Brakhage, 2013).



4.2.1.2 Péptidos no ribosomales

Los péptidos no ribosomales son proteínas con múltiples dominios y constituyen un gran grupo de productos naturales con actividad biológica. Son sintetizados por enzimas denominadas sintasas peptídicas no ribosomales (Ilustración 1.), o su sigla en inglés NRPS, y se encargan de hacer condensaciones consecutivas de aminoácidos tanto *proteinogénicos* como *no proteinogénicos*. Esta síntesis es elaborada en el citoplasma, fuera de los ribosomas. Las NRPS están constituidas por módulos, que a su vez contienen diferentes dominios catalíticos que se encargan de reconocer, activar y unir los aminoácidos para la conformación del

péptido. Un módulo de elongación de cadena contiene por lo menos tres dominios principales: el dominio de condensación (C), el dominio de adenilación (A) y el dominio de portador de peptidilo (PCP) o dominio de tiolación (T). Los dominios A y PCP se encargan de la adhesión de un aminoácido activado, enlazado covalentemente y preparado para la formación de enlaces peptídicos; el dominio C se encarga de formar estos enlaces peptídicos entre los aminoácidos y la cadena resultante (Brakhage, 2013; Challis y Naismith, 2012; Khan et al., 2014; Strieker et al., 2010).

4.3 Regulación del metabolismo secundario

La regulación de la expresión de los clústeres biosintéticos en hongos filamentosos para la producción de los metabolitos secundarios es compleja y abarca diversos niveles, entre los cuales se encuentra la regulación global, la regulación específica y el control epigenético. Es importante destacar que los estudios en la regulación de la transcripción de los BGCs son la base para la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios (Macheleidt et al., 2016).

4.3.1 Regulación global

La regulación global de la transcripción de los metabolitos secundarios comprende proteínas y complejos que responden a estímulos ambientales generales como pH, estado de óxido-reducción, fuente de carbón, de nitrógeno y la luz. Estos reguladores no se encuentran dentro de los clústeres biosintéticos, por lo tanto, también pueden regular genes no pertenecientes al metabolismo secundario (Anexo 1.) (Brakhage, 2013; Macheleidt et al., 2016). Un ejemplo de esto es el factor de transcripción PacC, importante para la regulación por pH en hongos y es indispensable para su crecimiento en ambientes ácidos o alcalinos; además de esto, influye en la síntesis de micotoxinas como la ocratoxina A en *Aspergillus ochraceus* y fumonisinas en *Fusarium verticillioides* (Luo et al., 2017; Macheleidt et al., 2016). Otro de los reguladores globales más importantes es LaeA, una metil transferasa que influiría en aproximadamente el 50% de los BGCs (Macheleidt et al., 2016). LaeA juega un papel importante y es necesario para la transcripción de BGCs, por ejemplo, para la producción de esterigmatocistina, lovastatina y penicilina en *Aspergillus sp.* y penicilina en *P. rubens* (Baba et al., 2012). Diversos estudios indican que el factor LaeA está relacionado con la regulación epigenética (Macheleidt et al., 2016).

4.3.2 Regulación específica

Cerca del 60% de los Clústeres genéticos biosintéticos de hongos filamentosos poseen factores de transcripción necesarios para la expresión de estos genes que, como ha sido mencionado previamente, son necesarios para la síntesis de las enzimas encargadas de la construcción de los metabolitos secundarios. Estos reguladores pueden estar dentro o fuera del BGC a regular (Brakhage, 2013; Yin y Keller, 2011). Los factores reguladores específicos de clústeres en hongos filamentosos son proteínas de unión específica al ADN y son del tipo Zn₂Cys₆, el más frecuente, del tipo Cys₂His₂ y del tipo bZIP, menos frecuentes (Macheleidt et al., 2016). Algunos de los factores del tipo Zn₂Cys₆ más importantes en la producción de metabolitos secundarios están relacionados con la regulación de la transcripción de la fumonisina por *Fusarium vericillioides*, lovastatina por *Aspergillus terreus* y gliotoxina por *A. fumigatus* (Yin y Keller, 2011).

4.3.3 Control epigenético

Todas aquellas reacciones bioquímicas que sirven para alterar la transcripción de los genes a nivel cromosomal, pero que no afectan directamente la secuencia de ADN, se denomina *epigenética*. La cromatina está compuesta de proteínas estructurales como las histonas, que se encargan de compactar la molécula de ADN a un tamaño reducido por medio de la formación de los nucleosomas, hectómetros de histonas, impidiendo la unión de los factores basales para que se lleve a cabo la transcripción. Para acceder a las regiones de ADN compactado y que estas sean transcritas, la cromatina es alterada por remodeladores de cromatina dependientes de ATP y diferentes mecanismos como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otros, que por medio de uniones proteína-ADN liberan histonas y la región de ADN es expuesta (Brakhage y Schroeckh, 2011; Kilpatrick et al., 2014; Witzany, 2013). Se ha encontrado que estos mecanismos están relacionados con la expresión de BGCs en hongos filamentosos (Brakhage, 2013).

4.4 Identificación y activación de clústeres biosintéticos silenciados

El estudio de los factores de transcripción para la biosíntesis de MS, la secuenciación de genomas fúngicos y su estudio mediante programas informáticos de predicción, han revelado que los hongos presentan clústeres de genes de MS de los cuales no se tenía conocimiento, ya que no son expresados bajo condiciones estándar de cultivo en el laboratorio (Brakhage y Schroeckh, 2011; Yin y Keller, 2011). Diferentes estrategias se han establecido para la obtención de los BGC que están silenciados.

4.4.1 Minería genómica

La minería genómica es un área que se ha desarrollado durante los últimos años gracias a los diferentes métodos existentes para la secuenciación de genomas y su disponibilidad en bases de datos de fácil acceso. Varias herramientas han sido desarrolladas para el estudio computacional de los genomas fúngicos que han ayudado a la predicción y el aislamiento de MS, sin la necesidad de largos procesos experimentales. Dentro de los programas bioinformáticos relevantes para el descubrimiento de BGC se encuentran BAGEL, CLUSEAN antiMASH y SMURF, los cuales exploran los datos genómicos disponibles en bases de datos y comparan los perfiles de enzimas biosintéticas conocidas y altamente conservadas y así predecir la posible presencia de BGCs (Khaldi et al., 2010; Ziemert et al., 2016).

4.4.2 Condiciones de cultivo

La variación en las condiciones de cultivo tiene como fin determinar aquellas variables que sean las adecuadas para inducir la producción del metabolito deseado, además de mejorar su eficiencia una vez el metabolito haya sido identificado (Peláez, 2006). Las condiciones sujetas a variación son, generalmente, pH, temperatura, sustratos, inclusive la adición de especies competidoras; sin embargo, es difícil predecir cuál variable es aquella que permite la expresión del clúster biosintético (Rutledge y Challis, 2015).

4.4.3 Manipulación epigenética

Diversos estudios han encontrado que algunos de los BGCs se encuentran en regiones distales de los cromosomas, en estado compacto (heterocromatina) y que pueden ser controlados por medio de regulaciones epigenéticas como desacetilación de las histonas y la metilación del ADN. Por lo tanto, se han hecho diferentes estudios donde se utilizan moléculas denominadas *remodeladores de cromatina*, capaces de modificar el estado de la heterocromatina, y así lograr la obtención de MS de BGCs que no se expresaban previamente. Cabe resaltar que estas técnicas constan de la adición de agentes remodeladores químicos directamente a la cepa fúngica en su medio de cultivo, la remodelación no necesita ningún tipo de modificación genética de la cepa (Williams et al., 2008). Estos remodeladores químicos actúan por medio de la inhibición de lisin-acetiltransferasas, lisin-desacetil-transferasas y metil-transferasas (Macheleidt et al., 2016).

5 Antecedentes

Algunos hongos filamentosos tienen la capacidad de crecer en regiones de bajas temperaturas gracias a su capacidad para metabolizar diversos sustratos. Esta capacidad está dada gracias a la regulación de rutas metabólicas que generan nuevos metabolitos y estos, debido a sus características únicas, pueden ser fuente potencial de productos naturales con importancia en la industria. Durante las dos últimas décadas, se han encontrado diversos productos naturales con actividades antibacterianas y anticancerígenas a partir de organismos aislados de regiones de bajas temperaturas, como la Antártica (Esser, 2009; Tian et al., 2017).

Wang et al., (2016) encontraron cinco compuestos nuevos, tres de estos con actividad antiviral contra virus de la influenza H1N1 y H3N3, a partir de *Aspergillus ochraceopones* SCSIO 05702, mientras que L. Li et al., (2012) hallaron compuestos epipolítidioxopiperazinas, dicetopiperazinas, oidioperazinas producidos por *Oidiodendron truncatum* con potencial actividad antitumoral ante 5 diferentes líneas celulares. Los hongos de estos dos estudios fueron aislados del suelo de la Base Gran Muralla, ubicada en zona antártica China. Los estudios acerca de la producción de metabolitos secundarios a partir de *Pseudogymnoascus sp.* son escasos. Li et al. (2008) han reportado el descubrimiento de cinco nuevos metabolitos derivados del ácido astérrico con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. En nuestro laboratorio, Figueroa et al., (2015) encontraron cuatro nuevos productos naturales derivados del ácido nitroastérrico a partir de *Pseudogymnoascus sp.* aislado de una esponja marina encontrada en la región Antártica. Por otra parte, Chávez et al., (2015) utilizaron el programa antiSMASH para la predicción de clústeres de genes de metabolitos secundarios a partir de *Pseudogymnoascus pannorum* y *P. destructans*, aislados de región Antártica, encontrando clústeres con posible actividad de producción de MS homólogos a otros clústeres del hongo modelo y 3 aparentemente únicos.

Previo a los experimentos realizados en este trabajo, se realizaron diversos estudios que comprenden la obtención del microorganismo, cultivos bajo condiciones estándar de laboratorio y estudios computacionales para la búsqueda de nuevos MS. Los estudios bioinformáticos y un posterior análisis por PCR revelaron la existencia de 5 genes (denominados provisionalmente *bcl*, *ccl*, *dcl* *pk*s y *nrps* pertenecientes a probables BGCs en el hongo filamentosos *Pseudogymnoascus sp.* Estos genes son objeto de estudio en este trabajo.

6 Metodología

6.1 Cepa y medios de cultivo

El hongo filamentoso *Pseudogymnoascus sp.* fue proporcionado por el Departamento de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El hongo *Pseudogymnoascus sp.* fue inoculado en placas con medio PDA a 15°C durante 15 días. Se hizo una suspensión del micelio y esporas en 3 mL de solución salina estéril, la cual fue inoculada en 50 mL de medio líquido CYA a 15°C y 180 rpm durante 72 horas. Posteriormente, 5 mL de este medio fueron inoculados en 50 mL de los medios líquidos CYA y CM durante 10 y 14 días a 15°C con agitación a 180 rpm.

6.2 Extracción de ARN

Los crecimientos en medios CYA y CM fueron filtrados en membrana Miracloth y secados con papel filtro estéril para la obtención de micelio, el cual, posteriormente, fue molido con nitrógeno líquido. 100 mg de micelio molido fueron pesados, transferidos a tubos de 1,5 mL y se le fue adicionado 1 mL de Trizol. El tubo es agitado en vortex durante 20 minutos, se centrifuga a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante es transferido a un tubo nuevo. Se le agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló y fue dejado a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos y 500 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo. 500 µl de isopropanol se adicionaron al sobrenadante, se mezcló en vortex durante 3 segundos y se dejó en temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, fue centrifugado a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se verificó la formación de pellet al fondo del tubo. El pellet fue lavado con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 5 minutos dos veces. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado a temperatura ambiente durante dos horas. Seguido a esto, se le adicionó 120 µl de agua conteniendo dietilpirocarbonato (DEPC-H₂O) y se incubó a 60°C por 30 minutos.

El ARN total extraído fue cuantificado por espectrofotometría, donde a 2 µL de la muestra se le realiza una lectura de densidad óptica con longitud de onda a 260 nm y posteriormente se verificó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%. El gel de agarosa fue preparado con buffer TAE al 1% de agarosa y 17µL de bromuro de etidio. La electroforesis fue llevada a cabo a 90 voltios durante 30 minutos.

6.3 Eliminación de ADN residual

Para la eliminación de ADN residual se realizó un tratamiento con DNasa I (DNase Invitrogen®). A 1 µg de la muestra de ARN se le adicionan 1 µL de buffer de reacción de DNasa 10X, 1 µL de DNasa I y agua DEPC hasta lograr los 10 µL de volumen. Los tubos son incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la DNasa I se inactiva por la adición de 1 µL de EDTA 25 mM y se calienta a 65°C durante 10 minutos.

6.4 RT-PCR

Una vez obtenido el RNA, libre de ADN, se obtuvo el ADN complementario (cADN). A 1 µg de ARN se le agregó 1 µL Oligo (dT) y agua libre de nucleasas hasta obtener un volumen de 13 µL. Se incubó a 70 °C por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó a la mezcla 1 µL de transcriptasa reversa (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo®), 4 µL del buffer RT y 2 µL de dNTPs. Esta mezcla fue incubada durante 60 minutos a 42 °C y, posteriormente, durante 10 minutos a 70 °C. Para el control de la reacción, se realizó el cADN del gen β-tubulina, el cual es esencial para el crecimiento del organismo y por lo tanto siempre va a expresarse, siguiendo el mismo protocolo mencionado.

6.5 PCR

Una vez obtenido el cADN, se realiza la amplificación del mismo por medio de una reacción en cadena de la polimerasa. Para esto, se utilizaron primers específicos (Tabla 1.).

Tabla 1. Primers utilizados para PCR

Primer	Secuencia
BCL-FW	AGACTCCCATGGGGCATATTGCTGGGTTTA
BCL-RV	AGACTCCCATGGTGCTATTGGAAGCTTTGG
CCL-FW	AGACTCCCATGGCGTTGTCTGCTTCAGGAC
CCL-RV	AGACTCCCATGGAGATCCCTCACCGTGAAC
DCL-FW	AGACTCCCATGGCATTGATACTGCTTGCTC
DCL-RV	TGCCTTGCATCTCCTCGTGG
PKS-FW	GCAGGAGGTTGACACATACT
PKS-RV	CCGAGAACATTGTCCTTATC
NRPS-FW	GCAAACCAAAGGTGTTATTC

NRPS-RV
Bt2a FW
Bt2b RV

GTGTGATCCTTTTGATAGCC
GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC

6.6 Remodelador de cromatina

Se empleó el remodelador de cromatina: 5-azacitidina, el cual es un inhibidor de la ADN metiltransferasa. El experimento contempló un diseño experimental. La fermentación fue iniciada con un inóculo obtenido de la misma forma que las empleadas en las extracciones de RNA realizadas hasta el momento. Las fermentaciones se llevaron a cabo en 50 mL de medio CYA durante 10 a 15°C en rotación constante 180 rpm. La síntesis de cADN y su amplificación por PCR se hicieron bajo las mismas condiciones mencionadas previamente.

En cada condición (Tabla 2.) los 5 genes encontrados en estudios anteriores (*bcl*, *ccl*, *dcl*, *pks* y *nrps*) son evaluados bajo diferentes concentraciones del remodelador a diferentes tiempos de adición. El DMSO es utilizado como control ya que es el reactivo donde el remodelador es diluido para la preparación de las diferentes concentraciones (Anexo C).

Tabla 2. Condiciones de cultivo de *Pseudogymnoascus sp.* con el remodelador de cromatina 5-azacitidina

Condición	Concentración de 5-AZA	Tiempo de adición (Días)
1	50 µM	0
2	50 µM	7
3	500 µM	0
4	500 µM	7
Control 1*	-	0
Control 2*	-	7
Control 3**	-	0

*Adición de DMSO sin remodelador de cromatina

** Sin adición de DMSO o remodelador de cromatina

6.7 Análisis de expresión

Los geles de electroforesis fueron analizados con el programa MyImageAnalysis™ (ThermoFisher, 2014) para determinar la intensidad de las bandas obtenidas. Por medio de esta intensidad, la cantidad relativa puede ser evaluada tomando como control el gen de la β -tubulina. Posteriormente, se analiza las veces de cambio de

cada gen en cada condición (Ecuación 1.) para saber si la expresión de los genes aumenta o disminuye. Los resultados son graficados.

Ecuación 1. Fórmula para la determinación de las veces de cambio (Chang et al., 2009).

$$\text{Veces de cambio} = \left(\frac{\text{Valor del tratamiento}}{\text{Valor del control}} \right) - 1$$

7 Plan de trabajo

A continuación se detallan las actividades y el tiempo en las cuales fueron desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos propuestos al inicio del proceso.

Tabla 3. Cronograma de actividades.

OBJETIVO	ACTIVIDADES	MARZO					ABRIL				MAYO				JUNIO				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Inducción al laboratorio																			
Evaluar la expresión de los genes <i>bcl</i> , <i>ccl</i> , <i>dcl</i> , <i>pks</i> y <i>nrps</i> bajo condiciones normales de cultivo en medio CYA y CM a 10 y 14 días	Inoculación																		
	Extracción y cuantificación de RNA																		
	RT-PCR																		
	PCR																		
	Electroforesis																		
Analizar el efecto del remodelador químico de cromatina 5-azacitidina sobre la expresión de los genes <i>bcl</i> , <i>ccl</i> , <i>dcl</i> , <i>pks</i> y <i>nrps</i> .	Inoculación																		
	Extracción y cuantificación de RNA																		
	RT-PCR																		
	PCR																		
	Electroforesis																		
Revisión bibliográfica																			

8 Resultados

8.1 Extracción de ARN

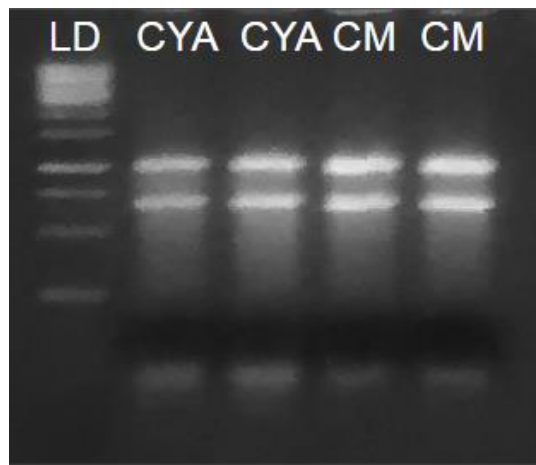
Posterior a la extracción, se realizó un análisis por espectrofotometría para determinar la concentración de ARN extraído y así determinar la cantidad de ARN necesario para la RT-PCR. A continuación se observan las concentraciones evaluadas por medio de espectrofotometría (Tabla 4-6). Por otra parte, los geles de electroforesis hechos al ARN extraído muestran dos bandas por cada carril (Ilustración 2-5).

8.1.1 Extracción de ARN a los 10 días de crecimiento en medios CYA y CM

Tabla 4. Cuantificación de RNA en los medios CYA y CM a los 10 días.

CYA	CM
2169 ng/ μ L	1334 ng/ μ L
2169 ng/ μ L	1304 ng/ μ L

Ilustración 2. Gel de electroforesis. Extracción de ARN en medios CYA y CM a los 10 días de crecimiento

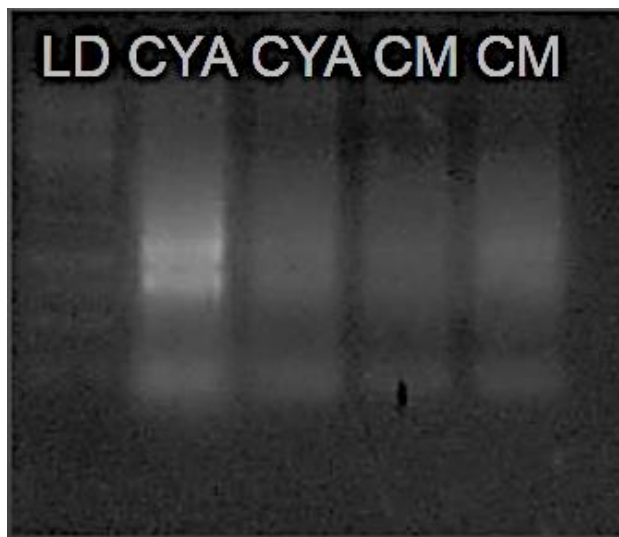


8.1.2 Extracción de ARN a los 14 días de crecimiento en medios CYA y CM

Tabla 5. Cuantificación de RNA en medios CYA y CM a los 14 días.

CYA	CM
740 ng/ μ L	742 ng/ μ L
742 ng/ μ L	787 ng/ μ L

Ilustración 3. Gel de electroforesis. Extracción de ARN en medios CYA y CM a los 14 días de crecimiento

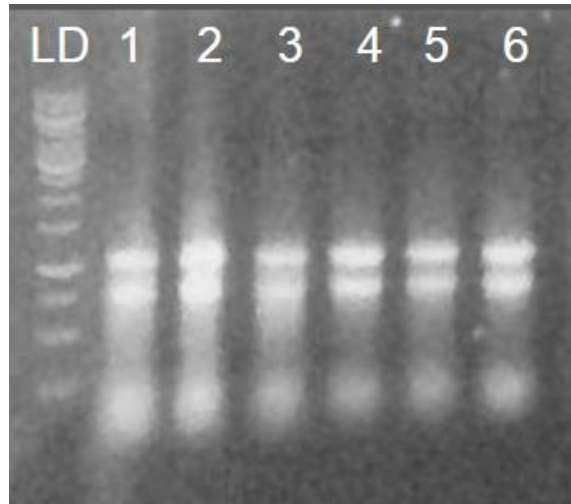


8.1.3 Extracción de ARN con el tratamiento con el remodelador de cromatina

Tabla 6. Cuantificación de RNA en medio CYA bajo diferentes concentraciones del remodelador de cromatina a los 10 días de crecimiento.

Condición	Cuantificación (ng/μL)	
1	1200	1700
2	1422	1484
3	596	593
4	1500	1000
Control 1	755	649
Control 2	664	629
Control 3	795	862

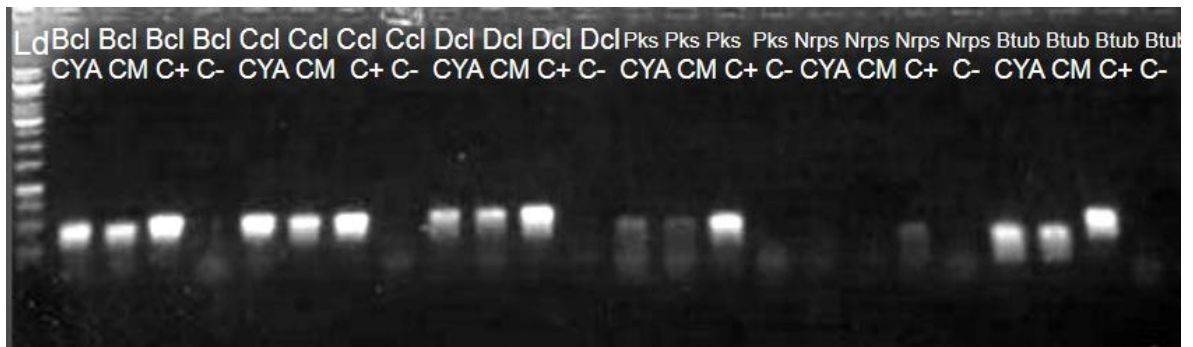
Ilustración 4. Gel de electroforesis. Extracción de ARN con el remodelador de cromatina a los 10 días de crecimiento. Carril 1: Condición 1; Carril 2: Condición 2; Carril 3: Condición 3; Carril 4: Condición 4; Carril 5: Control 1 ; Carril 6: Control 2.



8.2 RT-PCR y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

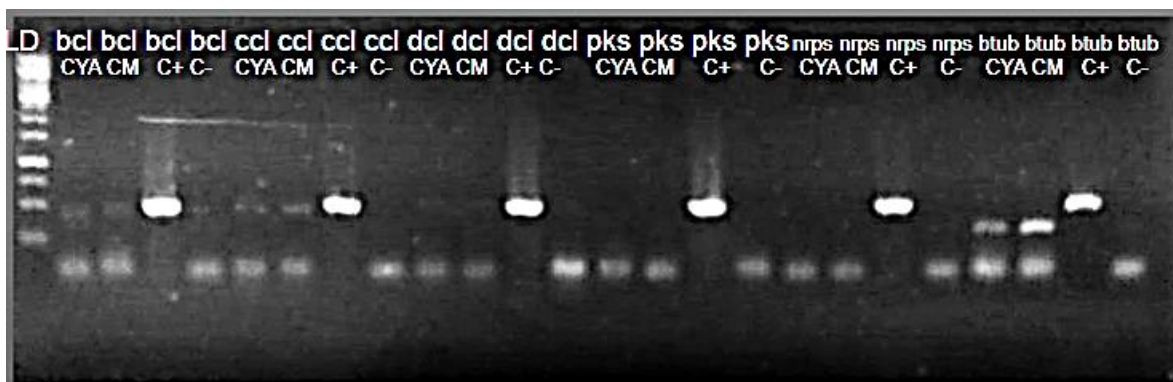
En el análisis de la expresión de los genes en medio CYA y CM a los 10 días de crecimiento se observa que casi todos los genes son expresados, a excepción del gen *nrps*. Además de esto, no se evidencian diferencias considerables en la expresión de los medios CYA y CM (Ilustración 5).

Ilustración 5. Gel de electroforesis para el análisis de la expresión de los genes *bcl*, *dcl*, *pks*, *nrps* en medio CYA y CM a los 10 días de crecimiento. El gen de la β -tubulina es tomado como control. Control positivo, ADN genómico (C+); Control negativo, sin ADN (C-).



Por otra parte, la expresión de los genes a los 14 días en medios CYA y CM es similar a la expresión de los genes a los 10 días de hecha la extracción, sin embargo no se observan bandas para el gen *pks* ni para el *nrps* para los dos medios (Ilustración 6.).

Ilustración 6. Gel de electroforesis para el análisis de la expresión de los genes *bcl*, *dcl*, *pks*, *nrps* en medio CYA y CM a los 14 días de extracción de RNA. El gen de la beta-tubulina es tomado como control. Control positivo, ADN genómico (C+); Control negativo, sin ADN (C-).



8.3 Expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *pks* y *nrps* con la adición de 5- azacitidina bajo diferentes concentraciones y días

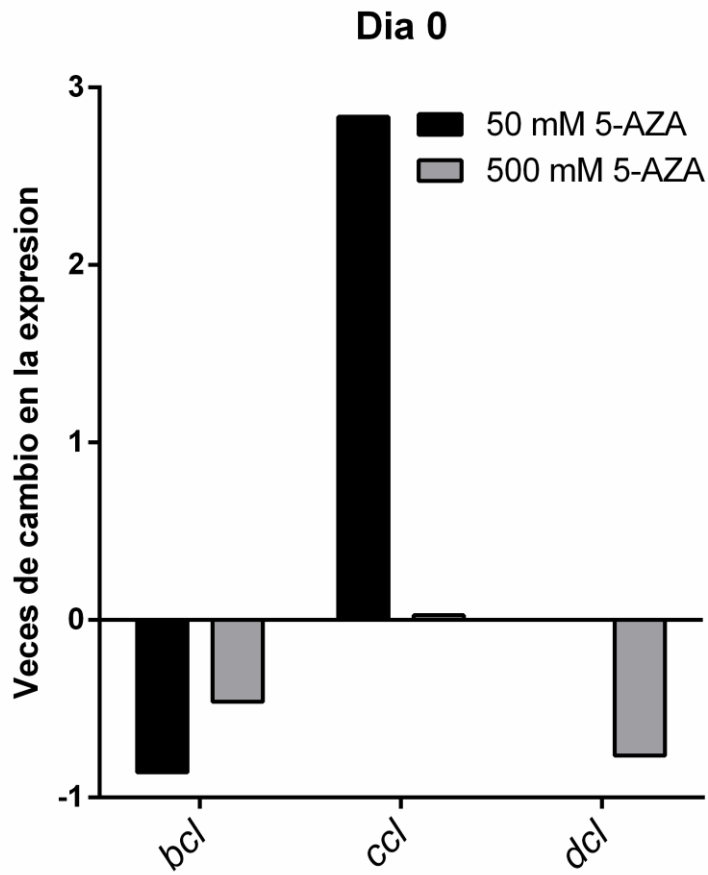
Se evaluó la expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl*, *pks* y *nrps* en medio CYA a los 0 y 7 días de la adición de 5- azacitidina a diferentes concentraciones. Las bandas resultantes de los tratamientos 1, 2, 3 y 4 fueron comparados con las bandas resultantes de los tratamientos control que no presentaban 5- azacitidina y solo se le adicionó solvente (DMSO). La comparación hecha con el programa MyImageAnalysis determina la cantidad relativa de cada banda, tomando como control el gen de la β -tubulina. A partir de estos resultados (Tabla 7.), las veces de cambio fueron calculadas para cada gen. Se determinan diferentes niveles de expresión de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* para el día 0 de haber adicionado el remodelador (Figura 1.), donde el gen con más expresión es *ccl* con la menor concentración del remodelador, mientras que la expresión del gen *bcl* es menor que el control bajo las dos diferentes concentraciones. Por otra parte, el gen *dcl* no presenta cambios en los niveles de expresión bajo la concentración más baja, pero si presenta un cambio negativo en la expresión bajo la concentración más alta. El

gen *nrps* no fue expresado bajo ninguna condición, mientras que el gen *pks* solo fue expresado en el control.

Tabla 7. Análisis de la expresión. Cantidad relativa evaluada por medio del programa MyImageAnalysis. El gen β -tubulina es tomado como control.

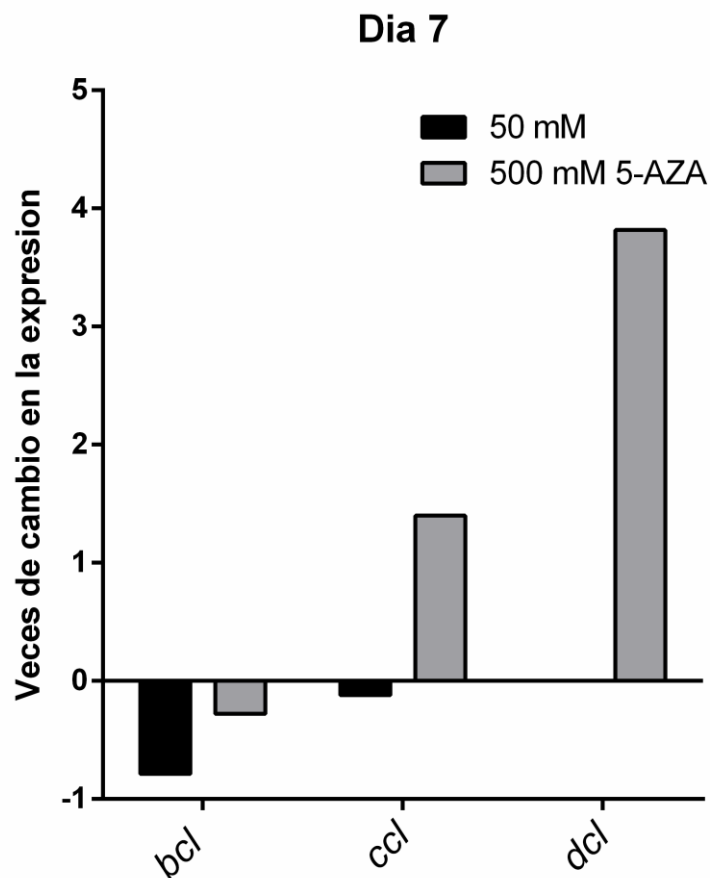
Genes	Tratamientos						
	1	2	3	4	Control 1	Control 2	Control 3
<i>bcl</i>	0,09	0,46	0,34	0,44	0,63	0,61	0,35
<i>ccl</i>	2,8	0,48	0,75	1,8	0,73	0,75	0,73
<i>dcl</i>	0	0,14	0,13	0,53	0,55	0,11	0,11
<i>pks</i>	0	0	0	0	0,22	0	0,45
<i>nrps</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>btub</i>	1	1	1	1	1	1	1

Figura 1. Expresión de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* a diferentes concentraciones de 5-azacitidina adicionado al día cero (0)



De igual manera, los diferentes niveles de expresión de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* para el día 7 de haber adicionado el remodelador son determinados (Figura 2.), donde el gen *bcl* presenta cambios negativos en la expresión en cuanto al control. El gen *ccl* aumenta los niveles de expresión con la adición del remodelador a mayor concentración. El gen *dcl* no presenta cambios en los niveles de expresión bajo la concentración más baja, pero si presenta un cambio positivo en la expresión bajo la concentración más alta. El gen *nrps* no fue expresado bajo ninguna condición, mientras que el gen *pks* solo fue expresado en el control.

Figura 2. Expresión de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* a diferentes concentraciones de 5-azacitidina (5-AZA) adicionado al día siete (7)



9 Análisis de Resultados

En los estudios previos elaborados en nuestro laboratorio, los genes encontrados por medio de la predicción con programas bioinformáticos fueron nombrados *bcl*, *ccl*, *dcl*, *pk*s (policétidos) y *nrps* (péptido no ribosomal) provisionalmente. Por lo tanto, diversos experimentos se llevaron a cabo para determinar las variables, bajo condiciones normales de cultivo en el laboratorio, que fuesen las ideales para la obtención de los MS de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* predichos. Se observó que las condiciones más viables para que estos genes fueran expresados son a los 10 días de cultivo a 15°C en los medios CYA y CM.

Extracción de ARN

Durante el proceso de expresión genética que dará lugar a los metabolitos secundarios, el ADN debe ser transcrito en ARN. Este último pasa por una serie de procesos complejos de maduración que dan lugar a la eliminación de intrones y la adición de los extremos 5' y de la cola poliA, para dar lugar al ARN mensajero, molécula que posteriormente podrá ser traducida a proteína. Los datos obtenidos revelan la concentración de ARN extraído (Tabla 4-6.). Sin embargo, un análisis electroforético fue realizado para determinar la integridad del ARN, ya que el ARN mensajero se constituye como una hebra de cadena sencilla, la cual es poco estable y puede ser degradada fácilmente por enzimas RNAsas, aumentos en la temperatura y otros factores ambientales (Kilpatrick et al., 2014). Sin embargo las diferentes extracciones mostraron que el ARN estaba íntegro, ya que se observa un patrón definido de dos bandas en cada carril que corresponden a la sub unidad 28s y 18s de ARN ribosomal (rARN), lo cual es importante para el estudio de la expresión genética por diversos ensayos real-time PCR o RT-PCR (Schroeder et al., 2006).

RT-PCR y PCR

*Evaluación de la expresión de los genes bcl, ccl, dcl, pk*s y *nrps* bajo condiciones normales de cultivo en medio CYA y CM

Las técnicas basadas en la variación de las condiciones de cultivo como método para la obtención de nuevos metabolitos secundarios son las más sencillas y han sido efectivas para la inducción de la producción de MS en múltiples casos (Rutledge & Challis, 2015). En este estudio, se realizó la comparación de la expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl*, *pk*s y *nrps* en los medios CYA y a dos tiempos diferentes en la extracción del ARN como variables para evaluar la expresión de los mismos y, en especial, la búsqueda de la expresión del gen *nrps*, el cual, a pesar

de haber sido encontrado gracias a la predicción por medio de programas bioinformáticos, no se ha logrado expresar bajo ninguna condición. En la (Ilustración 2.) se observa que los genes *bcl*, *ccl*, *dcl* y *pks* son expresados en los dos medios de cultivo y no hay cambios considerables, sin embargo el gen *nrps* no es expresado en ningún medio. Medios como CM y CYA son utilizados para la producción y el estudio de metabolitos secundarios a partir de levaduras y hongos filamentosos. Los reportes de obtención de MS a partir de *Pseudogymnoascus sp.* son escasos, sin embargo, los estudios hechos por Figueroa et al. (2015), donde se cultivó al hongo *Pseudogymnoascus sp.* y lograron la obtención de productos nuevos derivados del ácido nitro-astérico, se utilizó medio CYA. Estudios con más variables para este hongo podrían llevarse a cabo; los efectos que tienen los medios de cultivo sobre la expresión de metabolitos secundarios están bien descritos, ya que gracias a los cambios en la composición se puede explotar la diversidad metabólica (Vandermolen et al., 2013).

Determinación de los niveles de expresión de los genes bcl, ccl, dcl, pks y nrps en medio CYA a 10 y 14 días

Una vez determinado que no existían cambios considerables en la comparación de los dos medios de cultivo para la expresión de los genes, se consideró variar el tiempo de extracción de ARN para evaluar si existían cambios en la expresión, especialmente la obtención de productos a partir del gen *nrps*, el cual no mostró expresión previamente. Esta estrategia fue llevada a cabo ya que los hongos filamentosos del género *Pseudogymnoascus sp.* presentan un crecimiento lento y la temperatura adecuada para la generación de diferentes enzimas es a los 15°C (Raudabaugh y Miller, 2013). Los resultados obtenidos (Ilustración 3.) demuestran que el gen *nrps* bajo estas condiciones tampoco es expresado. Esto puede deberse a que, como se mencionó previamente, el crecimiento del *Pseudogymnoascus sp.* es lento (Raudabaugh y Miller, 2013) y puede que los cambios se lleven a cabo con una diferencia de días más extensa. A pesar de la facilidad de obtener MS a partir de cambios en las condiciones de cultivo, en este caso la extracción de ARN a los 14 días y diferentes sustratos (medio CY y CM), esta opción es condicionada puesto que las variables son limitadas, además de que es difícil predecir cuales variables son las adecuadas o cuales tienen el impacto para activar clústeres biosintéticos y dé la expresión genética (Rutledge y Challis, 2015). Los estudios referentes al hongo *Pseudogymnoascus destructans* están enfocados en su papel como patógeno, sin embargo en estudios hechos donde se evalúa la capacidad de producción de enzimas como factores de virulencia, la temperatura óptima de crecimiento y su comportamiento ambiental, los tiempos de incubación varían desde los 10 días hasta las 5 semanas (Raudabaugh y Miller, 2013; Reynolds et al., 2015; Verant et al., 2012).

Niveles de expresión de los genes con la adición del remodelador de cromatina 5-azacitidina

Las estrategias para la obtención de metabolitos secundarios por medio de la variación en las condiciones de cultivo enfrenta diversos problemas como la alta carga de trabajo y tiempo dedicado a esto, así como la dificultad de predecir las variables adecuadas que van a promover la expresión (Williams et al., 2008). Por lo tanto, la necesidad de nuevas estrategias para la expresión de BGCs para la obtención de nuevos MS es creciente. Uno de los métodos utilizados actualmente para la obtención de MS a partir de hongos filamentosos es la manipulación epigenética por medio de la adición de moléculas denominadas *remodeladores de cromatina* (Brakhage y Schroeckh, 2011). En este trabajo se utilizó el remodelador 5-azacitidina, el cual es un inhibidor de la ADN-metiltransferasa (Macheleidt et al., 2016), enzima que por medio de la metilación del ADN modifica la cromatina e inhibe la transcripción (Klose et al., 2005). Dentro de los principales intereses en el uso del remodelador de cromatina era observar si el gen *bcl* aumenta su nivel de expresión y si el gen *nrps* era finalmente expresado.

El aumento y la disminución de las veces de expresión de los genes *bcl*, *ccl* y *dcl* en las diferentes condiciones pueden estar relacionado al remodelador de cromatina (Figura 1. y 2.), lo cual evidenciaría que los clústeres biosintéticos que contienen estos genes están en una región de heterocromatina que puede ser modificada (Palmer y Keller, 2010). El hecho de que la expresión se disminuya puede ser debido a que algunas veces la remodelación de la cromatina puede permitir la unión de diferentes factores de regulación (Macheleidt et al., 2016), lo cual limitaría la expresión de los BGCs. Sin embargo el gen *nrps* no fue expresado bajo esta condición, evidenciando que el clúster al cual pertenece puede ser insensible al el remodelador. Por otra parte, este clúster críptico podría necesitar de otras estrategias o remodeladores distintos, ya que a pesar de que los clústeres comparten ciertos comportamientos, también son diferentes entre sí en cuanto a la red combinatoria de regulación de la cromatina (Macheleidt et al., 2016). Además de esto, la cromatina puede ser modificada por otros remodeladores que han influido en la activación de clústeres crípticos en otros hongos filamentosos. Entre estos se encuentran los inhibidores de lisin-acetil-transferasas y lisin-desacetil-transferasas (Macheleidt et al., 2016).

10. Conclusiones

No existen diferencias significativas para la expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl* y *pks* bajo condiciones normales de cultivo a 10 días de crecimiento en los medios CYA y CM.

Los genes *bcl*, *ccl*, y *dcl* son expresados a los 10 y 14 días y los niveles de expresión no presentan diferencias significativas a esos tiempos.

El gen *nrps* no es expresado bajo condiciones normales de cultivo, bien sea en medio CYA o CM a los 10 o 14 días, ni con la adición del remodelador 5-azacitidina.

Los niveles de expresión de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl* variaron con la adición del remodelador de cromatina. Sin embargo, el único cambio consistente se da en la expresión del gen *ccl*, cuya expresión aumenta casi 3 veces con la adición del remodelador a baja concentración al día 0, y 1,5 veces con la adición del remodelador a mayor concentración al día 7.

11. Perspectivas

El experimento realizado con el remodelador de cromatina debe ser evaluado dos veces para validar los resultados obtenidos. Por otra parte, es importante determinar cuáles son los productos producidos a partir de los genes *bcl*, *ccl*, *dcl* y *pks* por métodos como HPLC. Otros métodos epigenéticos pueden ser utilizados para inducir la expresión del gen *nrps*, como la utilización de otros remodeladores de cromatina que actúen por medio de la inhibición de lisin-acetil-transferasas y lisin-desacetil-transferasas.

12. Glosario

AMINOÁCIDOS NO PROTEINOGENICOS: Cualquier aminoácido que no se produce naturalmente como un residuo constituyente de proteínas. No están involucrados con el metabolismo primario.

CLÚSTER: Un conjunto de secuencias, genes o productos génicos agrupados de acuerdo con criterios de similitud dados (por ejemplo, basados en la distancia, asociativos, correlativos, probabilísticos).

CRÍPTICO: Descriptivo de una función que normalmente no es o no está siempre disponible o expresada.

CROMATINA: El complejo de una fibra de doble hebra de ADN con proteínas histonas y no-histonas que compone los cromosomas del núcleo eucariótico durante la interfase. Mancha fuertemente con tintes básicos. Algunas partes

de los cromosomas están altamente dispersas (eucromatina) y otras partes son altamente condensadas (heterocromatina).

HISTONA: Cualquiera de un grupo de proteínas básicas altamente conservadas evolutivamente, que constituyen aproximadamente la mitad de la masa de los cromosomas de todas las células eucariotas, excepto los espermatozoides. Comprenden cadenas polipeptídicas simples con un contenido de lisina-arginina de aproximadamente 25%, y se encargan del empaquetamiento de ADN en

MÓDULO: Es el conjunto completo de dominios que se requiere para una ronda de alargamiento y modificación de la cadena para la elaboración de policétidos o péptidos no ribosomales.

13. Bibliografía

- Atta-ur-Rahman (Ed.). (2016). *Studies in Natural Products Chemistry International Center for Chemical and Biological Sciences* (Vol. 49). Amsterdam: Elsevier Inc.
- Ávalos, J., Díaz Sánchez, V., García Martínez, Jorge Castrillo, M., Ruger Herreros, M., & Limón, M. C. (2014). *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. Ney York: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1191-2>
- Baba, S., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2012). Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Current Genetics*, 58(1), 1–11. <http://doi.org/10.1007/s00294-011-0359-x>
- Borkovich, K. A., & Ebbole, D. J. (2010). *Filamentous Fungi* (Vol. 9). Washington, DC: ASM Press. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90085-0](http://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90085-0)
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Brakhage, A. A., & Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 15–22. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development, 66(3), 447–459.
- Campbell, L. M. (1982). Fungal Secondary Metabolism Research: Past, Present and Future. *Journal of Natural Products*, 60–70.
- Challis, G. L., & Naismith, J. H. (2012). Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 14(6), 748–756. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.005>. Structural
- Chang, S., Chen, W., & Yang, J. (2009). Another formula for calculating the gene change rate in real-time RT-PCR. *Molecular Biology Reports*, 36(8), 2165–2168. <http://doi.org/10.1007/s11033-008-9430-1>
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O., & Vaca, I. (2015). Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00903>
- Cox, R. J. (2007). Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nanomachines begin to reveal their secrets. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(13), 2010. <http://doi.org/10.1039/b704420h>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6),

3670–3695. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

- Chang, S., Chen, W., & Yang, J. (2009). Another formula for calculating the gene change rate in real-time RT-PCR. *Molecular Biology Reports*, 36(8), 2165–2168. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9430-1>
- Deacon, J. (2006). *Fungal Biology. Journal of Chemical Information and Modeling* (4a ed., Vol. 53). Oxford: Blackwell Publishing. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Demain; Arnold. (1986). Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure and applied chemistry*, 58, 219–226. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
- Donoghue, A. J. O., Knudsen, G. M., Beekman, C., Perry, J. A., & Johnson, A. D. (2015). Correction for O'Donoghue et al., Destructin-1 is a collagen-degrading endopeptidase secreted by *Pseudogymnoascus destructans*, the causative agent of white-nose syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), E3152–E3152. <http://doi.org/10.1073/pnas.1509071112>
- Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., ... Skiniotis, G. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature*, 510(7506), 512–517. <http://doi.org/10.1038/nature13423>
- Esser, K. (2009). *The Mycota* (2a ed., Vol. 5). Berlin: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-87407-2>
- Fiechter, A., & Blakebrough, N. (1979). *Advances in Biochemical* (Vol. II).
- Figuerola, L., Jiménez, C., Rodríguez, J., Areche, C., Chávez, R., Henríquez, M., ... Vaca, I. (2015). 3-nitroasterric acid derivatives from an Antarctic sponge-derived *Pseudogymnoascus* sp. fungus. *Journal of Natural Products*, 78(4), 919–923. <http://doi.org/10.1021/np500906k>
- Gerke, J., & Braus, G. H. (2014). Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(20), 8443–8455. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-5997-8>
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., ... Vaca, I. (2014). Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 65–76. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x>
- Karlovsky, P. (2008). *Secondary Metabolites in Soil Ecology. In Vitro* (Vol. 14). Göttingen: Springer.
- Kaushal Kishore, R. S. G. (2015). Review Paper: Data Mining of Fungal Secondary Metabolites Using Genomics and Proteomics. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 6(3). <http://doi.org/10.4172/2153-0602.1000178>

- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, 3(12), 937–947. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., & Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 47(9), 736–741. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.003>
- Khan, A. A., Bacha, N., Ahmad, B., Lutfullah, G., Farooq, U., & Cox, R. J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(11), 859–870. <http://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0230>
- Kilpatrick S.T., Krebs J. E., G. E. S. (2014). *Eukaryotic Transcription Regulation. Lewin's GENES XI*.
- Klose, R. J., Sarraf, S. A., Schmiedeberg, L., McDermott, S. M., Stancheva, I., & Bird, A. P. (2005). DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Molecular Cell*, 19(5), 667–678. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.021>
- Kumar Gupta, V., Mach, R., & Sreenivasaprasad, S. (2015). *Fungal Biomolecules. Sources, Applications and Recent Developments (First)*. Chichester: Wiley Blackwell.
- Li, L., Li, D., Luan, Y., Gu, Q., & Zhu, T. (2012). Cytotoxic metabolites from the antarctic psychrophilic fungus *oidiodendron truncatum*. *Journal of Natural Products*, 75(5), 920–927. <http://doi.org/10.1021/np3000443>
- Li, Y., Sun, B., Liu, S., Jiang, L., Liu, X., Zhang, H., & Che, Y. (2008). Bioactive alicyclic acid derivatives from the antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 71(9), 1643–1646. <http://doi.org/10.1021/np8003003>
- Lorch, J. M., Lindner, D. L., Gargas, A., Muller, L. K., Minnis, A. M., & Blehert, D. S. (2013). A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia*, 105(2), 237–252. <http://doi.org/10.3852/12-207>
- Luo, Z., Ren, H., Moussa, J., Rangel, D., Zhang, Y., & Bruner, S. (2017). The PacC transcription factor regulates secondary metabolite production, stress response, but has only minor effects on virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 19, 788–802.
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., ... Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites.

- Annual Review of Genetics*, 50(1), 371–392. <http://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms. Igarss 2014* (14a ed.). Boston: Pearson. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- May, G. S., & Adams, T. H. (1997). The Importance of Fungi to Man. *Genome Research*, 7(11), 1041–1044. <http://doi.org/10.1101/gr.7.11.1041>
- Minnis, A. M., & Lindner, D. L. (2013). Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology*, 117(9), 638–649. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.07.001>
- Newman, D., & Cragg, G. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311–335. <http://doi.org/10.1021/np200906s.Natural>
- Palmer, J. M., & Keller, N. P. (2010). Secondary metabolism in fungi: Does chromosomal location matter? *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 431–436. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2010.04.008>
- Peláez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 981–990. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.010>
- Raudabaugh, D. B., & Miller, A. N. (2013). Nutritional Capability of and Substrate Suitability for *Pseudogymnoascus destructans*, the Causal Agent of Bat White-Nose Syndrome. *PLoS ONE*, 8(10), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0078300>
- Reynolds, H. T., Barton, H. A., & Slot, J. C. (2016). Phylogenomic analysis supports a recent change in nitrate assimilation in the White-nose Syndrome pathogen, *Pseudogymnoascus destructans*. *Fungal Ecology*, 23, 20–29. <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.010>
- Reynolds, H. T., Ingersoll, T., & Barton, H. A. (2015). MODELING THE ENVIRONMENTAL GROWTH OF *PSEUDOGYMNOASCUS DESTRUCTANS* AND ITS IMPACT ON THE WHITE-NOSE SYNDROME EPIDEMIC. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), 318–331. <http://doi.org/10.7589/2014-06-157>
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146–167. <http://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*,

13(8), 509–523. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3496>

- Sbaraini, N., Guedes, R. L. M., Andreis, F. C., Junges, Â., de Moraes, G. L., Vainstein, M. H., ... Schrank, A. (2016). Secondary metabolite gene clusters in the entomopathogen fungus *Metarhizium anisopliae*: genome identification and patterns of expression in a cuticle infection model. *BMC Genomics*, *17*(S8), 736. <http://doi.org/10.1186/s12864-016-3067-6>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*(1), 3. <http://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, *7*(2), 285–295. [http://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00020-6](http://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6)
- Smith, S., & Tsai, S.-C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports*, *24*(5), 1041–1072. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Staunton, J., & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, *18*(4), 380–416. <http://doi.org/10.1039/a909079g>
- Strauss, J., & Reyes-Dominguez, Y. (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(1), 62–69. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.07.009>
- Strieker, M., Tanović, A., & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: Structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, *20*(2), 234–240. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.009>
- Tian, Y., Li, Y. L., & Zhao, F. C. (2017). Secondary metabolites from polar organisms. *Marine Drugs*, *15*(3). <http://doi.org/10.3390/md15030028>
- Vandermolen, K. M., Raja, H. A., El-Elmat, T., & Oberlies, N. H. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, *3*(71), 1–7. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-3-71>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management (2015)*, *40*(4), 277–83. <http://doi.org/Article>
- Verant, M. L., Boyles, J. G., Waldrep, W., Wibbelt, G., & Blehert, D. S. (2012). Temperature-Dependent Growth of *Geomyces destructans*, the Fungus That Causes Bat White-Nose Syndrome. *PLoS ONE*, *7*(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046280>

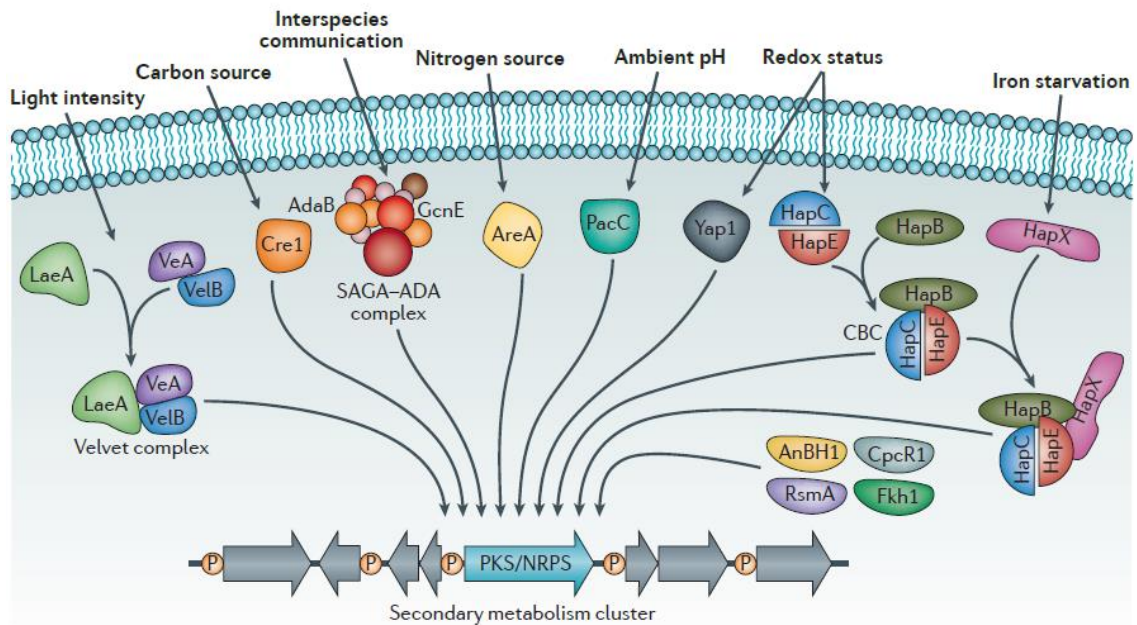
- Wang, J., Wei, X., Qin, X., Tian, X., Liao, L., Li, K., ... Liu, Y. (2016). Antiviral Merosesquiterpenoids Produced by the Antarctic Fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis* SCSIO 05702. *Journal of Natural Products*, 79(1), 59–65. <http://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00650>
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E., & Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 6(11), 1895–1897. <http://doi.org/10.1039/b804701d>
- Witzany, G. (2013). *Biocommunication of fungi. Biocommunication of Fungi.* <http://doi.org/10.1007/978-94-007-4264-2>
- Yin, W., & Keller, N. P. (2011). Transcriptional Regulatory Elements in Fungal Secondary Metabolism. *The Journal of Microbiology*, 49(3), 329–339. <http://doi.org/10.1007/s12275-011-1009-1>
- Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. *Nat. Prod. Rep.*, 33(8), 988–1005. <http://doi.org/10.1039/C6NP00025H>

Anexos

ANEXO A

Ejemplo de factores de la regulación global de BGCs en hongos filamentosos

Ilustración 7. Proteínas involucradas en la regulación global de la expresión de clústeres genéticos de metabolitos secundarios en diferentes hongos. Tomado de (Brakhage, 2013).



ANEXO B

Medios de cultivo

Tabla 8. Composición medio de cultivo CYA.

CYA	
K ₂ HPO ₄	1.0g
Solución Czapek*	10.0 mL
Extracto de levadura	5.0g
Sacarosa	30.0g

*Solución Czapek: NaNO₃ (30.0 g); KCl (5.0 g); MgSO₄ · 7H₂O (5.0 g) FeSO₄ · 7H₂O (0.1 g) ZnSO₄ · 7H₂O (0.1 g); CuSO₄ · 5H₂O (0.05 g); Agua destilada (1.0 L).

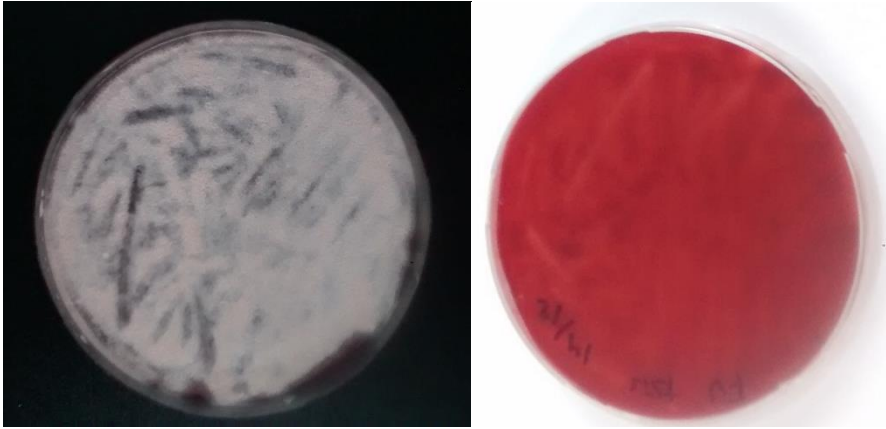
Tabla 9. Composición del medio de cultivo PDA

PDA	
Extracto de papa	4g
Dextrosa	20g
Agar	15g

ANEXO C

Hongo *Pseudogymnoascus sp.* en medio sólido PDA

Ilustración 8. Crecimiento del hongo filamentosos *Pseudogymnoascus sp.* en medio PDA. Anverso (izq.) Reverso (Der.).



ANEXO D

Cálculos para el experimento con el remodelador de cromatina 5-AZA

La realización de este experimento requiere de la preparación de una solución stock de 5AZA a una concentración de 10 mg/ mL en DMSO.

Condición 1: Adición de 50 μ M de remodelador al inicio de la fermentación (0.061 mL de solución stock+ 0.549 mL de DMSO).

Condición 2: Adición de 50 μ M de remodelador a los X días de iniciada la fermentación. (0.061 mL de solución stock+ 0.549 mL de DMSO).

Condición 3: Adición de 500 μ M de remodelador al inicio de la fermentación. (0.61 mL de solución stock)

Condición 4: Adición de 500 μ M de remodelador a los X días de iniciada la fermentación. (0.61 mL de solución stock)

Control 1: Adición de 0.61 mL de DMSO al inicio de la fermentación.

Control 2: Adición de 0.61 mL de DMSO a los X días de iniciada la fermentación.

Control 3: Sin adición de ninguna sustancia en todo el proceso de fermentación.

ANEXO E

Ilustración 9. Gel de electroforesis. Control 1: Adición de DMSO al inicio de la fermentación sin remodelador.

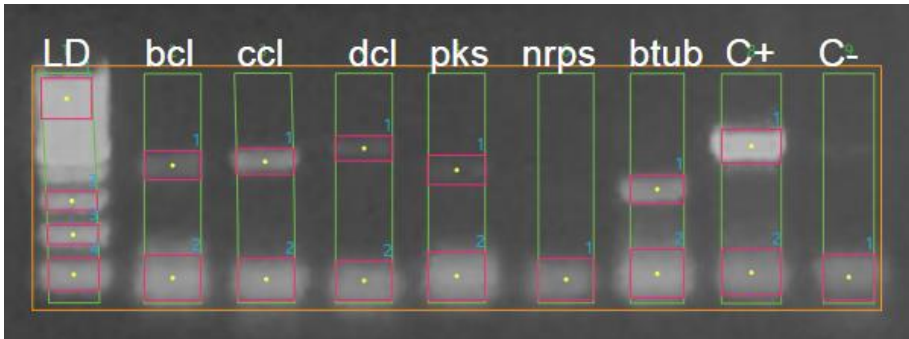


Ilustración 10. Gel de electroforesis. Control 2: Adición de DMSO a los 7 días de la fermentación sin remodelador.

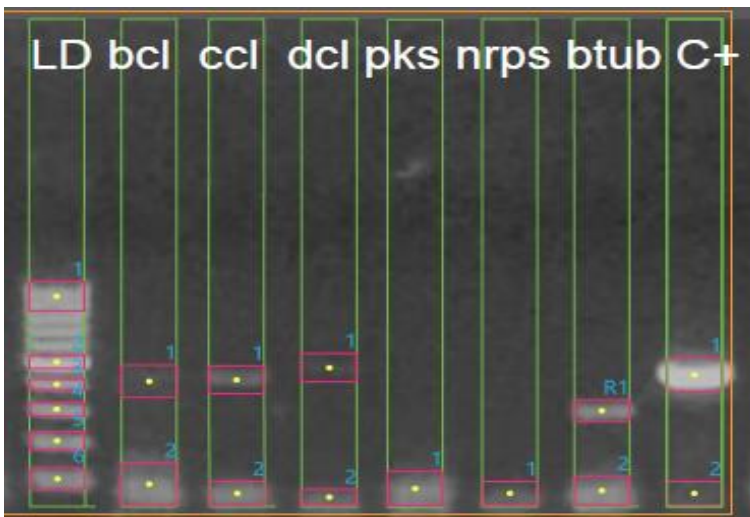


Ilustración 11. Gel de electroforesis. Control 3: Sin adición de DMSO ni remodelador.

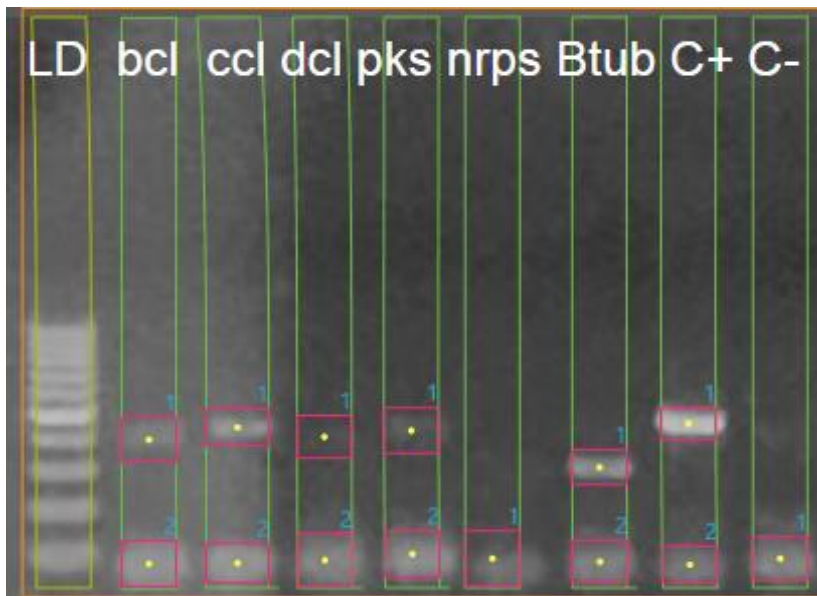


Ilustración 12. Gel de electroforesis. Tratamiento 1 (izq.) Adición de de 50 uM de remodelador al día cero de la fermentación

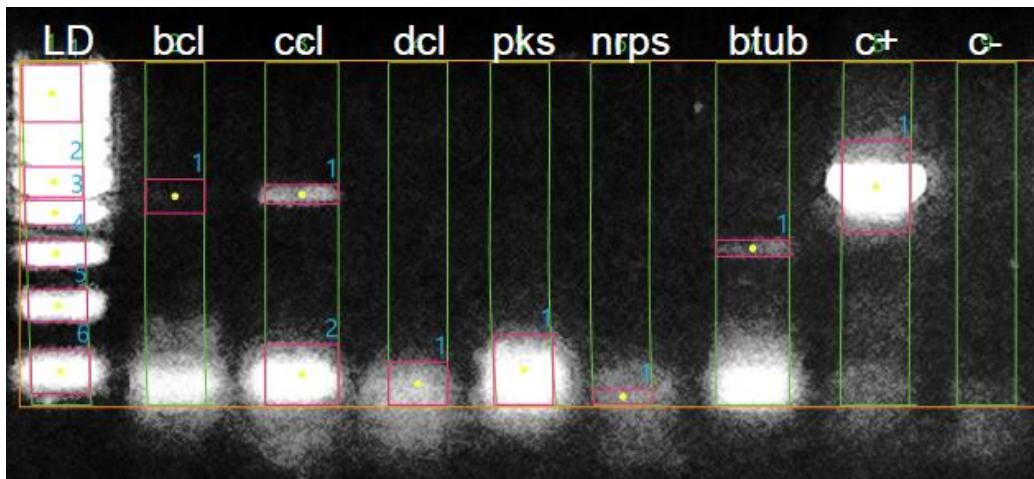


Ilustración 13. Gel de electroforesis. Tratamiento 1 (izq.) Adición de de 50 uM de remodelador al día siete de la fermentación.

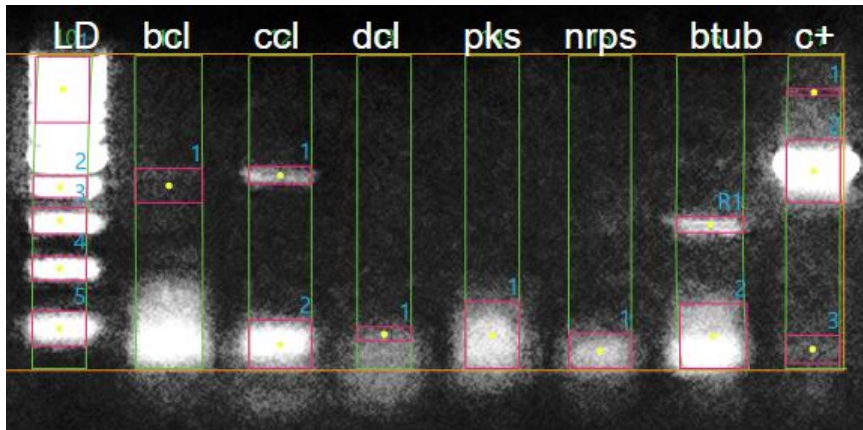


Ilustración 14. Gel de electroforesis. Tratamiento 3: Adición de 500 uL del remodelador al inicio de la fermentación.

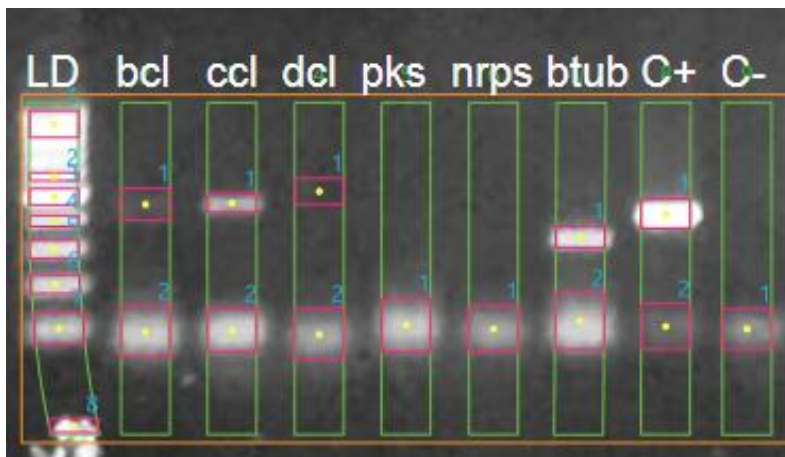


Ilustración 15. Gel de electroforesis. Tratamiento 4: Adición de 500 uL del remodelador a los 7 días de la fermentación

