



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN

**“Determinación y caracterización de
actividad proteolítica de *Aspergillus flavus*”**

T E S I S

Para obtener el título de

Médica Veterinaria Zootecnista

Presenta

Daniela Gama Aguayo

Asesor

cDr. Gerardo Alberto Ramírez Rico

Coasesores

Dr. Juan Omar Hernández Ramírez

Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya

CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.
DE TITULACIÓN

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**.

Determinación y caracterización de actividad proteolítica de Aspergillus flavus

Que presenta la pasante: **Daniela Gama Aguayo**.

Con número de cuenta: **417072713** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	M. en C. Gerardo Alberto Ramírez Rico	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	
2do. SUPLENTE	M. en C. María del Carmen Lili Muñoz Rivera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

DEDICATORIAS

A mis padres Liliana y Marco

Por todo el apoyo y amor incondicional que me han regalado a lo largo de toda la vida. Gracias por todas sus enseñanzas y sacrificios. Las palabras nunca serán suficientes para mostrarles el agradecimiento por todo lo que han hecho por mí, que hoy en día me ha permitido llegar hasta aquí. Espero hacerlos sentir orgullosos, todo se los debo a ustedes. Este logro es de los tres, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Malcom

Por estar ahí siempre, por intentar entenderme y apoyarme como solo un hermano puede hacerlo, en todas esas veces parece que somos tú y yo contra el mundo. Gracias por compartir tantas alegrías, risas, tristezas, llantos y locuras conmigo, porque nadie me entiende como tú. La vida jamás podría haberme regalado una mejor persona que tú para acompañarme en el camino, eres y siempre serás mi persona favorita en todo el mundo. Te amo con todo mi corazón.

A mis abuelitos Aurora y Javier

Por su amor, apoyo y enseñanzas. Abue, cómo me hubiera gustado que estuvieras aquí para acompañarme en este logro, pero a pesar de que no estes aquí físicamente espero hacerte sentir orgullosa. Te prometí que lo lograría, gracias por inspirarme y apoyarme hasta el último momento. Te llevo siempre en mi corazón. Gracias abuelito por ser una gran inspiración para mí, por compartirme tus vivencias e historias, por enseñarme que el trabajo duro y perseverancia es la forma de alcanzar nuestras metas. Los amo muchísimo.

A mi abuelita Eva

Por inspirarme a ser una mujer de ciencia. Aún recuerdo que fue contigo que conocí por primera vez un el laboratorio y usé un microscopio. Gracias por ser una gran inspiración en mi vida, por impulsarme a seguir una carrera universitaria y demostrarme que con esfuerzo, dedicación y estudio se puede llegar muy lejos. Algún día espero ser tan grande, exitosa e inteligente como tú.

Al Departamento de Patología de FES Cuautitlán

Por depositar su confianza en mí y mostrarme el apoyo desde el primer día que tuve oportunidad de pertenecer al departamento. Gracias a todos por su paciencia, consejos y enseñanzas. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo. Espero algún día poder llegar a ser al menos una fracción de lo que son ustedes, son todos una enorme inspiración para mí.

A Mara y Jesús

Por haberme acompañado en este camino, Me llena saber que los tres lo hemos logrado, después de tantas noches de desvelo y esfuerzos incontables. Gracias a ustedes la carrera ha sido una de las mejores etapas de mi vida, siempre me sentiré tan afortunada de haberla disfrutado a su lado. Gracias por todas las risas y llantos compartidos, gracias por su compañía, complicidad, cariño y amistad a lo largo de estos años, por estar en los buenos y malos momentos. Por escuchar todas mis quejas y frustraciones, y siempre saber cómo levantarme, jamás lo habría logrado sin ustedes y su apoyo. Serán mis personas para toda la vida, ustedes saben cuánto los amo.

A Madara, Piccolo y Koneko

Por recordarme por qué elegí esta carrera y acompañarme en las alegrías y tristezas que viví en este camino. Por ser mi única compañía en mis noches de desvelo, por ser mis modelos anatómicos y primeros pacientes. Gracias por regalarme su cariño y lealtad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Gerardo

Por depositar su confianza en mí para este trabajo e invitarme a participar en esta investigación. Desde que tuve oportunidad de tomar clase con usted, siempre ha sido una gran inspiración como profesor e investigador. Gracias por mostrarme un enfoque diferente dentro de la Patología y acercarme a la ciencia. Gracias por todas sus enseñanzas y consejos a lo largo de este proceso. Gracias por todo, espero usted esté orgulloso de este trabajo también.

A mi co-asesor, el Dr. Omar

Por todo su apoyo, sus enseñanzas y la confianza depositada en mí. Por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir como en casa. Llegar a su laboratorio ha sido una de las mejores oportunidades que he tenido y estoy infinitamente agradecida con todo lo que me ha enseñado. Gracias por su paciencia y comprensión, así como por también jalarme las orejas cuando ha sido necesario. Gracias por impulsarme a superarme cada día, gracias por acercarme al mundo de la ciencia en invitarme a seguir este camino. Usted es una gran inspiración para mí en todos los aspectos, sus enseñanzas, consejos y apoyo han sido muy importantes para mi crecimiento personal y académico. Gracias por todo.

A mi coa-sesora, la Dra. Mireya

Por haber confiado en este proyecto, por su apoyo y colaboración. Por haberme permitido realizar algunos experimentos dentro su laboratorio. Gracias por compartir sus conocimientos y observaciones que sin duda enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Ernesto Marin

Sin duda alguna uno de los mejores profesores que tuve en la carrera, fue gracias a usted que nació mi interés en la Patología, desde entonces usted ha sido una gran inspiración. Aún recuerdo aquella vez que le compartí mi inquietud por la investigación y cómo no sabía cómo iniciar o si sería capaz. A partir de ese día sus palabras y enseñanzas fueron una gran motivación para continuar buscando este camino. Gracias por todo su apoyo.

A Abigail

Que aunque no estuviste conmigo desde el inicio, una vez que llegaste al laboratorio tu compañía y amistad ha sido muy valiosa para mí y me ha ayudado mucho a finalmente concluir este proceso. Gracias por estar ahí para apoyarme, escuchar mis quejas, reclamos y festejar mis logros. Espero verte pronto también concluyendo tu proyecto. Gracias por todo.

A los miembros del jurado

Por su atención y colaboración en este proceso. Gracias por sus valiosas observaciones y comentarios, así como su interés por que este trabajo concluyera de la mejor forma.

Al laboratorio 52 de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)

Por su colaboración y apoyo con material que permitió la realización de los trabajos experimentales de este proyecto.

A todos los profesores y doctores que compartieron sus conocimientos y experiencias conmigo a lo largo de la carrera y mostraron su apoyo en este proceso de titulación. Muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Antecedentes	7
1.2 Generalidades de los hongos	7
1.3 El género <i>Aspergillus</i>	8
1.4 <i>Aspergillus flavus</i>	9
1.4.1 Morfología.....	9
1.4.2 Biología	11
1.4.3 Nutrición	13
1.4.4 Vigor	14
1.4.5 Aflatoxinas	15
1.5 Aspergilosis.....	17
1.5.1 Aspergilosis en animales	18
1.5.2 Aspergilosis humana	20
1.6 Impacto de la aspergilosis por <i>A. flavus</i> en la salud humana y animal	24
1.7 Patogenia.....	26
1.8 Factores de virulencia.....	27
1.9 Proteasas.....	28
1.9.1 Clasificación de las proteasas.....	28
1. 10 Proteasas de <i>A. flavus</i>	32
1.10.1 Serinaproteasas de <i>A. flavus</i>	33
1.10.2 Metaloproteasas de <i>A.flavus</i>	35
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo General	39
4.2. Objetivos Particulares	39
5. METODOLOGÍA.....	40
5.1. Cultivo del hongo y obtención de muestras	40
5.2. Cuantificación de proteína	42
5.3. SDS-PAGE.....	42

5.4. Zimografía.....	43
5.5. Caracterización bioquímica de proteasas de <i>A. flavus</i>	43
5.6. Rompimiento de estructuras fúngicas por choque térmico.	44
6. RESULTADOS	45
6.1. Curva de producción de esporas.....	45
6.2. Cuantificación de proteína total en muestras de SN cultivos de <i>A. flavus</i> en grano de maíz y CPD.....	48
6.3. SDS-PAGE.....	49
6.3.2 Perfil proteico de SN de cultivos de <i>A. flavus</i> en CPD	51
6.4. Zimografía.....	51
6.4.1 Zimografía de SN de cultivos de <i>A. flavus</i> en grano de maíz.....	53
6.4.2 Zimografía de SN de cultivos de <i>A. flavus</i> en CPD	60
6.5. Caracterización bioquímica de proteasas de <i>A. flavus</i>	65
6.5.1 Caracterización bioquímica de proteasas en SN de cultivos en grano de maíz.....	65
6.5.2 Caracterización bioquímica de proteasas en SN de cultivos en CPD.....	68
6.6. Rompimiento de estructuras fúngicas por choque térmico	71
6.6.1 Ensayos preliminares de las muestras de EXT de grano de maíz después del tratamiento de choque térmico	73
7. DISCUSIÓN	77
8. CONCLUSIONES	91
8.1 Conclusiones particulares.....	91
9. PERSPECTIVAS.....	93
10. REFERENCIAS	94

RESUMEN

Aspergillus flavus es uno de los principales hongos patógenos de importancia para la salud humana y animal; esta facultad se asocia con su capacidad de sintetizar diversos factores de virulencia tales como las proteasas. Ante la carencia de información específica sobre la actividad proteolítica de esta especie, en este trabajo se evaluó la actividad de las proteasas de secreción de *A. flavus* para degradar colágeno cuando crece en medios que proveen sustratos similares a los de su ambiente natural. El hongo fue cultivado en grano de maíz blanco y caldo papa-dextrosa (CPD) durante 10 días. Se elaboró una cinética de producción de esporas para la evaluación del vigor del hongo cada 24 h. El sobrenadante fue analizado mediante zimografía, donde se identificaron proteasas activas de diferente peso molecular en diferentes tiempos de crecimiento, temperatura y pH. La caracterización bioquímica se realizó empleando los inhibidores EDTA, 1,10-fenantrolina, PMSF y PHMB a diferentes concentraciones y valores de pH. En los cultivos de grano se identificaron seis proteasas de 250, 80, 45, 28, 25, y 15 kDa, mientras que en los cultivos de CPD se identificaron tres proteasas de 250, 65 y 55 kDa, algunas dependientes de pH. Debido a esto, las actividades proteolíticas son dependientes del medio en donde crece el hongo. Además, se observó la inhibición de todas las proteasas con PHMB; sin embargo, también se encontró inhibición con agentes quelantes (EDTA y 1,10-fenantrolina). Con base a estos resultados se concluye que las proteasas identificadas corresponden a cisteína-proteasas; sin embargo, se demostró la existencia de posibles iones involucrados en el sitio catalítico, probablemente de Zn y Ca. Estas proteasas podrían ser secretadas *in vivo* durante el proceso infeccioso e intervenir durante la patogenia de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las infecciones causadas por especies de *Aspergillus* han ganado importancia en los últimos años. Mientras la mayoría de las infecciones por *Aspergillus* spp son causadas por *A. fumigatus*, la mayoría de los estudios se han centrado en esta especie y nuestro conocimiento de otras especies de *Aspergillus* como *A. flavus* dista de ser satisfactorio (1).

El género *Aspergillus* ha sido ampliamente estudiado en los últimos años debido a su distribución cosmopolita, sus cepas pueden aislarse prácticamente de cualquier superficie. *A. flavus*, miembro de la sección *Flavi* es una de las especies en las que se ha identificado actividad patogénica y capacidad alérgica, además de ser una de las principales especies productoras de toxinas.

A. flavus es la segunda causa principal de aspergilosis invasiva y no invasiva en humanos y diversas especies animales. Además, es la principal especie de *Aspergillus* que infecta a los insectos y también es capaz de causar enfermedades en cultivos de importancia económica, como el maíz y el maní, produciendo potentes micotoxinas.

A. flavus causa enfermedad en animales y humanos, ya sea por el consumo de alimentos contaminados (causando aflatoxicosis y/o cáncer de hígado) o por un crecimiento invasivo, que a menudo es fatal en individuos inmunodeprimidos (2).

1.2 Generalidades de los hongos

Los hongos tienen estructuras vegetativas filamentosas llamadas hifas, las cuales crecen en forma de largos brazos en toda dirección; estas son generalmente uniformes y

delgadas con diámetros de 1 a 2 μm ., aunque en algunos hongos pueden alcanzar hasta 100 μm . de grosor. El conjunto de hifas o micelio dan origen a los talos o a las colonias del hongo.

El color del hongo aparece cuando se forman las estructuras reproductivas, las cuales contienen grandes cantidades de esporas que son las responsables de la diseminación.

La mayoría de las hifas de los hongos son estructuras tubulares con crecimiento polarizado en el ápice. El protoplasma del hongo está limitado por una membrana plasmática que se encuentra delineando la pared celular y produciendo la presión de turgencia del citoplasma. Esta membrana está compuesta de lípidos, proteínas y pequeñas cantidades de carbohidratos; los fosfolípidos son los componentes más importantes de la membrana.

Aunque la pared celular protege, también se ha observado actividad de algunas enzimas importantes en los procesos de infección. Esta es una estructura que tiene diferente composición de acuerdo con los estadios del ciclo de vida, por ejemplo, la pared de las esporas es delgada pero más resistente que las paredes de las hifas que están en crecimiento (3).

1.3 El género *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen al reino *Fungi*, phylum *Ascomycota*, clase *Eurotiomycetes* y orden *Eurotiales*, caracterizado por la producción de esporas asexuales. Este género fue descrito por primera vez por el biólogo italiano Pietro Micheli en 1729 en la ciudad de Florencia, recibiendo este nombre en comparación con el reordenamiento de esporas con un instrumento utilizado en la iglesia católica para rociar agua bendita, el “*aspergillum*”.

El género *Aspergillus* pertenece a la familia *Aspergillaceae*, genéticamente cercano al género *Penicillium*, géneros cuyos miembros tienen aplicaciones biotecnológicas cruciales en la actualidad (4).

A partir de 2015, se han incluido un total de 344 especies en *Aspergillus*. Para la identificación y clasificación de *Aspergillus*, se utilizan los detalles morfológicos de conidióforo y/o cleistotecio (cuerpos fructíferos sexuales), células de Hulle (células proveedoras de nutrientes para la cleistotecio) o esclerocios (estructura de preparación para el invierno) (5, 6).

1.4 *Aspergillus flavus*

A. flavus es un hongo común del suelo y plantas, a menudo coloniza semillas ricas en aceite como maíz, maní, semillas de algodón y nueces de árbol (almendras y pistaches), así como otros cultivos como cebada, trigo y arroz.

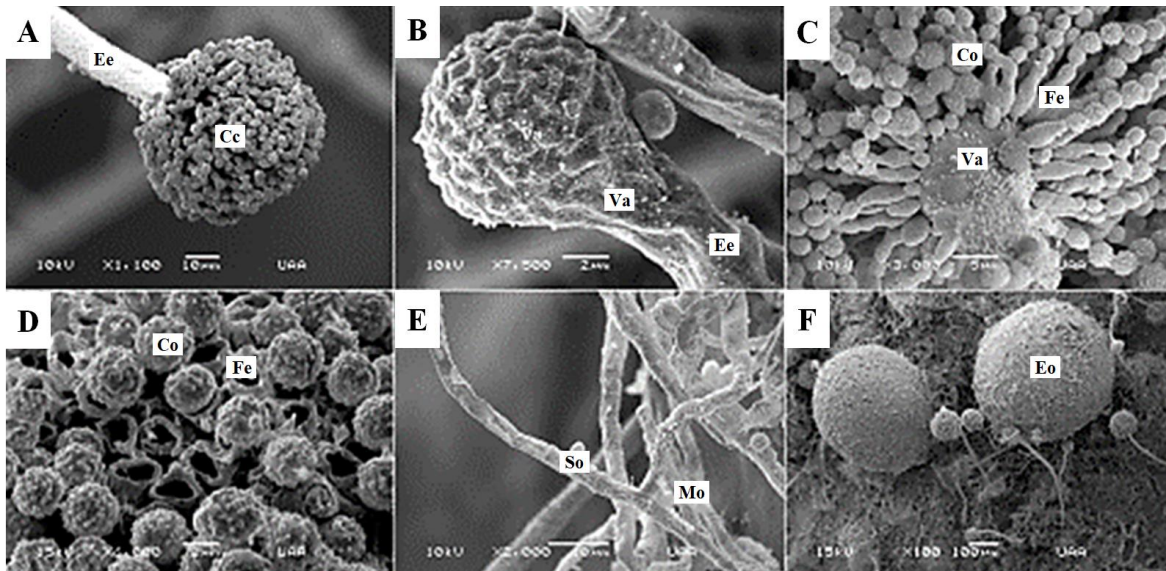
A. flavus es un patógeno oportunista de animales y humanos, particularmente en individuos inmunodeprimidos. La infección por *A. flavus* se ha convertido en la segunda causa principal de aspergilosis humana después de *Aspergillus fumigatus*. Debido a su naturaleza omnipresente, *A. flavus* se ha aislado de una amplia variedad de alimentos incluyendo pasas, lima agria, granos de cacao, productos cárnicos secos ahumados, jamón curado, pescado seco salado y especias (7).

1.4.1 Morfología

La morfología de *A. flavus* es típica del género *Aspergillus*, posee como característica distintiva la estructura portadora de esporas (5). La cabeza conidial consiste en una vesícula hinchada que contiene una o dos capas de células especializadas formadas

sincrónicamente. Las células especializadas conidiogénicas que llevan las esporas asexuales (conidios) se denominan fiálides. Una cabeza conidial con solo fiálides se denomina uniseriada. Cuando hay una segunda capa de células estériles especializadas (métulas) entre la vesícula y la fialide, la cabeza conidial se denomina biseriada. Existen cepas uniseriadas, pero la mayoría son biseriadas. La cabeza conidial se apoya en un estípote largo, cuya parte basal forma la "célula del pie" característica de *Aspergillus* spp. Las estructuras que apoyan la formación de conidios (célula del pie, estípote, vesícula, métulas, fiálides) se denominan colectivamente conidióforo. Sus conidióforos son de aspecto rugoso con conidios globosos lisos de entre 3 y 6 μm ., dispuestos de forma radiada. Estas estructuras pueden ser fácilmente observadas en un campo microscópico al extraer muestras de placas de cultivo (7) . Las características morfológicas de *A. flavus* pueden observarse en la **Imagen 1**.

Imagen 1. Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*.



A) Cc: Cabeza conidial, Ee: Estípote; B) Va: Vesícula, Ee: Estípote; C) Conidióforo, Fe: Fiálides, Co: Conidio, Va: Vesícula ; D) Cc: Conidio, Fe: Fialide; E) Mo: Micelio, So: Septo; F) Eo: Esclerocio.

Foto modificada de Rangel-Muñoz, 2020. (8)

Otras estructuras encontradas en *Aspergillus* incluyen las células de Hülle, que son células de paredes gruesas frecuentemente asociadas con el cleistotecio y los esclerocios, los cuales son masas asexuales endurecidas de hifas capaces de permanecer latentes en el suelo durante largos períodos para hacer frente a entornos hostiles hasta que las condiciones sean favorables para el crecimiento (7).

En placas de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), agar Czapek con extracto de levadura (CYA) y agar extracto de malta (MEA), *A. flavus* forma colonias de color amarillo verdoso de rápido crecimiento que suelen alcanzar entre 60 y 70 mm. de diámetro después de 7 días de crecimiento a 25-30 °C; el crecimiento también es rápido a 37 °C. El estípito del conidióforo suele tener entre 400 y 800 µm. de longitud y paredes rugosas que generalmente no están coloreadas. Las vesículas son casi globosas y de 20 a 45 µm. de diámetro. La seriación es variable, pero por lo general al menos el 20% de las cabezas de los conidios producen metulas y fiálides (biseriadas) en CYA. Los conidios son globosos a elipsoidales, en su mayoría de 3 a 6 µm. de ancho, con paredes lisas a finamente rugosas y algunos aislamientos producen esclerocios negros (7).

1.4.2 Biología

Los hongos crecen mejor en un hábitat oscuro, y necesitan humedad para su desarrollo, la cual obtienen de la atmósfera o del medio sobre el cual crecen. Cuando el ambiente se hace demasiado seco o las condiciones para su desarrollo son adversas, sobreviven entrando en latencia o produciendo esporas resistentes a la deshidratación (3).

Para las conidias de *A. flavus*, la germinación de una spora fúngica es el primer paso crucial desde el propágulo asexual hasta el crecimiento del micelio vegetativo metabólicamente activo capaz de producir enzimas y aflatoxinas, que provoca la

contaminación y el deterioro de forrajes y alimentos. Tan pronto como una espora fúngica se expone a condiciones favorables, pasa de una célula latente a una de metabolización activa, que después de una secuencia ordenada de pasos, da lugar a la formación de un micelio visible (9).

Las transiciones de la germinación de conidios se reconocen en tres etapas diferentes: conidios latentes, crecimiento isotrópico y crecimiento polarizado. Cada etapa tiene sus propias características morfológicas únicas (10).

Los conidios latentes germinan cuando se complementaron con nutrientes flexibles como azúcares, sal inorgánica y fuentes de nitrógeno en la mayoría de las cepas de *A. flavus*. Sin embargo, los tiempos de germinación dependen de las diferentes condiciones de cultivo y variaciones en las diferentes cepas de este hongo (9).

Tras la activación de la germinación, la absorción de agua conduce a un aumento de la presión osmótica intracelular. Durante esta etapa, el primer cambio morfológico en la germinación de los conidios implica la hinchazón, con el diámetro de la espora aumentando dos veces o más. La fase de hinchamiento de los conidios también se denomina crecimiento isotrópico. La hinchazón es concomitante con muchas actividades metabólicas, como el metabolismo respiratorio, la biosíntesis de aminoácidos, la biosíntesis de proteínas, etc (10).

A los conidios hinchados les sigue un crecimiento polarizado que conduce a la formación de tubos germinativos. Una gran cantidad de actividades metabólicas de esta fase de crecimiento polarizado son las mismas que las que se encuentran en el crecimiento isotrópico y solo algunas actividades metabólicas especiales surgen en esta fase, como la formación del citoesqueleto y el sistema de tráfico de vesículas (10). La germinación de los

conidios se completa cuando la longitud del tubo germinativo es igual a la mitad del diámetro de la espora (11).

En etapas posteriores de desarrollo, el tubo germinativo crece cada vez más rápido y se produce la elongación y ramificación del tubo germinativo, que conduce a la aglomeración de hifas del hongo que forman micelios vegetativos y aéreos, donde a partir de las hifas que conforman a este último, se desarrollaran las estructuras reproductivas denominadas conidióforos. Eventualmente esta propagación del micelio dará forma a una colonia (9). Durante la fase de crecimiento polarizado, las aflatoxinas son el principal metabolito secundario secretado por las hifas (10).

Además del estado conidial típico (anamorfo) característico del género, algunas especies también se reproducen sexualmente y tienen un estado ascospórico (teleomorfo). La reproducción sexual se caracteriza por la formación de cleistotecios, que son ascocarpos (cuerpos fructíferos) indehiscentes que contienen numerosos ascos. Las ascas contienen meiosporas llamadas ascosporas. La etapa sexual de *A. flavus* se ha identificado recientemente como *Petromyces flavus*, donde se encontró que las ascosporas se desarrollan dentro de los esclerocios (12).

1.4.3 Nutrición

Los hongos son heterótrofos y muchos de sus componentes orgánicos los obtienen del sustrato en el cual crecen y se desarrollan. Existe un amplio rango de sustratos que el hongo puede utilizar como nutriente; aún así, antes de tomar los materiales que necesita debe degradar las células externas liberando enzimas hidrolíticas a través de las paredes celulares (enzimas constitutivas), las cuales están siempre presentes en las colonias en

crecimiento; otras se producen en respuesta a la presencia de determinado sustrato (enzimas inducidas).

El rompimiento o degradación de los nutrientes por la acción de las enzimas es extremadamente eficiente convirtiendo a los hongos en un grupo muy exitoso de organismos descomponedores. El uso de una amplia gama de cultivos ha permitido la explotación de las enzimas de los hongos con fines comerciales y para procesos industriales. Los hongos son muy eficientes en la conversión de su materia nutritiva en componentes celulares nuevos. Si disponen de suficiente materia nutricional son capaces de almacenarlas en los micelios, mientras que ciertos nutrientes excesivos son excretados hacia el medio circundante.

Las enzimas producidas por sus hifas sobre el sustrato permiten la hidrólisis de los nutrientes, que una vez que son convertidos en material soluble son absorbidos y transportados a través de la membrana y usados en procesos metabólicos para el crecimiento y desarrollo del hongo (3).

1.4.4 Vigor

Vigor es un término relativamente reciente que se relaciona con el nivel de actividad de la germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinativo, que dará lugar a la formación de nuevos conidióforos y sus esporas (13). El vigor de las esporas es un reflejo de su condición fisiológica y puede verse fuertemente influenciado por el sistema de fermentación y el procesamiento posterior. Por ejemplo, la fermentación puede afectar en gran medida el tipo y la cantidad de reservas de nutrientes almacenados en las esporas, lo que influye en la extensión de la germinación y el crecimiento de los tubos germinativos (14).

Un alto vigor es un rasgo común de los hongos patógenos y se ha identificado como un factor de virulencia en varias asociaciones huésped-patógeno (13).

El relativo éxito o fracaso del patógeno está determinado en parte por la cantidad de inóculo producido, la liberación del inóculo, la resistencia del inóculo a condiciones desfavorables y factores que afectan la germinación y el establecimiento del patógeno en el huésped. Una vez que se ha producido la infección, el patógeno tiene que esporular para continuar con su ciclo de vida. El medio ambiente juega un papel decisivo en la producción de esporas en un tiempo definido. El tiempo que transcurre entre la inoculación y la esporulación determina el número de germinaciones de esporas y naturalmente el número de generaciones producidas por estas esporas. Las esporas germinarán en forma de hifas las cuales crecerán, se alargarán y finalmente producirán nuevas esporas (15, 16).

Doran, 1992 encontró que las esporas de hongos patógenos empleadas para las pruebas de germinación son más fiables cuando se obtienen de un sustrato donde está produciendo infección que cuando se obtienen de hongos que crecen en medios artificiales. Una espora obtenida del huésped vivo presumiblemente posee todo su vigor natural, mientras que la espora obtenida de un hongo que crece en medios artificiales puede haber estado sujeta a una influencia debilitante o, por otro lado, puede haberse vuelto antinaturalmente resistente a condiciones adversas (17).

1.4.5 Aflatoxinas

Aspergillus flavus produce una variedad de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se incluyen ácido ciclopiazónico, aflatrem, aflavinina, ácido kójico, ácido aspergílico, ácido neoaspergílico, ácido b-nitropropiónico, paspalinina y particularmente las aflatoxinas.

La palabra “aflatoxina” proviene de "toxina de *Aspergillus flavus*", una de las especies predominantes responsables de la contaminación de los cultivos por aflatoxinas antes de la cosecha o durante el almacenamiento (18).

Las aflatoxinas representan una gran amenaza para humanos y animales debido al riesgo de las aflatoxinas para la salud humana y la productividad del ganado. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha designado a las aflatoxinas como carcinógenos hepáticos, siendo la aflatoxina B1 la de mayor importancia, ya que es el compuesto natural hepatocarcinogénico más tóxico y potente caracterizado hasta el momento (7, 19).

Además, las micotoxinas pueden causar efectos agudos y crónicos en una gran variedad de especies animales en sus distintos órganos, aparatos y/o sistemas. La contaminación por aflatoxinas de los productos agrícolas causa pérdidas económicas sustanciales y recurrentes en todo el mundo.

La producción de aflatoxinas es un proceso complejo que involucra muchas vías intermedias, genes, enzimas convertidoras y está regulado en múltiples niveles. Los genes que codifican las proteínas necesarias para las etapas oxidativa, reductora y reguladora de la biosíntesis se agrupan en una porción de 70 kb en la región subtelomérica del cromosoma III en el genoma de *A. flavus*.

La producción de aflatoxinas se ve afectada por factores nutricionales, como las fuentes de carbono, nitrógeno y los oligoelementos, además de factores ambientales, como el pH fisiológico, la temperatura, la actividad del agua, el estrés oxidativo y los volátiles producidos por las plantas hospedantes (7, 20).

1.5 Aspergilosis

La actividad patogénica de *A. flavus* no se reduce únicamente al efecto de las aflatoxinas que produce, sino también a su capacidad de infección y colonización de distintos tejidos, principalmente del tracto respiratorio de organismos vertebrados, denominada Aspergilosis (2).

Dixon y Walsh en 1992, manifestaron que la aspergilosis es el término empleado para las enfermedades causadas por el género *Aspergillus* en humanos o animales (21). *A. flavus* es uno de los agentes causales de la aspergilosis, junto con al menos otras 20 especies de *Aspergillus* (1).

El contacto con *Aspergillus flavus* se produce a través de la inhalación de sus esporas (conidios). Diariamente se inhalan abundantes conidios que alcanzan los alveolos pulmonares, donde en circunstancias normales su eliminación tiene lugar por células epiteliales de la vía aérea y fundamentalmente por macrófagos alveolares mediante fagocitosis. Este mecanismo es muy eficiente, pero no es el único que participa en el aclaramiento de los conidios inhalados. Tras reconocer determinados antígenos fúngicos de la pared celular, los macrófagos secretan mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento de neutrófilos que se adhieren a su superficie, provocando la lisis de los conidios al liberar radicales libres de oxígeno. Por otro lado, se da la activación de la inmunidad celular, que acompañado de la fagocitosis y lisis celular, forma parte de los mecanismos de la eliminación de hifas y en la constitución de la respuesta inmunológica (22).

Cuando *A. flavus* logra vencer estos mecanismos de defensa, puede producir cuadros clínicos pulmonares muy diferentes, que van desde un cuadro alérgico hasta las infecciones invasivas, que son de extrema gravedad y cursan con diseminaciones hematógenas (23).

1.5.1 Aspergilosis en animales

La aspergilosis se encuentra en casi todos los animales y aves domésticos, así como en muchas especies de vida silvestre. Generalmente se considera una infección respiratoria; sin embargo, la predilección por los tejidos varía entre las especies. Las presentaciones de la enfermedad características por especie incluyen el aborto micótico en bovinos; micosis de la bolsa gutural y queratitis micótica en caballos; infecciones de los tejidos nasales y paranasales, articulaciones y riñones de perros; e infección sinonasal, sino-orbitaria y pulmonar en gatos domésticos, donde los microorganismo prevalentes son *A. fumigatus* y *A. terreus*. En contraste con los mamíferos, las aves son particularmente susceptibles a la infección por *Aspergillus* spp. Las formas más comunes de aspergilosis son infecciones pulmonares en aves de corral y otras aves, donde se ha identificado a *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus* como las principales especies causantes de la enfermedad (24).

1.5.1.1 Aspergilosis aviar

La aspergilosis es una enfermedad de las aves domésticas y de vida libre causada por la infección de hongos del género *Aspergillus*, donde *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus* son los agentes etiológicos aislados con mayor frecuencia en especies aviares. Los conidios de *Aspergillus* spp. inhalados causan infección del tracto respiratorio y enfermedad sistémica en los órganos viscerales y el cerebro con el desarrollo de placas y nódulos caseosos de color blanco a amarillo en los tejidos, además del crecimiento de

moho gris verdoso en los alvéolos. Microscópicamente, las lesiones se caracterizan por inflamación granulomatosa asociada con hifas fúngicas (25) .

La enfermedad aguda, comúnmente conocida como “Neumonía de las criadoras”, se caracteriza por una alta morbilidad y mortalidad con signos respiratorios y neurológicos ocasionales en aves jóvenes. Se adquiere mediante la inhalación de esporas y la primera infección se origina en las nacedoras. Las esporas de *Aspergillus* spp. penetran a la cámara de aire del huevo por medio de pequeñas cuarteaduras, penetrando y generando crecimiento del hongo en la cámara de aire (cámara de aire fúngica) provocando que los huevos infectados se observen de color verde. La contaminación de las nacedoras, se origina cuando los huevos embrionados son abiertos durante la incubación o la eclosión. La aspergilosis en una nacedora puede ocurrir por los ductos de aire u otros equipos contaminados (25, 26).

Por otro lado, la enfermedad respiratoria crónica se observa con mayor frecuencia en aves de corral adultas y aves cautivas, como aves rapaces, pingüinos y loros. El material de cama y el alimento contaminado son fuentes reconocidas de exposición de las aves de corral a *Aspergillus* spp. Los niveles de humedad y el potencial de formación de polvo de la cama aumentan la exposición a hongos en el aire y aumentan el riesgo de infección. Por lo tanto, los niveles relativamente altos de temperatura, humedad, polvo y producción de amoníaco presentes en las granjas avícolas promueven el rápido crecimiento de las hifas y la eficiente multiplicación asexual, lo que da como resultado una abundante producción de conidios diseminados por el aire. Estos conidios son posteriormente dispersados e inhalados por las aves, y el riesgo de aspergilosis severa se correlaciona con la cantidad de conidios inhalados (25, 27).

1.5.2 Aspergilosis humana

Existen clasificaciones clínicas de la aspergilosis: alérgica (aspergilosis broncopulmonar alérgica), colonizadora (aspergilosis pulmonar crónica) e invasiva (pulmonar y extrapulmonar) (21). *A. flavus* es el segundo patógeno principal que causa aspergilosis invasiva y no invasiva después de *A. fumigatus* (1).

1.5.2.1 Aspergilosis broncopulmonar alérgica

La Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA) es una afección pulmonar caracterizada por una hipersensibilidad al hongo *Aspergillus* spp. que se asocia con la destrucción inflamatoria de la vía aérea. La signología clínica de la ABPA conlleva episodios recurrentes de obstrucción bronquial provocado por exudados mucosos oscuros y en ocasiones hemoptisis, acompañada de disnea. Las lesiones observables en pulmones suelen mostrar infiltrados en el parénquima de lóbulos craneales, atelectasias y bronquiectasias, y en cuadros crónicos es posible observar fibrosis (23).

La patogénesis de la ABPA es una reacción compleja de hipersensibilidad. En individuos con esta manifestación existe un incremento en la respuesta Th2 de los linfocitos CD4 como respuesta a los antígenos de *Aspergillus* spp. a nivel broncoalveolar y sistémico, con un incremento de la producción de interleucinas 4, 5 y 13. Esto conlleva un incremento de la eosinofilia y de los niveles séricos de IgE (22).

1.5.2.2 Aspergilosis pulmonar crónica

La aspergilosis pulmonar crónica incluye varios cuadros clínicos, como el aspergiloma, la aspergilosis crónica cavitada, la aspergilosis crónica fibrosante y la aspergilosis crónica necrotizante. La duración de los signos en estos cuadros es superior a tres meses. Suelen afectar a pacientes inmunocompetentes o con inmunosupresión débil, por lo que es

bastante característico que presenten anticuerpos séricos frente a *Aspergillus* spp., a diferencia de los pacientes con aspergilosis invasiva, severamente inmunodeprimidos.

El aspergiloma es una pelota fúngica compuesta por hifas, fibrina, moco y detritus celulares que anidan o colonizan una cavidad pulmonar previa.

La aspergilosis crónica cavitada (anteriormente denominado aspergiloma complicado) afecta a pacientes inmunocompetentes que desarrollan una o más cavidades durante varios meses, habitualmente en lóbulos superiores y si progresan pueden llegar a desarrollar formas crónicas fibrosantes (22).

La aspergilosis crónica necrotizante suele afectar a pacientes con algún grado de compromiso inmunológico. Tiene una presentación no tan crónica (semanas más que meses), por lo que algunos prefieren denominarla como aspergilosis pulmonar subaguda (23).

1.5.2.3 Aspergilosis invasiva

Desde un punto de vista histológico, la aspergilosis invasiva (AI) produce disrupción de planos tisulares e invasión vascular por adhesión de componentes de la superficie celular fúngica a los componentes de la pared vascular, incluida la membrana basal, la matriz extracelular y los constituyentes celulares; esto produce infarto e isquemia de estructuras distales (22).

Las formas clínicas locales más frecuentes de AI tienen lugar a nivel pulmonar y en los senos paranasales, aunque también pueden afectar a otros tejidos por angio-invasión o por inoculación directa (23).

1.5.2.4 Aspergilosis invasiva pulmonar

La aspergilosis pulmonar puede cursar con una signología inespecífica, donde es común observar fiebre, dolor pleural y hemoptisis. La aspergilosis pulmonar suele presentar uno o múltiples nódulos, con o sin cavitación, con consolidación segmentaria o infiltrado peribronquial o derrame pleural. El tejido pulmonar refleja hemorragia y edema circundante a las zonas de lesión. Pueden observarse engrosamiento de la vía aérea, infiltrados multifocales o nódulos centrolobulares. Se han descrito diferentes patrones: la aspergilosis bronquial obstructiva se asocia con la producción de tapones mucosos producidos por crecimiento de hifas en la vía aérea, pero con poca afectación mucosa o invasión; la traqueobronquitis ulcerativa expresa una invasión focal de la mucosa traqueobronquial y/o cartílago por hifas, en tanto que la traqueobronquitis pseudomembranosa se caracteriza por una extensa inflamación e invasión del árbol traqueobronquial con presencia de pseudomembranas y detritus necróticos sobre la mucosa bronquial (23). Si existe angio-invasión, *Aspergillus* spp. se puede diseminar más allá del tracto respiratorio y afectar piel, sistema nervioso central (SNC), ojos, hígado, riñones y otras estructuras (22).

1.5.2.5 Aspergilosis invasivas extrapulmonares

A nivel de senos paranasales, *Aspergillus* spp. puede presentarse en pacientes con grados de inmunosupresión menor; sin embargo, la extensión rino-orbitaria suele ser característica de pacientes con neutropenias prolongadas, en los cuales la neutropenia puede justificar una ausencia de reacción inflamatoria y predominar los fenómenos necróticos. Las lesiones presentes suelen ser focales, donde se observa erosión ósea o engrosamientos de la mucosa sinusal. Si se afecta la órbita pueden asociarse signos oculares (proptosis, equimosis,

parálisis oculomotora o ceguera por trombosis de la arteria central de la retina). La infección puede extenderse al seno cavernoso, produciendo trombosis del mismo y extensión al SNC. La aspergilosis del SNC puede observarse en el contexto de enfermedad diseminada o como extensión desde una aspergilosis sinusal. Las lesiones características en SNC incluyen abscesos cerebrales, infartos corticales o subcorticales con o sin hematomas asociados, o engrosamiento de mucosa sinusal con engrosamiento dural por extensión. La aspergilosis del SNC se asocia con una mortalidad superior al 80%. La endoftalmitis ocular se puede observar en el seno de una aspergilosis diseminada o por extensión corneal secundaria a heridas traumáticas contaminadas. La infección invasiva provoca destrucción de estructuras oculares y grandes déficits funcionales que en ocasiones obligan a la enucleación. La endocarditis por *Aspergillus* spp. es menos frecuente que la producida por *Candida* spp. y suele asentar sobre válvulas protésicas (prótesis de válvulas cardíacas) (22). De forma característica los individuos afectados presentan fiebre y embolismos sépticos. A pesar de tratarse de una infección endovascular, los hemocultivos rara vez son positivos, como en todas las formas de aspergilosis. La aspergilosis gastrointestinal puede producir invasión local y expresarse como tiflitis, úlceras colónicas, dolor abdominal y/o sangrado intestinal.

La aspergilosis cutánea suele ser primaria, tras inoculaciones locales, traumatismos abiertos, catéteres vasculares, quemaduras, vendajes contaminados, etc; rara vez se produce en el contexto de infecciones diseminadas. La angio-invasividad de *Aspergillus* spp. hace que estas lesiones sean frecuentemente necróticas (23).

1.6 Impacto de la aspergilosis por *A. flavus* en la salud humana y animal

Como otras especies de *Aspergillus*, *A. flavus* tiene una distribución mundial. Esto probablemente se deba a la producción de numerosos conidios que se dispersan fácilmente por los movimientos del aire y posiblemente por los insectos (2).

A. flavus se ha identificado como uno de los principales hongos patógenos de importancia para la salud animal y humana.

Como se ha mencionado anteriormente, *A. flavus* ha sido identificado como el segundo organismo más frecuente asociado a aspergilosis aviarias, en particular en especies productivas como pollos, gansos y pavos (28). Las infecciones ocurren naturalmente en las bandadas domésticas y también pueden establecerse después de la exposición a aerosoles o alimento contaminado (1, 2). En las aves la aspergilosis respiratoria se considera una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, causando pérdidas económicas importantes en el sector avícola (28).

En las granjas avícolas, la especie de *Aspergillus* aislada con mayor frecuencia es *A. flavus* presentando el mayor nivel de esporas en el aire (> 2000 UFC / m³) (29). Las infecciones invasivas experimentales en ratones muestran que *A. flavus* es 100 veces más virulento que *A. fumigatus* en términos de inóculo requerido (2).

A su vez, encontramos que una de las fuentes de contagio en humanos está asociada a la producción animal y a las mismas condiciones que provocan la enfermedad en los animales. Uno de los entornos con altos niveles de exposición a los hongos son las instalaciones de producción animal, como las de cerdos y aves de corral, donde los granjeros que trabajan con ellos tienen un mayor riesgo de contraer enfermedades

respiratorias ocupacionales (29). Se ha informado de agricultores y trabajadores de granjas infectados por respirar esporas de alimentos y piensos contaminados en todo el mundo (30). Las respuestas alérgicas se desarrollan después de la exposición repetida a esporas de hongos, lo que resulta en asma, alveolitis extrínseca o aspergilosis broncopulmonar alérgica (12).

Entre otros datos sobre su impacto en la salud humana, también se ha reportado que *A. flavus* es la segunda causa principal de enfermedades fúngicas alérgicas, invasivas y colonizadoras. Representa el 65% de la aspergilosis infantil en América del Norte. Recientemente, se ha citado a este microorganismo como una de las principales causas de queratitis micótica, una infección por hongos en la córnea (31-33).

En dos estudios, *A. flavus* fue la especie de *Aspergillus* más prevalente que se recuperó del aire de las salas de los hospitales y hogares (2, 34). Las infecciones nosocomiales pueden ocurrir durante la cirugía, en estos casos se sugiere que la fuente de las esporas parece originarse en el aire dentro del quirófano, como ocurre con los pacientes trasplantados o de manera iatrogénica con la inoculación directa del hongo produciendo aspergilosis posquirúrgica o incluso de fungemias por contaminación de catéteres o implantes, aunque también es posible la contaminación a través de los senos paranasales o lesiones broncopulmonares, con su posterior diseminación hematológica, sin precisar una alteración del sistema inmune del hospedador. Además, se ha reportado que la aspergilosis invasiva es una complicación de la neumonía grave entre los pacientes de cuidados intensivos (35-37).

En relación a lo anterior, en el contexto de la situación de pandemia en los años 2020 y 2021, existe la preocupación de que los pacientes críticamente enfermos con COVID-19

también puedan tener un mayor riesgo de coinfección con aspergilosis pulmonar, asociada al uso de ventilador, que ha sido estudiada luego del reporte de aspergilosis que involucra a *A. flavus* en un paciente con COVID-19 (38).

1.7 Patogenia

Los conidios de *A. flavus* (2,5 μm . de diámetro) son en promedio más grandes que los conidios de *A. fumigatus* (2,3 μm .), un rasgo que se piensa conduce a una mayor incidencia de *A. flavus* como agente de la sinusitis fúngica debido a la deposición de las esporas grandes en las vías respiratorias superiores (2, 12, 39).

La temperatura óptima para *A. flavus* para crecer es de 37 °C, aunque se puede observar el crecimiento de hongos en temperaturas que oscilan entre 12 y 48 °C. Una temperatura óptima de 37° C contribuye a su patogenicidad en humanos y otros vertebrados (2).

Los conidios acceden a los alvéolos pulmonares, germinan en hifas en crecimiento activo provocando una infección pulmonar y una enfermedad invasiva. Varios factores bioquímicos y celulares (principalmente proteasas) producidos por el organismo infectante pueden ayudar a la germinación de los conidios y a la penetración de las hifas emergentes en las células de los alvéolos pulmonares (1). La transmisión secundaria de esporas de hongos surge de la infección a través de heridas (34).

La adhesión de los conidios de *Aspergillus* spp. a las proteínas presentes en la lámina basal de las células pulmonares se considera un paso inicial importante en el desarrollo de la aspergilosis invasiva (12). Las proteínas importantes en este contexto incluyen fibronectina, laminina, colágeno, fibrinógeno, complemento, albúmina y proteínas tensoactivas. En una comparación en la que participaron varias especies de *Aspergillus*, se

encontró que los conidios de *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus* se unían significativamente mejor al fibrinógeno que los conidios de *A. terreus*. En otra investigación, se encontró que los conidios de *A. fumigatus* se unían significativamente mejor a la lámina basal y a la fibronectina que los de *A. flavus*. Al estudiar los mecanismos implicados en la unión de los conidios, los autores encontraron que los carbohidratos cargados negativamente que se encuentran en la pared celular de las conidiosporas desempeñaban un papel en la adhesión de los conidios a la lámina basal del huésped (39).

1.8 Factores de virulencia

De manera similar a otros parásitos facultativos, es difícil identificar un solo factor de virulencia definitivo en *A. flavus*. La virulencia de este patógeno es multifactorial y está íntimamente relacionada con el enlace de desarrollo de la esporulación, el metabolismo secundario, la adaptabilidad a las condiciones de estrés y la intercepción de moléculas de defensa de señalización del huésped (12).

Aspergillus puede secretar toxinas (gliotoxina) capaces de actuar sobre el epitelio mucoso ralentizando el movimiento ciliar y lesionando el epitelio del tracto respiratorio (36, 40). Otros factores de virulencia, tales como las proteasas, actúan en etapas posteriores de la interacción entre microorganismo y huésped, interfiriendo en la capacidad de defensa del sistema inmune del huésped (36).

A. flavus tiene la capacidad de producir una gran variedad de enzimas para ayudar en la degradación de sustratos complejos. De hecho, cuando la utilización del sustrato por *A. flavus* se comparó con patógenos obligados, *A. flavus* tuvo una mayor capacidad de crecimiento tanto en sustratos de proteínas complejas (por ejemplo, elastina y mucina)

como en sustratos de carbohidratos complejos (por ejemplo, celulosa, quitina, pectina y xilano) (41).

1.9 Proteasas

Descifrar las secreciones fúngicas se ha convertido en un objetivo importante desde que se identificaron las proteínas secretadas como los principales efectores responsables de las interacciones (patógenas o simbióticas) entre los hongos y organismos vegetales y animales. (42)

Las proteasas se refieren a un grupo de enzimas cuya función catalítica es hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Estas proteasas forman un gran grupo de enzimas pertenecientes a la clase de hidrolasas. Tradicionalmente, las proteasas se han considerado enzimas degradantes que son capaces de escindir alimentos o sustratos proteicos, aunque también participan en la renovación de la proteína celular (43).

1.9.1 Clasificación de las proteasas

Originalmente las proteasas se clasificaron como endopeptidasas o exopeptidasas, indicando que el enlace peptídico blanco de hidrólisis es interno a la proteína, o próximo al extremo amino-terminal (aminopeptidasas) o carboxilo-terminal (carboxipeptidasas), respectivamente. Según el pH de su actividad óptima, también se denominan proteasas ácidas, neutras o alcalinas (44).

Existe a su vez una clasificación basada en su mecanismo catalítico, particularmente al grupo funcional presente en el sitio activo, que las distingue en cuatro grupos principales de proteasas: I) serina-proteasas, II) cisteína-proteasas, III) proteasas aspárticas y IV) metalo-proteasas. Estas proteasas se denominan así debido a la presencia de un residuo de

serina, cisteína, ácido aspártico, o un ión metálico, respectivamente, en los sitios activos de estas enzimas (1, 43).

Serina-proteasas. Las serina-proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Son numerosas y están muy extendidas entre virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos. Las serina-proteasas se reconocen por su inhibición irreversible por 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), L-trans-3-carboxiran-2-carbonil-L-leucilagmatina (E64), diisopropilfluorofosfato (DFP), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK).

Algunas de las serina-proteasas son inhibidas por reactivos de tiol como el p-cloromercuribenzoato (PCMB) debido a la presencia de un residuo de cisteína cerca del sitio activo. Estas enzimas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un pH óptimo entre 7-11. Tienen amplias especificidades de sustrato, incluida la actividad esterolítica y de amidasa. La mayoría de estas enzimas tienen masas moleculares entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoeléctricos de las serina-proteasas están generalmente entre pH 4-6. Las serina-proteasas alcalinas que son activas a pH altamente alcalino representan el subgrupo más grande de serina proteasas. El pH óptimo de estas proteasas alcalinas está alrededor de pH 10 y su punto isoeléctrico está alrededor de pH 9. Sus masas moleculares están en el rango de 15 a 30 kDa (44, 45).

Proteasas aspárticas. Las proteasas de ácido aspártico, comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son las endopeptidasas que dependen de los residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría de las proteasas aspárticas muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3-4) y tienen puntos isoeléctricos en el rango de pH 3-4.5. Sus masas moleculares están en el rango de 30 a 45 kDa. Las proteasas aspárticas son

inhibidas por la pepstatina. También son sensibles a compuestos de diazocetona como diazoacetil-DL-norleucina metiléster (DAN) y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano (EPNP) en presencia de iones de cobre (44).

Cisteína/tiol proteasas. Las cisteína-proteasas se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas. Se han reconocido unas 20 familias de cisteína proteasas. La actividad de todas las cisteína-proteasas depende de una díada catalítica formada por cisteína e histidina. Según la especificidad de su cadena lateral, se dividen ampliamente en cuatro grupos: I (similares a la papaína), II (similares a la tripsina con preferencia por la escisión en el residuo de arginina), III (específicos del ácido glutámico) y IV (otros). La papaína es la cisteína proteasa más conocida. Las cisteína proteasas tienen un pH óptimo neutro, aunque algunas de ellas, por ejemplo, las proteasas lisosomales, son activas a pH ácido. Son susceptibles a los agentes de sulfidriolo como el ácido 4-cloromercuribenzoico (PCMB), pero no se ven afectados por el Fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y los agentes quelantes de metales. En general tienen un punto isoeléctrico de pH 4 y pH 9 y una masa molecular entre 30 y 50 kDa (44, 45).

Metaloproteasas. Las metaloproteasas son las más diversas de los tipos catalíticos de proteasas. Se caracterizan por el requerimiento de un ion metálico divalente para su actividad. Incluyen enzimas de una variedad de orígenes, como colagenasas de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de venenos de serpientes y termolisina de bacterias. Todos ellos son inhibidos por agentes quelantes como EDTA pero no por agentes sulfidriolo o DFP. Las metaloproteasas neutras fúngicas son activas alrededor de un pH 7.0, mientras que las metaloproteasas alcalinas son activas en el rango de pH de 7 a 9 y tienen masas moleculares en la región de 48 a 60 kDa. Los miembros más importantes de las

metaloproteasas son las termolisinas, colagenasas y elastasas, producidas por una gran variedad de organismos, incluyendo a los hongos. Estas metaloproteasas desempeñan un papel destacado en la degradación de la matriz extracelular durante la morfogénesis, la diferenciación y la reparación de los tejidos. Su importancia en la conducción de las funciones metabólicas y reguladoras esenciales es evidente por su presencia en todas las formas de organismos vivos.

Las proteasas desempeñan un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos y patológicos, como el catabolismo de proteínas, la coagulación sanguínea, el crecimiento y la migración celular, la disposición de los tejidos, la morfogénesis en el desarrollo, la inflamación, el crecimiento tumoral y la metástasis, la activación de zimógenos, la liberación de hormonas y péptidos farmacológicamente activos a partir de proteínas precursoras y transporte de proteínas secretoras a través de las membranas. En general, las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes a moléculas más pequeñas para su posterior absorción por la célula, mientras que las proteasas intracelulares desempeñan un papel fundamental en la regulación del metabolismo(45).

Las enzimas extracelulares juegan un papel importante en la nutrición debido a su ya que mediante la hidrólisis de polipéptidos facilita la absorción de aminoácidos por la célula, participando principalmente en el mantenimiento de la vida de las células al proporcionarles la reserva de estos nutrientes (44).

Las proteasas secretadas siguen el esquema clásico de síntesis de proteínas, pero se distinguen de otras por la adición de un péptido señal en las secuencias codificantes que permite su direccionamiento a un organelo o al exterior en el medio a través de vesículas secretoras. Sin embargo, existen rutas alternativas, ya que las proteínas sin secuencia señal

se encuentran en el exterior de la célula, a través de la exocitosis por vesículas recubiertas, lisosomas secretores, microvesículas o transportadores de cassettes de unión a ATP (42).

Los hongos elaboran una variedad más amplia de enzimas que las bacterias. Por ejemplo, *Aspergillus oryzae* produce proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Las proteasas fúngicas son activas en un amplio rango de pH (pH 4 a 11) y exhiben una amplia especificidad de sustrato. Sin embargo, tienen una velocidad de reacción más baja y poca tolerancia al calor que las enzimas bacterianas. (45)

1. 10 Proteasas de *A. flavus*

Se han logrado identificar una variedad de proteasas extracelulares secretadas por *A. flavus*, clasificadas como serina proteasas (SP), metaloproteasas (MP). Las funciones de enzimas extracelulares de esta naturaleza, se han estudiado ampliamente durante la infección y patogénesis de especies de otros hongos y levaduras como *A. fumigatus* y *Candida* spp., pero no de manera tan amplia en *A. flavus* (1).

Diversos investigadores (18, 46-50) creen que esta situación prevalece en el caso de *A. flavus*. Sin embargo, es posible que el papel de las proteasas extracelulares sea doble. Como estos organismos se encuentran comúnmente en nichos donde la disponibilidad de nutrientes es muy escasa, tienen que utilizar sustratos disponibles como nutrientes. Las proteasas extracelulares producidas por estos microorganismos ayudan a descomponer moléculas de proteínas complejas en nutrientes utilizables. Además, estas enzimas digieren la matriz extracelular formada por fibras de elastina y colágeno que facilita la penetración tisular (1). Estas proteínas alteran los procesos de transmisión de señales en el cuerpo,

actúan como factores de virulencia en los procesos patogénicos y afectan la regulación del crecimiento en un nuevo entorno (42).

En diversas investigaciones, se han logrado identificar proteasas de *A. flavus* mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western Blot, como se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Proteasas previamente identificadas de *Aspergillus flavus*

<i>Autor</i>	<i>Clasificación de la proteasa</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Técnica</i>
<i>Ramesh y col. (1994)</i>	Serinaproteasa Reacción cruzada con proteasa de <i>A. fumigatus</i>	36 kDa	Elastina	Medio de elastina(Yeast Carbon Base 1.17% + elastina insoluble 0.2 % + carbonato de Ca 0.3%) a 37° C.	SDS-PAGE & Western Blot
<i>Ramesh y col. (1995)</i>	Metaloproteasa Reacción cruzada con proteasa <i>A. fumigatus</i>	23 kDa *Rhodes, 1990	Elastina	Medio de elastina (<i>Ramesh 1994</i>)	SDS-PAGE & Western Blot
<i>Chou y col. (1999)</i>	Serinaproteasa alcalina (inhibición con PMSF)	34 kDa	Caseína	Medio de cultivo líquido	SDS-PAGE
<i>Rhodes y col. (1990)</i>	Metaloproteasa (inhibición con 1,10 fenantrolina)	23 kDa	Elastina	Yeast Carbon Base en buffer de borato con partículas de elastina.	SDS-PAGE
<i>Kolattukudy y col. (1993)</i>	Serinaproteasa Reacción cruzada con proteasa <i>A. fumigatus</i>	32 kDa	Elastina	Medio líquido con elastina (100ml) 1,17% Yeast carbon base + elastina	SDS-PAGE & Western Blot
<i>Zhu y col. (1990)</i>	Serinaproteasa (inhibición con PMSF)	28k Da	Colágeno, Elastina	Cultivo líquido sumergido (M9)	SDS-PAGE
	Metaloproteasa (inhibición con EDTA y 1,10 fenantrolina)	65kDa	Colágeno, Elastina		
<i>Mellon y Cotty (1996)</i>	Metaloproteasas (inhibición con EDTA y 1,10 fenantrolina)	23 kDa (35 kDa)	Colágeno, Elastina y Proteína de Semilla de algodón	Medio de cultivo líquido (V-8)	SDS-PAGE

Tabla compilada de las referencias de (46-51). Daniela Gama, 2023.

1.10.1 Serinaproteasas de *A. flavus*

Estudios han indicado que las SP son probablemente un factor de virulencia de *A. flavus*. El efecto de estas enzimas como factor de virulencia es directo, es decir, actuando sobre la matriz extracelular de los tejidos (18).

Kolattukudy y col. en 1993, demostraron la existencia de una serina proteasa extracelular de 33 kDa con actividad elastinolítica de *A. fumigatus* al ser crecido en material estructural insoluble obtenido de pulmón murino y bovino, lo que indica que es probable que esta enzima se produzca cuando el organismo infecta el pulmón. Tras la inoculación de ratones neutropénicos con *A. fumigatus* se observó que el hongo al germinar y penetrar en los pulmones de los ratones neutropénicos secretaba la proteasa elastinolítica. Con base en esta evidencia se sugiere que la proteasa elastinolítica extracelular es un factor de virulencia significativo en la aspergilosis invasiva. Esta información es relevante ya que en la misma investigación también se encontró que *A. flavus* produce una serina proteasa de 32 kDa con actividad elastinolítica, que reaccionó de forma cruzada con los anticuerpos preparados contra la proteasa elastinolítica de *A. fumigatus* mencionada anteriormente, lo cual sugiere que en esta especie también podría tratarse de un factor de virulencia significativo en la aspergilosis invasiva (51).

Chou y col. en 1999, lograron identificar una serina proteasa alcalina capaz de degradar caseína, con peso molecular de 34-kD, cuyo extremo N-terminal tiene una alta frecuencia de unión a IgE (63 %), con lo que se concluyó que se trata de una proteasa con una doble función que representa también un alérgeno principal de *A. flavus* (47).

Por otro lado se han realizado estudios de comparación entre las proteínas secretadas por *A. fumigatus* y *A. flavus*, con el fin de identificar similitudes entre las proteasas de estos dos hongos, ambos considerados los principales agentes de la aspergilosis invasiva (44).

Ramesh *et al.* en 1996, descubrió que *A. fumigatus* y *A. flavus* secretan serina proteasas altamente homólogas. Se identificó una serina proteasa de 36 kDa producida por *A. flavus*, que al secuenciarse codifica para una proteasa alcalina elastinolítica (Alp) de *A. fumigatus*

y se demostró que la transcripción de la secuencia de nucleótidos depende de la composición del medio (49).

Las proteasas reportadas por estos autores poseen pesos moleculares muy similares, además de que todas han sido clasificadas como serina proteasas. Estos datos sugieren que puede tratarse de la misma proteasa, con ligeras diferencias en su detección producto de las distintas técnicas y cepas empleadas en cada uno de estos estudios.

Finalmente Zhu y *col.* en 1990, experimentaron con *A. flavus* e identificaron una serina-proteasa de 28 kDa a la cual se le observó una actividad colagenolítica y elastinolítica al cultivarse sumergido en medio de cultivo líquido (46).

1.10.2 Metaloproteasas de A.flavus

La segunda clase de proteasas extracelulares que se sabe que aumenta la infección y patogénesis de *A. fumigatus* y *A. flavus* son las MPs. Rhodes y *col.* (48) y Ramesh y *col.* (50) identificaron una proteasa extracelular que se ajusta al perfil bioquímico de una MP en *A. flavus*, mientras que estudios preliminares han implicado un papel activo en la infección y patogenicidad de esta enzima en la virulencia de este hongo (1).

Rhodes y *col.* en 1990 identificaron una elastasa con una masa molecular de 23 kDa con un punto isoeléctrico de 7,6 que indica ser una metaloproteasa por su sensibilidad al inhibidor 1,10-fenantrolina (48).

En otro estudio, Ramesh *et al.* en 1995, observaron que *A. fumigatus* y *A. flavus* producen una metaloproteasa MEP, en el primero una proteína de 42 kDa, y en el segundo una proteína de 23 kDa denominada MEP20 las cuales fueron secuenciadas, además se

identificó un gen homólogo denominado *Afu* que se relacionó con la producción de estas enzimas en ambas especies (50).

Zhu y *col.* en 1990, identificaron una posible metaloproteasa de 65 kDa inhibida por EDTA y 1,10 fenantrolina, con capacidad para degradar colágeno y elastina al cultivarse sumergido en medio de cultivo líquido (46).

Mellon y Cotty en 1996, purificaron una metaloproteasa de 23 kDa con actividad elastinolítica a partir de filtrados de cultivo de *A. flavus* y un punto isoeléctrico de 9.0. La actividad elastolítica se secretó inicialmente en el medio de cultivo como una proteína de 35 kDa, que posteriormente se convirtió en una proteína de 23 kDa, presumiblemente mediante autólisis (52).

Este último descubrimiento sugiere que las proteasas reportadas por Rhodes (48), Ramesh (50) y Zhu (46), al presentar un peso molecular similar y una naturaleza bioquímica en común (metaloproteasas), puedan ser la misma proteasa identificada por Mellon y Cotty (52) una vez que ha sido degradada por autólisis.

Recientemente, Osmolovskiy y *col.* en 2021, observaron que *A. flavus* puede afectar diversos componentes del sistema de hemostasia al penetrar en el torrente sanguíneo, como parte de su patogenicidad y virulencia. Se demostró que sus proteasas son altamente activas en la ecisión de proteínas globulares (albumina) y fibrilares (fibrina) y en cierto grado, capaces de coagular el plasma de humanos y animales(53).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una carencia de información específica de *A. flavus* debido a que la patogenia disponible ha sido teorizada a partir de la extrapolación de reportes realizados en otros hongos más estudiados (*A. fumigatus* o *Candida*). Los estudios existentes, han reportado actividades proteolíticas de *A. flavus* únicamente detectadas en sobrenadantes de cultivo a partir de medios de crecimiento sintéticos o enriquecidos. En *A. flavus* no hay reportes de proteasas detectadas en extractos (hifas o esporas) y obtenidos de un medio natural como es el grano de maíz o en medio papa y dextrosa. Debido a esto, el estudio de la determinación y caracterización de proteasas en extractos completos y sobrenadantes de *A. flavus* cultivado en estos medios, nos permitirá brindar un mayor conocimiento en la patogenia de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

A. flavus posee la capacidad de producir enzimas proteolíticas en extractos completos y sobrenadantes en distintas fases del crecimiento dependiendo del medio de cultivo o sustrato donde es crecido y que podrían participar en la patogenia de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar y caracterizar bioquímicamente proteasas de *A. flavus* de diferentes fases de crecimiento en grano de maíz y caldo papa dextrosa como medios de cultivo.

4.2. Objetivos Particulares

- Realizar una cinética de producción de esporas de *A. flavus* en distintos medios de cultivo.
- Determinar la presencia de proteasas en el sobrenadante de cultivo de *A. flavus* en diferentes fases de crecimiento mediante zimografía.
- Determinar la presencia de proteasas en extractos de *A. flavus* de diferentes fases de crecimiento mediante zimografía.
- Identificar la variación en el perfil proteico de acuerdo al peso molecular de diferentes fases de crecimiento por SDS-PAGE.
- Caracterizar las proteasas identificadas con distintas condiciones de pH, temperatura, e inhibidores de actividad proteolítica.

5. METODOLOGÍA

5.1. Cultivo del hongo y obtención de muestras

A partir de la cepa 1325 (obtenida del cultivo en grano en la unidda de investigación de granos y semillas de la unam

UNIGRAS) de *A. flavus* en latencia, se realizó un trasplante del hongo a cajas de petri con agar papa-dextrosa (PDA) por punción con aguja en 5 puntos equidistantes. Las cajas con trasplante se incubaron por 7 días a una temperatura de 30 °C y con una humedad relativa (HR) del 35%.

Posteriormente, se realizó un raspado de toda la superficie de la caja y se mezcló con 10 ml de solución estéril de agua destilada con tween 20% y se filtró para obtener una suspensión de esporas, las cuáles fueron contadas en cámara de Neubauer para determinar la cantidad de esporas/ml.

Para el mantenimiento del hongo se inocularon 100,000 esporas de la suspensión en 500 g. de grano de maíz seco, previamente limpiado de forma manual y esterilizado por calor húmedo en autoclave. Diez gramos de grano inoculado se almacenaron en 50 viales estériles, a los cuales se les añadió solución estéril de agua destilada con tween 20% en el volumen necesario para elevar la humedad del grano al 25% HR y se homogenizó. Los viales se taparon con una doble capa de gasa, fijada con una liga para permitir la entrada de oxígeno al interior. A su vez, el hongo fue también aislado en medio de cultivo líquido Papa- Dextrosa (CPD). Se realizó la inoculación con 100,000 esporas en 10 ml. de CPD en 50 viales estériles y se taparon con doble gasa. Los viales con ambos medios de cultivo se colocaron en el horno de incubación a 28° C durante 10 días y se realizó la lectura de la

cantidad de esporas cada 24 hrs. (54). Se evaluó el vigor híbrido y se realizó una curva de producción de esporas del hongo mediante el conteo de esporas en cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de 5 viales de cada medio de cultivo durante 10 días.

Para la obtención de muestras de sobrenadante (SN) y extracto completo (EXT), de los cultivos en grano, se colocó 8 ml. de solución estéril de H₂O + tween 20% y se sometieron a agitación durante 1 minuto para desprender al hongo de la superficie del grano. Se filtró el contenido a través de papel filtro Whatman 40 (poro de 25 µm) para separar la estructura micelial de las esporas. En los viales de caldo de cultivo se agitó el contenido para el desprendimiento de esporas y se filtró. En ambos casos, el filtrado se sometió a centrifugación a 245 x g durante 15 minutos y posteriormente se recuperó el SN. El SN fue filtrado a través de membranas de 0.22 µM para eliminar cualquier estructura micelial presente y se realizó la precipitación de proteínas con etanol absoluto en una relación 1:3 (muestra: etanol) a -20°C durante 48 h. Posteriormente, se centrifugó la mezcla 1720 x g /30 min/ 4°C. La proteína precipitada se resuspendió en 500 µl. de PBS 1X (55).

Para la obtención de EXT, después de la centrifugación, el sedimento de cada uno de los viales de ambos medios de cultivo recibió un lavado con solución estéril de H₂O + tween 20% y se sometió nuevamente a centrifugación a 245 x g durante 5 minutos y se retiró el líquido de lavado. Este proceso se repitió en dos ocasiones más para completar 3 lavados en total, con el fin de eliminar cualquier residuo de SN. Una vez eliminado el último líquido de lavado, se re suspendió el sedimento con 1 ml. de H₂O + tween 20%, se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y se almacenaron a -20°C (54).

5.2. Cuantificación de proteína

Se realizó la cuantificación de proteína total (PT) de las muestras por el método de Bradford y una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a distintas concentraciones (0,100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$). En una microplaca se colocaron 200 μl . de reactivo de Bradford y 10 μl . de muestra de cada uno de los 10 días de cada medio de cultivo. Se realizó la lectura de la placa a 595 nm. El cálculo se elaboró mediante regresión lineal empleando los valores de absorbancia de la lectura (56).

5.3. SDS-PAGE

La separación de las proteínas del SN y EXT de *A. flavus* se realizó en función de sus pesos moleculares, utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%. La preparación de muestras para el corrimiento electroforético se hizo agregando amortiguador de muestra 5x. Se ajustó la concentración de proteína a 25 μl . para el corrimiento en ambos casos. Se realizó una electroforesis a un voltaje de 80 V/10 min para el gel concentrador y 100 V/2 hrs. para el gel separador en una solución amortiguadora de corrida 1X. Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie R-250 durante 1 hr. a temperatura ambiente, posteriormente se destiñeron con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% y se conservaron en una solución de ácido acético al 10% (57). La tinción de geles con plata se realizó empleando el kit de tinción de plata de Bio-Rad (Bio-Rad Silver stain kit #1610449, USA), los geles teñidos se conservaron en ácido acético al 5%.

5.4. Zimografía

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con 0.2% de gelatina porcina. Se ajustó la concentración de proteína necesaria a utilizar en el corrimiento electroforético de las proteínas precipitadas del SN y ET de *A. flavus*, empleándose 2.5 µl. de cada una de las muestras. Después de la electroforesis, los geles se incubaron en agitación con Tritón X100 al 2.5% durante 30 min a temperatura ambiente. Para caracterizar las actividades proteolíticas, se probaron diferentes amortiguadores de activación: 100 mM Tris-Acetato de sodio pH 5, 100mM Tris pH 7 y 100mM Glicina pH 9. Todos los amortiguadores contenían CaCl₂ a una concentración de 2 mM. Los geles se incubaron durante 12-16 hrs. a temperaturas de 22 y 37 °C. Posteriormente se procedió a teñir los geles con azul de Coomassie por 24 hrs. y se destiñeron sometiéndolos a una solución de lavado hasta visualizar las bandas deseadas. Por último, los geles se conservaron en ácido acético al 5% (58).

5.5. Caracterización bioquímica de proteasas de *A. flavus*.

Para continuar con la caracterización de las proteasas presentes en SN y extractos completos de *A. flavus*, dependiendo de los residuos involucrados en el sitio catalítico, se usaron inhibidores de actividad proteolítica. Para la identificación de metaloproteasas se usaron 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 50 mM de 1,10-fenantrolina; para cisteína proteasas se usó 50 mM de ácido 4-(hidroximercurio) benzoico (PHMB) y finalmente para serina proteasa se empleó 50 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Estos inhibidores se mezclaron con las muestras previamente obtenidas durante 1 hr. en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una zimografía como se describió anteriormente.

5.6. Rompimiento de estructuras fúngicas por choque térmico.

Para el rompimiento de las estructuras fúngicas de las muestras de extracto (EXT), se incubaron los microtubos con la suspensión de esporas a 95 °C durante 15 min. Inmediatamente después, los tubos se transfirieron a un contenedor con nitrógeno líquido a -200 °C donde permanecieron durante aproximadamente 10 min. Este proceso se repitió una vez más para someter las muestras a dos choques térmicos. Las muestras se conservaron a -20 °C.

6. RESULTADOS

6.1. Curva de producción de esporas

Mediante el conteo de esporas realizado en los cultivos de grano de maíz y CPD, se realizó una curva de producción de esporas, que ayudó a visualizar el comportamiento y vigorosidad del hongo a lo largo de un periodo de 10 días. Los datos fueron transcritos a tablas de Excel donde se calcularon promedios, desviaciones estándar y finalmente se graficaron estos valores.

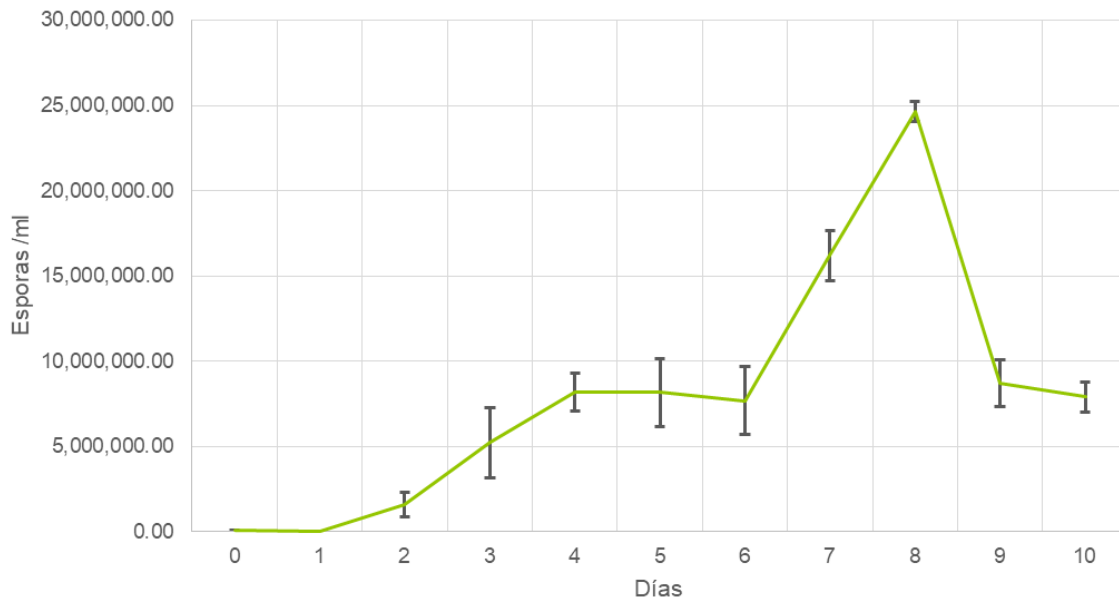
Los conteos de esporas en los cultivos en grano de maíz mostraron altos valores en la cantidad de producción de esporas. Desde el segundo día se obtuvieron valores promedio de 1, 610,000 esporas/ml., y hacia el día 8 que corresponde al punto más alto en el gráfico se observan valores promedio de 24, 650, 000 esporas/ml., véase **Tabla 2**.

Tabla 2. Valores de Promedio (\bar{X}) de esporas/ml. y desviación estándar de los conteos de *A. flavus* en grano de maíz realizados a 10 días.

<i>Día</i>	\bar{X} Esporas/ml \pm DE		
0			100,000
1	5,100.00	\pm	651.92
2	1,610,000.00	\pm	713,924.02
3	5,216,666.67	\pm	2,064,784.09
4	8,175,000.00	\pm	1,128,789.91
5	8,175,000.00	\pm	1,990,184.25
6	7,683,333.33	\pm	1,993,949.18
7	16,200,000.00	\pm	1,473,091.99
8	24,650,000.00	\pm	576,628.13
9	8,700,000.00	\pm	1,393,735.99
10	7,900,000.00	\pm	884,590.30

Resultados de 5 ensayos con muestras independientes. El día 0 representa el inóculo inicial.

Figura 1. Curva de producción de esporas de *A. flavus* en grano de maíz.



En el eje de las “X” se muestran los días de incubación, mientras que en el eje de la “Y” se muestran los valores de esporas contadas por ml. Entre los días 0 y 1 puede observarse la fase de adaptación del hongo. A partir del día 2 hasta el día 4 se aprecia una fase de crecimiento logarítmico, volviéndose estacionaria entre los días 4 y 6. En el día 7 se observa un repunte en la producción de esporas de manera exponencial, seguido de una fase de muerte donde se observa la disminución en la producción de esporas.

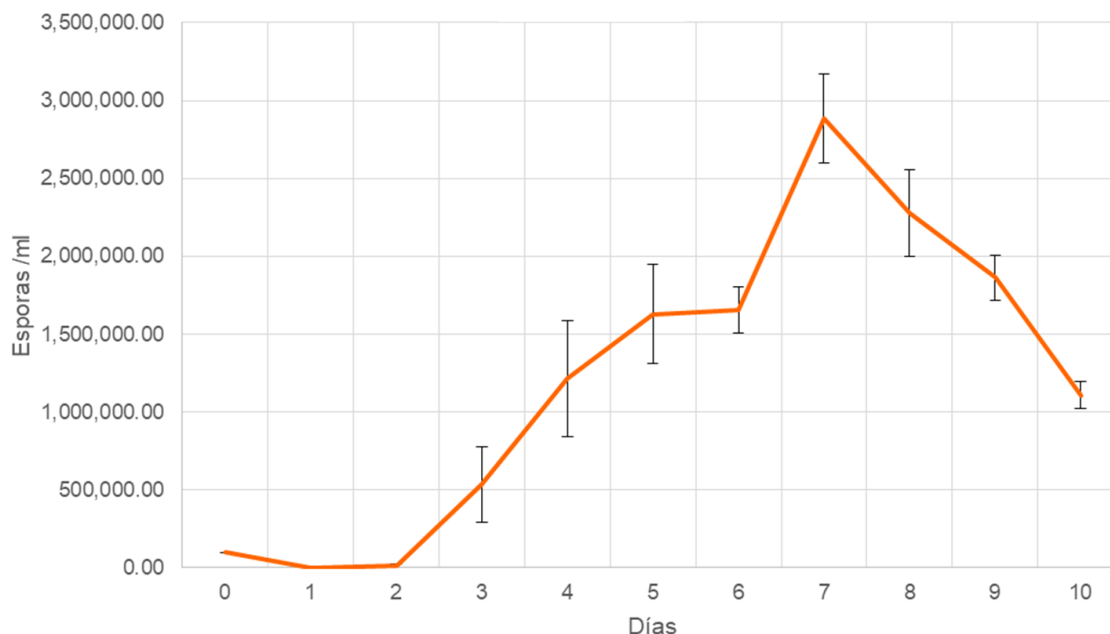
Tabla 3. Valores de Promedio (\bar{X}) de esporas/ml. y su desviación estándar de los conteos de *A. flavus* en CPD realizados a 10 días.

<i>Día</i>	\bar{X} Esporas/ml	\pm DE
0	100,000	
1	1,300.00	\pm 570.09
2	12,700.00	\pm 9,059.53
3	536,625.00	\pm 243,027.22
4	766,666.67	\pm 455,530.83
5	1,628,333.33	\pm 319,917.05
6	1,655,000.00	\pm 150,249.79
7	2,550,000.00	\pm 623,237.51
8	2,276,666.67	\pm 280,237.99
9	1,861,666.67	\pm 143,730.07
10	1,261,250.00	\pm 317,368.74

Resultados de 5 ensayos con muestras independientes. El día 0 representa el inóculo inicial.

En los conteos de esporas de los cultivos en CPD, en el día 2 se observaron valores promedio de apenas 12,700 esporas/ml., mientras que en el día 7 que corresponde al día con la mayor producción de esporas en este medio, los valores promedio se ubican alrededor de los 2,550,000 esporas/ml., véase **Tabla 3**.

Figura 2. Curva de producción de esporas de *A. flavus* en CPD.



En el eje de las “X” se muestran los días de incubación, mientras que en el eje de la “Y” se muestran los valores de esporas contadas por ml. A partir del día 0 al día 2 se observa la fase de adaptación, seguida de una fase crecimiento logarítmico que inicia en el día 3 y se detiene alrededor del día 5, a partir del cual se aprecia una fase estacionaria o de meseta entre los días 5 y 6. En el día 7 se observa un repunte con una producción de esporas de forma exponencial, seguida de una disminución en la producción de esporas hacia los días 8, 9, y 10.

Al analizar las curvas de producción de esporas en las **Figuras 1 y 2**, es posible identificar cada una de las diferentes fases de crecimiento con base a la producción de esporas que *A. flavus* produjo en cada uno de los medios en los que se creció y al compararlas es posible reconocer que el comportamiento del hongo fue similar en ambas. La curva inicia con una fase de adaptación, seguida de una fase de crecimiento

exponencial, que se detiene dando lugar a una fase de meseta o estacionaria. A continuación se observa un notorio repunte marcado por una segunda fase de crecimiento exponencial, que finalmente decrece, iniciando la fase decreciente o de muerte donde se aprecia una clara disminución en la producción de esporas.

6.2. Cuantificación de proteína total en muestras de SN cultivos de *A. flavus* en grano de maíz y CPD

Se realizó la cuantificación de la proteína total en las muestras de SN de grano de maíz y SN de CPD, así como de las muestras de EXT con esporas rotas.

A continuación, se presentan los resultados con los valores de $\mu\text{g/ml}$. de proteína total (PT) en las muestras de SN de cultivos en grano de maíz, y en SN de cultivos en CPD. Puede apreciarse una diferencia en la cantidad de proteína total secretada por el hongo al crecer en distintos medios de cultivo. La cantidad de proteína presente en los SN de cultivos de grano de maíz es mayor que la cantidad de proteína presente en los SN de cultivos en CPD. Esto indica que *A. flavus* secreta más proteínas extracelulares cuando crece en un medio de cultivo natural como el grano de maíz, a diferencia de cuando crece en un medio semisintético como el CPD, véase **Tabla 4**.

Tabla 4. Valores de proteína total en SN de cultivos de *A. flavus* realizados a 10 días.

<i>Día</i>	<i>PT en SN de cultivos en grano de maíz µg/ml</i>	<i>PT en SN de cultivos en CPD µg/ml</i>
<i>2</i>	70.75	36.06
<i>3</i>	96.97	53.10
<i>4</i>	112.54	41.65
<i>5</i>	137.67	38.79
<i>6</i>	142.86	18.30
<i>7</i>	118.55	78.94
<i>8</i>	178.09	107.89
<i>9</i>	158.15	17.48
<i>10</i>	159.25	17.21

Se muestran los valores de PT/ml. obtenidas para las muestras de cada uno de los días evaluados a partir del día 2. La segunda columna muestra los valores de PT obtenidos en los SN de cultivos en grano de maíz, mientras que en la tercera columna se muestran los valores de PT presente en el SN de cultivos en CPD.

6.3. SDS-PAGE

Con el fin de identificar el perfil proteico de las muestras de SN de cultivos en grano de maíz y en CPD, se realizó el corrimiento electroforético de 3 muestras al azar de cada día evaluado y se formaron tres grupos de muestras, cada uno con una muestra por día, obteniendo 3 grupos de 10 días por cada medio de cultivo. Para cada grupo se elaboraron geles de poliacrilamida al 10% y posteriormente fueron teñidos con azul de Coomassie. Al no observarse bandeo en el día 1, se descartaron las muestras de este día.

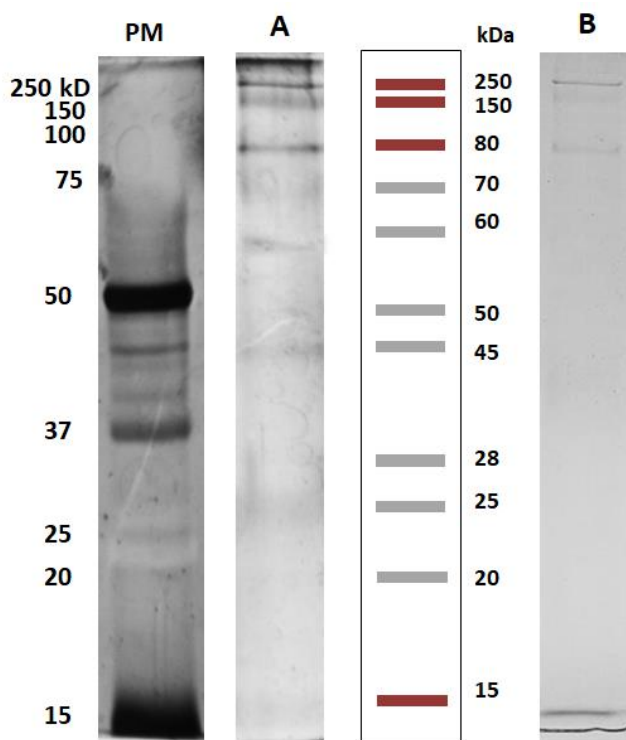
6.3.1 Perfil proteico de SN de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz.

Al analizar los geles teñidos, solo fue posible observar un ligero bandeo con pesos moleculares de 250, 150, 100 y 80 kDa en el caso del SN de cultivos de grano de maíz , como puede observarse en la **Figura. 4**, carril. B.

Con el objetivo de lograr una mejor visualización del perfil proteico de las muestras, se realizó el corrimiento de nuevos geles de poliacrilamida al 10%, con 25 μ l. (3.2 μ g. de PT) de muestra en cada carril y se empleó una tinción de plata. A continuación, se muestran los resultados en las **Figuras 3**, carril. A y **Figura 4**, carril A.

En las muestras de SN de grano de maíz se logró identificar un perfil proteico conformado por una serie de proteínas de distintos pesos moleculares, cuya presencia fue constante a lo largo de los días evaluados.

Figura 3. SDS-PAGE al 10% SN de cultivos *A. flavus* en grano de maíz.

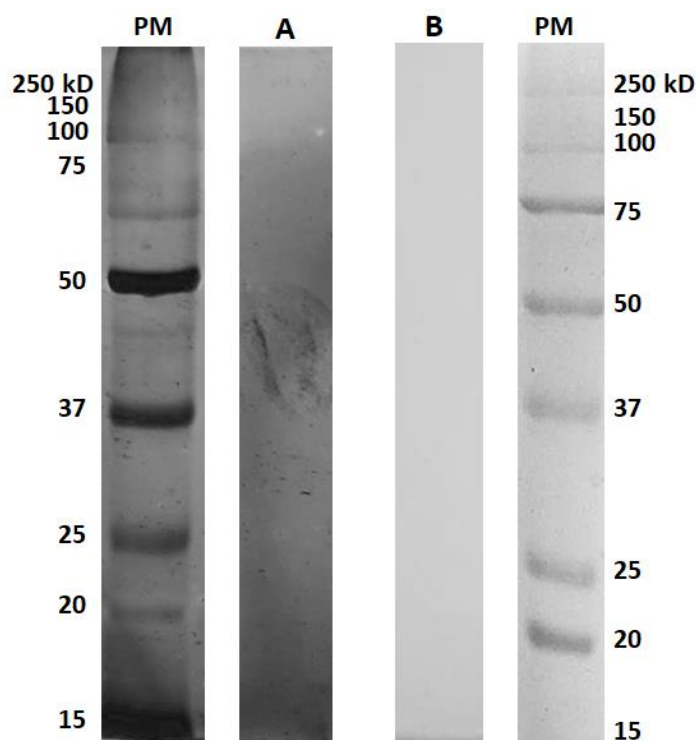


En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (PM) A. Carril representativo del gel teñido con plata, todos los carriles del gel mostraron un bandeo similar. B. Carril representativo del gel teñido con azul de Coomassie, todos los carriles del gel mostraron un bandeo similar. Al centro se esquematiza el bandeo observado con tinción de plata, con rojo se señalan las bandas que pudieron ser igualmente visualizadas con la tinción de azul de Coomassie, las bandas grises corresponden al bandeo que solo fue observado con plata.

6.3.2 Perfil proteico de SN de cultivos de *A. flavus* en CPD

En las muestras de SN de cultivos en CPD no fue posible visualizar un bandeo en ninguna de ambas técnicas de tinción, como se observa en la **Figura 4**, por lo que no fue posible determinar el perfil proteico de estas muestras mediante estas técnicas.

Figura 4. SDS-PAGE al 10% SN de cultivos *A. flavus* en CPD.



En el primer y cuarto carril se observa el marcador de peso molecular (PM). **A.** Carril representativo del gel teñido con plata, todos los carriles del gel mostraron un bandeo similar. **B.** Carril representativo del gel teñido con azul de Coomasie, todos los carriles del gel mostraron un bandeo similar.

6.4. Zimografía

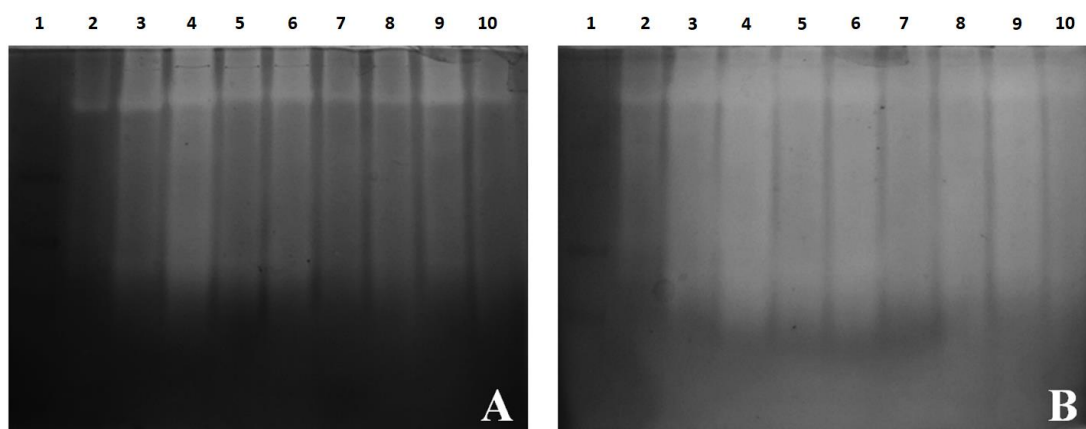
Mediante la técnica de zimografía, se determinó la actividad proteolítica al emplear gelatina como sustrato para su degradación. Esta es un sustrato general para el estudio de actividad proteolítica específica para la degradación de colágeno.

Se seleccionaron al azar tres muestras de cada día evaluado y se formaron tres grupos de muestras, cada uno con una muestra por día. Esto se realizó de igual forma para las muestras de cada uno de los medios de cultivo. Para cada grupo se elaboraron zimogramas al 10% copolimerizados con 0.2% de gelatina y se incubaron a 22 y 37° C, en valores de pH de 5, 7 y 9. La actividad proteolítica presente en las muestras se evidenció mediante la degradación del sustrato, que se observa como un bandeo sin pigmento. Al no observarse actividad el día 1, se descartaron las muestras de este día. Inicialmente se cargaron 25 µl. de muestra (3.2 µg. de PT en SN de cultivos de grano de maíz y 1.4 µg. de PT en SN de cultivos CPD) en cada carril.

Al comparar los geles incubados en cada una de las temperaturas probadas se observó actividad proteolítica en ambas, sin ninguna diferencia en el patrón o perfil proteolítico, sin embargo, fue posible observar una mayor degradación en los geles incubados a 37 °C, por lo que se decidió continuar únicamente con esta temperatura de incubación para los siguientes ensayos. Los resultados de la incubación en ambas temperaturas se muestran en la **Figura 5**.

De igual forma no fue posible observar diferencia en el patrón de actividad proteolítica tras la incubación a distintas temperaturas. A 37 °C se observa una mayor degradación que complica la observación de un bandeo definido, indicando mayor actividad proteolítica, por lo que se ajustó el volumen de muestra de ambos medios de cultivo a 5 µl. por carril (0.65 µg. de PT en SN de cultivos de grano de maíz y 0.28 µg. de PT en SN de cultivos CPD).

Figura 5. Zimogramas al 10% copolimerizados al 0.2% con gelatina de SN de cultivos *A. flavus* en grano de maíz a pH 7.



A. incubación a 22°C, **B.** incubación a 37°C. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. A partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva.

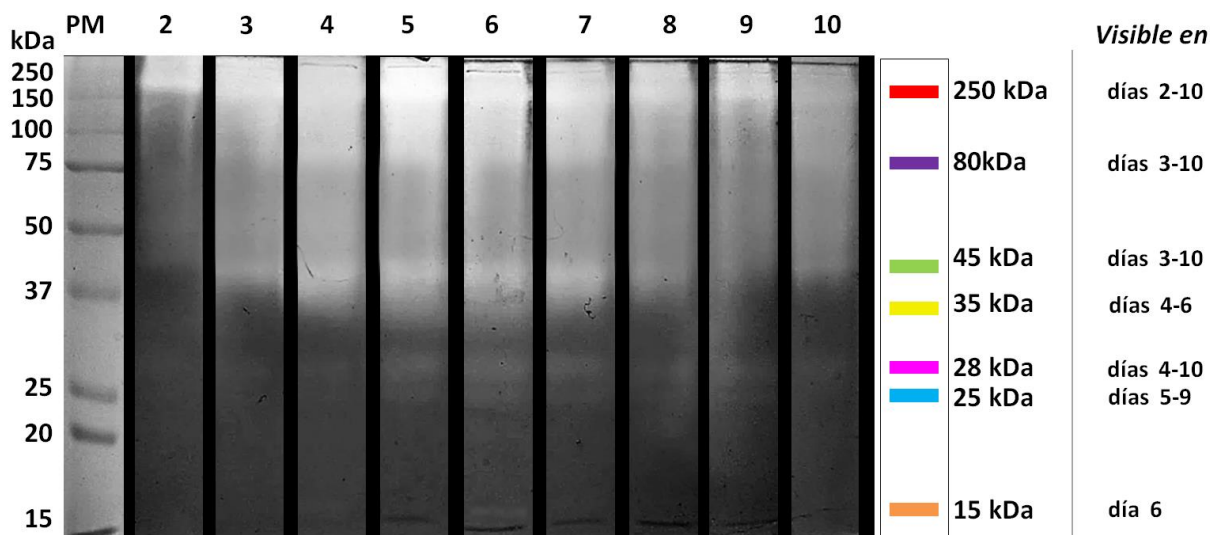
Una vez estandarizada la técnica, se realizó el corrimiento electroforético de las muestras de cada uno de los grupos. En los tres geles de cada grupo, incubados en las mismas condiciones, pudo observarse un bandeo similar a lo largo de los días evaluados.

6.4.1 Zimografía de SN de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz

En las muestras de SN de cultivos de grano de maíz se identificaron proteasas con un peso molecular de 250 kDa, 80 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 28 kDa, y 25 kDa al ser incubadas en amortiguadores de activación con pH de 5, 7 y 9. La expresión de estas proteasas se observó constante a lo largo de todos los días evaluados, sin observarse un patrón de secreción asociado a los días de incubación. Adicionalmente fue posible observar una proteína activa con un peso molecular de 15 kDa que se presentó entre los días 3-7 en algunos ensayos, sin embargo, esta proteasa se mantuvo constante en el día 6, véase **Figuras 6-8.**

En los zimogramas incubados en un pH de 5, se identificaron proteínas con actividad proteolítica a los 250 kDa, 80 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 25 kDa y 15 kDa presentes durante todos los días con un grado de actividad similar, observándose mayor actividad a partir del día 3. Solo en el día 6 se observó actividad a los 15 kDa, los resultados pueden observarse en la **Figura 6**.

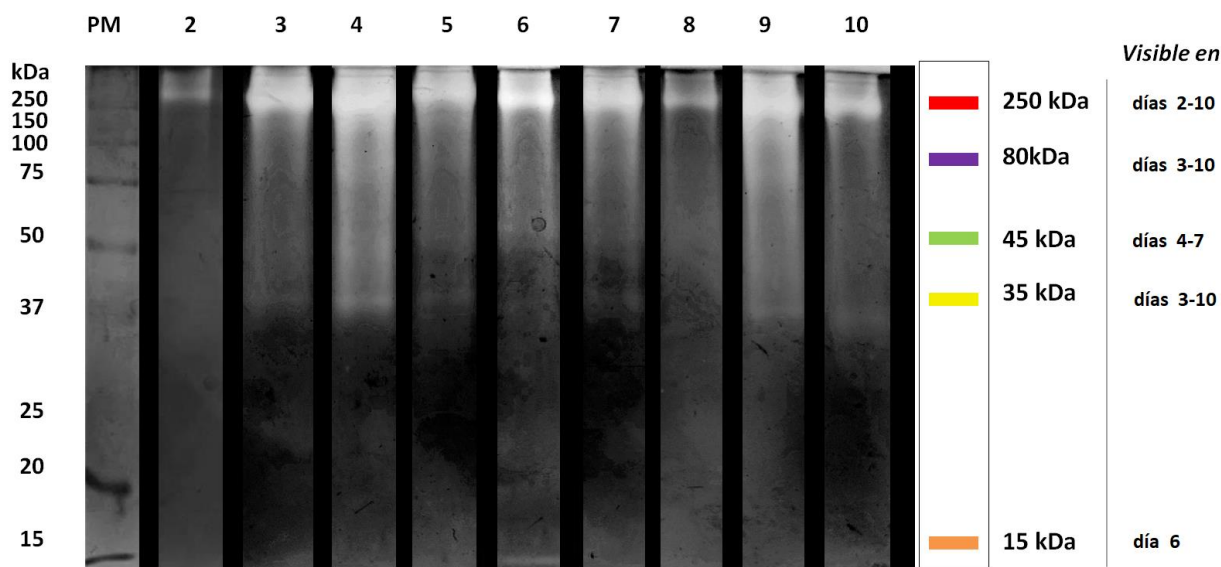
Figura 6. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina SN de cultivos *A. flavus* en grano de maíz a pH 5.



En el primer carril se observa el marcador de peso molecular. A partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los gels mostraron un bandeo similar.

En los zimogramas incubados a un pH de 7 se identificaron proteínas con actividad proteolítica a los 250 kDa, 80 kDa, 45 kDa, y 35 kDa presentes durante todos los días con un grado de actividad similar, observándose mayor actividad a partir del día 3. Nuevamente, solo en el día 6 se observó actividad a los 15 kDa. Esta actividad también se presentó entre los días 3-7 en algunos ensayos, sin embargo, esta proteasa se mantuvo constante durante el día 6. Resultados observables en la **Figura 7**.

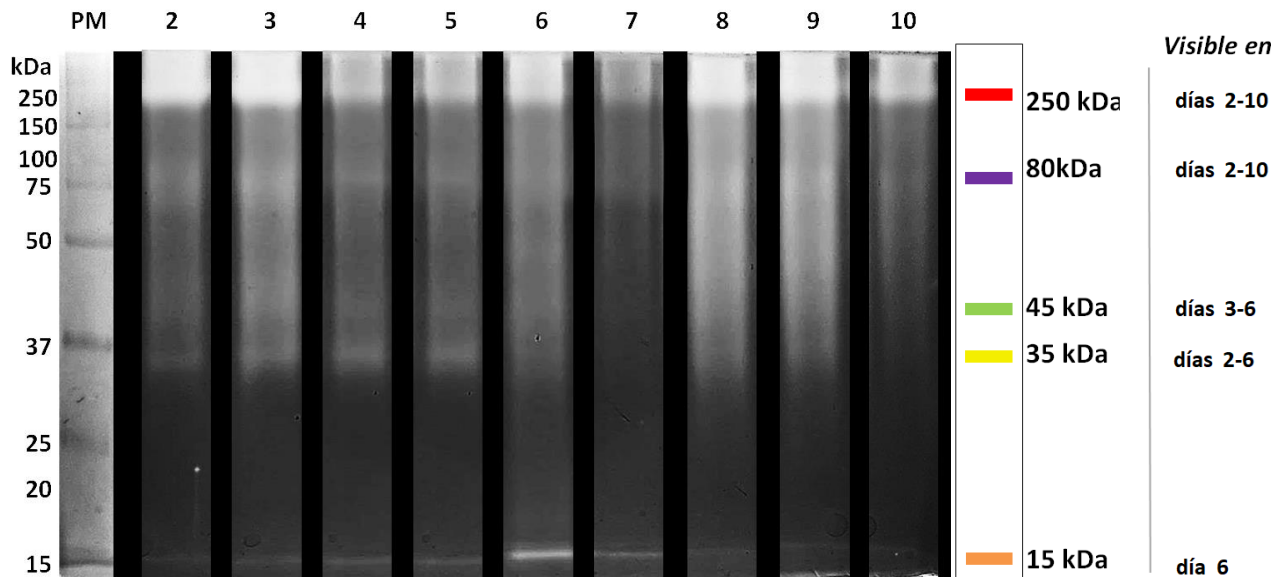
Figura 7. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de SN de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz a pH 7.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los geles mostraron un bandeo similar.

Al incubar los zimogramas en un pH 9 se identificaron proteínas con actividad proteolítica a los 250 kDa, 80 kDa, 45 kDa, y 35 kDa presentes durante todos los días con un grado de actividad similar, observándose mayor actividad a partir del día 3. Además, entre los días 3-7 en algunos ensayos, se observó actividad a los 15 kDa, sin embargo esta proteasa solo se mantuvo constante en el día 6. Estos resultados se muestran en la **Figura 8**.

Figura 8. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de SN de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz a pH 9.



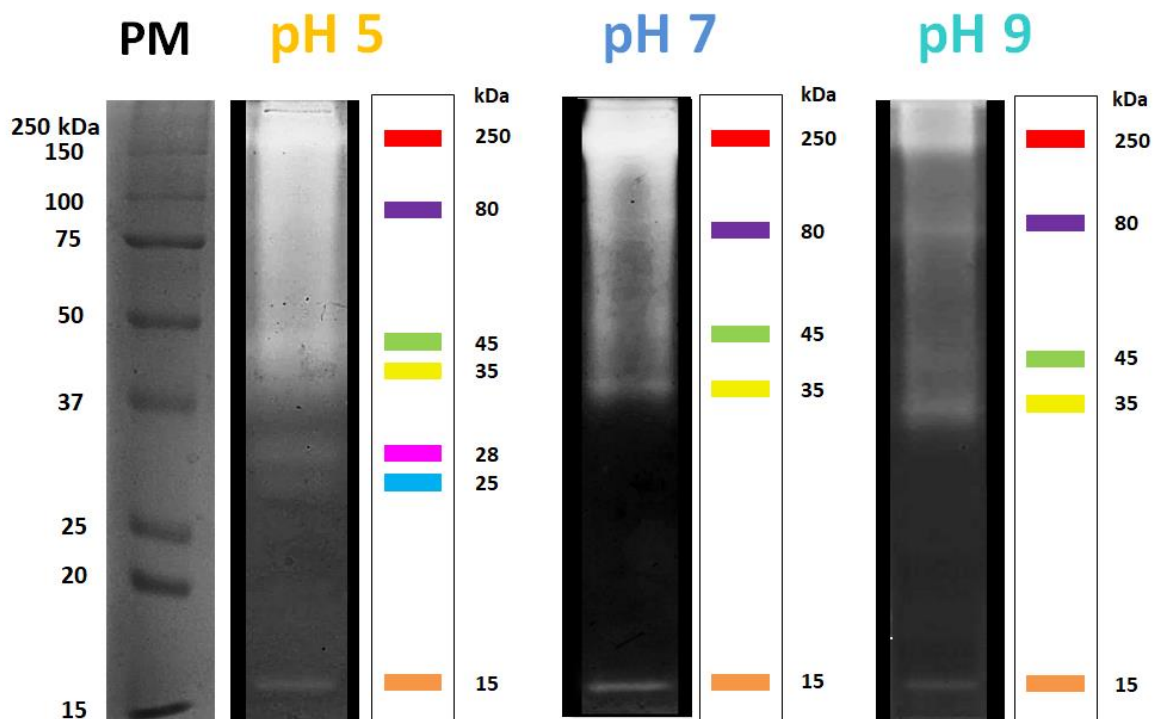
En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los gels mostraron un bandeo similar.

Al realizar una comparación entre la actividad proteolítica evidenciada en cada uno de los valores de pH de incubación evaluados, como se muestra en la **Figura 9**, se observa que solo en pH 5 se observó la presencia de actividad proteolítica a los 28 kDa (banda rosa) y 25 kDa (banda azul). La actividad del resto de las proteasas identificadas es constante en los distintos valores de pH. Se comparó la actividad del día 6 de cada pH ya que se observó que este fue el día en el que se expresaron todas las proteínas activas identificadas.

El efecto de las variaciones en el pH de activación fue visible. En los tres valores de pH se observó actividad proteolítica, con una mayor degradación del sustrato al ser incubadas a pH 5 y 7 a comparación de pH 9. Las proteasas tuvieron una mayor actividad proteolítica en pH 5, véase **Figura 9**, indicando que el rango óptimo de pH para la actividad de estas proteasas se encuentra entre 5 y 7.

El pH 5 también tuvo efecto en el perfil de actividad proteolítica observada, ya que en este ensayo se pudieron identificar dos proteasas más con un peso molecular de 28 y 25, como es posible observar en la **Figura 9**, carril 2. Esto demuestra que para estas dos proteasas el pH de activación corresponde a un pH ácido, clasificándolas así como proteasas ácidas.

Figura 9. Comparativa de actividad proteolítica de SN de cultivos de *A. flavus* en el día 6 de crecimiento en grano de maíz a pH 5, 7, y 9.

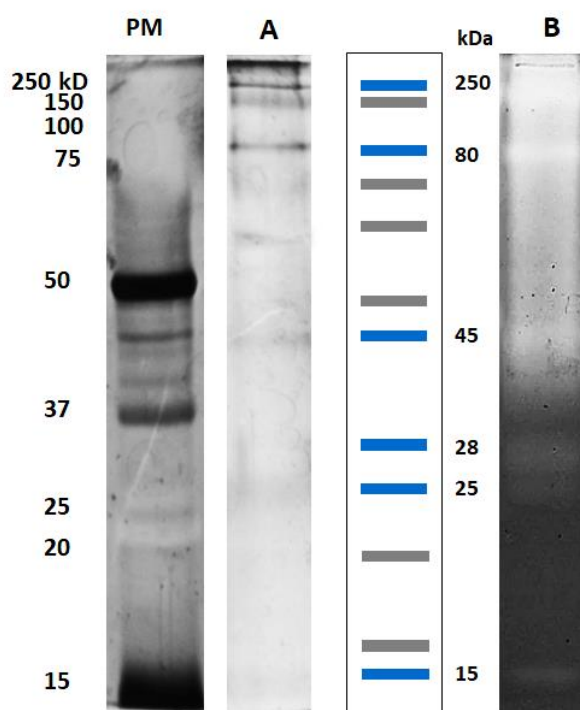


En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). Los siguientes tres carriles corresponden a los zimogramas a distintos pH de incubación, y a la derecha cada uno se esquematiza el bandeo correspondiente a las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares.

Se comparó el perfil proteico de los SN, con la actividad proteolítica detectada por zimografía para confirmar las proteínas activas y sus respectivos pesos moleculares.

En el caso de las muestras de SN de cultivos en grano de maíz, al comparar los geles de perfil proteico y zimografía, fue posible observar que seis de las proteínas identificadas en los geles de tinción de plata, poseen actividad enzimática capaz de degradar la gelatina de los geles. Los resultados de estas pruebas se presentan en la **Figura 10**.

Figura 10. Comparativa de perfil proteico y actividad proteolítica del SN de cultivos *A. flavus* en grano de maíz.

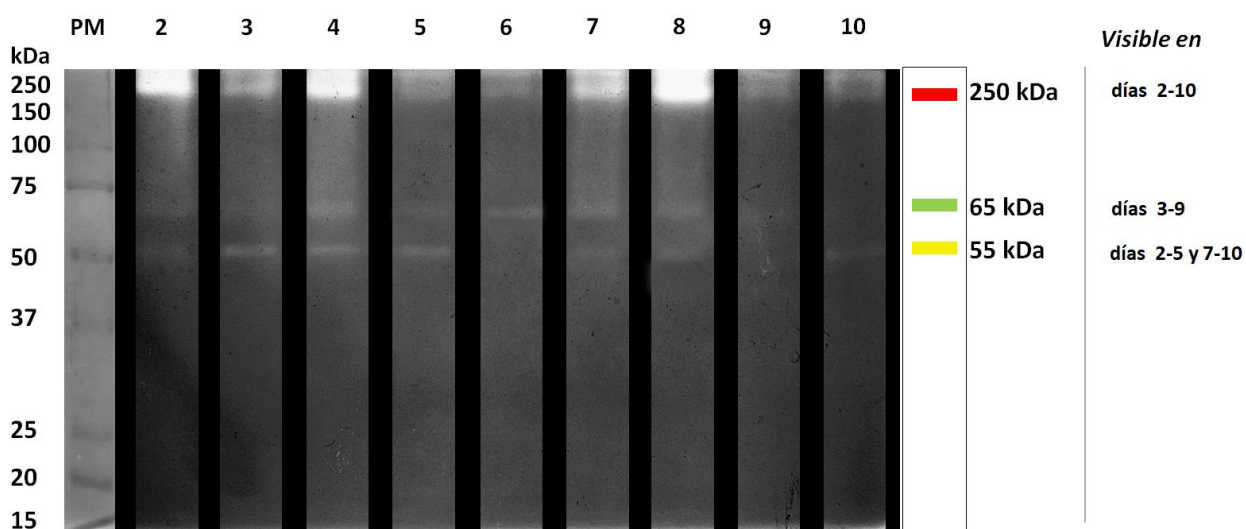


En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular. **A.** Perfil proteico de la muestra por SDS-PAGE al 10% y tinción de plata. **B.** Actividad proteolítica de la muestra por SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.2% . Al centro se esquematiza el patrón de bandeado de la muestra, con azul se marcan las bandas que también pudieron observarse en el zimograma, así como sus pesos moleculares.

6.4.2 Zimografía de SN de cultivos de *A. flavus* en CPD

En los zimogramas incubados a un pH de 5 se identificaron proteasas con pesos moleculares de 250 kDa, 65 kDa y 55 kDa presentes a lo largo de todos los días evaluados, en distinta proporción, observándose mayor actividad en el día 2, 4, 7 y 8, véase **Figura 11**.

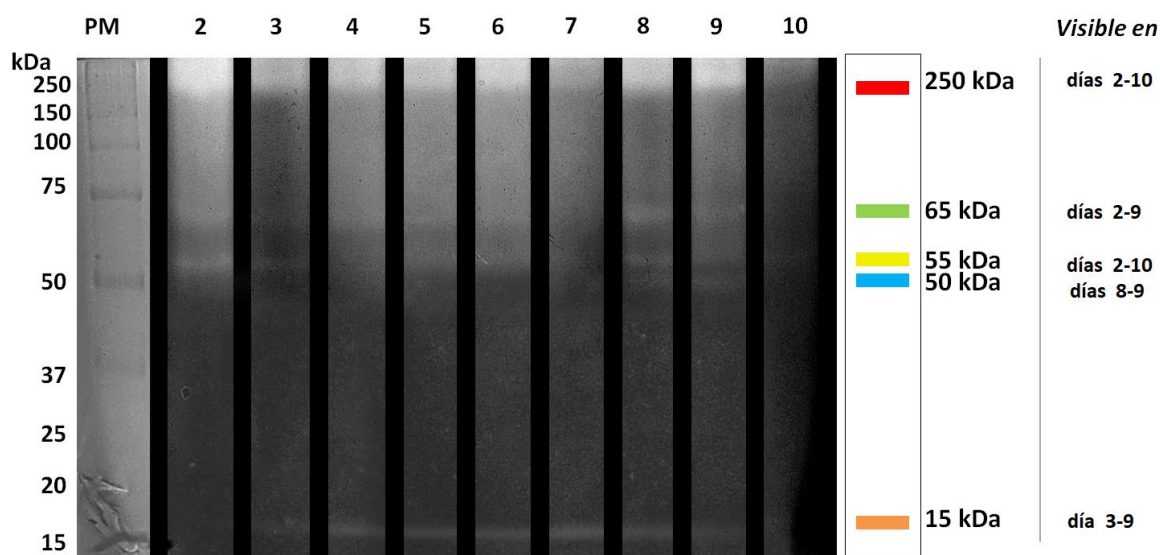
Figura 11. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de SN de cultivos de *A. flavus* en CPD a pH 5.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los gels mostraron un bandeo similar.

En los zimogramas en un pH de incubación de 7 se identificaron proteínas con actividad proteolítica a los 250 kDa, 65 kDa, 55 y 50 kDa y presentes a lo largo de todos los días evaluados, en distinta proporción, observándose mayor actividad en el día 2, 8 y 9. Adicionalmente se observa una proteína activa de 15 kDa presente a partir del día 2 hasta el día 10, como puede observarse en la **Figura 12**.

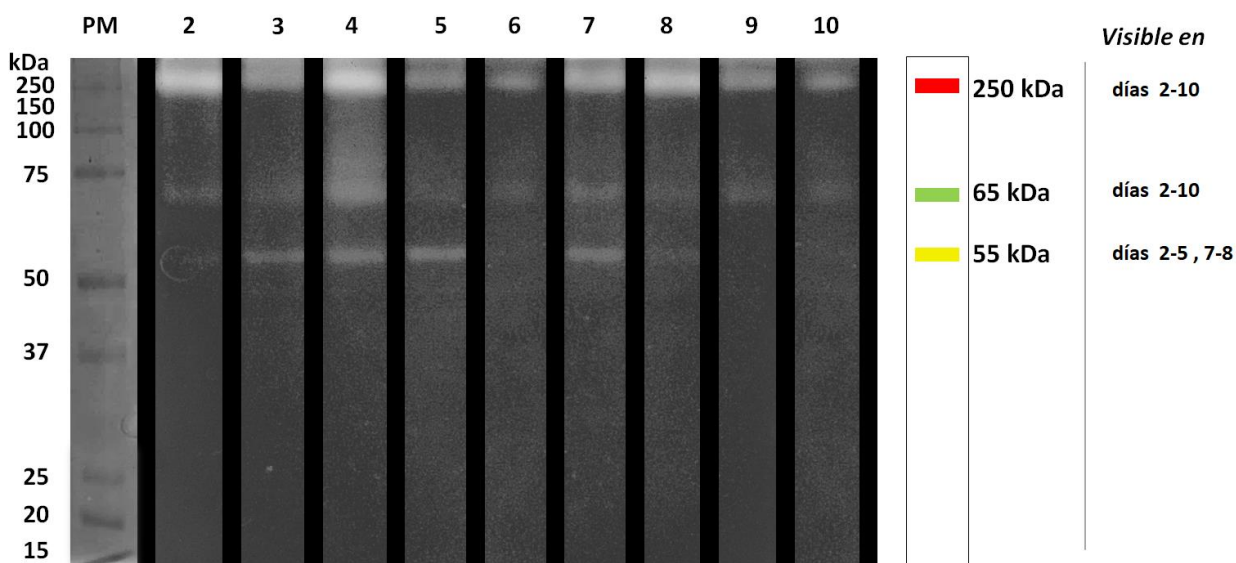
Figura 12. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de SN de cultivos de *A. flavus* en CPD a pH 7.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los geles mostraron un bandeo similar.

En los zimogramas incubados a un pH de 9 se identificaron proteínas con actividad proteolítica a los 250 kDa, 65 kDa y 55 kDa presentes a lo largo de todos los días evaluados, en distinta proporción, observándose mayor actividad en el día 2, 4 y 8. Estos resultados se muestran en la **Figura 13**.

Figura 13. SDS-PAGE al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de SN de cultivos de *A. flavus* en CPD a pH 9.



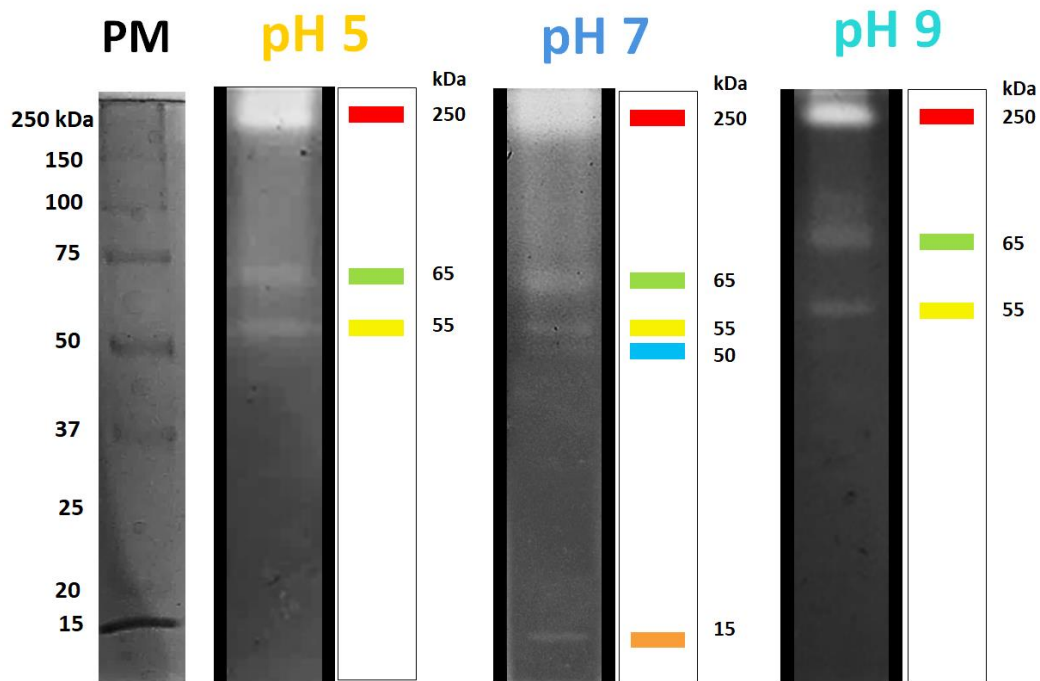
En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, a partir del carril 2 se visualizan las muestras del día 2 al 10 de manera consecutiva. A la derecha se esquematiza el patrón de bandas formado por las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. En el extremo derecho se indican los días en los que cada una de las proteasas fue visible. Gel representativo de tres ensayos realizados, todos los gels mostraron un bandeo similar.

Se comparó el desempeño de la actividad proteolítica presente en las muestras de SN de cultivos de CPD a distintos valores de pH de incubación, como se muestra en la **Figura 14**. La comparación se hizo con las muestras del día 8 de cada pH ya que se observó que este fue el día en el que se expresaron todas las proteínas activas identificadas.

Es posible apreciar que solo en pH 7 se observó la presencia de actividad proteolítica a los 50 kDa (banda azul) y 15 kDa (banda naranja), lo que clasificaría a estas dos proteínas activas como proteasas neutras al solo mostrarse activas en este valor de pH.

La actividad del resto de las proteínas identificadas es constante en los distintos valores de pH, ya que no se observó diferencia en el grado de actividad entre los valores de pH de activación que se probaron, lo que indica la estabilidad de estas tres proteasas (250, 65, y 55 kDa) frente a esta variable.

Figura 14. Comparativa de actividad proteolítica de SN de cultivos de *A. flavus* al día 8 de crecimiento en CPD a pH 5, 7, y 9.

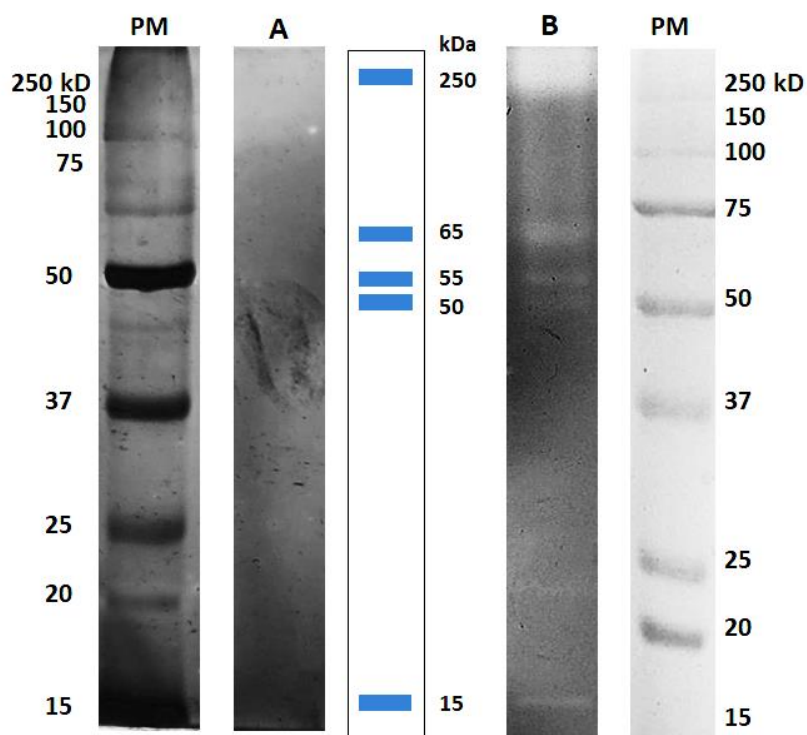


En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). Los siguientes tres carriles corresponden a los zimogramas a distintos pH de incubación, y a la derecha cada uno se esquematiza el bandeo correspondiente a las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares.

Para estas muestras también se compararon los resultados del perfil proteico con la actividad proteolítica detectada por zimografía para confirmar las proteínas activas y sus respectivos pesos moleculares.

A diferencia de las muestras de SN de cultivos en grano de maíz, en las muestras de SN de cultivos en CPD, no fue posible visualizar el perfil proteico de las muestras, sin embargo, sí se pudo determinar la presencia de proteasas. Estos resultados se presentan en la **Figura 15**.

Figura 15. SDS-PAGE al 10% SN de cultivos *A. flavus* en CPD.



En el primer y cuarto carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). **A.** Carril representativo del perfil proteico de la muestra por SDS-PAGE al 10% y tinción de plata. **B.** Carril representativo de la actividad proteolítica de la muestra por SDS- PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.2% .

6.5. Caracterización bioquímica de proteasas de *A. flavus*

La caracterización bioquímica de las proteasas identificadas en los sobrenadantes de los distintos medios de cultivo de *A. flavus*, se realizó empleando inhibidores de actividad proteolítica. Se probaron cuatro inhibidores, PMSF para serina-proteasas, EDTA para metaloproteasas dependientes de Ca, PHMB para cisteína-proteasas y 1,10-fenantrolina para metaloproteasas dependientes de Zn. Los valores de pH de incubación probados fueron 5 y 9, ya que en estos dos pH se observaron variaciones en el perfil proteico.

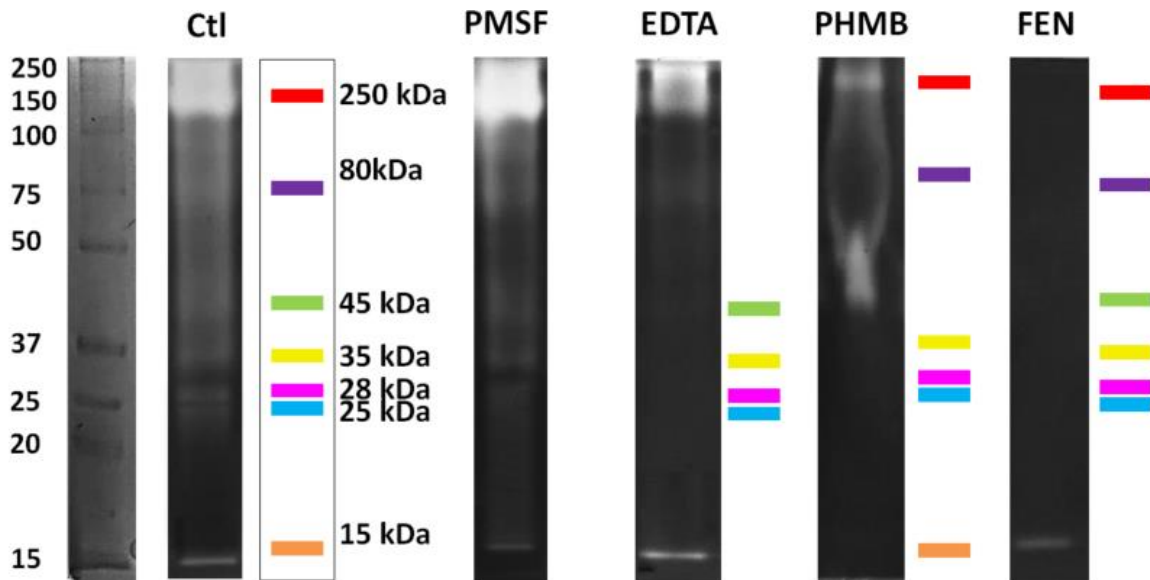
6.5.1 Caracterización bioquímica de proteasas en SN de cultivos en grano de maíz

Las proteasas identificadas en el SN de cultivos en grano de maíz con pesos de 35, 28 y 25 kDa fueron inhibidas por PHMB, 1,10-fenantrolina y EDTA, mientras que aquellas con peso molecular de 250 y 80 kDa fueron inhibidas con PHMB y 1,10-fenantrolina, como se observa en las **Figuras 17 y 18**, carriles EDTA, PHMB y FEN. Esto permite caracterizarlas como cisteína-metaloproteasas, lo que indicaría tanto la presencia de un residuo de cisteína, como de iones en el sitio catalítico de las enzimas.

La proteasa con peso molecular de 45 kDa únicamente fue inhibida tanto por EDTA como por 1, 10 fenantrolina, como puede apreciarse en las **Figuras 17 y 18**, carriles EDTA y FEN. Estos hallazgos la clasifican como una metaloproteasa, indicando la existencia de algún ion en su sitio catalítico.

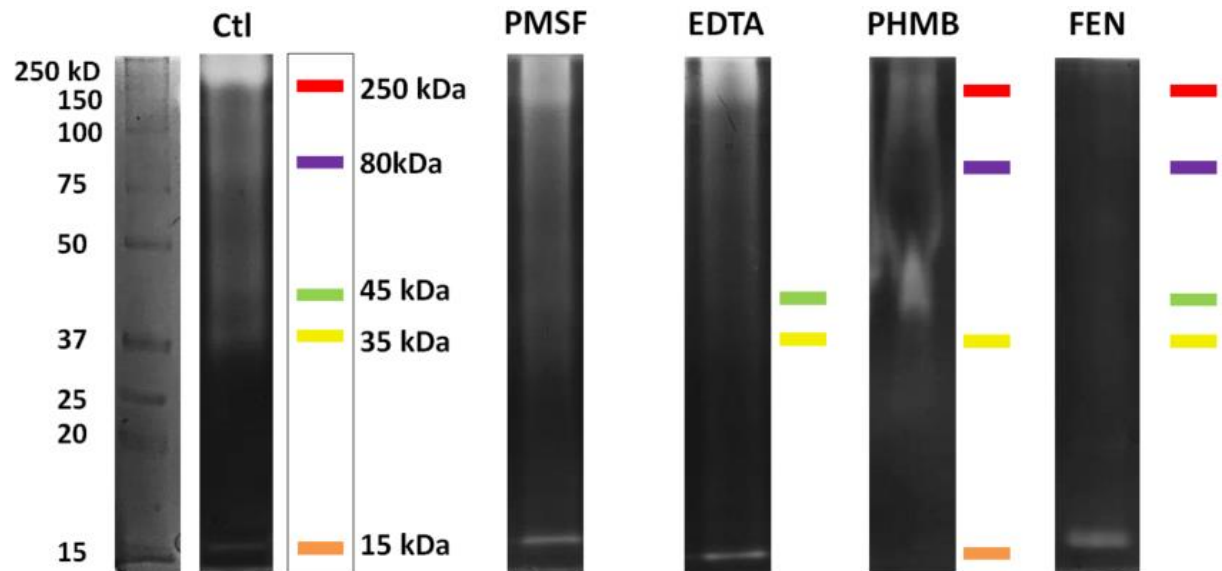
La proteasa identificada con 15 kDa únicamente fue inhibida con PHMB, véase **Figuras 16 y 17**, carril PHMB. Esto indica que únicamente posee un residuo del aminoácido cisteína en su sitio activo, lo que la clasifica como cisteína-proteasa

Figura 16. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina con inhibidores de proteasas de SN de cultivos de *A. flavus* en el día 8 de crecimiento en grano de maíz a pH 5.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo carril se observa un corrimiento control de la actividad proteolítica de la muestra sin inhibidores y a su derecha se esquematiza el bandeo de las proteínas activas y sus pesos moleculares. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se observan las muestras tratadas con los inhibidores PMSF, EDTA, PHMB y 1,10-fenantrolina respectivamente. Las bandas a un costado de cada carril corresponden a las proteínas que fueron inhibidas en cada caso. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

Figura 17. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina con inhibidores de proteasas de SN de cultivos de *A. flavus* en el día 8 de crecimiento en grano de maíz a pH 9.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo carril se observa un corrimiento control de la actividad proteolítica de la muestra sin inhibidores, y a su derecha se esquematiza el bandeo de las proteínas activas y sus pesos moleculares. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se observan las muestras tratadas con los inhibidores PMSF, EDTA, PHMB y 1,10-fenantrolina, respectivamente. Las bandas a un costado de cada carril corresponden a las proteínas que fueron inhibidas en cada caso. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

Tabla 4. Actividad de proteasas presentes en SN de grano de maíz después de su tratamiento con inhibidores.

PM	PMSF	EDTA	PHMB	FEN	Clasificación
■ 250 kDa	+++	+++	++	+	Cisteína- metalo proteasa
■ 80 kDa	+++	+++	+	+	Cisteína- metalo proteasa
■ 45 kDa	+++	+	+++	+	Metal proteasa
■ 35 kDa	+++	+	++	+	Cisteína- metalo proteasa
■ 28 kDa	+++	+	+	+	Cisteína- metalo proteasa
■ 25 kDa	+++	+	+	+	Cisteína- metalo proteasa
■ 15 kDa	+++	+++	+	+++	Cisteína proteasa

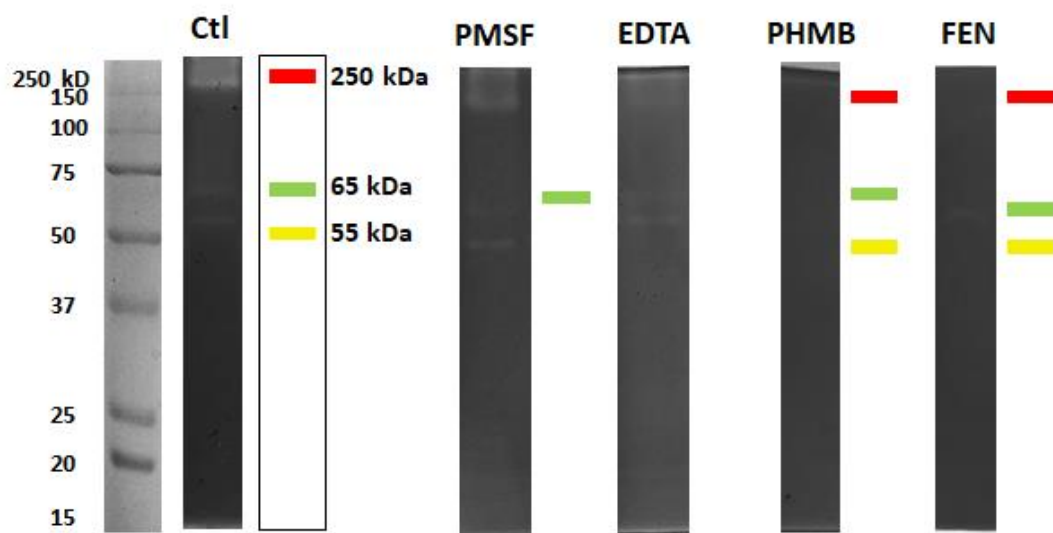
Las cruces indican el grado de actividad de cada una de las proteasas tras su tratamiento con inhibidores (+++ activa, ++ parcialmente activa, + sin actividad). En el recuadro rojo se señalan las proteasas que fueron inhibidas por PHMB y 1, 10-fenantrolina. En el recuadro azul se observan las proteasas inhibidas con EDTA; PHMB y 1, 10-fenantrolina.

6.5.2 Caracterización bioquímica de proteasas en SN de cultivos en CPD

En cuanto a las proteasas identificadas en el SN de cultivos en CPD tanto la proteasa de 250 kDa, como la de 55 kDa se vieron inhibidas parcialmente por EDTA y completamente por PHMB y 1,10-fenantrolina, clasificándose como cisteína-metal proteasas, es decir, existe tanto la presencia de un residuo de cisteína, como de iones en el sitio catalítico de estas proteasas. Estos resultados pueden observarse en las **Figuras 18 y 19**, carriles EDTA, PHMB y FEN.

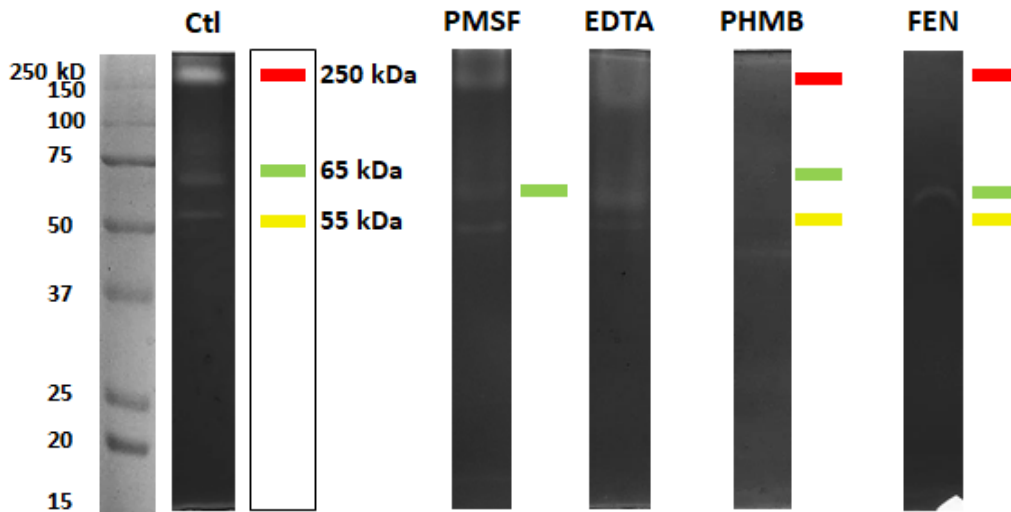
Por otro lado, la proteasa de 65 kDa fue inhibida parcialmente por EDTA, y de manera completa tanto por PHMB, 1,10-fenantrolina, y adicionalmente por PMSF, lo que podría indicar la presencia de un residuo de cisteína y de iones en su sitio catalítico. Véase **Figuras 18 y 19**, carriles EDTA, PHMB y PMSF.

Figura 18. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina con inhibidores de proteasas de SN de cultivos de *A. flavus* en el día 4 de crecimiento en CPD a pH 5.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo carril se observa un corrimiento control de la actividad proteolítica de la muestra sin inhibidores, y a su derecha se esquematiza el bandeo de las proteínas activas y sus pesos moleculares. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se observan las muestras tratadas con los inhibidores PMSF, EDTA, PHMB y 1,10-fenantrolina respectivamente. Las bandas a un costado de cada carril corresponden a las proteínas que fueron inhibidas en cada caso. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

Figura 19. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina con inhibidores de proteasas de SN de cultivos de *A. flavus* en el día 4 de crecimiento en CPD a pH 9.



En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo carril se observa un corrimiento control de la actividad proteolítica de la muestra sin inhibidores, y a su derecha se esquematiza el bandeo de las proteínas activas y sus pesos moleculares. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se observan las muestras tratadas con los inhibidores PMSF, EDTA, PHMB y 1,10-fenantrolina respectivamente. Las bandas a un costado de cada carril corresponden a las proteínas que fueron inhibidas en cada caso. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

Tabla 5. Actividad de proteasas presentes en SN de CPD después de su tratamiento con inhibidores.

PM	PMSF	EDTA	PHMB	FEN	Clasificación
250 kDa	+++	+++	+	+	Cisteína-metaloproteasa
65 kDa	++	+++	+	+	Cisteína-metaloproteasa
55 kDa	+++	+++	++	++	Cisteína-metaloproteasa

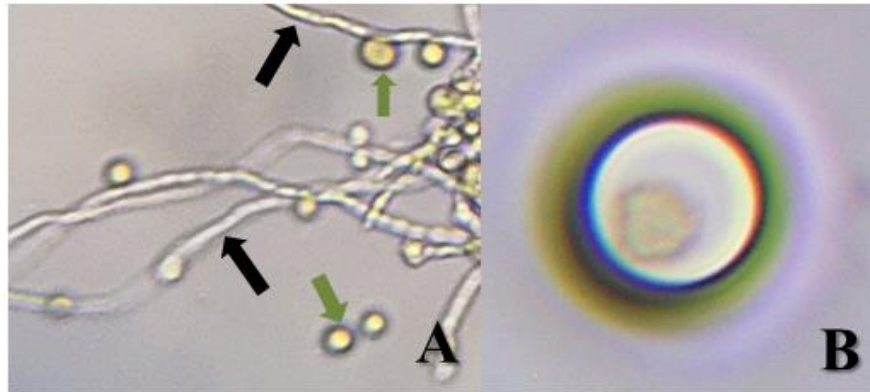
Las cruces indican el grado de actividad de cada una de las proteasas tras su tratamiento con inhibidores (+++ activa, ++ parcialmente activa, + sin actividad). En un recuadro verde se señalan las proteasas que fueron inhibidas por PMSF, PHMB y 1, 10-fenantrolina. Las proteasas de 250 y 55 kDa únicamente fueron inhibidas por PHMB y 1, 10-fenantrolina. Ninguna proteasa fue inhibida por EDTA.

6.6. Rompimiento de estructuras fúngicas por choque térmico

Después de analizar las muestras de extracto (EXT) mediante la técnica de SDS-PAGE y no observar la presencia de proteínas, se realizó el tratamiento de choque térmico en las muestras de tres de los días evaluados (días 2, 3 y 6) con el fin de romper la membrana celular de estas estructuras y así liberar las proteínas que pudieran estar contenidas en su interior. Tras el tratamiento, se realizó una inspección microscópica de frotis de la muestra tratada, así como de una muestra sin tratar para su comparación. Al observar ambos frotis, se identificaron diferencias en la morfología de las estructuras de ambas muestras.

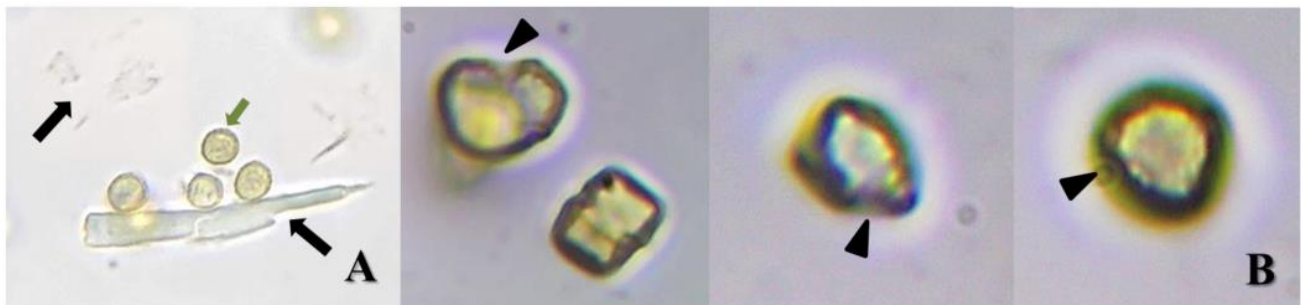
En los frotis de EXT sin tratamiento se observó la presencia de hifas y esporas completas, con una pared celular lisa, intacta y las esporas con una forma perfectamente esférica como puede apreciarse en la **Figura 20**. Por otro lado, en los frotis de EXT sometido a choque térmico no se encontró la presencia de hifas completas, únicamente se encontraron fragmentos de estas y esporas exhibiendo una pared celular tortuosa, arrugada, de grosor inconsistente y fraccionada, que dio formas irregulares a las esporas, veáse **Figura 21**. Estas observaciones evidencian el daño provocado en las paredes celulares de estas estructuras, permitiendo así la salida de su contenido al exterior.

Fig 20. Micrografías de estructuras fúngicas presentes en el EXT de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz antes del tratamiento de choque térmico. 100X.



A. Frotis de EXT sin tratamiento de choque térmico. Se observa la presencia de hifas (flecha negra) y esporas (flecha verde) intactas. **B.** Espora intacta, sin tratamiento térmico. Daniela Gama, 2023.

Fig 21. Micrografías de las esporas presentes en el EXT de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz después del tratamiento de choque térmico. 100X.



A. Frotis de EXT con tratamiento de choque térmico. Se observan hifas fragmentadas y detritus celulares (flecha negra) y esporas (flecha verde) con daño en su membrana. **B.** Esporas después de tratamiento de choque térmico. Nótese el daño en la pared celular (cabezas de flecha). Daniela Gama, 2023.

6.6.1 Ensayos preliminares de las muestras de EXT de grano de maíz después del tratamiento de choque térmico

6.6.1.1 Cuantificación de proteína

Con el fin de evaluar la cantidad de proteína presente en las muestras de EXT de cultivos en grano de maíz después del choque térmico, se realizó la cuantificación de proteína tota (PT). Los resultados mostraron concentraciones de proteína > a 100 µg., demostrando la presencia de proteína en las muestras.

Tabla 6. Valores de proteína total en EXT de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz después de tratamiento de choque térmico.

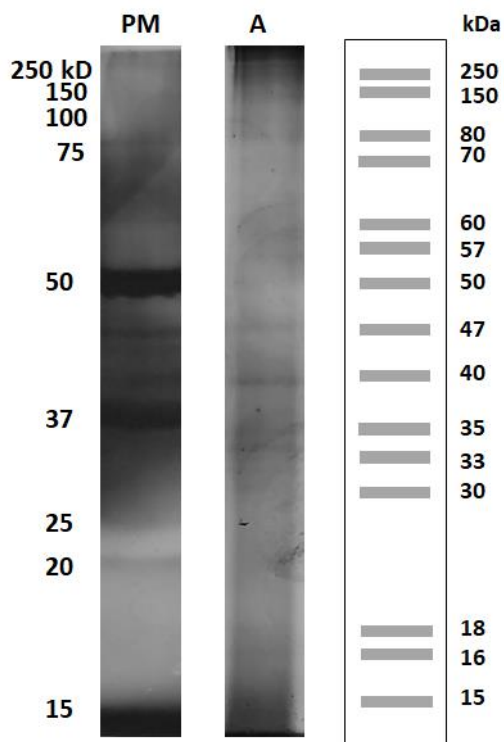
<i>Día</i>	<i>PT en EXT de cultivos en grano de maíz µg/ml</i>
2	140.13
3	267.41
6	498.91

Valores de proteína total/ml. obtenidos para las muestras de tres de los días evaluados (días 2, 3 y 6).

6.6.1.2 SDS- PAGE

Al analizar las muestras de EXT en los geles de perfil proteico con las muestras inicialmente obtenidas, no se observó algún bandeo. Después del tratamiento de choque térmico, se realizó nuevamente el corrimiento electroforético de las muestras y se tiñó el gel con plata. En este ensayo fue posible evidenciar la presencia de una serie de proteínas de distintos pesos moleculares conformando el perfil proteico de la muestra, el cual se observó constante a lo largo de los 9 días evaluados, como puede observarse en la **Figura 22**.

Figura 22. SDS-PAGE al 10% EXT tratado con choque térmico de cultivos *A. flavus* en grano de maíz.



En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). **A.** Perfil proteico de la muestra. Carril representativo del gel teñido con plata, todos los carriles del gel mostraron un bandeo similar. A la derecha se esquematiza el patrón de bandeo de las proteínas presentes en la muestra, así como su peso molecular.

6.6.1.3 Zimografía

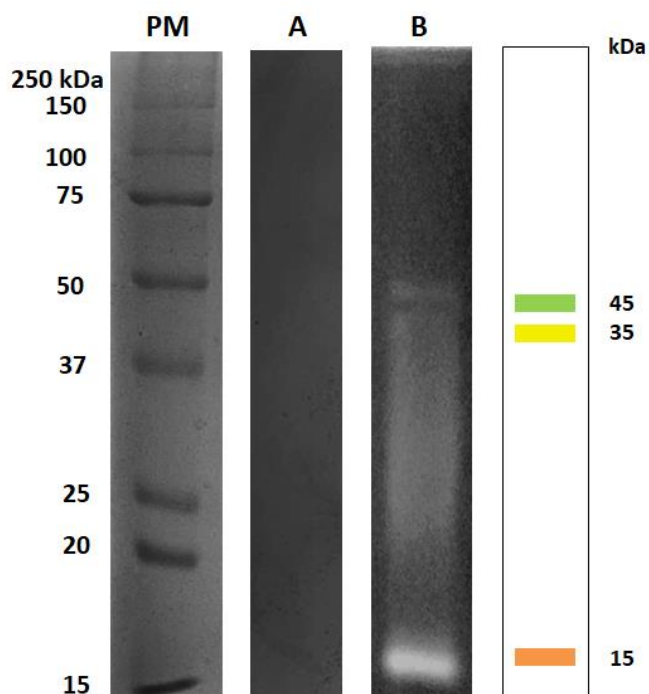
Por último se realizó el corrimiento de los zimogramas de las muestras de EXT de cultivos de grano antes y después del tratamiento de choque térmico con el objetivo de conocer la actividad proteolítica de las muestras. Se emplearon las muestras del día 6 a un pH 5 de incubación ya que fue durante este día y a este valor de pH donde se observó la presencia de todas las proteasas identificadas en cultivos de grano de maíz.

En los zimogramas elaborados con las muestras antes de recibir el tratamiento térmico no se observó ningún bandeo que indicara la degradación del sustrato en el gel por lo que se sometió la muestra a un tratamiento de choque térmico y al realizar los zimogramas

nuevamente, se logró evidenciar la presencia de proteínas activas. Se observó un bandeo a los 45, 35 y 15 kDa , como se aprecia en la **Figura 23**.

Estos resultados demuestran que esta actividad solo fue visible tras el tratamiento de choque térmico, sugiriendo que inicialmente las proteasas se encontraban dentro de las estructuras fúngicas presentes en la muestra (hifas y esporas), y que tras el tratamiento sufrieron alteraciones en su membrana que permitieron su salida.

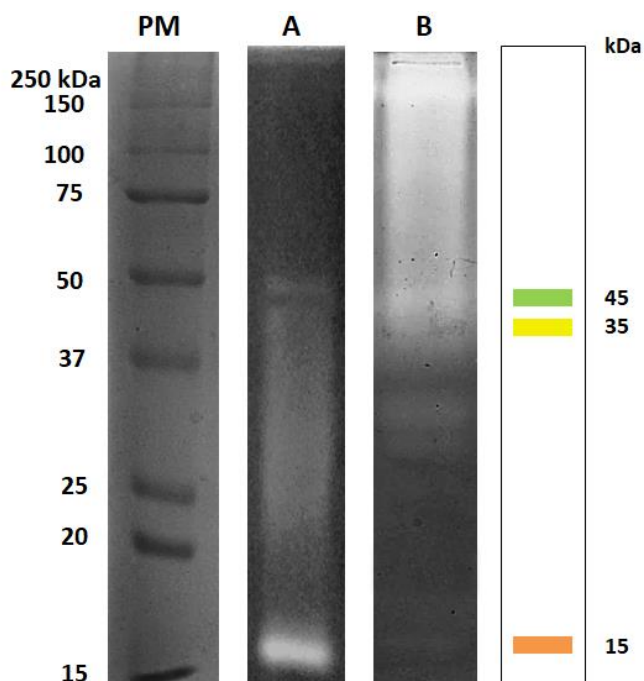
Figura 23. Zimograma al 10% copolimerizado al 0.2% con gelatina de EXT de cultivos de *A. flavus* en grano de maíz al día 6 en pH 5.



En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM) **A.** Zimograma de EXT de cultivos en grano de maíz antes del tratamiento térmico. **B.** Zimograma de EXT de cultivos en grano de maíz después del tratamiento térmico. A la derecha se muestra un esquema del bandeo correspondiente a las proteínas con actividad proteolítica, así como sus pesos moleculares. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

Al comparar la actividad observada en estos zimogramas, con los zimogramas de SN de cultivos en grano de maíz, véase **Figura 24**, puede observarse que las proteasas identificadas en este ensayo con pesos moleculares de 45, 35 y 15 kDa, coinciden con las proteasas que se identificaron en los zimogramas de SN de cultivos del mismo medio, lo que podría sugerir que se trate de las mismas proteasas.

Figura 24. Comparativa de actividad proteolítica de EXT y SN de cultivos de *A. flavus* al día 6 de crecimiento en grano de maíz a pH 5.



En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). A. Zimograma de EXT con tratamiento de choque térmico, pH de incubación de 5. B. Zimogramas de SN de cultivos en grano de maíz. A la derecha se esquematiza el bandeo correspondiente a las proteasas en común de estas dos muestras, así como sus pesos moleculares. Carriles representativos de tres ensayos realizados, todos mostraron un bandeo similar.

A pesar de que no se realizó la caracterización de la actividad proteolítica de las muestras de EXT de cultivos de grano de maíz después del tratamiento de choque térmico, al observar la presencia de proteasas con el mismo peso molecular de las identificadas y caracterizadas en el SN de cultivos del mismo medio, podría sugerirse que se trata de las mismas proteínas, con una alta probabilidad de expresar la misma naturaleza bioquímica.

7. DISCUSIÓN

Aspergillus flavus es un hongo que ha sido sujeto de diversas investigaciones previas debido a su importancia económica y su papel como patógeno en la salud animal y humana. Sin embargo, la identificación y caracterización de sus proteínas de secreción, particularmente sus proteasas, ha sido estudiada en menor medida.

Es por eso que el análisis de su actividad asociada a factores de tiempo y medios en los que crece, resulta relevante para ampliar el conocimiento respecto a su metabolismo y patogenicidad, tomando en cuenta distintas variables de crecimiento y actividad.

Mediante el conteo de esporas, se llevó a cabo la elaboración de una cinética de producción de esporas, que permite visualizar el comportamiento de *A. flavus* a lo largo de 10 días de incubación, de acuerdo a la cantidad de conidios que produce. Este método resulta útil para monitorear el crecimiento del hongo, ya que la producción de esporas es reflejo de su desarrollo y crecimiento (9).

La germinación de esporas, la proliferación de micelio y la producción de metabolitos son eventos sucesivos y no independientes (11). Una vez que la espora se expone a condiciones favorables, pasa de una célula latente a una metabólicamente activa, que tras una secuencia ordenada de pasos formará un micelio visible con conidióforos y sus conidios capaces de dar lugar a una nueva generación (9).

Las esporas observadas en el conteo son aquellas que surgen a partir de la culminación de este ciclo y uno nuevo. El incremento en los conteos de estas estructuras es reflejo del desarrollo de la colonia, propagación y formación de nuevos micelios con más conidios (10).

La observación de dos fases de crecimiento logarítmico, indican un patrón de crecimiento de tipo diaúxico. El crecimiento diaúxico describe las fases de crecimiento de un microorganismo a medida que metaboliza una mezcla de sustratos, generalmente azúcares. Durante la primera fase, las células metabolizan preferentemente el sustrato cuyo catabolismo es más eficiente. Después del agotamiento del primer sustrato, las células cambian al segundo sustrato de carbono. A menudo se registra un período estacionario entre las dos fases de crecimiento, debido al tiempo requerido para producir la enzima necesaria para metabolizar el segundo sustrato (59).

Además de observar el patrón de crecimiento, los resultados obtenidos permiten comparar el desarrollo del hongo en cada uno de los medios que se probaron analizando los valores referentes a la cantidad de esporas producidas (13).

La diferencia que existe entre los valores de esporas/ml. de ambos medios puede derivarse de la composición del medio de cultivo. El CPD es un medio líquido que si bien posee un componente de origen natural (extracto de papa), en su composición química también existen compuestos sintéticos, por lo que se le clasifica como un medio de cultivo semi sintético (3). A diferencia de este, el grano de maíz no solo representa un sustrato de origen natural, sino que igualmente es un huésped vegetal de esta especie (7). En estudios anteriores se ha encontrado que las esporas de hongos patógenos son más fiables cuando se obtienen de un sustrato donde está produciendo infección que cuando se obtienen de hongos que crecen en medios artificiales. Una espora obtenida del huésped presumiblemente posee todo su vigor natural, mientras que una espora obtenida de un hongo que crece en medios artificiales puede haber estado sujeta a una influencia

debilitante (17). El vigor de las esporas es un reflejo de su condición fisiológica y puede verse fuertemente influenciado por las condiciones ambientales y nutricionales (14).

Como se observó en la cinética de producción de esporas, cuando *A. flavus* crece en grano de maíz su metabolismo es más alto, esto se refleja en el vigor que expresa, determinado por una considerable diferencia en la producción de esporas en contraste con la cantidad de esporas que produce en el CPD y también puede observarse este efecto en la diferencia que pudo observarse en el perfil de actividad proteolítica, con la síntesis de una mayor variedad de proteasas cuando *A. flavus* crece en un medio natural como el grano de maíz.

Se ha observado que cuando se cultiva a *A. flavus* en medios con fuentes de nitrógeno de bajo peso molecular, se detecta poca o ninguna actividad de proteasa. Lo que explicaría también la diferencia entre el perfil proteico observado en el SN de cultivos en grano de maíz y de CPD. Los granos de maíz proporcionan una variedad de proteínas de alto peso molecular como globulinas (60), esto podría estar relacionado con la amplia expresión de proteínas activas observadas en el SN de cultivos de *A. flavus* al crecer en grano de maíz.

En el análisis del perfil proteico se empleó la técnica de SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie. Al realizar los geles de poliacrilamida al 10% con 25µl. de muestra (3.2 µg. de PT en SN de cultivos de grano de maíz y 1.4 µg. de PT en SN de cultivos CPD), no se observó un bandeo muy visible, por lo que se repitió el experimento empleando una tinción más sensible.

Cuando la cantidad de proteína se encuentra por debajo de los niveles de detección de la tinción pueden aparecer bandas de proteínas débiles, muy claras o faltantes (61), lo cual puede sugerir que las proteínas presentes en la muestras se encuentran en una muy pequeña

cantidad, tan pequeña que el colorante empleado no logra teñir las proteínas al punto que pudieran ser visibles.

En estos casos se debe aumentar la concentración de la muestra o emplear una tinción más sensible. (61). La tinción con azul de Coomassie es más fácil y rápida; sin embargo, los métodos de tinción con plata son más sensibles y por lo tanto, pueden usarse para detectar cantidades más pequeñas de proteína (62).

En el caso de las muestras de SN de cultivos en grano de maíz, al emplear la tinción de plata, sí fue posible visualizar el perfil proteico, lo que coincidiría con la aseveración anterior, y probaría que la cantidad de proteína es tan pequeña que solo pudo ser evidenciada con una tinción muy sensible.

En cuanto a las muestras de SN de cultivos de CPD, no fue posible visualizar el bandeo del perfil proteico de las muestras, aun cuando se empleó una tinción con mayor sensibilidad como la tinción con plata. Estos hallazgos no implican la ausencia de proteína, ya que mediante la cuantificación de PT sí se logró evidenciar su presencia. Es posible que la concentración de PT en la muestra haya sido tan baja que la tinción no fue capaz de detectar y evidenciar las proteínas del SDS-PAGE. Aunque la técnica posea cierta sensibilidad, la sensibilidad de todas las tinciones varía de una proteína a otra (62).

Si bien la medición del total de proteínas no corresponde directamente a la cantidad de proteasas presentes en la muestra, sí constituye parte de las proteínas presentes en el medio, ya que se trata de proteínas extracelulares secretadas al medio de cultivo (63).

Al relacionar estos hallazgos con los valores de proteína total (PT) de la cuantificación de proteína, podemos notar que existe una mayor cantidad de proteína en las muestras de SN

de cultivos de grano de maíz, que en el SN de cultivos de CPD, lo que soportaría este supuesto.

Respecto al perfil proteico observado en las muestras de EXT de cultivos de grano de maíz tratado con choque térmico, fue posible determinar la presencia de proteínas de distinto peso molecular, liberadas al líquido de suspensión después de haberse fraccionado la pared celular de las esporas. Estas proteínas al igual que los casos anteriores, puede que se encuentren en una pequeña cantidad debido a que el bandeo observado en el gel teñido con plata, igualmente fue muy tenue.

Por otro lado mediante la técnica de zimografía, se logró evidenciar la presencia de actividad proteolítica, por lo que con el uso de un marcador de peso molecular conocido en los geles copolimerizados con gelatina al 0.2% fue posible identificarlas de acuerdo a su peso molecular.

A diferencia de los geles de perfil proteico SDS – PAGE, en estos se empleó una menor cantidad de muestra (5 µl.) (0.65 µg. de PT en SN de cultivos de grano de maíz y 0.28 µg. de PT en SN de cultivos CPD) ya que en los primeros ensayos, al probar con 25 µl. (3.2 µg. de PT en SN de cultivos de grano de maíz y 1.4 µg. de PT en SN de cultivos CPD) la actividad proteolítica fue tan intensa que el barrido que ocasionaba en los geles no permitía observar un bandeo definido. Esto indica la alta actividad de las proteasas presentes, incluso en cantidades muy bajas.

Respecto a la temperatura de incubación inicialmente se probaron las temperaturas de 22 y 37° C, sin embargo, no se encontraron diferencias en el patrón de actividad proteolítica relacionadas con la temperatura. En los geles incubados a 37 °C se observó una mayor

degradación de sustrato, indicando una mayor actividad proteolítica de las proteínas en la muestra. Esta observación es importante ya que 37°C es la temperatura fisiológica. Una temperatura ideal para medir y evaluar las actividades de las enzimas relacionadas con los mamíferos es a 37°C debido a su importancia fisiológica (64). En el caso de las proteasas evaluadas en este trabajo, el observar que estén activas a 37° C sugiere que éstas puedan estar actuando durante la infección en un organismo vivo, ya que se logró observar su actividad y estabilidad a dicha temperatura.

En las muestras de SN de CPD, la proteasa de 65 kDa fue inhibida tanto por PHMB y 1,10-fenantrolina, como por PMSF. Estos resultados no necesariamente indican la presencia de un aminoácido serina y cisteína conjuntos en el sitio catalítico. Es importante mencionar que PMSF en ocasiones también muestra inhibición de cisteína proteasa, por ese motivo, se sugiere emplear otros inhibidores específicos como aprotinina (inhibidor de la serina proteasa) y PHMB (inhibidor de cisteína proteasa) para evidenciar o no la presencia de un residuo de serina (57). La inhibición de las proteasas con PHMB evidencia la presencia de residuos de cisteína en el sitio activo de la enzima (57).

Al observarse inhibición de la actividad con otros inhibidores no específicos para cisteína proteasas, como EDTA y 1,10-fenantrolina que son empleados como inhibidores de metaloproteasas, puede pensarse que existan iones involucrados en el sitio catalítico. Se ha observado interacción de iones con en el aminoácido cisteína de proteasas. El estado de ionización de los grupos Tiol de los residuos de cisteína pueden ser regulados por metales como Zn^{2+} y Ca^{2+} (57, 65).

La 1,10-fenantrolina no solo es capaz de quelar metales coordinados con Zn^{2+} en el sitio activo, sino que también logra quelar iones de Ca^{2+} presentes en el mismo o en otras

cadena, dependiendo del acceso del metal a la 1,10-fenantrolina (66). Mientras que la 1,10-fenantrolina es quelante de Zn y Ca, EDTA es un agente quelante de Ca y Mg, por lo que una reacción de inhibición frente a ambos inhibidores podría atribuirse a la presencia de iones de Ca^{2+} en el sitio catalítico, ya que ambos inhibidores comparten la capacidad de quelar iones de este compuesto. Este puede ser el caso de las proteasas identificadas con pesos moleculares de 45, 35, 28 y 25 kDa, que fueron inhibidos por EDTA y 1,10-fenantrolina. Aunque no puede descartarse por completo la posibilidad de que existan iones de Zn también. Para descartar esta posibilidad pueden realizarse otras pruebas para revertir la quelación de metales mediante la adición de iones de Zn^{2+} o Ca^{2+} (66).

Por otro lado, aquellas que solo fueron inhibidas por 1,10-fenantrolina, es posible que presenten únicamente iones de Zn en su sitio catalítico, debido a que no mostraron reacción inhibitoria frente a EDTA. Se prefiere la 1,10-fenantrolina como inhibidor de metaloproteasas de zinc, ya que tiene una constante de estabilidad mucho mayor para el zinc ($2,5 \times 10^6/\text{M}$) que para el calcio ($3,2/\text{M}$). Por tanto, 1,10-fenantrolina, 1 mM inactivaría una metaloproteasa incluso en presencia de calcio 10 mM, mientras que esta concentración de 1,10-fenantrolina no elimina el calcio de una proteína que se une al calcio. Por lo tanto, la 1,10-fenantrolina generalmente se usa como diagnóstico para una metaloproteasa de zinc (57).

Estos resultados sugieren que existen residuos de cisteína en aquellas proteasas inhibidas con PHMB y que a su vez existen iones de calcio y zinc participando en su sitio catalítico, probablemente asociado a que el estado de ionización de los grupos tiol de los residuos de cisteína puede ser regulado por metales como Zn^{2+} y Ca^{2+} (65). Sin embargo, para

determinar concretamente el tipo de proteasa y tipo de iones presentes, es necesario evaluar otros inhibidores específicos y realizar pruebas para revertir la quelación de iones (66).

La síntesis de proteínas con actividad proteolítica por *A. flavus* ha sido estudiada previamente por diversos autores.

Ramesh y *col.* observaron que *A. flavus* produce una metaloproteasa con un peso molecular de 23 kDa (50). Rhodes y *col.* identificaron una elastasa con una masa molecular de 23 kDa que indica ser una metaloproteasa por su sensibilidad al inhibidor 1,10-fenantrolina (48). Zhu y *col.*, identificaron una serina-proteasa de 28 kDa y una posible metaloproteasa de 65 kDa con actividad colagenolítica (46).

Por otro lado, Chou y *col.* lograron identificar una serina proteasa alcalina con peso molecular de 34-kD (47), mientras que Kolattukudy y *col.*, demostraron la existencia de una proteasa de 33 kDa con actividad elastinolítica que determinó como una serina-proteasa por su susceptibilidad de modificación e inactivación por reactivos activos dirigidos a serina e histidina (51). Ramesh y *col.* descubrieron que *A. flavus* secreta una serina proteasas de 36 kDa, identificada como una proteasa alcalina elastinolítica (49).

De acuerdo a sus pesos moleculares, la proteasa de 35 kDa identificada en este trabajo, se asemeja a las serina-proteasas reportadas por Ramesh (49), Chou (47) y Kolattukudy (51) con pesos moleculares de 36, 34 y 32 kDa, respectivamente. Estas proteasas fueron caracterizadas como serina proteasas por su inhibición con PMSF y no se observó inhibición de estas frente a agentes quelantes como EDTA y 1,10 fenantrolina. A pesar de presentar un peso molecular similar, al analizar su actividad frente a inhibidores y el

sustrato específico que degradan, no es posible determinar si alguna estas proteasas es la misma proteína activa de 35 kDa identificada en el presente trabajo.

En cambio, la metaloproteasa de 35 kDa identificada por Mellon y Cotty (52) además de coincidir en peso molecular con nuestra proteína de 35 kDa, también presentó actividad colagenolítica e inhibición por los agentes quelantes EDTA y 1,10 fenantrolina. Así mismo, este autor reporta que esta proteasa fue secretada inicialmente como una proteína de 35 kDa, que posteriormente se convirtió en una proteína de 23 kDa debido a un proceso de autólisis (52). Nuestros resultados apoyan este hallazgo, ya que de igual forma se identificaron dos proteasas de 28 y 25 kDa con las mismas características bioquímicas a la proteasa de 35 kDa encontradas en el presente trabajo. La proteína de 25 kDa posee un peso molecular similar a los de las proteasas reportadas por Rhodes (48) y Ramesh (50), mientras que la proteasa de 28 kDa identificada en este trabajo posee el mismo peso molecular que la reportada por Zhu (46). Analizando los resultados de estos estudios previos en conjunto con nuestros resultados, es posible que las proteasas de 23, 28 y 25 kDa que se han identificado sean, en efecto, producto de la autólisis de una proteasa de 35 kDa, con el contraste de que nuestras proteasas de 28 y 25 kDa solo se mostraron activas en un pH 5, y sí mostraron inhibición por PHMB, un inhibidor de cisteína-proteasas. Zhu observó inhibición de la actividad proteolítica con N-etilmaleimida (NEM); sin embargo, no caracterizó como cisteína-proteasas a ninguna de las dos proteasas identificadas en su ensayo (46). Por otro lado, Mellon empleó E-64 como inhibidor de cisteína-proteasas, pero no observó el efecto inhibitorio de este compuesto sobre las proteasas que reportó (52).

Se observa una situación similar respecto a la proteasa de 65 kDa identificada en este trabajo, la cual coincide con la proteasa del mismo peso molecular reportada por Zhu (46),

ambas fueron inhibidas por EDTA y 1,10 fenantrolina. En su ensayo Zhu reporta inhibición por el sustrato específico para cisteína proteasas NEM, más no caracteriza a esta proteasa como cisteína-proteasa, a diferencia de nuestros resultados donde sí se determinó la presencia de un residuo de cisteína en el sitio catalítico de la enzima tras su inhibición con PHMB.

La similitud entre los pesos moleculares de proteasas reportadas en los estudios anteriores y las proteasas identificadas en este trabajo con pesos moleculares de 35, 28, 25 y 65 kDa, contrasta con las diferencias que se observaron en su naturaleza bioquímica. Esta variación en la conformación de su sitio catalítico puede estar relacionada con la composición del medio en el que es crecido *A. flavus*. Zhu en 1990, reportó una diferencia en la naturaleza bioquímica de las proteasas de 28 y 65 kDa que logró identificar cuando el hongo creció en distintos medios de cultivo. Los resultados de los estudios de inhibidores, indicaron que cuando *A. flavus* se cultivó en medio líquido M9 con proteína de leche, la actividad fue sensible a los agentes quelantes (EDTA y 1,10 fenantrolina), pero insensible a PMSF y NEM, que indican solo actividad metaloproteasa. Sin embargo, cuando se cultivó en M9 con colágeno o elastina como fuente de nitrógeno, parece haber una mezcla de actividades que son sensibles a los agentes quelantes, a PMSF y a NEM, lo que indicaría que actividades metalo-serina y cisteína proteasa están presentes. Las cantidades relativas de estas actividades parecen variar en diferentes cultivos de colágeno y elastina (46). Esta observación sugiere que la presencia de un residuo del aminoácido serina, o en su defecto, un residuo de cisteína en el sitio catalítico de las proteasas, como se observó en los resultados de este trabajo, dependerá de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. Haber empleado medios de cultivo distintos a los empleados anteriormente en

otras investigaciones, podría ser la razón por la cual se caracterizaron a las proteasas de 65, 35, 28 y 25 kDa como cisteína proteasas durante esta investigación.

Anteriormente, no se había identificado actividad proteolítica en cultivos de *A. flavus* en un medio natural. Se ha observado que al enriquecer el medio con un nutriente específico, el hongo es capaz de producir una proteasa capaz de degradarlo. Algunos ejemplos son los experimentos como los realizados por Ramesh (49, 50, 67), Rhodes (48) y Kolattukudy (51), donde se enriqueció un medio de cultivo sintético con un sustrato específico (elastina) con el propósito de estimular al hongo para la producción de una proteasa que lo degradara. En el presente estudio no se adicionó al medio de cultivo un sustrato específico, y bajo esta condición se lograron identificar proteasas sintetizadas por el hongo capaces de degradar colágeno.

A. flavus ha mostrado poseer actividad proteolítica contra una variedad de sustratos. Mellon y col. (52) demostraron que la proteasa de *A. flavus* con un peso molecular de 23 o 35 kDa es capaz de degradar sustratos naturales de origen vegetal como la proteína de almacenamiento de semilla de algodón, además de sustratos naturales de origen animal como la elastina, colágeno, ovoalbúmina y albúmina de suero bovino. La variedad de sustratos que puede degradar esta proteasa, sugiere que esta no solo es una proteasa inespecífica, sino que *A. flavus* posee la capacidad de sintetizar proteasas inespecíficas capaces de degradar sustratos de origen animal y vegetal, y esta proteína podría no ser el único caso.

Se ha planteado el posible doble papel de las proteasas extracelulares en los hongos filamentosos, por una parte estas proteasas permiten descomponer moléculas de proteínas complejas en nutrientes utilizables, y a su vez, actúan como factores de virulencia en los

procesos patogénicos al digerir la matriz extracelular facilitando su penetración en los tejidos (1). Esto apoya la idea de que *A. flavus* puede sintetizar proteasas inespecíficas que le permitan realizar esta doble función para su supervivencia e invasión de tejido como parte de su patogenicidad.

La principal fuente de contagio de la aspergilosis es la inhalación de esporas provenientes de micelios adaptados y en crecimiento sobre sustratos vegetales como granos o cereales contaminados (2, 12, 39), que probablemente no hayan tenido contacto con los tejidos de animales o humanos y por lo tanto no hayan pasado por un proceso de adaptación que les permita sintetizar proteínas contra sustratos específicos.

Es por esto que, tras el cultivo de *A. flavus* en medios de origen vegetal como el grano de maíz (medio natural) y en CPD (medio semisintético), el sustrato específico empleado en la zimografía de esta investigación fue gelatina. Este sustrato se compone de colágeno desnaturalizado, es decir, colágeno que se ha degradado en sus componentes peptídicos por medio de enzimas, calor o pH (68). El colágeno es una de las proteínas estructurales que componen la lámina basal y tejido intersticial que *A. flavus* debe penetrar para colonizar los tejidos (1). Además junto con la elastina, forma parte de los principales elementos del tejido conectivo presente en el pulmón y córnea, dos de los principales órganos blanco de *A. flavus* (21, 48, 69). Esto indica que *A. flavus* no solo requiere de la síntesis de una proteasa con actividad elastinolítica, sino de una proteasa con la capacidad de degradar tanto elastina como colágeno, ya que este segundo compuesto se encuentra presente, incluso en mayor proporción en el tejido conectivo de pulmón (69). La síntesis de una proteasa con actividad proteolítica sobre ambos compuestos le permitirá al microorganismo asegurar su penetración en el tejido (21).

Ramesh y col (49, 50)., Rhodes y col (48) y Kolattukudy y col(51) han empleado como sustrato en el medio de cultivo la elastina, y demostraron la producción de elastinas extracelulares con un peso molecular de 23 kDa liberadas por conidios fúngicos en germinación en medio de cultivo con elastina (48-50) y de una elastasa de 32 kDa en el pulmón huésped cuando crece en presencia de elastina. Estos hallazgos demuestran que *A. flavus* posee una actividad elastinolítica, la cual forma parte de sus factores de virulencia involucrados en la aspergilosis invasiva (51). Por otra parte, Mellon reporta la degradación de una variedad de sustratos, entre ellos, elastina y colágeno por la proteína de 35 o 23 kDa. identificada en su estudio (52).

Como se ha discutido anteriormente, en el presente trabajo se encontraron proteasas con pesos moleculares y características bioquímicas similares, lo que podría sugerir que las proteasas identificadas en este trabajo con pesos moleculares de 35, 28, y 25 kDa podrían tener la capacidad de degradar otros sustratos además del colágeno, por ejemplo la elastina. El análisis de las proteasas identificadas en este trabajo no solo ayuda a sostener esta teoría, sino que la complementa al evidenciar su actividad colagenolítica que podría acompañar a su capacidad elastinolítica demostrada en otros estudios, no obstante, futuros ensayos deben realizarse para determinar si esta proteasa es inespecífica al probar su actividad proteolítica frente a distintos sustratos.

Los resultados de este trabajo vuelven a este estudio uno de los primeros en los que se ha evidenciado la capacidad de *A. flavus* para sintetizar factores de virulencia, como proteasas, a pesar de no haber entrado en contacto con este sustrato durante su crecimiento, además de haberse empleado un medio de cultivo natural de origen vegetal como es el grano de maíz.

A pesar de haberse identificado una serie de proteasas de *A. flavus* con anterioridad, se observan variaciones en su naturaleza bioquímica, particularmente en su actividad tras el tratamiento con inhibidores, por lo que resultaría útil emplear otra variedad de inhibidores, en esta ocasión más específicos, para futuras investigaciones.

Por otra parte, no se tiene antecedente de proteasas sintetizadas por *A. flavus* con pesos moleculares de 250, 80, 55, 50, 45 y 15 kDa como las identificadas el presente trabajo, lo que indica que fue posible identificar nuevas proteasas de *A. flavus* que podrían actuar en matriz extracelular o membrana basal *in vivo* durante la patogenia de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

A. flavus produce enzimas proteolíticas durante sus distintas fases de crecimiento. Estas proteínas activas identificadas en el SN y EXT de cultivos en grano de maíz y CPD, poseen la capacidad de degradar colágeno y sus características bioquímicas dependerán del medio de cultivo o sustrato donde el hongo es crecido.

8.1 Conclusiones particulares

A. flavus es un microorganismo con un patrón de crecimiento diáuxico que no es determinante en el patrón de secreción de proteasas.

A. flavus produce cisteína y metalo-proteasas de secreción con pesos moleculares de 250, 80, 45, 35, 28, y 25 kDa y una proteasa más de 15 kDa caracterizada como cisteína proteasa, cuando es crecido en grano de maíz mientras que, al ser cultivado en CPD produce cisteína y metalo proteasas de 250, 65 y 55 kDa.

Las proteasas identificadas son secretadas de manera constante a lo largo de 10 días, a excepción de la de 15 kDa que solo fue secretada de forma constante durante el día 6 de crecimiento al crecer en grano de maíz.

Estas proteasas son termoestables, presentando actividad proteolítica a una temperatura entre 22 y 37°C.

Las proteasas identificadas son estables a distintos valores de pH, a excepción de las proteasas ácidas de 25 y 28 kDa identificadas en el SN de cultivos de grano de maíz que solo se observan activas en un pH 5.

El grano de maíz es un sustrato que permite al hongo expresar un alto vigor, reflejado en los elevados valores de producción de esporas, debido al contenido y calidad de nutrientes que éste ofrece y su relación patógeno - hospedero. De igual manera, el perfil de actividad proteolítica de *A. flavus* varía dependiendo del sustrato en el que es crecido, expresando una mayor variedad de proteasas al crecer en un medio natural como grano de maíz.

Las proteasas coinciden con las proteínas observadas en el perfil proteico y sus respectivos pesos moleculares, lo cual podría ser una proteína presente en bajas cantidades, pero con una alta actividad.

Estas proteasas podrían ser la clave para la migración, diseminación y colonización de *A. flavus* durante la patogenia del proceso infeccioso de este patógeno hacia los diferentes hospederos en donde produce enfermedad.

9. PERSPECTIVAS

Purificar y estudiar estas proteasas podrían mejorar el conocimiento del proceso infeccioso de *A. flavus* y sugerir su posible uso como blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad a través de la inhibición de su actividad, y posiblemente impidiendo su migración a través de los tejidos, y en consecuencia la respuesta inflamatoria que podría desencadenar.

A pesar de que no se caracterizó la actividad proteolítica en el EXT tras el rompimiento de sus estructuras fúngicas en este estudio, sí fue posible determinar la presencia de proteínas en el líquido de suspensión que no estaban presentes antes del tratamiento de choque térmico y se determinó la presencia de actividad proteolítica de estas. Este hallazgo abre la puerta a futuras investigaciones enfocadas al estudio de las proteínas y proteasas dentro de las esporas de *A. flavus*.

Conocer la naturaleza bioquímica de las enzimas de *A. flavus* puede representar una opción para investigaciones encaminadas a la búsqueda de inhibidores de crecimiento del hongo, a través de la inhibición de actividades metabólicas involucradas en la obtención de nutrientes, lo que podría limitar su desarrollo,

10. REFERENCIAS

1. Krishnan, S., Manavathu, E. K., & Chandrasekar, P. H. (2009). *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, 52(3), 206-222. doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01642.
2. Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(Pt 6), 1677-1692. doi:10.1099/mic.0.2007/007641-0
3. Garcés, E., Correa, M., Coba, B., Orozco, M., Zapata, A. C., Anacona, A., & Sabogal, S. P. (2003). *Morfología y clasificación de los hongos*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
4. Pimenta, R. S., Monteiro dos Santos Baliza, D. D., & Moreira da Silva, J. F. (2020). *Aspergillus*. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Krishna, & A. Sankaranarayana (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (1st ed., pp. 611-624).
5. Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol*, 86, 199-249. doi:10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4
6. Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B., & Yu, J. H. (2017). Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *aspergillus* fungi. *Adv Appl Microbiol*, 100, 161-202. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001
7. Chang, P. K., Horn, B. W., Abe, K., & Gomi, K. (2014). *Aspergillus*: Introduction. In C. A. Batt (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 77–82).
8. Rangel-Muñoz, E. J., Valdivia Flores, A. G., Moreno-Rico, O., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., de Luna-López, M. C., Máyek Pérez, N. (2020). Characterization of *Aspergillus flavus* and quantification of aflatoxins in feed and raw milk of cows in

Aguascalientes, México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 11(2).
doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5686>

9. Gougouli, M., & Koutsoumanis, P. K. (2013). Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 231-239.
10. Li, C., Jia, S., Rajput, S. A., Qi, D., & Wang, S. (2022). Transcriptional stages of conidia germination and associated genes in *Aspergillus flavus*: an essential role for redox genes. *Toxins*, 14.
11. Aldars-Garcia, L., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2017). Time-course of germination, initiation of mycelium proliferation and probability of visible growth and detectable AFB1 production of an isolate of *Aspergillus flavus* on pistachio extract agar. *Food Microbiology*, 64, 104-111.
12. Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol*, 49, 107-133. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095221
13. Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *J Invertebr Pathol*, 125, 68-72. doi:10.1016/j.jip.2014.12.012
14. Jin, X., Hayes, C. K., Harman, G. E. (1992). Principles in the development of biological control systems employing trichoderma species against soil-borne plant pathogenic fungi. In G. F. Leatham (Ed.), *Frontiers in Industrial Mycology* (pp. 174-195). New York, NY: Chapman & Hall.
15. Wahyuni, M. P., Suhernawan, D. Y. (2017). Study on the distribution of endomycorrhizal fungi in some species root-plants in bali. *Online journal of biological sciences*.

16. Gopalan, R. (1980). Some effects of environment on spore production and germination in Yellow Rust of wheat. University of Southampton.
17. Doran, W. L. (1992). Effect of external and internal factors on the germination of fungous spores. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 49(11), 313-340.
18. Yu, J., Whitelaw, C. A., Nierman, W. C., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2004). *Aspergillus flavus* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol Lett*, 237(2), 333-340. doi:10.1016/j.femsle.2004.06.054
19. Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 497-516. doi:10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
20. Perusia, O. R., & Rodríguez, A. R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2).
21. Dixon, D. M., & Walsh, T. J. (1992). Human pathogenesis. In J. W. Bennett & M. A. Klich (Eds.), *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*: Butterworth-Heinemann.
22. Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G., & Moreno, S. (2012). Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 201-208.
23. Ruíz-Hernández, I., Jenki-Delgado, D., Castro-Junco, I., Rodríguez-Giralt, O. W., & Méndez Fleitas, L. (2018). Aspergilosis pulmonar. Presentación de casos. *Revista Médica Electrónica*, 40(4), 12.
24. Tell, L. A. (2005). Aspergilosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, 43(1), S71- S73.

25. Hauck, R., Cray, C., & Franca, M. (2020). Spotlight on avian pathology: aspergillosis. *Avian Pathol*, 49(2), 115-118. doi:10.1080/03079457.2019.1696946
26. Brugere-Picoux, J., Vaillancourt, J. P., Shivaprasad, H. L., Venne, D., & Bouzouaia, M. (2015). *Manual de Patología Aviar*. París, Francia: OIE.
27. Cherif, G., Hadrich, I., Harrabi, M., Kallel, A., Fakhfekh, N., Messaoud, M., Ranque, S. (2023). *Aspergillus flavus* genetic structure at a turkey farm. *Vet Med Sci*, 9(1), 234-241. doi:10.1002/vms3.1015
28. Hadrich, I., Amouri, I., Neji, S., Mahfoud, N., Ranque, S., Makni, F., & Ayadi, A. (2013). Genetic structure of *Aspergillus flavus* populations in human and avian isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(2), 277-282. doi:10.1007/s10096-012-1740-5
29. Sabino, R., Faisca, V. M., Carolino, E., Verissimo, C., & Viegas, C. (2012). Occupational exposure to *Aspergillus* by swine and poultry farm workers in Portugal. *J Toxicol Environ Health A*, 75(22-23), 1381-1391. doi:10.1080/15287394.2012.721170
30. Adhikari, A., Sen, M. M., Gupta-Bhattacharya, S., & Chanda, S. (2004). Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ Int*, 29(8), 1071-1078. doi:10.1016/S0160-4120(03)00103-X
31. Tilak, R., Singh, A., Maurya, O. P., Chandra, A., Tilak, V., & Gulati, A. K. (2010). Mycotic keratitis in India: a five-year retrospective study. *J Infect Dev Ctries*, 4(3), 171-174. doi:10.3855/jidc.309
32. Hetherington, S. V., Henwick, S., Parham, D. M., & Patrick, C. C. (1994). Monoclonal antibodies against a 97-kilodalton antigen from *Aspergillus flavus*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1(1), 63-67. doi:10.1128/cdli.1.1.63-67.1994

33. Steinbach, W. J. (2005). Pediatric aspergillosis: disease and treatment differences in children. *Pediatr Infect Dis J*, 24(4), 358-364. doi:10.1097/01.inf.0000157218.37603.84
34. Heinemann, S., Symoens, F., Gordts, B., Jannes, H., & Nolard, N. (2004). Environmental investigations and molecular typing of *Aspergillus flavus* during an outbreak of postoperative infections. *J Hosp Infect*, 57(2), 149-155. doi:10.1016/j.jhin.2004.02.007
35. Florio, M., Marroni, M., Morosi, S., & Stagni, G. (2004). Nosocomial *Aspergillus flavus* wound infections following cardiac surgery. *Infez Med*, 12(4), 270-273.
36. Garcia-Vidal, C., & Carratala, J. (2012). Pathogenesis of invasive fungal infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 30(3), 151-158. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.011
37. Pasqualotto, A. C., & Denning, D. W. (2006). Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, 12(11), 1060-1076. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01512.
38. Fernandez, N. B., Caceres, D. H., Beer, K. D., Irrazabal, C., Delgado, G., Farias, L., Stecher, D. (2020). Ventilator-associated pneumonia involving *Aspergillus flavus* in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19) from Argentina. *Med Mycol Case Rep*, 31, 19-23. doi:10.1016/j.mmcr.2020.07.001
39. Pasqualotto, A. C. (2009). Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Med Mycol*, 47 Suppl 1, S261-270. doi:10.1080/13693780802247702
40. Amitani, R., Murayama, T., Nawada, R., Lee, W. J., Niimi, A., Suzuki, K., Kuze, F. (1995). *Aspergillus* culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro. *Eur Respir J*, 8(10), 1681-1687. doi:10.1183/09031936.95.08101681

41. St Leger, R. J., Joshi, L., & Roberts, D. W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology (Reading)*, 143 (Pt 6), 1983-1992. doi:10.1099/00221287-143-6-1983
42. Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., & Job, D. (2013). Secretomes: the fungal strike force. *Proteomics*, 13(3-4), 597-608. doi:10.1002/pmic.201200282
43. Rani, K., Rachita, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2(1), 12-18.
44. McDonald, J. K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem J*, 17(7), 773-785. doi:10.1007/BF01003313
45. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3), 597-635. doi:10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998
46. Zhu, W. S., Wojdyla, K., Donlon, K., Thomas, P. A., & Eberle, H. I. (1990). Extracellular proteases of *Aspergillus flavus*. Fungal keratitis, proteases, and pathogenesis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 13(6), 491-497. doi:10.1016/0732-8893(90)90081-6
47. Chou, H., Lin, W. L., Tam, M. F., Wang, S. R., Han, S. H., & Shen, H. D. (1999). Alkaline serine proteinase is a major allergen of *Aspergillus flavus*, a prevalent airborne *Aspergillus* species in the Taipei area. *Int Arch Allergy Immunol*, 119(4), 282-290. doi:10.1159/000024205
48. Rhodes, J. C., Amlung, T. W., & Miller, M. S. (1990). Isolation and characterization of an elastolytic proteinase from *Aspergillus flavus*. *Infect Immun*, 58(8), 2529-2534. doi:10.1128/iai.58.8.2529-2534.1990

49. Ramesh, M. V., Sirakova, T., & Kolattukudy, P. E. (1994). Isolation, characterization, and cloning of cDNA and the gene for an elastinolytic serine proteinase from *Aspergillus flavus*. *Infect Immun*, 62(1), 79-85. doi:10.1128/iai.62.1.79-85.1994
50. Ramesh, M. V., Sirakova, T. D., & Kolattukudy, P. E. (1995). Cloning and characterization of the cDNAs and genes (mep20) encoding homologous metalloproteinases from *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus*. *Gene*, 165(1), 121-125. doi:10.1016/0378-1119(95)00434-8
51. Kolattukudy, P. E., Lee, J. D., Rogers, L. M., Zimmerman, P., Ceselski, S., Fox, B., Copelan, E. A. (1993). Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun*, 61(6), 2357-2368. doi:10.1128/iai.61.6.2357-2368.1993
52. Mellon, J. E., & Cotty, P. J. (1996). Purification and partial characterization of an elastinolytic proteinase from *Aspergillus flavus* culture filtrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(2).
53. Osmolovskiy, A. A., Schmidt, L., Orekhova, A. V., Komarevtsev, S. K., Kreyer, V. G., Shabunin, S. V., & Egorov, N. S. (2021). Action of extracellular proteases of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* micromycetes on plasma hemostasis proteins. *Life (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/life11080782
54. Mendez-Albores, A., Arambula-Villa, G., Loarca-Pina, M. G., Castano-Tostado, E., & Moreno-Martinez, E. (2005). Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize. *Food Chem Toxicol*, 43(2), 233-238. doi:10.1016/j.fct.2004.09.009
55. Righetti, P. G., & Boschetti, E. (2013). Detailed methodologies and protocols. In P. G. Righetti & E. Boschetti (Eds.), *Low Abundance Proteome Discovery* (pp. 263-319): Elsevier.

56. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
57. Ramirez Rico, G., Martinez-Castillo, M., Gonzalez-Ruiz, C., Luna-Castro, S., & de la Garza, M. (2017). *Mannheimia haemolytica* A2 secretes different proteases into the culture medium and in outer membrane vesicles. *Microb Pathog*, 113, 276-281. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.027
58. Ramirez-Rico, G., Martinez-Castillo, M., Avalos-Gomez, C., & de la Garza, M. (2021). Bovine apo-lactoferrin affects the secretion of proteases in *Mannheimia haemolytica* A2. *Access Microbiol*, 3(10), 000269. doi:10.1099/acmi.0.000269
59. Aziza, M., Amrane, A. (2012). Diauxic Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on amino acids and glucose. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(02), 203-210.
60. Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*, 53(370), 947-958. doi:10.1093/jexbot/53.370.947
61. Biotech, H. (2010). Troubleshooting Sodium Dodecyl Sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) In H. Biotech (Ed.), (Vol. 04-2010). www.hycultbiotech.com
62. Gallagher, S. R., & Sasse, J. (2012). Staining proteins in gels. In *current protocols essential laboratory techniques* (2009/01/27 ed., pp. 7.4.1 - 7.4.14): Wiley Online Library.
63. Ward, O. P. (2011). Proteases. In M. M. Y. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed ed., pp. 571-582): Elsevier.

64. Duggan, P. F. (1979). Activities of enzymes in plasma should be measured at 37 degrees C. *Clin Chem*, 25(3), 348-352.
65. Bulaj, G., Kortemme, T., & Goldenberg, D. P. (1998). Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*, 37(25), 8965-8972. doi:10.1021/bi973101r
66. Nam, K. H. (2021). Structural analysis of metal chelation of the metalloproteinase thermolysin by 1,10-phenanthroline. *J Inorg Biochem*, 215, 111319. doi:10.1016/j.jinorgbio.2020.111319
67. Addwebi, T. M., Call, D. R., & Shah, D. H. (2014). Contribution of Salmonella Enteritidis virulence factors to intestinal colonization and systemic dissemination in 1-day-old chickens. *Poult Sci*, 93(4), 871-881. doi:10.3382/ps.2013-03710
68. Harris, R. B., Fonseca, F. L. A., Sharp, M. H., & Ottinger, C. R. (2022). Functional Characterization of Undenatured Type II Collagen Supplements: Are They Interchangeable? *J Diet Suppl*, 19(6), 717-732. doi:10.1080/19390211.2021.1931621
69. Mercer, R. R., & Crapo, J. D. (1990). Spatial distribution of collagen and elastin fibers in the lungs. *J Appl Physiol* (1985), 69(2), 756-765. doi:10.1152/jappl.1990.69.2.756