

## Necroptosis programada en *Aspergillus salvadorensis* bajo condiciones de estrés oxidativo causadas por Peróxido de Hidrógeno en conidias.

Antonio Vásquez Hidalgo\* 

Professor Microbiology, School of Medicine, University of El Salvador, San Salvador, El Salvador

### Resumen

Resultado KEGG enviado por MACROGEN INC encontrado en la muestra DNA enviada a Korea del Sur en el año 2024 del *Aspergillus* de las posibles vías que utiliza el hongo en su crecimiento y muerte celular. Se evaluaron tres concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, 5% y 10%) mediante microscopía directa aplicada a cultivos en Saboraud muestras de alícuotas de *Aspergillus salvadorensis*. Este trabajo presenta un procedimiento para inducir y registrar estos cambios morfológicos y analiza su relevancia en investigaciones sobre patogenicidad y mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo. Los resultados muestran un deterioro progresivo de la integridad hifal y conidial, con pérdida estructural marcada a concentraciones superiores. En observaciones de preparaciones en fresco seco las hifas evidencian adelgazamientos localizados y disminución de la turgencia, mientras que los conidióforos experimentan deformaciones graduales y las vesículas muestran irregularidades en su forma y pérdida de uniformidad, así como en las conidias. La Necroptosis en hongos de esta especie se manifiesta por la ruptura de la pared, la liberación del contenido citoplasmático y la generación de detritos de aspecto granular. La transición desde un estado morfológicamente íntegro hacia la desintegración celular al 10% de peróxido de hidrogeno se presenta la necroptosis en este hongo está fuertemente influenciada por la intensidad del estrés oxidativo, los daños no son inmediatos a excepto a la inflamación de las conidias en su inicio, los resultados completos se ven de cinco días en las concentraciones no letales, en promedio 15 días que se observa en los frotis el ataque invasivo letal de destrucción del *Aspergillus* en los frotis secos.

**Palabras clave:** *Aspergillus salvadorensis*, peróxido de hidrógeno, Necroptosis, conidias, ROS

### Introducción:

La necroptosis es un término científico específico que describe un tipo de muerte celular programada que ocurre bajo condiciones de estrés inducido, caracterizándose por seguir una ruta genética controlada, a pesar de presentar rasgos morfológicos típicos de la necrosis, como la lisis celular y la liberación del contenido citoplasmático. En la literatura, este proceso suele denominarse también necrosis programada, diferenciándose de la apoptosis, que es una forma de muerte celular programada ejecutada de manera ordenada por la propia célula sin provocar inflamación. Debido a la liberación de componentes intracelulares, la necroptosis se considera una forma de muerte celular proinflamatoria, al igual que la piroptosis, la cual se asocia principalmente a respuestas frente a infecciones, especialmente en células del sistema inmunológico. Estas clasificaciones han sido establecidas para distinguir las distintas subrutinas de muerte celular programada según sus mecanismos moleculares y consecuencias fisiopatológicas. (Vandenabeele et al., 2010; Galluzzi et al., 2012; Cookson & Brennan, 2001).

El estrés oxidativo en los hongos filamentosos muestra respuestas complejas ante la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas el peróxido de hidrógeno. Estas moléculas pueden inducir daño a proteínas, lípidos y membranas celulares, afectando la viabilidad y funcionalidad del microorganismo.

En hongos, incluyendo especies del género *Aspergillus*, se ha reportado la existencia de procesos de muerte celular programada similares a la Apoptosis y Necroptosis observadas en organismos eucariotas superiores. La exposición a peróxido de hidrógeno constituye un método eficaz para inducir estas rutas de muerte celular al generar un desequilibrio redox que afecta directamente la integridad hifal y otras estructuras.

Este estudio tiene por objetivo describir los efectos morfológicos generados por distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre *Aspergillus salvadorensis*, permitiendo visualizar de forma comparativa la progresión hacia la necroptosis inducida por estrés oxidativo.

En los hongos es muy complejo manifestaciones como la necroptosis es un proceso de muerte celular programada violenta e inflamatoria que combina características de la necrosis y de la apoptosis. Intervienen principalmente tres proteínas: RIPK1, RIPK3 y MLKL. La proteína MLKL viaja a la membrana celular y la perfora, provocando que la célula se hinche y explote, liberando todo su contenido al exterior. La Piroptosis es activada específicamente por señales de infección en humanos. La Necrosis es por ausencia de oxígeno en los tejidos vista en humanos. La Apoptosis corresponde a una muerte celular programada, controlada por la propia célula, que ocurre de manera ordenada y no induce inflamación, ya que se desarrolla de forma silenciosa mediante la activación de caspasas. Por el contrario, la necrosis es un proceso no programado, resultado de una agresión externa o daño celular, en el que la membrana se rompe de manera pasiva, provocando la liberación del contenido celular y una respuesta inflamatoria marcada. La necroptosis, aunque comparte con la necrosis su carácter inflamatorio, se diferencia porque es una forma de muerte celular regulada, mediada por señales específicas en las que participan proteínas. De este modo, la necroptosis se sitúa como un mecanismo intermedio: es controlado como la apoptosis, pero con consecuencias inflamatorias similares a las de la necrosis. (Aguirre, 2005, Goncalves, 2020, Shlezinger, 2017, Paoletti, 2009, Vandenaabeele, 2010). En condiciones de laboratorio se observa que a 100x el cubre objetos se levanta en mm debido a la inflamación de las conidias se dificulta el enfoque la observación en condiciones normales, por lo que hay que esperar varios días al secado.

### **Diseño metodológico.**

Preparación del Cultivo Fúngico. Cultivo Inicial: Sembrar esporas de *A. salvadorensis* en un medio de cultivo Saboraud y permitir el crecimiento hasta la fase exponencial o inicio de la fase estacionaria (generalmente 24-48 horas a 25–37°C con agitación). Ajuste de Densidad: Diluir el cultivo para obtener una concentración estandarizada de micelio, vesícula y conidios (por ejemplo, 1×10<sup>6</sup> conidios/mL) antes del tratamiento a la inducción del estrés y necroptosis. Los agentes inductores más probables que promueven la muerte celular no-apoptótica en hongos incluyen: Estrés Oxidativo con Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): Es un inductor común de estrés oxidativo. Las concentraciones varían ampliamente entre 3,5 y 10 %. El peróxido de hidrógeno es un fuerte

candidato para desregular el metabolismo fúngico y provocar la muerte celular. Procedimiento de Inducción: Dividir el cultivo en viales. Añadir el inductor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración pre-determinada (3,5 y 10 %), dejando un vial control sin inductor como control. Incubar a la temperatura de crecimiento óptima por una semana y hacer observaciones con lactofenol azul algodón con múltiples preparaciones al fresco y observar a los 5 a 15 días de nuevo los mismos frotis secos realizados con anterioridad.

## Resultados

KEGG summary: Orthology Frequency within Main and Sub-Categories		
* KEGG: Database for understanding biological functions and utilities from molecular-level data		
* Level1, Level2, Level3: Hierarchical classification of KEGG pathways, from broad categories to specific processes.		
* {Sample}: Gene counts specific to each sample, indicating the presence of genes related to each pathway.		
Level1	Level2	Level3
Cellular Processes	Cell growth and death	Apoptosis
Cellular Processes	Cell growth and death	Apoptosis - fly
Cellular Processes	Cell growth and death	Cell cycle
Cellular Processes	Cell growth and death	Cell cycle - Caulobacter
Cellular Processes	Cell growth and death	Cell cycle - yeast
Cellular Processes	Cell growth and death	Cellular senescence
Cellular Processes	Cell growth and death	Meiosis - yeast
Cellular Processes	Cell growth and death	Necroptosis
Cellular Processes	Cell growth and death	Oocyte meiosis
Cellular Processes	Cell motility	Cytoskeleton in muscle cells
Cellular Processes	Cell motility	Flagellar assembly
Cellular Processes	Cell motility	Motor proteins

Tabla 1. Resultado de la secuenciación de *Aspergillus salvadorensis* 2024. MACROGEN INC.

En la Tabla I. Es un resultado KEGG enviado por MACROGEN INC encontrado en la muestra enviada en el año 2024 del *Aspergillus* de las posibles vías que utiliza el hongo en su crecimiento y muerte. El análisis KEGG revela una marcada predominancia de ortólogos vinculados a la categoría de Procesos Celulares, lo que indica que el repertorio génico evaluado participa principalmente en funciones esenciales para el mantenimiento y la regulación de la célula. Dentro de este grupo, la subcategoría de crecimiento y muerte celular es la más representativa, abarcando rutas relacionadas con el control del ciclo celular, la senescencia y distintos tipos de muerte celular programada. La identificación de vías como Apoptosis y Necroptosis pone de manifiesto la capacidad del organismo para modular la supervivencia celular y responder de manera regulada a estímulos adversos o condiciones de estrés. Además, la presencia de rutas del ciclo celular descritas en diferentes organismos modelo, como levaduras y otros eucariotas, sugiere un alto grado de conservación evolutiva de estos mecanismos.

Por otra parte, La detección de procesos asociados a la motilidad celular, incluyendo componentes del citoesqueleto, el ensamblaje flagelar y las proteínas motoras, destaca la relevancia de la organización estructural y del movimiento intracelular en la dinámica celular (Alberts et al., 2022; Pollard & Cooper, 2009). En conjunto, este perfil funcional indica una fuerte inversión génica en la regulación del crecimiento, la muerte celular y la arquitectura interna, lo que respalda la idea de un sistema celular altamente controlado y adaptable. (Elmore, 2007; Vale, 2003). Estos resultados proporcionan una base funcional sólida para interpretar respuestas celulares complejas y orientan futuros estudios dirigidos a la caracterización detallada de las vías moleculares implicadas. En un montaje seco

posterior a los 15 días de la misma lamina inicial, donde el peróxido ya actuó y el hongo quedó fijado. Las hifas se observan aplanadas, sin brillo, como si hubieran perdido completamente su hidratación. Las conidias en cambio se ven hinchadas. El conidióforo parece un tubo rígido y quebradizo, con zonas donde la pared se ve fracturada en pequeños segmentos. La vesícula es apenas una esfera mal formada, aplastada y opaca, sin los contornos regulares de una vesícula sana. Las fiálides casi no se distinguen; parecen puntas aplastadas o desgarradas, como restos de una estructura que ya no conserva forma. Los conidios son las estructuras que mejor se conservan, pero incluso ellos muestran deformaciones: algunos están arrugados, otros fragmentados o parcialmente colapsados. El conjunto transmite una sensación de degradación total, con las estructuras fúngicas reducidas a un patrón rígido y sin vitalidad, marcado por el daño previo del peróxido.

En la primera condición (*Aspergillus* en estado basal) se observan estructuras morfológicas plenamente conservadas, características de un hongo filamentoso en crecimiento activo. Las hifas septadas presentan paredes celulares continuas, homogéneas y sin signos de degradación. El conidióforo mantiene su eje erguido con integridad estructural completa, lo que refleja estabilidad citoplasmática y funcionalidad del citoesqueleto. La vesícula es esférica y muestra una distribución uniforme de fiálides y conidios, los cuales presentan contornos regulares y ausencia de artefactos morfológicos. Esta condición representa un estado fisiológico estable, sin intervención de estrés oxidativo ni mecanismos de muerte celular.

En la segunda condición (*Aspergillus* sometido a peróxido de hidrógeno) se identifican alteraciones compatibles con estrés oxidativo subletal. Las hifas muestran pérdida parcial de la definición de la pared celular, con adelgazamientos focales y zonas de palidez óptica que indican daño en polisacáridos estructurales como quitina y glucanos. Se evidencian regiones de vacuolización intracelular, lo que sugiere acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción orgánular. El conidióforo presenta ligera deformación y disminución de su turgencia, mientras que la vesícula revela irregularidades superficiales atribuibles a oxidación de lípidos de membrana. Varios conidios aparecen retraídos, deformados o desprendidos, reflejando una respuesta de estrés previa a la activación de rutas de muerte celular programada no regulada.

En la tercera condición (Necroptosis inducida por peróxido de hidrógeno) se observa un patrón morfológico marcado por destrucción estructural avanzada. Las hifas exhiben ruptura franca de la pared celular, con extravasación del contenido citoplasmático y presencia de detritos granulares, hallazgos característicos de necroptosis fúngica. El conidióforo se encuentra colapsado y presenta fragmentación axial, asociada a la pérdida completa de integridad mecánica. La vesícula muestra deformación severa, con colapso de la curvatura y evidencias de disrupción membranal. Los conidios están ausentes, destruidos o dispersos irregularmente, sugiriendo desanclaje por lisis generalizada. Este escenario representa un estado terminal, compatible con activación de vías de necrosis regulada mediada por ROS y degradación de componentes celulares esenciales.

Resultado a la inducción del peróxido, presenta las siguientes características morfológicas:

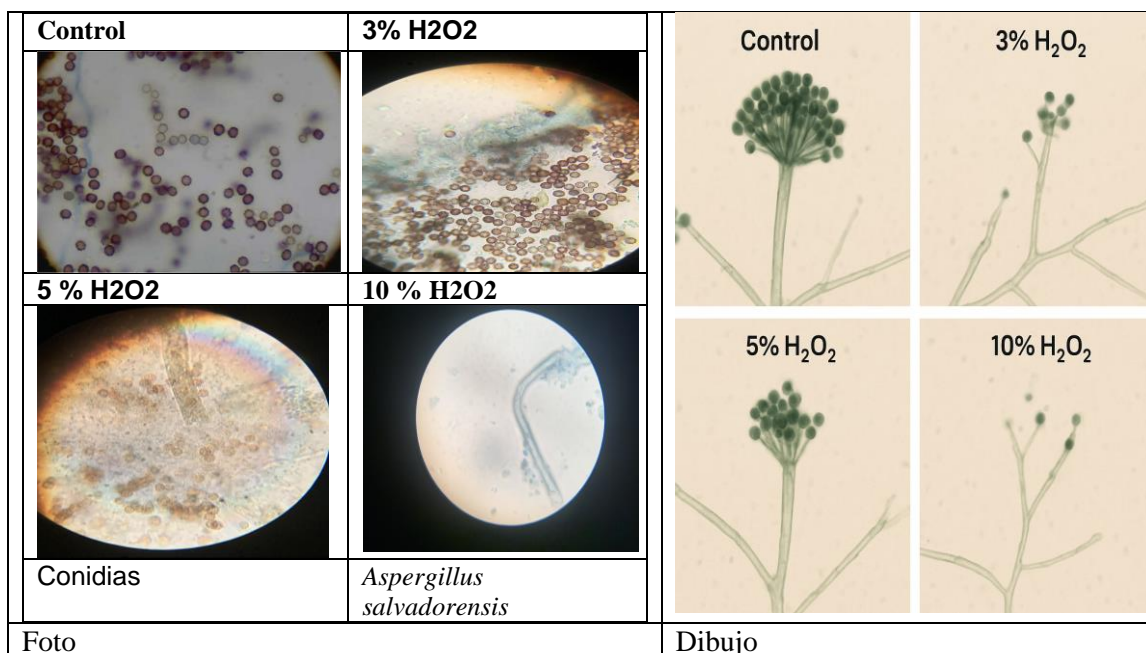


Foto y dibujo 1. *Aspergillus salvadorensis* a concentraciones de peróxido de hidrógeno. 100x.

En la foto y dibujo 1. En la condición control, las células mantienen una morfología conservada, con membranas íntegras y una distribución homogénea. No se observan signos de daño estructural significativo, lo que indica ausencia de muerte celular y, por tanto, la ausencia de necroptosis. Al exponer las células a 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comienzan a evidenciarse cambios morfológicos menores asociados a estrés oxidativo. Algunas células muestran alteraciones leves, como irregularidades en el contorno y discreta agregación, pero la mayoría conserva su integridad. Esto sugiere una etapa temprana de daño celular, en la que pueden activarse vías de muerte celular, aunque la necroptosis aún no es predominante. En la muestra tratada con 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observan cambios más marcados: pérdida de la forma celular normal, aumento de material granular y presencia de restos celulares. Estas características son compatibles con necroptosis, un tipo de muerte celular programada que cursa con inflamación y ruptura progresiva de la membrana plasmática, pero que aún conserva ciertos rasgos estructurales antes de la lisis completa. Finalmente, en la condición de 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el daño celular es extremo. La mayoría de las células ha perdido completamente su integridad, con escasos elementos celulares reconocibles. Este patrón corresponde más a necrosis no regulada, resultado de un estrés oxidativo excesivo, en el que la destrucción celular ocurre de forma rápida y descontrolada, superando los mecanismos regulados propios de la necroptosis. En conjunto, los resultados indican que la necroptosis se manifiesta de manera más evidente a concentraciones intermedias de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%), mientras que concentraciones bajas inducen daño limitado y concentraciones altas provocan necrosis masiva. Se aclara que la necroptosis no es inmediata los resultados se ven de cinco días en las concentraciones no letales, es en promedio 15 a 30 días que se observa el ataque invasivo de destrucción en *Aspergillus*.

**Análisis Morfológico del deterioro por Necroptosis.**

La evaluación microscópica de *Aspergillus salvadorensis* bajo diferentes niveles de necroptosis reveló alteraciones progresivas en la integridad de la cabeza conidial y en la densidad de las

conidias asociadas. El análisis microscópico reveló una degradación progresiva de las estructuras reproductivas en función del porcentaje de necroptosis inducida. En ejemplares con un daño mínimo (3%), se observó la preservación de la arquitectura fúngica, destacando cabezas conidiales globosas hinchadas, de morfología circular y alta densidad esporal; en esta fase, las conidias se mantienen compactas con una textura granulosa uniforme sobre un conidióforo estructuralmente firme. Las estructuras reproductivas presentaron una morfología prácticamente conservada. La cabeza conidial se observó esférica, voluminosa y uniformemente delimitada, con una superficie densamente cubierta por conidias. Estas conidias mantuvieron morfología esférica regular, con distribución homogénea y sin evidencia de separación prematura o desorganización. El conidióforo se mostró íntegro y robusto, sosteniendo adecuadamente la vesícula apical. Las conidias se ven completas, con un desarrollo normal en su estructura (esférica y con un pedicelo alargado). Esto sugiere que la necroptosis tiene un impacto leve en la morfología de las conidias a esta concentración. Al incrementar el nivel de necroptosis a un rango moderado (5%), se evidenció una reducción volumétrica de la cabeza conidial y una pérdida de la cohesión en la masa de esporas. Este estado se caracteriza por la aparición de irregularidades superficiales y zonas de erosión donde la densidad de las conidias disminuye, dejando áreas del conidióforo parcialmente expuestas. Se detectaron alteraciones morfológicas moderadas. La cabeza conidial exhibió una reducción visible en su diámetro, con pérdida parcial de su homogeneidad estructural. Se identificaron zonas con disminución de la densidad de conidias, generando áreas irregulares y discontinuas. La superficie adquirió un aspecto menos compacto, con interrupciones en el patrón esférico habitual. Aunque el conidióforo permaneció estructuralmente estable, la vesícula mostró signos de deterioro periférico. Las conidias se ven completas, con un desarrollo normal en su estructura (esférica y con un pedicelo alargado). Esto sugiere que la necroptosis tiene un impacto leve en la morfología de las conidias a esta concentración. A medida que aumenta la concentración de necroptosis, se puede observar que la conidia empieza a cambiar ligeramente, mostrando una disminución en su tamaño o una deformación, pero aún mantiene una forma relativamente intacta. A 10% de necroptosis, el daño fue marcadamente severo. La cabeza conidial se encontró casi completamente ausente, dejando expuesta la región apical del conidióforo. Las conidias mostraron una pérdida drástica, permaneciendo solo algunos remanentes esporádicos sin organización espacial. La ausencia de la estructura globular típica indica colapso avanzado de la vesícula conidial y disrupción completa del aparato productor de esporas. En esta etapa, la morfología corresponde a un conidióforo desnudo, carente de funcionalidad reproductiva. A concentraciones más altas de necroptosis, las conidias muestran un daño más evidente, posiblemente presentando elongación anormal o incluso fragmentación. Esto indica que a concentraciones elevadas de necroptosis, las conidias sufren mayor daño estructural.

En conjunto, los hallazgos evidencian que incluso incrementos modestos en necroptosis generan cambios progresivos y cuantificables en la arquitectura conidial, afectando primero la densidad de conidias y posteriormente la integridad total de la vesícula.

En resumen, se está observando necroptosis en *Aspergillus salvadorensis* a distintas concentraciones, podríamos interpretar lo siguiente: Hay Evidencia de necroptosis: Si el proceso de necroptosis está en curso, debería observarse una desintegración o alteración de las estructuras celulares, como una expansión anómala de la célula, ruptura de la membrana celular, o la liberación de contenido celular hacia el espacio extracelular, el hongo parece sufrir cambios en su estructura

conforme aumenta la concentración del agente químico provocando el stress oxidativo. Si estamos hablando de necroptosis, lo que podría estar sucediendo es que, a concentraciones más altas, el estrés causado por el agente desencadena el proceso de necroptosis, lo cual impide que la célula continúe funcionando normalmente y lleva a su muerte. A concentraciones más bajas, es posible que la célula no esté tan gravemente afectada, y solo se vean leves alteraciones, lo que podría indicar un comienzo del proceso de necroptosis, pero sin ser completamente irreversible. Interpretación de los cambios morfológicos: A 3% de concentración, la célula parece intacta, lo que podría indicar que no ha comenzado el proceso de necroptosis o que el daño es muy leve. A 5%, las alteraciones en la morfología podrían sugerir un proceso de necroptosis en sus etapas iniciales, donde algunas células comienzan a descomponerse, pero aún no de manera completa. A 10%, la desaparición de la estructura esférica y el alargamiento del tallo indican una necrosis avanzada o necroptosis, lo que sugiere que las células han alcanzado un punto en el cual su estructura se ve severamente afectada, con ruptura de sus componentes. (Ver Tabla 1)

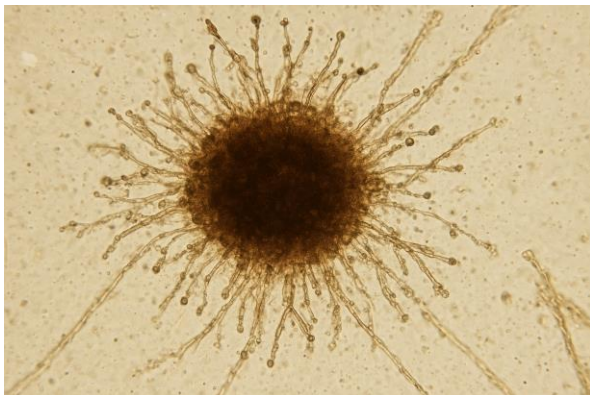


Fig 1. Muestra de *Aspergillus* morfología de vesícula, conidiforo y conidias con necroptosis.

En la imagen se observa muestra de *Aspergillus salivatorensis* con un conidióforo de *Aspergillus* con una morfología alterada por un proceso de necroptosis inducida. El tallo del conidióforo se eleva de manera recta, pero su textura aparece más densa y granular de lo habitual, señal de daño estructural. En el extremo superior se distingue una vesícula oscurecida y escasas conidias, de contornos poco definidos, que indica condensación del contenido celular y pérdida de integridad. Alrededor de la vesícula emergen fiálides distribuidas radialmente, aunque varias muestran acortamiento, colapso parcial y una disposición irregular, reflejando el deterioro producido por el estrés oxidativo. Sobre las fiálides se observan conidios esféricos, algunos bien formados, pero otros con bordes difusos, ruptura superficial o separación desigual, lo cual refuerza la presencia de muerte celular por daño oxidante. Todo el conjunto presenta un aspecto granuloso, con zonas de mayor densidad y sectores claros alrededor de la vesícula, indicativos de liberación de contenido intracelular. La imagen en su totalidad representa la estructura típica de un conidióforo, pero profundamente afectada por un proceso de necroptosis.

Se aprecia con claridad un conidióforo de *Aspergillus* sometido a un proceso avanzado de daño celular compatible con Necroptosis inducida por estrés oxidativo. La estructura principal, el eje o tallo del conidióforo, se observa relativamente recto, aunque presenta un color pardo más intenso y una textura interna más rugosa y granulada de lo normal, lo que indica alteraciones en la pared celular y acumulación anómala de material intracelular. Esta pérdida de homogeneidad en el tallo sugiere que los radicales libres han deteriorado la consistencia de la hifa que lo origina.

En el extremo distal del conidióforo se encuentra la vesícula, una esfera que en condiciones normales exhibe un aspecto más claro y uniforme. En la imagen, por el contrario, la vesícula

aparece marcadamente oscurecida, con un centro denso y bordes parcialmente irregulares, rasgos que reflejan un colapso estructural interno y una posible condensación del citoplasma como respuesta al estrés, en otras se observa ausencia de vesícula. Ese oscurecimiento, junto con la falta de uniformidad en la superficie, es característico de un daño celular significativo.

Rodeando la vesícula se disponen las fiálides, que normalmente se organizan de manera ordenada formando una corona simétrica. En esta proyección se observa que las fiálides están presentes, pero su longitud y forma se encuentran irregularmente comprometidas: algunas se visualizan delgadas y alargadas, mientras que otras están visiblemente acortadas, deformadas o con la punta colapsada, lo cual sugiere pérdida de turgencia y daño en la membrana celular. Esta asimetría en la arquitectura fialídica es propia de un proceso degenerativo.

En los extremos de las fiálides se encuentran los conidios, esporas que en un conidióforo sano deberían ser esféricas, homogéneas y distribuidas de manera simétrica. En esta imagen, si bien muchos conidios mantienen su forma redondeada, otros presentan contornos borrosos, áreas de translucidez, superficie rugosa o señales de desprendimiento incompleto, lo que indica alteraciones en la síntesis de la pared esporal o daño directo por especies reactivas de oxígeno. La distribución desigual de los conidios también sugiere una interrupción del proceso de esporulación.

Alrededor de toda la estructura se aprecia un halo claro, originado posiblemente por la liberación de contenido intracelular del hongo tras la ruptura o debilitamiento de la membrana. Este halo refuerza la interpretación de necroptosis o muerte celular asociada a daño oxidante. Además, en la vesícula y en algunas fiálides se observan pequeñas áreas granulares o burbujas citoplasmáticas, rasgo típico del deterioro causado por la exposición a peróxido de hidrógeno u otros agentes generadores de ROS.

En un frotis directo al fresco de *Aspergillus* tratado con peróxido de hidrógeno y observado a 100x, es posible apreciar únicamente cambios generales en la estructura del hongo. A ese aumento y sin tinción, las hifas pueden verse más oscuras, granuladas o parcialmente colapsadas, y es posible distinguir un conidióforo alterado con una vesícula que aparece menos definida y más densa de lo normal. También pueden apreciarse conidios dispersos y algunas deformaciones evidentes, como irregularidad en la forma de la cabeza aspergilar o zonas de ruptura en las hifas. Sin embargo, el nivel de detalle estructural como la forma precisa de las fiálides, la separación individual de los conidios o los cambios finos en la superficie de la vesícula no se observa claramente a 100x con un montaje fresco, ya que este tipo de preparación solo permite identificar la morfología global y los signos más evidentes de daño. Por lo tanto, lo que se visualiza es una imagen general de deterioro morfológico por efecto del estrés oxidativo, pero no una definición nítida de cada componente del conidióforo.

Con peróxido de hidrógeno aplicado directamente sobre un frotis fresco de *Aspergillus*, la imagen al microscopio se vería con signos claros de daño oxidativo inmediato, pero sin la nitidez fina de un preparado teñido. Al colocar el peróxido de hidrógeno, la estructura del hongo comienza a mostrar un oscurecimiento irregular en las hifas, como si partes del citoplasma se condensaran en pequeños grumos opacos. Las hifas, que normalmente son transparentes y de bordes definidos, adquieren un aspecto más quebrado y granulado, con zonas que parecen adelgazarse y otras que se

inflan levemente antes de colapsar. Algunas se observan con un tono más mate o amarillento, señal de que la pared celular empieza a dañarse.

El conidióforo puede verse aún como una prolongación vertical, pero con una superficie que pierde uniformidad. La vesícula en la punta ya no se aprecia como una esfera nítida; aparece más densa, oscura y con contornos borrosos, como si estuviera perdiendo su tensión interna. En torno a ella, las fiálides se distinguen solo parcialmente, muchas veces acortadas o mal definidas, producto del daño inmediato causado por el oxidante.

Los conidios, normalmente esféricos y brillantes, se ven dispersos y algunos pierden su forma circular, tomando un aspecto deformado o colapsado, casi como pequeñas burbujas que se han desinflado. En ocasiones, alrededor del hongo puede formarse un halo claro, producto de la interacción entre el  $H_2O_2$  y los componentes celulares liberados al medio.

En conjunto hay una impresión de desorganización y deterioro rápido, donde el hongo conserva su forma general, pero presenta múltiples señales de estrés severo: oscurecimiento, colapso parcial, pérdida de definición estructural y dispersión irregular de conidios. (Ver Tabla 1)

### **Con tinción (azul de lactofenol o algodón azul)**

El género *Aspergillus* es un hongo eucariota, por lo tanto, sus células poseen un núcleo verdadero delimitado por membrana nuclear, además de otros orgánulos como mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. La estructura de esta especie no se colorea en su totalidad por sus componentes no permiten el ingreso del colorante, esto debido a que el género *Aspergillus* corresponde a hongos filamentosos que presentan una organización estructural compleja, especialmente en su pared celular y en sus estructuras reproductivas. La pared celular desempeña un papel clave en la protección y estabilidad del hongo y está constituida principalmente por quitina, que confiere rigidez, y por polisacáridos como los  $\beta$ -glucanos, que forman el soporte estructural básico. A estos componentes se suman galactomananos y diversas glicoproteínas implicadas en procesos de adhesión y en la interacción con el sistema inmunitario del huésped. En determinadas especies, la presencia de melanina en la pared celular contribuye a aumentar la resistencia frente a factores ambientales adversos y a los mecanismos defensivos del organismo.

En el proceso de reproducción asexual, *Aspergillus* desarrolla un conidióforo que culmina en una vesícula de forma globosa. Esta estructura funciona como plataforma para la producción de esporas, ya que sobre su superficie se disponen las fiálides, ya sea de manera directa o mediante métulas, dependiendo de la especie. Las fiálides son las células responsables de la formación de las conidias, y la disposición y morfología de la vesícula constituyen criterios importantes para la identificación taxonómica del hongo. ( Samson, 2010)

Las conidias representan las esporas asexuales encargadas de la diseminación del microorganismo. Poseen una pared celular multilaminar rica en quitina y glucanos, frecuentemente pigmentada con melanina, lo que les otorga una notable resistencia a condiciones ambientales desfavorables. Además, presentan una capa externa hidrofóbica que facilita su dispersión por el aire. En su interior contienen los elementos celulares esenciales, como núcleo y mitocondrias, así como reservas

energéticas. Estas propiedades explican su facilidad para ser inhaladas y su relevancia en el desarrollo de infecciones causadas por *Aspergillus*. (Latgé, J. P. (1999)

En las hifas de *Aspergillus*, los núcleos suelen ser numerosos y se distribuyen a lo largo del filamento, separados por septos (tabiques) que presentan poros, lo que permite el movimiento de citoplasma y orgánulos entre compartimentos. Asimismo, las conidias también contienen uno o más núcleos, lo que les permite germinar y formar nuevas hifas cuando las condiciones son favorables. En resumen, *Aspergillus* es un organismo eucariota multicelular con células nucleadas, característica fundamental que lo diferencia de bacterias y otros organismos procariotas. (Latge, 1999, Latge, 2014, Knowon, 1992, Deacon, 2013)

Con tinción, la reacción del hongo al peróxido se vuelve más evidente. Las hifas se tiñen de un azul profundo ya que el peróxido posible reblandece la pared, las conidias son más resistentes al color por el grosor, pero presentan interrupciones claras donde la pared está dañada, visibles como zonas pálidas o adelgazadas. El conidióforo aparece más nítido, pero su contorno no es liso; parece rugoso, como la superficie de una fibra erosionada. La vesícula se tiñe intensamente, pero su redondez perfecta está alterada: se observa ligeramente colapsada de un lado, con un aspecto hundido. Las fiálides se ven como proyecciones cortas e irregulares; unas se tiñen bien y otras aparecen apenas como sombras. Los conidios tienden a teñirse homogéneamente, pero muchos muestran zonas claras o pequeños desgarros, indicadores de ruptura superficial. En conjunto, el hongo se ve definido, pero dañado, con un contraste claro entre las partes teñidas y las rotas.

**1. Tabla resumen comparativa de indicadores morfológicos**

Estructura	Estado basal (control)	Estrés oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (subletal)	Necroptosis inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (letal)
Hifas	Septadas, paredes homogéneas, citoplasma denso	Adelgazamiento focal, palidez, vacuolización moderada	Ruptura de pared celular, lisis, liberación de detritos
Conidióforo	Erecto, cilíndrico, íntegro	Deformación leve, pérdida parcial de turgencia	Colapsado, fragmentado, estructura irreconocible
Vesícula	Esférica, bien definida	Irregular, con áreas de oxidación y pérdida de brillo	Deformada, colapsada, ruptura membranal evidente
Conidios	Abundantes, esféricos, uniformes	Deformados, retraídos, desprendimiento parcial e hinchados.	Ausentes, destruidos o dispersos por lisis
Citoplasma	Denso, continuo	Vacuolizado, granularidad leve	Aspecto granular, extravasado, detritos celulares
Pared celular	Intacta, sin discontinuidades	Debilitada, oxidada, adelgazamientos	Discontinuidades amplias, ruptura y colapso
Aspecto general	Morfología estable y funcional	Alteración progresiva inicial	Desintegración total, muerte celular no apoptótica

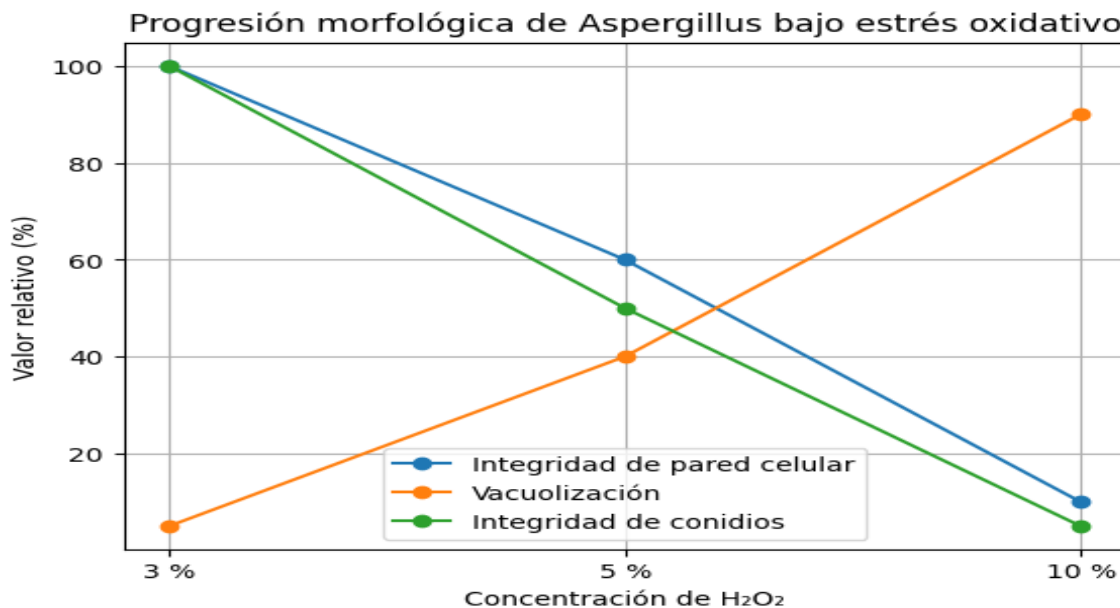


Gráfico 1. Progresión morfológica al stress oxidativo con peróxido de hidrógeno.

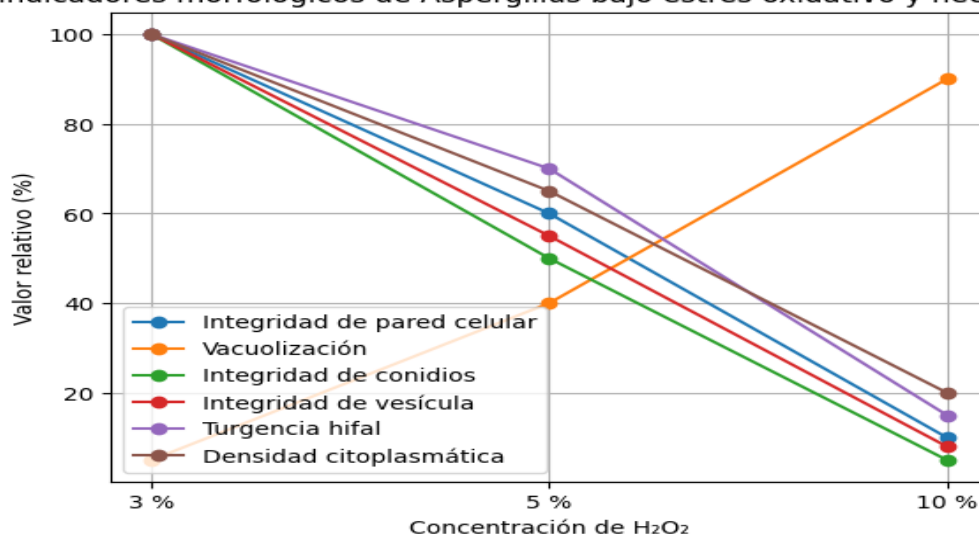
**Tabla 2. Signos presentados de conidias a diferentes concentraciones (%) de Peróxido de hidrógeno.**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Integridad pared celular (%)	Vacuolización (%)	Integridad de conidios (%)
3	100	5	100
5	60	40	50
10	10	90	5

En la tabla 2. Bajo una concentración de 3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Aspergillus salvadorensis* mantiene una morfología prácticamente íntegra, con valores máximos de integridad de la pared celular y de los conidios, mientras que la vacuolización es mínima, lo que indica un estado cercano a la condición basal con estrés oxidativo leve. Al aumentar la concentración a 5 %, se evidencia una transición hacia un estrés subletal, caracterizada por una disminución moderada de la integridad de la pared celular y de los conidios, acompañada de un incremento claro en la vacuolización, lo que sugiere la activación de mecanismos adaptativos y de compartimentalización del daño oxidativo. Finalmente, a 10 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la progresión morfológica culmina en un estado severo, donde la integridad de la pared celular y de los conidios se reduce drásticamente, mientras que la vacuolización alcanza valores elevados, reflejando una desorganización estructural avanzada y un colapso funcional compatible con un proceso de muerte celular inducida por estrés oxidativo. La gráfica 1 evidencia una secuencia progresiva de alteraciones morfológicas en *Aspergillus* a medida que se intensifica el estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la condición control, las células muestran un estado fisiológico estable, caracterizado por una integridad total de la pared celular y

de los conidios, junto con una vacuolización muy baja, lo que indica una estructura celular conservada. Bajo estrés subletal, comienzan a manifestarse cambios notorios: la integridad de la pared celular y de los conidios disminuye de forma moderada, mientras que la vacuolización aumenta, lo que sugiere la activación de mecanismos celulares de respuesta y adaptación al daño oxidativo. En la etapa de Necroptosis, el deterioro estructural es marcado, con una pérdida casi completa de la integridad de la pared celular y de los conidios, acompañada de un incremento máximo de la vacuolización. Este patrón refleja una transición desde una respuesta adaptativa inicial hacia un estado de daño celular irreversible y muerte, mostrando una relación inversa entre la conservación estructural y la vacuolización conforme avanza el estrés oxidativo.

Indicadores morfológicos de *Aspergillus* bajo estrés oxidativo y necroptosis



Grafica 2. Morfología al estrés oxidativo con Necroptosis.

La gráfica 2 presentada resume la respuesta estructural de *Aspergillus salvadorensis* frente a un gradiente de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, evaluando seis variables morfológicas fundamentales. El patrón general muestra un deterioro progresivo de la integridad celular a medida que la exposición al oxidante avanza desde condiciones fisiológicas hasta un escenario de Necroptosis completa. Bajo condiciones control, *Aspergillus* presenta una morfología íntegra, caracterizada por una pared celular y conidios funcionales, alta turgencia hifal, elevada densidad citoplasmática y mínima vacuolización. Al exponer el micelio a 3 % de  $H_2O_2$ , se observa un estado cercano al basal, con conservación general de la integridad estructural y solo indicios leves de estrés oxidativo, reflejados en una vacuolización incipiente sin comprometer de forma significativa la viabilidad celular.

Cuando la concentración de peróxido de hidrógeno se incrementa a 5 %, el hongo entra en una fase de estrés subletal, evidenciada por una reducción moderada en la integridad de la pared celular, de los conidios y de las vesículas, junto con una disminución de la turgencia hifal y de la densidad citoplasmática. En esta condición, la vacuolización aumenta de manera notable, sugiriendo una respuesta adaptativa orientada a la compartimentalización del daño y al mantenimiento temporal de la homeostasis celular.

A 10 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la progresión morfológica culmina en un estado compatible con Necroptosis, donde se registra una pérdida severa de la integridad de la pared celular, de los conidios y de las vesículas, acompañada por un colapso marcado de la turgencia hifal y una disminución pronunciada de la densidad citoplasmática. En contraste, la vacuolización alcanza valores máximos, lo que indica una desorganización celular avanzada y un fallo irreversible de los mecanismos de adaptación al estrés oxidativo.

Este patrón describe una respuesta claramente dependiente de la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la que *Aspergillus* transita desde un estado basal, pasando por una fase adaptativa subletal, hasta un desenlace necrótico caracterizado por el colapso estructural y funcional del micelio.

En el estado basal, todas las variables parten de un valor relativo de 100 %, reflejando la morfología típica del hongo intacto: paredes celulares firmes, hifas turgentes, citoplasma denso y conidióforos funcionales con vesículas y conidios plenamente desarrollados. El nivel mínimo de vacuolización (5 %) es consistente con células metabólicamente activas sin señales de estrés.

Bajo estrés oxidativo subletal se observa un desplazamiento simultáneo en todas las métricas. La vacuolización aumenta hasta 40 %, reflejando un estado de respuesta al daño, mientras que la integridad de pared, vesícula, conidios y citoplasma cae entre 50–70 %. La turgencia hifal disminuye a 70 %, lo cual sugiere afectación del equilibrio osmótico y del soporte estructural. Este conjunto es típico de un estado reversible, en el que el hongo activa mecanismos antioxidantes y repara parcialmente las lesiones inducidas por ROS. La estructura sigue siendo funcional, pero visiblemente comprometida.

El estado de Necroptosis muestra un quiebre drástico en la arquitectura celular: integridad de pared (15 %), integridad de vesícula (8 %), turgencia (15 %) e integridad de conidios (5 %) caen a niveles mínimos. La densidad citoplasmática se reduce a 20 %, indicando extravasación masiva del contenido interno y ruptura de la compartimentalización. En contraste, la vacuolización alcanza 90 %, lo que representa uno de los indicadores más claros de disfunción severa y colapso de los sistemas de mantenimiento celular. La combinación de estos valores confirma un patrón de muerte celular no apoptótica, caracterizado por lisis, ruptura osmótica y degradación irreparable de las estructuras reproductivas.

El comportamiento de los indicadores demuestra que la necroptosis en hongos filamentosos puede cuantificarse mediante métricas morfológicas, y la gráfica lo refleja con un descenso sincronizado de la mayoría de variables estructurales frente a un incremento explosivo de vacuolas. Esta relación permite diferenciar tres estados biológicos: normalidad, estrés compensado y colapso terminal. Además, resalta la pared celular y la vesícula como los elementos más sensibles a la oxidación, mientras que la turgencia hifal y el citoplasma son marcadores robustos del nivel de integridad funcional.

El análisis comparativo demuestra que *A. salvadorensis* presenta una transición progresiva desde un estado fisiológicamente estable a uno de estrés oxidativo moderado y, finalmente, hacia una forma terminal de muerte celular regulada. La intensidad y distribución del daño estructural en cada condición reflejan la sensibilidad del hongo a oxidantes fuertes y la posibilidad de inducir Necroptosis mediante perturbación dirigida del equilibrio redox intracelular. Estos hallazgos

aportan un marco visual y experimental consistente para comprender la dinámica celular de *A. salvadorensis* frente a estímulos químicos, y constituyen una base sólida para estudios posteriores enfocados en la caracterización molecular de vías de resistencia oxidativa y mecanismos de muerte programada en hongos filamentosos. (Arias, 2021, Geoghegan, 2020, Kowalski, 2022)

## Discusión

La respuesta de *A. salvadorensis* al estrés oxidativo es dependiente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que coincide con patrones observados. En otros hongos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un rol determinante en la activación de rutas de muerte celular programada, actuando como señales intracelulares que desencadenan respuestas dependientes de metacaspasas fúngicas y vías de señalización MAPK. (Madeo et al., 2002; Carmona-Gutierrez et al., 2010; Ikner & Shiozaki, 2005). A bajas concentraciones del agente oxidante, las estructuras celulares mantienen su integridad; sin embargo, a una concentración del 5 % se observan alteraciones morfológicas propias de una muerte celular programada emergente, lo cual es consistente con procesos mediados por vías similares a caspasas fúngicas y mecanismos MAPK previamente descritos en hongos. (Dagenais & Keller, 2009).

La desintegración casi completa a 10% sugiere que el estrés oxidativo sobrepasa la capacidad fúngica de adaptación, activando rutas de Necroptosis que conllevan colapso hifal y pérdida estructural generalizada. Fenómenos similares han sido documentados en otros *Aspergillus* y hongos patógenos bajo condiciones de ROS elevadas. (Latge, 1999, Dagenais, 2009, Shlezinger, 2012, Carmona, 2010)

Los resultados proporcionan una línea de evidencia morfológica que apoya la existencia de procesos comparables a Necroptosis en hongos filamentosos, abriendo la puerta a estudios de carácter molecular que involucren regulación redox, integridad de membranas y señalización por estrés.

Desde un enfoque comparativo, estas proteínas permiten inferir la capacidad del hongo para activar procesos de muerte celular bajo condiciones de estrés, especialmente estrés oxidativo, el cual en hongos desencadena acumulación de especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial y activación de factores proteolíticos que llevan a la pérdida de integridad de membrana. De manera complementaria, la vía de incompatibilidad vegetativa, mediada por HET proteínas, puede generar una respuesta de muerte celular regulada que comparte rasgos morfológicos con la Necroptosis, como la lisis celular y la liberación de contenido citoplasmático. (Glass, 2006, Paolotti, 2009, Saupe, 2000)

El análisis bioinformático conceptual de la muerte celular regulada en *Aspergillus salvadorensis* permite comprender cómo esta especie, al igual que otros hongos filamentosos, podría activar mecanismos funcionalmente equivalentes a los procesos de necroptosis descritos en organismos superiores, aun cuando carece de los genes clásicos asociados a dicha vía en animales (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Sharon et al., 2009). En hongos, la muerte celular programada se articula a través de rutas particulares que involucran metacaspasas, proteínas de incompatibilidad vegetativa tipo HET, dominios NACHT/WD40 asociados a sensores intracelulares y sistemas ATG vinculados a la autofagia, conformando una red molecular distinta de la apoptosis y necroptosis animales. (Glass & Dementhon, 2006; Paoletti & Saupe, 2009; Nakatogawa et al., 2009).

Desde esta perspectiva, un primer paso teórico consiste en la identificación de genes candidatos mediante la búsqueda de ortólogos en especies filogenéticamente cercanas como *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus nidulans*, así como en la detección de dominios funcionales conservados como el dominio C14 en metacaspasas, dominios HET implicados en incompatibilidad vegetativa y dominios NACHT/WD40 relacionados con la detección y transducción de señales de estrés. (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Glass & Dementhon, 2006; Paoletti & Saupe, 2009).

Actualmente, la evidencia sugiere que la Necroptosis fúngica puede ser un mecanismo importante en la interacción huésped-patógeno. Un inductor clave identificado para la Necroptosis en células del huésped (*in vitro*) es el exopolisacárido secretado por *A. fumigatus* (como la galactomanano-galactano, GAG). Sin embargo, para inducir la necroptosis en el hongo mismo (en *A. salvadorensis*), el enfoque se centra en el estrés ambiental/químico que desregula los mecanismos de supervivencia.

La necroptosis en hongos filamentosos describe una forma de muerte celular programada no apoptosis, mediante la cual las colonias miceliales pueden gestionar daño extremo eliminando de manera controlada hifas comprometidas, contribuyendo así a la supervivencia del micelio en su conjunto (Glass et al., 2000; Paoletti & Saupe, 2009). En *Aspergillus salvadorensis*, la evidencia comparativa con especies emparentadas sugiere la existencia de un sistema integrado que involucra sensores redox y receptores tipo NOD/NACHT, cascadas MAPK de respuesta al estrés como SakA/Hog1 y MpkC, así como quinasas con similitud funcional a RIP, capaces de coordinar respuestas de muerte celular regulada bajo condiciones adversas. (Hagiwara et al., 2009; Kawakami et al., 2013; Daskalov et al., 2016).

La activación de estas rutas conduciría a la señalización hacia ejecutores membranales del tipo HeLo/HELL proteínas capaces de oligomerizarse e insertarse en la membrana plasmática formando poros, lo que provoca pérdida de integridad celular, lisis y liberación del contenido citoplasmático, un mecanismo característico de muerte lítica regulada en hongos (Daskalov et al., 2016; Saupe, 2020). En conjunto, estos elementos apoyan que *A. salvadorensis* no desarrolla necroptosis en el sentido estricto descrito en animales, sino un conjunto de respuestas funcionalmente equivalentes, integradas dentro de una red molecular fúngica especializada en la eliminación controlada de células dañadas como estrategia evolutiva de adaptación al estrés (Saupe, 2020).

## Conclusiones

*Aspergillus salvadorensis* presenta una respuesta morfológica claramente dependiente de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la que el aumento del estrés oxidativo conduce a cambios celulares progresivos y bien definidos. La exposición a concentraciones del 5 % y 10 % desencadena alteraciones morfológicas típicas de Necroptosis, lo que sugiere que la muerte celular inducida por estrés oxidativo constituye un mecanismo relevante en la biología celular de este hongo. El efecto del estrés se manifiesta de manera escalonada, iniciando con modificaciones potencialmente reversibles, como el incremento de la vacuolización y la pérdida parcial de la integridad estructural, antes de avanzar hacia una destrucción celular extensa e irreversible. En este proceso, la vacuolización emerge como el indicador temprano más sensible, ya que aumenta antes del colapso estructural global. La pared celular y la vesícula se identifican como los componentes más

susceptibles al daño oxidativo, funcionando como un umbral crítico entre el daño reparable y la muerte celular definitiva. La Necroptosis, en etapas avanzadas, se caracteriza por una pérdida masiva de la compartimentalización interna, una turgencia mínima y la destrucción casi completa de las estructuras reproductivas. En conjunto, estas métricas permiten definir un perfil cuantitativo de la progresión morfológica, con aplicaciones potenciales en estudios de toxicidad, mecanismos de defensa antioxidante y patogenicidad fúngica. La concentración del 10 % es letal e induce a la Necroptosis con pérdida de la integridad y funcionamiento del hongo.

### Conflictos de Interés

El autor declara no poseer conflictos de interés.

### Referencias

- Aguirre J, Hansberg W, Navarro R.(2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;29(2):211–22.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular biology of the cell* (7th ed.). Garland Science.
- Arias, M., & Ramírez, L. (2021). *Oxidative stress responses in filamentous fungi*. *Journal of Medical Mycology*, 58(4), 215–228.
- Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M. A., Zimmermann, A., Aguilera, A., Austriaco, N., Ayscough, K.Madeo, F. (2018). Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. *Microbial Cell*, 5(1), 4–31. <https://doi.org/10.15698/mic2018.01.607>
- Cookson, B. T., & Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*, 9(3), 113–114. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01936-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01936-3)
- Dagenais TRT, Keller NP. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(3):447–65.
- Daskalov, A., Habenstein, B., Martinez, D., Debets, A. J. M., Sabaté, R., Loquet, A., & Saupe, S. J. (2016). Signal transduction by a fungal NOD-like receptor based on propagation of a prion fold. *PLoS Biology*, 14(4), e1002459. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002459>
- Deacon, J. W. (2013). *Fungal biology* (4th ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Geoghegan, I. A., & Steinberg, G. (2020). *Stress mechanisms in Aspergillus species*. *Fungal Genetics and Biology*, 140, 103380.

- Georgiou G. How cells respond to oxidative stress. *Science*. 2002;295(5561):248–9.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., & Shiu, P. K. T. (2000). The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*, 34, 165–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.165>
- Gonçalves AP. et al., (2020). Regulated cell death pathways in fungi. *Annual Review of Microbiology*.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M. Mizuno, T. (2009). The SskA–SakA MAP kinase pathway regulates conidiation and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1796–1806. <https://doi.org/10.1128/EC.00113-09>
- Harris SD. Hyphal morphogenesis: an evolutionary perspective. *Fungal Biol*. 2011;115(6):475–84.
- Ikner, A., & Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.023>
- Jamieson DJ. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998;14(16):1511–27.
- Kawakami, T., Kadooka, C., & Honda, Y. (2013). MpkC MAP kinase is involved in oxidative stress tolerance in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.04.001>
- Kowalski CH, Beattie SR, Fuller KK, McGurk EA, Tang YW, Hohl TM, et al. (2019). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress modulates fungal morphogenesis. *mBio*. 2019;10(2):e00393–19.
- Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1992). *Medical mycology*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger.
- Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310–350. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Büttner S, Eisenberg T, Kroemer G. (2009). Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(1):12–35.
- Paoletti, M., & Saupe, S. J. (2009). Fungal incompatibility: Evolutionary origin in pathogen defense? *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000510. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000510>
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957), 1208–1212. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>

Rispail N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grünler A, Huguet R, et al. (2009) .Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcieneurin signalling components in plant-pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 2009;46(4):287–98.

Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Saupe, S. J. (2020). Amyloid signaling in fungal programmed cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(8), a036434. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036434>

Severin, F. F., & Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, 12(23), R844–R845. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01350-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01350-0)

Shlezinger, N., Irmer, H., Dhingra, S., Beattie, S. R., Cramer, R. A., & Sharon, A. (2017). Sterilizing immunity in the lung relies on targeting fungal apoptosis-like programmed cell death. *Science*, 357(6355), 1037–1041. <https://doi.org/10.1126/science.aam7445>

Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. (2005) .Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 2005;15(6):319–26.

Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112(4), 467–480. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00111-9)

Vandenabeele P. et al., (2010). Molecular mechanisms of necroptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*