

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



IDENTIFICACIÓN DE 6 AISLADOS CLÍNICOS DE CEPAS DE HONGOS MUCORALES, Y DISEÑO Y EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*, DOS ESPECIES DE ALTA FRECUENCIA DE INFECCIÓN.

Por:

ALEXIS FEDERICO CABRAL DE ROBLES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo Coahuila, México

Diciembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

IDENTIFICACIÓN DE 6 AISLADOS CLÍNICOS DE CEPAS DE HONGOS MUCORALES, Y DISEÑO Y EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*, DOS ESPECIES DE ALTA FRECUENCIA DE INFECCIÓN.

Por:

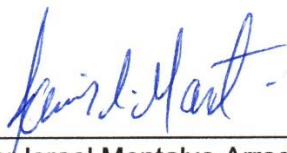
ALEXIS FEDERICO CABRAL DE ROBLES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Asesor principal



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Co-asesor



Dra. Aida Isabel Leal Robles
Co-asesor



Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Co-asesor

Saltillo Coahuila, México
Diciembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

IDENTIFICACIÓN DE 6 AISLADOS CLÍNICOS DE CEPAS DE HONGOS MUCORALES, Y DISEÑO Y EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*, DOS ESPECIES DE ALTA FRECUENCIA DE INFECCIÓN.

Por:

ALEXIS FEDERICO CABRAL DE ROBLES

TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA


Aprobada por el Comité de Evaluación:




Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Presidente



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Vocal



Dra. Aída Isabel Leal Robles
Vocal



Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Vocal suplente





M.C. Sergio Sánchez García
Coordinación División de Ingeniería

Saltillo Coahuila, México
Diciembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

IDENTIFICACIÓN DE 6 AISLADOS CLÍNICOS DE CEPAS DE HONGOS MUCORALES, Y DISEÑO Y EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*, DOS ESPECIES DE ALTA FRECUENCIA DE INFECCIÓN.

Por:

ALEXIS FEDERICO CABRAL DE ROBLES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Asesor principal

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Co-asesor

Dra. Aida Isabel Leal Robles
Co-asesor

Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Co-asesor

Saltillo Coahuila, México
Diciembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

IDENTIFICACIÓN DE 6 AISLADOS CLÍNICOS DE CEPAS DE HONGOS MUCORALES, Y DISEÑO Y EVALUACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*, DOS ESPECIES DE ALTA FRECUENCIA DE INFECCIÓN.

Por:

ALEXIS FEDERICO CABRAL DE ROBLES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Evaluación:

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Presidente

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Vocal

Dra. Aída Isabel Leal Robles
Vocal

Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Vocal suplente

M.C. Sergio Sánchez García
Coordinación División de Ingeniería

Saltillo Coahuila, México
Diciembre 2022

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante de Ingeniero en Biotecnología

Alexis Federico Cabral de Robles

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme todo lo necesario para lograr todas mis metas.

A la **División de Ingeniería** y al **Departamento de Ciencias Básicas** por todo el apoyo institucional que un instituto puede dar.

A mi asesor **Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo** por darme la asesoría para realizar este trabajo de investigación que dará muchos frutos. También agradezco a mis co-asesores **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes** y La **Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez** por la ayuda incondicional que me brindaron durante el transcurso de la tesis.

A las estudiantes de la carrera de Ingeniero en Biotecnología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, **Bertha Lizeth Hernández Tello** y **Katia Itzel López Ibarra** por su apoyo en experimentos, cuyos productos se publican en esta obra.

A mi **familia** por brindarme el amor y las fuerzas que me abrieron el camino hacia mis metas.

Tabla de contenido

Declaración de no plagio	IV
Agradecimientos	V
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VIII
Introducción	1
Revisión de literatura	4
Generalidades del orden de los <i>Mucorales</i>	4
Morfología y ciclo de vida	5
Factores de virulencia	7
Métodos moleculares de detección rápida y específica	10
Propuesta de investigación	14
Materiales y métodos	15
Extracción de ADN genómico	15
Amplificación por PCR y secuenciación de la subunidad larga 28S y el espaciador interno ITS1 del gen ribosomal	15
Limpieza de las secuencias y búsqueda en la base de datos de nucleótidos del NCBI	16
Construcción del árbol fenético	16
Identificación de las regiones disímiles en los genomas de <i>Rhizopus oryzae</i> y <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	17
Diseño de cebadores	17
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivos generales y específicos	21
Resultados y discusión	22
Identificación de género y especie de 6 cepas por medio de la secuencia parcial del gen 28S ribosomal y de la secuencia ITS1	22
Identificación de las regiones disímiles en la secuencia de los genomas de los hongos patógenos <i>R. oryzae</i> y <i>C. bertholletiae</i>	28
Diseño de los cebadores de PCR especie-específicos para <i>R. oryzae</i> y <i>C. bertholletiae</i>	31
Pruebas de especificidad de los cebadores de PCR específicos de especie combinando los conjuntos de pares de cebadores	34
Pruebas de especificidad de los cebadores de PCR específicos de especie combinando muestras de ADN genómico de <i>R. oryzae</i> y <i>C. bertholletiae</i>	37
Conclusiones	43
Referencias	44

Lista de figuras

Figura 1. Amplificación de la subunidad larga 28S del gen ribosomal en las cepas del orden Mucorales	23
Figura 2. Amplificación de la región ITS1 por PCR	24
Figura 3. Calidad de la secuencia 28S.	25
Figura 4. Árbol fenético construido con las secuencias 28S e ITS1 de los hongos Mucorales.	27
Figura 5. Diagrama de flujo de la tubería de comandos 'not alike'	30
Figura 6. Cebadores de PCR especie específicos	33
Figura 7. Evaluación de especificidad intercambiando los pares de cebadores	35
Figura 8. Evaluación de especificidad del conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_160	39
Figura 9. Evaluación de especificidad del conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_348	40

Lista de tablas

Tabla 1. Cebadores de PCR que usamos para amplificar el 28S y el ITS1	23
Tabla 2. Identificación del género y especie de 6 cepas de hongos Mucorales	26
Tabla 3. Fragmentos disímiles retenidos y fragmentos eliminados	31
Tabla 4. Cebadores de PCR especie específicos	34

Introducción

Las especies de hongos que pertenecen al orden de los Mucorales se encuentran en el clado de los Zigomicetos. Dentro de ese clado se encuentran dos filos llamados Mucormicota y Zoopagomicota. En el filo Mucormicota se encuentra la familia Mucormicotina que comprende el orden de los Mucorales. La comunidad científica ha aceptado como miembros a 261 especies distribuidas a lo largo de 55 géneros de los cuales han reportado 38 especies como causantes de infecciones.

Una revisión de literatura científica realizada por (Walther y col., 2020), reveló que las especies más frecuentes en EEUU son *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*), *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor* sp., *Lichtheimia* sp., *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella bertholletiae* y *Apophysomyces trapeziformis*, y las principales vías de contagio están involucradas con materiales de nosocomio así como el contacto directo con materia orgánica en descomposición contaminada con Mucorales.

Los mucorales han desarrollado numerosas estrategias en forma de factores de virulencia para evadir la maduración del fagosoma dentro del macrófago y poder inducir la apoptosis o matar al macrófago además de la invasión de tejidos. Estos factores de virulencia se pueden agrupar en eventos de reconocimiento extracelular, dimorfismo, interacciones con metabolitos y elementos de rutas de señalización. Aunque el conocimiento sobre estos factores de virulencia de los mucorales no es muy profundo, se puede observar que es muy variado. Uno de los factores de virulencia muy importante es la enzima Erg11 involucrado en la biosíntesis de la membrana del hongo. Los fármacos como los triazoles inactivan esta enzima y las especies que son resistentes a esos fármacos presentan mutaciones puntuales que producen enzimas Erg11 que no se pueden inactivar con los triazoles.

Vitale y colaboradores (2012) realizaron experimentos de susceptibilidad en donde desafiaron a 66 cepas de *Mucorales* identificadas molecularmente a 8 antifúngicos y encontraron que la susceptibilidad no solo difiere en el nivel de familia y géneros, sino que también difiere al nivel de especies. Debido a esto y a la alta tasa de mortalidad es de suma importancia identificar al agente causal de la mucormicosis hasta la especie para poder dar un tratamiento adecuado.

Las técnicas de identificación molecular que revisamos en la literatura científica utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la variante de tiempo real cuantitativo y los cebadores que diseñan tienen como objetivo principal las regiones del gen ribosomal antes mencionadas y en algunos otros casos utilizan el gen ribosomal mitocondrial o la secuencia del gen *COTH* que es un gen específico de *Mucorales*. Todas estas técnicas solo pueden identificar el orden, la familia o el género, pero fallan al tratar de identificar las especies. Para lograr identificar las especies acoplan el producto de PCR al análisis por espectrometría de masas (mass-spectrometry) en sus diversas variantes o a un análisis de fusión de alta resolución para poder obtener información suficiente y poder discernir entre especies que pertenecen al mismo género.

Actualmente existen métodos de detección rápida, sensible y específica hasta cierto límite, pero el costo de inversión, operación y mantenimiento es muy alto y hace imposible que laboratorios de recursos limitados puedan acceder a éstos.

En este trabajo sometimos a prueba, con resultados satisfactorios, una tubería de comandos que identifica regiones disímiles entre un genoma y varios genomas de una base de datos determinada con el objetivo de diseñar cebadores específicos que nos permitieron diferenciar dos especies de *Mucorales* de alta frecuencia infectiva *R. oryzae* y *C. bertholletiae* de otras especies que pertenecen al mismo orden incluso el mismo género (caso *R. oryzae* y *R. delemar*). Además en este trabajo identificamos el género y especie de 6 aislados clínicos.

Palabras clave: Mucorales, 'not lilke', 'Python', PCR

Revisión de literatura

Generalidades del orden de los Mucorales

Las especies de hongos que pertenecen al orden de los Mucorales se encuentran en el clado de los Zigomicetos. Dentro de ese clado se encuentran dos filos llamados Mucormicota y Zoopagomicota. En el filo Mucormicota se encuentra la familia Mucormicotina que comprende el orden de los Mucorales. La comunidad científica ha aceptado como miembros a 261 especies distribuidas a lo largo de 55 géneros de los cuales han reportado 38 especies como causantes de infecciones (Walther y col., 2019).

Los hongos Mucorales son muy importantes para el ecosistema debido a que son los primeros organismos unicelulares que colonizan la materia orgánica y son los responsables de llevar a cabo los procesos iniciales de descomposición e incluso algunas especies son utilizadas para fermentar alimentos (Benny y col., 2014; Morin-Sardin y col., 2017). También, algunas especies, han sido ampliamente utilizadas en el área de la biotecnología para la obtención, por medio de la biotransformación, de compuestos moleculares de interés industrial como algunos esteroides y terpenos así como un amplio espectro de enzimas (Benny y col., 2014; Hüettel y col., 2011; Morin-Sardin y col., 2017).

Estos hongos se caracterizan por su rápido crecimiento y la formación de cantidades mesurables de hifas. La forma de reproducción sexual se da por la formación de zigosporas que son el cigoto de forma variada con una pared bastante gruesa producto de la fusión de dos hifas terminales el cual incluye el núcleo y el citoplasma. La forma de reproducción asexual se da por la formación de esporangios: unidad celular grande en el cual se forman las esporangioesporas, dentro del esporangio se observa una vesícula estéril llamada columella. Dichos esporangios son de tamaño muy grande que pueden

visualizarse sin el uso de microscopio. Los esporangios suelen presentarse de formas variadas, por ejemplo aquellos se llaman esporangias cuando contienen un número incontable de esporangioesporas, si contiene de una a pocas esporangioesporas, entonces se le conoce como esporangiola, y si además las esporas son elongadas, se le conoce como mesoesporangia (Walther y col., 2019; Walther y col., 2020).

Así como existen especies con bondades, también hay especies que se caracterizan por producir mucormicosis en humanos en donde se diseminan rápidamente en el hospedero, invaden el sistema vascular y producen la necrosis del tejido infectado. Estas micosis causadas por las especies de Mucorales patógenos están asociadas con una alta tasa de mortalidad. La incidencia de mucormicosis ha incrementado debido al incremento de enfermedades que causan inmuno-compromiso como la diabetes, infecciones con VIH, cáncer, y pacientes que están recibiendo un tratamiento inmuno-supresor como aquellos que fueron sometidos a cirugía para transplantes de órganos (Ibrahim y Kontoyiannis 2013; Kontoyiannis y col., 2016; Chakrabarti y col., 2014; Rammaert y col., 2012).

Una revisión de literatura científica realizada por (Walther y col., 2020), reveló que las especies más frecuentes en EEUU son *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*), *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor* sp., *Lichtheimia* sp., *Mucor circinelloides*, *Cunninghamella bertholletiae* y *Apophysomyces trapeziformis*, y las principales vías de contagio están involucradas con materiales de nosocomio así como el contacto directo con materia orgánica en descomposición contaminada con Mucorales.

Morfología y ciclo de vida

Los hongos Mucorales muestran un número muy pequeño de caracteres morfológicos con los que se puedan distinguir entre especies. Estos hongos son

filamentosos y presentan hifas con septos esporádicos, se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se da por la fusión de dos hifas (1N) (citoplasma y núcleo) terminales con el tipo de apareamiento contrario y produce una estructura celular llamada zigoespora (zigoto 2N). De la zigoespora emerge un promicelio que dará origen a una célula especializada llamada esporangio en el cual la zigoespora 2N dará origen a las esporangioesporas (1N) por medio de la meiosis. La mayoría de las especies del orden de los Mucorales son heterotálicos, que quiere decir que las hifas que se van a aparear deben de proceder de diferentes cepas, pero también hay reportes de especies homotálicas (Hoffmann y col., 2013; Walther y col., 2019; Walther y col., 2020).

En la reproducción asexual, algunas hifas (1N) terminales también pueden generar aquella célula especializada llamada esporangio que por medio de mitosis genera las esporangioesporas y cada esporangioespora puede germinar y producir hifas (Hoffmann y col., 2013; Walther y col., 2019; Walther y col., 2020).

Existen algunos caracteres morfológicos que son de ayuda en la identificación de los géneros. Estos son algunas características del micelio, esporangio, esporangioesporas y zigoesporas que pueden variar entre todas las especies. El micelio puede presentar diverso color, altura y puede presentar algunas células llamadas clamidioesporas. El esporangio puede presentar diversos tamaños y colores, y dependiendo de la especie puede tener diferentes orígenes en las hifas así como diferentes patrones de ramificaciones, también pueden observarse variaciones en el número y forma de las esporas; el esporangio de algunas especies también responde a la luz. Las esporangioesporas tienen variación en el tamaño, forma y color y también depende de la especie. Las zigoesporas suelen ser de origen homotálicas o heterotálicas, estas pueden estar presentes en la superficie del hongo o estar sumergidas y también presentan variación en la forma tamaño y color (Hoffmann y col., 2013).

Como hemos mencionado anteriormente, existen especies que son patógenas de humanos y durante el ciclo de vida y su reproducción sexual o asexual existen momentos en donde las esporas asexuales de estos hongos entran en contacto con la superficie del epitelio o las mucosas. La invasión del tejido se da debido a lesiones en la integridad del mismo permitiendo el paso de las esporas al interior de las células. Una vez invadido el tejido, pueden internalizarse y dirigirse al sistema vascular y diseminarse por todo el cuerpo (Ghuman y Voelz, 2017; Hussell y Bell, 2014).

Los macrófagos y neutrófilos representan la respuesta inmune temprana cuando el cuerpo se enfrenta a una infección causada por hongos, y también lo hace cuando se trata de una mucormicosis. Se ha observado que los macrófagos alveolares e intersticiales fagocitan las esporas y estas pueden inducir la apoptosis a los macrófagos o pueden permanecer en dormancia (Andrianaki y col., 2018; López-Muñoz y col., 2018).

Los mucorales han desarrollado numerosas estrategias en forma de factores de virulencia para evadir la maduración del fagosoma dentro del macrófago y poder inducir la apoptosis o matar al macrófago. Entre estas estrategias puedo citar las siguientes: el macrófago falla en la eliminación de la espora en dormancia en el fagosoma pero inhibe su germinación, las esporas bloquean la maduración del fagosoma debido a la melanina o a través de la vía de señalización de calcineurina, las esporas en dormancia se reactivan y eliminan al macrófago o inducen apoptosis (Nicolás y col., 2020).

Factores de virulencia

Estos factores de virulencia se pueden agrupar en eventos de reconocimiento extracelular, dimorfismo, interacciones con metabolitos y elementos de rutas de señalización. Aunque el conocimiento sobre estos factores de virulencia de los mucorales no es muy profundo, se puede observar que es muy variado. Por

ejemplo, los niveles altos de hierro libre en el plasma incrementa la susceptibilidad a padecer mucormicosis, y esto es debido a que el metabolismo del hierro en los mucorales es muy importante para el desarrollo de la infección. Los mucorales han desarrollado sistemas muy eficientes para la adquisición de hierro del medio, entre estos se encuentran el sistema de toma de hierro de alta afinidad conformado por la reductasa de hierro, la ferroxidasa y una permeasa además de la síntesis de sideróforos que retienen el hierro para su disposición (Carroll y col., 2017; Navarro-Mendoza y col., 2018).

Otro factor de virulencia, que se observa en especies del género *Mucor*, es la capacidad de alternar el estilo de vida pasando de forma filamentosa a levaduriforme, a eso se le conoce como dimorfismo. Por ejemplo *Mucor rouxii* en presencia de azúcares fermentables crece en forma de levadura tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, por el contrario *Mucor genevensis* pasa al estilo de vida levaduriforme en presencia de una hexosa pero solo si está creciendo en un ambiente de aerobiosis. *Mucor circinelloides* también es un hongo di-mórfico ya que crece en forma de levadura en condiciones de anaerobiosis y como hongo filamentoso en condiciones aerobias. Y cuando es eliminado o alterado el sistema molecular que dispara el evento di-mórfico *M. circinelloides* no puede pasar a la forma de hongo filamentosos permaneciendo como levadura y además se observa que esas cepas son menos virulentas comparándolas con las cepas que no tienen alterado dicho sistema molecular. Estas observaciones sugieren fuertemente que la transición di-mórfica juega un papel muy importante en la virulencia de algunas especies de mucorales (Lee y col., 2015; Lee y col., 2013; Orłowski 1991; Wolff y col., 2002).

Los genes involucrados en el desarrollo de resistencia a antifúngicos son factores de virulencia muy importantes. Los triazoles son la fármacos principales utilizados para tratar las mucormicosis, estos desestabilizan la membrana y permiten la acumulación de metilesteroles tóxicos para el hongo. En la actualidad hay numerosos reportes de la adquisición de resistencia a estos fármacos por

parte de algunos aislados clínicos de algunas especies de mucorales. Y los genes que codifican para el factor de transcripción Tac1 así como *CDR1* y *CDR2* que codifican para dos bombas de eflujo que transportan xenobióticos al exterior de la célula representan factores de virulencia debido a que cuando se inhiben disminuye la virulencia del mucoral y el modo de acción que genera la resistencia es que las bombas expresadas gracias a Tac1 exportan al exterior de la célula los fármacos triazoles y estos no tienen contacto con la enzima Erg11 que participa en la síntesis de las membranas (Prasad y col., 1995; Sanglard y col., 1995). De una manera lógicamente equivalente existen otros factores de virulencia que son los genes que codifican para el factor de transcripción Mrr1 que activa la expresión del gen *MDR1* que codifica otro transportador de fármacos (Dunkel y col., 2008; Franz y col., 1998).

También se ha propuesto al gen que codifica la enzima lanosterol 14(alfa)-desmetilasa (Erg11) representa un factor de virulencia ya que se ha reportado mutantes puntuales en algunas especies de mucorales aislados a partir de pacientes enfermos de mucormicosis, y esa mutación es responsable de la resistencia a los triazoles. La mutación más frecuente es el cambio de fenilalanina por tirosina en la posición 129 (Y129F) (Sagatova y col., 2016).

Por último y no menos importante, se considera el gen que codifica a CotH así como la proteína 78 reguladora dependiente de glucosa (GRP78) como otros factores de virulencia. GRP78 se expresa en células del endotelio del tejido vascular debido a un incremento de glucosa o a agentes acidificantes en el torrente sanguíneo. Esta proteína es un receptor de glucosa pero también reconoce a CotH que se expresa en la membrana de la espora del hongo y le sirve de ancla para adherirse al endotelio y facilitarle la entrada de la hifa que va a germinar de la espora (Baldin y Ibrahim 2017).

Vitale y colaboradores (2012) realizaron experimentos de susceptibilidad en donde desafiaron a 66 cepas de Mucorales identificadas molecularmente a 8

antifúngicos y encontraron que la susceptibilidad no solo difiere en el nivel de familia y géneros, si no que también difiere al nivel de especies, por eso es de suma importancia identificar al agente causal de la mucormicosis hasta la especie para poder dar un tratamiento adecuado.

Métodos moleculares de detección rápida y específica

Debido a la alta tasa de mortalidad asociada a las mucormicosis y la diferencia en susceptibilidad a fármacos observada hasta el nivel de especie, es necesario desarrollar técnicas específicas, sensibles y rápidas que permitan identificar el género y especie del agente causal de la mucormicosis para dar el tratamiento adecuado.

Los marcadores moleculares de preferencia para la comunidad científica que dedica sus estudios al desarrollo de métodos de detección, son las regiones del genoma en donde se encuentran los genes ribosomales. Entre estos, puedo citar la subunidad corta 18S, la subunidad larga 28S, y los espacios internos ITS1 e ITS2. Estas secuencias tienen la suficiente calidad e información para identificar el género y especie de muchas cepas de hongos en general, incluso dichas regiones son utilizadas para reconstruir el pasado evolutivo de las especies de organismos vivos.

Las técnicas de identificación molecular que revisamos en la literatura científica utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la variante de tiempo real cuantitativo y los cebadores que diseñan tienen como objetivo principal las regiones del gen ribosomal antes mencionadas y en algunos otros casos utilizan el gen ribosomal mitocondrial o la secuencia del gen *COTH* que codifica para una proteína dirigida a membrana que tiene la habilidad de unirse al receptor GPR78 en las células del endotelio del tejido vascular. Todas estas técnicas solo pueden identificar el orden, la familia o el género, pero fallan al tratar de identificar las especies. Para lograr identificar las especies acoplan el producto de PCR al

análisis por espectrometría de masas (mass-spectrometry) en sus diversas variantes o a un análisis de fusión de alta resolución para poder obtener información suficiente y poder discernir entre especies que pertenecen al mismo género.

Wang y colaboradores (2014) desarrollaron un método de identificación de hongos clínicamente relevantes mediante la secuenciación del gen rRNA y PCR multilocus acoplado a la espectrometría de masas de ionización por atomizador eléctrico. Debido a la alta conservación entre especies del mismo género se decide a secuenciar el 18S, 28S e ITS1, pero eso tiene la limitante de que se requiere muestras de ADN de calidad alta, es un procedimiento que consume tiempo, y tiene una baja eficiencia cuando se requiere diferenciar especies cuando se ensaya con muestras donde se mezclan organismos. Wang y colaboradores (2014) proponen el uso de espectrómetro de masas en donde se acopla el producto de PCR para generar los picos de los espectros y utilizarlos para buscar en bases de datos de espectros anteriormente definidos y poder identificar al patógeno sospechoso. Ellos demostraron que es una técnica rápida y sensible, pero la limitante para el tercer mundo es que se requiere la generación previa del patrón del espectro de masas de las especies a identificar para realizar la comparación, y se requiere un aparato muy costoso, difícil de mantener y operar.

Millon y colaboradores (2016) propusieron un método similar al propuesto por el equipo de trabajo de (Wang y col., 2014) pero en este caso utilizan como región genómica blanco el 18S y la identificación la realizan mediante la técnica de espectrometría de masas de ionización por atomizador eléctrico. De forma equivalente, ellos demostraron una buena sensibilidad y especificidad del método, pero tiene los mismos problemas que mencionamos para la propuesta de (Wang y col., 2014).

Lengerova y colaboradores (2014) proponen un método diferente en donde utilizan la técnica de PCR en tiempo real y para identificar la especie utilizan un

análisis de fusión de alta resolución. En este trabajo diseñaron cebadores de PCR especie específicos dirigidos a la región del espacio interno ITS2, sin embargo no pudo garantizar la especificidad de los cebadores para las especies que pertenecen al género *Mucor*. Otro inconveniente es que los tamaños esperados de los amplicones no son muy diferentes entre sí, por lo que sería difícil discernir entre especies, por lo que la identificación de la especie la realizaron mediante el análisis de fusión de alta resolución. Aunque la técnica mostró buenos resultados respecto al tiempo requerido y la especificidad, solo se pudo mostrar la especificidad para unas pocas especies evaluadas. Además el costo de operación y mantenimiento es elevado para esta técnica.

Springer y colaboradores (2016) proponen un método rápido basado en PCR tiempo real donde utilizan cebadores que se dirigen a la región 18S del gen y se diseñó una sonda degenerada que puede detectar la presencia de cualquier Mucoral. Esta técnica es rápida y sensible, pero no es específica porque es necesario secuenciar el fragmento amplificado para tener la suficiente información para identificar hasta el nivel de género, ni siquiera llega a nivel de especie y requiere secuenciación que es una técnica que consume tiempo y el aparato secuenciador es costoso.

Baldin y colaboradores (2018) propusieron una técnica basada en PCR punto final en donde pueden identificar la presencia de Mucorales. Ellos utilizaron la secuencia conservada del gen *COTH* para diseñar los cebadores universales para el orden de los mucorales debido a que ese gen es específico. La técnica mostró mucha sensibilidad solo para especies del género de *Rhizopus* y baja sensibilidad para las demás especies evaluadas: *Lichtheimia corymbifera*, *Cunninghamella bertholletiae* y *Mucor circinelloides*. Lo único que puedo decir de esta técnica, es que es rápida, pero carece de sensibilidad y especificidad para diferenciar entre especies del mismo género.

Caramalho y colaboradores (2019) propusieron un método lógicamente equivalente al método de (Baldin y col., 2018), pero en este caso utilizaron como blanco un marcador pan-*Mucorales*, que quiere decir que está presente virtualmente en todas las especies del orden de los Mucorales. Este marcador es la subunidad larga del gen ribosomal de la mitocondria. El diseño de cebadores conservados en esa región y el diseño de sondas permitió identificar algunas especies mediante el análisis de fusión de alta resolución. La técnica es rápida, sensible y específica para algunas especies, pero como ya hemos discutido, esta técnica tiene costos altos de operación y mantenimiento. Por lo que los laboratorios de bajos ingresos no podrían realizar esta técnica.

En el trabajo de investigación que publicó (Voigt y col., 1999) se reportó la construcción de la filogenia y la identificación de especies del subfilo Mucormicotina (Zigomicetos) de relevancia clínica basándose en los datos de secuencia del ADN ribosomal nuclear. Aunque ese trabajo no estaba destinado al desarrollo de una técnica de identificación rápida, sensible y específica, nos regaló a la comunidad el diseño de cebadores específicos de especie dirigidos a la región del 28S ribosomal. Aunque mostró la especificidad limitada de los cebadores, algunos de ellos fallaron al tratar de diferenciar algunas especies que pertenecen al mismo género. Por ejemplo, el diseño de cebadores para *Basidiobolus haptosporus* no pudo discernir a *Basidiobolus ranarum*. El diseño para *Cunninghamella bertholletiae*, no pudo diferenciar a *Cunninghamella elegans* y *Cunninghamella polymorpha*. El diseño para *Mucor circinelloides* no pudo diferenciar a *Mucor ramosissimus*. El diseño para *Rhizopus azygosporus* no diferencia a *Rhizopus microsporus*. Y el diseño de *Rhizomucor miehei* no puede diferenciar a *Rhizomucor pusillus*.

Aunque existen técnicas rápidas y sensibles, aún no se ha podido desarrollar alguna que sea específica para todas las especies de los géneros de mayor relevancia médica y que pueda detectar a la especie patógena incluso en una muestra que contiene mezclas de ADN genómico de otras especies.

Propuesta de investigación

Como hemos visto es difícil diseñar cebadores específicos de especie en las regiones de los genes ribosomales con la capacidad de poder discernir entre especies que pertenecen al mismo género incluso aquellas que se encuentran muy cerca filogenéticamente. Esto es debido a la alta conservación en secuencia de los genes ribosomales entre especies cercanas.

A pesar de que la conservación es muy alta en esas regiones no significa que también lo tiene que ser a lo largo del genoma completo. Por lo tanto debe de existir regiones disímiles, entre esas especies cercanas, en alguna parte del genoma. En el laboratorio diseñamos una tubería de comandos que permite la exploración a nivel genoma para la búsqueda de dichas regiones disímiles (Roblero 2021)

En este trabajo queremos someter a prueba dicha tubería de comandos para diseñar cebadores específicos que permitan diferenciar dos especies de Mucorales de alta frecuencia infectiva *R. oryzae* y *C. bertholletiae* de otras especies que pertenecen al mismo orden incluso el mismo género (caso *R. oryzae* y *R. delemar*). Además en este trabajo identificamos el género y especie de 6 aislados clínicos.

Materiales y métodos

Extracción de ADN genómico

Las cepas de hongos Mucorales que contamos en el laboratorio fueron aisladas a partir de pacientes. Éstas fueron cultivadas en cajas Petri con agar PDA y fueron incubadas a temperatura ambiente hasta saturación de la caja por 2 a 3 semanas. Tomamos toda la biomasa (hifas y esporas) y extrajimos el DNA con detergente CTAB como es descrito en (Velegraki y col., 1999). Las muestras fueron visualizadas en gel de electroforesis 1%. Las muestras de ADN genómico fueron diluidas 1:10 para preparar las soluciones de trabajo.

Amplificación por PCR y secuenciación de la subunidad larga 28S y el espaciador interno ITS1 del gen ribosomal

Usamos 1uL de ADN genómico diluido 1:10 de las muestras para usarlo como ADN molde en reacciones de PCR con el par de cebadores NL1 y NL4 para amplificar el 28S y el par de cebadores ITS-1 e ITS-2 para amplificar el ITS1. Las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes: Crystal Taq Polimerasa + sales y tampones (1X), cebadores (100nM), ADN molde (50nM aprox.). Las condiciones de temperatura fueron: desnaturalización inicial de 95°C x 5 min, 35 ciclos {95°C x 20seg, 55°C x 20s, 72°C x 50s}, extensión final de 72°C x 10 min. Estas condiciones de concentración de los reactivos y de termociclado fueron las mismas para ambos casos (28S e ITS1).

Purificamos los productos amplificados por columna (Agarosa kit de extracción de gel, Jena Bioscience) y cuantificamos por método espectrofotométrico a 260nm la concentración de los productos de PCR. Después de cuantificar los productos de PCR purificados preparamos muestras de 50uL a una concentración de 50ng/uL para enviarlas a secuenciar al Laboratorio Nacional

de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. La secuenciación se realizó con los mismos cebadores que utilizamos para amplificar el 28S e ITS1.

Limpieza de las secuencias y búsquedas en la base de datos de nucleótidos del NCBI

Recibimos las secuencias en formato AB1 y las visualizamos en el programa Unirpo UGENE (ref). Inspeccionamos manualmente las secuencias y recortamos aquellas regiones iniciales y finales que fueron de baja calidad; aquellas que tuvieron una puntuación de calidad por debajo del valor de 25 en la escala Phred-33. Las secuencias resultantes tienen un tamaño promedio de 200pb a 600pb.

Después de limpiar las secuencias las utilizamos para realizar búsquedas en la base de datos de nucleótidos (nr) del NCBI y seleccionamos los hallazgos con un valor esperado ('e-value') cercano a 0, un 100% de identidad y un 100% de cobertura de la secuencia consulta. El nombre del género y especie de los hallazgos que seleccionamos fueron utilizados para identificar el género y especie de nuestras cepas de hongos Miccroales del laboratorio.

Construcción del árbol fenético

Alineamos las secuencias curadas del 28S e ITS1 con ClustalO. Calculamos la matriz de distancias con el modelo de sustitución de Jukes-Cantor en las secuencias alineadas. La topología del árbol y las distancias de las ramas fueron calculadas con el método de Neighbor-joining. La construcción del árbol se realizó dentro del programa MEGA6. Visualizamos el árbol fenético en el programa TreeView.

Identificación de regiones disímiles en los genomas de *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*

Para identificar dichas regiones disímiles trabajamos con los genomas de *R. oryzae* (RA 99-892; KK997910.1) y *C. bertholletiae* (175; JNEG01000001.1). Cada uno de estos genomas fue comparado con 998 genomas de diferentes especies de hongos, bacterias y arqueas que están en contacto con el humano o que forman un nicho en el lugar de infección.

Esta comparación sistemática se realizó con la tubería de comandos 'not alike' (Roblero 2021) en un 'cluster' de 12 nodos con procesadores Intel 2.5Ghz y 4Gb de memoria RAM mediante el empleo de la librería GNU/Parallel. Extrajimos de las regiones identificadas como disímiles las secuencias para utilizarlas como molde en el diseño de los cebadores.

Los parámetros que utilizamos en la tubería de comandos 'not alike' fueron los siguientes: tamaño de ventana 1000pb, tamaño del paso 250pb, porcentaje de identidad 25%, cobertura HSP 12%, e-value 100, apertura de gap 0, extensión de gap -1, buena coincidencia 1, mala coincidencia -1, algoritmo 'blastn'. Para más información sobre los parámetros revisar la tesis de (Roblero 2021).

Diseño de cebadores

Las secuencias que extrajimos de las regiones disímiles, las utilizamos para diseñar cebadores con el programa primer_3core (ref). Los parámetros de selección de los cebadores fueron los siguientes: longitud 18 a 22 nucleótidos, temperatura de alineamiento 55 a 62 °C y que la diferencia entre los pares de cebadores sentido y antisentido no fuera mayor de 2 °C, porcentaje de guaninas y citocinas de 50 a 65 % y que los oligonucleótidos de los cebadores no formaran estructuras secundarias estables ni homo- o hetero-dímeros.

Todos los cebadores diseñados cuyos parámetros estuvieron cerca de los óptimos fueron calificados con valores cercanos a 0 y los valores más distantes fueron los diseños cuyos parámetros estuvieron alejados de los óptimos. Una vez que primer_3core diseñó todos los cebadores que pudo los ordenamos de forma ascendente por la calificación que obtuvieron y seleccionamos los dos primeros para cada cepa *R. oryzae* y *C. bertholletiae*.

Justificación

La alta tasa de mortalidad y velocidad de diseminación de las mucormicosis, así como la diferencia en susceptibilidad a fármacos entre especies de *Mucorales* que pertenecen al mismo género, hace necesaria la identificación rápida, sensible y específica, hasta el nivel de especie, de todas las especies de los géneros de alta frecuencia. En la actualidad existen métodos que son rápidos y sensibles pero fallan en la especificidad cuando se quiere diferenciar especies estrechamente cercanas y que pertenecen al mismo género debido a la alta conservación de las secuencias de los marcadores más utilizados por la comunidad científica. Es por eso que es necesario la búsqueda de otras regiones que se puedan utilizar para poder diferenciar dichas especies cercanas. Estas regiones las llamamos disímiles y las logramos identificar con la tubería de comandos 'not alike' y en este trabajo las sometimos a prueba en el diseño de cebadores altamente específicos dando resultados satisfactorios.

Hipótesis

En este trabajo de investigación científica generamos dos hipótesis.

- (1) Las cepas de hongos que pertenecen al orden de los Mucorales que fueron aisladas a partir de pacientes, fueron identificadas mediante la morfología microscópica. Por lo tanto la hipótesis es que las cepas de hongos son: *Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor sp.*, *Mucor circinelloides* y *Lichtheimia corymbifera* y en consecuencia las secuencias del 28S e ITS1 de estos hongos deben de ser 100% idénticas con un 100% de cobertura a las secuencias 28S e ITS1 reportadas para las especies de hongos antes mencionadas.

- (2) Los cebadores sentido y antisentido diseñados en las regiones disímiles del genoma de *R. oryzae* y *C. bertholletiae* son específicos de la especie y por lo tanto pueden detectar la presencia del ADN genómico de dichas especies incluso en una muestra donde se encuentran mezclados varios ADN genómicos de otras especies filogenéticamente cercanas.

Objetivos generales y particulares

- (1) Identificación del género y especie de 6 cepas de hongos que pertenecen al orden de los Mucorales.
 - a. Extracción de ADN genómico de las 6 cepas de hongos Mucorales.
 - b. Amplificación por PCR de las regiones de la subunidad larga 28S e ITS1 del gen ribosomal.
 - c. Secuenciación por el método de Sanger de los fragmentos amplificados.
 - d. Limpieza de las secuencias y búsqueda en base de datos de nucleótidos (nr) del NCBI.

- (2) Diseño y evaluación de cebadores de PCR específicos para las especies *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*; dos especies de alta frecuencia infectiva.
 - a. Identificación de regiones disímiles en los genomas de *R. oryzae* (RA 99-892; KK997910.1) y *C. bertholletiae* (175; JNEG01000001.1) y la extracción de la secuencia.
 - b. Diseño y selección de cebadores utilizando las secuencias de las regiones disímiles de *R. oryzae* y *C. bertholletiae*.
 - c. Evaluación experimental de la especificidad de los cebadores diseñados para ambas especies de hongos mediante dos diseños de experimentos combinando los conjuntos de cebadores o combinando los ADN genómicos en las muestras.

Resultados y discusión

Identificación de género y especie de 6 cepas por medio de la secuencia parcial del gen 28S ribosomal y de la secuencia del ITS1.

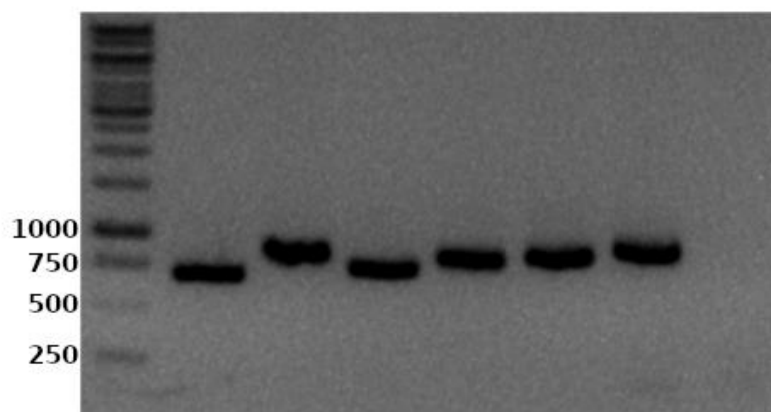
Los genes ribosomales se han descrito en el ADN genómico de todos los organismos vivos estudiados hasta el momento y codifican para las ribozimas que van a formar parte del complejo ribosomal encargado de la traducción a proteína de los ARN mensajeros. En cada copia de los genes ribosomales contiene regiones muy conservadas como el 18S conocido como la subunidad corta (SSU), el 5.8S y el 28S también conocido como la subunidad larga (LSU), pero también contiene regiones con polimorfismos en secuencia e incluso en tamaño como las regiones ITS1 e ITS2 que son las regiones espaciadoras internas entre SSU y 5.8, o 5.8 y LSU. Las secuencias de esas regiones son de importancia para la identificación del género y especie de organismos vivos unicelulares e incluso aquellos organismos multicelulares. En este trabajo amplificamos por PCR los dominios D1/D2 de la subunidad larga 28S del gen ribosomal y la región completa del ITS1 a partir de ADN genómico de 6 cepas de hongos patógenos pertenecientes al orden de los Mucorales cuya identificación solo ha sido por medio de la observación de la morfología microscópica y macroscópica. La amplificación de dichas regiones y la subsecuente secuenciación nos ayudará a confirmar el género y la especie de dichas cepas fúngicas.

Utilizamos los cebadores de PCR NL1 y NL4 para amplificar los dominios D1/D2 de la subunidad larga; y los cebadores ITS-1 e ITS-2 para amplificar la región interna espaciadora 1 (Tabla 1). El amplicón del 28S midió aproximadamente 740pb para el caso de *R. oryzae* y *R. delemar*. Para el caso de *C. bertholletiae* observamos un tamaño del amplicón de 800pb. En el caso de *L. ramosa* y *M. plumbeus* el tamaño del amplicón que observamos fue aproximadamente de 750pb (Figura 1). Estas diferencias en tamaño nos sugieren

la presencia de polimorfismos en el tamaño de la secuencia para las especies de hongos estudiadas. Para el caso del amplicón de la región ITS1 observamos otro interesante polimorfismo del tamaño del espaciador interno. Como pueden observar en la (Figura 2), el tamaño aproximado del amplicón para: *R. oryzae* fue de 270pb, *C. bertholletiae* 550pb, *R. delemar* 400pb, *L. ramosa* 600pb (carriles 4 y 6) y *M. plumbeus* 400pb. Para darle facilidad de lectura al manuscrito vamos a usar el nombre del género y especie que identificamos en este trabajo y no vamos a mostrar los nombres anteriores de los hongos Mucorales a menos que sea necesario para describir los resultados.

Tabla 1. Cebadores de PCR que usamos para amplificar el 28S y el ITS1.

Nombre	Secuencia	Longitud	Tm (°C)	%GC	Referencia
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG	23	58.0	43.5	
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	19	59.3	57.9	
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	61.9	63.2	
ITS-2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	20	58.5	55.0	



<i>R. oryzae</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. bertholletiae</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>R. delemar</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. ramosa</i>	-	-	-	+	-	+	-
<i>M. plumbeus</i>	-	-	-	-	+	-	-

Figura 1. Amplificación de la subunidad larga 28S del gen ribosomal en las cepas del orden Mucorales. La escalera de peso molecular está en el carril 1, y el control negativo está en el carril 8. Abajo en la leyenda de la figura el nombre de la

cepa representa la fuente de ADN genómico y el signo (+) significa presencia del ADN genómico en la muestra y el signo (-) es la ausencia.

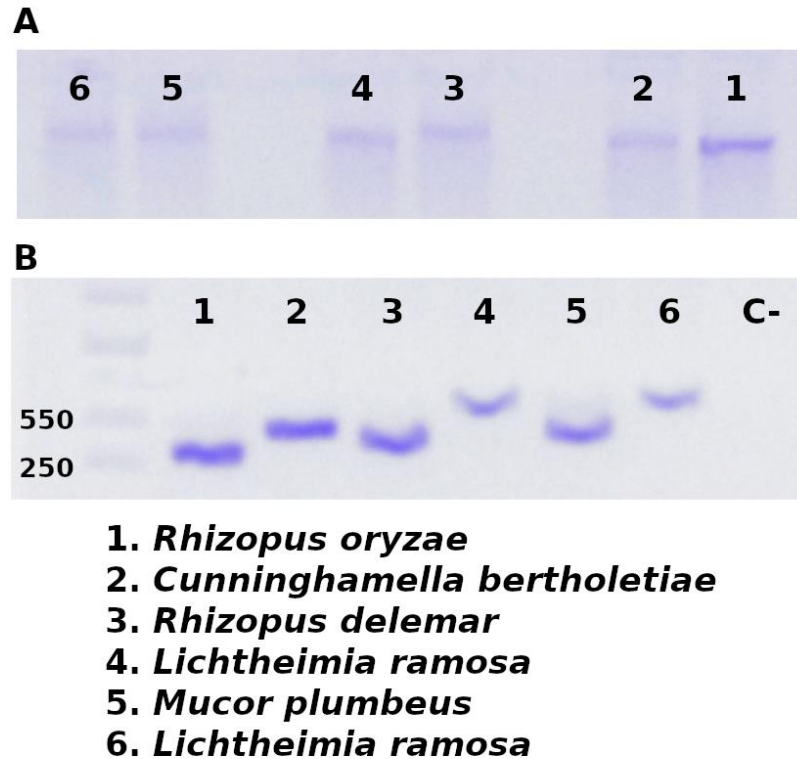


Figura 2. Amplificación de la región ITS1 por PCR. En esta figura mostramos en (A) los ADN genómicos de los hongos Mucorales y en (B) mostramos los amplicones del ITS1 obtenidos a partir de las muestras de ADN genómico. El control negativo de PCR contenía todos los reactivos, excepto la muestra de ADN genómico.

Las secuencias de nucleótidos fueron obtenidas por medio del método de secuenciación automática de Sanger, y éstas fueron visualizadas y limpiadas a mano con el programa de computadora UGENE de Unipro (Okonechnikov y col., 2012). Este método de secuenciación genera, a menudo, llamados de bases de mala calidad al inicio y término de la secuencia por lo que hay que eliminar esas regiones. En la (Figura 3) mostramos dos regiones de una secuencia en particular en donde se observa los llamados de base de mala calidad y de buena calidad. Como pueden observar los picos del llamado de bases en la región de mala calidad están sobrelapados y no están bien definidos (Figura 3A). En comparación con los picos en la región de buena calidad, éstos son de buena intensidad, están definidos y no se sobrelapan (Figura 3B). Esas regiones de mala calidad fueron las que eliminamos a mano usando el 'software' antes mencionado para

quedarnos con las secuencias curadas solo con los llamados de bases de buena calidad.

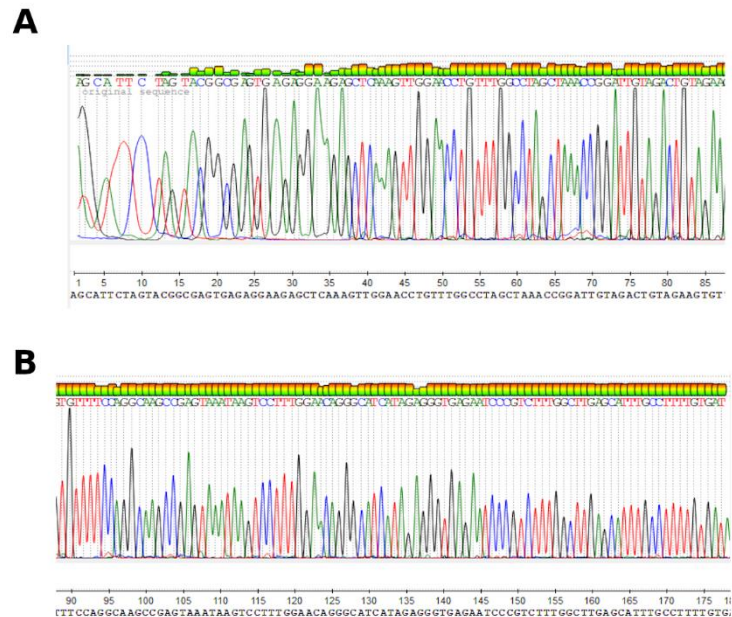


Figura 3. Calidad de la secuencia 28S. En esta figura se muestra la secuencia de la región ITS1 de la cepa *Rhizopus delemar*. En (A) mostramos la región de mala calidad que suele estar al inicio de la secuencia, y en (B) mostramos una región de buena calidad.

Después de limpiar las secuencias obtenidas por el método de secuenciación las utilizamos como secuencia consulta para buscar secuencias altamente similares en la base de datos de nucleótidos (nr) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (siglas en inglés NCBI) por medio de MegaBLAST (Chen y col., 2015). Los mejores hallazgos que seleccionamos fueron aquellos que tuvieron un 100% de identidad, 100% de cobertura de la secuencia consulta y un 'Expected value' cercano a 0. El nombre del género y especie de los hallazgos en la base de datos fueron utilizados para confirmar la identidad de las cepas patógenas de hongos Mucorales.

En la (Tabla 2) pueden observar que no pudimos confirmar el nombre del género y especie, determinado por la morfología microscópica, de cuatro cepas de

hongos debido a que estas cepas no estaban identificadas correctamente. Para el caso de *Rhizomucor miehei*, ésta realmente es una cepa de *Rhizopus delemar*. En el caso de las cepas que se pensaban eran *Rhizomucor sp.* Y *Lichtheimia corymbifera*, realmente fueron identificadas como dos cepas de *Lichtheimia ramosa*. Y para el caso de *Mucor circinelloides*, esta cepa es realmente *Mucor plumbeus*.

Tabla 2. Identificación del género y especie de 6 cepas de hongos Mucorales.

Morfología microscópica	Secuenciación del 28S e ITS1	Identidad ^a	Cobertura ^b	e-val ^c
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	100%	100%	0.0
<i>Cunninghamella Bertholletiae</i>	<i>Cunninghamella Bertholletiae</i>	100%	100%	0.0
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	100%	100%	0.0
<i>Rhizomucor sp.</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100%	100%	0.0
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor plumbeus</i>	100%	100%	0.0
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100%	100%	0.0

a. Representa el porcentaje de nucleótidos de la secuencia consulta que coincidieron con nucleótidos de la secuencia sujeto en el alineamiento pareado.

b. Representa el porcentaje de la secuencia consulta que se alineó con la secuencia sujeto generando un segmento pareado de alto puntaje.

c. Es el número de secuencias esperadas solo por casualidad. Es una medida de la significancia estadística del hallazgo.

Para confirmar mediante otra aproximación la identidad de estas cepas vamos a construir un árbol fenético con las secuencias concatenadas obtenidas de la subunidad larga del gen ribosomal y el ITS1. Las distancias de las secuencias fueron calculadas con el modelo de Jukes-Cantor (Erickson 2010), y Las distancias de las ramas fueron calculadas con el método de “neighbor-joining” (Sitou y Nei 1987).

En la (Figura 4) mostramos la topología del árbol fenético construido como se mencionó anteriormente. Como pueden observar, las especies de Mucorales se agrupan formando varios grupos, en uno están agrupadas las dos cepas de *L. ramosa* que son las especies de hongo más alejadas, en el otro grupo se asocian las cepas *R. oryzae* y *R. delemar* debido a que ambas cepas son filogenéticamente cercanas. Fuera del grupo de las dos especies de *Rhizopus*

podemos observar a *M. plumbeus* y la especie más distante de las tres es *C. bertholletiae*. Sin embargo las especies de *Rhizopus*, así como *M. plumbeus* y *C. bertholletias* están más cercanas entre ellas mismas que con la cepa *L. ramosa*.

La topología de este árbol fenético que construimos concuerda con la topología del árbol filogenético propuesto por Voigt y col. (1999) ya que en el árbol filogenético podemos realizar la misma observación sobre la distribución de las especies de las cepas de los hongos Mucorales: esto quiere decir, que Las especies de *Rhizopus*, *Mucor* y *Cunninghamella* son más cercanas entre ellas mismas que las especies de *Lichtheimia* (sinónimo *Absidia* sp.). Todas estas evidencias de análisis de similitudes de secuencias y análisis fenéticos sugieren que el nombre del género y especie de las cepas de hongos que tenemos en el laboratorio son los que mostramos en la (Tabla 2) y que por lo tanto pertenecen al orden de los Mucorales.

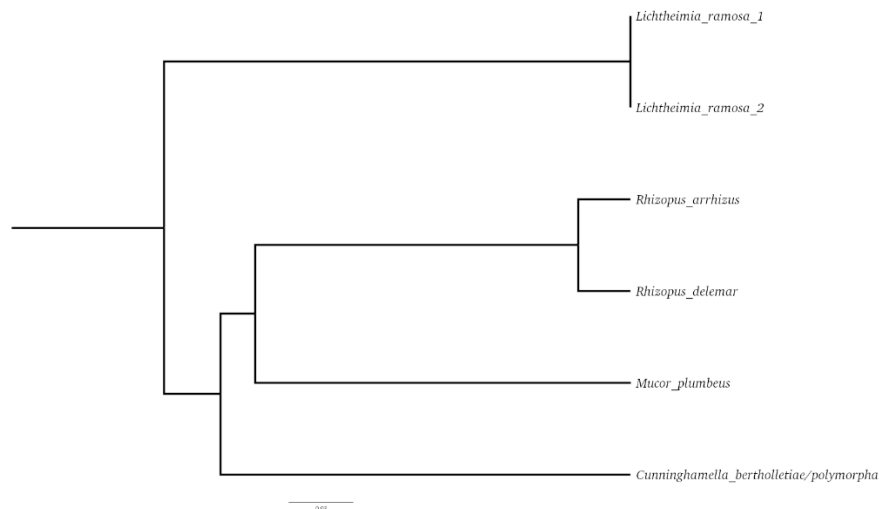


Figura 4. Árbol fenético construido con las secuencias 28S e ITS1 de los hongos Mucorales. Las especies pertenecientes al género *Rhizopus*, *Mucor* y *Cunninghamella* están más relacionadas filogenéticamente entre ellas que las especies del género *Lichtheimia*. Esta topología correlaciona con la topología del árbol filogenético propuesto por Voigt y col. (1999).

Uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación es diseñar un conjunto de cebadores (sentido y antisentido) de PCR que sean específicos

para la especie *R. oryzae* y otro conjunto para *C. bertholletiae*. Ambas especies tienen una frecuencia elevada de infección y son un problema de salud pública. Para probar la especificidad de los cebadores en experimentos *in vitro* es necesario contar con el material experimental definido y las muestras biológicas correctamente identificadas. En consecuencia, el primer paso de este trabajo fue la identificación del género y especie de las cepas de Mucorales con las que contamos en el laboratorio. Y El segundo paso en el diseño de los cebadores específicos para ambas especies de Mucorales es la identificación de las regiones disímiles de *R. oryzae* y *C. bertholletiae*.

Identificación de las regiones disímiles en la secuencia de los genomas de los hongos patógenos *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae*.

La identificación de regiones disímiles de los genomas de estos hongos comprende un paso anterior para el diseño de cebadores de PCR especie-específicos, ya que pensamos que estas regiones nos ayudarán a darle especificidad a los cebadores ya que tendrían como blanco aquellas regiones del genoma que son las más disímiles al compararlas con un conjunto de secuencias de genomas de otros organismos vivos, por lo tanto es lógico pensar que son un blanco fiel que nos permitirá discernir entre una especie de organismo y las demás especies. Las regiones disímiles del genoma de *R. oryzae* o *C. bertholletiae* las identificamos comparando sus genomas con un vasto número de genomas de microorganismos (998 genomas) de diferentes especies que pueden estar compartiendo un nicho. Esta tarea de comparación masiva entre genomas la automatizamos por medio de una tubería de comandos llamada 'not alike' (Roblero, 2021).

'Not alike' es una expresión inglesa que se refiere a algo desigual, y puede usarse como un adjetivo o adverbio para describir a alguna cosa o acción. Nombramos de igual forma a esta tubería de comandos debido a que realiza la búsqueda de regiones disímiles de un genoma en particular. 'Not alike' es un

conjunto de códigos de programas de computadora ('scripts') escritos en los lenguajes de programación 'Python' y 'BASH' para gestionar diversas tareas en un orden lógico que permite obtener el resultado deseado (Figura 5).

Esta tubería básicamente se divide en 3 pasos: el primero construye la base de datos de genomas (BLAST_DB versión 4) y rompe la secuencia del genoma en fragmentos de tamaño determinado que se usarán como consulta y esa fragmentación la realiza a cada cierto tamaño de paso. El segundo paso es un proceso de discriminación de todas aquellas secuencias que producen un hallazgo en las bases de datos (dan un 'hit') con los parámetros de consulta BLAST establecidos. Y el tercer paso es un proceso de ensamble de aquellos fragmentos retenidos que no fueron discriminados y eliminados en el proceso de consulta. El producto final es un archivo 'GFF3' con las coordenadas de la secuencia del genoma de las regiones disímiles identificadas. Para obtener más información respecto a la tubería de comandos ver (Roblero 2021).

Esta comparación sistemática se realizó con la tubería de comandos 'not alike' (Roblero 2021) en un 'cluster' de 12 nodos con procesadores Intel 2.5Ghz y 4Gb de memoria RAM mediante el empleo de la librería GNU/Parallel (Tange 2015). Extrajimos de las regiones identificadas como disímiles las secuencias para utilizarlas como molde en el diseño de los cebadores.

Los parámetros que utilizamos en la tubería de comandos 'not alike' fueron los siguientes: tamaño de ventana 1000pb, tamaño del paso 250pb, porcentaje de identidad 25%, cobertura HSP 12%, e-value 100, apertura de gap 0, extensión de gap -1, buena coincidencia 1, mala coincidencia -1, algoritmo 'blastn'. Para más información sobre los parámetros revisar la tesis de (Roblero 2021).

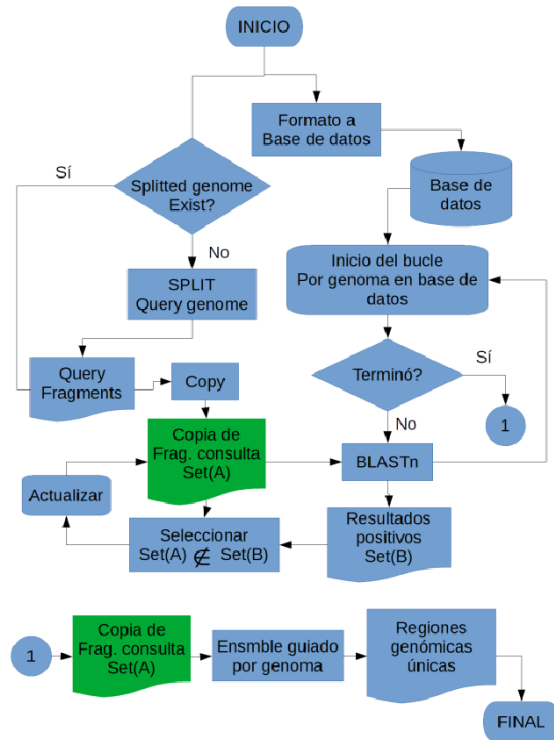


Figura 5. Diagrama de flujo de la tubería de comandos ‘not alike’. Figura tomada de (Roblero, 2021).

Los resultados obtenidos del proceso de identificación de regiones disímiles se describe en la (Tabla 3) para ambas especies de hongos Mucorales *R. oryzae* y *C. bertholletiae*. Como pueden observar el 99.59% de los fragmentos que provienen del genoma de *R. oryzae* fueron discriminados y eliminados debido que eran similares a alguna subsecuencia de los genomas de la base de datos consultada. Para el caso de *C. bertholletiae*, fue el 99.89% de los fragmentos eliminados.

En contraste, menos del 1% de los fragmentos del genoma consulta, para ambos hongos, fueron retenidos porque no encontraron ningún hallazgo de subsecuencias en los genomas de la base de datos con los parámetros de búsqueda que establecimos. Eso significa que esos fragmentos son los más disímiles que pudimos identificar. Estos fragmentos retenidos fueron sujetos a un proceso de ensamble para unir aquellos fragmentos contiguos. Se obtuvieron 322

regiones identificadas como disímiles para *R. oryzae* y 69 regiones para el caso de *C. bertholletiae*.

Tabla 3. Fragmentos disímiles retenidos y fragmentos eliminados.

Descripción	<i>R. oryzae</i>	<i>C. bertholletiae</i>
Tamaño del genoma	≈ 40Mb	≈ 32Mb
Fragmentos totales	79,000	63,000
Fragmentos eliminados	78,678	62,931
Fragmentos disímiles	322	69
% de genoma disímil	0.41%	0.11%

Aunque las regiones disímiles representan menos del 1% del total de los genomas analizados, es suficiente material para diseñar los cebadores de PCR específicos de especie. Y como estas regiones fueron las más disímiles que pudimos encontrar, pensamos que son un blanco perfecto para poder discernir entre el genoma de *R. oryzae* o *C. bertholletiae* entre otros genomas de diferentes especies de microorganismos que comparten el mismo nicho e incluso del genoma del propio humano. Por tal motivo, decidimos diseñar cebadores de PCR en esas regiones para que fueran específicos para cada especie.

Diseño de los cebadores de PCR especie-específicos para *R. oryzae* y *C. bertholletiae*.

Extrajimos todas las secuencias de las regiones disímiles con el programa 'gffread' (Partea y Partea 2020) y las guardamos en archivos en formato 'FASTA'. Estas secuencias fueron utilizadas para construir los archivos de entrada para el programa 'primer_3core' mediante el empleo de 'scripts' escritos en Python. 'primer_3core' (Untergasser y col., 2012) es un programa de computadora que emplea un algoritmo para diseñar cebadores de PCR. En este caso lo empleamos para diseñar los cebadores usando las secuencias de las regiones disímiles como molde. Los parámetros que utilizamos fueron un tamaño de 18 a 22 nucleótidos,

una temperatura de alineamiento de 55 a 65 °C, GC clamp de 3 nucleótidos, %GC de 55 a 60, evitar aquellos diseños que forman estructuras secundarias y homo – o hetero – dímeros.

El programa 'primer_3core' regresó 5 de los mejores diseños por cada secuencia de las regiones disímiles analizada y asocia el diseño del cebador con una calificación determinada de acuerdo a la calidad del diseño. Si el valor de la calificación incrementa quiere decir que la calidad del diseño disminuye, por el contrario, si la calificación se acerca a 0 la calidad del diseño incrementa. Para seleccionar los mejores diseños ordenamos los cebadores de forma ascendente por la calificación obtenida (del valor menor al mayor) y seleccionamos los dos pares del inicio de la lista para cada cepa de hongo: *R. oryzae* y *C. bertholletiae*. Los resultados del diseño se muestran en la (Tabla 4).

Los diseños de los cebadores de PCR que seleccionamos se pueden observar en la (Figura 6) mapeados en diferentes 'contigs' del ensamble del genoma de *C. bertholletiae* (Figura 6A) y en el genoma de *R. oryzae* (Figura 6B). El par de cebadores CB_160_F y CB_160_R para *C. bertholletiae* fueron mapeados en el contig JNEG01000822.1 en la región disímil localizada entre las coordenadas 192,001 a 193,000. El otro par de cebadores diseñados para *C. bertholletiae* CB_348_F y CB_348_R mapean en la región disímil del contig JNEG01000708.1 en las coordenadas 31,001 a 32,000. Para el caso de *R. oryzae*, el par de cebadores RO_135_F y RO_135_R mapean en la región disímil que se encuentra en el contig KK998109.1 en las coordenadas 41,001 a 42,000 y el par de cebadores RO_290_F y RO_290_R mapean en la región disímil del contig KK998524.1 en las coordenadas 56,001 a 57,000.

Los tamaños de los amplicones que esperamos obtener para los pares de cebadores son como sigue: para el par CB_160 esperamos obtener una banda de 160 pares de bases (pb), para el par CB_348 esperamos un amplicón de 348pb, para el par RO_135 y RO_290 esperamos unas bandas de tamaño de 135pb y

290pb respectivamente. Seleccionamos esos tamaños para poderlos usar en conjunto en una PCR del tipo 'multiplex' y poder identificar el tamaño en un gel de electroforesis.

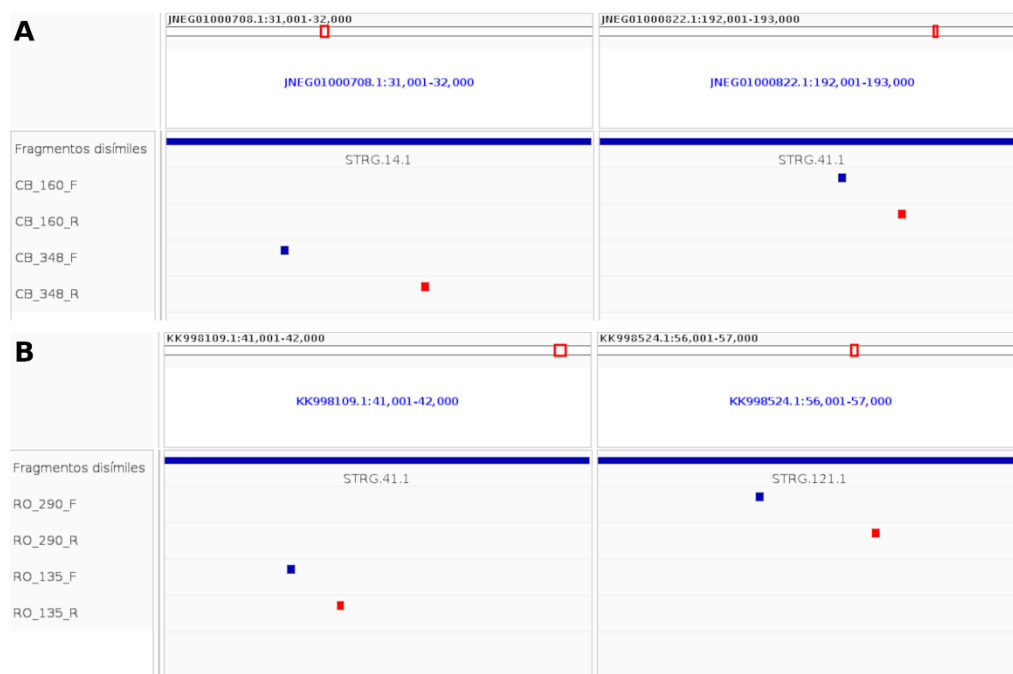


Figura 6. Cebadores de PCR especie específicos. Los diseños se hicieron usando como molde las secuencias de las regiones disímiles de (A) *C. bertholletiae* y (B) *R. oryzae*. La barra blanca en la parte superior de cada figura representa el 'contig' en el que estamos visualizando la información. El recuadro rojo en la barra blanca es la posición actual. Las barras azules representan las regiones disímiles y los cebadores sentido son representados por los cuadros azules; y los cebadores antisentido están representados por cuadros rojos pequeños. En la parte superior en letras azules se describe el nombre del 'contig' y la posición de la región.

Después de diseñar los cebadores de PCR para ambas especies de Mucorales decidimos evaluar su especificidad de manera experimental *in vitro* con PCR en donde hicimos mezclas de ADN genómico de las 4 especies de Mucorales que identificamos recientemente. Decidimos manipular de manera independiente los ADN genómicos de las dos cepas de *L. ramosa* debido a que puede existir alguna variante genética que pueda interferir con la amplificación generando inespecificidades en la reacción de PCR y por lo tanto nos permitiría saber de qué cepa proviene dicha inespecificidad.

Tabla 4. Cebadores de PCR especie específicos.

Nombre	Especie	Secuencia	Longitud	Tm (°C)	%GC
RO_135_F	<i>R. oryzae</i>	AGACCAAAGTCAGGACGGC	19	59.6	57.9
RO_135_R	<i>R. oryzae</i>	TTTTCTCACGCATGCGGC	18	58.5	55.6
RO_290_F	<i>R. oryzae</i>	TTTCAAATGCCGCAGCC	18	58.8	55.6
RO_290_R	<i>R. oryzae</i>	AGCACGTTGTCTTGAGGG	19	59.7	57.9
CB_160_F	<i>C. bertholletiae</i>	AGGGATTACTTCTCGCGCG	19	59.1	57.9
CB_160_R	<i>C. bertholletiae</i>	TGTCCTCGAAGCCAAACCG	19	60.4	57.9
CB_348_F	<i>C. bertholletiae</i>	GCTCCATCGCTTTTTCCGG	19	59.4	57.9
CB_348_R	<i>C. bertholletiae</i>	AAGCAGTGACAGTACCGCC	19	58.9	57.9

Pruebas de especificidad de los cebadores de PCR específicos de especie combinando los conjuntos de pares de cebadores.

En este experimento decidimos desafiar los pares de cebadores que diseñamos en conjunto y de manera individual contra muestras que contenían una mezcla de ADN genómico de las 4 cepas que identificamos en este trabajo con el objetivo de evaluar su especificidad. Pensamos que si los cebadores son realmente específicos deben de amplificar regiones de tamaño esperado y solo sí el par de cebador está presente en la reacción, si uno de los dos pares es eliminado, entonces la banda que le corresponde no deberá observarse en el gel de electroforesis.

Para someter a prueba dicha hipótesis decidimos realizar experimentos de PCR en donde hicimos algunas combinaciones de pares de cebadores de PCR (sentido y antisentido), por ejemplo RO_135 con CB_348 y RO_290 con CB_160 además de las condiciones donde se evalúan de manera individual. Las condiciones, concentraciones de reactivos y parámetros iniciales de reacción y de termociclado son las que se describen en la sección de materiales y métodos, sin embargo no obtuvimos ninguna amplificación de las regiones disímiles por lo que decidimos modificar la concentración de los cebadores y pasar de 100nM a 400nM

e incrementar el número de ciclos, así de esa forma fue como obtuvimos resultados satisfactorios.

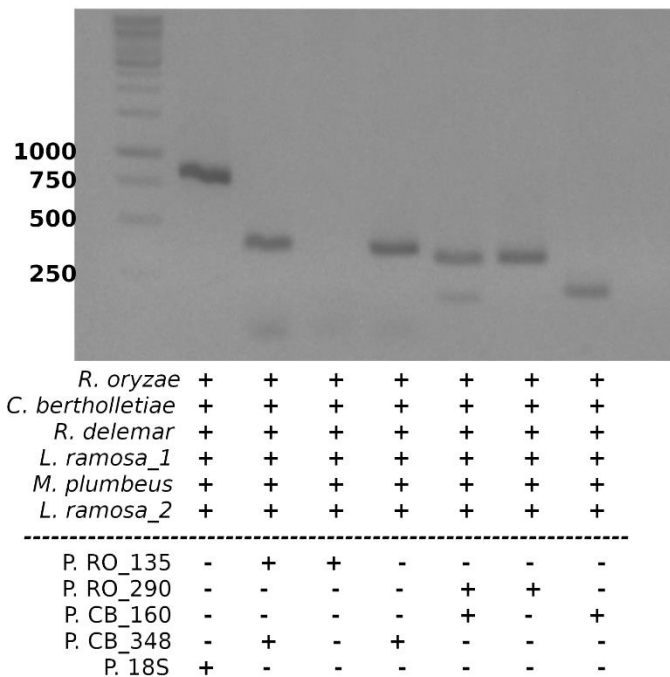


Figura 7. Evaluación de especificidad intercambiando los pares de cebadores.

En esta figura mostramos los amplicones obtenidos. En el carril 1 mostramos el marcador de peso molecular 1kb, en el carril 2 mostramos el control positivo donde se amplificó la subunidad 28S ribosomal, del carril 3 al 8 mostramos los resultados obtenidos de las evaluaciones de especificidad con las combinaciones de cebadores como se describe en la leyenda de abajo, y el carril 9 es un control negativo de PCR. En la leyenda, los nombres de las especies muestran la fuente de ADN genómico en la muestra mezclada. El signo + es presencia y el negativo es ausencia. P. RO_135, P. RO_290, P. CB_160 y P. CB_348 son los diferentes pares de cebadores evaluados y P. 28S es el juego de cebadores que amplifican la subunidad larga del gen ribosomal.

Los resultados de este experimento se muestran en la (Figura 7). El control positivo de la PCR amplificó un fragmento del tamaño 780pb (carril 2), un tamaño muy aproximado al reportado para el 28S. En el carril 3 mostramos el resultado que obtuvimos al utilizar la combinación de pares RO_135 y CB_348, y como se puede observar solo podemos ver una banda con un tamaño de 348pb, que es el tamaño esperado para CB_348, pero no observamos la banda esperada de 135pb del par de cebadores RO_135. En el carril 4 y 5 mostramos los resultados en

donde utilizamos de manera individual los pares de cebadores RO_135 y CB_348, y como se puede apreciar, no se observa ninguna banda en el carril 4, donde deberíamos observar una banda de 135pb; un producto hipotético que el par de cebadores RO_135 deberían de amplificar. Y en el carril 5 se logra reproducir la banda de 348pb. Esto nos indica que los pares de cebadores RO_135_F y RO_135_R no amplifican la región donde fueron diseñados.

La explicación más parsimoniosa es que el contig en el que identificamos una región disímil puede ser un artefacto producto del proceso de ensamble del genoma ya que el estado de ensamble del genoma de *R. oryzae* se encuentra en el nivel de fragmentos contigs. Este estado de ensamble se considera muy primitivo y necesita más información de secuenciación y trabajo de ensamble de andamiaje (Scaffolding). En este tipo de borradores de genomas existen contigs que son artefactos, productos de errores de ensamble en donde existen: colapsos de secuencias, formación de contigs quimeras, y secuencias truncas. Todos estos errores producen contigs que realmente no existen en los genomas reales. Es posible que el contig de *R. oryzae* donde identificamos una región disímil es el producto de un error en el ensamble creando un contig artefacto que no existe en el genoma de este hongo y por lo tanto sería poco probable que los pares de cebadores RO_135 amplificaran un producto en dicha región.

Por el contrario, como se puede observar en la (Figura 7), el conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_160 mostró resultados excelentes. Cuando se desafió el conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_348 contra la muestra de mezcla de ADN genómicos de las seis especies de Mucorales (Figura 7 carril 6) se observó las dos bandas de tamaño esperado (290pb y 160pb). Cuando desafiamos ambos pares de cebadores RO_290 y CB_348 de manera individual observamos la amplificación de las bandas de tamaño esperado de forma individual (Figura 7 carriles 7 y 8). Estos resultados indican que las bandas que observamos cuando usamos en conjunto los dos pares de cebadores no son

inespecificidades debido a la acción de un solo par o a la combinación de dos cebadores del conjunto RO_290 y CB_348.

Estos resultados que observamos tienen concordancia con lo que esperábamos, esto quiere decir que el contig dónde identificamos la región disímil, en donde diseñamos los cebadores, existen en ambos genomas del hongo *R. oryzae* y de *C. bertholletiae*. Y son regiones disímiles muy específicas para cada uno de estos hongos y por lo tanto fueron un buen blanco para poder distinguir el ADN genómico de *R. oryzae* o *C. bertholletiae* incluso en una muestra que contenga la mezcla de ADN genómicos de otras especies como las que usamos en este experimento.

Aun cuando obtuvimos resultados satisfactorios decidimos confirmar estas observaciones desde otro punto de vista. En el siguiente experimento decidimos hacer diferentes combinaciones de mezclas de ADN genómico de las especies de hongos con las que trabajamos en esta investigación.

Prueba de especificidad de los cebadores de PCR especie-específicos combinando muestras de ADN genómico de *R. oryzae* o *C. bertholletiae*.

En este experimento preparamos 4 muestras en donde mezclamos los ADN genómicos de diferente forma. (1) muestra que contiene el ADN de todas las cepas (**ALL**), (2) muestra en donde descartamos el ADN genómico de *R. oryzae* (**RO-**), (3) muestra en donde eliminamos el ADN genómico de *C. bertholletiae* (**CB-**) y (4) muestra donde no estaban presentes los ADN genómicos de *R. oryzae* ni de *C. bertholletiae* (**RC-**). Para confirmar la especificidad de los cebadores que diseñamos decidimos desafiar los conjuntos de pares de cebadores RO_290, CB_160 y RO_290, CB_348 de manera combinada con las muestras de ADN genómicos que preparamos.

Si los pares de cebadores de PCR son en verdad específicos de la especie para la cual fueron diseñados, entonces solo deberán de amplificar sí y solo sí está presente el ADN genómico de la especie de hongo en cuestión. Por ejemplo, si desafiamos el par de cebadores RO_290 que fueron diseñados para amplificar una región de un tamaño de 290pb específicamente en el genoma de *R. oryzae*, entonces solo debe de observarse la banda de ese tamaño cuando los cebadores se desafíen contra la muestra que contenga el ADN genómico de *R. oryzae*. De una manera lógicamente equivalente, debemos esperar ese tipo de resultados para los demás pares de cebadores en las demás muestras que preparamos.

Después de ejecutar el experimento combinando los ADN genómicos, con el conjunto de los pares de cebadores RO_290 y CB_160 obtuvimos los resultados que mostramos en la (Figura 8). El carril 1 cargamos el marcador de peso molecular de 1kb, el carril 3 mostramos los resultados de desafiar dicho conjunto de pares de cebadores con la mezcla de ADN genómicos (**ALL**), en el carril 5 mostramos el resultado del desafío del conjunto de cebadores con la mezcla (**RO-**), en el carril 7 es el resultado del desafío con la mezcla (**CB-**) y en el carril 9 es el desafío con la muestra que contiene la muestra que carece de los ADN genómicos de *R. oryzae* y *C. bertholletiae*, pero contiene los genómicos de *R. delemar*, *L. ramosa* y *M. plumbeus* (**RC-**). En los carriles 2, 4, 6 y 8 mostramos los resultados del desafío del par de cebadores 28S contra todas las muestras que preparamos (ALL, RO-, CB- y RC- respectivamente). Estos cebadores amplifican una banda de tamaño aproximado a 780pb. La amplificación del 28S se utilizó como un control positivo de la carga de muestra de ADN genómicos y como observamos, obtuvimos una banda del tamaño esperado.

Los resultados que obtuvimos muestran la especificidad que tienen los pares de cebadores RO_290 y CB_160 y por lo tanto confirman las predicciones de la hipótesis. Como podrán observar, cuando desafiamos este conjunto de cebadores con la muestra (ALL) se amplifican dos regiones una de tamaño de 290pb y la otra de 160pb, cuando se desafían contra la muestra (RO-) desaparece

la banda de tamaño de 290pb pero permanece la banda de tamaño de 160pb. Cuando realizamos el desafío contra la muestra (CB-) fue la banda de 160pb la que desapareció y se mantuvo la banda de 290pb. Cuando desafiamos la muestra (RC-) con el conjunto de pares de cebadores observamos que las bandas desaparecen y solo quedan los cebadores abatidos después de la reacción de PCR.

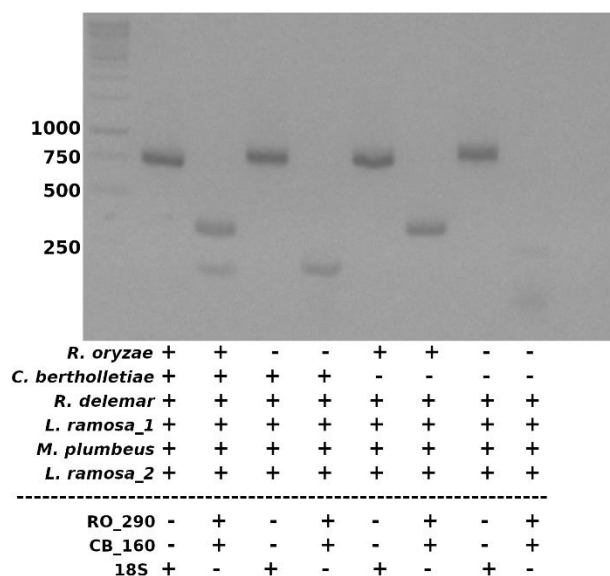


Figura 8. Evaluación de especificidad del conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_160. Marcador de peso molecular (carril 1), desafío del par de cebadores 28S contra las muestras ALL, RO-, CB- y RC- (carriles 2, 4, 6 y 8 respectivamente), desafío del conjunto de los pares de cebadores RO_290 y CB_160 contra las muestras ALL, RO-, CB- y RC- (carriles 3, 5, 7 y 9). Control negativo (carril 10). En la leyenda de abajo el nombre de la especie representa la fuente del ADN genómico, presencia (+), ausencia (-). RO_290 representa el par de cebadores RO_290_F y RO_290_R, y CB_160 el par CB_160_F y CB_160_R.

Después, ejecutamos el experimento donde preparamos muestras en donde combinamos los ADN genómicos de los hongos antes mencionados, pero ahora con el conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_348, y también observamos resultados satisfactorios. Como pueden apreciar en la (Figura 9) cuando la muestra contenía el ADN genómico de *R. oryzae* y *C. bertholletiae* juntos se observa la presencia de dos bandas de tamaños similares a los esperados, 290pb y 348pb respectivamente (Figura 9 carril 3). Cuando quitamos el ADN genómico de la muestra, observamos que solo amplifica la banda de 348pb

específica de la especie de *C. Bertholletiae* (Figura 9 carril 5). Cuando descartamos el ADN genómico de *C. bertholletiae* de la muestra observamos la amplificación solo de la banda de tamaño de 290pb que es específica de *R. oryzae* (Figura 9 carril 7). Cuando eliminamos el ADN genómico de *R. oryzae* y *C. bertholletiae* no se puede obtener las bandas de 290 y 348pb (Figura 9 carril 9). Las bandas observadas en los carriles 2, 4, 6 y 8 de la (Figura 9) son controles positivos de carga de muestra; estas bandas corresponden al 28S.

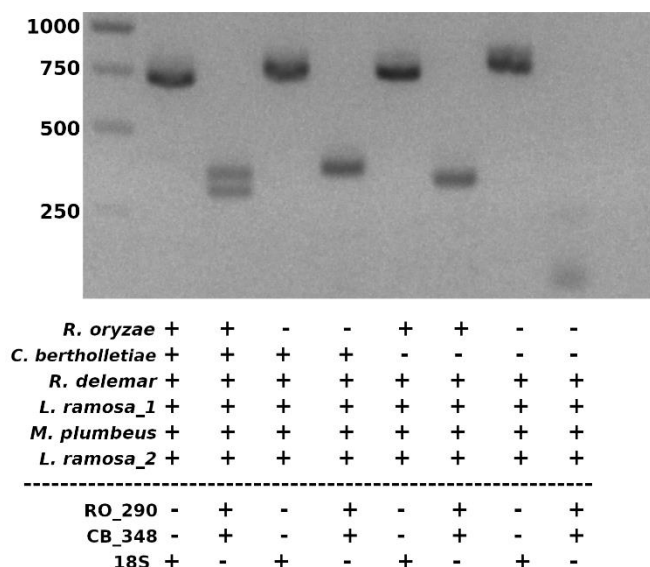


Figura 9. Evaluación de especificidad del conjunto de pares de cebadores RO_290 y CB_348. Marcador de peso molecular (carril 1), desafío del par de cebadores 28S contra las muestras ALL, RO-, CB- y RC- (carriles 2, 4, 6 y 8 respectivamente), desafío del conjunto de los pares de cebadores RO_290 y CB_348 contra las muestras ALL, RO-, CB- y RC- (carriles 3, 5, 7 y 9). Control negativo (carril 10). En la leyenda de abajo el nombre de la especie representa la fuente del ADN genómico, presencia (+), ausencia (-). RO_290 representa el par de cebadores RO_290_F y RO_290_R, y CB_348 el par CB_348_F y CB_348_R.

En resumen, los resultados que obtuvimos en este trabajo de investigación científica fue la identificación del género y especie de 6 cepas de hongos que pertenecen al orden de los Mucorales mediante la secuenciación y comparación de la subunidad larga del gen ribosomal 28S y el ITS1. Estas especies son *Rhizopus oryzae*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Lichtheimia ramosa* y *Mucor plumbeus* (Tabla 2). Además identificamos regiones disímiles de dos especies de

hongos Mucorales de alta frecuencia de infección *Rhizopus oryzae* y *Cunninghamella bertholletiae* comparando la secuencia de sus genomas con 998 secuencias de genomas de especies que pertenecen a diversos órdenes incluyendo el de los Mucorales que se sabe interaccionan con el ser humano o pueden estar formando un nicho (Tabla 3). Con estas regiones disímiles diseñamos cebadores de PCR para *R. oryzae* y *C. bertholletiae* con la tubería de comandos 'not alike' (Roblero, 2021) y mostramos que esos cebadores son específicos para la especie de hongo para la cual los diseñamos (Tabla 4; Figura 7 - 9).

El resultado general de este trabajo, que se puede aplicar en el desarrollo tecnológico, fue el diseño de cebadores específicos para las especies de alta frecuencia de infección que pueden ser implementados en un protocolo de rutina para la identificación rápida y confiable de dichos hongos patógenos *R. oryzae* y *C. bertholletiae* en hospitales mediante una técnica relativamente barata como la reacción en cadena de la polimerasa tipo 'multiplex' (PCR).

Aunque se han diseñado cebadores específicos de especie para algunas especies de importancia médica, algunos de estos no pueden discernir entre otras especies que pertenecen al mismo género. Voigt y col. (1999) diseñaron cebadores específicos de especie usando como molde regiones polimórficas de ITS1, ITS2 y 28S, sin embargo algunos de los diseños, como el par de cebadores específico para *Basidiobolus haptosporus* no puede diferenciarlo de *B. ranarum*. El par de cebadores específico para *Cunninghamella bertholletiae* no puede diferenciarlo de las especies *Cunninghamella elegans* y *C. polymorpha*. El par diseñado para *Mucor circinelloides* no puede diferenciarlo de *M. ramosissimus*. El par diseñado para *Rhizopus azygosporus* no lo puede diferenciar de *R. microsporus*. Y el par diseñado para *Rhizomucor miehei* no puede diferenciarlo de *R. pusillus*.

Como hemos visto a en el transcurso de este trabajo hemos mostrado que 'not alike' es una tubería de comandos que automatiza la comparación masiva de secuencia de genomas e identifica aquellas regiones disímiles que son un buen blanco para poder diferenciarlas de otras especies cercanas. Como hemos visto en el trabajo de (Voigt y col, 1999) ellos han diseñado cebadores especie-específicos para algunas especies de Mucorales de importancia médica, pero algunos diseños de cebadores no son realmente tan específicos. Esto se debe a que las secuencias de las regiones ITS1, ITS2 y 28S no son lo suficientemente diferentes para que se puedan diseñar cebadores específicos, por lo tanto hay que buscar otras soluciones. Una solución posible es la exploración sistemática a nivel genómico de regiones disímiles para el diseño de cebadores especie-específicos como la exploración que produce la tubería de comandos 'not alike'. Con estos resultados que obtuvimos, pensamos que 'not alike' daría buenos resultados en el diseño de cebadores específicos de especie y poder diseñar un par de ellos para poder discernir entre *B. haptospurs* y *B. ranarum*, *C. bertholletiae* y *C. elegans* o *C. polymorpha*, *M. circinelloides* y *M. ramosissimus*, *Rhizopus azygosporus* y *R. microsporus*, y *R. miehei* y *R. pusillus*.

Conclusiones

- (1) La identidad del género y especie de las cepas *Mucorales* aisladas fue *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar*, *Lichtheimia ramosa*, *Mucor plumbeus* y *Cunninghamella bertholletiae*. La hipótesis propuesta se refutó de manera parcial porque no se pudo refutar la hipótesis de la identidad de dos cepas *R. oryzae* y *C. bertholletiae*.
- (2) El diseño de cebadores para *R. oryzae* y *C. bertholletiae* son altamente específicos y si los utilizamos en una PCR punto final puede diferenciar cada una de estas dos cepas individualmente de las demás cepas.
- (3) Con estos resultados concluimos que 'not alike' es una tubería de comandos muy útil para encontrar regiones disímiles y utilizarlos como blancos o marcadores para poder diferenciar las especies de mucorales filogenéticamente cercanas que pertenecen al mismo género.

Referencias

- Andrianaki, A. M., Kyrmizi, I., Thanopoulou, K., Baldin, C., Drakos, E., Soliman, S. S., Shetty, A. C., McCracken, C., Akoumianaki, T., Stylianou, K., & others. (2018). Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nature communications*, *9*(1), 1–17.
- Baldin, C., & Ibrahim, A. S. (2017). Molecular mechanisms of mucormycosis—The bitter and the sweet. *PLoS pathogens*, *13*(8), e1006408.
- Baldin, C., Soliman, S. S., Jeon, H. H., Alkhazraji, S., Gebremariam, T., Gu, Y., Bruno, V. M., Cornely, O. A., Leather, H. L., Sugrue, M. W., & others. (2018). PCR-based approach targeting Mucorales-specific gene family for diagnosis of mucormycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *56*(10), e00746-18.
- Benny, G. L., Humber, R. A., & Voigt, K. (2014). 8 Zygomycetous fungi: Phylum entomophthoromycota and subphyla kickxellomycotina, mortierellomycotina, mucoromycotina, and zoopagomycotina. En *Systematics and evolution* (pp. 209–250). Springer.
- Caramalho, R., Madl, L., Rosam, K., Rambach, G., Speth, C., Pallua, J., Larentis, T., Araujo, R., Alastruey-Izquierdo, A., Lass-Flörl, C., & others. (2019). Evaluation of a novel mitochondrial pan-Mucorales marker for the detection, identification, quantification, and growth stage determination of Mucormycetes. *Journal of Fungi*, *5*(4), 98.
- Carroll, C. S., Grieve, C. L., Murugathasan, I., Bennet, A. J., Czekster, C. M., Liu, H., Naismith, J., & Moore, M. M. (2017). The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal

- pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the NIS gene family. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 89, 136–146.
- Chakrabarti, A., & Singh, R. (2014). Mucormycosis in India: Unique features. *Mycoses*, 57, 85–90.
- Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic acids research*, 43(16), 7762–7768.
- Erickson, K. (2010). The jukes-cantor model of molecular evolution. *Primus*, 20(5), 438–445.
- Ghelfenstein-Ferreira, T., Verdurme, L., & Alanio, A. (2022). Analytical Performance of the Commercial MucorGenius® Assay as Compared to an In-House qPCR Assay to Detect Mucorales DNA in Serum Specimens. *Journal of Fungi*, 8(8), 786.
- Ghuman, H., & Voelz, K. (2017). Innate and adaptive immunity to mucorales. *Journal of Fungi*, 3(3), 48.
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., De Hoog, G., Benny, G., Kirk, P., & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: A synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30(1), 57–76.
- Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology*, 14(2), 81–93.
- Hüttel, W., & Hoffmeister, D. (2011). Fungal biotransformations in pharmaceutical sciences. En *Industrial applications* (pp. 293–317). Springer.
- Ibrahim, A. S., & Kontoyiannis, D. P. (2013). Update on mucormycosis pathogenesis. *Current opinion in infectious diseases*, 26(6), 508.

- Kontoyiannis, D. P., Yang, H., Song, J., Kelkar, S. S., Yang, X., Azie, N., Harrington, R., Fan, A., Lee, E., & Spalding, J. R. (2016). Prevalence, clinical and economic burden of mucormycosis-related hospitalizations in the United States: A retrospective study. *BMC infectious diseases*, *16*(1), 1–6.
- Lengerova, M., Racil, Z., Hrnčirova, K., Kocmanova, I., Volfova, P., Ricna, D., Bejdak, P., Moulis, M., Pavlovsky, Z., Weinbergerova, B., & others. (2014). Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *Journal of clinical microbiology*, *52*(8), 2824–2828.
- López-Muñoz, A., Nicolás, F. E., García-Moreno, D., Pérez-Oliva, A. B., Navarro-Mendoza, M. I., Hernández-Oñate, M. A., Herrera-Estrella, A., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Garre, V., & others. (2018). An adult zebrafish model reveals that mucormycosis induces apoptosis of infected macrophages. *Scientific reports*, *8*(1), 1–12.
- Millon, L., Herbrecht, R., Grenouillet, F., Morio, F., Alanio, A., Letscher-Bru, V., Cassaing, S., Chouaki, T., Kauffmann-Lacroix, C., Poirier, P., & others. (2016). Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: Retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(9), 810-e1.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J.-L. (2017). Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, *31*(1), 12–32.

- Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., Murcia, L., Martínez-García, P., Lax, C., Sanchis, M., Capilla, J., Nicolás, F. E., & Garre, V. (2018). Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Scientific reports*, *8*(1), 1–13.
- Nicolás, F. E., Murcia, L., Navarro, E., Navarro-Mendoza, M. I., Pérez-Arques, C., & Garre, V. (2020). Mucorales species and macrophages. *Journal of Fungi*, *6*(2), 94.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & Team, U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, *28*(8), 1166–1167.
- Pertea, G., & Pertea, M. (2020). GFF utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research*, *9*.
- Rammaert, B., Lanternier, F., Zahar, J.-R., Dannaoui, E., Bougnoux, M.-E., Lecuit, M., & Lortholary, O. (2012). Healthcare-associated mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(suppl_1), S44–S54.
- Riad, A., Shabaan, A. A., Issa, J., Ibrahim, S., Amer, H., Mansy, Y., Kassem, I., Kassem, A. B., Howaldt, H.-P., Klugar, M., & others. (2021). COVID-19-Associated mucormycosis (CAM): Case-series and global analysis of mortality risk factors. *Journal of Fungi*, *7*(10), 837.
- Roblero-Roblero A. X. (2021). Diseño y evaluación experimental de la selectividad de oligonucleótidos cebadores especie-específicos para la levadura patógena *Candida glabrata*. Tesis: UAAAN. Dr. Egidio G. Rebonato Koha.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*(4), 406–425.

- Singh, A. K., Singh, R., Joshi, S. R., & Misra, A. (2021). Mucormycosis in COVID-19: A systematic review of cases reported worldwide and in India. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*.
- Soni, S., Namdeo Pudake, R., Jain, U., & Chauhan, N. (2022). A systematic review on SARS-CoV-2-associated fungal coinfections. *Journal of Medical Virology*, *94*(1), 99–109.
- Springer, J., Goldenberger, D., Schmidt, F., Weisser, M., Wehrle-Wieland, E., Einsele, H., Frei, R., & Löffler, J. (2016). Development and application of two independent real-time PCR assays to detect clinically relevant Mucorales species. *Journal of Medical Microbiology*, *65*(3), 227–234.
- Tange, O. (2015). *Gnu Parallel 20150322 ('Hellwig')*. Zenodo.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.16303>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, *40*(15), e115–e115.
- Velegraki, A., Kambouris, M., Kostourou, A., Chalevelakis, G., & Legakis, N. J. (1999). Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Sabouraudia*, *37*(1), 69-73.
- Vitale, R. G., de Hoog, G. S., Schwarz, P., Dannaoui, E., Deng, S., Machouart, M., Voigt, K., van de Sande, W. W., Dolatabadi, S., Meis, J. F., & others. (2012). Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order mucorales. *Journal of clinical microbiology*, *50*(1), 66–75.

- Voigt, K., Cigelnik, E., & O'donnell, K. (1999). Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 3957–3964.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2019). Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi*, 5(4), 106.
- Walther, G., Wagner, L., & Kurzai, O. (2020). Outbreaks of Mucorales and the species involved. *Mycopathologia*, 1–17.
- Wang, X., Fu, Y.-F., Wang, R.-Y., Li, L., Cao, Y.-H., Chen, Y.-Q., Zhao, H.-Z., Zhang, Q.-Q., Wu, J.-Q., Weng, X.-H., & others. (2014). Identification of clinically relevant fungi and prototheca species by rRNA gene sequencing and multilocus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *PLoS One*, 9(5), e98110.