

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



DISEÑO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA SELECTIVIDAD DE
OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS PARA LA
LEVADURA PATÓGENA *Candida glabrata*.

Por:

ALEXANDRA YOMARA ROBLERO ROBLERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Noviembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

DISEÑO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA SELECTIVIDAD DE
OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS PARA LA
LEVADURA PATÓGENA *Candida glabrata*.

Por:

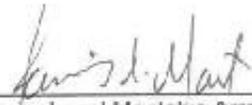
ALEXANDRA YOMARA ROBLERO ROBLERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



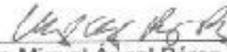
Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Asesor principal interno



Dra. Lihua Wei
Asesor principal externo



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Co-Asesor



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Co-Asesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo Coahuila, México
Noviembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

DISEÑO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA SELECTIVIDAD DE
OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS PARA LA
LEVADURA PATÓGENA *Candida glabrata*.

Por:

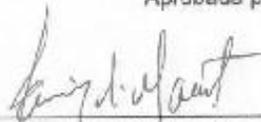
ALÉXANDRA YOMARA ROBLERO ROBLERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

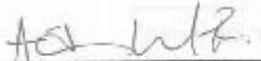
Aprobada por el Comité de Evaluación:



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Presidente



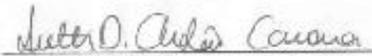
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Secretario



Dra. Aida Isabel Leal Robles
Sinodal



Dra. Silvia Judith Martínez Amador
Sinodal



Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona
Sinodal

Buerravista, Saltillo Coahuila, México
Noviembre, 2021

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



Alexandra Yomara Roblero Roblero

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme lo necesario para mi formación profesional, por el conocimiento brindado y experiencias vividas.

A mi asesor el Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo por brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su valiosa asesoría y paciencia durante el presente trabajo, por haber compartido sus conocimientos durante mi estancia universitaria. Para un gran maestro ¡Gracias por su amabilidad y dedicación!

A mi amigo y compañero de esta aventura Jhonatan García Rodríguez, quien siempre ha estado para apoyarme, por creer en mí y por representar una base emocional e intelectual. “GRACIAS TOTALES”.

A mi persona y hermana “omae” por permanecer a mi lado y ser mi pilar emocional. Gracias por todos los momentos que hacen de mi vida feliz.

A mi mamá por creer en mí, por ser uno de mis impulsos en la vida y brindarme su apoyo durante mi carrera.

A mi hermano menor por darme chispas de felicidad, amabilidad y por ser parte de mi vida.

Agradecimientos institucionales

Los autores de este trabajo titulado: “**DISEÑO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA SELECTIVIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS PARA LA LEVADURA PATÓGENA *Candida glabrata***”, agradecemos el apoyo y soporte brindado por las siguientes personas e instituciones, necesario para la realización de este trabajo de obtención de grado de **Ingeniería en Biotecnología**:

- A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** y al **Departamento de Ciencias Básicas**, por el apoyo de su infraestructura.
- A la **Dra. Lina Raquel Riego-Ruiz**, a la **Dra. Irene Castaño Navarro**, y al **Dr. Alejandro de las Peñas Nava** del **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C (IPICYT)**, por su valiosa colaboración en el diseño de la tubería de comandos BESTur y por proporcionar el material biológico.
- A la **Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo**, Técnico Titular C de la División de Biología Molecular del IPICYT, por proporcionarnos el material biológico que utilizamos en este trabajo.
- Al **Departamento de Botánica**, al **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez** y al **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes** por facilitarnos reactivos, laboratorio y equipo para realizar las evaluaciones experimentales.

Con inmensa gratitud,

La sustentante: **Alexandra Yomara Roblero Roblero**.

El director de tesis: **Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo**.

Tabla de contenido

Declaración de no plagio	Error! Bookmark not defined.
Agradecimientos institucionales	VI
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
I.- Prólogo	XI
II. Introducción	1
III. Revisión de literatura	3
3.1 Hongos y levaduras.	3
3.1.1 Definición	3
3.1.2 Clasificación filogenética de levaduras de la familia <i>Saccharomycetaceae</i>	3
3.2 Biología celular de los hongos <i>ascomicetos</i>.	6
3.3 Biología molecular de levaduras	7
3.3.1 ADN, cromosomas y genes	7
3.3.2 ADN mitocondrial	8
3.4 Levaduras comensales y patógenas en humanos.	8
3.4.1 Levaduras comensales en humanos.	8
3.4.2 De levaduras comensales a patógenas.	11
3.5 Características de las candidemias.	14
3.5.1 Factores de virulencia.	14
3.5.2 Inicio y desarrollo de la infección.	17
3.5.3 Tratamientos.	18
3.5.4 Problemas más comunes en el tratamiento de las candidemias.	19
3.6 Métodos de detección.	21
3.6.1 Métodos de identificación más utilizados	21
3.7 Recursos bioinformáticos	23
3.8 BESTur: Herramienta de búsqueda potenciada por BLAST.	25
3.9 Parámetros de corte en la búsqueda con BLAST.	27
IV. Materiales y métodos	29
4.1 Descarga de la base de datos de secuencias	29
4.2 Identificación de regiones únicas en el genoma de <i>Candida glabrata</i> ..	29
4.3 Diseño de los oligonucleótidos cebadores de PCR	30

4.4 Extracción del material genético de las levaduras.....	31
4.5 Prueba de selectividad de los oligonucleótidos cebadores de PCR.	32
V. Justificación	34
VI. Hipótesis.	35
VII. Objetivos	36
7.1 Objetivo general	36
7.2. Objetivos específicos.....	36
VIII. Resultados y discusión	37
8.1 Evaluación de los parámetros porcentaje de identidad y de cobertura HSP sobre el porcentaje de fragmentos retenidos del genoma consulta. ...	37
8.2 Evaluación del efecto de los parámetros porcentaje de identidad y de cobertura HSP sobre el número de fragmentos ensamblados y las características del ensamble.....	38
8.3. Visualización y selección de las regiones únicas.	43
8.4 Diseño de los oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie de levadura <i>Candida glabrata</i>	48
8.5 Identificación específica de <i>Candida glabrata</i> por PCR.....	51
IX. Conclusiones	56
X. Perspectivas.....	57
XI. Referencias.....	59

Lista de figuras

Figura 1. Representación topológica del árbol del proteoma del reino de los hongos	5
Figura 2. Relaciones del grupo de especies de <i>C. glabrata</i>	6
Figura 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Figura 4. Distribución de hongos comensales comunes	11
Figura 5. Etapas de la formación de biopelículas de <i>Candida albicans</i>	14
Figura 6. La topología predicha de los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) pertenecientes a la subfamilia de resistencia a fármacos pleiotrópicos	17
Figura 7. Descripción gráfica del proceso de fragmentado del genoma consulta	25
Figura 8. Definición gráfica de los parámetros porcentaje de cobertura HSP de la secuencia consulta y porcentaje de identidad	26
Figura 9. Descripción gráfica de los parámetros de ensamble.....	27
Figura 10. Diagrama de flujo de la tubería de comandos de BESTur.....	27
Figura 11. Porcentaje de fragmentos retenidos.....	39
Figura 12. Número de fragmentos ensamblados.....	40
Figura 13. Tamaño de los fragmentos ensamblados	41
Figura 14. Correlación lineal entre el tamaño de fragmento máximo obtenido y el estadístico N50 con el número de fragmentos retenidos del genoma consulta.....	42
Figura 15. La correlación entre el número de fragmentos ensamblados y el número de fragmentos retenidos no es lineal.....	43
Figura 16. Regiones únicas identificadas en el cromosoma H de <i>C. glabrata</i>	45
Figura 17. Un acercamiento al cromosoma A de <i>C. glabrata</i>	45
Figura 18. Regiones únicas con poco soporte en el cromosoma C de <i>C. glabrata</i>	47
Figura 19. Acercamiento al cromosoma H del genoma de <i>C. glabrata</i>	48
Figura 20. Oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie <i>C. glabrata</i> con la mejor puntuación	50
Figura 21. Evaluación experimental de la selectividad de los oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie de levadura <i>C. glabrata</i>	53

Lista de tablas

Tabla 1. Levaduras de interés médico del género <i>Candida</i>	29
Tabla 2. Oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie <i>C. glabrata</i>	49

I.- Prólogo

“El futuro de la ciencia será una mezcla de proyectos grandes y pequeños [...]”
Freeman Dyson

Al momento de formar parte de este proyecto sentí un gran interés por el hecho ser una técnica híbrida entre biología molecular y bioinformática. Creciendo mi interés a la constante información sobre levaduras patógenas y las enfermedades causadas.

El presente trabajo de tesis que lleva por nombre “DISEÑO Y EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA SELECTIVIDAD DE OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS PARA LA LEVADURA PATÓGENA *Candida glabrata*” proporciona una recopilación de conocimientos sobre diversos temas abarcados en biotecnología, donde se pretende contribuir a la identificación de hongos patógenos (de gran importancia en la salud pública), mediante herramientas bioinformáticas y de biología molecular accesibles.

Poder contribuir al área de investigación con una herramienta que permita reducir el tiempo de detección y por consiguiente disminuir el costo de tratamiento de las enfermedades causadas por *C. glabrata* esta levadura patógena representa una aportación y progreso en los métodos de detección.

A lo largo de este escrito se puede encontrar información necesaria para el conocimiento sobre levaduras, su patogenicidad, tratamientos, así como los métodos de detección utilizados actualmente (ventajas y desventajas) por consiguiente la herramienta presentada puede ser de suma ayuda para optimizar y/o mejorar diferentes técnicas/métodos con los cuales se disponen actualmente.

II. Introducción

Muchas especies de levadura ascomicetos del género *Candida* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y actúan como constituyentes saprófitos comunes de la microflora humana normal. Sin embargo, algunas de estas especies de hongos también pueden convertirse en patógenos oportunistas tras una transición de una fase comensal a una patógena, inducida por alteraciones en el entorno huésped (Papon et al., 2013).

Las infecciones fúngicas invasivas tales como candidiasis, representan un problema de salud pública de gran importancia. En los últimos 10 años, el número de infecciones causadas por especies de *Candida* ha aumentado progresivamente. Aunque la mayoría de los casos de candidiasis se han atribuido a *Candida albicans*, recientemente se han identificado otras especies (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*) como patógenos comunes (Silva et al., 2009).

Una de las principales contribuciones a la virulencia de *Candida* es su versatilidad para adaptarse a una variedad de hábitats y la formación de comunidades microbianas adheridas a las superficies conocidas como biopelículas. La capacidad de formación de biopelículas puede conferir una ventaja ecológica, ayudando a la supervivencia como comensales y patógenos de los humanos al permitirles evadir los mecanismos inmunes del huésped, resistir el tratamiento antifúngicos y resistir la presión competitiva de otros microorganismos (Silva et al., 2009). Además, cuentan con adhesinas, bombas de extrusión multi-drogas y flujo de salida de antibióticos que confieren resistencia a diferentes antifúngicos. Estas especies de levadura muestran resistencia diferencial a múltiples fármacos como azoles, incluidas las equinocandinas y la anfotericina, y debido a una mala identificación de las especies se puede administrar una terapia antifúngica inadecuada, por lo cual destaca la importancia de la identificación correcta de las especies (Schelenz et al., 2016).

La identificación rápida y confiable de la especie de *Candida* que está ocasionando la invasión en el hospedero, mejora los resultados del paciente y

acorta el tiempo de hospitalización (Schelenz et al., 2016). Existen diferentes métodos de detección como hemocultivo que es considerado como convencional, es inespecífico y el tiempo de identificación tiende a ser de 3 a 4 días. Se han desarrollado otras técnicas como ELISA, MALDI-TOF, (Zheng et al., 2014). Estos métodos de detección aportan alta sensibilidad y especificidad en periodos cortos de procesamiento, eliminan las limitaciones de los métodos convencionales para la detección e identificación de patógenos, ahorran mano de obra y reducen errores humanos, al contar con un proceso automatizado; sin embargo, cada uno de estos métodos presenta sus limitaciones como el alto costo y el difícil acceso de todos los laboratorios de análisis como en el caso del método que utiliza el espectrómetro de masas (MALDI-TOF) (Huertas et al., 2019).

Para la identificación rápida y confiable se necesita de un método altamente específico, sensible, rápido y que su costo no sea tan elevado. Los métodos basados en ADN han mostrado tener esas características, sin embargo estas técnicas requieren del empleo de oligonucleótidos diseñados de tal manera que puedan ser dirigidos a blancos específicos presentes en el genoma del patógeno. En este trabajo se presenta una herramienta que permite identificar regiones únicas de un genoma determinado, por ejemplo el genoma de una especie patógena como *Candida glabrata*. Esta herramienta se llama BESTur (Herramienta de búsqueda potenciada por BLAST). Empleamos esta herramienta bioinformática para ayudar en el diseño de los oligonucleótidos cebadores específicos para la especie de levadura patógena *C. glabrata* y poder implementar una técnica basada en ADN como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El diseño de los oligonucleótidos dirigidos a esas regiones únicas identificadas en el genoma de la levadura empleando la herramienta BESTur, le dieron mucha especificidad a la técnica de PCR. En este trabajo se muestran los resultados de las pruebas bioinformáticas y de especificidad experimental, así como la identificación de regiones únicas del genoma de esta levadura patógena y el diseño de oligonucleótidos cebadores especie-específicos.

Palabras clave: PCR, *Candida glabrata*, Levaduras patógenas, Bioinformática.

III. Revisión de literatura.

3.1 Hongos y levaduras.

3.1.1 Definición.

Los hongos son organismos eucariotas de presencia global y están agrupados en el reino fungi. Este reino está constituido por un gran grupo de organismos diversos y muy extendidos, que incluye a setas, hongos filamentosos y levaduras (Madigan et al., 2016).

Se pueden encontrar en la estratosfera y en el fondo del mar, desde glaciares antárticos hasta desiertos tórridos, desde el intestino de las moscas hasta sedimentos oceánicos profundos y en cualquier punto intermedio. Los hongos son actores poderosos en la biogeoquímica global, reciclando carbono y movilizándolo nitrógeno, fósforo y otros bioelementos (Naranjo & Gabaldón., 2019).

Un gran número de especies de hongos son parásitos de plantas y animales, incluyéndose los seres humanos. Algunos también pueden establecer asociaciones simbióticas beneficiosas con muchas plantas y animales. Numerosos hongos son empleados de forma beneficiosa para llevar a cabo ciertos procesos fermentativos y la síntesis de antibióticos o productos de interés industrial (Madigan et al., 2016).

Todos los hongos son heterótrofos (quimiorganotrofos), por lo tanto, requieren materia orgánica para utilizarla como fuente de energía y de carbono en la síntesis de estructuras celulares. Tienen necesidades nutricionales habitualmente sencillas y en su mayoría bajo condiciones aerobias. Se alimentan de compuestos orgánicos complejos como polisacáridos o proteínas digeridos hasta obtener los monómeros constituyentes mediante la acción de enzimas que secretan al medio (Madigan et al., 2015).

3.1.2 Clasificación filogenética de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*.

Según Naranjo y Gabaldón (2019), los hongos verdaderos se dividen en nueve linajes principales: Opisthosporidia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Basidiomycota, Ascomycota. Los dos últimos filos, Basidiomycota y Ascomycota se han agrupado en un subreino llamado Dykarya que abarca un gran número de especies, siendo además el mejor estudiado.

El linaje Ascomycota es considerado el filo fúngico más grande, comprende aproximadamente dos tercios de todas las especies descritas. Ascomycota abarca desde levaduras simples hasta hongos con cuerpos fructíferos macroscópicos de gran complejidad. El filo contiene tres clases principales: Taphrinomycotina (anteriormente conocida como Aarchiascomycota), Saccharomycotina (anteriormente conocida como Hemiascomycota) y Pezizomycotina (anteriormente conocida como Euascomycota) (Naranjo & Gabaldón, 2019).

Según estudios realizados Saccharomycotina comprende un gran orden (Saccharomycetales) donde todos los miembros se caracterizan por (i) la posesión de ninguna o solo hifas rudimentarias, (ii) células vegetativas que se multiplican por gemación o fisión, (iii) paredes celulares que carecen de quitina y (iv) asci que se forman de manera individual o en cadenas (Diezmann et al., 2004).

Además, este orden posee diversas especies de importancia práctica e interés científico, incluidas varias especies que son patógenas para los humanos, como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida albicans*, que es el hongo patógeno humano más frecuente. Otras especies de *Saccharomycetales* son explotadas por la industria para producir metabolitos secundarios y subproductos fermentados (Diezmann et al., 2004).

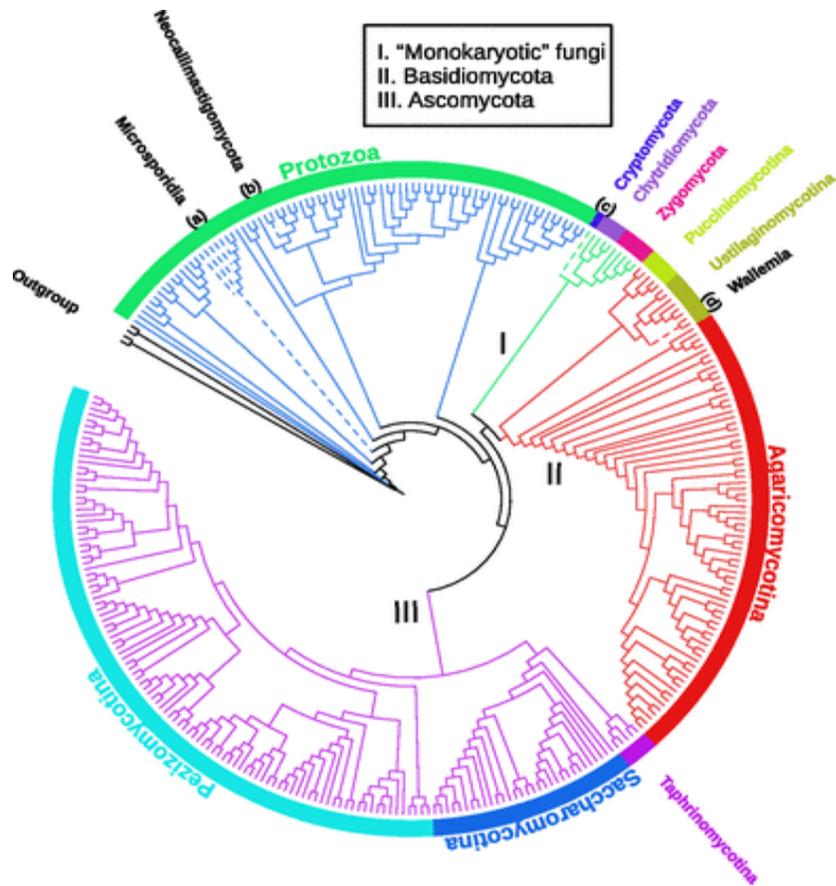


Figura 1. Representación topológica del árbol del proteoma del reino de los hongos. Las ramas de los tres grupos principales se observan de color verde para el grupo I (hongos monokaryotic), rojo para el grupo II (Basidiomycota) y violeta para el grupo III (Ascomycota). Todos los protistas están en azul, las ramas de dos conjuntos de externos están en negro. Los nombres de nueve grupos a nivel de filo pertenecientes a los tres grupos principales se muestran alrededor del círculo (Choi & Kim., 2017).

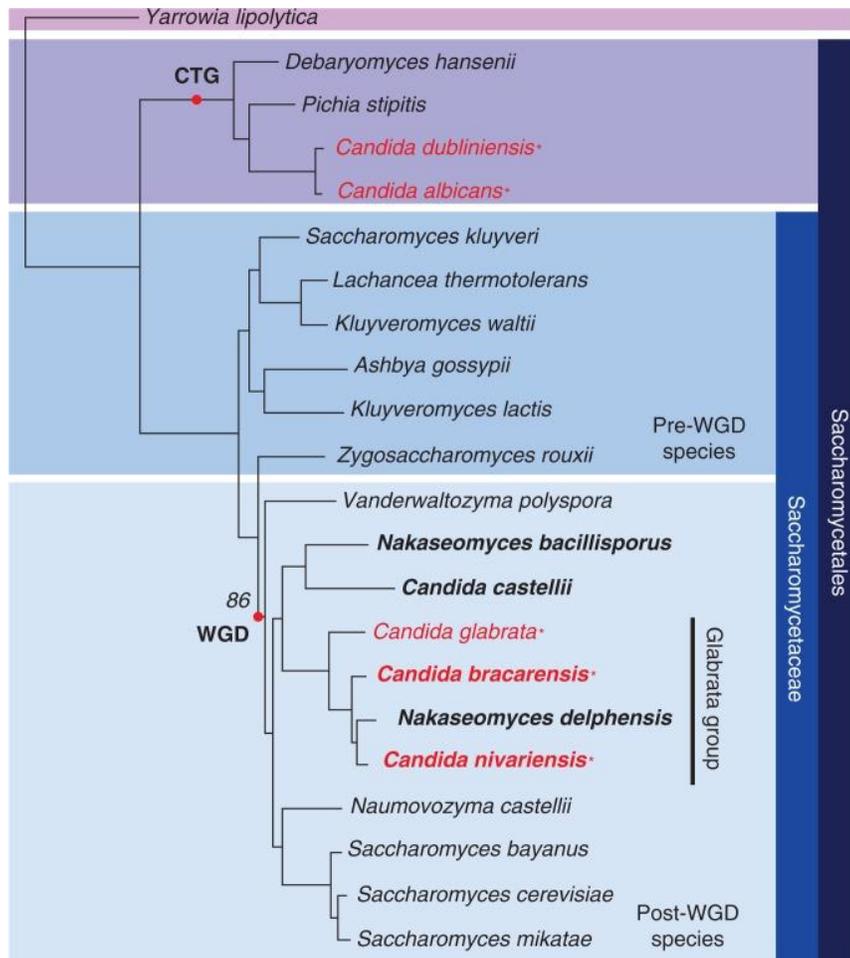


Figura 2. Relaciones del grupo de especies de *C. glabrata*. Los nombres de especies en rojo y con un asterisco indican patógenos fúngicos humanos (Turner & Butler., 2014).

3.2 Biología celular de los hongos ascomicetos.

Los hongos ascomicetos crecen de manera filamentosa o de forma de levadura. Los filamentos individuales se denominan hifas y están rodeados a menudo (aunque no siempre) por quitina como componente principal de las paredes de estos hongos. Las hifas crecen solo en sus extremos, por lo que los hongos presentan crecimiento apical, y se ramifican periódicamente detrás de los ápices, dando como resultado una red de hifas a la que se denomina micelio. Las hifas pueden ser septadas o no septadas (Deacon, 2013). Las esporas son las células sexuales de estos hongos y normalmente se encuentran dentro de un saco denominado asca, de ahí su nombre ascomicetos (Nabors, 2006).

En contraste con los hongos que desarrollan micelio, algunos otros crecen como organismos unicelulares, como las levaduras que se multiplican por gemación en donde la célula hija brota y crece en un extremo de la célula madre. Las levaduras producen una estructura sexual llamada asca que contempla el 100% de la célula, en donde se desarrollan las esporas. Al final las células sexuales se liberan del asca y se dispersan en el medio (Kuhar & Papinutt., 2013).

Las levaduras son organismos unicelulares relativamente grandes (si se las compara con una bacteria común). Su tamaño varía entre uno y cinco micrómetros (μm) de ancho por cinco a 30 μm de largo, aunque la mayoría oscila entre tres y ocho μm de diámetro (Deacon, 2013). Una levadura típica tiene forma ovoide, sin embargo, también existen formas alargadas, esféricas o incluso irregulares, cada especie tiene su forma característica.

La estructura celular de una levadura es como la de una típica célula eucarionte, por lo que contiene estructuras subcelulares características de ese tipo celular: como una pared celular compuesta por diversos polisacáridos principalmente quitina y proteínas. También muestra una membrana plasmática compuesta por una bicapa fosfolipídica, diversas proteínas y esteroides.

Dentro de la célula encontramos el citoplasma compuesto por los organelos como las mitocondrias, (ya que las levaduras son heterótrofas), el aparato de Golgi, los retículos endoplasmáticos, vacuola y el citoesqueleto que da forma a la estructura característica de la levadura. El núcleo, que es uno de los componentes subcelulares que distinguen a una célula eucarionta, contiene en su interior el ADN y toda la maquinaria molecular encargada de mantener y expresar la información genética codificada.

3.3 Biología molecular de levaduras

3.3.1 ADN, cromosomas y genes

El genoma de levadura posee una gran densidad de genes que constituye alrededor del 72% (excluyendo el rDNA), lo cual deja muy poco espacio para DNA no codificante y otros elementos funcionales. Dado el patrón de tamaños de ORFs,

la compactación del genoma se debe a la rareza y pequeño tamaño de los intrónes (el más largo es de 1 kb, aunque habitualmente son mucho más pequeños) y a las cortas distancias intergénicas. Un gen típico de levadura tiene una pauta de 1000 - 1500 pb de marco de lectura abierta, una región mínima promotora que oscila entre los 300 pb y una región terminadora de un tamaño promedio de 160 pb. La densidad de genes no es uniforme a lo largo de los cromosomas. En muchos cromosomas hay regiones de alta densidad de genes (85%) separadas por otras de baja densidad (50%). Las regiones centroméricas y teloméricas siempre son de baja densidad (Pérez, 1997).

Una levadura haploide (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*) contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200 Kb (González & Valenzuela., 2004), cerrado en sus dos extremos por dos estructuras especiales, constituidas por repeticiones de TG de unas 150-350 pb. A estas regiones le siguen las zonas subteloméricas, de un tamaño de 25 Kb, pobres en GC y en genes, que contienen elementos repetidos. En una posición aproximadamente central se encuentra la región centromérica, que es muy pequeña (125 pb), también con una composición rica en AT que incluyen algunas secuencias consenso (Pérez, 1997).

3.3.2 ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) de levadura representa en promedio el 15% del contenido total de ADN nuclear, consiste principalmente en moléculas lineales de longitud variable de ~75 a 150 Kb, pero también están presentes pequeñas cantidades de ADN circular (Malina et al., 2018). Las características del ADNmt en el género *Candida* varía en cada especie, el genoma mitocondrial de *C. albicans* es más compacto que el de *S. cerevisiae*, y las regiones codificantes cubren la mayor parte de su secuencia. Tiene un tamaño molecular de 41 kb.

3.4 Levaduras comensales y patógenas en humanos.

3.4.1 Levaduras comensales en humanos.

Los microorganismos comensales son aquellos que cohabitan en diferentes regiones anatómicas de los individuos sin causar daño, es decir, conviven en contacto directo con el hombre, de modo que se establece una relación simbiótica (beneficios bidireccionales) (La Rosa et al., 2014). Entre esta clase de microorganismos están presentes los hongos, que pueden asociarse con nuestros cuerpos, ya sea en la piel grasa o en el intestino anaeróbico. Los mamíferos han evolucionado en presencia de diversos hongos, y nuestros sistemas inmunes están adaptados a su presencia (Wheeler et al., 2017).

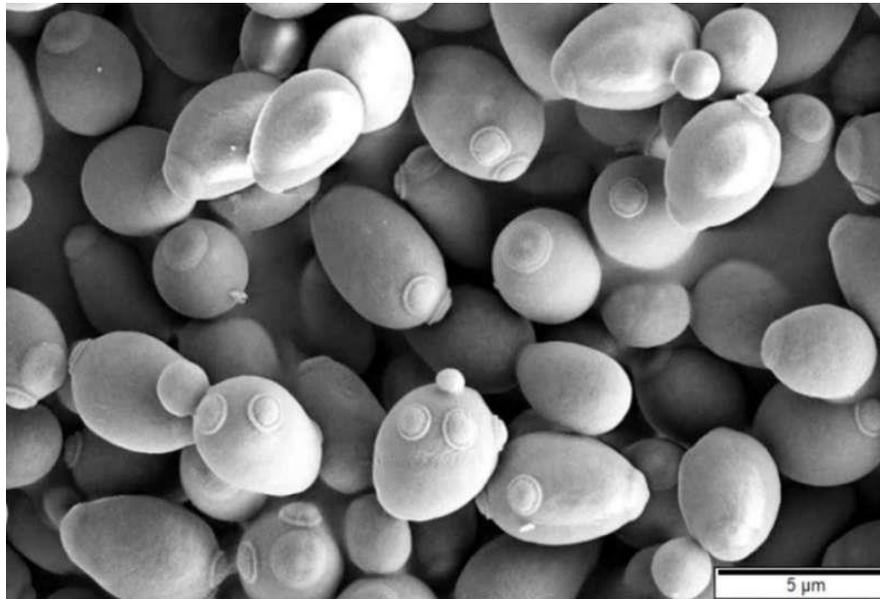


Figura 3. *Saccharomyces cerevisiae*. Microscopía electrónica de barrido (Das Murtey & Ramasamy, 2016).

En el intestino, por ejemplo, esfuerzos de secuenciación han sugerido que los hongos constituyen aproximadamente el 0.1% de los microorganismos (Wheeler et al., 2017). y se ha demostrado que en el intestino habitan más de 50 géneros de especies de hongos como: *Candida*, *Saccharomyces* y *Cladosporium*, (particularmente comunes) (Underhill & Iliev., 2014).

El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *C. albicans*. Así mismo existen otras especies que pueden colonizar la mucosa oral, epidermis y del tracto gastrointestinal humano como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* (Biasoli, 2013). Algunas

levaduras como es el caso del género *Saccharomyces* comúnmente se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal como un microorganismo comensal, pero también es considerada benéfica ya que es empleada como probiótico (Leonard, 2007). A mención de este género de levadura se puede comprender que algunos comensales son benéficos para el hospedero.

En contraste, enfoques dependientes de cultivo han identificado muchos hongos comensales asociados con la piel, *Malassezia* quien es el residente dominante de la piel, requiere lípidos para crecer, por lo tanto, se encuentra asociada con áreas de la piel donde hay secreciones sebáceas, en menor grado se encuentran *Penicillium* y *Aspergillus*. También se han cultivado otros hongos como *Alternaria*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cladosporium* y *Mucor*, pero con menor frecuencia (Underhill & Iliev, 2014).

Bajo un estado fisiológico normal, la cavidad oral alberga una diversa microbiota con especies de *Candida* que se encuentran en hasta el 75% de las personas sanas. Estudios basados en secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) para la evaluación de microbioma oral se identificó más de 80 géneros de hongos y se descubrió que *Candida* y *Clodosporium* se detectaban más abundantemente en individuos sanos (Wheeler et al., 2017).

Diferentes partes del cuerpo humano se encuentran expuestas a la presencia de diversos hongos. Los pulmones están constantemente expuestos a hongos orales y ambientales. Por lo tanto, el sistema inmunitario de la mucosa en los pulmones se encuentra continuamente con hongos y antígenos fúngicos. Los hongos comúnmente encontrados en este entorno incluyen *Aspergillus sp.* y *Scedosporium sp.* dos mohos filamentosos formadores de esporas (Underhill & Iliev., 2014).

Al igual que otras superficies mucosas, la vagina alberga un grupo de ocupantes microbianos, diversos estudios sugieren la presencia de 11-20 géneros diferentes, con hongos comúnmente detectados que incluyen *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Underhill & Iliev, 2014).

3.4.2 De levaduras comensales a patógenas.

Las interacciones entre el Sistema inmune y el microbioma son reconocidos como importantes para la homeostasis inmune (Wheeler et al., 2017). Se cree que la interacción entre microorganismos comensales y/o ambientales y el sistema inmune en individuos sanos promueve una “coexistencia pacífica” entre el huésped y el microbio. Por lo tanto, es lógico suponer que algunos hongos comensales desarrollarían mecanismos para remover su tolerancia por parte del sistema inmunitario del huésped para establecer la colonización (Wheeler et al., 2017).

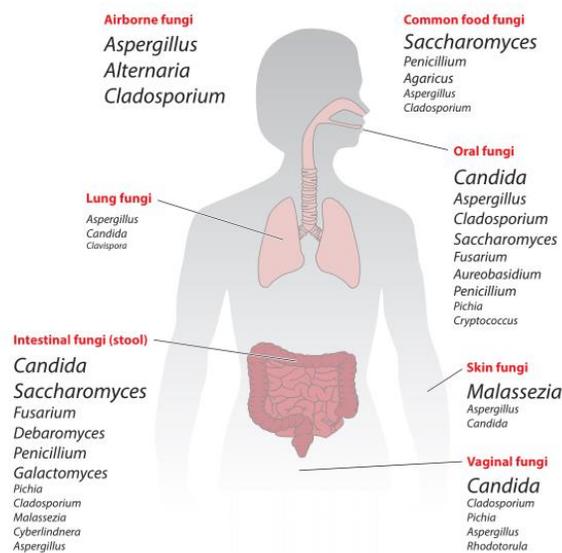


Figura 4. Distribución de hongos comensales comunes. El nivel de prevalencia de estos géneros de hongos se describe con el tamaño de los caracteres; entre más grande es el caracter, más prevalente es el hongo de ese género (Wheeler et al., 2017).

Los hongos comensales responden al estado inmunitario del huésped y este es un determinante importante del comensalismo versus la invasión fúngica patológica. Normalmente estamos colonizados con muchos hongos, de los cuales pueden generar enfermedades (por ejemplo, en la piel, mucosas o en el intestino). Al romperse la protección del sistema inmune las infecciones fúngicas superficiales

e invasivas causan enfermedades que van desde irritantes hasta mortales (Wheeler et al., 2017).

Muchas especies de hongos que se encuentran como parte del microbioma normal (filo *Ascomycota* y *Basidiomycota*) de los mamíferos pueden asociarse con enfermedades; sin embargo, a menudo es difícil establecer si los hongos patógenos se derivan realmente de cepas comensales. Estudios previos han señalado que las cepas que causan enfermedades coinciden con las cepas comensales transportadas por los pacientes (Wheeler et al., 2017). Según estudios de Gouba y Drancourt (2015) se demostró mediante genotipado que el microbioma intestinal representa una fuente de infección micótica causada por *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Con base a los estudios realizados por Nucci and Anaissie (2001) sugieren que la colonización intestinal por *Candida* que lleva a la inmunosupresión conduce a la candidiasis diseminada. Teóricamente se habla de que las diferentes especies de *Candida spp.* comensales realizan translocación y así pueden causar enfermedades en diferentes ubicaciones.

C. albicans es un miembro de la microbiota saludable, colonizando asintóticamente el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo, la cavidad oral y la piel de la mayoría de los humanos. En individuos saludables es inofensiva, se mantiene en equilibrio con otros miembros de la microbiota local. Sin embargo alteraciones en la microbiota del huésped, cambios en la respuesta inmune del huésped o variaciones en el entorno local pueden permitir que *C. albicans* crezca demasiado y cause infección (Nobile & Johnson, 2015).

Las infecciones varían desde infecciones superficiales de la mucosa y dérmicas, como aftas, infecciones diseminadas de manera hematológica con tasas considerables de mortalidad. *C. albicans* se encuentra entre la cuarta causa más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo en entornos clínicos que puede conducir a infecciones invasivas sistémicas de tejidos y órganos (Wheeler et al., 2017).

Por su parte, la microbiota vaginal comprende una comunidad de microbios con diversidad moderada y juega un papel mutualista en el mantenimiento de la salud vaginal. Estudios han sugerido que la interrupción en la composición

microbiana puede conducir a una mayor susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas (Liu et al., 2013). Aunque *Candida* forma parte normal del microbioma vaginal, del 5 al 8% de las mujeres adultas experimentan candidiasis vulvovaginal recurrente. La naturaleza recurrente de tales infecciones sugiere frecuentemente que las cepas comensales causan enfermedades, no la reintroducción constante de cepas extrañas (Wheeler et al., 2017).

Las levaduras vaginales se vuelven patógenas cuando el sitio de colonización en el huésped es favorable para su desarrollo. Varios factores que pueden aumentar este riesgo son, la colonización previa por la levadura, enfermedades inmunosupresoras, diabetes mellitus (DM), entre otros (Gunther et al., 2014).

La candidiasis sistémica es el tipo más común de infecciones micóticas del torrente sanguíneo documentada en el mundo, se cree que se origina comúnmente a partir de la translocación de hongos intestinales o de la mucosa en la sangre. Se ha documentado que más de una docena de especies de *Candida* causan infecciones del torrente sanguíneo en humanos, de las cuales el 95% son causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Wheeler et al., 2017).

La colonización oral por levaduras es uno de los principales procesos iniciales que pueden progresar a infección si el sistema inmunitario innato y adaptativo se ve interrumpido. La candidiasis oral es una de las principales infecciones fúngicas oportunistas que ocurren en más de 90% de las personas infectadas por el VIH durante el transcurso de la enfermedad. La colonización de la cavidad oral por *Candida spp.* en la población sana varía del 17% al 75% en todo el mundo. Las terapias múltiples y principalmente el tratamiento con antibióticos entre las personas infectadas con VIH es uno de los factores que pueden influir en la colonización oral de *Candida* (Mushi et al., 2016).

En pacientes con cáncer que reciben quimioterapia, son tratados con cocteles de antibióticos que pueden inducir a disbiosis de la microbiota intestinal normal y un crecimiento patológico excesivo de *Candida spp.* comensal (Wheeler et al., 2017).

3.5 Características de las candidemias.

3.5.1 Factores de virulencia.

Las levaduras así como otros microorganismos poseen diferentes factores de virulencia que favorecen su acción invasora. *Candida albicans* es la especie fúngica más prevalente de la microbiota humana debido a sus diferentes factores de virulencia como biopelículas, secreción de enzimas hidrolíticas y la presencia de transportadores de membrana (Rodrigues et al., 2014).

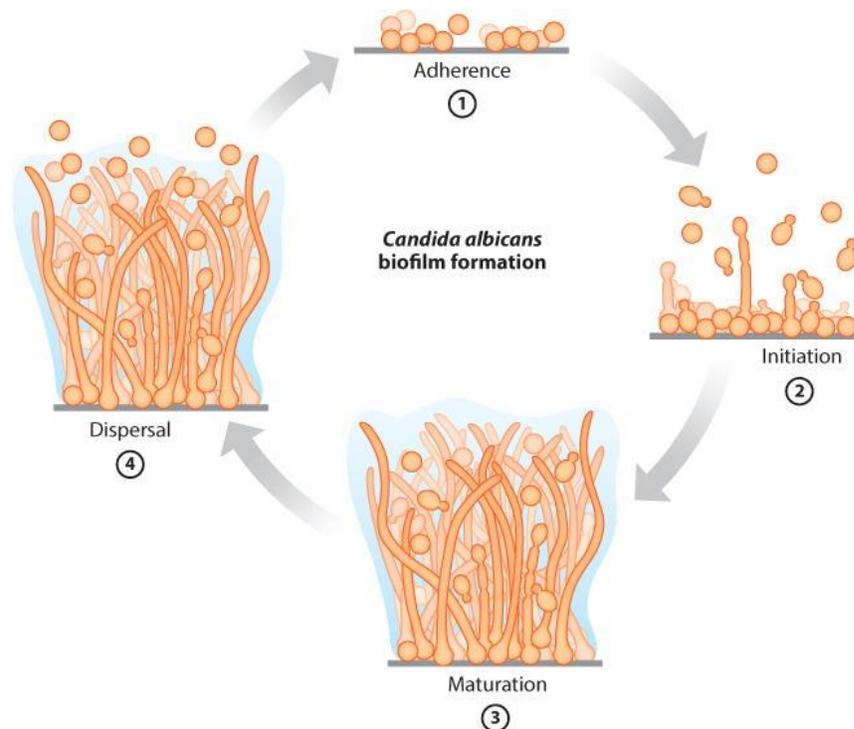


Figura 5. Etapas de la formación de biopelículas de *Candida albicans*. (1) adhesión de levaduras a una superficie. (2) proliferación o división celular, forman una capa basal de células de anclaje. (3) Maduración, comienza la producción de material de matriz extracelular. (4) Dispersión, liberación de células en forma de levadura de la biopelícula que colonizaran nuevas superficies (Nobile & Johnson, 2015).

Las biopelículas son el estado de crecimiento predominante de muchos microorganismos (Nobile & Johnson., 2015). Estas forman comunidades biológicas

con un grado extraordinario de organización, en el que los microorganismos forman comunidades estructuradas, coordinadas y funcionales, incrustadas en una matriz extracelular de creación propia (Rodrigues et al., 2014).

En el estudio realizado por Nobile & Johnson (2015) se menciona que la matriz de biopelículas de *C. albicans* está compuesta predominantemente por proteínas y glucoproteínas (55%), carbohidratos (25%), lípidos (15%) y ácidos nucleicos (5%). Además se identificaron más de 500 proteínas en la matriz.

C. albicans produce biopelículas altamente estructuradas, compuestas de múltiples tipos de células (es decir, células redondas, en forma de levadura en ciernes; células pseudohifales ovales; y células de hifas cilíndricas alargadas) encerradas en una matriz extracelular. La formación de biopelículas *in vitro*, en su mayor parte, se correlaciona bien con los modelos de biopelículas *in vivo* y *ex vivo*. Las hifas en las biopelículas contribuyen a la estabilidad arquitectónica general de la biopelícula, actuando como un andamio de soporte para las células de levadura y otras hifas promoviendo el desarrollo de las biopelículas. (Nobile & Johnson., 2015).

Sin embargo *C. albicans* no es la única especie fúngica que puede formar biopelículas en un huésped mamífero. Las especies estrechamente relacionadas *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* han sido implicadas en infecciones asociadas a biopelículas. Cada una de estas especies puede formar una biopelícula *in vitro*, pero el grosor, la resistencia y la robustez en diferentes condiciones ambientales disminuyen a medida que las especies divergen filogenéticamente de *C. albicans* (Hasan et al, 2008). Adicionalmente la matriz extracelular secretada también contribuye a la resistencia de la biopelícula ante el fármaco, actuando como una barrera física para la penetración del fármaco y contribuyendo directamente a la integridad estructural general de la biopelícula (Nobile & Johnson., 2015).

Otro factor importante son las adhesinas que median la adhesión a otros microorganismos, a superficies abióticas (Mayer et al., 2013), y tienen una gran capacidad de adaptación y facilitan la unión del hongo con los epitelios del huésped.

También puede favorecer a la virulencia de *Candida* la capacidad de generar cambios en su morfología, o alterar las propiedades de la superficie celular y/o bioquímicas (García et al., 2013).

En el género *Candida*, los llamados factores de virulencia comprenden no solo la adhesión y la formación de biopelículas, sino también la capacidad de destruir los tejidos huésped, lo que puede facilitarse mediante la liberación de enzimas hidrolíticas en el entorno local. La secreción general de enzimas, como proteasas, fosfolipasas, lipasas y hemolisinas, ayudan a las levaduras a sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, pudiendo destruir el epitelio. Algunas especies no producen proteasas como lo es *C. glabrata*, en oposición al resto de las especies de *Candida* (Rodríguez et al., 2014).

Según Figueiredo et al. (2017) en las especies de *Candida*, las enzimas hidrolíticas extracelulares facilitan la nutrición, adherencia, colonización, penetración de tejidos o células, invasión, diseminación y escape de las respuestas inmunes del huésped. Además la secreción de enzimas hidrolíticas tiene la capacidad de regular la resistencia a los medicamentos antifúngicos de *Candida spp.*

Candida glabrata puede producir hemolisinas *in vitro*, produciendo lisis de eritrocitos parciales o totales. Aunque se sabe que las hemolisinas son factores de virulencia putativos que respaldan la patogenicidad en la especie *Candida*, la expresión genética de la actividad hemolítica en *C. glabrata* es poco entendida (Rodríguez et al., 2014).

Todas las especies de *Candida* poseen la capacidad de responder a las alteraciones ambientales destinadas a adaptarse a la presencia de agentes antifúngicos (Rodríguez et al., 2014). Las levaduras cuentan con un flujo de salida que modula la actividad de un gran número de antifúngicos. Este flujo de salida es constituido por proteínas de la gran superfamilia de casetes de unión a ATP, e incluyendo la glucoproteína P en el grupo MDR (resistencia a múltiples fármacos) y la MRP (proteína de resistencia a múltiples fármacos), han sido reconocidas como responsables del eflujo de salida de antibióticos (Prasad & Goffeau, 2012).

Entre los diversos mecanismos que contribuyen al fenómeno MDR, la sobreexpresión de las bombas de extrusión multidrogas de tamaño completo pertenecientes a la superfamilia ABC es la causa más frecuente de resistencia a los antifúngicos, herbicidas, medicamentos contra el cáncer y otros medicamentos. En *C. glabrata* Una gran cantidad de transportadores ABC multidrogas pertenecen a la subfamilia de proteínas Pdr. La subfamilia fúngica de la proteína Pdr comprende al menos 10 grupos filogenéticos. En la mayoría de estos grupos como el grupo A que contiene Pdr5p de *S. cerevisiae* y Cdr1p de *C. albicans* (Prasad & Goffeau, 2012).

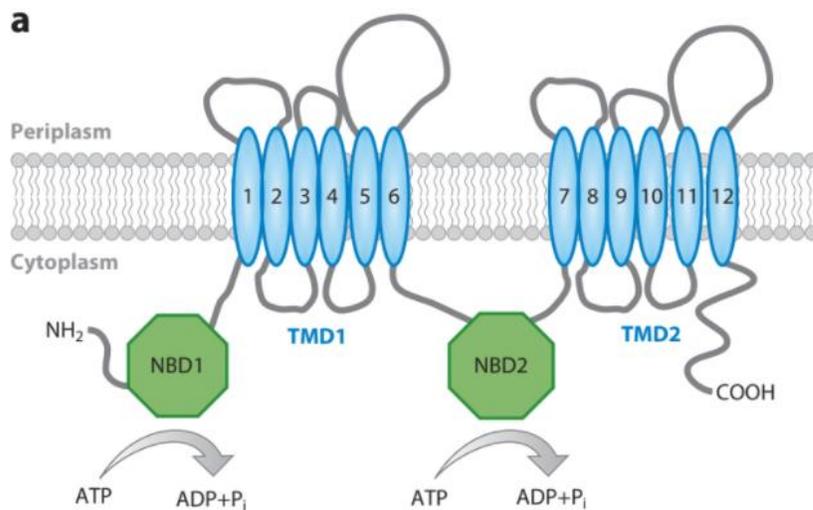


Figura 6. La topología predicha de los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) pertenecientes a la subfamilia de resistencia a fármacos pleiotrópicos. Estos transportadores tienen 12 segmentos transmembrana (TMS) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), organizados en topología inversa (NBD TMS6) 2. Los dos NBD (NBD N- y C-terminales) se muestran como octógonos. Se indican los dominios transmembrana (TMD1 y TMD2). Cada TMD consta de seis TMS. Se indican los terminales amino y carboxilo de la proteína (Prasad & Goffeau, 2012).

3.5.2 Inicio y desarrollo de la infección.

Como se mencionó anteriormente, la patogenicidad de las especies de *Candida* está mediada por una serie de factores de virulencia, incluida la adherencia y la formación de biopelículas en el tejido del huésped, la capacidad de evadir las defensas del huésped y la producción de enzimas hidrolíticas que dañan los tejidos (por ejemplo, proteasas, fosfolipasas y hemolisinas) (Silva et al., 2012).

La transición entre la colonización y la invasión de mucosas o la diseminación de la infección depende mayoritariamente de la respuesta inmunológica que sea capaz de ofrecer el huésped frente al hongo. La infección por *Candida spp.* se divide en dos grandes grupos: infección mucocutánea e invasiva (Basmaciyan et al., 2019).

El evento primario en la infección por *Candida* es la adherencia a las superficies del huésped, que se requiere para la colonización inicial. La adherencia contribuye a la persistencia del organismo dentro del huésped y se considera esencial en el establecimiento de la enfermedad. (Silva et al., 2012). En el huésped la primera línea de defensa frente a *Candida* lo constituyen los diferentes mecanismos de inmunidad innata locales a nivel de las mucosas (Garcia et al., 2013). La unión de *Candida* al huésped es seguida por la división celular, la proliferación y el posterior desarrollo de biopelículas (Silva et al., 2012).

La destrucción de los tejidos del huésped por las especies de *Candida* puede verse facilitada por la liberación de enzimas hidrolíticas en el medio ambiente local. Una vez atravesadas las barreras mucocutáneas, los neutrófilos y monocitos son las células claves en los estadios iniciales de la respuesta del huésped frente a la infección (Garcia et al., 2013).

Las especies del género *Candida* tienen mecanismos para evadir la respuesta inmunológica producida por el hospedero. *C. glabrata* y *C. albicans* tienen la capacidad de sobrevivir a la fagocitosis de los macrófagos (Tóth et al., 2014).

3.5.3 Tratamientos.

En el tratamiento de las candidemias se han perfilado tres grupos de medicamentos, usados en varias estrategias de manejo: los azoles que constituyen los medicamentos de primera elección, con el fluconazol como principal exponente y posterior itraconazol, los policétidos como la anfotericina B y el grupo de las equinocandinas con caspofungina, micofungina y anidulafungina que se caracterizan por reducir el riesgo de resistencia a los antifúngicos (Lazo et al., 2018).

Los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol al interferir con la enzima fúngica, lanosterol desmetilasa, una función clave de esta enzima es convertir el

lanosterol en ergosterol y la inhibición de este conduce al agotamiento del esteroles en la membrana celular fúngica. Esto provoca deficiencias durante la biosíntesis de la membrana plasmática (Silva et al., 2012).

Los antifúngicos de policétidos, como la anfotericina B, son fungicidas debido a su capacidad de interactuar con el componente ergosterol dentro de la membrana celular para generar poros, lo que provoca una fuga de la membrana celular que conduce a la pérdida del contenido citoplasmático. La anfotericina B es considerada el espectro más amplio de actividad antifúngica y se usa en casos de infecciones graves e invasivas por *Candida*, como en el tratamiento de infecciones sistémicas en pacientes hospitalizados (Silva et al., 2012).

El grupo de las equinocandinas se dirigen a los componentes de la pared celular, por ejemplo β -1,3- D- glucano, un componente clave de la pared celular fúngica que no está presente dentro de las células de mamíferos. La interferencia con la enzima β -1,3- D- glucano sintetasa puede inhibir la síntesis de β -1,3- D- glucano (Mesa et al., 2012).

Otro antifúngicos utilizado es la 5-flucitosina que ingresa a la célula fúngica a través de una permeasa de citosina y luego el hongo lo convierte en 5-fluorurucilo. Este análogo de nucleosido se incorpora a las moléculas de ARN y posteriormente interfiere con la síntesis de proteínas dentro de la célula fúngica provocando la muerte de esta (Silva et al., 2012).

3.5.4 Problemas más comunes en el tratamiento de las candidemias.

Un gran problema que se está presentando en el manejo de las candidemias es el desarrollo de resistencia a los antifúngicos. El uso repetitivo y prolongado de azoles sin justificación terapéutica es una práctica que debe evitarse, ya que ha sido uno de los motivos generadores de dicha resistencia (Lazo et al., 2018).

La resistencia a la anfotericina B es poco frecuente durante el tratamiento, pero los informes de aislamiento que muestran una concentración mínima inhibitoria (CIM) elevada se han vuelto más frecuentes. Se cree que la resistencia a los policétidos es el resultado de la alteración del contenido o composición de esteroides

en la membrana celular resultado de una mutación en el gen ERG3, (Silva et al., 2012).

El desarrollo de los antifúngicos azólicos mejoró las opciones de tratamiento para las infecciones por hongos y su reducida toxicidad en el huésped ha llevado a su uso generalizado. En consecuencia, con este uso extenso, se ha encontrado resistencia a estos agentes, particularmente fluconazol. La resistencia a los azoles puede ser el resultado de mutaciones puntuales en ERG11, estas mutaciones conducen a sustituciones de aminoácidos que alteran la estructura de la proteína y hacen que la unión de los azoles sea menos eficiente (Silva et al., 2012; Berkow & Lockhart, 2017).

Otro mecanismo primario por el cual las especies de *Candida* resisten los efectos de los antifúngicos azólicos implica el flujo de salida activo del medicamento fuera de la célula mediante la activación de dos tipos de proteínas de transporte de flujo de salida codificadas por genes MDR o CDR. La característica más importante de *Candida* es la formación de biopelículas por su papel en el aumento de la tolerancia ante la terapia antifúngica convencional (Silva et al., 2012).

Un estudio realizado por Lockhart et al. (2017). Donde se llevaron a cabo 54 aislamientos de *Candida auris* a partir de muestras de sangre, orina, tejidos blando y otros sitios de pacientes hospitalizados de Pakistán, India, Sudafrica y Venezuela se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicótica donde se obtuvieron los siguientes resultados: 50 aislamientos (93%) fueron resistentes al fluconazol, 29 (54%) al voriconazol, 19 (35%) a la anfotericina B, 4 (7%) a equinocandinas y 3 (6%) fueron resistentes a la flucitosina. Este estudio demostró la alta capacidad de resistencia ante múltiples fármacos como los azoles y una alta distribución a nivel geográfico. Adicionalmente, En los EE. UU., *C. albicans* tiene una baja incidencia de resistencia al fluconazol, aproximadamente 0.5 a 2%. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, por otro lado, tienen tasas más altas en 4–9%, 2–6% y 11–13%, respectivamente (Berkow & Lockhart., 2017).

Como se ha visto, la resistencia a fármacos es variable entre especies, incluso entre cepas de la misma especie del género *Candida*. Por lo que la

identificación correcta de la especie es de suma importancia para tomar una decisión acertada en el tratamiento.

3.6 Métodos de detección.

Las infecciones causadas por *Candida* están asociadas con una alta mortalidad y un exceso en costos de hospitalización. La mortalidad atribuible varía de 11% a más del 47%, dependiendo del tiempo hasta el inicio de la terapia antimicótica, aumentando en más de 10% por día de retraso en el tratamiento desde el momento del inicio sospechoso. La identificación temprana de la candidemia y la administración oportuna de la terapia antimicótica adecuada es fundamental para mejorar los resultados (Bilir et al., 2015).

Para los pacientes candidemicos, la terapia específica de especie se administra solo después de que los diagnósticos basados en hemocultivo aíslen un patógeno y lo identifiquen mediante métodos canónicos, y esto puede tomar al menos entre 4 a 7 días debido al lento crecimiento de *Candida*, aumentando la mortalidad y los costos (Bilir et al., 2015).

La candidemia y otras formas de candidiasis invasivas representan un desafío significativo para el diagnóstico. Para proporcionar el mejor tratamiento, es importante identificar la especie. Históricamente, el diagnóstico de infección por *Candida* dependía de tres enfoques clásicos de laboratorio: microbiológico, inmunológico e histopatológico; y ahora incluye nuevos métodos, como técnicas radiográficas, métodos moleculares, proteómicos y bioquímicos (Pfaller et al., 2016).

3.6.1 Métodos de identificación más utilizados

Hemocultivo

El cultivo de sangre es el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo causado por bacterias y hongos. (Menchinelli et al., 2019). Sin embargo, se necesitan al menos 24 horas para obtener el crecimiento de las muestras clínicas, y otras 24 horas adicionales para la caracterización de aislados

en pasos subsecuentes. Además, cuenta con baja sensibilidad (40%) (Martínez-Garnica et al., 2015).

ELISA

Los métodos inmunológicos son una herramienta de gran valor que se basan en la detección de antígenos o anticuerpos a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en látex o de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Guilarte & Pardi, 2009). Los parámetros de diagnóstico muestran una alta especificidad diagnóstica para ELISA del 97% y una sensibilidad del 83%. Sin embargo esta técnica puede dar reacción cruzada entre patógenos filogenéticamente cercanos (Moudni et al., 1998).

Existen otras variaciones de ensayos inmunológicos como Inmunoensayo enzimático (EIA), ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA), ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo de inyección de flujo, los cuales requieren menos tiempo de operación (Alahi & Mukhopadhyay, 2017).

MALDI-TOF

El método que emplea el espectrómetro de masas MALDI-TOF identifica rápidamente organismos después del aislamiento de muestras de las especies bacterianas y de levadura. La integración de MALDI-TOF en el flujo de trabajo de microbiología clínica disminuye el tiempo de identificación del organismo en 1.2-1.5 días en comparación con los métodos convencionales. Sin embargo se requiere que el patógeno sea aislado y además el perfil del espectro de masas de los componentes de la membrana plasmática (Huang et al., 2013). Además, la adquisición de estos instrumentos puede tener un costo restrictivo para laboratorios de recursos limitados (Kothari et al., 2014).

Hibridación “in situ” fluorescente (FISH)

La hibridación fluorescente in situ es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos preservados mediante el empleo de una sonda marcada con un fluorocromo, la cual va dirigida hacia un lugar específico del cromosoma y que emite fluorescencia que puede ser observada por medio de un microscopio. (Martínez & Otero, 2013). FISH es robusto, fácil de realizar y considerablemente rápido, con un tiempo de resultado de alrededor de 5 horas. Además, tiene la capacidad de identificar los hongos directamente en las muestras biológicas y no requiere subcultivos (Da Silva et al., 2015).

La exactitud y confiabilidad de los resultados obtenidos por FISH depende de lo específica que sea la sonda de oligonucleótidos. El diseño, así como la evaluación exhaustiva de nuevas sondas, son pasos críticos. A pesar de que la sonda haya sido bien diseñada y probada se puede presentar la unión a microorganismos que no se hayan descrito hasta el momento (Martínez & Otero, 2013).

Métodos moleculares basados en ADN

Los métodos basados en ADN como: PCR, qPCR, PCR-multiplex, y biosensores son muy rápidos, son fáciles de implementar y no requieren de personal técnico muy capacitado para su manipulación. Y a pesar de que algunos de ellos son muy sensibles, todos ellos requieren que el diseño de los oligonucleótidos sea altamente específico para incrementar la exactitud y confiabilidad, y evitar falsos positivos. Por lo tanto para que estos métodos de identificación de patógenos sean muy eficientes, rápidos, sensibles y sobre todo específicos, es necesario crear una herramienta bioinformática que permita diseñar esos oligonucleótidos especie-específicos que le van a dar la exactitud y confiabilidad.

3.7 Recursos bioinformáticos

En la actualidad, el uso de ordenadores en el quehacer científico ha ido en incremento. Siendo éstos de mucha utilidad para realizar investigaciones, analizar datos y contestar incógnitas en muchas disciplinas. La biotecnología es una

disciplina de la biología que se ha aprovechado del uso de los ordenadores y la bioinformática para el desarrollo tecnológico y del conocimiento. La bioinformática es una rama multidisciplinaria de la biología, bioquímica, matemáticas, estadística y ciencias computacionales o informáticas que tiene como objetivo el desarrollo y empleo de herramientas computacionales destinadas al análisis masivo de datos biológicos de diversos tipos para contestar preguntas en el área de la biología y todas sus disciplinas (de Carvalho et al., 2019).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva de nueva y tercera generación, se han recopilado una cantidad inimaginablemente grande de datos; dichos datos se ordenan en bases de datos que se encuentran almacenadas en repositorios. Un repositorio muy reconocido en la actualidad es el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) que es un sistema centralizado de recolección y ordenamiento de la información obtenida a partir de experimentos científicos del área de la biología para ofrecérsela al público de manera gratuita y comprensiva (Wheeler et al., 2007).

El NCBI cuenta con una gama amplia de bases de datos como las que contienen información sobre taxonomía, hasta aquellas que contienen las secuencia de nucleótidos de genomas completos de muchas especies de diferentes reinos. Toda esta información es de mucha relevancia para el diseño de oligonucleótidos específicos para un patógeno dado ya que podemos realizar un análisis de discriminación de aquellas secuencias del genoma del patógeno que son similares a alguna subsecuencia de microorganismos pertenecientes a otras especies (Wheeler et al., 2007).

Para lograr este objetivo contamos con una herramienta bioinformática que permite realizar este tipo de análisis de manera automática y sistemática. Dicha herramienta se desarrolló en el área de Bioinformática del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en colaboración con la división de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT). Esa herramienta se llama “BESTur” (<https://www.github.com/exsevier/bestur>).

3.8 BESTur: Herramienta de búsqueda potenciada por BLAST.

BESTur es una implementación en tubería de comandos que en un primer proceso fracciona el genoma del patógeno (por ejemplo, *C. glabrata*) en fragmentos de tamaño determinado y a cada cierta distancia entre cada fragmento. Estos parámetros los llamamos tamaño de ventana y tamaño de salto (Figura 7). Para realizar el análisis de discriminación de secuencias similares, BESTur prepara y formatea una base de datos con las secuencias de genomas completos de microorganismos de diferentes especies y que no contiene el genoma del patógeno en cuestión.

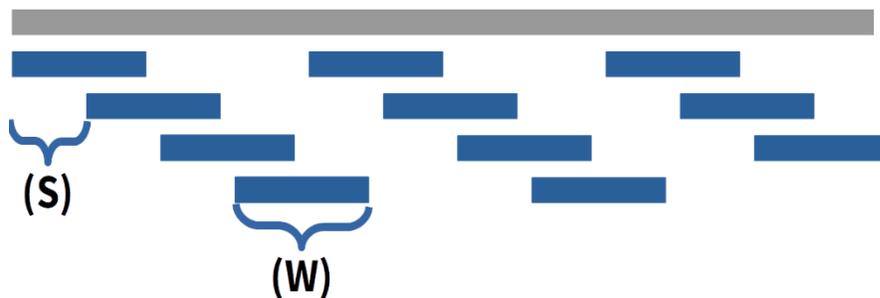


Figura 7. Descripción gráfica del proceso de fragmentado del genoma consulta. La barra gris representa una región del genoma consulta, y las barras cortas de color azul son los fragmentos obtenidos después del corte. (S) es el tamaño del salto, que es el número de nucleótidos que BESTur salta entre cortes. (W) es el tamaño de la ventana, que es el número de nucleótidos del fragmento obtenido.

Después BESTur realiza una búsqueda por BLASTn (Altschul et al., 1990) utilizando diversos parámetros de corte como (% identidad, % de cobertura HSP de la secuencia consulta, y el valor esperado (e-value), toma como secuencia consulta cada fragmento generado a partir del genoma del patógeno y lo compara con el primer genoma seleccionado de la base de datos. BESTur selecciona todos los fragmentos del genoma que dieron la mejor puntuación en su alineamiento con alguna subsecuencia del genoma de la base de datos, tomando en cuenta los parámetros de corte.

Figura 9. Descripción gráfica de los parámetros de ensamble. número de fragmentos mínimos por ensamble (**MFPT**) y número de nucleótidos máximo para considerar ambos fragmentos dentro de un ensamble (**OR**). En la parte superior se muestra una región del genoma consulta así como una regla que muestra el tamaño de la región. A bajo se muestran los fragmentos consulta mapeados en esa región.

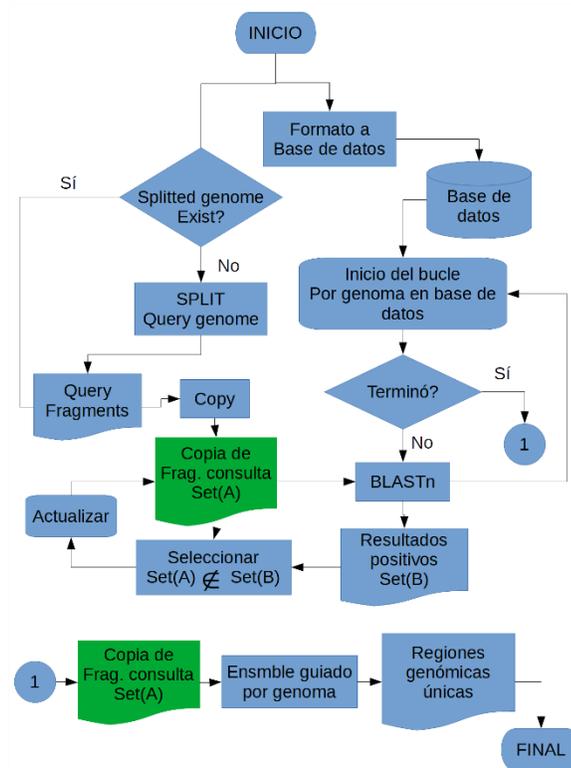


Figura 10. Diagrama de flujo de la tubería de comandos de BESTur.

3.9 Parámetros de corte en la búsqueda con BLAST.

BLASTn utiliza diversos parámetros en sus búsquedas. Nosotros utilizamos para modular la búsqueda tres parámetros que miden la similitud entre la secuencia consulta y alguna región del genoma de la base de datos. Estos son el porcentaje de identidad, el porcentaje de la cobertura HSP de la secuencia consulta y el valor esperado (e-value).

El porcentaje de identidad es el porcentaje de nucleótidos de la secuencia consulta que son idénticos a alguna secuencia del genoma de la base de datos que

generó un segmento pareado de alto puntaje. El porcentaje de la cobertura HSP de la secuencia consulta se refiere al porcentaje de la secuencia consulta que generó un segmento pareado de alta puntuación entre la secuencia consulta y alguna secuencia del genoma de la base de datos. El e-value es un valor que está relacionado con el score, el tamaño de la base de datos y el tamaño de la secuencia consulta.

IV. Materiales y métodos

4.1 Descarga de la base de datos de secuencias

Las secuencias de ADN de diversas levaduras pertenecientes al género *Candida* (Tabla 1) se descargaron del repositorio del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). La descarga se logró con las herramientas “eutils” y “edirect” proporcionadas por el mismo NCBI. El formato de archivos que seleccionamos para almacenar la base de datos fue FASTA.

Tabla 1. Levaduras de interés médico del género Candida.

Nombre científico	No. acceso (GenBank)
<i>Candida glabrata</i>	GCA_000002545.2
<i>Candida albicans</i>	GCA_000182965.3
<i>Candida orthopsilosis</i>	GCA_000315875.1
<i>Candida parapsilosis</i>	GCA_000182765.2
<i>Candida tropicalis</i>	GCA_000006335.3
<i>Candida guilliermondii</i>	GCA_000149425.1
<i>Candida auris</i>	GCA_002775015.1
<i>Candida krusei</i>	GCA_003054445.1
<i>Candida pseudohaemulonii</i>	GCA_002933435.1
<i>Candida haemulonii</i>	GCA_002926055.1
<i>Candida duobushaemulonii</i>	GCA_002926085.1

4.2 Identificación de regiones únicas en el genoma de *Candida glabrata*

Se preparó una base de datos solo con las secuencias del genoma de casi todas las especies de *Candidas* de interés médico que se muestran en la (Tabla 1), excepto la de *C. glabrata*. La base de datos fue formateada para ser sometida a análisis usando la tubería de comandos BESTur; un programa de computadora desarrollado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en colaboración con

el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. para identificar regiones únicas en el genoma de la levadura *C. glabrata*. La identificación de esas regiones únicas se logró mediante un proceso sistemático exhaustivo de comparación entre el genoma de *C. glabrata* y la base de datos.

Para evaluar el funcionamiento de la herramienta BESTur y seleccionar los parámetros óptimos de búsqueda, decidimos variar los valores del porcentaje de identidad (10%, 30%, 50%, 60%, 65% y 70%) y porcentaje de cobertura HSP de la secuencia consulta (20% y 40%). Los parámetros adicionales que utilizamos los mantuvimos constantes durante todos los análisis: tamaño de la ventana 500 nucleótidos, tamaño del salto 250 nucleótidos, e-value 10, número de fragmentos mínimos por fragmento ensamblado 5, y radio de sobreempalme 50 nucleótidos. Utilizamos las siguientes puntuaciones para el alineamiento: recompensa por un buen apareamiento entre nucleótidos 1, penalización por mal apareamiento de nucleótidos -1, penalización por existencia de espacios 0, y penalización por extensión del espacio -1. El algoritmo utilizado de búsqueda fue BLASTn.

Los resultados fueron analizados con el objetivo de encontrar los valores de corte para los parámetros evaluados. Las regiones únicas identificadas fueron visualizadas en el visor “Integrative Genomic Viewer” (IGV) de “Broad Institute” (Robinson et al., 2011). Las mejores predicciones de regiones únicas que seleccionamos fueron aquellas que tuvieron suficiente apoyo con fragmentos del genoma consulta retenidos y mapeados en dicha región así como sintenia conservada en regiones aledañas a la región única.

Las regiones únicas ensambladas fueron extraídas de la secuencia del genoma y almacenadas en un archivo en formato FASTA para su posterior uso en el diseño de los cebadores de PCR.

4.3 Diseño de los oligonucleótidos cebadores de PCR

El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando como molde las regiones únicas identificadas con BESTur en el genoma de *C. glabrata*. Estas secuencias se analizaron con el programa Primer3_core (Untergasser et al., 2012

<https://www.github.com/primer3-org/primer3>) y se configuraron parámetros de calidad para el diseño óptimo de los oligonucleótidos:

- 1) Tamaño 16 – 18 nucleótidos.
- 2) Porcentaje de GC 50% - 60%.
- 3) Temperatura de fusión 55% - 60%.
- 4) Evitar heterodímeros y homodímeros.
- 5) Evitar la formación de estructuras secundarias estables.

Primer3_core regresa una lista con los diseños de los pares de oligonucleótidos con una calificación asociada. Entre más cercana a 0 es la calificación más óptimo es el diseño de los cebadores. Por lo que ordenamos los pares de oligonucleótidos de la calificación mínima a la calificación máxima y nos quedamos con el primer par de cebadores.

4.4 Extracción del material genético de las levaduras.

Extrajimos el ADN genómico de las levaduras *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliemondii* mediante el protocolo que se describe a continuación.

Crecimos las cepas a 30 °C en 5mL de medio YPD líquido, centrifugamos a 3,500 rpm por 5 min para recuperar el pelet. Resuspendimos el pelet en 500 µl de Buffer A con detergente, con ayuda de vortex. Transferimos a tubos eppendorf y agregamos 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Agitamos vigorosamente con ayuda de vortex e Incubamos en un bloque a 44 °C por 30 min. Centrifugamos a 13,000 rpm por 5 min y tomamos la fase acuosa (aprox. 450 µl) y la transferimos a tubos eppendorf de 1mL, agregamos 50 µl de Buffer A sin detergente (No Triton, No SDS) +0.3 µl de RNAasa cóctel y agitamos suavemente.

Incubamos en un bloque a 30 °C por 30 min, y centrifugamos a 14,000 rpm por 5 min. Transferimos el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1mL y agregamos 15 µl de 1M de Acetato de sodio. Adicionamos 1 mL de etanol helado al 100% y

mezclamos gentilmente. Centrifugamos a 13,000 rpm por 2 min, después desecharmos el sobrenadante y adicionamos 1mL de Etanol al 70% y mezclamos gentilmente. Centrifugamos a 13,000 rpm por 1 min y repetimos el paso del lavado con etanol al 70% dos veces. Después desecharmos el sobrenadante y centrifugamos por 30 seg. Dejamos secar los pelets a temperatura ambiente por 15 min y después resuspendimos en 50 µl de solución TE.

Soluciones empleadas.

1) Buffer A:

- Tris 50mM (0.05M)
- EDTA 10mM (0.01M)
- Acetato de sodio 150 mM (0.15M)
- Triton 1 %
- SDS 1%
- Agua Mili Q cbp

2) TE

- Tris 10mM
- EDTA 0.1mM
- Agua Mili Q cbp

De las muestras de ADN obtenidas tomamos una alícuota de 5 µl y las cargamos en los pozos del gel de agarosa al 1% y corrimos una sesión de electroforesis. Después teñimos el gel con bromuro de etidio y lo revelamos en el fotodocumentador con luz ultravioleta.

4.5 Prueba de selectividad de los oligonucleótidos cebadores de PCR.

Se tomaron alícuotas de las muestras de ADN genómico que extrajimos de las levaduras antes mencionadas para realizar reacciones de PCR con muestras que contenían ADN genómico en concentraciones equimolares. Para realizar este

experimento, primero preparamos dos mezclas de ADN genómico, en la primera, mezclamos alícuotas de 2 µl de todas las muestras de ADN genómico, y en la segunda mezcla que preparamos agregamos alícuotas de 2 µl de casi todas las muestras de ADN genómico excepto la que proviene de *C. glabrata*.

A partir de las mezclas de ADN genómicos tomamos una alícuota de 1 µl para realizar la amplificación por medio de la reacción de PCR con los oligonucleótidos cebadores específicos de *C. glabrata*.

La reacción de PCR la hicimos como sigue: Se empleó una mezcla maestra en la que contenía la mayoría de los reactivos (Green GoTaq PCR Mix). La solución de reacción final fue: amortiguador 1X, cloruro de magnesio 1.5mM, mezcla de dNTPs 1mM, cebador-1 0.5 µM, cebador-2 0.5 µM, GoTaq Polimerasa 1U, Para llevar al volumen final la solución de reacción se utilizó agua miliQ estéril.

El programa de PCR fue como se indica a continuación: desnaturalización inicial de 94°C x 5 min., después 35 ciclos (94°C x 25 seg.; 59°C x 25 seg.; 72°C x 30s) y una extensión final de 72°C x 10 min. Los amplicones obtenidos se visualizaron en fotodocumentador después de haberse sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

V. Justificación

Las infecciones por hongos se han convertido en un problema de salud pública de gran importancia. Las distintas especies de *Candida* se consideran entre los patógenos fúngicos humanos más comunes y son responsables de infecciones tanto superficiales (mucosas y cutáneas) como sistémicas (Turner & Butler, 2014). La candidemia tiene una mortalidad atribuible del 15 al 35% para adultos y del 10 al 15% para los recién nacidos. La tasa de mortalidad está claramente correlacionada con un retraso en el inicio del tratamiento antimicótico apropiado, debido a la mala identificación de especie (Guinea, 2014).

Las enfermedades causadas por *Candida* son diagnosticadas por diferentes métodos, desde los canónicos (generalmente hemocultivo), aquellos basados en inmunología, hasta los de biología molecular; no obstante, el diagnóstico sigue siendo un desafío, de hecho, la mitad de todos los casos de infecciones por *Candida* pasan desapercibidos en los hemocultivos. Estos métodos varían de sensibilidad, especificidad y costos (Martínez-Garnica et al., 2015; Menchinelli et al., 2019).

Los basados en biología molecular como la PCR son útiles en el diagnóstico, aunque su sensibilidad y especificidad depende del diseño del primer. Es por ello que en el presente trabajo aprovechando el potencial de la PCR se diseñó una herramienta bioinformática que se acopla a esta técnica para el diseño de cebadores específicos que contribuirá a la identificación específica de especie para un posterior tratamiento correcto.

VI. Hipótesis.

Los oligonucleótidos cebadores diseñados en las regiones únicas del genoma de *Candida glabrata*, identificadas previamente con la herramienta bioinformática BESTur, van a ser muy específicos y nos van a permitir detectar, de manera selectiva, a esta levadura patógena por medio de la técnica de PCR, incluso en una muestra en donde están presentes los ADN genómicos de otras especies de levaduras.

VII. Objetivos

7.1 Objetivo general

Diseñar oligonucleótidos cebadores especie-específicos para *Candida glabrata* con la herramienta bioinformática BESTur, y desarrollar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) altamente específica para identificar dicha levadura patógena en muestras biológicas que contengan la presencia de ADN genómico de otras levaduras filogenéticamente cercanas.

7.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto que tienen los parámetros porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura HSP sobre el porcentaje de fragmentos del genoma consulta retenidos.
2. Evaluar el efecto que tienen los parámetros porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura HSP sobre el número de fragmentos ensamblados y las características del ensamble.
3. Visualizar y seleccionar las regiones únicas del genoma de *Candida glabrata* y diseñar los oligonucleótidos cebadores especie-específicos para esa levadura.
4. Probar experimentalmente la especificidad de los oligonucleótidos cebadores especie-específicos diseñados para *Candida glabrata*.

VIII. Resultados y discusión

8.1 Evaluación de los parámetros porcentaje de identidad y de cobertura HSP sobre el porcentaje de fragmentos retenidos del genoma consulta.

Después de escribir y depurar la tubería de comandos, la sometimos a prueba y ejecutamos varias corridas en un ordenador HP con procesador x86 Ryzen 3 de 3.1GHz en donde utilizamos 2 núcleos y 9 GB de memoria RAM. En este análisis utilizamos al genoma de la levadura *C. glabrata* como genoma consulta y éste lo comparamos con varios genomas de 10 especies diferentes de levaduras filogenéticamente cercanas (ver Tabla 1). En cada ejecución de la tubería de comandos, probamos diferentes valores de porcentaje de identidad (10%, 30%, 50%, 60%, 65% y 70%) y diferentes valores de porcentaje de cobertura HSP del fragmento consulta (20% y 40%). Estos valores nos permitieron evaluar la similitud entre un fragmento del genoma consulta y los genomas de la base de datos y eliminar aquellas secuencias similares.

Al incrementar el porcentaje de identidad observamos una tendencia de incremento de los fragmentos del genoma consulta que no fueron eliminados después de ser comparados con los genomas de la base de datos. La diferencia del porcentaje de fragmentos retenidos es notoria entre los resultados obtenidos con 20% y 40% de porcentaje de cobertura HSP. De manera individual por cada porcentaje de identidad analizado, siempre observamos mayor porcentaje de fragmentos del genoma consulta retenidos cuando ejecutamos la tubería con un 40% de porcentaje de cobertura HSP en comparación cuando usamos un 20%.

El porcentaje de fragmentos del genoma consulta retenidos en el análisis en donde usamos 20% de cobertura HSP y a lo largo de los porcentajes de identidad analizados, varía entre un 3% y un valor cercano al 50%. Cuando utilizamos un 40% de cobertura HSP en el análisis observamos que el porcentaje de fragmentos del genoma consulta retenidos varía entre el 20% y un valor cercano al 60% (Figura 11).

Los resultados que obtuvimos fueron esperados ya que al utilizar parámetros de corte muy rigurosos como porcentajes muy altos de identidad y cobertura HSP debemos de esperar que un porcentaje muy pequeño de fragmentos del genoma consulta sean muy similares con alguna subsecuencia de algún genoma de la base de datos, y que por lo tanto sean eliminados, de esta forma el porcentaje de esos fragmentos retenidos será mayor en el escenario riguroso comparado con un escenario menos riguroso donde se utilizan porcentajes muy bajos de identidad y cobertura HSP como parámetros.

8.2 Evaluación del efecto de los parámetros porcentaje de identidad y de cobertura HSP sobre el número de fragmentos ensamblados y las características del ensamble.

De los resultados que obtuvimos de las ejecuciones de la tubería de comandos BESTur en donde variamos los parámetros de porcentajes de identidad y cobertura HSP medimos como respuesta el número de regiones ensambladas a partir de los fragmentos del genoma consulta retenidos, el tamaño obtenido de las regiones ensambladas, el tamaño máximo obtenido por cada corrida BESTur y el estadístico N50. Y evaluamos si los parámetros antes mencionados tienen un efecto sobre estas medidas.

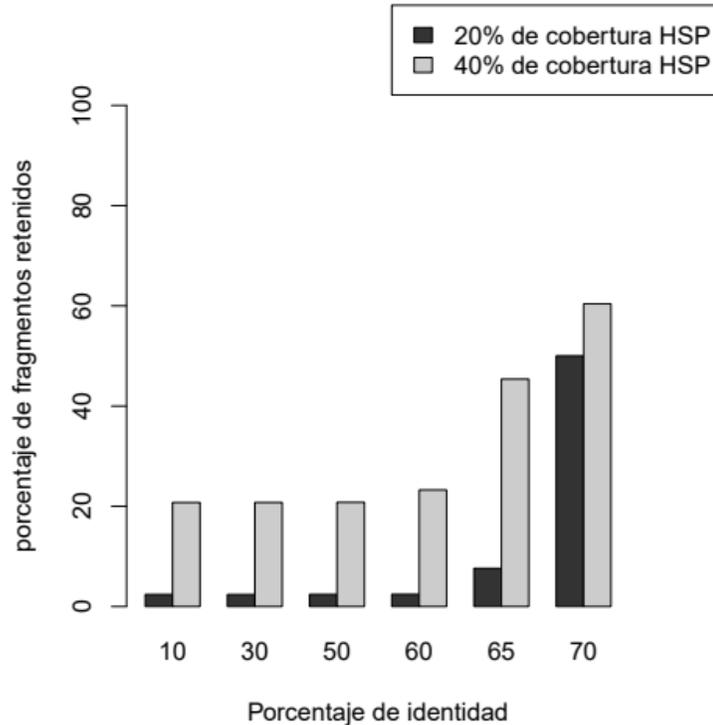


Figura 11. Porcentaje de fragmentos retenidos. Al incrementar el porcentaje de identidad, se incrementa la cantidad de fragmentos retenidos. En el eje de las abscisas se muestra el porcentaje de identidad evaluado y en el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de fragmentos del genoma consulta que fueron retenidos. Las barras grises representan los resultados obtenidos cuando utilizamos 40% de porcentaje de cobertura HSP y las barras negras muestran los resultados para un 20% de porcentaje de cobertura HSP.

Observamos que al incrementar el porcentaje de identidad se incrementa el número de fragmentos ensamblados. En el caso donde utilizamos el 20% de cobertura HSP se observa un incremento continuo, sin embargo, cuando ejecutamos el programa BESTur con 40% de cobertura HSP, el número de fragmentos ensamblados tiende a saturarse, incluso se llega a apreciar una pequeña disminución del número de fragmentos ensamblados (Figura 12). Respecto a los tamaños de los fragmentos ensamblados obtenidos, éstos también muestran un incremento que tiende a ser exponencial conforme se incrementa el porcentaje de identidad. Esto se puede observar en la (Figura 13), en donde el gráfico de cajas muestra la distribución de los tamaños obtenidos por cada valor de los parámetros evaluados (porcentajes de identidad y de cobertura HSP). De

manera general, observamos que los tamaños de los fragmentos ensamblados obtenidos cuando utilizamos un porcentaje de cobertura HSP de 40% en el análisis BESTur son más grandes que los que obtuvimos con un 20% de cobertura.

Estos resultados que hemos obtenido hasta el momento son esperados, ya que al incrementar la rigurosidad de los parámetros de BESTur (mayor porcentaje de identidad y de cobertura HSP), se obtiene un mayor porcentaje de fragmentos retenidos del genoma consulta por lo que se pueden ensamblar más fragmentos del genoma y de un tamaño mayor porque existe una mayor cobertura del genoma consulta. Por lo tanto, debe de haber una correlación lineal entre el logaritmo base 10 del tamaño máximo obtenido y el estadístico N50.

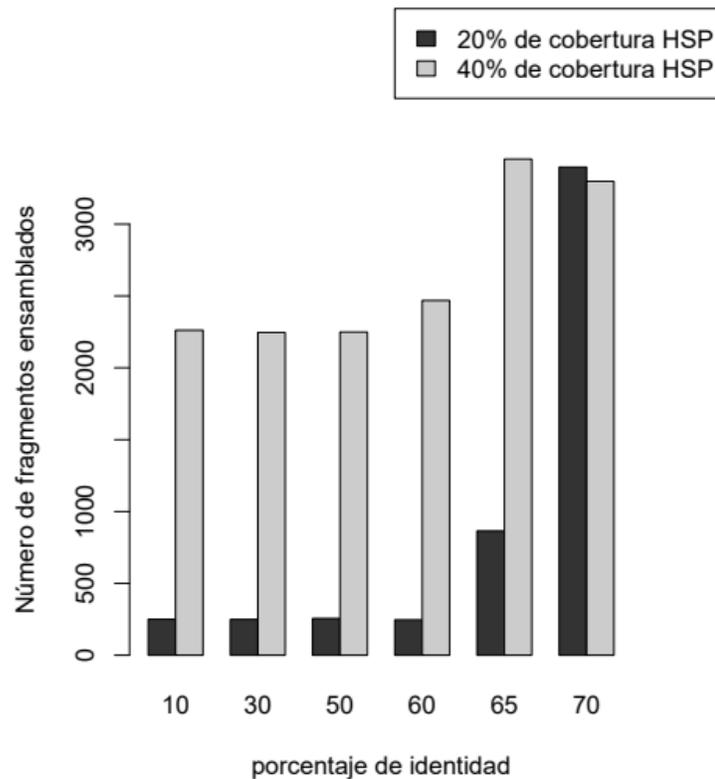


Figura 12. Número de fragmentos ensamblados. Resultados del proceso de ensamblaje de los fragmentos retenidos del genoma consulta. En el eje de las abscisas se muestran los porcentajes de identidad y en el eje de las ordenadas se muestra el número de fragmentos ensamblados.

En la (Figura 14) graficamos el logaritmo base 10 del tamaño máximo obtenido y el estadístico N50 por cada ejecución del programa BESTur en función

del número de fragmentos retenidos del genoma consulta, y podemos observar que hay una correlación lineal entre estas variables como esperábamos. Si incrementamos hasta el máximo los valores de estos parámetros evaluados (100% identidad y 100% cobertura HSP) deberíamos esperar una máxima cantidad de fragmentos retenidos y por lo tanto una cobertura casi total del genoma, y por lo tanto deberíamos ensamblar el total de cromosomas del genoma consulta y eso debería reflejarse en una disminución en el número de fragmentos ensamblados pero un incremento en el tamaño promedio o máximo de los ensamblados así como el estadístico N50.

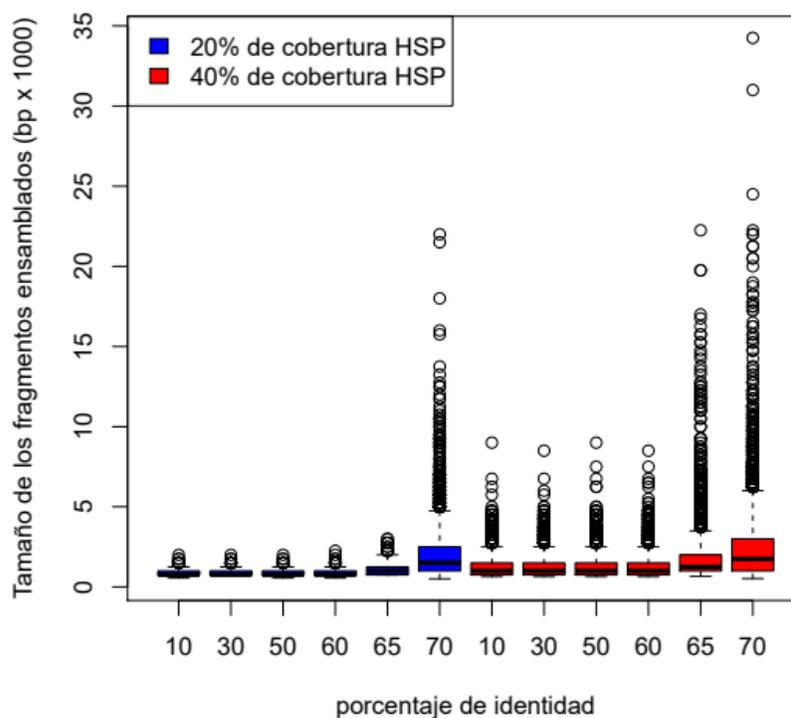


Figura 13. Tamaño de los fragmentos ensamblados. Incremento en los porcentajes de identidad y cobertura HSP correlaciona con el incremento de los tamaños de los fragmentos ensamblados. Las cajas muestran la distribución de los tamaños de los fragmentos ensamblados.

En la (Figura 15) graficamos el número de fragmentos ensamblados en función del número de fragmentos del genoma consulta y observamos que no existe una correlación lineal entre ellos. Lo que observamos fue que al incrementar el número de fragmentos retenidos del genoma consulta, hay un incremento inicial del

número de fragmentos ensamblados, pero después este incremento tiende a disminuir.

Seleccionamos, para los análisis subsecuentes, los fragmentos ensamblados obtenidos de la ejecución de la tubería de comandos BESTur en donde asignamos los valores de 60% de identidad y ambos valores de 20% y 40% del parámetro porcentaje de cobertura HSP, ya que estos resultados no varían drásticamente al compararlos con los resultados donde asignamos valores menores de los parámetros probados.

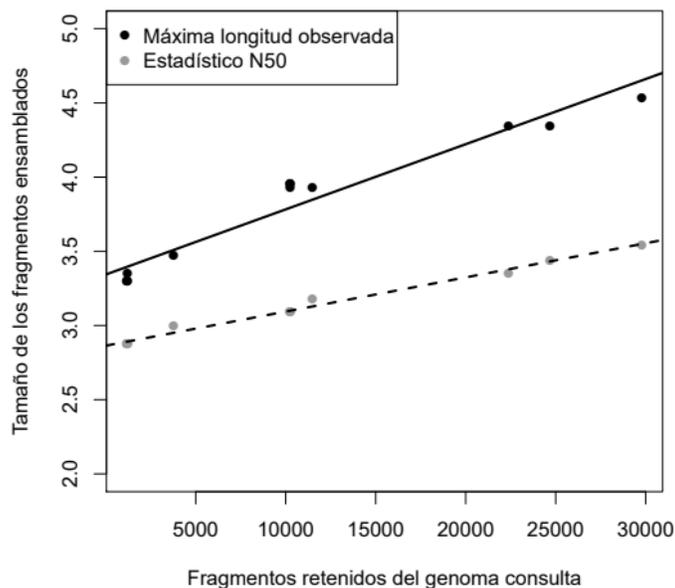


Figura 14. Correlación lineal entre el tamaño de fragmento máximo obtenido y el estadístico N50 con el número de fragmentos retenidos del genoma consulta. El tamaño de los fragmentos está dado en logaritmo base 10.

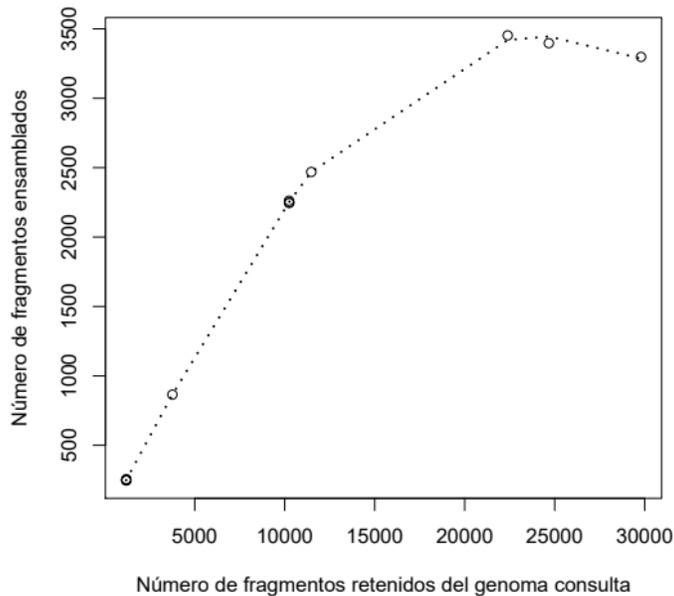


Figura 15. La correlación entre el número de fragmentos ensamblados y el número de fragmentos retenidos no es lineal. El número de fragmentos ensamblados se satura y disminuye después de 25000 fragmentos retenidos del genoma consulta. La correlación entre ambas variables no es lineal.

8.3. Visualización y selección de las regiones únicas.

Los fragmentos retenidos del genoma consulta son ensamblados mediante un proceso guiado por genoma de referencia (el mismo genoma de donde provienen los fragmentos retenidos). Los fragmentos retenidos contiguos que se superponen son ensamblados en fragmentos más grandes y esos fragmentos son mapeados en el genoma de referencia. Esas regiones del genoma en donde se alinean los fragmentos ensamblados las vamos a llamar de ahora en adelante como las regiones únicas identificadas en el genoma de *C. glabrata* (microorganismo de interés).

Cuando ejecutamos la tubería de comandos BESTur con el valor de 20% para el parámetro cobertura HSP y 60% para el parámetro porcentaje de identidad obtuvimos 1,202 fragmentos retenidos de 49,332 fragmentos totales del genoma consulta, esto representa aproximadamente el 2.44% de los fragmentos totales. Con estos fragmentos retenidos obtuvimos un total de 246 fragmentos

ensamblados. Cuando corrimos la tubería de comandos con un valor de 40% para la cobertura HSP y el mismo valor para el parámetro porcentaje de identidad obtuvimos el 23.26% de fragmentos retenidos a partir del total de fragmentos del genoma consulta, esto representa un total de 11,475 fragmentos retenidos. Con estos fragmentos retenidos obtuvimos 2,469 fragmentos ensamblados.

Mapeamos todos los fragmentos ensamblados en el genoma de referencia (genoma de *C. glabrata*), y en la (Figura 16) mostramos el resultado de manera gráfica del mapeo en el cromosoma H de *C. glabrata*. Como es de esperarse, existe una mayor cantidad de fragmentos ensamblados mapeados en el cromosoma H del genoma de referencia cuando utilizamos 40% de cobertura HSP en comparación con los resultados obtenidos con 20% de cobertura HSP. Es importante hacer notar que una gran mayoría de fragmentos ensamblados los localizamos en las regiones intergénicas del genoma.

Al visualizar los resultados obtenidos hasta ese momento nos percatamos que algunos fragmentos ensamblados los localizamos en regiones del genoma con muy poca representación génica, dicho de otra manera regiones que carecen de genes anotados o predichos. Eso nos llamó la atención debido a que regiones genómicas con esas características pueden ser producto de errores en la secuenciación o en el ensamble del genoma consulta; a estos errores se le conoce como artefactos. Estos errores pueden afectar los resultados de un análisis por medio de la tubería de comandos BESTur, ya que existe una alta probabilidad de que esas secuencias artefacto sean muy disimilares con los genomas de la base de datos que utilizamos para identificar las regiones únicas, por lo que decidimos realizar un proceso de selección de regiones únicas.

Para lograr esa selección evaluamos algunas características del ensamble y el mapeo, estas características son: 1) Si existen fragmentos ensamblados mapeados al genoma de referencia tanto en la corrida de la tubería de comandos con el valor de 20% y 40% del parámetro cobertura HSP, 2) el tamaño del fragmento ensamblado y mapeado: entre más grande sea el fragmento mayor puntuación obtiene la región única identificada. 3) que el fragmento ensamblado sea localizado

y se expanda sobre una región que contenga genes anotados y que además tenga representantes ortólogos en otras especies.

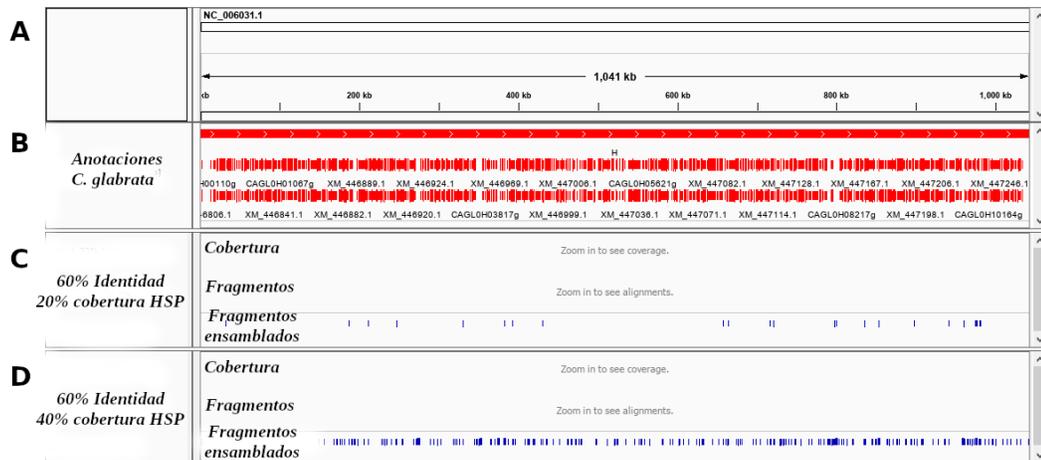


Figura 16. Regiones únicas identificadas en el cromosoma H de *C. glabrata*. La figura se divide en 4 paneles, en el primero (A) de arriba hacia abajo se muestra el cromosoma completo y una regla con subdivisiones graduadas, en el segundo panel (B) se muestra las anotaciones de todos los genes del cromosoma en forma de barras rojas, en el tercer y cuarto panel (C y D) se muestra las regiones únicas identificadas en el cromosoma por medio del análisis de BESTur con (C) 20% y (D) 40% de cobertura HSP y 60% de identidad. Las barras azules muestran la localización de dichas regiones únicas.

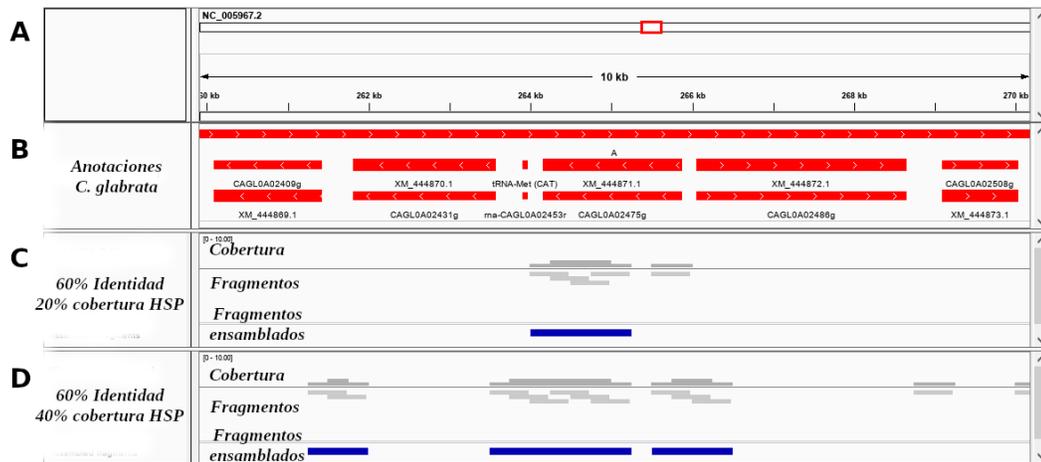


Figura 17. Un acercamiento al cromosoma A de *C. glabrata*. La figura se divide en 4 paneles, en el primero (A) de arriba hacia abajo se muestra el cromosoma A completo y una regla con subdivisiones graduadas, en el segundo panel (B) se muestra las anotaciones de todos los genes del cromosoma en forma de barras rojas, en el tercer y cuarto panel (C y D) se muestra las regiones únicas identificadas en el cromosoma por medio del análisis de BESTur con (C) 20% y (D) 40% de cobertura HSP y 60% de identidad. Las barras azules muestran la localización de dichas regiones únicas.

Por ejemplo, en la (Figura 17) mostramos una región del cromosoma A de *C. glabrata*, en ella se puede observar la identificación de una región única de buena calidad ya que existen fragmentos ensamblados de buen tamaño en las dos corridas de la tubería de comandos para una cobertura HSP de 20% y 40%, ya que el tamaño máximo obtenido en ambas corridas es de 2kb y 8.5kb respectivamente, y estos fragmentos ensamblados miden aproximadamente 1kb y 2kb lo que corresponde al 50% y 23.5% del tamaño máximo obtenido respectivamente. Y además, los fragmentos ensamblados los localizamos en una región donde existen genes anotados.

En la (Figura 18) mostramos un ejemplo de la identificación de una región única de baja calidad en comparación con los resultados plasmados en la (Figura 17). En la figura podemos observar que los fragmentos ensamblados se expanden en una región donde hay ausencia de genes anotados, además no hay fragmentos ensamblados localizados en esa región con el análisis BESTur donde utilizamos el 20% de cobertura HSP como parámetro de corte. La región única que identificamos en el cromosoma H de *C. glabrata* (Figura 19), tiene todas las características de una región única de buena calidad, pero si las comparamos con las características de la región única identificada en el mismo cromosoma de la (Figura 17) podemos ver que el fragmento ensamblado obtenido cuando usamos el 20% de cobertura HSP en el análisis es de menor tamaño.

Para calificar de manera sistemática todas las regiones únicas utilizamos una fórmula muy inocente:

$$S = (A*B) + C \quad \text{eq. [1]}$$

En donde S es la puntuación de la región única, A es una variable binaria en donde 1 significa que existen fragmentos ensamblados obtenidos en ambas corridas de BESTur donde utilizamos 20% o 40% de cobertura HSP que localizan en la misma región del genoma, 0 significa que no existen fragmentos en ambas corridas, B es el cociente del tamaño del fragmento ensamblado obtenido en el análisis BESTur donde utilizamos 20% de cobertura HSP y el tamaño máximo obtenido de los fragmentos ensamblados. C es otra variable binaria en donde 1 significa que los

fragmentos ensamblados localizan y expanden en una región del genoma donde existen genes anotados y que cuando menos uno de ellos tiene un gen ortólogo en otra especie.

Calificamos todas las regiones únicas identificadas, las ordenamos de la mejor calificada a la peor calificada, y nos quedamos con aproximadamente el 4% del total de las regiones únicas identificadas con las mejores calificaciones. Esto representa solo 10 regiones de buena calidad que llamamos regiones únicas selectas.

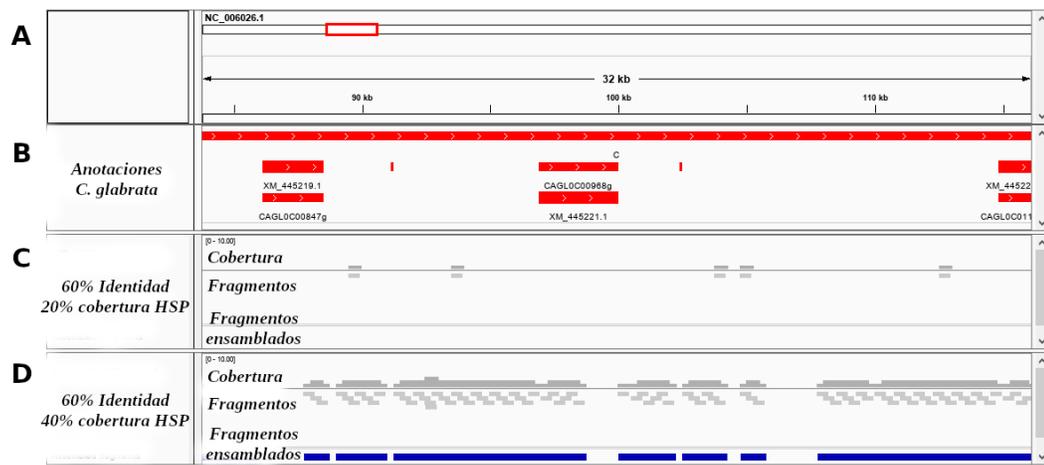


Figura 18. Regiones únicas con poco soporte en el cromosoma C de *C. glabrata*. En esta figura se muestra un acercamiento al cromosoma C y se puede observar regiones ausentes de genes anotados y además no existe soporte de regiones únicas identificadas cuando se realizó el análisis BESTur con 20% de cobertura HSP. La descripción de los paneles (A-D) es similar a la descripción de la (Figura 17).

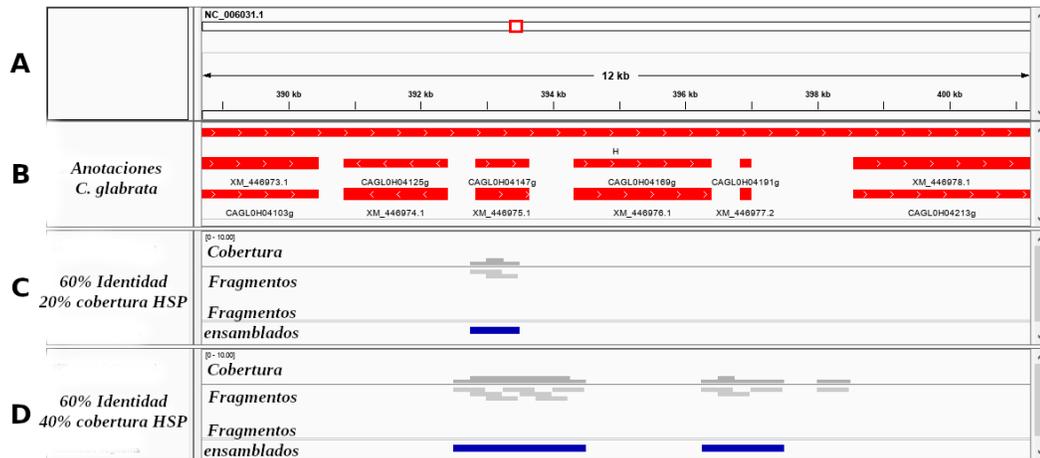


Figura 19. Acercamiento al cromosoma H del genoma de *C. glabrata*. La descripción de esta figura es similar a la (Figura 17), pero en este caso es para el cromosoma H. Podemos observar que la región única identificada está apoyada por fragmentos ensamblados para ambos análisis (20% y 40% de cobertura HSP).

8.4 Diseño de los oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie de levadura *Candida glabrata*.

Utilizamos las secuencias de las regiones únicas selectas, que fueron identificadas por BESTur y que seleccionamos previamente, como molde para diseñar oligonucleótidos cebadores de PCR. Las secuencias fueron formateadas y almacenadas en archivos para ser procesadas con la herramienta Primer3_core (Utergasser et al, 2012) para el diseño de los oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie *C. glabrata* utilizamos los parámetros de búsqueda: tamaño del oligonucleótido, temperatura de alineamiento, y porcentaje de GC como los describimos en la sección de materiales y métodos. Con esta herramienta diseñamos 55 pares de oligonucleótidos cebadores de buena calidad con las 10 regiones únicas selectas que usamos como molde.

Primer3_core es un programa de computadora que diseña oligonucleótidos cebadores o sondas mediante un procedimiento en pasos. El primer paso es formar todos los posibles pares de cebadores sentido y antisentido que se encuentren a una distancia dentro del intervalo que seleccionamos. Si la distancia se desvía un poco de ese intervalo, entonces los pares de cebadores obtienen menos penalización en su calificación. En un segundo paso, evalúa si los pares de

cebadores forman estructuras secundarias indeseables, y entre más estables sean esas estructuras se penaliza más a esos pares. También califica, en un tercer paso, si la temperatura y porcentaje de guaninas y citosinas están dentro del intervalo que establecimos. Al final se obtiene las secuencias de todos los posibles pares de cebadores con las características deseables dentro de los intervalos y asociados con una calificación; dicha calificación nos permite saber la buena o mala calidad del diseño de los pares de cebadores de PCR.

Las secuencias de los cebadores de PCR fueron ordenados por su calificación de calidad, desde los mejores calificados a los peores calificados, y nos quedamos con el primero en la lista. En la (Tabla 2) mostramos las secuencias de los oligonucleótidos cebadores de PCR tanto el cebador sentido como el antisentido, y en la dirección 5' a 3'. Además podemos ver los valores de la temperatura de alineamiento (Tm) en grados celsius, el porcentaje de guaninas y citosinas (%GC) y el tamaño esperado del amplicón en pares de bases (pb). El tamaño de ambos oligonucleótidos cebadores es de 20 nucleótidos y todas las estructuras secundarias indeseables que forman estos cebadores como: estructuras tallo-asa, homodímeros y heterodímeros son inestables a la temperatura de alineamiento que utilizamos en los experimentos de PCR.

Tabla 2. Oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie *C. glabrata*.

Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	%GC	Tamaño (pb)	Estructuras secundarias^a
ACAACGTGTGTAAATGCGGC	60.0	50	229	Inestables a 60°C
TTCGATAGCCACCATTCCGG	59.9	55		

a: estructuras tallo-asa, homo y hetero-dímeros.

Los pares de oligonucleótidos cebadores de PCR que obtuvieron la mejor calificación los mapeamos en la parte central del cromosoma G de *C. glabrata* (Figura 20A). Estos se encuentran en una región única soportada por fragmentos ensamblados obtenidos de dos análisis BESTur en donde usamos 20% o 40% de cobertura de HSP y 60% de identidad (Figura 20B). Estos fragmentos ensamblados

se expanden en una región del genoma donde se encuentran 3 genes: *CAGLOG05511g* (*WHI4*), *CAGLOG05522g*, *CAGLOG05544g* (*HBT1*). El primer gen se encuentra sin caracterizar pero el gen ortólogo en *S. cerevisiae* es *WHI4* y participa en la regulación del tamaño celular. El segundo gen es un ORF sin caracterizar y no se encuentra ningún ortólogo descrito en otra levadura filogenéticamente cercana. Y el tercer gen se encuentra sin caracterizar pero el gen ortólogo en *S. cerevisiae* (*HBT1*) está involucrado en la morfogénesis celular, además de encontrar genes ortólogos en *S. cerevisiae*, también los encontramos en otras levaduras del género *Candida* (“*Candida* genome database” www.candidagenome.org).

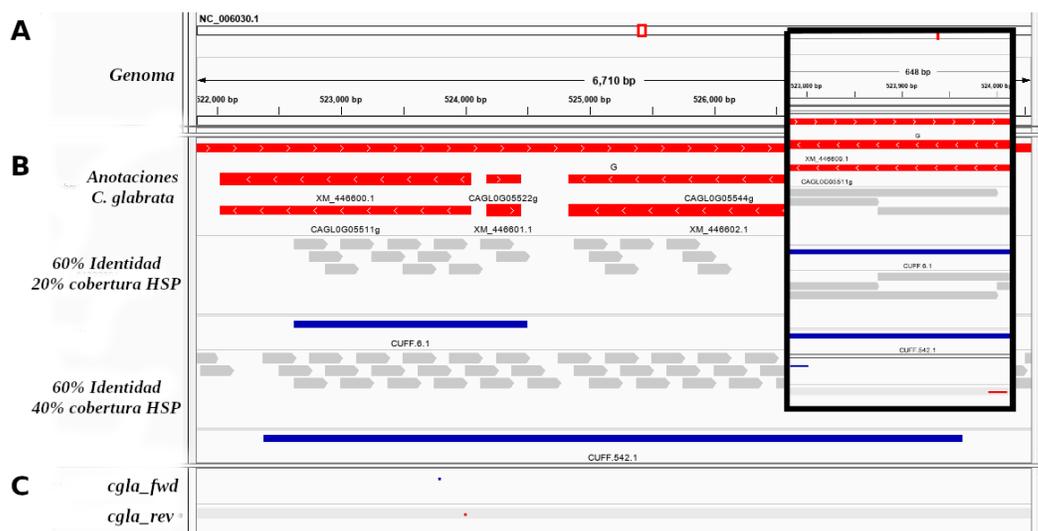


Figura 20. Oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie *C. glabrata* con la mejor puntuación. Mostramos la localización de la región única identificada en el genoma donde se alinean los cebadores, así como como los fragmentos retenidos y ensamblados que dan soporte a la región única identificada. En el panel (A) se muestra el cromosoma G como una barra blanca, y en la parte central de esa barra está un recuadro rojo que muestra la posición en el cromosoma de donde obtenemos la información que mostramos en los demás paneles. En el panel (B) mostramos las anotaciones de los genes en el cromosoma, los fragmentos retenidos y ensamblados del genoma consulta para los análisis BESTur con 20% o 40% de cobertura HSP y 60% de identidad. En el panel (C) mostramos la posición donde se alinean los oligonucleótidos cebadores de PCR (*cgla_fwd* y *cgla_rev*). En la figura embebida en el recuadro de color negro podemos observar un acercamiento a la posición en donde se encuentran los cebadores.

Encontramos los cebadores en la región cercana al 5' del primer gen *CAGLOG05511g* (Figura 20C). Pensamos que el diseño de los cebadores es de buena calidad, y además el blanco al que los dirigimos no representa algún artefacto producto de errores en la secuenciación y ensamble del genoma de *C. glabrata*. Con estos resultados obtenidos decidimos mandar a sintetizar los oligonucleótidos cebadores de PCR a la empresa Mexicana "T4 oligo". Y decidimos evaluar experimentalmente la selectividad de estos cebadores de PCR en un experimento en donde los desafiamos a amplificar específicamente la región del cromosoma G de *C. glabrata* a partir de ADN genómico en presencia de otros ADN genómicos de levaduras filogenéticamente cercanas pertenecientes al género *Candida*.

8.5 Identificación específica de *Candida glabrata* por PCR

Logramos identificar específicamente el ADN genómico de *C. glabrata* por PCR en una muestra en donde mezclamos el ADN genómico de *C. glabrata* con los ADN genómicos de otras especies de levadura relacionadas filogenéticamente a esta levadura: a decir, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*. El material genético fue donado amablemente por la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro, el Dr. Alejandro de las Peñas Nava y la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez investigadores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT).

La hipótesis de este experimento es que los oligonucleótidos cebadores que diseñamos son altamente específicos para la levadura *C. glabrata* que van a lograr identificar la presencia del ADN genómico de esta levadura en una muestra de ADN genómicos de especies relacionadas. Por lo que decidimos hacer una mezcla equitativa en concentración de ADN genómico de las tres levaduras antes mencionadas que están relacionadas filogenéticamente a *C. glabrata*. Esa muestra se dividió en dos y a una de ellas se agregó una cantidad equitativa en concentración del ADN genómico de *C. glabrata* y a la otra se agregó un volumen similar pero de agua destilada estéril.

En la (Figura 21A) mostramos los ADN genómicos de las cuatro levaduras: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. En la (Figura 21B) mostramos los resultados de electroforesis del desafío que le pusimos a los oligonucleótidos cebadores específicos para *C. glabrata*. En el carril 1 mostramos el amplicón obtenido con un control positivo donde utilizamos los cebadores que diseñamos y ADN genómico aislado de *C. glabrata*; ese es el tamaño esperado que debemos de obtener. En el carril 2 mostramos el resultado de un amplicón de PCR donde utilizamos cebadores que amplifican una región del genoma de *C. tropicalis*. Este control lo utilizamos para confirmar que la reacción de PCR haya sucedido.

En el carril 3 mostramos el amplicón obtenido del ADN genómico de *C. glabrata* en una muestra donde mezclamos equitativamente los ADN genómicos de otras levaduras cercanas a esta levadura y usamos los cebadores que diseñamos en este trabajo. En el carril 4 mostramos el resultado de desafiar los cebadores específicos para *C. glabrata* en una muestra donde mezclamos los ADN genómicos de la levaduras relacionadas pero el ADN genómico de *C. glabrata* está ausente.

El carril 5 es el resultado del control de contaminación: ahí mezclamos los ADN genómicos de todas las levadura pero no utilizamos ningún cebador. Los resultados que observamos en los carriles 3 y 4 de la (Figura 21B) son la evidencia que apoya la conclusión de que los cebadores que diseñamos en este trabajo pueden discernir entre el ADN genómico de *C. glabrata* y el ADN genómico de *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*. Esto muestra que la tubería de comandos BESTur es una herramienta útil para el diseño de oligonucleótidos cebadores de PCR especie-específicos que permitirá la identificación de la especie de microorganismo de interés por medio de una reacción de PCR, de manera sencilla, rápida y económica.

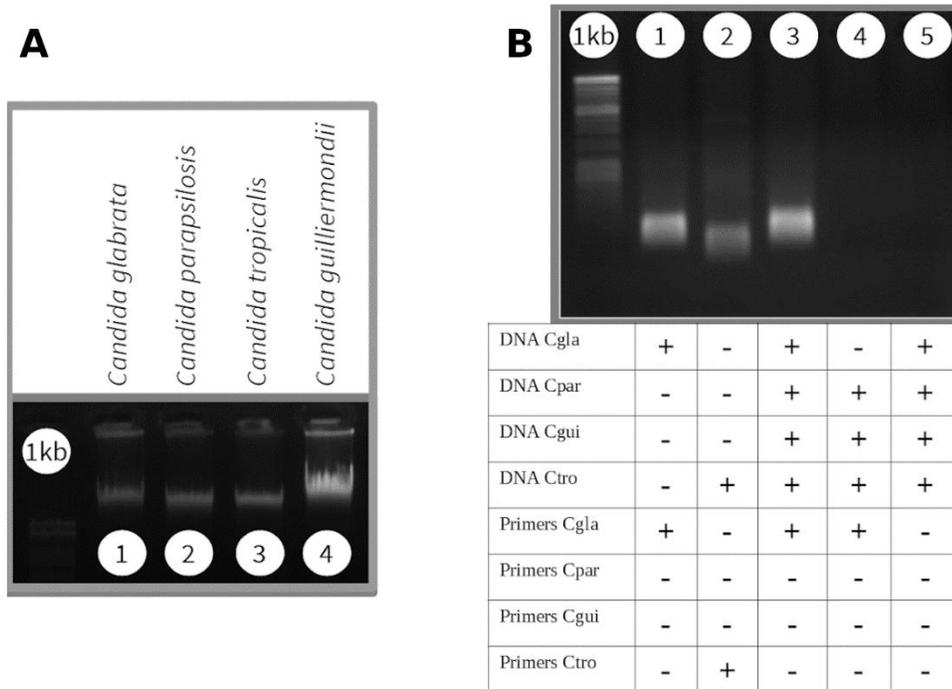


Figura 21. Evaluación experimental de la selectividad de los oligonucleótidos cebadores de PCR específicos para la especie de levadura *C. glabrata*. En (A) mostramos el resultado de un análisis de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Las bandas que se observan teñidas con bromuro de etidio y reveladas con luz ultravioleta representan el ADN genómico de las levaduras del género *Candida*; en el primer carril del gel se encuentra el marcador de peso molecular de 1kb. En (B) mostramos los resultados de un análisis de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en donde las bandas son los productos de PCR que obtuvimos del experimento. El primer carril es el marcador de peso molecular de 1kb y los carriles 1, 2 y 5 son controles de la reacción de PCR. DNA: ADN genómico, Primers: cebadores, Cgla: *Candida glabrata*, Cpar: *Candida parapsilosis*, Cgui: *Candida guilliermondii*, Ctro: *Candida tropicalis*. Símbolos, (+): que está presente en la reacción, (-): que está ausente en la reacción.

El comportamiento de la tubería de comandos BESTur es el esperado, ya que al incrementar los valores de corte de los parámetros porcentaje de cobertura HSP e identidad obtenemos un mayor porcentaje de fragmentos retenidos del genoma consulta, un incremento inicial del número de fragmentos ensamblados pero con un decaimiento cuando se utilizan valores cercanos al 100% de los parámetros, y un incremento, con tendencia exponencial, de los tamaños máximos y los valores del estadístico N50 de los fragmentos ensamblados. Esto es debido a que si se configura BLAST para hacer búsquedas muy estrictas, muy pocos fragmentos del genoma consulta serán muy similares a alguna subsecuencia de los genomas de las levaduras de la base de datos, por lo que obtendremos una cantidad muy grande de fragmentos retenidos. Por el contrario si la búsqueda no es

muy estricta, estamos configurando a BLAST para encontrar secuencias algo similares en la base de datos, por lo que obtendremos una cantidad pequeña de fragmentos retenidos.

La disminución en el número de fragmentos ensamblados cuando se usan valores cercanos a 100% en los parámetros descritos es debido a que se obtiene una mayor cantidad de fragmentos retenidos y por lo tanto hay una mayor cobertura del genoma de referencia por lo que se empieza a ensamblar el genoma completo observándose una disminución en el número de fragmentos ensamblados pero un incremento en el tamaño y N50 de esos fragmentos.

Pensamos que seleccionar las regiones únicas tomando en cuenta las características descritas en este trabajo mejoraría la especificidad del diseño de los oligonucleótidos cebadores, sin embargo no tenemos evidencia para concluir respecto a si esa selección tiene un efecto positivo en la especificidad de los cebadores.

En este trabajo observamos que la tubería de comandos BESTur es una herramienta que nos permitió diseñar oligonucleótidos cebadores de PCR que pueden discernir entre el genoma de *C. glabrata* y las especies *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, y *C. tropicalis*, pero no sabemos aún si pueden tener la misma especificidad al desafiarlos con los genomas de las demás levadura filogenéticamente relacionadas (Tabla 1) que faltaron evaluar en el experimento pero que se contemplaron en el diseño de los cebadores.

También es preciso tener evidencia de la especificidad de los cebadores diseñados con BESTur al compararlos con cebadores diseñados en regiones del genoma consulta al azar o con otras herramientas, así como evidenciar mediante un experimento las mejoras en la especificidad del diseño de los cebadores en regiones únicas selectas al compararlos con los cebadores diseñados en las regiones únicas con calificaciones bajas.

Estos resultados preliminares nos sugieren que BESTur es una herramienta bioinformática muy versátil que nos ayudará en el diseño de oligonucleótidos cebadores de PCR muy específicos para un microorganismo de interés que

permitirán identificarlo en una muestra que incluso puede tener ADN genómico de otras especies.

IX. Conclusiones

- 1) El comportamiento durante la ejecución de la tubería de comandos BESTur es el esperado.
- 2) BESTur es una tubería de comandos que ayuda en el diseño de oligonucleótidos cebadores muy específicos para un microorganismo de interés y poder identificarlo por PCR punto final incluso en muestras contaminadas con ADN genómico de otras especies.
- 3) En este trabajo logramos diseñar, con ayuda de BESTur, oligonucleótidos cebadores de PCR que pueden discernir entre el ADN genómico de *C. glabrata* y los ADN genómicos de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*.

X. Perspectivas

Pensamos que esta tubería de comandos (BESTur), una herramienta bioinformática, será de utilidad en el diagnóstico rápido, barato y específico de enfermedades causadas por agentes microbiológicos que afectan no solo al ser humano, sí no que también a especies de animales y plantas de interés agropecuario. Ya que esta herramienta explotará la información almacenada en las bases de datos de genomas para identificar regiones únicas del genoma del microorganismo patógeno de interés. Estas regiones son el blanco perfecto que nos va a permitir discernir entre el genoma del patógeno y los demás genomas de otras especies de microorganismos que comparten un nicho en el hospedero.

Queremos madurar esta tecnología, desarrollar y estandarizar técnicas de identificación microbiológica por PCR punto final para que sean utilizadas en laboratorios clínicos de bajo presupuesto, ya que esta herramienta puede dar resultados si se ejecuta en ordenadores de capacidades bajas como aquellas que tienen memoria RAM de 8Gb, y procesadores Intel de 2.8GHz, y los cebadores especie-específico diseñados pueden ser implementados en una reacción de PCR de rutina, en donde no se requerirá el aislamiento del patógeno previo en medios de cultivo selectivos, y esto disminuirá los costos en la identificación y el diagnóstico de la enfermedad así como los tiempos de estadía del paciente en el hospital.

También, a lo largo de este trabajo nos hemos dado cuenta que la utilidad de esta herramienta va más allá del diseño de oligonucleótidos cebadores especie-específico. Ya que puede ser empleada para obtener información de regiones únicas en genomas de microorganismos de interés y con esta información podríamos realizar estudios evolutivos que involucran dichas regiones. La pregunta que nos interesa contestar es saber cuáles son las regiones conservadas entre levaduras hemiascomicetos patógenas y que además son las más distantes comparadas con genomas de levaduras del mismo clado pero que no son patógenas. Para explorar este camino vamos a emplear la herramienta BESTur y

otra herramienta que busca regiones conservadas llamada "Eta for homology" (EFH) que consiste en un recableado de la primera herramienta.

XI. Referencias

- Alahi, M. E. E., & Mukhopadhyay, S. C. (2017). Detection methodologies for pathogen and toxins: a review. *Sensors*, 17(8), 1885.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Basmaciyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., & Dalle, F. (2019). *Candida albicans* interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers*, 7(2), 1612661.
- Berkow, E. L., & Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and drug resistance*, 10, 237.
- Biasoli, M. (2013). Candidiasis. Obtenido de http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_20, 13.
- Bilir, S. P., Ferrufino, C. P., Pfaller, M. A., & Munakata, J. (2015). The economic impact of rapid *Candida* species identification by T2Candida among high-risk patients. *Future microbiology*, 10(7), 1133-1144.
- Choi, J., & Kim, S. H. (2017). A genome tree of life for the fungi kingdom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9391-9396.
- Da Silva, R. M., Neto, J. R. D. S., Santos, C. S., Frickmann, H., Poppert, S., Cruz, K. S., ... & De Souza, J. V. B. (2015). Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 1-6.
- de Carvalho, L. M., Borelli, G., Camargo, A. P., de Assis, M. A., de Ferraz, S. M. F., Fiamenghi, M. B., ... & Carazzolle, M. F. (2019). Bioinformatics applied to biotechnology: A review towards bioenergy research. *Biomass and Bioenergy*, 123, 195-224.
- Deacon, J. W. (2013). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.
- La Rosa Hernández, D., Gómez Cabeza, E. J., & Sánchez Castañeda, N. (2014). La microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmune del recién nacido. *Revista Cubana de Pediatría*, 86(4), 502-513.

- Diezmann, S., Cox, C. J., Schönian, G., Vilgalys, R. J., & Mitchell, T. G. (2004). Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5624-5635.
- Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Ramos, L. D. S., Barbedo, L. S., Oliveira, J. C. A. D., Santos, A. L. S. D., Almeida-Paes, R., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2017). Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. *Mediators of inflammation*, 2017.
- Garcia-Vidal, C., Viasus, D., & Carratala, J. (2013). Pathogenesis of invasive fungal infections. *Current opinion in infectious diseases*, 26(3), 270-276.
- González, A., & Valenzuela, L. (2004). La levadura *Saccharomyces cerevisiae*: un modelo de estudio desde hace más de cien años. México: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México.
- Gouba, N., & Drancourt, M. (2015). Digestive tract mycobiota: a source of infection. *Medicine et maladies infectieuses*, 45(1-2), 9-16.
- Guilarte, C., & Pardi, G. (2009). Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(3), 201-205.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 5-10.
- Gunther, L. S. A., Martins, H. P. R., Gimenes, F., Abreu, A. L. P. D., Consolaro, M. E. L., & Svidzinski, T. I. E. (2014). Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *São paulo medical journal*, 132, 116-120.
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., & Fries, B. C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and infection*, 11(8-9), 753-761. -----ROWE2008
- Huang, A. M., Newton, D., Kunapuli, A., Gandhi, T. N., Washer, L. L., Isip, J., ... & Nagel, J. L. (2013). Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clinical infectious diseases*, 57(9), 1237-1245.
- Huertas-Caro, C., Urbano-Cáceres, E., & Torres-Caycedo, M. (2019). Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 513-528.

- Kothari, A., Morgan, M., & Haake, D. A. (2014). Emerging technologies for rapid identification of bloodstream pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 59(2), 272-278.
- Kuhar, JF, Castiglia, VC y Papinutti, VL (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos.
- Lazo, V., Hernández, G., & Méndez, R. (2018). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75-85.
- Leonard, H. P. (2007). Beneficios de las levaduras vivas en la obtención de productos con actividad probiótica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(3), 35-41.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Liu, M. B., Xu, S. R., He, Y., Deng, G. H., Sheng, H. F., Huang, X. M., ... & Zhou, H. W. (2013). Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PloS one*, 8(11), e79812.
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., ... & Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2), 134-140.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiología de Brock-14ª Edición*. Artmed Editora.
- Malina, C., Larsson, C., & Nielsen, J. (2018). Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS yeast research*, 18(5), foy040.
- Martínez-Garnica, D. E., Jiménez-Jiménez, M., Ramírez-Guerrero, C., & López-Martínez, B. (2015). Evaluación de la utilidad clínica de la prueba ELISA de detección de Ag manano de *Candida* para el diagnóstico de la candidiasis invasiva en pacientes pediátricos. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 62(2), 81-85.

- Martínez, R. R., & Otero, G. S. (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte*, 29(2), 327-340.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- Menchinelli, G., Liotti, F. M., Fiori, B., De Angelis, G., D'Inzeo, T., Giordano, L., ... & Spanu, T. (2019). In vitro evaluation of BACT/ALERT® VIRTUO®, BACT/ALERT 3D®, and BACTEC™ FX automated blood culture systems for detection of microbial pathogens using simulated human blood samples. *Frontiers in microbiology*, 10, 221.
- Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., & Zaragoza, O. (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, 3, 286.
- Moudni E.I., B., Rodier, M. H., Daniault, G., & Jacquemin, J. L. (1998). Improved immunodiagnosis of human candidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay using a *Candida albicans* 52-kilodalton metallopeptidase. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(6), 823-825
- Das Murtey, M., & Ramasamy, P. (2016). Sample preparations for scanning electron microscopy–life sciences. *Modern electron microscopy in physical and life sciences*, 161-185.
- Mushi, M. F., Mtemisika, C. I., Bader, O., Bii, C., Mirambo, M. M., Groß, U., & Mshana, S. E. (2016). High oral carriage of non-*albicans Candida* spp. among HIV-infected individuals. *International Journal of Infectious Diseases*, 49, 185-188.
- Nabors, M. W. (2006). *Introducción a la Botánica* (No. 581). Pearson:.
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71-92
- Nucci, M., & Anaissie, E. (2001). Revisiting the source of candidemia: skin or gut?. *Clinical infectious diseases*, 33(12), 1959-1967.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003550.

- Pérez Ortín, J. E. (1997). Organización molecular del genoma de levadura. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular. Universidad de Coruña.
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T., & Salzberg, S. L. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature protocols*, 11(9), 1650-1667.
- Pfaller, M. A., Wolk, D. M., & Lowery, T. J. (2016). T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future microbiology*, 11(1), 103-117.
- Prasad, R., & Goffeau, A. (2012). Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annual review of microbiology*, 66, 39-63.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), 24-26.
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(5), 673-688.
- Rodríguez Martínez, R., & Suescún Otero, G. (2013). Applications and inconvenient of Fluorescence in situ hybridization technique (FISH) in the identification of microorganism. *Revista Salud Uninorte*, 29(2), 327-340.
- Schelenz, S., Hagen, F., Rhodes, J. L., Abdolrasouli, A., Chowdhary, A., Hall, A., ... & Fisher, M. C. (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 5(1), 1-7.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47(7), 681-689.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
- Tóth, R., Tóth, A., Papp, C., Jankovics, F., Vágvölgyi, C., Alonso, M. F., ... & Gácsér, A. (2014). Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Frontiers in microbiology*, 5, 633.
- Turner, S. A., & Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(9), a019778.

- Underhill, D. M., & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 405-416.
- 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.
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., ... & Yaschenko, E. (2007). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D13-D21.
- Wheeler, M. L., Limon, J. J., & Underhill, D. M. (2017). Immunity to commensal fungi: detente and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 12, 359-385.
- Zheng, X., Polanco, W., Carter, D., & Shulman, S. (2014). Rapid identification of pathogens from pediatric blood cultures by use of the FilmArray blood culture identification panel. *Journal of clinical microbiology*, 52(12), 4368-4371.

Fe de erratas

1. En la figura 11 de la página XX falta el siguiente texto: de cobertura HSP y las barras negras muestran los resultados para un 20% de porcentaje de cobertura HSP.
2. En la figura 21 escribimos que los porcentajes de agarosa fueron de 0.8% para visualizar los ADN genómicos y 1.5% para visualizar los amplicones. Los porcentajes correctos son los que mencionamos en la sección de materiales y métodos: 1% y 2% respectivamente.