

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE
Candida parapsilosis.

Por

Q.B.P. YOLANDA CANÓNICO GONZÁLEZ

Como requisito para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Agosto, 2015

Marcadores moleculares específicos de *Candida parapsilosis*.

Comité de Tesis

DIRECTOR

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal.

SECRETARIO

Dr. Arturo Espinoza Mata

VOCAL

M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez

VOCAL

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

VOCAL

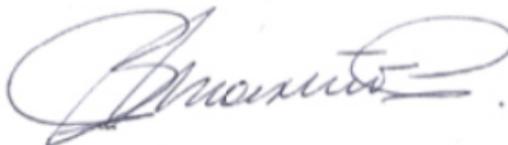
Dra. Susana Favela Lara

Marcadores moleculares específicos de *Candida parapsilosis*.

Dirección de Tesis

DIRECTOR

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal.



DIRECTOR EXTERNO

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



ASESOR EXTERNO

Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado

Centro de Investigación Científica de Yucatán

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su matrícula y al Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme usar sus instalaciones para mi desarrollo profesional.

A la Dra. Elva Teresa Árechiga Carvajal, quien durante todos estos años en el laboratorio ha sido como una segunda madre para mí. No tengo las palabras suficientes para agradecerle todo lo que ha hecho usted por mí, pues no sólo me depositó su confianza y me aceptó en el posgrado a pesar de no tener un buen promedio, ha estado ahí siempre como amiga, consejera y *sensei* de la ciencia. Muchas gracias por guiarme en este camino, por todo su apoyo y excelentes consejos.

Al MC Juan Manuel Adame Rodríguez, gracias por transmitirme el amor a la Micología médica, por siempre apoyarme y motivarme a seguir adelante, estar siempre con la mejor disposición y por hacerme esas preguntas y/o comentarios que siempre me dejaban pensando.

Al Dr. Jorge Ramírez Prado, gracias por aceptarme en su laboratorio no una, sino dos veces. Gracias por toda su amabilidad y el conocimiento que me brindó.

Al Dr. Arturo Espinoza Mata, gracias no sólo por ayudarme a corregir la tesis, sino además por todo el apoyo que me brindó durante mi etapa de catedrática de Microbiología.

A la Dra. Rosa Mouriño Pérez, por la cepas proporcionadas y por su tiempo invertido.

Al Dr. Carlos Hernández Luna y a la Dra. Susana Favela Lara por formar parte del comité.

Al Laboratorio de Micología donde me desarrollado profesional y que me ha forjado grandes valores humanos al igual que el staff de la Unidad Manipulación Génética: Adrianita, Alex, Asa, Luisa, Mares, Paola, Fermin, Eli y especialmente a mi querida Ana, quién me ayudó mucho con la parte técnica de la tesis. Gracias a cada uno de ustedes por todo su apoyo y amistad.

A mis mejores amigos Mary, Karlita, Andrés, Luis, Tavo y Alberto. Gracias chicos por su valiosa y sincera amistad.

A la familia De la Hidalga Ortiz, muchas gracias Ale, Camila, Agustín y al niño hermosa que viene en camino por recibirme en su casa y por su amistad.

Al Don Bosco Team: Marianela, Mónica, Leslie, Brianda, Pekas, David, Rey y Samuel, a pesar del poco tiempo que tenemos de conocernos siento que son grandes seres humanos con las que puedo contar.

A los mil alumnos que tuve en la Prepa 16 y en la FCB, créanme que aprendí yo más de ustedes que ustedes de mí.

A mi familia, por ser mi principal motivo de superación. A mi madre bonita por ser mi modelo a seguir, por toda su lucha, entrega y amor. A mi padre por su apoyo, motivación y por todas las veces que lo hice levantarse temprano para que yo pudiese llegar a tiempo. A mis hermanos Miguel, Emmanuel, Humberto y Mayelonga por su amor, alegría y entusiasmo, gracias a ustedes por ser mi motor y mi fuerza.

Y por último pero no menos importante... a mi camarada favorito y compañero en las mil batallas David Pintor Rodríguez, muchas gracias David por cuidarme y amarme de esa forma tan especial y sobretodo tener la paciencia suficiente para entenderme en mis múltiples facetas.

"Voluntad de Poder."

Friedrich Nietzsche, 1901

INDICE

LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Sobre el género <i>Candida</i>	3
2.2 Generalidades de <i>Candida parapsilosis</i>	4
2.3 Historia taxonómica.....	5
2.4 <i>Candida parapsilosis</i> como patógeno emergente.....	6
2.5 Características genómicas	9
2.5.1 Homología entre <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	13
2.5.2 Complejo parapsilosis	13
2.6 Factores de virulencia.....	15
2.6.1 Adhesinas	16
2.6.1.1 Familia génica Als.....	16
2.6.1.2 Formación de biopelículas.....	17
2.6.2 Proteasas	18
2.6.2.1 Familia génica SAP	19
2.6.3 Lipasas	21
2.7 Identificación molecular	23
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS.....	31

5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1 Estrategia general	32
6.2 Análisis comparativo de <i>Candida parapsilosis</i>	33
6.2.1. Geneious y Mauve	33
6.2.3 SyMAP	33
6.3 Comparación de familias génicas: Búsqueda de posibles ortólogos y parálogos.	34
6.4 Diseño de marcadores moleculares específicos.	35
6.5 Selección y tamaño de muestra	36
6.6 Identificación microbiológica	36
6.6.1 Auxonograma de carbono.....	36
6.6.2 Identificación de especies utilizando CHROMagar	36
6.7 Validación de marcadores moleculares in vitro	38
6.7.1 Extracción de material genético	38
6.7.2 Estandarización del programa de PCR punto final.....	38
6.7.3 Electroforesis.....	39
6.7.4 Secuenciación.....	39
6.8 Análisis filogenético para SAPP	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Comparación de genomas de <i>Candida</i>	40
7.1.1 Comparación de los genomas de <i>C. albicans</i> y <i>C. dubliniensis</i>	40
7.1.2 Comparación del los genomas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. albicans</i>	41
7.1.3 Comparación del los genomas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	42
7.2 Comparación de familias génicas: Búsqueda de ortólogos y parálogos.....	48
7.2.1 Comparación de familia génica: ALS (adhesinas)	50
7.2.2 Comparación de familia génica: LIP (Lipasas).....	54
7.2.3 Comparación de familia génica: PLB (Fosfoipasa B).....	57
7.2.4 Comparación de familias génicas: SAP (aspartil-proteínasa)	60
7.3 Diseño de oligonucleótidos	68
7.4 Validación de oligonucleótidos por PCR en cepas ATCC	71

7.5 Analisis microbiológicos	73
7.6 Validación de oligonucleótidos en aislados clínicos.	76
7.7 Comparación de secuencias obtenidas con base de datos Genbank.....	77
7.8 Análisis filogenéticos	78
8. DISCUSIÓN.....	80
9. CONCLUSIÓN.....	86
10. PERSPECTIVAS	87
11. LITERATURA CONSULTADA	88
12. ANEXOS	98
ANEXOS 1.....	98
ANEXOS 2.....	99
ANEXO 3	105

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los genomas de especies pertenecientes al clado CTG.	10
Tabla 2. Genes ALS reportados en la literatura de algunas especies del género <i>Candida</i>	17
Tabla 3. Genes SAP reportados en la literatura de algunas especies del género <i>Candida</i>	19
Tabla 4. Genes LIP reportados en la literatura de algunas especies del género <i>Candida</i>	22
Tabla 5. Genes PLB reportados en la literatura de algunas especies del género <i>Candida</i> . (Ghannoum, 2000).....	23
Tabla 6. Interpretación de resultados (Auxonograma).....	37
Tabla 7. Interpretación de los resultados en BBL CHROMagar <i>Candida</i> Medium.....	37
Tabla 8. Tabla de agrupación de secuencias de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> con alta similitud a la familia génica ALS1-7 y ALS9 (adhesinas) reportada en <i>C. albicans</i>	51
Tabla 9. Porcentajes de identidad (%) de secuencias de genes de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> con respecto a los presentes en la familia ALS de <i>C. albicans</i>	52
Tabla 10. Porcentajes de identidad (%) de las secuencias ortólogas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> , con respecto a dominio de adhesinas.....	52
Tabla 11. Secuencias génicas con homología de LPS.	55
Tabla 12. Porcentajes de identidad (%)de secuencias de genes de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> con respecto a los presentes en la familia LIP de <i>C. albicans</i>	55
Tabla 13. Porcentajes de identidad (%)de las secuencias ortólogas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> con respecto al dominio lipolítico que presentan.	55
Tabla 14. Secuencias génicas con homología de PLB.	58
Tabla 15. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes de <i>C. parapsilosis</i> con la familia PLB de <i>C. albicans</i>	58
Tabla 16. Porcentajes de identidad (%) adquiridos al comparar las secuencias de genes de <i>C. orthopsilosis</i> con la familia PLB de <i>C. albicans</i>	58

Tabla 17. Porcentajes de identidad (%) obtenidos al comparar las secuencias de genes de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	59
Tabla 18. Secuencias homólogas de SAP.	61
Tabla 19. Genes SAP y sus respectivos ortólogos en los genomas de <i>C. albicans</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	61
Tabla 20. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes de <i>C. parapsilosis</i> con la familia SAP de <i>C. albicans</i>	62
Tabla 21. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes <i>C.orthopsilosis</i> con la familia SAP de <i>C. albicans</i>	62
Tabla 22. Porcentajes de identidad (%) de secuencias de genes SAP7-10 de <i>C. albicans</i> y SAPP1-3 de <i>C. parapsilosis</i> con respecto a los presentes en la familia SAP de <i>C. orthopsilosis</i>	63
Tabla 23. Porcentajes de identidad (%) adquiridos al comparar el locus de aspartil proteinasa detectado el mapeo en Symap.	66
Tabla 24. Oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes presentes en el loci aspartil-proteasa.	70
Tabla 25. Programas de amplificación para los diferentes fragmentos de SAP Y SAPP.	71
Tabla 26. Resultados de la validación de los oligonucleótidos diseñados en cepas control	72
Tabla 27. Resultados de la caracterización microbiológica.	74
Tabla 28. Compración de resultados observados de las translocaciones cromosomales entre <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias morfológicas coloniales obtenidas a partir de aislados clínico de <i>Candida parapsilosis</i>	5
Figura 2. Árbol filogenético de <i>Candida</i> spp. y el clado <i>Saccharomyces</i>	11
Figura 3. Comparación genómica de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C.orthopsilosis</i> mediante Dot blot	14
Figura 4. Árbol filogenético del complejo parapsilosis y <i>Candida</i> spp.	15
Figura 5. Esquema de la estructura del gen de la ALS.	16
Figura 6. Sitio catalítico y región circundante de pepsina	19
Figura 7. Dendograma de la familia proteica aspartil-proteinasa en <i>C. albicans</i>	20
Figura 8. Ubicación de los ITS (Espaciadores transcritos internos) en el complejo de genes ribosomales.	25
Figura 9. El alineamiento del cromosoma 7 de <i>C. dubliniensis</i> y el cromosoma 7 de <i>C. albicans</i>	41
Figura 10. El alineamiento del cromosoma 3 de <i>C. parapsilosis</i> y el cromosoma R de <i>C. albicans</i>	42
Figura 11. El alineamiento del cromosoma 6 de <i>C. parapsilosis</i> y el cromosoma 7 de <i>C. orthopsilosis</i>	43
Figura 12. El alineamiento del cromosoma 8 de <i>C. parapsilosis</i> y el cromosoma 3 de <i>C. orthopsilosis</i>	43
Figura 13. El alineamiento del cromosoma 8 de <i>C. parapsilosis</i> y el cromosoma 5 de <i>C. orthopsilosis</i>	44
Figura 14. El alineamiento del cromosoma 3 de <i>C. parapsilosis</i> y el cromosoma 5 de <i>C. orthopsilosis</i>	44
Figura 15. Comparación de genomas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i> esquematizada mediante Circle plot ..	45
Figura 16. Comparación de genomas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>	46
Figura 17. Comparación de genomas de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. albicans</i>	47
Figura 18 y 19 Búsqueda de regiones sinténicas entre el cromosoma 2 de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	49

Figura 20. Búsqueda de regiones sinténicas entre el cromosoma 2 de <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	49
Figura 21. Representación visual del orden que presentan los genes ortólogos en sus respectivos genomas.	53
Figura 22. Orden de genes ortólogos en los genomas de diferentes especies de <i>Candida</i>	54
Figura 23. Representación grafica del orden de los genes ortólogos en sus respectivos genomas	57
Figura 24. Representación visual de la ubicación de los genes ortólogos a LIP7.	57
Figura 25. Representación grafica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB1 Y PLB2.	59
Figura 26. Representación grafica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB3	60
Figura 27. Representación grafica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB5	60
Figura 28. Representación grafica del orden y arreglo de las secuencias ortólogos de SAP de <i>C.orthopsilosis</i>	64
Figura 29. Representación grafica del arreglo y orden de los genes ortólogos a SAP7 en el cromosoma 1 de <i>C.albicans</i>	64
Figura 30. Representación grafica del arreglo y orden de los genes ortólogos a SAP9 de <i>C.albicans</i> en el cromosoma 3.	65
Figura 31. Representación visual de los ortólogos a SAP8 de <i>C.albicans</i> , su homonimo en <i>C. orthopsilosis</i> y SAPP1 en <i>C. parapsilosis</i>	65
Figura 32. Representación visual de la ubicación de los genes ortólogos a SAP8 de <i>C.albicans</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	66
Figura 33. Representación grafica del loci de los genes de apartyl-proteasa y sus duplicaciones en <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	66
Figura 34. Representación gráfica del posible evento de duplicación del locus aspartil-proteinasa en <i>C. orthopsilosis</i>	67

Figura 35. Representación grafica del posible evento de traslocación en lo locus de aspartil proteasa en <i>C parapsilosis</i> y <i>C. orthopsilosis</i>	67
Figura 36. Alineamiento múltiple del locus SAPP (aspartil-proteinasa) en <i>C. parapsilosis</i>	69
Figura 37 y 38. Validación de amplificación exclusiva en la especie de interes.....	73
Figura 39. Validación de oligonucleótido 2420 en aislamientos clínicos.....	76
Figura 40. Validación de oligonucleótido 3830 en aislamientos clínicos.....	77
Figura 41. Producto de 600 pb de PCR amplificado con ITS1 y 2	77
Figura 42. Análisis filogenético que muestra la relación y variabilidad.....	79

LISTA DE SÍMBOLOS

- ALS: Alpha-agglutinin-like sequence ó adhesinas.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- CORT: Identificación de *C. orthopsilosis*.
- CPAR2: Identificación de *C. parapsilosis*.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- GC: Guanina-Citosina.
- IDT: Integrated DNA technologies.
- ITS: Espaciadores transcritos internos.
- L: Lactosa.
- LCB: Bloques colineales locales.
- LIP: Lipasas.
- LMYF: Laboratorio de Micología Y Fitopatología
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PLB: Fosfolipasas B.
- RAPD: DNA aleatoriamente amplificado.
- RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
- rDNA: DNA ribosomal .
- SADH: Deshidrogenasa de alcohol secundario.
- SAP / SAPP: aspartil-proteínasa.
- SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido.
- SyMAP: Synteny mapping and analysis program.
- TM: Temperatura de fusión.
- VASES: Valina-alanina-serina-ácido glutámico-serina.
- YPD: Dextrosa, peptona, extracto de levadura.

RESUMEN

A través de estudios genómicos comparamos locus que por sintenia parecen ser regiones prometedoras para el desarrollo de marcadores moleculares específicos de *Candida parapsilosis*, una levadura oportunista cuya incidencia va aumentando y que ha registrado altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

C. parapsilosis junto a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* comprenden un grupo de estrecha filogenia pero diferente virulencia denominado complejo parapsilosis. A pesar de su importancia como patógenos emergentes las técnicas de identificación microbiológicas y moleculares se han visto limitadas no sólo entre el complejo, sino además entre otras especies de importancia médica como lo son *C. guilliermondi*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata*.

Gracias a la disponibilidad de secuencias genómicas y mediante programas bioinformáticos de alta capacidad como Geneious, Symap y prfectBLAST, comparamos los genomas completos de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*; ubicando bloques colineales sinténicos y analizando una de las familias génicas de proteasas, encontramos eventos de expansión de genes en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Para cada una de estas duplicaciones se diseñaron sondas específicas, obteniendo así 9 diferentes marcadores moleculares; dos de estos han sido utilizados para la identificación de dos de las tres especies que conforman el complejo parapsilosis: *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Los oligonucleótidos fueron denominados 420 y 830 con amplicones de 1000 y 900pb respectivamente. Además de ser validados en cepas ATCC, ha sido probados en 35 aislados clínicos que fueron identificados de la siguiente manera; 19 cepas como *C. parapsilosis*, 1 cepa como *C. orthopsilosis*, mientras que las 15 cepas restantes mostraron alta similitud con *C. glabrata*, *C. guilliermondi* y *C. lusitaniae* al ser identificadas mediante secuenciación del fragmento ITS1 e ITS2 de la secuencia de DNA ribosomal 18S.

ABSTRACT

Through genomic studies synteny locus were compared, leading us to regions that are promising for the development of specific molecular markers of *Candida parapsilosis*, an opportunistic yeast whose incidence has been increasing, showing high rates of morbidity and mortality worldwide.

C. parapsilosis along with *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* comprise a group in close phylogeny but different virulence called parapsilosis complex. Despite their importance as emerging pathogens, microbiological and molecular identification techniques have been limited not only in the parapsilosis complex, but also among other species such as *C. guillermondi*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata*.

Due to the accessibility of genomic sequences and by using high-capacity bioinformatic programs such as Geneious, Symap and prfectBLAST, complete genomes of *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis* were compared. By analyzing a protease gene family and locating syntenic collinear blocks, gene expansion events were found in *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*.

Molecular markers were designed for each of these duplications, thus obtaining 9 different molecular markers; two of which have been used to identify successfully two of the three species from the parapsilosis complex: *C. parapsilosis* and *C. orthopsilosis*. The oligonucleotides were referred to as 420 and 830 with 1000 and 900 bp amplicons respectively. After validate the ATCC strains, 35 clinical samples were tested against these markers resulting in 19 strains identified as *C. parapsilosis*, one strain as *C. orthopsilosis*, while the remaining 15 strains showed high similarity to *C. glabrata*, *C. guillermondi* and *C. lusitaniae* after being identified by sequencing ITS1 and ITS2 fragments from 18S ribosomal DNA sequences.

1. INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección producida por hongos del género *Candida*, cuyas especies pertenecientes se encuentran como saprófitos o comensales de forma habitual en humanos, siendo agentes causales de un variado espectro de enfermedades.

Por desgracia esta micosis lejos de desaparecer, se ha incrementado día con día debido a la presencia de enfermedades y condiciones inmunosupresoras y al uso indiscriminado de antimicóticos.

Durante años se ha considerado a *Candida albicans* como la principal especie responsable de las diferentes manifestaciones de la candidiasis, sin embargo en la última década se han presentado cambios en la distribución de las especies de este importante género, siendo cada vez más común identificar especies no-*albicans* como patógenos. (Rodero *et al*, 2005; Trofa *et al*, 2008; Land *et al*, 2009).

Tal es el caso de *Candida parapsilosis*, que es una de las principales especies no-*albicans* cuya incidencia ha incrementado dramáticamente en el mundo, contribuyendo a la mortalidad y morbilidad de pacientes nosocomiales y neonatos, siendo este último grupo el más afectado significativamente, ya que las tasas de mortalidad en recién nacidos de manera prematura es de aproximadamente el 10%. (Pammi *et al*, 2014)

C. parapsilosis junto a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* comprenden un grupo de estrecha filogenia pero diferente virulencia denominado complejo parapsilosis, un grupo de tres levaduras que anteriormente se habían clasificado taxonómicamente como una misma especie (*Candida parapsilosis*) pero separada en tres grupos: I, II Y III. Fue hasta el 2005 que Tavanti *et al*. propusieron la separación y sustitución de los grupos, en lo que hoy se conoce como complejo parapsilosis, esto basándose en el análisis de polimorfismo de restricción del gen de la deshidrogenasa de alcohol secundario (SADH), que codifica una deshidrogenasa de alcohol secundario y que es común para las tres especies. Aunque se han encontrado cepas de cada especie del complejo en muestras de pacientes humanos, los aislados clínicos predominantes son de *C. parapsilosis*

A pesar de la importancia de *C. parapsilosis* como patógeno emergente, las técnicas de identificación microbiológicas se han visto limitadas, no sólo entre el complejo parapsilosis sino además entre otras especies como lo son *C. guillermondi*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata*; a consecuencia de que la identificación de las levaduras se basa en métodos microbiológicos convencionales, que poseen ambigüedades e incorrecciones en los resultados, ya que se ha observado que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo celular. (Cannon *et al*, 1995; Becker, 2000). Por otro lado las técnicas moleculares disponibles son complejas, laboriosas y costosas. En estas se necesitan emplear al menos 2 pasos para la obtención de resultados, además de no existir una técnica molecular de referencia bien establecida.

Por lo tanto, el presente trabajo implicó generar un método de identificación *C. parapsilosis* a partir de la amplificación de un elemento del genoma presente únicamente en la especie a identificar mediante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sobre el género *Candida*

El género *Candida* corresponde a un grupo de hongos levaduriformes y se clasifica taxonómicamente dentro del phylum Ascomycota, orden Saccharomycetales y pertenece a la familia Saccharomycetaceae (Trofa *et al*, 2008). Microscópicamente las células de este género son globosas, ovoides con un tamaño medio de 3 a 5 μm y se reproducen por gemación multipolar; en ocasiones formando pseudomicelio y/o tubo germinal dependiendo de la especie. Macroscópicamente forman colonias blanquecinas, húmedas de bordes definidos después de 48 horas de incubación en agar papa dextrosa (Bonifaz, 2012).

Se conocen alrededor de 300 especies las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza y su importancia radica en la variedad de cuadros clínicos que éstas pueden causar. Aproximadamente 17 de estas especies se han asociado con enfermedades en humanos, siendo *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* las principales causantes de infecciones. (Dismukes *et al*, 2003; Kavanagh, 2005).

Es posible encontrar a estas levaduras en un estado comensal, ya que *Candida* no es patógeno estricto, sino que forman parte de la microbiota normal de las mucosas del tracto respiratorio, digestivo y genitourinario, así como de la piel de humanos y de animales de sangre caliente (Gatica *et al*, 2002).

La principal causa de su patogenia está relacionada con las alteraciones del sistema inmunológico del hospedero, así como otros factores predisponentes que pueden interferir en el equilibrio biológico que mantienen las levaduras en su estado comensal, originando así infecciones de distinta localización y gravedad denominadas candidiasis (Mendoza, 2005). Estas infecciones tienen una alta incidencia a nivel mundial, y son frecuentes en individuos de cualquier edad, raza o sexo.

El potencial patógeno de las especies varía de forma considerable siendo, hasta el presente, *C. albicans* el principal agente causal de enfermedades que pueden llegar a ser mortales en seres humanos (Bonifaz, 2012).

Por otro lado, en las últimas décadas se ha elevado el número de casos de candidiasis y se observa un cambio considerable en la distribución de especies. Siendo cada vez más frecuente el aislamiento de especies no-*albicans* (Rodero *et al.* 2005; Trofa *et al.* 2008; Land *et al.* 2009). De acuerdo a los reportes por parte del Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY, *C. albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia (48.4%) en candidemias, seguida de *C. glabrata* (18%), *C. parapsilosis* (17.2%), *C. tropicalis* (10 %), *C. krusei* (1.9%) y *Candida spp.* (4.5%) (Pfaller *et al.*, 2011).

2.2 Generalidades de *Candida parapsilosis*.

C. parapsilosis es un patógeno oportunista exógeno que puede ser encontrado en la piel y en superficies mucosas. Las células de *C. parapsilosis* pueden presentar formas ovaladas, redondas o con disposición cilíndrica, con un tamaño que oscila entre 2.5-4 x 2.5-9 μm . Las colonias típicas son de color blanco, cremoso y de aspecto brillante, mientras que el borde puede ser liso o rugoso. (Trofa *et al.*, 2008).

A diferencia de *C. albicans*, *C. parapsilosis* no forma hifas verdaderas, pero si puede realizar una transición dimórfica de levadura a pseudohifa. Por lo que es posible encontrarla en ambas fases (Butler *et al.*, 2009). Estas pseudohifas se encuentran vinculadas a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, producido a partir de L-ornitina y carbamoil-fosfato en la ruta de biosíntesis de arginina (Inglis *et al.* 2012), la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del microorganismo (Kim *et al.* 2006; Treviño *et al.*, 2012). Debido a esto se han observado diferentes morfotipos (figura 1); la morfología celular crepé (a), concéntrica (b), lisa (c) y cráter (d).

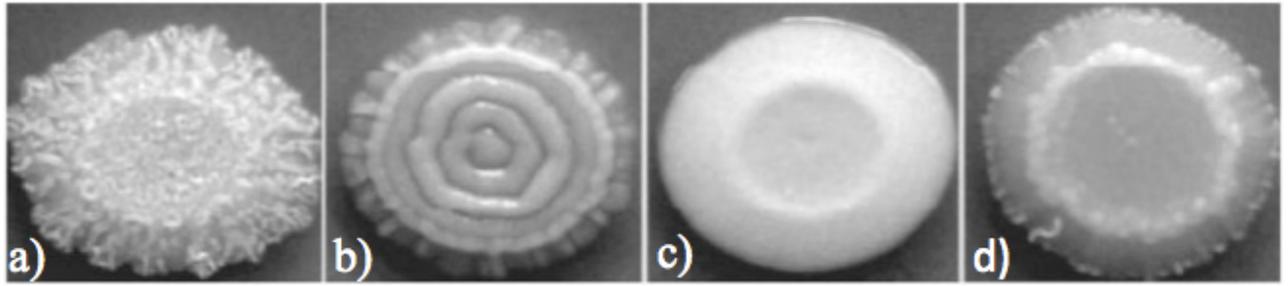


Figura 1. Diferencias morfológicas coloniales obtenidas a partir de aislados clínico de *Candida parapsilosis*. Estos fenotipos están relacionados con la morfogenia de la levadura, mientras que los fenotipos crepé (a) y concéntrico (b) están compuestos principalmente por pseudohifas, los fenotipos cráter (d) y lisa (c) lo están por levaduras (Laffey y Butler, 2005).

Respecto a las condiciones de cultivo, *C. parapsilosis* presenta requerimientos nutritivos relativamente simples, pudiendo crecer sobre un sustrato mineral que contenga fuente de carbono (glucosa u otros azúcares), nitrógeno (sales de amonio), fosfato, azufre y algunos cationes divalentes, pero en cambio es incapaz de asimilar y fermentar la lactosa (Silva *et al*, 2011).

2.3 Historia taxonómica

En 1928, Ashford realizó el primer aislamiento de *C. parapsilosis* a partir de las heces de un paciente con diarrea en Puerto Rico, siendo nombrada originalmente como *Monilia parapsilosis* y descrita como una especie incapaz de asimilar la maltosa (Trofa *et al*, 2008). No había sido considerado como patógeno, hasta 1940 cuando fue identificada como agente etiológico de un caso fatal de endocarditis en un consumidor de drogas intravenosas (Joachim y Polayes, 1940).

En 1987, Scherer y Stevens propusieron la aplicación de la técnica molecular RFLP para el análisis de variabilidad genética en aislamientos clínicos de *C. parapsilosis*. En sus estudios descubrieron tres distintos patrones de restricción no reportados previamente en la literatura médica, con lo cual se sugirió que *C. parapsilosis* poseía una elevada variabilidad genética.

Posteriormente, en 1992, Lehmann y colaboradores utilizando la técnica de “DNA Aleatoriamente Amplificado” (RAPD, por sus siglas en inglés), encontraron tres

distintos patrones de bandeo en aislamientos de *C. parapsilosis*, los cuales fueron clasificados dentro de tres diferentes grupos bajo la misma especie (*C. parapsilosis* grupo I, *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III).

En 1998, Roy y Meyer se apoyaron en estudios de homología del DNA y en base patrones de restricción, confirmaron la existencia de tres distintos genotipos de *C. parapsilosis* pobremente relacionados a nivel de especie, apoyando con esto su división temprana en tres especies filogenéticamente independientes.

Finalmente en el 2005 hubo una reclasificación, ya que este complejo fenotípicamente idéntico, posee diferencias genotípicas entre los aislamientos. De tal forma *C. parapsilosis* grupo I, mantiene el nombre de *C. parapsilosis* (también llamado *C. parapsilosis sensu stricto*) mientras que los aislamientos del grupo II y III constituyen las nuevas especies *C. orthopsis* y *C. metapsilosis* (Tavanti *et al*, 2005).

Tavanti se basó en la comparación de las secuencia del ITS1 de los tres grupos de *C. parapsilosis* con la de otras 15 especies de *Candida* y *Saccharomyces cerevisiae*. Ellos reportaron que *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III se encontraban más relacionadas filogenéticamente entre ellos que con respecto a *C. parapsilosis* grupo I, y así mismo que la distancia filogenética que separaba a *C. dubliniensis* de *C. albicans* es la misma que separaba los tres grupos de *C. parapsilosis*.

2.4 *Candida parapsilosis* como patógeno emergente

C. parapsilosis se encuentra como comensal de la piel humana, razón por la que se encuentra asociada a una amplia gama de entidades clínicas, desde infecciones superficiales hasta infecciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida del paciente.

Su papel como patógeno emergente surge una década después del surgimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en 1980. Tras su aparición se ocasionó la emergencia y reemergencia de una gran cantidad de enfermedades, observándose un incremento en infecciones causadas por hongos oportunistas como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus* spp. (McNeil *et al*, 2001).

Durante esta misma década, *C. albicans* fue considerada el principal agente causal de la candidiasis invasiva, manifestación que se caracteriza por la presencia de levaduras del género *Candida* en sangre y a su posterior diseminación a otros órganos (candidiasis diseminada) siendo responsable de una variedad de enfermedades oportunistas graves, que incluyen endocarditis, meningitis, endoftalmitis, entre otras (Bonifaz, 2012).

Para 1990, *C. albicans* que presentaba un alta incidencia del 70%, disminuyó cerca del 50%. Lo que representó un cambio epidemiológico hacia un conjunto de especies denominadas *Candida* no-*albicans*, entre las cuales se encuentran *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Este cambio en la distribución de las especies fue en gran medida al abuso de antimicóticos, siendo estas especies no-*albicans* más resistentes a los antifúngicos convencionales que la misma *C. albicans* (Pfaller *et al*, 2007).

Por otra parte, otro factor que se debe tomar mucho en cuenta es que los métodos de identificación de microorganismos y particularmente de especies del género *Candida* han mejorado en años recientes, un ejemplo clave fue el correcto discernimiento de *C. dubliniensis*, especie que era identificada como *C. albicans* hasta 1995; tras diferencias fenotípicas en la formación de clamidosporas así como en perfiles de asimilación de carbohidratos, se obtuvo suficiente evidencia genómica adicional para separar a ambas especies después de la obtención de diferentes patrones de bandeo mediante análisis DNA fingerprinting (Haynes, 2001; Sullivan *et al*. 1995).

En el 2007, la candidiasis invasiva se convirtió en un importante problema de salud pública debido a las altas tasas de mortalidad, alcanzado cifras de hasta el 78%, representado *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* en conjunto alrededor del 95% de agentes causales de candidiasis invasiva; de estos *C. albicans* y *C. glabrata* se relacionan ampliamente con infecciones urogenitales, *C. parapsilosis* es un problema particular en receptores de trasplantes, neonatos y pacientes que reciben nutrición parental, mientras que las infecciones por *C. tropicalis* son asociadas más comúnmente con la neutropenia. Otras especies incluyendo *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* representan cerca del 5% de la candidiasis invasiva (Pfaller y Diekma, 2007).

Trofa y colaboradores (2008) reportaron el posicionamiento de *C. albicans* como el principal agente causal de la mayor parte de las fungemias alrededor del mundo, con un 49.8% de aislamiento, encontrándose precedida por *C. parapsilosis* con un 19% (Pfaller y Diekma, 2007).

En latinoamérica la frecuencia de ese serio problema debido a *C. parapsilosis* se incremento, principalmente en Brazil y México (Colombo *et al*, 1999, 2006; González *et al*, 2008; Morales-Mendoza *et al*, 2013).

En el 2008, se reportó que *C. parapsilosis* es el principal agente causal de la candidiasis invasiva en Monterrey, Nuevo León, con una incidencia del 37.9%, precedida por *C. albicans* y *C. tropicalis* con un 31.9% y 14.8% de incidencia respectivamente (Treviño Rangel *et al*, 2012).

En el 2013, el Hospital General Dr. Manuel González, en el cd. de México, presenta que *C. parapsilosis* fue la especie más aislada con un 59%, a partir de pacientes con candidiasis invasiva, seguida de *Candida* spp (18%), *C. albicans* (9%) y *C. glabrata* (13.6%) (Morales *et al*, 2013).

C. parapsilosis también se encuentra como patógeno recurrente en otras manifestaciones de la candidiasis, como ya se mencionó anteriormente al ser parte de la microflora normal de la piel humana, puede ocasionar lesiones superficiales en uñas, piel y mucosas (Dizbay *et al*, 2010; Clark *et al*, 2004; Barchiesi *et al*, 2004).

En el laboratorio de Micología y fitopatología (LMYF) se realizó un estudio en pacientes diabéticos con candidiasis bucal, donde la incidencia de *C. parapsilosis* fue del 87% en pacientes no controlados (Garza Zaragoza *et al*, 2012).

Por otra parte, las infecciones vaginales no suelen ser tan comunes, *C. albicans* se encuentra asociada con el 85% al 95% de los casos, sin embargo la infecciones producidas por *C. parapsilosis* tienden a comprometer seriamente a las pacientes debido a la secreción de proteínasas aspárticas (Agatensi *et al*, 1991), que son enzimas capaces de lisar la mucosa normal del tracto vaginal (De Bernardis *et al*, 1989). Las infecciones urinarias cada vez son más frecuentes, han aumentado en los últimos años debido al uso

de sistemas de drenaje urinario en pacientes nosocomiales, ya que el microorganismo suele adherirse y formar biopelículas a la superficie de los mismos; un factor determinante en la colonización e infección (Camacho *et al*, 2007; Tamura *et al*, 2003).

C. parapsilosis es conocida por su habilidad para formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos de implantes, presenta una alta diseminación nosocomial debida a la mala higiene de manos, así como a la elevada persistencia en ambientes hospitalarios.

El aumento de las infecciones debidas a *C. parapsilosis* se ha atribuido a una amplia variedad de factores de riesgo incluso a la capacidad selectiva del microorganismo para crecer en soluciones ricas de glucosa, empleadas para la nutrición vía parental en hospitales, por lo que pacientes inmunocomprometidos, como afectados de SIDA y pacientes nosocomiales, especialmente los sometidos a una cirugía extensiva del tracto gastrointestinal, presentan un riesgo elevado de candidiasis por *C. parapsilosis*.

No obstante, la población más sensible a sufrir infecciones nosocomiales por dicha levadura, son los neonatos con muy bajo peso al nacer, donde frecuentemente se asocia con la mortalidad de los mismos (Shin *et al*, 2002; Wisplinhoff *et al*, 2004; Trofa *et al*, 2008; Van Asbeck *et al*, 2009).

2.5 Características genómicas

La comparación de genomas ha permitido la observación de las variaciones que existen en la composición y el tamaño de los genomas pertenecientes al género *Candida* (Tabla 5). El tamaño del genoma varía desde 12.2 hasta 27.56 Mb. El contenido de Guanina-Citosina (GC) varía de 33% a 44.5%. A pesar del tamaño del genoma y la variación fenotípica entre las especies, los números predichos de genes codificantes de proteínas son muy similares y van desde 5,733 a 6,658 genes, a excepción de *C. albicans* SC5314 que presenta 14, 217. Incluso las pequeñas diferencias en el número de genes no se correlacionan con el tamaño del genoma.

Tabla 1. Características de los genomas de especies pertenecientes al clado CTG, incluyendo *Candida glabrata* (candidagenome.org; Butler *et al*, 2009).

Organismo	Genoma (Size)	Cromosomas	GC%	Genes	Proteínas
<i>Candida albicans</i> SC5314	27.56	8	33.4	14,217	14,217
<i>Candida albicans</i> WO-1	14.47	8	33.5	6101	5752
<i>Candida dublinensis</i>	14.6	8	33.2	6095	5860
<i>D. hansenii</i>	12.2	7	36.3	6658	6290
<i>Candida glabrata</i>	12.24	13	38.6	5499	5312
<i>Candida parapsilosis</i>	13.08	8	38.7	5733	¿?
<i>Candida orthopsilosis</i>	12.66	8	37.6%	5787	5678
<i>L. elongisporus</i>	15.55	-	37.0	5908	5799
<i>C. tropicalis</i>	14.5	8	33.1	6441	6254
<i>C. guillermondii</i>	10.6	-	43.8	6062	5920
<i>C. lusitaniae</i>	12.1	-	44.5	6153	5936

Butler y colaboradores (2009) propusieron el árbol evolutivo de *Candida* spp. y otros hongos filogenéticamente más cercanos, tales como *Lodderomyces elongisporus*, *Debaryomyces hansenii* y nueve especies relacionadas con *Saccharomyces* sp. Este estudio cuya finalidad fue determinar las características genéticas subyacentes, su diversidad de la biología y la patogénesis, se basó en las divergencias encontradas en el análisis del gen de la subunidad nuclear pequeña (18S) del DNAr.

Los resultados indicaron la presencia de dos grupos: por un lado el clado CTG, que incluye levaduras en las que el codón CTG inusualmente codifica para serina en lugar de leucina (*C. albicans*, *C. dublinensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guillermondii* y *C. lusitaniae*) y por otro el clado WGD, que abarca levaduras que han sufrido una duplicación de su genomas (*Saccharomyces* spp. *Kluyveromyces* spp. y *C. glabrata*) (Figura 2) (Santos *et al*, 1995; Butler *et al*, 2009).

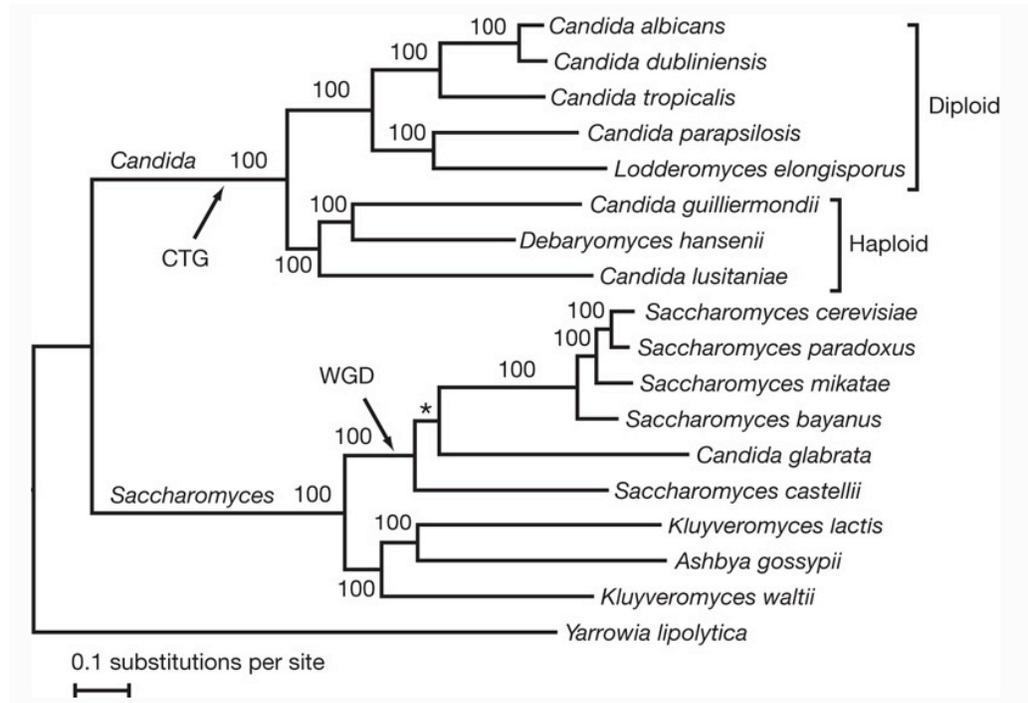


Figura 2. Árbol filogenético de *Candida* spp. y el clado *Saccharomyces* (Butler *et al*, 2009).

Uno de los más interesantes hechos que se han estudiado en el genoma de *C. albicans* es la ocurrencia de rearrreglos numéricos y estructurales cromosomales, como medio de generar diversidad genética (Butler *G et al*, 2009).

Los cambios genéticos pueden ser sutiles debido a mutaciones, inserciones o deleciones de nucleótidos individuales, o bien severamente drásticos como la duplicación o pérdida de segmentos cromosómicos, cromosomas enteros o genomas completos.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en diferentes genomas de una misma especie. Debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. Butler y colaboradores (2009) encontraron diferentes tasas de SNPs en dos cepas de *C. albicans*, para la cepa WO-1 se detectó la presencia de 36925 SNPs en WO-1 (1 SNP cada 330-390 pb) y 43665 SNPs se encuentra dentro SC5314 (1 SNP cada 330 pb). Para otros genomas diploides, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y

su pariente cercano *L. elongisporus*; se identificaron 24.756 SNPs (1 SNP / 589 pb), 842 (1 SNP cada 15.553 pb) y 72.820 SNPs (1 SNP cada 213 pb), respectivamente.

Los reordenamientos en el genoma de un organismo pueden ser posibles debido a la presencia de elementos móviles y a su capacidad para saltar, unir e interrumpir secuencias de DNA, propiciando la adquisición de nuevas funciones y así como a la pérdida de otras.

Las diferencias resultantes teniendo en cuenta el comportamiento y la organización del cromosoma puede reducir algunas capacidades en subpoblaciones o dá como resultado la emergencia de nuevas especies.

Cuando comparamos diversas especies de este género podemos observar claras similitudes en su composición y organización genómica. Una gran cantidad de genes conocidos identificados como ortólogos mantienen la similitud de secuencia e inclusive de función en diferentes especies.

Se dice que los genes ortólogos se generan mediante eventos de especiación, mientras que los genes homólogos conocido como parálogos (dos copias del mismo gen en el mismo genoma) se generan por duplicación de genomas o de regiones específicas.

Estos eventos dan lugar a un sinnúmero de copias de genes que le confieren una gran plasticidad metabólica en estas levaduras que, lejos de representar un peligro para los organismos, les aporta la capacidad de adaptación a cambios en el medio ambiente; por lo tanto los eventos de inversión, translocación, duplicación, inserciones intraespecíficas, así como la introducción de material genético externo en el genoma de un organismo podría aumentar la posibilidad de adaptación del organismo para continuar su subsistencia.

2.5.1 Homología entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Candida dubliniensis es el pariente más cercano de *C. albicans*, pero *C. dubliniensis* es significativamente menos adaptable a ambientes desfavorables que *C. albicans* (McManus y Coleman, 2014).

El estudio de la disposición de los genomas de ambas levaduras, ha permitido identificar los genes que están ausentes o divergen entre estas dos especies. Aunque en la mayoría de los casos, los genes de ambas especies son tan similares que se podría inferir su homología, ya que en ocasiones presentan valores de aproximadamente 90% de identidad mientras que algunos genes altamente conservados muestran hasta 98% de identidad (Sullivan *et al*, 2005).

Por otro lado, *C. dubliniensis* ha sufrido la pérdida de genes significativos y presenta una gran cantidad de pseudogenes, mientras que las familias de genes en *C. albicans* han sido ampliadas, lo cual es considerado importante en su virulencia (McManus, 2008).

A manera global Jackson *et al*, 2009, a través de la comparación de genomas completos observaron eventos de translocaciones cromosómicas en *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Esta reestructuración en el genoma de una de estas levaduras, pudo ser uno de los factores o eventos que ocurrieron durante la especiación de estas dos levaduras a partir de su posible ancestro común.

El genoma de *C. albicans* es altamente plástico y sus aislados clínicos muestran una gran variabilidad en su cariotipo (Chibana *et al*, 2000). Reordenamientos cromosómicos se toleran muy bien en *C. albicans* y con frecuencia se producen en respuesta al estrés, tales como choque térmico, las interacciones huésped-patógeno y la presencia de medicamentos antifúngicos (Selmecki *et al*, 2006; Bouchonville *et al*, 2009 y Fourche *et al*, 2010).

2.5.2 Complejo parapsilosis

Con el fin de distinguir entre las tres especies, Tavanti *et al*, (2007) han propuesto el análisis de polimorfismo de restricción del gen de la SADH, que codifica una deshidrogenasa de alcohol secundario y es común a las tres especies:

C. parapsilosis, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Todas las especies del complejo parapsilosis son miembros del clado CTG y a pesar de la secuenciación del genoma de *C. parapsilosis* en el 2009 y de *C. orthopsilosis* en el 2012, los análisis moleculares siguen siendo limitados.

Tras la comparación de ambos genomas se encontró que ambas especies difieren por un mínimo de 7 eventos de translocación recíproca. Además, de un total de 397 secuencias invertidas, incluyendo 240 pequeñas inversiones en un gen pequeño y 157 casos que involucran grandes inversiones en más de un gen (Riccombeni *et al*, 2012).

El eje horizontal representa los 8 cromosomas de *C. parapsilosis*, ordenados por tamaño; el eje vertical de igual manera, muestra los 8 cromosomas de *C. orthopsilosis*. El alineamiento de secuencias entre las dos especies está representado en negro si éstas se encuentran en la misma dirección, y en rojo si están en dirección opuesta (Figura 3).

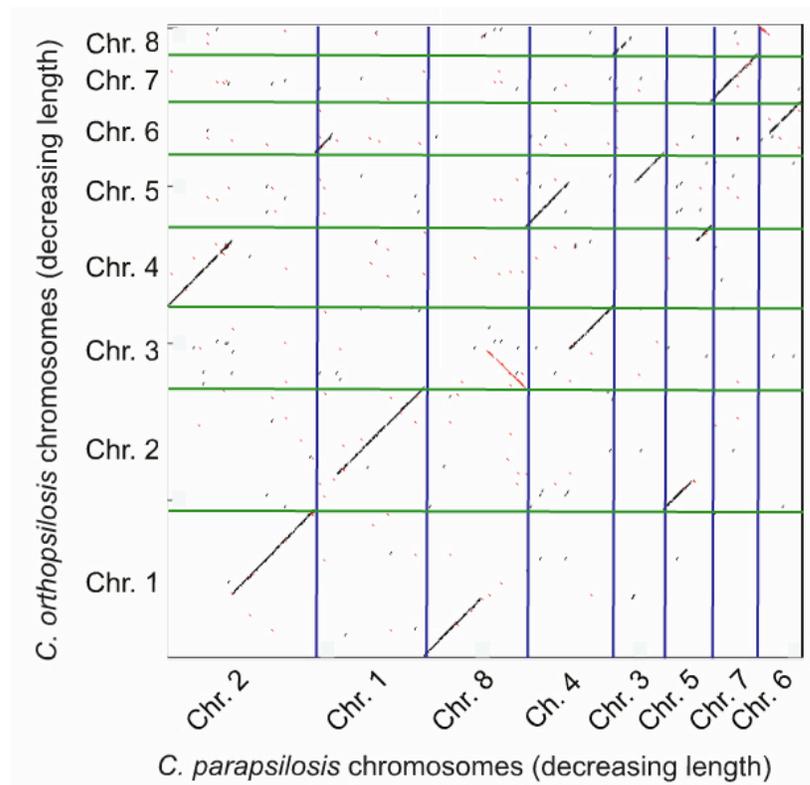


Figura 3. Comparación genómica de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* mediante Dot blot (Riccombeni *et al*, 2012)

Asimismo, en este mismo estudio se identificaron 5.700 genes codificadores de proteínas en *C. orthopsilosis*, de los cuales 5570 tienen un ortólogo en *C. parapsilosis*. Estimándose que la relación filogenética entre *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* es dos veces más grande como la que existe entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* (Figura 4).

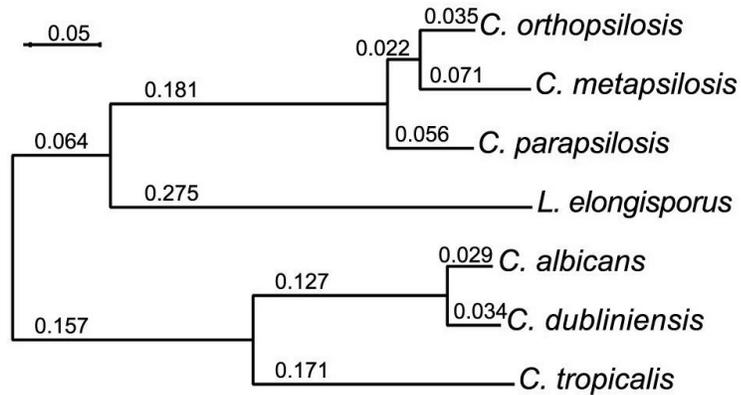


Figura 4. Árbol filogenético del complejo parapsilosis y *Candida* spp. Relación filogenética entre 7 especies a partir de 1334 proteínas homólogas (Riccombeni *et al*, 2012).

2.6 Factores de virulencia

Durante años se han realizado diversas investigaciones para descifrar la patogénesis en *C. albicans*, sin embargo se conoce relativamente poco sobre la base genética de los factores de virulencia que le permiten a *C. parapsilosis* causar enfermedad. En particular, tanto la adhesión a las células hospederas como la formación de biopelículas permiten la invasión a tejidos, la resistencia a antifúngicos, al igual que el daño a células y a moléculas especializadas del sistema inmune. Así mismo, la secreción de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y fosfolipasas, juegan un papel crucial durante la infección, ya que estas enzimas pueden digerir o distorsionar las membranas celulares, facilitando la adhesión e invasión a tejidos por parte de la levadura (Singaravelu *et al*, 2014).

2.6.1 Adhesinas

Una característica de *Candida albicans* que se correlaciona de forma positiva con su patogenicidad es la capacidad adherente a las células del huésped. Las cepas adherentes de *C. albicans* son más patógenas que las que tienen un fenotipo menos adherente.

Una adhesina se define como una proteína que promueve la adherencia de *Candida* a las células del hospedero o bien, a sus ligandos específicos. Por lo tanto la colonización e infección por *Candida* spp. depende de la habilidad de adhesión. Se han descrito adhesinas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV (Chaffin, 1998; Sturtevant y Calderone, 1997; Hostetter, 1994). Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, que pueden ser codificadas por diferentes genes como: Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p.

2.6.1.1 Familia génica Als

Los genes de la familia Als de sus siglas en inglés (Alpha-agglutinin-like sequence o adhesinas) se describieron primero en *C. albicans* y esta familia incluye al menos, nueve genes.

Cada gen Als tiene una estructura similar de tres dominios, que incluyen un dominio 5' de 1299 a 1308 pb, que es similar en 55 a 90% entre los componentes de la familia, un dominio central con un número variable de secuencias repetidas de 108 pb y un dominio 3' que tiene una longitud relativamente variable entre los genes de esta familia (Hoyer, 2001) (Figura 5).

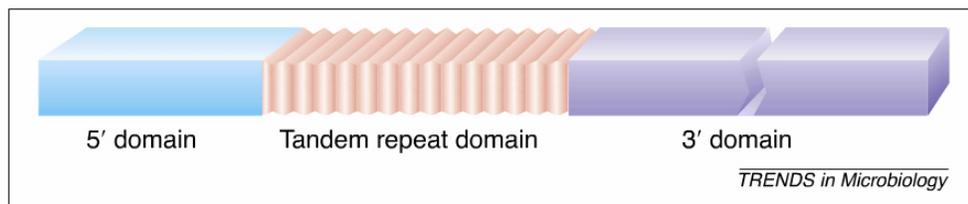


Figura 5. Esquema de la estructura del gen de la ALS. (Hoyer, 2001)

El dominio de repetición variable incluye una secuencia interna de cinco aminoácidos: Valina-Alanina-Serina-Ácido glutámico-Serina (VASES). Los genes Als están regulados diferencialmente en *C. albicans* por condiciones fisiológicas relevantes como cambios en el medio de cultivo (Als1), morfología (Als3/Als8) y fase de crecimiento (Hoyer, 1995; Hoyer, 1998).

Desde su caracterización inicial se notó que el producto traducido del gen Als1 comparte una secuencia con la glucoproteína de adhesión a superficies celulares llamada aglutinina, codificada por *Saccharomyces cerevisiae* (AGb1). Dicha molécula se requiere para el reconocimiento célula-célula.

Mediante mapas físicos se han demostrado la presencia de genes ALS localizados en 3 de 8 cromosomas de *C. albicans* (Hoyer y Hecht, 2001; 2000; Hoyer *et al.*, 1998; 1995), así mismo estos genes codificadores de adhesinas también se han reportado en otras especies como lo son *C.dublinsiensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Tabla 2).

Tabla 2. Genes ALS reportados en la literatura de algunas especies del género *Candida*. (Hoyer, 2001).

Familia génica	<i>C. albicans</i>	<i>C.dublinsiensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>
Adhesinas ALS	8 miembros -ALS1, ALS2, ALS4, ALS5 y ALS9 en cromosoma 6 -ALS6 y ALS7 en cromosoma 3 -ALS 3 en cromosoma R	8 miembros (ALS1-7 y 9)	3 secuencias reportadas.	2 miembros ALS1 Y ALS3

2.6.1.2 Formación de biopelículas

La formación de biopelículas de *C. albicans* se distingue por la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración.

Las biopelículas son comunidades de microorganismos asociadas a superficies dentro de una matriz extracelular y son el tipo más prevalente de crecimiento microbiano (Baillie y

Douglas, 1999). La formación de biopelículas es un importante factor de virulencia para varias especies de *Candida*, ya que limita la penetración de antifúngicos, confiriendo resistencia significativa a la terapia, además de protección frente a la respuesta inmune del hospedero.

La resistencia clínica se define como la persistencia o progresión de una infección, a pesar del tratamiento antimicrobiano apropiado. La resistencia a antifúngicos por biopelículas de *Candida* se demostró por primera vez en 1995, en ensayos de catéteres (Hawser y Douglas, 1995). Aunque las biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* son claramente resistentes a los nuevos triazoles (voriconazol y ravuconazol), hay reportes de actividad antibiopelículas de formulaciones con lípidos de anfotericina B y dos equinocandinas, la micafungina y la caspofungina (inhibe la síntesis de b1,3 glucano, principal componente estructural de las paredes celulares de *Candida*) (Trofa *et al*, 2008).

En 2005 Song y colaboradores reportaron que *C. parapsilosis sensu stricto* era la única especie del complejo capaz de producir biopelículas. Sin embargo, Lattif y colaboradores en el 2010 reportaron que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* también eran capaces de producirlas.

2.6.2 Proteasas

Las aspartil proteinasas (Saps) pertenecen a la familia A1 de las peptidasas. Esta familia comprende proteínas cuya molécula es una sola cadena que forma dos dominios con diferentes secuencias de aminoácidos, pero con plegamientos similares. El sitio catalítico de estas enzimas (Figura 6) está formado por la unión de dominios y contiene 2 residuos de ácido aspártico, uno en cada dominio, Asp 32 y Asp 215 (Andreeva y Rumsh, 2001).

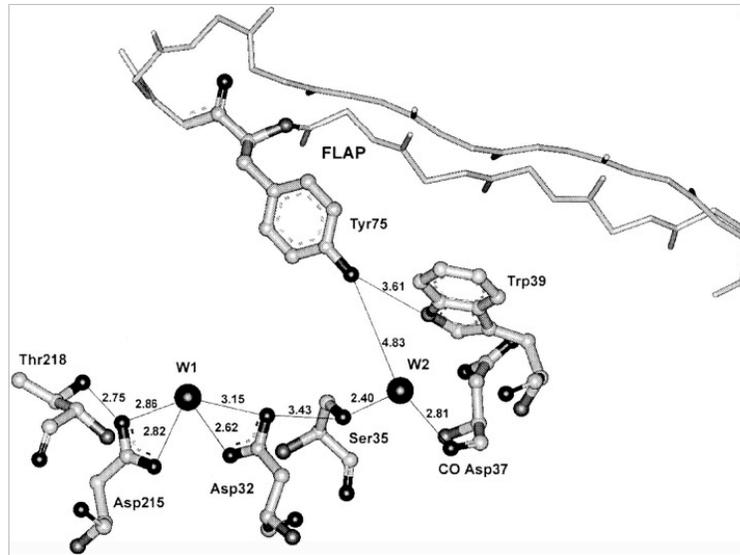


Figura 6. Sitio catalítico y región circundante de pepsina (aspartil proteinasas) (Andreeva y Rumsh, 2001).

La secreción de aspartil-proteasas facilita la colonización e invasión de los tejidos del hospedador por ruptura de las membranas y degradación de importantes proteínas inmunológicas, como la cadena pesada de la inmunoglobulina G, la α - 2 macroglobulina, colágeno y fibronectina (Baillie *et al*, 1998).

2.6.2.1 Familia génica SAP

En *C. albicans*, la secreción de esta enzima es un determinante de virulencia importante y se han identificado 10 genes codificantes a SAPs (SAP1-SAP10). Además se ha demostrado su presencia en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* (Tabla 3).

Tabla 3. Genes SAP reportados en la literatura de algunas especies del género *Candida* (Naglik *et al*, 2003; Horváth *et al*, 2012).

Familia génica	<i>C. albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.orthopsilosis</i>
SAP (Aspartil-proteasa)	10 miembros (SAP1-SAP10)	8 miembros (SAP1-SAP8)	4 miembros (SAP1-4)	SAPP1, SAPP2 SAPP3 (SAPP1a y SAPP1b)	SAP7,SAP8, SAP9 Y SAP10

Basándose en secuencias aminoácidas, las aspartil-proteasas de *C. albicans* forman 3 subgrupos de familias: Sap1-3, Sap4-6 que están estrechamente agrupadas y Sap9-Sap10, Sap8 que están remotamente relacionados con los tres grupos, mientras que Sap7 tiene poca relación (Naglik *et al*, 2003; Sther *et al*, 2000) (Figura 7).

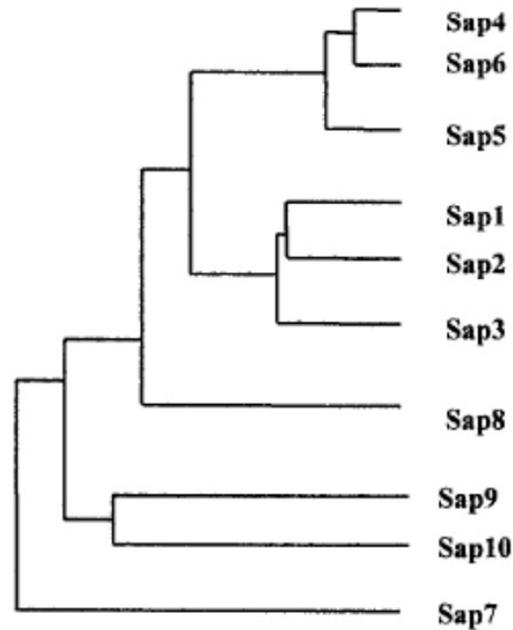


Figura 7. Dendrograma de la familia proteica aspartil-proteinasas en *C. albicans* (Naglik *et al*, 2003).

El gen codificante para proteinasas con mayores niveles de expresión en *C. albicans* es SAP2, dicho gen está regulado por un mecanismo de retroalimentación positiva, es decir, la acumulación de péptidos resultantes de la proteólisis de proteínas; SAP1 Y SAP3, son expresados diferencialmente *in vitro* cuando *C. albicans* presenta *switching* fenotípico, lo que le permite adaptarse a distintos ambientes durante el curso de infección *in vitro* especialmente en respuesta a estrés.

Por otra parte SAP4-6 son expresadas casi exclusivamente durante la formación de hifas a valores de pH neutros, mientras que *in vitro* SAP8 está regulada por la temperatura, ya que su expresión es mayor a 30°C que a 37 °C, lo que sugiere que este gen podría expresarse preferencialmente durante infecciones superficiales (piel). Sin embargo, esto no es un indicador confiable de su función, de hecho, SAP8 es expresado eficientemente a temperaturas fisiológicas durante infecciones humanas y animales.

En contraste Sap9 y Sap10 están asociadas a procesos regulatorios en la superficie celular que son fundamentales para la máxima patogenicidad durante la interacción con tejidos epiteliales (Naglik *et al*, 2004).

Se han caracterizado 3 genes SAP en *C. parapsilosis* (SAPP1-SAPP3), pero se han encontrado 14 secuencias que podrían estar codificando la secreción de aspartil-proteasa (Parra-Ortega *et al*, 2009).

Recientemente se analizó la virulencia de SAPP1 de *Candida parapsilosis*, los análisis *in silico* de la secuencia SAPP1 revelaron la presencia de dos secuencias génicas idénticas en el genoma de *C. parapsilosis* siendo definidos como SAPP1a y SAPP1b.

Estas dos regiones duplicadas de 2871 pares de bases (pb) presentan un marco de lectura abierto completo de SAPP1 (1206 bp), se identificaron a una distancia de 32 pares de kilobases (kb) uno del otro (Horváth *et al*, 2012).

2.6.3 Lipasas

Las lipasas extracelulares microbianas son factores de virulencia en una amplia gama de bacterias y hongos; catalizan la hidrólisis y la síntesis de triglicéridos y se caracterizan por su estabilidad a altas temperaturas y frente a disolventes orgánicos, así como a la resistencia a la proteólisis (Crump y Collignos, 2000).

2.6.3.1 Familia génica LIP

Hasta la fecha, 10 genes de lipasas se han identificado en *C. albicans*, (Hube B *et al*, 2000) y de los cuales sólo LIP8 tiene importancia en la virulencia de dicha levadura, ya que al suprimir la expresión de LIP8, puede afectar significativamente la virulencia (Gacser A *et al*, 2007) (Tabla 4).

Sólo dos genes de lipasa se han reportado en *C. parapsilosis*: LIP1 y LIP2, de los cuales sólo este último ha sido demostrado que codifica para una proteína activa (Brunel *et al*, 2004; Neugnot *et al*, 2002).

Tabla 4. Genes LIP reportados en la literatura de algunas especies del género *Candida* (Hube *et al*, 2000; Neugnot *et al*, 2002; Brunel *et al*, 2004; Gacser *et al*, 2007).

Familia génica	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
LIP (Lipasas)	10 miembros (LIP1-10)	2 miembros CpLIP1 y CpLIP2	No reportados

2.6.4 Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas capaces de hidrolizar una o más de las uniones éster de los glicerofosfolípidos. La función de las fosfolipasas durante la infección aún no se conoce bien, aunque se cree que interviene en la destrucción de membranas (Ghannoum, 2000).

La actividad de las fosfolipasas se ha implicado en la virulencia de *C. albicans* en varios sistemas experimentales. Las fosfolipasas se han asociado a virulencia en modelos murinos de infección, adhesión a células epiteliales, penetración en células del hospedador e invasión de epitelio oral humano reconstituido (Calderone y Fonzi, 2003).

El papel de las fosfolipasas en *C. parapsilosis* durante el proceso infeccioso aún no se comprende del todo, aunque se hipotetiza que se encuentran involucradas en la ruptura de las membranas de las células del hospedero. (Calderone y Fonzi, 2003).

2.6.4.1 Familia génica PLB

Se han identificado cuatro multifamilias génicas de fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD), de las cuales sólo la PLB ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidiasis. PLB posee una familia génica de 5 integrantes (PLB1-5) (Tabla 5).

Tabla 5. Genes PLB reportados en la literatura de algunas especies del género *Candida* (Ghannoum, 2000).

Familia génica	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
PLB (Fosfolipasas B)	5 miembros (PLB1-5)	PLB1 Y PLB2	No reportados

2.7 Identificación molecular

La identificación microbiológica de levaduras se lleva a cabo atendiendo criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos como el auxonograma, zimograma, producción de ureasa, obtención de clamidosporas y formación de tubos germinativos. Si bien estos son métodos convencionales, involucran una serie de etapas que consumen varios días de trabajo para la identificación de la cepa, además de poder dar falsos resultados positivos (Bonifaz, 2012). Existen medios diferenciales con sustratos cromogénicos útiles para la identificación de *Candida spp.* El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas mediante hidrólisis específicas de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de determinadas especies como *C. albicans* da una coloración verde mientras que *C. tropicalis* da lugar a una coloración azul. (Ruiz-Aragón, 2003).

A diferencia de estas especies, la identificación de *C. parapsilosis* puede ser complicada, ya que puede generar diferentes coloraciones que van desde el blanco al rosa-lavanda, debido a la mezcla de la coloración natural de la colonia y al pigmento resultante de su actividad enzimática. Esta técnica no es capaz de diferenciar bien entre los mismos miembros del complejo parapsilosis y otras especies como lo son *C. guillermondi*, *C. lusitanea* y *C. glabrata*.

Debido a su especificidad y sensibilidad, la PCR es un método atractivo para la detección de diversos organismos. La PCR es un método de gran alcance con aplicaciones generalizadas en el campo de la Biología molecular. Esta reacción enzimática *in vitro* permite la amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN. Cualquier secuencia de ácido nucleico puede ser clonada, analizada o modificada e incluso secuencias extrañas pueden ser detectados mediante la amplificación por PCR (Saiki et al., 1985; Mullis y Faloona, 1987).

Desde su desarrollo en 1985, la PCR ha facilitado en gran medida los estudios genéticos en todos los organismos debido a su especificidad, sensibilidad y la velocidad de esta tecnología, que a lo largo del tiempo ha conducido al desarrollo de diversos métodos para el análisis de variabilidad genética y a la identificación de marcadores genéticos.

Una de las primeras aplicaciones de la PCR en micología fue descrita en 1990 por White *et al.* y se refiere a la amplificación y secuenciación directa de rDNA para establecer la taxonómica y filogenética de los hongos. Las secuencias de rDNA son utilizadas a menudo ya que se encuentran universalmente en las células vivas. Estas secuencias contienen regiones variables y conservadas, lo que permite la comparación y la discriminación de organismos de diferentes niveles taxonómicos. El rDNA nuclear en los hongos es organizado como una unidad de rDNA que se repite en tándem. Una unidad incluye tres genes rRNA: 18S, 5.8S 28S. En una unidad (Figura 8), los genes están separados por dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2).

Los ITS1 e ITS2, son regiones no conservadas que separan los genes ribosomales 18S, 5.8S y 28S, las cuales se encuentran altamente conservadas. El desarrollo de la PCR y el diseño de *primers* para la amplificación de las diversas regiones de rDNA ha facilitado considerablemente los estudios taxonómicos de hongos (White *et al.*, 1990). Estos *primers* universales fueron diseñados a partir de regiones conservadas, lo que permite la amplificación del fragmento de flanco en la mayoría de los hongos y por lo que se han utilizado para investigar características taxonómicas y filogenéticas entre especies del mismo género.

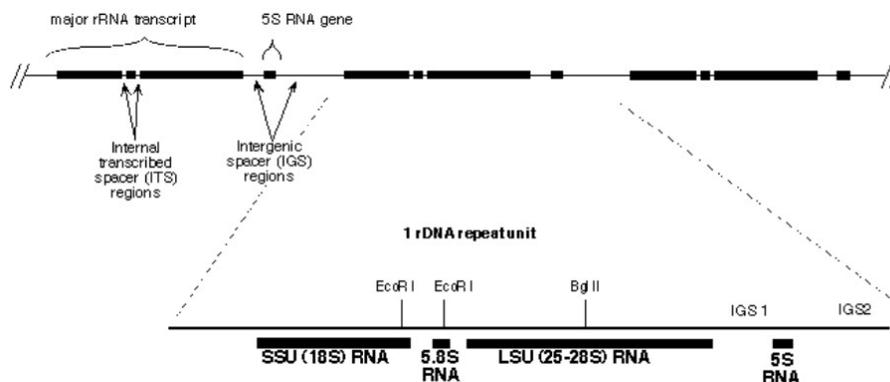


Figura 8. Ubicación de los ITS . Espaciadores transcritos internos en el complejo de genes ribosomales. La región del DNA que codifica para los ribosomas es una única secuencia que se encuentra repetida varias veces una después de otra (en tándem). En esta secuencia repetitiva se pueden encontrar los genes que codifican las subunidades ribosomales 18S, 5.8S y 28S, los cuales se encuentran separados entre sí por los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2). Además se encuentra el gen que codifica para la subunidad ribosomal 5S, el cual se encuentra rodeado por los espaciadores intergénicos 1 y 2 (IGS1 e IGS2) Vilgalys lab, DukeUniversity (www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm).

Otro método molecular muy utilizado para identificación de microorganismos es el Polimorfismo de Longitud en los fragmentos de Restricción del rDNA/rRNA (RFLP), que consiste en la diferenciación de los mismos mediante el análisis de los patrones de corte que se generan en sitios específicos del genoma, cuando es reconocido por enzimas de restricción. En el PCR-RFLP, se amplifican fragmentos específicos de DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis (Orberá-Ratón, 2004).

En el 2011, Chang-Chang y colaboradores emplearon un método de PCR múltiple para la identificación de las levaduras más importantes clínicamente en cultivos aislados en sangre. El método consistía en la amplificación de la región ITS1 entre los genes rRNA 18S y 5.8S por los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, además de un par de oligonucleótidos específicos para *C. albicans* (CA3 y CA4). El resultado arrojó dos bandas, comparadas el resto de las especies que sólo amplifican una banda. La sensibilidad del método fue de 96.9% y la identificación de las especies pudo realizarse en alrededor de 8 horas.

Mirhendi y colaboradores en el 2006 publicaron un trabajo de identificación de seis especies de *Candida* médicamente importantes, por medio de PCR-RFLP, en donde identificaron 137 aislamientos clínicos.

El patrón de RFLP producido por cada especie de *Candida* fue completamente específico por lo que es poco probable que alguna de las especies examinadas pueda ser identificada erróneamente.

En otro reporte de uso de técnicas moleculares, Ayatollahi y colaboradores (2007) utilizaron la PCR con el uso de los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 y la enzima MspI como enzima de restricción para la digestión de esta región de tal manera que pudieron identificar las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. Las muestras que colectaron provenían de aislamientos clínicos de pacientes con vaginitis. De las 27 muestras examinadas, 22 fueron identificadas como *C. albicans*, *C. glabrata* (2/27 7.4%), *C. guilliermondii* (2/27 7.4%) y *C. tropicalis* (1/27). Concluyeron que la enzima MspI, es una enzima de restricción confiable y de gran uso para delimitación de la mayoría de las especies de *Candida*.

Asimismo, Liguori *et al.* 2007, emplearon un método de PCR múltiple para la identificación de *Candida*. En este trabajo utilizaron los oligonucleótidos ITS1 e ITS2, adicionalmente usaron los oligonucleótidos CA3 y CA4 que son específicos para la identificación de *C. albicans* y diseñaron los oligonucleótidos para *C. famata* (ITSF), *C. kefyr* (ITS1K) y *C. dublinensis* (ITS2D). La PCR múltiple identificó todas las muestras que en el cultivo resultaron positivas, especies únicas o especies mixtas, además de las que en los medios fenotípicos rutinarios dieron un resultado negativo.

La identificación molecular de *C. parapsilosis* entre el complejo se basa en técnicas de DNA como ITS y RFLPs principalmente, sin embargo los métodos descritos hasta la fecha tiene diferentes ventajas e inconvenientes, y ninguno de ellos es ideal en términos de velocidad y/o costo por ejemplo en el análisis de longitud secundaria de alcohol deshidrogenasa los fragmentos de restricción BanI (SADH-RFLP), descrito por Tavanti *et al.*, en el 2005 para diferenciar entre las especies pertenecientes al complejo parapsilosis.

En el 2011, Hays *et al*, describieron un ensayo de PCR en tiempo real utilizando el análisis de curva de fusión en una parte del gen SADH.

Este método proporciona una identificación rápida, pero puede exhibir una baja reproducibilidad, ya que es posible observar las variaciones en la curva de fusión cuando se utilizan diferentes termocicladores.

García-Effron *et al*, 2011 propusieron un nuevo método molecular de identificación, cuyos resultados mostraron 100% de concordancia con la secuenciación por ITS1/ITS2. El primer método se basa en la amplificación por PCR del gen FKS1, seguido por una digestión con EcoRI. La región de este gen no presentó mutaciones en cualquiera de los sitios EcoRI de 293 cepas clínicas analizadas, lo que demuestra una baja probabilidad de falsa identificación. Esta metodología es sólida y altamente reproducible. Sin embargo, tiene los mismos inconvenientes como cualquier PCR seguida de una digestión con enzimas de restricción, ya que es mucho tiempo (4 horas más el tiempo de extracción de DNA) y además que se pueden producir problemas de digestiones enzimáticas.

La capacidad de diferenciar entre cepas de hongos estrechamente relacionados se puede lograr mediante la comparación de regiones de DNA con mayor variabilidad tales como la rDNA mitocondrial (White *et al*. 1990). Estudios de la organización genética basados en análisis con enzimas de restricción demostraron que DNA mitocondrial de *C. parapsilosis* posee una estructura lineal muy compacta, en contraste a la típica estructura circular encontrada en las mitocondrias de levaduras como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* y *S. cerevisiae* (Trofa *et al*, 2008).

La arquitectura molecular y organización genética de los genomas mitocondriales del complejo parapsilosis proporcionan la base para el análisis de la diversidad biológica de los aislados clínicos y para el desarrollo de las especies, así como el grupo específico de sondas moleculares dirigidas a secuencias de ADN mitocondrial (Nosek *et al*, 2002).

Souza *et al*, 2012, describieron un ensayo de PCR TaqMan-MGB en tiempo real, utilizando DNA mitocondrial (mtDNA) como objetivo, que distingue fácilmente el complejo parapsilosis. Primero utilizaron genómica comparativa para localizar regiones homólogas entre estos genomas mitocondriales y luego seleccionaron el gen NADH5

como objetivo para el ensayo de PCR en tiempo real. Las sondas fueron diseñadas para incluir una combinación de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido, que son capaces al igual que el resto de las técnicas mencionadas de diferenciar cada especie dentro del complejo parapsilosis.

Debido a que las tasas de mutación en el genoma mitocondrial son más altas que en el genoma nuclear, es posible obtener una resolución suficiente para distinguir entre estrechas relaciones filogenéticas (Clark-Walker, 1991). De hecho, Souza *et al*, 2012 demostraron que las secuencias del mtDNA se pueden utilizar fácilmente para discriminar entre el complejo parapsilosis.

C. parapsilosis carece de diversidad de secuencias de nucleótidos (Tavanti *et al*, 2007). La frecuencia de mutación en *C. albicans* es de aproximadamente 1/140 pb. En contraste, los estudios de *C. parapsilosis* encuentran sólo dos sitios de nucleótidos polimórficos entre secuencias de 7,5 kb (Tavanti *et al*, 2007) y sólo cuatro mutaciones entre más de 36 kb (Fundyga *et al*, 2004). La falta de diversidad de secuencias de nucleótidos sugiere que *C. parapsilosis* es altamente clonal (Trofa D *et al*, 2008). A pesar de que son estructuralmente diversas, las secuencias de codificación del DNA mitocondrial de *C. parapsilosis* son muy similares a las de *C. albicans*. En contraste, un estudio de DNA genómico revela que existe un 59% de identidad entre 3.900 genes de *C. parapsilosis* y *C. albicans* (Logue *et al*, 2005).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las infecciones producidas por *C. parapsilosis* así como otras especies del género *Candida* están constituyendo una causa importante de morbi-mortalidad principalmente en infecciones nosocomiales. Debido a este dramático incremento nos vemos en la necesidad de diseñar nuevos métodos de detección mucho más rápidos y precisos que permitan diferenciar entre las especies más comunes del género *Candida*.

Hoy en día no es complicado tener acceso a algunos de los genomas de *Candida* spp.; ya que recientemente fueron ensamblados los genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, los cuales se encuentran disponibles en diferentes bases de datos. Esto nos permite realizar análisis comparativos de diferentes regiones genómicas para identificar regiones únicas entre especies útiles en el diseño sondas de oligonucleótidos.

Mediante el uso de la PCR es posible identificar organismos diferentes con un buen diseño de oligonucleótidos o marcadores específicos para cada organismo diferente, ya que esta técnica es muy específica y sensible.

Por lo tanto el presente trabajo busca generar un método de identificación de la levadura oportunista *C. parapsilosis* de otras especies del género *Candida* por medio de PCR punto final para una rápida detección. Cabe señalar que existen métodos como Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP, por sus siglas en inglés) que permiten detectar *C. parapsilosis*, pero esta técnica involucra más pasos que el método de PCR punto final.

Esta investigación contribuye al área de la salud generando una herramienta que permite una temprana identificación y con ello un tratamiento efectivo de una candidiasis, además que aporta elementos que permitirán el aumento en el conocimiento de su genoma, que en un futuro puede servir para identificar posibles dianas alternativas para el desarrollo de nuevos antifúngicos, más selectivos y potentes.

4. HIPÓTESIS

Existen regiones únicas en el genoma de *Candida parapsilosis* que permiten diseñar sondas o sistemas de diagnóstico entre las principales especies de importancia médica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar marcadores moleculares específicos para PCR punto final que permitan la detección e identificación rápida y confiable de *Candida parapsilosis*.

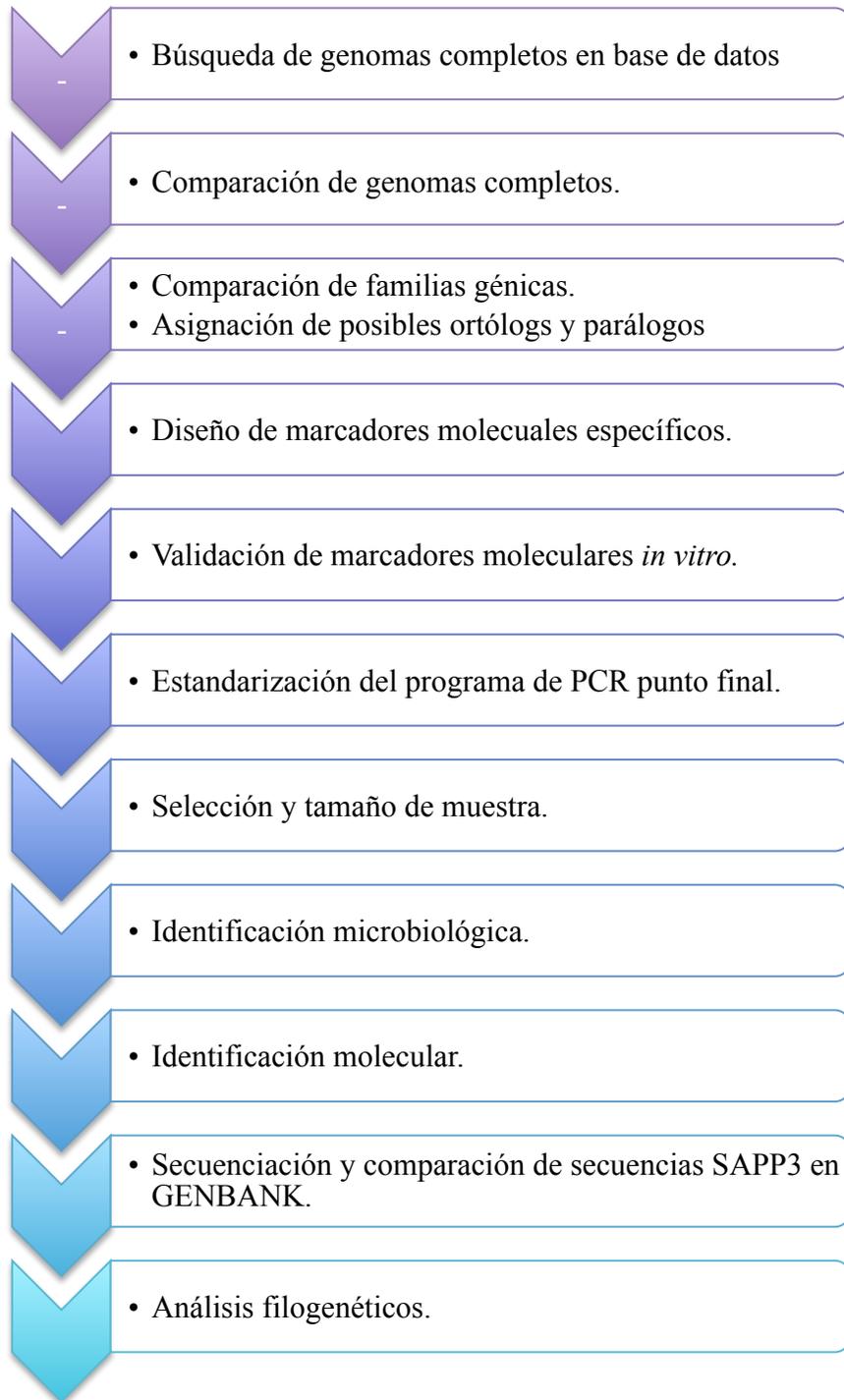
5.2 Objetivos específicos

1. Establecer un correcto discernimiento entre las especies *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.
2. Realizar análisis comparativos de regiones de interés médico en el genoma de *C. parapsilosis*.
3. Identificar elementos genómicos de *C. parapsilosis*, susceptibles de ser utilizados para su detección y/o diagnóstico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

Para dar cumplimiento al objetivo general del trabajo se realizó la siguiente estrategia experimental:



6.2 Análisis comparativo de *Candida parapsilosis*

Para la realización del análisis comparativo del genoma completo de *C. parapsilosis* con respecto a los genomas de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. orthopsilosis* fue necesario obtener las secuencias de sus respectivos genomas. Estos fueron localizados y descargados de la base de datos de *Candida* (*Candida* Genome database www.candidagenome.org)

6.2.1. Geneious y Mauve

Las secuencias genómicas fueron analizadas en el software bioinformático Geneious, (<http://www.geneious.com/>), Geneious es una suite, lo que indica que posee múltiples herramientas bioinformáticas para el análisis y la visualización de datos biológicos. Entre las herramientas que presenta se encuentra Mauve; el cual es un sistema que permite la construcción eficiente de alineamientos locales y múltiples tomando en cuenta la presencia de eventos evolutivos a gran escala, como los reordenamientos e inversiones. Durante el alineamiento, esta herramienta logra identificar Bloques Colineales Locales (LCB) y segmentos conservados con alto grado de sintenia.

6.2.3 SyMAP

Además de utilizar Geneious, se procedió a trabajar con otra herramienta bioinformática llamada Synteny Mapping and Analysis Program (SyMAP). SyMap fue utilizado por la necesidad de detectar, mostrar y consultar las relaciones sinténicas entre los cromosomas estudiados. SyMAP también fue utilizado en la selección de loci sinténicos y para la comparación de familias génicas.

6.2.4 prfectBLAST

Fue la tercera herramienta bioinformática utilizada en este trabajo, prfectBLAST es una interfaz multiplataforma gráfica de usuario que permite hacer alineamientos tanto locales como múltiples. Aunque este software fue más bien empleado para el diseño de marcadores moleculares, también se realizaron hibridaciones *in silico* entre los genomas completos, al igual que la comparación de familias génicas, con la finalidad de

reproducir los resultados obtenidos en la software Geneious.

6.3 Comparación de familias génicas: Búsqueda de posibles ortólogos y parálogos.

Mediante la selección de genes que contribuyen a la virulencia de *C. parapsilosis*, se realizaron mapeos génicos, localizando genes con alta similitud de secuencia (posibles ortólogos y parálogos). Se hizo hincapié en seleccionar familias génicas caracterizadas previamente en *C. albicans* y con presencia en *C. orthopsilosis* y *C. dubliniensis*.

1. Por lo que primeramente se realizó la búsqueda de genes ortólogos y parálogos reportados en la literatura.
2. Utilizando la herramienta Symap se localizaron genes parálogos (miembros de una misma familia génica) en su respectivo genoma, y se procedió a localizar la posible presencia de ortólogos entre las diferentes especies antes mencionadas.
3. Se extrajeron las secuencias nucleotídicas y proteicas de todos los “posibles” ortólogos y se conservó la identificación de la secuencia anotada. (ID:sequence)

Para la búsqueda de ortólogos se debe considerar la pérdida de genes, la presencia de pseudogenes, los eventos de duplicación, inversión y/o translocación, así como de una incorrecta anotación en el genoma, puede dar complicaciones para el reconocimiento de los mismos. Por lo que se recomienda tomar en cuenta dos importante factores:

- Se suelen asignar ortólogos entre un conjunto de genes con alta similitud de secuencia tomando en cuenta los mejores scores/hits obtenidos mediante un alineamiento comparativo *in silico* (Rivera *et al*, 1998).
 - Sin embargo, los ortólogos no son necesariamente los que tienen las secuencias con mayor similitud entre todos los homólogos (Lynch y Conery, 2000). Se puede definir a estos basándose en la conservación de su localización genética.
4. En base a esto y utilizando el ID:sequence, se creó una librería de estas secuencias en la interfaz pfectBLAST; donde se realizaron alineamientos *in silico*, contra las bases de datos disponibles, ubicando los mejores scores/hits de estas.

5. Por último se examinó en loci la similitud de los genes flanqueantes, ubicando los genes duplicados de tal manera que se pudiese establecer la relación conservación-localización de genes sugerido previamente y describir la presencia y características de la posible familia génica.

6.4 Diseño de marcadores moleculares específicos.

A partir de la localización de las familias génicas comparadas, se procedió a diseñar oligonucleótidos para la amplificación de uno de los genes ortólogos identificados en las cuatro especies en cuestión.

1. Para el diseño de oligonucleótidos las secuencias resultantes se insertaron y analizaron utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Versión 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>).
2. Se realizaron alineamientos locales y múltiples usando el algoritmo progresivo de ClustalW, donde se delimitaron las regiones consenso entre las diferentes secuencias génicas para la creación de sondas específicas.
3. Estas sondas se evaluaron con la aplicación OligoAnalyzer 3.1 que se encuentra en la página Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com>), esto con la finalidad de que cumplan con los estándares establecidos por (Dieffenbach *et al*, 2014; Chen *et al*, 2002) que incluyen: la longitud del oligonucleótido, temperatura de fusión (T_f), especificidad, secuencias complementarias del oligonucleótido, contenido de G/C y los tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G) (ANEXOS1).
4. Así mismo las secuencias se validaron mediante PCR *in silico*, con el programa pfectBLAST, para esto se realizaron diferentes alineamientos locales, buscando como resultado que ninguno de los oligonucleótidos diseñados hibridara con otra especie que no fuera la perteneciente.
5. Por último se comprobó su reproducibilidad *in vitro* con DNA de cepas ATCC y la colección de aislados clínicos previamente identificadas como *C. parapsilosis* mediante técnicas clásicas de microbiología pertenecientes al LMYF.

6.5 Selección y tamaño de muestra.

Se sometieron a 300 cepas del cepario del LMYF y del Departamento de Microbiología experimental (CICESE) a reactivación metabólica en medio líquido YPD (Dextrosa, Peptona, Extracto de Levadura), identificadas en trabajos anteriores como *Candida* spp. (Garza Zaragoza *et al*, 2012).

6.6 Identificación microbiológica

Las cepas activadas se identificaron como especies del género *Candida*, mediante pruebas microbiológicas tales como: Auxonograma de carbono en tubo, y fenotipo y/o coloración obtenido en el medio cromogénico (CHROMagar *Candida*) (Odds y Bernaerts, 1994).

6.6.1 Auxonograma de carbono

En esta prueba se evaluó la capacidad de la levadura para utilizar diversas fuentes de carbono. El auxonograma de carbono en tubo, también llamada técnica de Wickerham, consiste en preparar un medio que contenga exclusivamente extracto de levadura (DIBICO), el carbohidrato a utilizar y agua destilada.

Para preparar este medio, se diluyeron 6.5 g extracto de levadura en un litro de agua destilada y esterilizar a 180 libras de presión durante 15 minutos. Una vez estéril y a temperatura ambiente se agregó la fuente de carbono previamente estéril por filtración al 6%. En esta prueba se utilizó dextrosa como control positivo, lactosa como control negativo y maltosa como fuente de carbono diferencial (JALMEK).

Una vez homogeneizado se colocaron alrededor de 8 mL del medio en tubos estériles, y después se inoculó una porción de la levadura a analizar, las concentraciones de las suspensiones fúngicas se ajustaron a 0.5 de la escala de McFarland (Williams y Wilkins, 2006). La asimilación del carbohidrato se interpreta por presencia de turbidez en el medio (Tabla 6) (Bonifaz, 2012).

Tabla 6. Interpretación de resultados: +: Asimilación, -: No hay asimilación

Levadura	Dextrosa	Lactosa	Maltosa
<i>C. albicans</i>	+	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-

6.6.2 Identificación de especies utilizando CHROMagar

Se determinó el morfotipo colonial sobre medio de cultivo CHROMagar (CHROMagar), los cultivos se incubaron a 30 °C y fueron examinados a las 24, 28 y 72 horas, registrando la morfología colonial. De acuerdo a la morfología mostrada en este medio, se determinó la especie de la levadura (Tabla 7) (Odds y Bernaerts, 1994).

Tabla 7. Interpretación de los resultados en BBL CHROMagar Candida Medium (Becton Dickinson GmbH: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8810>)

Cepas	BBL CHROMagar Candida Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Crecimiento de bueno a excelente; colonias grandes y planas, de color rosado claro a rosa, con un borde blancuzco
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9968	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color gris azulado, con o sin halos de color violeta
Sin inocular	De incoloro a beige claro, transparentes

6.7 Validación de marcadores moleculares in vitro

6.7.1 Extracción de material genético

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Sambrook y Russell (2001).

Se inocularon los cultivos de *Candida* spp. en caldo YPD (DIFCO) a 30 °C a 150 rpm por 24 h. A partir de este cultivo se transfirieron 1.5 ml de cultivo a un tubo eppendorf y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, para después decantar sobrenadante. Se lavó la pastilla celular con agua bidestilada fría, repitiendo la centrifugación.

El pellet fue resuspendido en 500 µl de buffer NTES (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS), agregando 1 volumen de perlas de vidrio y resuspendiendo con vórtex por 5 min. Posteriormente se les agregó 400 µl de fenol-cloroformo (1:1) y nuevamente se llevó a vórtex por 2 min. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min, transfiriéndose la fase acuosa superior a un tubo nuevo y agregando 0.1 volumen de acetato de amonio y 2 volúmenes de isopropanol 100% frío, mezclando por inversión durante 1 min y se dejó toda la noche precipitando a una temperatura de - 20 °C. Después se centrifugó por 10 min a 14000 rpm y 4 °C, observando la precipitación de DNA, el cual se dejó secar al retirar el sobrenadante. Una vez seca y lavado el DNA con alcohol al 70%, se resuspendió en 40 µL de TE (Tris-HCl 10mM, 1mM EDTA). El DNA fue conservado a 4°C.

6.7.2 Estandarización del programa de PCR punto final

El programa de PCR que fue utilizado durante la estandarización de las cepas ATCC y en la validación de los marcadores moleculares en las cepas clínicas fue diseñado usando las siguientes condiciones: 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min. la extensión final fue a 72°C por 5 min, mientras que la temperatura de alineamiento dependió de la T_M (temperatura de fusión o melting temperature) de cada primer diseñado, el tiempo del alineamiento fue de 1 min.

La mezcla de reacción de volumen final de 25 µL consistió de 2 µL de DNA a (100 ng/1 µl), 10.5 µL de H₂O MiliQ y 12.5 de master mix Mifi (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.),

6.7.3 Electroforesis

Se realizó mediante el empleo de un gel de agarosa preparado al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA), el cual se vació sobre una cámara de electroforesis (Thermo OWL Easycast B1A). Se tomaron 4 µL de muestra de DNA, la cual fue mezclada con un buffer de carga (BlueJuice Invitrogen) y con gelred (GelRed™) para finalmente depositar cada muestra en los carriles. La cámara de electroforesis fue conectada a una fuente de poder (Labnet 300 V) para así aplicar una corriente de 80 V durante 30 minutos. Al finalizar la electroforesis en gel fue colocado en un trasluminador (UVP Laboratory Products Epi-Chemi Darkroom) exponiendo el gel a luz ultravioleta para su observación.

6.7.4 Secuenciación

Los productos resultantes del paso anterior fueron secuenciados en CINVESTAV-Langebio, en Irapuato, Guanajuato. Las secuencias obtenidas fueron proporcionadas en formato FASTA junto con sus respectivos electroferogramas.

6.8 Análisis filogenético para SAPP

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se realizó mediante un alineamiento múltiple usando el algoritmo de MUSCLE del programa MEGA 5. Posterior al alineamiento se realizó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining para determinar la distancia genética entre una secuencia y la otra, el objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. El estudio se realizó con un “Bootsrap” de 1000 repeticiones utilizando el programa MEGA 5. El “Bootsrap” se usa para soportar estadísticamente los clados mediante un sub-muestreo de los datos obteniendo réplicas de los mismos y construyendo árboles para cada una de las réplicas. Esta metodología permite determinar qué tan confiables son las relaciones deducidas a partir de los datos; un “Bootstrap” de 80% en este caso, indica que al correr 100 veces el mismo análisis, el clado aparece de la misma forma 80 veces, tomando como un buen “Bootstrap” un valor por encima de 50%.

7. RESULTADOS

7.1 Comparación de genomas de *Candida*

Los genomas descargados de la base de datos *Candida* Genome fueron depositados en el programa Geneious y divididos en cromosomas para facilitar los análisis comparativos.

Por lo tanto se procedió con la comparación de los 8 cromosomas de *C. parapsilosis* con cada uno de los 8 cromosomas correspondientes de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. orthopsilosis*.

7.1.1 Comparación de los genomas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

Se tomó la decisión de comparar primero los genomas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, para usar esta comparación como control positivo y así mismo reproducir los resultados vistos en la literatura.

Tras la comparación de estas dos especies, que consistió en alineamientos locales en Geneious y a la organización de los cromosomas mediante MAUVE, se pudo constatar la sintenia de estos dos genomas; pues al ir comparando cada cromosoma de *C. albicans* con su respectivo homólogo en *C. dubliniensis*, se pudieron identificar regiones colineales que llamaremos como bloques colineales locales (LCB).

Los LCB son regiones que se asume son homólogas de una secuencia que es compartida en dos o más organismos, en este caso se ubicó la presencia de LCB en ambas especies. Por ejemplo la comparación entre el cromosoma 7 de *C. albicans* con el cromosoma 7 de *C. dubliniensis* (Figura 9).

Cada cromosoma ha sido colocado horizontalmente y alineado en regiones conservadas; la comparación de ambos cromosomas indica la presencia de 11 bloques colineales locales que son regiones homólogas de la secuencia compartida por ambos cromosomas. Dentro de cada bloque se observan segmentos coloreados, esta coloración representa regiones sinténicas, por lo que las zonas carentes de coloración son regiones sin sintenia. Además MAUVE permite comparar el orden y orientación de los LCB, a fin de observar los reordenamientos globales de los genomas, facilitando así la ubicación de

eventos de translocación e inversión presentes en los cromosomas (bloques rojos y amarillos en la figura). Consideramos que estos eventos fueron como una peculiaridad que se presentó durante la observación del arreglo cromosómico de estas dos levaduras (ANEXOS 2).

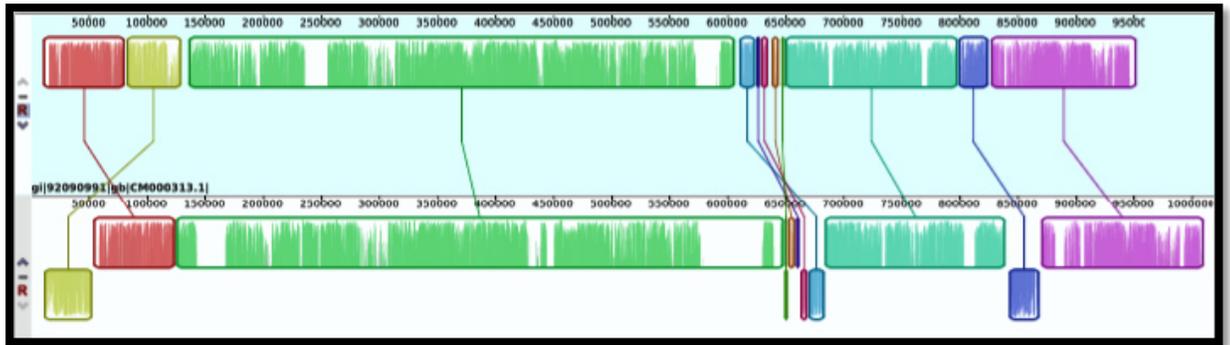


Figura 9. El alineamiento del cromosoma 7 de *C. dubliniensis* y el cromosoma 7 de *C. albicans*.

7.1.2 Comparación del los genomas de *C. parapsilosis* y *C. albicans*

A diferencia de la comparación genómica anterior, la comparación entre estas dos especies carece de sintenia, el mejor alineamiento de ambas especies (Figura 10) muestra la comparación entre el cromosoma 5 de *C. parapsilosis* y el cromosoma R de *C. albicans*.

La comparación de estos cromosomas muestran al menos 52 LCB compartiendo homología, pero con escasas regiones sinténicas, por ejemplo el LCB morado a la altura de los 400,000 nt en la parte del cromosoma 5 de *C. parapsilosis* encuentra un homólogo cerca de los 900,000 nt en la parte del cromosoma 3 de *C. albicans*. Ambos LCB presentan secuencias conservadas, además de observarse que el bloque se encuentra traslocado e invertido.

A pesar de la presencia de LCB, estos presentan numerosas regiones blancas, estas regiones al igual que los huecos que separan los LCB son zonas de plasticidad (variables). Las zonas de plasticidad son regiones que representan secuencias únicas y/o específicas del genoma de cada especie.

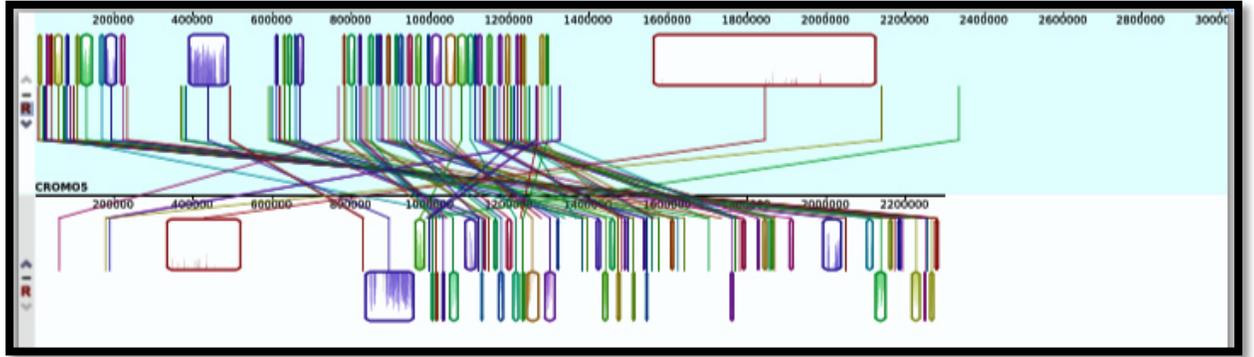


Figura 10. El alineamiento del cromosoma 3 de *C. parapsilosis* y el cromosoma R de *C. albicans*.

Puesto que *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan genomas casi idénticos, las comparaciones entre los cromosomas de *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* fueron muy similares a los observados con *C. albicans*, una gran cantidad de LCB, que si bien estos representan la homología entre secuencias, existe escasa conservación en los loci.

7.1.3 Comparación de los genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*

Lo que se esperaba al comparar dos de los genomas del complejo parapsilosis, era la posibilidad de obtener resultados similares a los obtenidos con el control positivo, al ser *C. parapsilosis* un organismo estrechamente relacionado con *C. orthopsilosis* como lo son *C. albicans* y *C. dubliniensis*, se pretendía observar que la mayoría de sus cromosomas fueran homólogos entre sí; sin embargo solamente el cromosoma 6 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*, (Figura 11) presentaron similitud aunque con numerosos rearrreglos, principalmente la presencia de eventos de inversión. La comparación de estos cromosomas muestra la presencia de al menos 25 LCB, los cuales se encuentran en diferente orden. Además un fenómeno interesante entre ambos genomas, donde uno de los cromosomas de una especie presenta grandes bloques similares con alta sintenia con dos loci provenientes de dos cromosomas diferentes de la especie contraria, y esto es recíproco entre ambas especies.

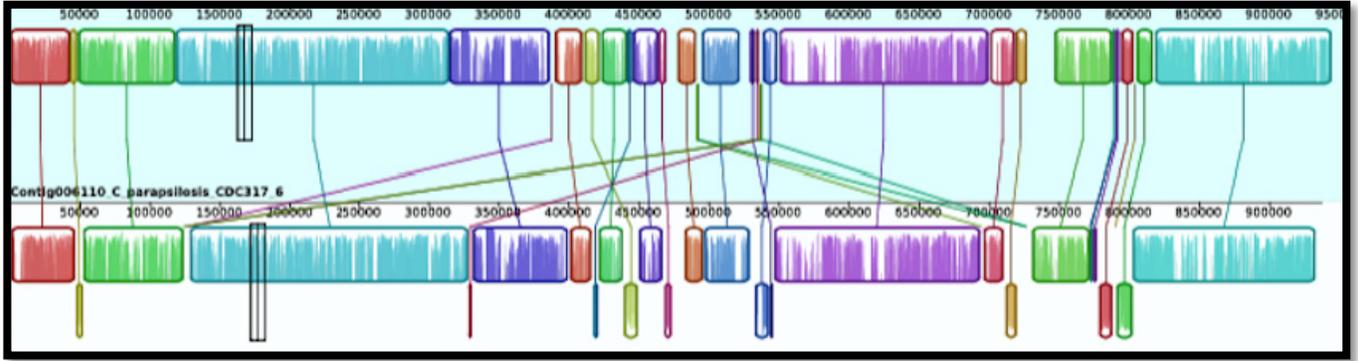


Figura 11. El alineamiento del cromosoma 6 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*.

Tal como se puede observar en la figura 12, donde se compara el cromosoma 8 de *C. parapsilosis* con el 3 de *C. orthopsilosis*, existe un fragmento de la longitud total del cromosoma 8 en *C. parapsilosis* al parecer es homóloga a una parte del cromosoma 3 de *C. orthopsilosis*, donde se presentan 7 LCB.

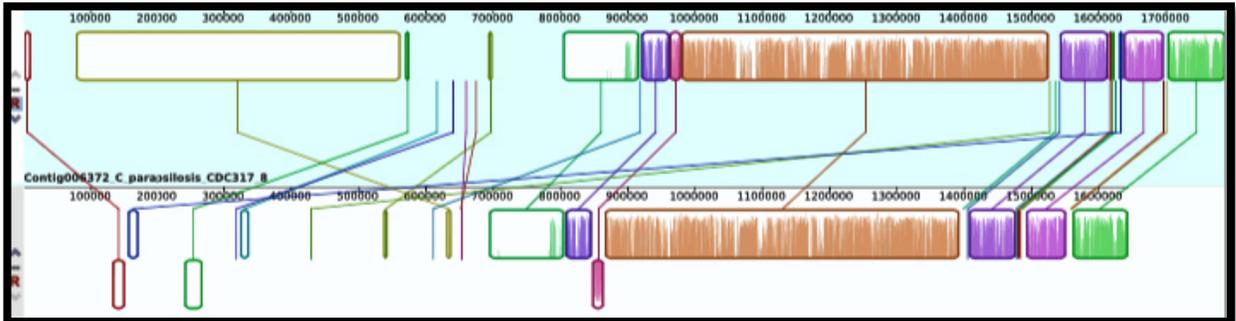


Figura 12. El alineamiento del cromosoma 8 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 3 de *C. orthopsilosis*.

Mientras que el fragmento restante de *C. parapsilosis*, cuyos LCB no muestran locus sinténicos, presenta alta similitud con una parte del cromosoma 5 de *C. orthopsilosis*. (Figura 13). Destacando 6 LCB en la posición carente de homología en el alineamiento anterior.

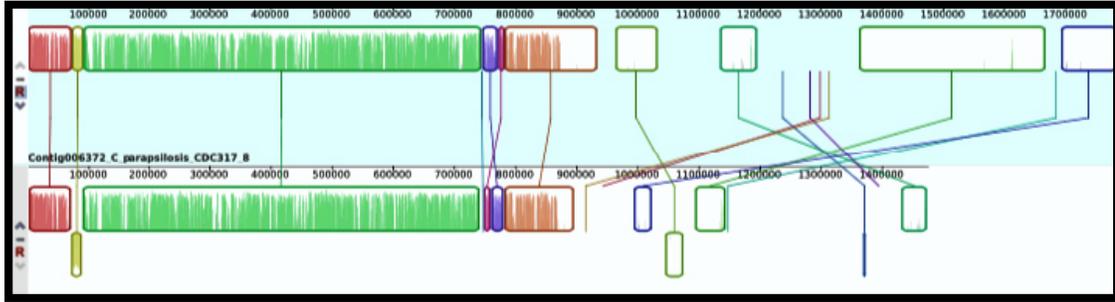


Figura 13. El alineamiento del cromosoma 8 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 5 de *C. orthopsilosis*.

Y de manera similar éste último cromosoma, el 5 de *C. orthopsilosis* presenta regiones sinténicas con el cromosoma 3 de *C. parapsilosis*. Lo que significa que dos secuencias homólogas cromosómicas pueden ocupar dos posiciones genómicas distintas (Figura 14).

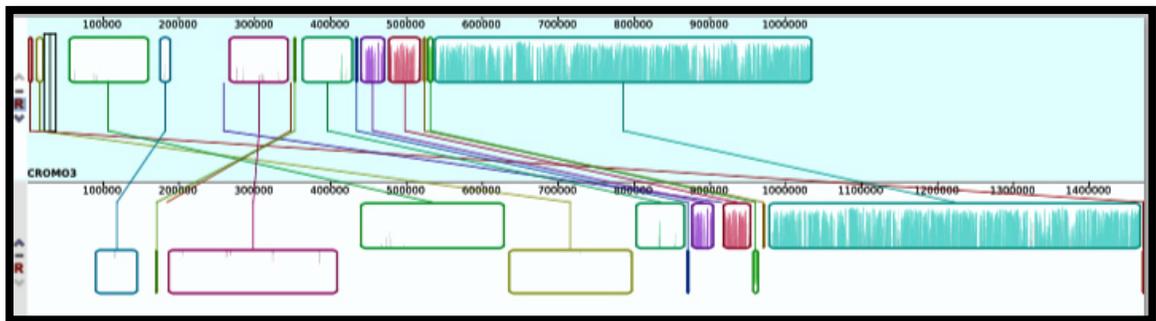


Figura 14. El alineamiento del cromosoma 3 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 5 de *C. orthopsilosis*.

Para observar de manera más simple estos eventos evolutivos se utilizó el programa Symp, en el cual se ingresaron los 4 genomas de las levaduras estudiadas a fin de realizar una comparación mediante un circle plot (figura 15); estos diagramas permiten ilustrar las características de un genoma en su contexto genómico completo. Nótese la fragmentación de los cromosomas de ambas especies, donde un loci se conserva en ambos genomas. En todos se conserva esta condición a excepción del cromosoma 6 de *C. parapsilosis* y el cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*, así mismo el cromosoma 2 de ambas especies se mantiene gran parte de sus regiones sinténicas. Además de la comparación de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, se incluyó como control positivo *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Figura 16) donde los cromosomas de ambas especies homólogas presentan alta sintenia y considerando como control negativo

la comparación entre los genomas de *C. parapsilosis* y *C. albicans* (Figura 17), en este diagrama se muestra una fragmentación mayor que la mostrada en la figura 8. En esta comparación se puede apreciar perfectamente cómo ha sido perdida de sintenia en estas especies debido al misma fragmentación y/o reordenamiento de los cromosomas.

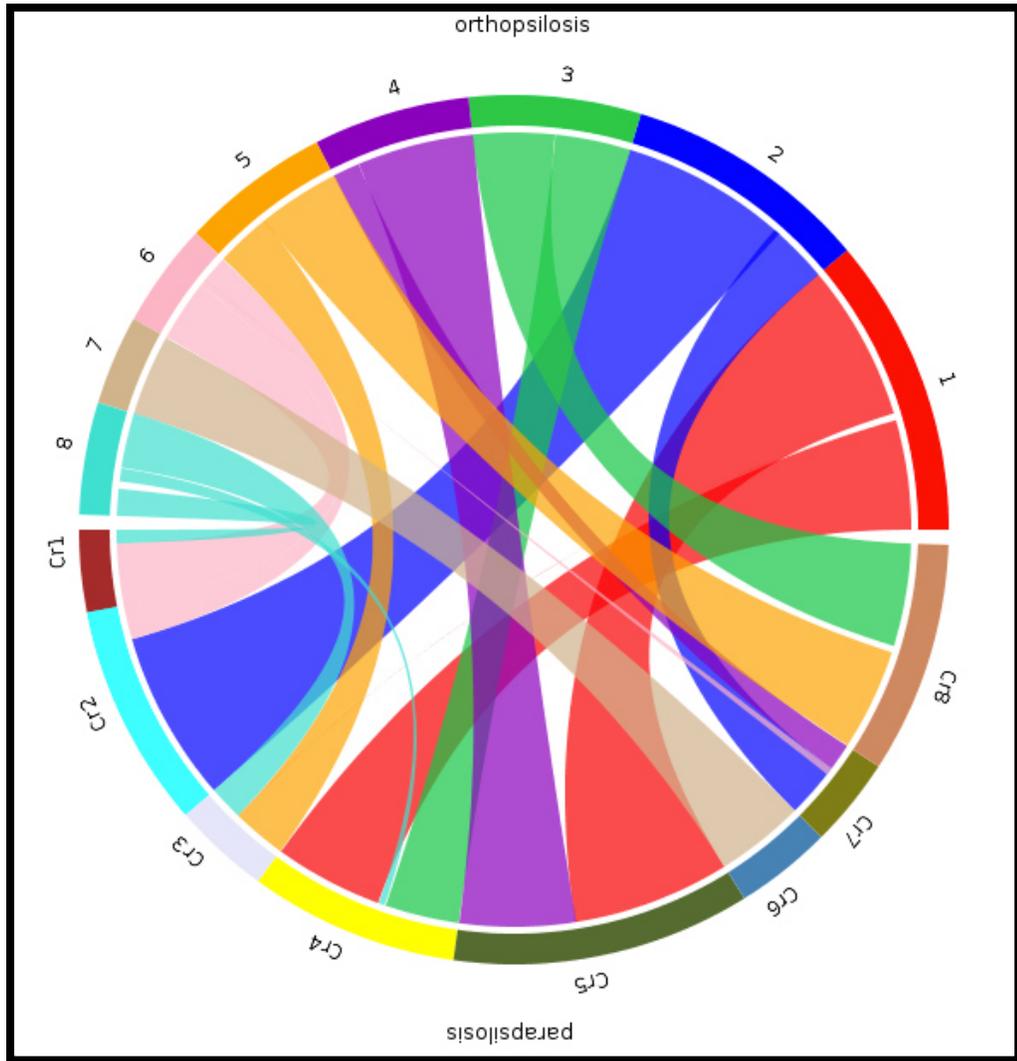


Figura 15. Comparación de genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* esquematizada mediante Circle plot (www.agcol.arizona.edu/software/symap/). En la parte del arriba del diagrama se encuentran los ocho cromosomas de *C. orthopsilosis* ordenados en contra de las manecillas del reloj enumerados con números cardinales para discriminarlos de los cromosoma correspondientes a *C. parapsilosis* presentes en la parte de abajo, se encuentran etiquetados con Cr y su respectivo número.

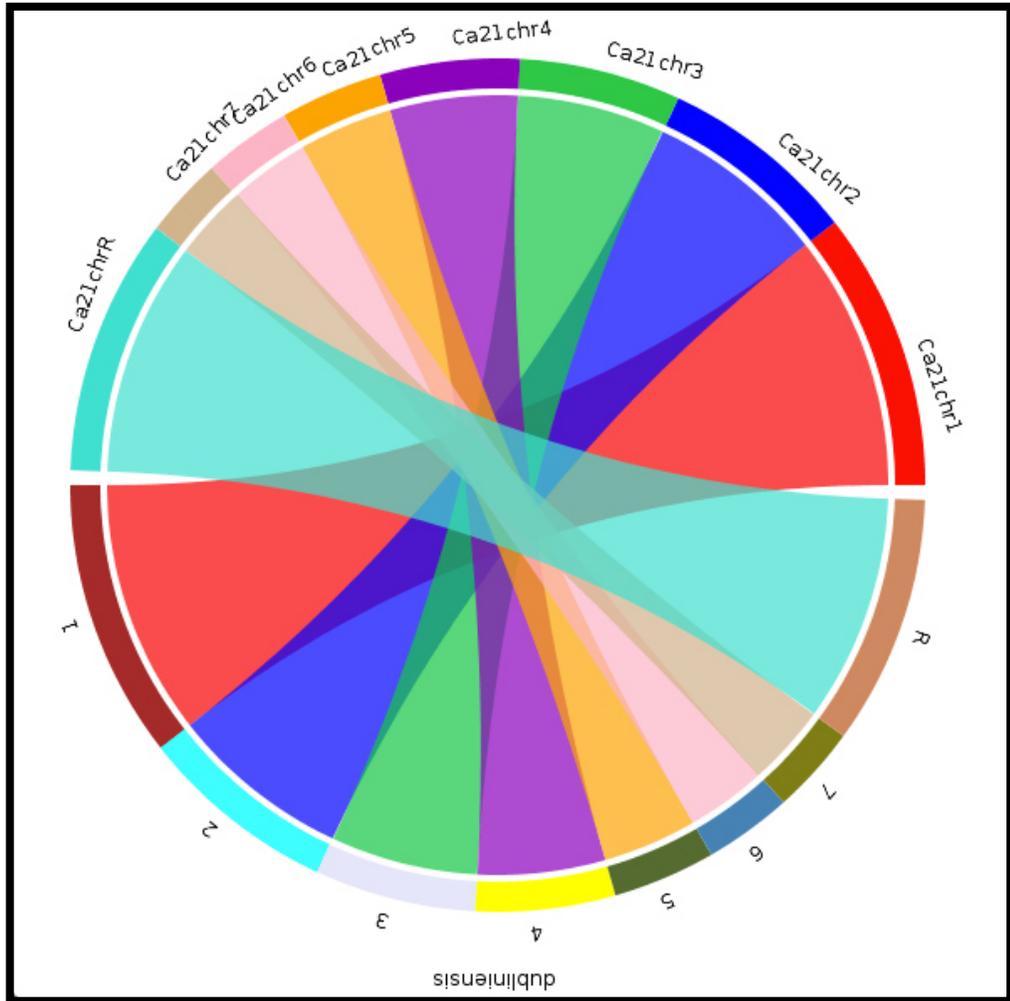


Figura 16. Comparación de genomas de *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* (www.agcol.arizona.edu/software/symap/).

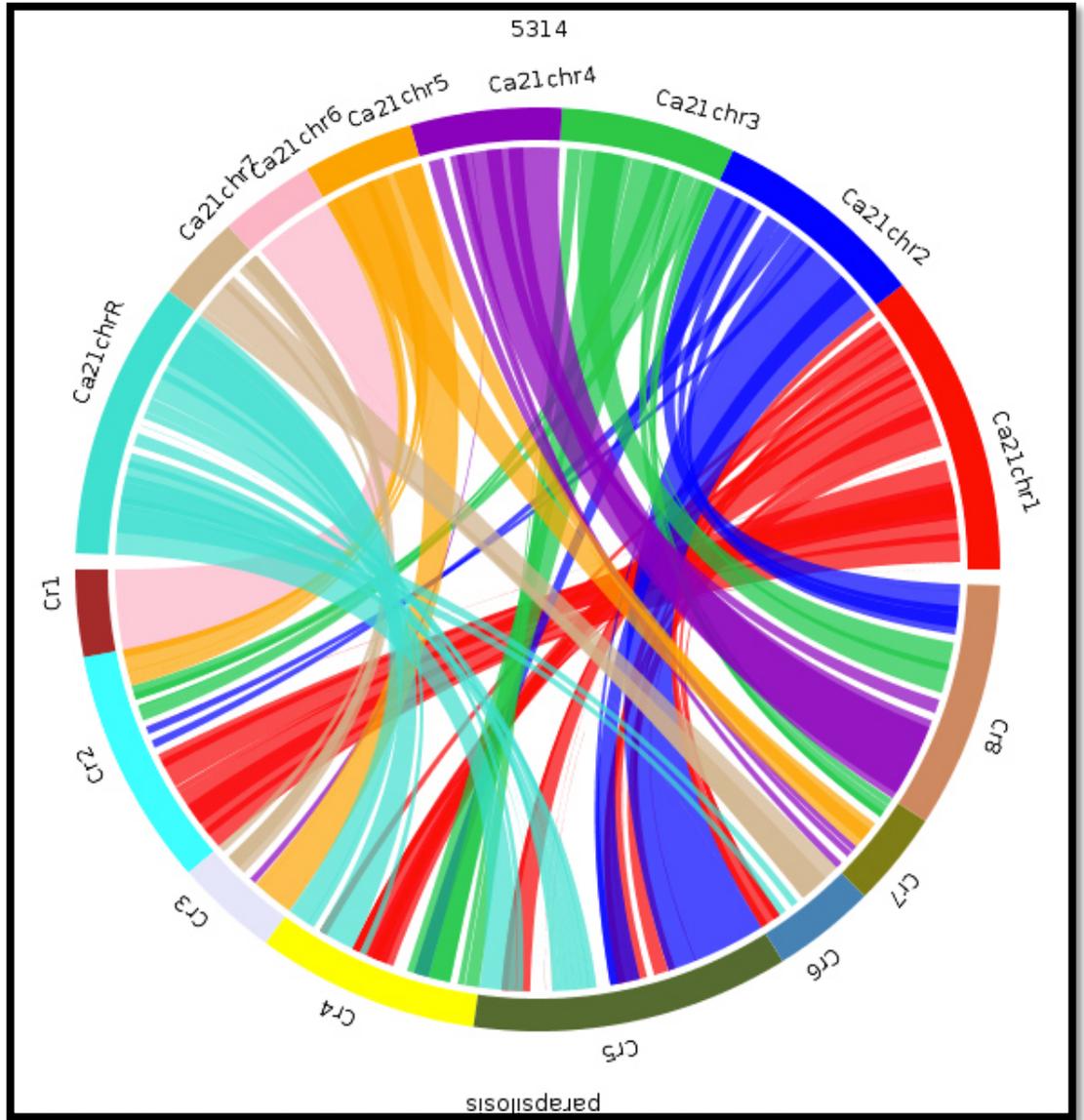


Figura 17. Comparación de genomas de *C. parapsilosis* y *C. albicans* (www.agcol.arizona.edu/software/symap/).

7.2 Comparación de familias génicas: Búsqueda de ortólogos y parálogos.

En base al amplio conocimiento que se tiene del genoma de *C. albicans* y tomando en cuenta los factores de virulencia que comparte con *C. parapsilosis*, se seleccionaron 4 familias génicas involucradas en la patogénesis de estas levadura, las cuales fueron adhesinas (ALS), fosfolipasas B (PLB), lipasas (LIP) y Aspartil-proteasa (SAP).

Además de la realización de comparaciones cromosómicas mediante circle plots, Symap permite mapear secuencias para identificar ya sea genes parálogos entre un mismo genoma o bien, genes ortólogos entre diferentes genomas.

Por otro lado, tanto MAUVE como Symap, son programas para identificar regiones sinténicas, ambos requieren del procesamiento para calcular genes y pares homólogos. MAUVE compara el genoma al que se le somete la comparación (definido como genoma de entrada) y lleva a cabo su propia alineamiento seguido por un cómputo sintenia; sin embargo a diferencia de Symap, MAUVE no identifica bloques sinténicos a gran escala, sino más bien de menor escala (LCB), (Darling *et al*, 2004) lo que puede limitar la forma de búsqueda de homólogos.

Por lo tanto para proceder con la búsqueda de ortólogos y parálogos se ingresaron los sequence ID (claves de acceso a una región o algún gen es específico) de las familias génicas estudiados a Symap. El programa opera mediante la relación sinténica de los cromosomas los cuales son marcados por líneas que detectan regiones conservadas. Es importante señalar que se analizaron todos los miembros de las familias génicas estudiadas, el ejemplo representado (Figuras 18, 19 y 20) es la visualización de los locus de SAP.

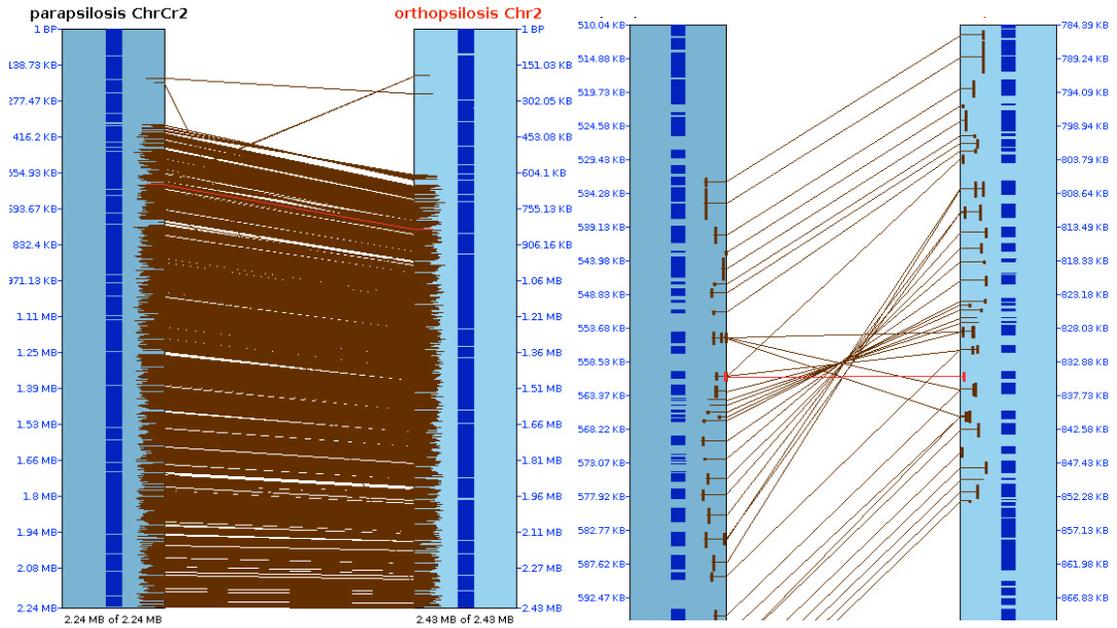


Figura 18 y 19 Búsqueda de regiones sinténicas entre el cromosoma 2 de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Las líneas en color café marcan todas las regiones sinténicas presente entre ambos cromosomas, la línea color rojo señala la ubicación del gen que se está buscando; que como se puede apreciar con mejor claridad en la Figura 17 y 18, el programa permite hacer acercamientos al cromosoma para buscar el gen de interés y sus ortólogos.

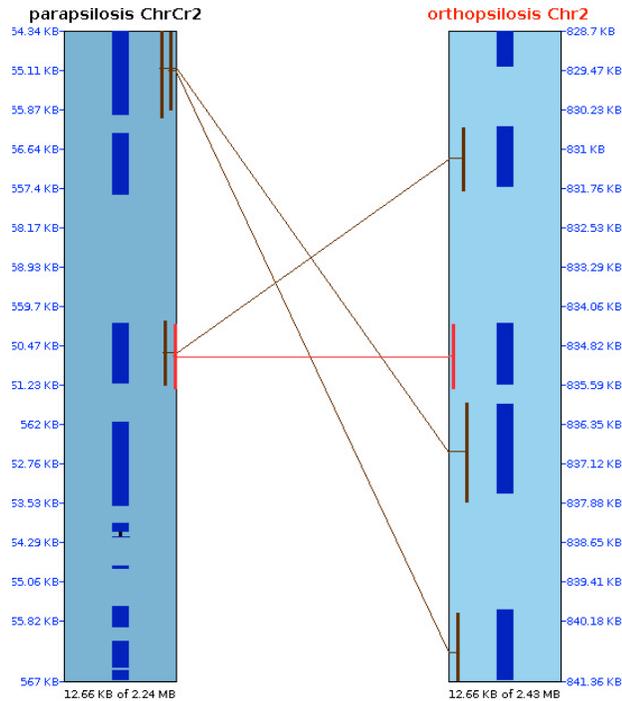


Figura 20. Búsqueda de regiones sinténicas entre el cromosoma 2 de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Mayor acercamiento a la región sinténica que permite el mapeo del gen de interés con su ortólogo(s).

Durante la ubicación de los genes ortólogos en los genomas de interés utilizando este software, se encontró homología con más de una secuencia génica, esto no generó conflicto en un inicio pues se esperaba encontrar diversas secuencias parálogas, debido a que estos podrían ser miembros de una misma familia de genes. Sin embargo, al ir analizando los locus sinténicos se observaron secuencias ortólogas no reportadas previamente que poseían el dominio proteico característico.

Se obtuvieron así secuencias proteicas a partir de cada secuencia ortóloga y paróloga que presentara el dominio funcional característico. Estas secuencias fueron analizadas en el software pfrectBLAST para alineamientos *in silico*, obteniendo los porcentajes de identidad de las secuencias comparadas mediante el alineamiento.

A continuación se presentan 2 tipos de tablas, el primer tipo (Tablas 8, 11, 14, 19 y 20), corresponde a la identificación de genes homólogos que Symap detectó en relación con las diferentes familias multigénicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. En estos resultados se muestra el gen caracterizado y ID de la secuencia sinténica. En caso de corresponder a una secuencia de *C. parapsilosis* el ID inicia con “CPAR2”, mientras que “CORT” indica que el ID es de *C. orthopsilosis*.

En el segundo tipo de tabla se observan los porcentajes de identidad obtenidos en pfrectBLAST, tras los alineamientos de las secuencias ortólogos a *C. albicans*, señaladas en las tablas anteriores a estas, (Tablas 9, 12, 15, 16, 21, 22 y 23). En las tablas 10, 13, 17 y 24, se que presentan exclusivamente los resultados de los alineamientos entre secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

7.2.1 Comparación de familia génica: ALS (adhesinas)

Secuencias génicas con homología de ALS; en la primera columna se presentan los siete integrantes de la familia génica de las adhesinas, en la columna del medio los ID de las secuencias de *C. parapsilosis* con los que se presentó homología. Nótese que la mayor parte de los miembros de esta familia génica encontraron como ortólogos a 4 diferentes secuencias; entre ellos a CPAR2_404770 y CPAR2_500660 que ya han sido caracterizados como ALS1 y ALS3 en *C. parapsilosis* respectivamente; así mismo en la

columna de la derecha los ID de las secuencias ortólogas de *C. orthopsilosis*, las cuales se repiten para cada miembro de las ALS (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de agrupación de secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con alta similitud a la familia génica ALS1-7 y ALS9 (adhesinas) reportada en *C. albicans*

<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
ALS1	CPAR2_404770, CPAR2_404790 CPAR2_404800	CORT_0B00800, CORT_0C04210, CORT_0C04220
ALS2	CPAR2_404790 CPAR2_404800 CPAR2_500660	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS3	CPAR2_404790 CPAR2_404800 CPAR2_500660	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS4	CPAR2_404790 CPAR2_404800 CPAR2_500660	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS5	CPAR2_404790 CPAR2_404800	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS6	CPAR2_404790 CPAR2_404800	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS7	CPAR2_404790 CPAR2_404800 CPAR2_404790	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220
ALS9	CPAR2_404770 CPAR2_404790 CPAR2_404800 CPAR2_500660	CORT_0B00800 CORT_0C04210 CORT_0C04220

Tabla 9. Porcentajes de identidad (%) de secuencias de genes de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con respecto a los presentes en la familia ALS de *C. albicans*.

*Los cuadros en color naranja corresponden a los genes de *C. parapsilosis*, mientras que los verdes a *C. orthopsilosis*.

	<i>C. parapsilosis</i>					<i>C. orthopsilosis</i>		
	CPAR2_404770 (ALS3)	CPAR2_404780	CPAR2_404790	CPAR2_404800	CPAR2_500660 (ALS1)	CORT_0B00800	CORT_0C04210	CORT_0C04220
ALS1	27.6%	27.6%	39.6%	39.4%	29%	44.1%	33.2%	37.9%
ALS2	26.5%	26.9%	42.8%	41.7%	27.2%	44.1%	33.1%	33.4%
ALS3	27.6%	28.4%	41.8%	44.1%	27.9%	44.6%	33.3%	39.2%
ALS4	26.1%	27.3%	45.8%	40.7%	27.5%	43%	32.4%	33.5%
ALS5	28.5%	27.5%	32.0%	31.3%	29.9%	44.1%	31.8%	33.2%
ALS6	28.5%	27%	32.8%	32.7%	29.4%	44.1%	32%	32.9%
ALS7	27.5%	25.6%	25.3%	28.5%	27.9%	36.9%	27.6%	26.5%
ALS9	27.8%	26.8%	38.3%	41.1%	26.8%	40.8%	30.6%	34.1%

Los puntajes (scores) obtenidos tras comparar los genes ALS de *C. albicans* con secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, no son en realidad altos pues oscilan entre 25.3-44.1% de identidad. A diferencia de la comparación de secuencias entre los especies del complejo parapsilosis cuyo porcentaje más alto es de 86% de identidad (Tabla 9).

Tabla 10. Porcentajes de identidad (%) de las secuencias ortólogas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, con respecto a dominio de adhesinas.

	CORT_0C04210	CORT_0C04220	CORT_0B0080
CPAR2_500660 (ALS1)	62.1%	38.9%	86.0%
CPAR2_404770 (ALS3)	57.3%	39.2%	74.4%
CPAR2_404780	63.4%	37%	78.8%
CPAR2_404790	32.8%	38.2%	42.8%
CPAR2_404800	52.2%	49.4%	71.5%

A pesar de que en la mayoría de los genes ALS tanto de *C. albicans* y *C. parapsilosis* presentan mejor puntaje de similitud (score) con la secuencia génica CORT_0B0080, se consideró la relación conservación-localización.

El score más alto lo presenta el gen ALS1 (CPAR2_500660) de *C. parapsilosis* con un porcentaje de identidad del 86%. Como se observa en la tabla 1(antecedentes) el gen ALS1 está presente en el cromosoma 7 y este comparte regiones sinténicas con el cromosoma 2 de *C. orthopsilosis*, misma locus donde se presenta CORT_0B0080 (Tabla 10).

Para identificar el gen ortólogo de ALS1 de *C. parapsilosis* en *C. albicans* se tomó de igual manera el mejor score adquirido ante los alineamientos con la familia génica. El score más alto lo obtuvo ALS5 (*C. albicans*) con 29.9% y mismo que mostró un 44.1% con respecto a la secuencia CORT_0B0080 (*C. orthopsilosis*). A pesar de que estos porcentajes no son altos, hay que tomar en cuenta que el grado de sintenia que presentan los genomas *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* no se mantienen con el genoma de *C. albicans*.

En la figura 21 se presentan los ortólogos identificados de ALS1 de *C. parapsilosis* ubicados en los cromosomas 6, 2 y 7 de *C. albicans*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* respectivamente.

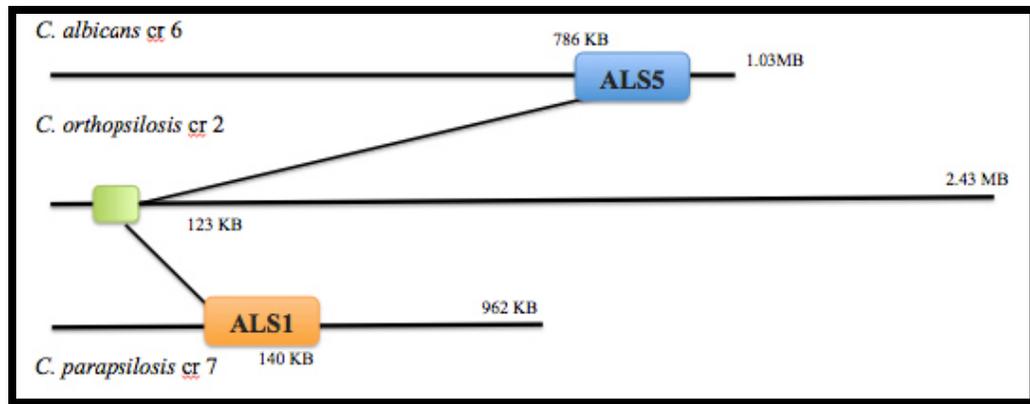


Figura 21. Representación visual del orden que presentan los genes ortólogos en sus respectivos genomas.

De igual forma el resto de las secuencias parálogas a ALS3 de *C. parapsilosis* (CPAR2_404770), secuencias pertenecientes a un mismo locus, parecen ser los ortólogos a los también parálogos: CORT_0C04210 y CORT_0C04220. De acuerdo a su ubicación cromosomal los genes pertenecientes a *C. parapsilosis* están

presentes en el cromosoma 8; mismo que comparte sintenia con el cromosoma 3 de *C. orthopsilosis*, en donde encontramos a *CORT_0C04210* y *CORT_0C04220*. El gen ortólogo en *C. albicans* parece corresponder a *ALS3* debido a los scores que presenta este gen con todas las secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Si analizamos visualizamos el arreglo de estas secuencias, (Figura 22) observamos que éstas podrían ser eventos de duplicación en los cromosomas correspondientes a *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, pues estos datos demuestran dos secuencias parálogas en *C. orthopsilosis* a partir del gen *ALS3* en *C. albicans*. Mientras que en *C. parapsilosis* se observan 4 repeticiones en tandem, que podrían ser resultado de una duplicación por parte de las dos secuencias en *C. orthopsilosis*.

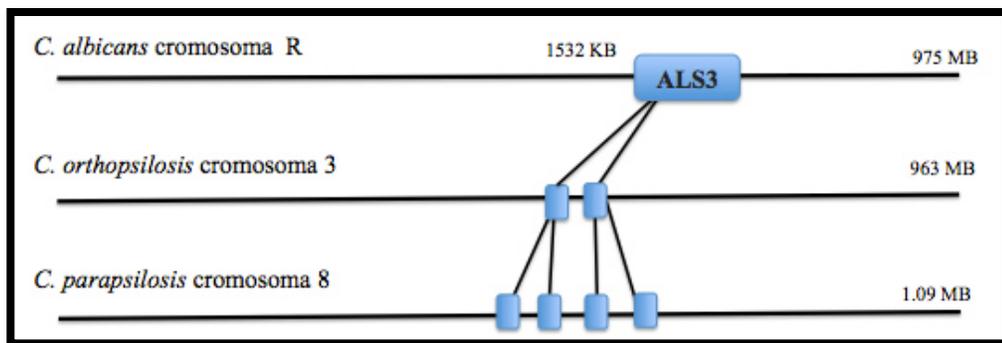


Figura 22. Orden de genes ortólogos en los genomas de diferentes especies de *Candida*, que además muestran lo que podrían ser eventos de duplicación génica en los genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

7.2.2 Comparación de familia génica: LIP (Lipasas)

Cuadro comparativo de genes lipolíticos de tres especies diferentes de *Candida*, (tabla 11 y 12), en la primera columna se presentan los diez integrantes de la familia génica de las lipasas y en la segunda y tercera columna los ID de las secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con mayor homología.

A diferencia de ALS, los miembros de la familia LIP presentaron incidencia con una sola secuencia ortóloga, las cuales se repiten entre cada gen *CPAR2_703190*, *CPAR2_703200* y *CPAR2_501220* (*C. parapsilosis*) y *CORT_0G03360*,

CORT_0G03370 y CORT_0G01380 (*C. orthopsilosis*). Resulta importante señalar que aunque las secuencias CPAR2_601970 y CORT_0F02950, no presentaron homología con alguna secuencia de *C. albicans*, estas entre sí presentan un alto porcentaje de identidad (Tabla 13). En la primera columna se presentan los diez integrantes de la familia multigénica de las lipasas, mientras en las filas se presentan los ID de las secuencias con los que mostró homología en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Tabla 11. Secuencias génicas con homología de LPS.

<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
LIP1	CPAR2_703200	CORT_0G03370
LIP2	CPAR2_703190	CORT_0G03370
LIP3	CPAR2_703190	CORT_0G03360
LIP4	CPAR2_703200	CORT_0G03370
LIP5	CPAR2_703200	CORT_0G03370
LIP6	CPAR2_703200	CORT_0G03370
LIP7	CPAR2_501220	CORT_0G01380
LIP8	CPAR2_703200	CORT_0G03370
LIP9	CPAR2_703190	CORT_0G03360
LIP10	CPAR2_703190	CORT_0G03360

Tabla 12. Porcentajes de identidad (%) de secuencias de genes de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con respecto a los presentes en la familia LIP de *C. albicans*.

	<i>C. parapsilosis</i>				<i>C. orthopsilosis</i>			
	CPAR2_703190	CPAR2_703200	CPAR2_501220	CPAR2_601970	CORT_0B01380	CORT_0G03370	CORT_0G03360	CORT_0F02950
LIP1	53.4%	54.1%	37.9%	50.5%	37.0%	53.7%	53.6%	51.9%
LIP2	48.4%	49.7%	36.8%	47.5%	36.2%	49.1%	48.8%	47.5%
LIP3	50.6%	48.4%	39.1%	46.2%	37.9%	48.2%	50.2%	46.8%
LIP4	50.6%	59.4%	38.7%	45.9%	39.3%	60.3%	55.5%	46.2%
LIP5	54.3%	57.3%	40.3%	44.2%	40.5%	58.4%	54.3%	45.1%
LIP6	49.3%	51.5%	37.6%	44.2%	35.6%	51.9%	49.8%	48.1%
LIP7	36.6%	39.6%	44.3%	47.5%	43.1%	38.3%	36.2%	34.1%
LIP8	54.1%	56.9%	40.7%	45.9%	39.7%	57.5%	54.5%	14.3%
LIP9	52.9%	55.8%	38.7%	42.2%	38.7%	56.6%	53.0%	42.9%
LIP10	48.3%	48.5%	37.7%	44.5%	37.4%	49.1%	48.9%	44.3%

Tabla 13. Porcentajes de identidad (%) de las secuencias ortólogas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con respecto al dominio lipolítico que presentan.

	CORT_0B01380	CORT_0G03370	CORT_0G03360	CORT_0F02950	CORT_0F02960
CPAR2_703200	38.5%	93.1%	62.4%	46.9%	46.9%
CPAR2_703190	37.1%	60.2%	89.9%	47.3%	47.3%
CPAR2_501220	85.6%	38.7%	36.6%	34.3%	34.3%
CPAR2_601970	33.7%	44.2%	45.4%	84.2%	84.2%

La similitud cuando es baja se concentra en los sitios estructuralmente importantes de la secuencia por lo que se puede inferir homología entre las secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. En ambos genomas encontramos 2 pares de genes pertenecientes al mismo locus, presentando altos porcentajes de identidad, además de que éstos se encuentran en cromosomas sinténicos, por un lado CPAR2_703190 y CPAR2_703200 están ubicados en el cromosoma 6 de *C. parapsilosis*, y por el otro, CORT_0G03370 y CORT_0G03360 en el cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*., cromosomas que como se mencionó anteriormente, son los únicos que no están fragmentados. Es posible que éstos genes estén relacionados filogenéticamente con LIP8 de *C. albicans* ya que con éste es con el que presentan el más alto porcentaje de identidad, pero hay que señalar que podría ser cualquiera de sus otros miembros como LIP5 y LIP9, quienes presentaron porcentajes similares y se ubican en el mismo cromosoma. Es posible que esta duplicación presente en ambos genomas sea producto de una fragmentación del gen LIP8 de *C. albicans* debido a que el tamaño de la secuencia de LIP8 que es de 1383 pb, mientras que el tamaño de las secuencias ortólogas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* son de 700 y 583 pb respectivamente (Figura 23).

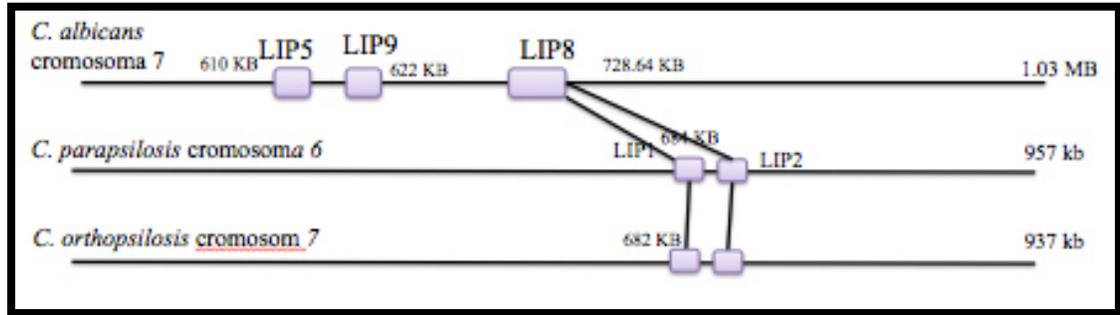


Figura 23. Representación gráfica del orden de los genes ortólogos en sus respectivos genomas, que además muestran lo que podrían ser eventos de fragmentación génica de LIP8 en los genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Por otra parte las secuencias CPAR2_601970 y CPAR2_601980 del cromosoma 7 de *C. parapsilosis* son los ortólogos de CORT_0F02950 y CORT_0F02950 presentes en el cromosoma 2 de *C. orthopsilosis*. El gen LIP7 de *C. albicans* resultante podría tener el mismo origen filogenético que estos genes en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*; que a diferencia del caso anterior, podrían ser secuencias duplicadas en cada genoma correspondiente (Figura 24).

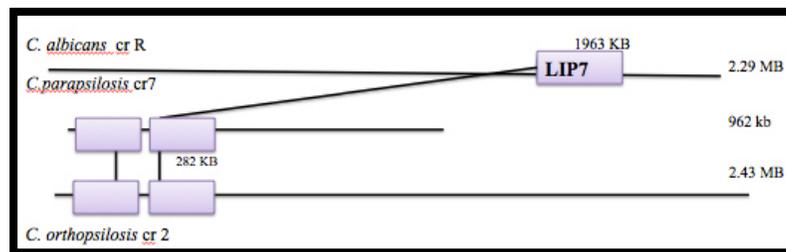


Figura 24. Representación visual de la ubicación de los genes ortólogos a LIP7. Donde se observa la duplicación génica en los genomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* este gen.

7.2.3 Comparación de familia génica: PLB (Fosfoipasa B)

Ocho y cinco fueron las secuencias de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* que tuvieron similitud con los genes de la familia PLB, tras su búsqueda (Tabla 14). Cada gen PLB de *C. albicans* presentó al menos dos secuencias ortólogas al compararlas con el resto de las especies (a excepción de PLB1 y 2 quien muestra homología con tres secuencias y una de *C. parapsilosis*).

En la primera columna se presentan los cinco integrantes de la familia multigénica de las

fosfolipasas B de *C. albicans* mientras en las filas restantes se muestran los ID de las secuencias presuntamente homólogas pertenecientes a *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Tabla 14. Secuencias génicas con homología de PLB.

<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
PLB1	CPAR2_601740 CPAR2_601750 CPAR2_601760	CORT_0F02740 CORT_0F02750
PLB2	CPAR2_601730	CORT_0F02740 CORT_0F02750
PLB3	CPAR2_601730 CPAR2_601740	CORT_0G01300 CORT_0G01310
PLB4	CPAR2_701130 CPAR2_701140	CORT_0G01300 CORT_0G01310
PLB5	CPAR2_804680 CPAR2_808920	CORT_0A04690

Tabla 15. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes de *C. parapsilosis* con la familia PLB de *C. albicans*.

	CPAR2_601730	CPAR2_601740	CPAR2_601750	CPAR2_601760	CPAR2_701130	CPAR2_701140	CPAR2_804680	CPAR2_808920
PLB1	58.0%	57.9%	59.3%	57.1%	47.2%	47.7%	43.0%	41.7%
PLB2	60.6%	59.6%	60.5%	55.4%	44.5%	45.8%	41.5%	40.9%
PLB3	45.9%	46.0%	47.8%	47.3%	59.5%	61.6%	48.6%	43.9%
PLB4	43.4%	43.6%	42.7%	39.3%	41.3%	40.8%	39.3%	35.4%
PLB5	43.0%	43.9%	43.0%	43.8%	45.4%	44.3%	61.9%	50.7%

Tabla 16. Porcentajes de identidad (%) adquiridos al comparar las secuencias de genes de *C. orthopsilosis* con la familia PLB de *C. albicans*.

	CORT_0F02740	CORT_0F02750	CORT_0G01300	CORT_0G01310	CORT_0A04690
PLB1	57.9%	57.4%	47.4%	47.7%	43.1%
PLB2	57.2%	56.1%	44.4%	44.9%	41.2%
PLB3	46.5%	46.3%	59.3%	61.0%	48.2%
PLB4	42.0%	39.2%	40.5%	41.7%	38.7%
PLB5	41.9%	42.6%	44.5%	45.8%	61.4%

Tabla 17. Porcentajes de identidad (%) obtenidos al comparar las secuencias de genes de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

	CORT_0F02740	CORT_0F02750	CORT_0G01310	CORT_0G01300	CORT_0A04690
CPAR2_601730	72.5%	59.8%	44.4%	43.9%	42.5%
CPAR2_601740	70.8%	59.3%	45.7%	44.0%	41.2%
CPAR2_601750	78.8%	59.4%	45.7%	44.9%	42.2%
CPAR2_601760	58.9	82.6%	45.1%	46.1%	42.7%
CPAR2_701130	43.9%	47.2%	74.5%	93.2%	46.5%
CPAR2_701140	45.2%	46.7%	89.4%	73.3%	46.1%
CPAR2_804680	40.9%	43.8%	45%	45.2%	87.9%
CPAR2_808920	37.8%	40.3%	42.6%	41.8%	52.1%

Cuatro de los cinco miembros de los PLB de *C. albicans* poseen un ortólogo en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, aunque lo interesante es como PLB2 mantiene una sola secuencia homóloga en *C. orthopsilosis*, mientras en *C. parapsilosis* presenta 3 secuencias con porcentajes de identidad muy altos. Estas secuencias por su arreglo y similitud parecen tener origen en dos eventos de duplicación del gen ancestral, además de esto también fue observable un evento de traslocación (Figura 25).

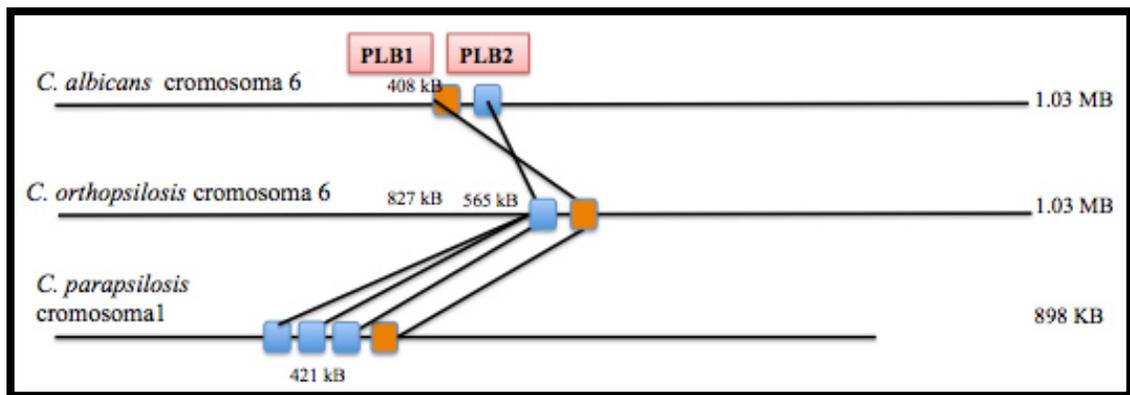


Figura 25. Representación gráfica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB1 Y PLB2. Este esquema muestra un posible evento de inversión de secuencias génicas en el cromosoma 6 de *C. orthopsilosis* con respecto a las secuencias de *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

Aunque no se descarta la posibilidad de una duplicación de las regiones PLB de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* con respecto al gen PLB3, el tamaño de éste con respecto a sus ortólogos podría hacer referencia a una fragmentación (Figura 26). Mientras que el gen PLB5 se mantiene conservado en ambos genomas (Figura 27).

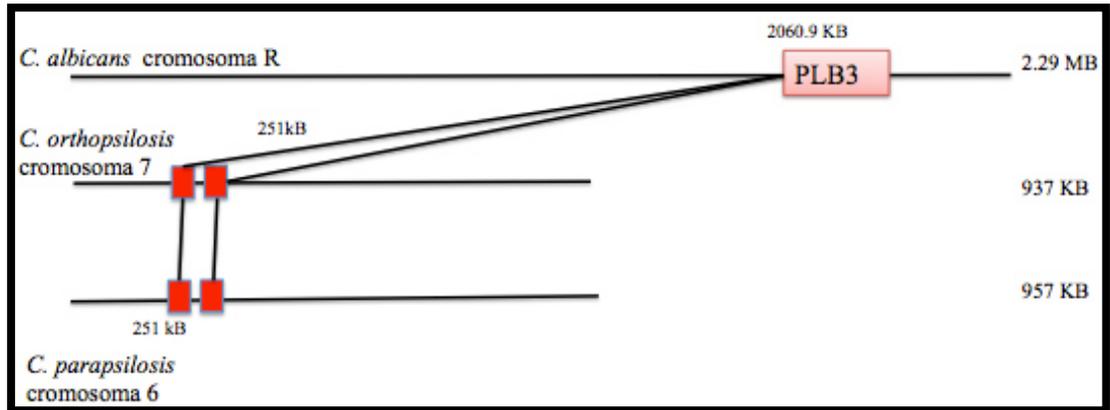


Figura 26. Representación gráfica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB3.

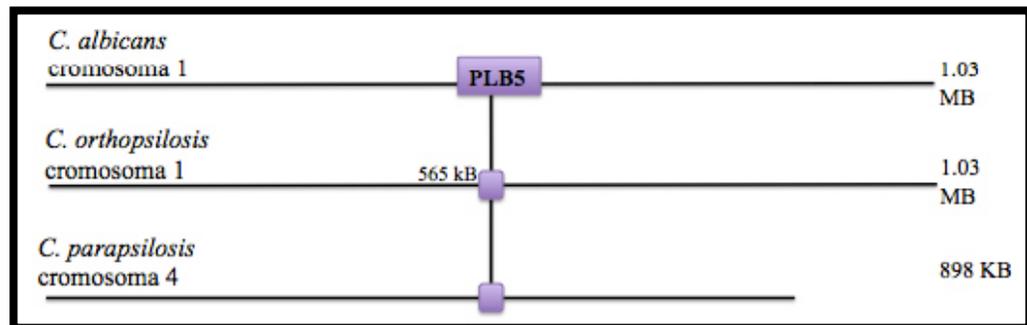


Figura 27. Representación gráfica del arreglo y orden de los genes ortólogos a PLB5.

7.2.4 Comparación de familias génicas: SAP (aspartil-proteinasa)

La búsqueda de posibles genes ortólogos entre las especies de *Candida* mencionadas con anterioridad, señaló a 5 secuencias de *C. parapsilosis* y 4 de *C. orthopsilosis*, que al igual que la familia génica ALS, algunas de estas secuencias (CPAR2_102410, CPAR2_102420 y CPAR2_102580) ya han sido caracterizadas como los genes SAPP1, SAPP3 y SAPP2 respectivamente. Dichos genes parálogos resultan

ser los ortólogos a SAP8 de *C. albicans*, por su parte *C. orthopsilosis* presentó 5 secuencias ortólogas con respecto a *C. albicans*, de las cuales CORT_0B06860, CORT_0B03830 y CORT_0B03690 son genes identificados como SAP7, SAP8 y SAP9 (Tabla 18 y 19).

En la primera columna se presentan los diez integrantes de la familia multigénica de las aspartil-proteinasa, mientras en las columnas restantes se presentan los ID que presentaron homología en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Tabla 18. Secuencias homólogas de SAP.

<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
SAP1	CPAR2_102410	CORT_0B03820
SAP2	CPAR2_102410 CPAR2_102580	CORT_0B03690
SAP3	CPAR2_102410 CPAR2_102420 CPAR2_102580	CORT_0B03690 CORT_0B03820
SAP4	CPAR2_102410 CPAR2_102580	CORT_0B03820
SAP5	CPAR2_102410 CPAR2_102580	CORT_0B03820
SAP6	CPAR2_102410 CPAR2_102580	CORT_0B03820
SAP7	CPAR2_105640	CORT_0B06860
SAP8	CPAR2_102410 CPAR2_102580	CORT_0B03830
SAP9	CPAR2_102610 CPAR2_102590	CORT_0B03860
SAP10	CPAR2_500929	CORT_0B01090

Tabla 19. Genes SAP y sus respectivos ortólogos en los genomas de *C. albicans*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis*. Los tres genes caracterizados en esta última especie son identificados como ortólogos de SAP8 de *C. albicans* y SAP8 de *C. orthopsilosis*.

<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
SAP7 (orf19.756)		SAP7 (CORT_0B06860)
SAP8 (orf19.242)	SAPP1 (CPAR2_102410) SAPP3 (CPAR2_102420) SAPP2 (CPAR2_102580)	SAP8 (CORT_0B03830)
SAP9 (orf19.6928)		SAP9 (CORT_0B03860)
(SAP10) (orf19.3839)		SAP10 (CORT_0B01090)

Aunque en investigaciones previas ya se habían identificado los genes ortólogos entre estas especies, se le dio continuidad a realizar las comparaciones entre estas secuencias (Tabla 20 y 21).

Tabla 20. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes de *C. parapsilosis* con la familia SAP de *C. albicans*.

	CPAR2_102410_SAPP1	CPAR2_102420_SAPP3	CPAR2_102580_SAPP2	CPAR2_102610	CPAR2_105640	CPAR2_500920
SAP1	49.3%	43.7%	48.8%	27.8%	31.8%	30.8%
SAP2	48.6%	42.5%	48.6%	26.5%	30.5%	29.9%
SAP3	50%	41.9%	47.9%	27.2%	31.8%	30.6%
SAP4	43%	37.4%	41.3%	29.6%	33%	28.5%
SAP5	40.5%	36.9%	42%	28.7%	36.9%	27.8%
SAP6	40.2%	37.6%	41.4%	28.1%	31.4%	27.3%
SAP7	30.1%	29.1%	30.3%	27.1%	51.1%	26.1%
SAP8	54.4%	44.3%	51%	28.6%	29.8%	28.1%
SAP9	28.1%	26.8%	27.3%	52.7%	29%	29.5%
SAP10	32.3%	30.6%	30.2%	27%	30%	39.4%

Tabla 21. Porcentajes de identidad (%) obtenidos mediante comparación de secuencias de genes *C. orthopsilosis* con la familia SAP de *C. albicans*.

	CORT_0B03820	CORT_0B03690	CORT_0B03830_SAP8	CORT_0B01090_SAP10
SAP1	49%	48.5%	47.8%	27.8%
SAP2	48.9%	49.8%	49%	28.5%
SAP3	46.7%	49.9%	48.8%	28.1%
SAP4	42.1%	39.4%	41.2%	28.5%
SAP5	40.4%	40.2%	41.1%	27.1%
SAP6	40.4%	38.5%	40.2%	27.3%
SAP7	29.2%	29.7%	29.9%	25.3%
SAP8	51.2%	53.7%	53.7%	29.5%
SAP9	29.2%	29.7%	28.5%	29.6%
SAP10	32.6%	32.2%	33.1%	40.4%

Tabla 22. Porcentajes de identidad (%) de secuencias de genes SAP7-10 de *C. albicans* y SAPP1-3 de *C. parapsilosis* con respecto a los presentes en la familia SAP de *C. orthopsilosis*.

<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. albicans</i>				<i>C. parapsilosis</i>				
	SAP7	SAP8	SAP9	SAP10	SAPP1 CPAR2_ 102410	SAPP3 CPAR2_ 102420	SAPP2 CPAR2_ 102580	CPAR2_ 105640	CPAR2_ 500920
SAP7	49.5%	30.2%	28.1%	30.6%	29.9%	29.4%	31.9%	31.9%	26.8%
SAP8	29.9%	53.7%	28.5%	33.1%	85.3%	51.4%	56.7%	29.2%	30%
SAP9	25.1%	28.8%	53.7%	28.1%	27.2%	26.2%	27.4%	24.7%	25%
SAP10	25.3%	28.3%	29.6%	40.4%	28.9%	27.5%	27.9%	24.7%	80.8%

Los genes SAP7-10 de *C. orthopsilosis* ubicados en su cromosoma 2, presentaron altos porcentajes de identidad (alrededor de 80%) con secuencias aminiacídicas de CPAR2_105640, CPAR2_102410 (SAPP1), CPAR2_102610 y CPAR2_500920 de *C. parapsilosis* (Figura 28-31).

La mayoría de los porcentajes de identidad adquiridos en los genes SAP y sus secuencias homólogas no presentaron valores mayores a 53.7%, aunque la mayoría de los alineamientos realizados entre las familias génicas anteriores tampoco fueron altos. Sin embargo, la comparación entre los genes ortólogos ya se encuentran descritos en la literatura de SAP7-SAP10 en *C. albicans* y sus respectivos en *C. orthopsilosis* (Tabla 22).

Podríamos constatar que estos ortólogos no necesariamente deben presentar altos porcentajes de identidad; la similitud entre secuencias puede ser alta aunque este sea del 30%, siempre y cuando se localice en una región estructuralmente importante como lo es el dominio funcional. Por otro lado si las secuencias presentan sintenia y la función es la misma, es cuando se puede presumir homología.

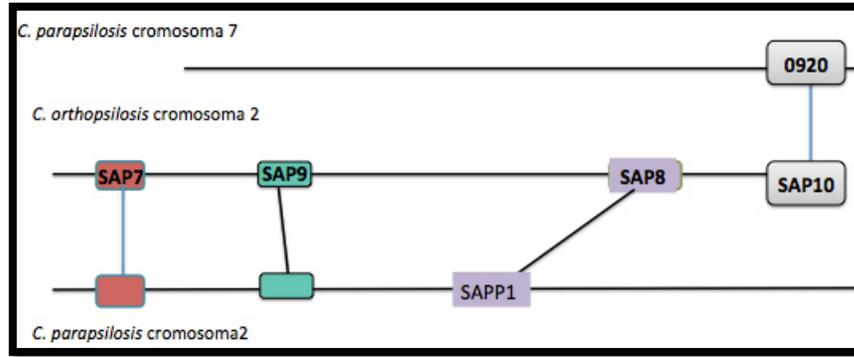


Figura 28. Representación gráfica del orden y arreglo de las secuencias ortólogas de SAP de *C. orthopsilosis*.

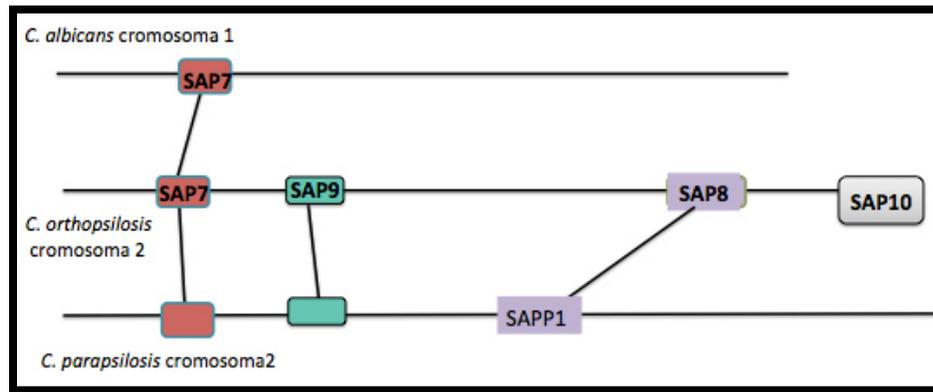


Figura 29. Representación gráfica del arreglo y orden de los genes ortólogos a SAP7 en el cromosoma 1 de *C. albicans* con su ortólogo (y homónimo) en *C. orthopsilosis*, los cuales parecen tener relación filogenética con la secuencia CPAR2_105640.

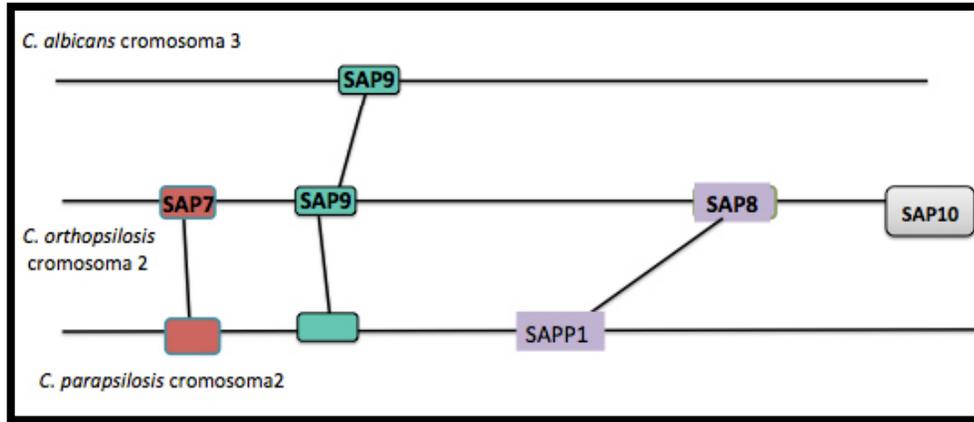


Figura 30. Representación gráfica del arreglo y orden de los genes ortólogos a SAP9 de *C. albicans* en el cromosoma 3; con su ortólogo (y homónimo) en *C. orthopsilosis*, los cuales parecen tener relación filogenética con la secuencia CPAR2_105640.

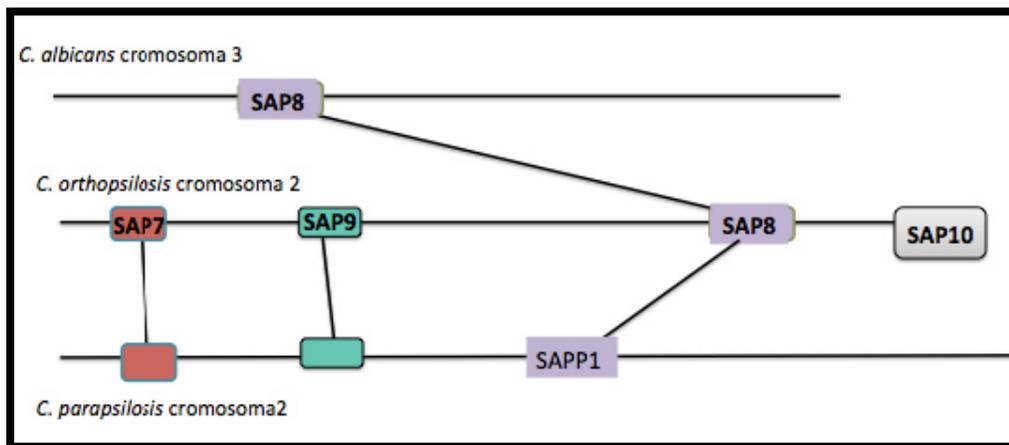


Figura 31. Representación visual de los ortólogos a SAP8 de *C. albicans*, su homónimo en *C. orthopsilosis* y SAPP1 en *C. parapsilosis*.

Como se observó en la tabla 27, el gen SAP8 en *C. orthopsilosis* (y *C. albicans*) es el ortólogo a los tres genes SAPP correspondientes en *C. parapsilosis* (figura 32). Sin embargo solo SAPP1 presenta un porcentaje de identidad alto de 85.3% y 54.4% respectivamente.

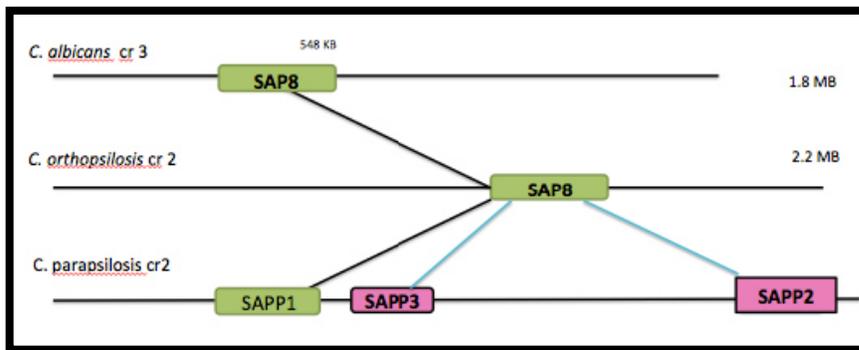


Figura 32. Representación visual de la ubicación de los genes ortólogos a SAP8 de *C. albicans*, *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis*.

Estos genes en particular (SAP8 de *C. orthopsilosis* y SAPP1-3 de *C. parapsilosis*) llamaron nuestra atención debido a la detección de secuencias génicas aledañas a SAPP1 y SAP8 con un mismo dominio y a que presentaron valores lo suficientemente alto para indicar la presencia de un loci de genes duplicados (Fig. 33) (Tabla 23).

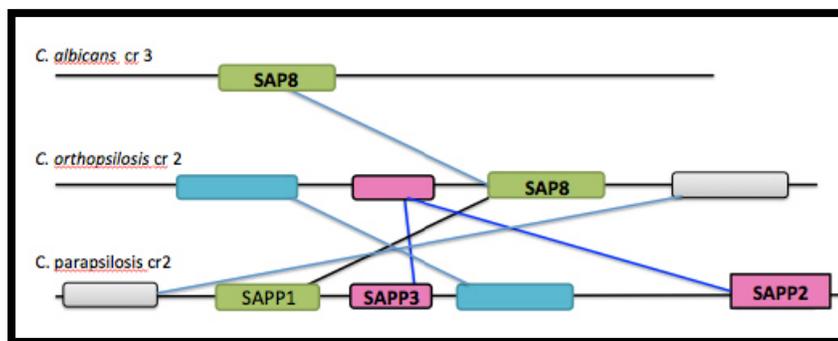


Figura 33. Representación gráfica del loci de los genes de aspartil-proteasa y sus duplicaciones en *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis*.

Tabla 23. Porcentajes de identidad (%) adquiridos al comparar el locus de aspartil proteínasa detectado el mapeo en Symap.

	CPAR2_102400	CPAR2_102410 (SAPP1)	CPAR2_102420 (SAPP3)	CPAR2_102430	CPAR2_102580 (SAPP2)
CORT_OBO3810	22%	26.1%	28.8%	76%	28.4%
CORT_OBO3820	20%	59.4%	68.6%	58%	83.6%
CORT_OBO3830 SAP8	18%	85.3%	51.4%	32%	56.7%
CORT_OBO3840	77%	28.8%	27.5%	47%	27.1%

Por lo tanto los resultados mostrados en la tabla 30 sugieren que SAP8 en *C. albicans* tiene el mismo origen filogenético que SAP8 en *C. orthopsilosis*, y que este último presenta 3 genes triplicados en los extremos. El que se encuentra más proximo a SAP8 identificado como CORT_OBO3820 (3820) presenta porcentajes de identidad más alto con SAPP2 y SAPP3 que el mismo SAP8 (Figura 34), lo que podría indicar que CORT_OBO3820 además de ser una duplicación de SAP8 es homólogo de SAPP2 y SAPP3 y que se podrían derivar a partir del ancestro de 3820; de igual manera las secuencias génicas a los extremos de ambos locus en *C. parapsilosis* y *C.orthopsilosis* poseen altos porcentajes de identidad con lo cual podemos tener más certeza de que éstos son ortólogos y que además han sido traslocados de acuerdo a la posición en la que se encuentran (figura 35).

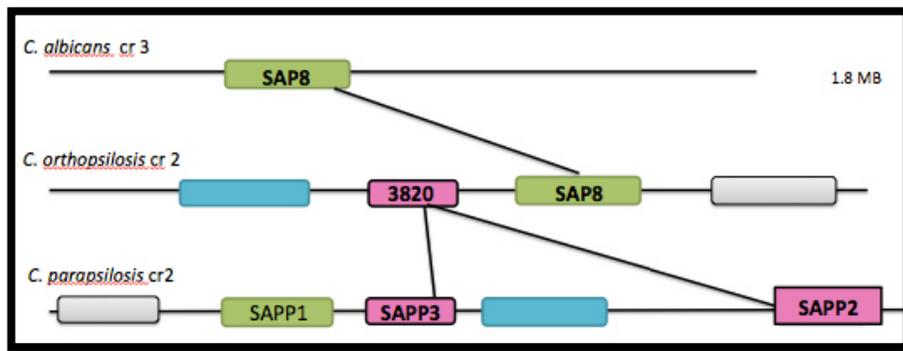


Figura 34. Representación gráfica del posible evento de duplicación del locus aspartil-proteasa en *C. orthopsilosis* (CORT_OBO3820) y lo que serían sus genes ortólogos en *C. parapsilosis* SAPP2 y SAPP3.

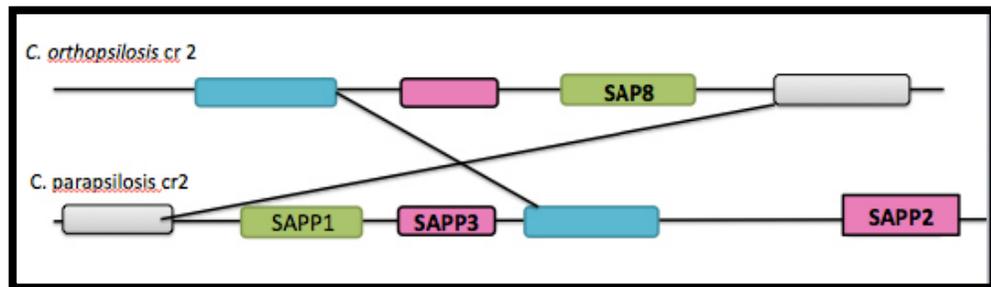


Figura 35. Representación gráfica del posible evento de traslocación en lo locus de aspartil proteasa en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

De acuerdo a todo lo observado en estos locus y además de los diferentes porcentajes de identidad que se observan, se tomó la decisión de diseñar oligonucleótidos de cada uno de estos genes para probarlos como marcadores moleculares específicos para *C. parapsilosis*.

7.3 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se realizó delimitando las regiones consenso observadas en los alineamientos múltiples (Figura 36), y se obtuvieron diversas secuencias las cuales fueron descritas a detalle en el programa Analyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer).



Figura 36. Alineamiento múltiple del locus SAPP (aspartil-proteinasa) en *C. parapsilosis*. Las secuencias alineadas fueron: CPAR2_102420 (SAPP3), CPAR2_102580 (SAPP2), CPAR2_102410 (SAPP1), CPAR2_102400, y CPAR2_102430.

Una vez que las secuencias analizadas cumplieran los estándares necesarios estas se mandaron a sintetizar para así obtener sondas específicas para cada una de las secuencias génicas de aspartil proteinasa (Tabla 24).

Tabla 24. Oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes presentes en el loci aspartil-proteasa.

Organismo	Nombre	Secuencia del oligonucleótido	No. de bases	Tm	%GC
<i>C. parapsilosis</i>	2400-F	CCG AGA ATT CCG ATT CAT TTG TCC	24	56.1	45.8
	2400-R	CAC CAT CAA GAG CGT CAG CA	20	57.7	55
	2410-F	GGC TAC ACC AGC AAT GAA GCA	23	56.5	47.8
	2410-R	GGA AGT AAG TGA GTG TCG TTC CA	21	58.1	52.3
	2420-F	GCC CGT TGA TGT GAA TTC CAC	21	56.8	52.3
	2420-R	CAC CCA AGA TTG GAG TAC CGC	21	58	57.1
	2430-F	GGA GTT GTT ACC ATC TCC AGG T	20	55.4	50
	2430-R	TGC CAA TCG TAA TCG TGT CG	22	56.3	50
	2580-F	GAG GGA CCT TCA TAT GGT ATT CGT	24	56	45.8
	2580-R	AGC ACC ATT GTC GAA GGT G	19	55.5	52.6
<i>C. orthopsilosis</i>	3810-F	GTC GCA TTC TGC ACA TGG CA	20	58.8	55
	3810-R	GTCTTCACCTGGATCTGGGTACG	23	58.9	56.5
	3820-F	GCT GAT GTG ACT AGT ACC TCT G	22	54.3	50
	3820-R	GGA AGT GTA CTT CAC TTG AGC	21	53.3	47.6
	3830-F	TCG CAT TGG CTT TAC TTG CGC	21	59.1	52.3
	3830-R	GCA ACA CAG ACA CTT CTG GC TC	21	58.4	54.5
	3840-F	CTG CTA CGG ATA TGG TTA CCG C	22	57.5	54.5
	3840-R	CTG GTA CCT CAA ACT TTA CCG GG	23	57.3	52.1
<i>C. albicans</i>	S8-F	GCT GAT GTC ACT ACG ACT TCA G	22	55.2	50
	S8-R	GGT AGT TGA AGC ACT AAC AGT GG	23	55.5	47.8

7.4 Validación de oligonucleótidos por pcr en cepas ATCC

Cada uno de los oligonucleótidos diseñados fueron validados *in vitro*, mediante PCR utilizando las cepas control: *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida dubliniensis* ATCC MYA 646, *Candida glabrata* ATCC 20C1, *Candida parapsilosis* ATCC 46/43, *Candida orthopsilosis* ATCC 20503 y *Candida tropicalis* ATCC MVA3464 y cepas clínicas identificadas como *C. metapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. zelanoides* *C. lusitaniae* y *C. krusei*,

Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal forma que su temperatura de fusión (TM) no tuviera tanta variación y así poderlos validar en un mismo programa. Sin embargo aunque estos oscilan entre los 53 y 59 °C, decidimos realizar diferentes programas de PCR para que cada *primer* pudiese amplificar de forma eficiente. Por lo tanto se diseñaron tres programas con una temperatura de alineamiento (TA) diferente mostrado en las tabla 25.

Tabla 25. Programas de amplificación para los diferentes fragmetos de SAP Y SAPP.

Programa	Primers	Pasos	Tiempo	Temperatura	Ciclos
CPARAP53	2400, 2410, 2420 y S8	Desnaturalización inicial	5 minutos	94°C	35 ciclos
		Desnaturalización	2 minutos	94°C	
		Alineamiento	30 segundos	53°C	
		Elongación	30 segundos	72°C	
		Elongación final	5 minutos	72°C	
CP51	2430, 2580, y 3820	Desnaturalización inicial	5 minutos	94°C	35 ciclos
		Desnaturalización	2 minutos	94°C	
		Alineamiento	30 segundos	51°C	
		Elongación	30 segundos	72°C	
		Elongación final	5 minutos	72°C	
CORT55	3810, 3830 y 3840	Desnaturalización inicial	5 minutos	94°C	35 ciclos
		Desnaturalización	2 minutos	94°C	
		Alineamiento	30 segundos	55°C	
		Elongación	30 segundos	72°C	
		Elongación final	5 minutos	72°C	

Una vez diseñados los programas, se procedió a llevar a cabo las validaciones de cada oligonucleótido en *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. En la tabla 26 se resumen los resultados obtenidos. Una vez seleccionados los oligonucleótidos, estos se probaron en diferentes especies de *Candida* para comprobar que ninguna otra especie tuviera un producto de amplificación (Figuras 37 y 38).

Tabla 26. Resultados de la validación de los oligonucleótidos diseñados en cepas control. (+) Presencia un producto amplificado. (-) No se presentó amplificación.

Marcador	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C.metapsilosis</i>
2400 (CPAR2_102400)	+	+	-	-	-
2410/SAPP1 (CPAR2_102410)	+	-	-	-	-
2420/SAPP3 (CPAR2_102420)	+	-	-	-	-
2430 (CPAR2_102430)	-	+	-	+	-
2580/SAPP2 (CPAR2_102580)	+	+	-	+	-
3810 (CORT_OBO3810)	+	-	-	+	-
3820 (CORT_OBO3820)	+	-	-	+	-
3830/SAP8 (CORT_OBO3830)	-	-	-	+	-
3840 (CORT_OBO3840)	+	-	-	+	-
SAP8 (orf19.242)	-	+	-	-	-

Al analizar estos resultados escogimos a los oligonucleótidos 2420 para *C. parapsilosis*, 3830 para *C. orthopsilosis* y SAP8 para *C. albicans* como los marcadores específicos que se validarían en cepas clínicas. Estos oligonucleótidos darán amplicones de 900, 1000 y 300 pb respectivamente.

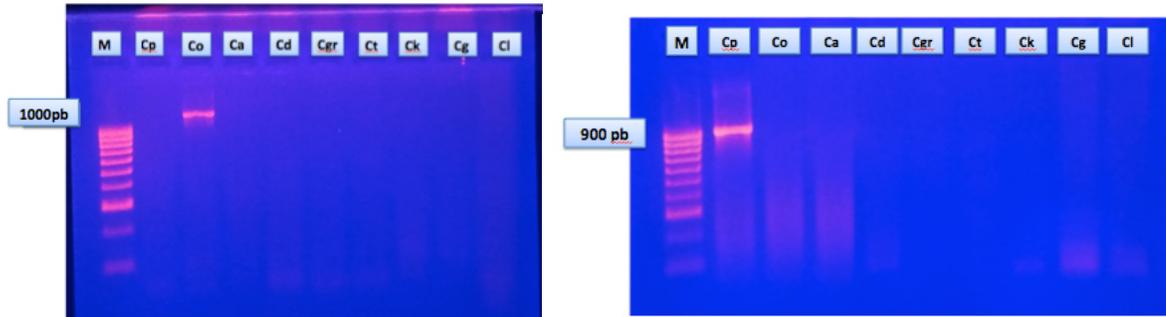


Figura 37 y 38. Validación de amplificación exclusiva en la especie de interés. La figura 30 muestra las diferentes especies de *Candida* probadas con el marcador 2420 (SAPP3) para *C. parapsilosis* mientras que la figura 31 muestra a las mismas especies probadas con el marcador 3830 (SAP8) para *C. orthopsilosis*. Carriles: (M) Marcador de peso molecular Hyperlandder. (Cp) *C. parapsilosis*, (Co) *C. orthopsilosis*, (Ca) *C. albicans*, (Cd) *C. dubliniensis*, (Cgr) *C. glabrata*, (Ct) *C. tropicalis*, (Ck) *C. Krusei*, (Cg) *C. guilliermondii*, (Cl) *C. lusitaniae*.

7.5 Análisis microbiológicos

Antes de someter nuestra colección de aislados clínicos ante su identificación molecular, fue necesario caracterizar previamente las cepas por microbiología. Se activaron 300 cepas provenientes de estudios previos de los cuales sólo se lograron rescatar 46 (Garza Zaragoza, *et al.* 2012), mientras que 7 cepas fueron donadas por el CICESE.

Estas 53 cepas identificadas anteriormente como *C. parapsilosis* se analizaron mediante auxonogramas de carbono en tubo y en el agar CHROMagar (Tabla 27). Los ensayos microbiológicos correspondientes caracterizaron a sólo 35 de las 53 cepas como *C. parapsilosis*.

Tabla 27. Resultados de la caracterización microbiológica.
Fuentes de carbono para el auxonograma Glucosa como control positivo (G), Lactosa como control negativo y Maltosa como azucar diferencial (M).

Cepa	Auxonograma			CHROMagar	Identificado previamente como	Referencia	Identificado como
	G	L	M				
1	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
2	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
3	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
4	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
5	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
6	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
7	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
8	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
9	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
10	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
11	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
12	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
13	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
14	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
15	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
16	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
17	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
18	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
19	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
20	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
21	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>

22	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
23	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
24	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
25	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
26	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
27	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
28	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. parapsilosis</i>
29	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
30	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
31	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
32	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
33	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
34	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
35	+	-	+	crema	<i>C. parapsilosis</i>	Donación CICESE	<i>C. parapsilosis</i>
36	+	-	-	Rosa-lavanda	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. glabrata</i>
37	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
38	+	-	-	Rosa-lavanda	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. glabrata</i>
39	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
40	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
41	+	-	-	azul	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. tropicalis</i>
42	+	-	+	Rosa-lavanda	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. glabrata</i>
43	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
44	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
45	+	-	-	Rosa-lavanda	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. glabrata</i>
46	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
47	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
48	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
49	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida

50	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
51	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
52	+	-	-	crema	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	Desconocida
53	+	-	-	Lila con bordes blancos	<i>C. parapsilosis</i>	(Garza Zaragoza, <i>et al.</i> , 2012)	<i>C. krusei</i>

7.6 Validación de oligonucleótidos en aislados clínicos.

Las 35 cepas identificadas como *C. parapsilosis* fueron sometidas al programa CPARAP53 con los oligonucleótidos 2420 Forward y Reverse el cual amplifica un fragmento del gen SAPP3 de 900 pb.

De las 35 cepas analizadas sólo 22 amplificaron una banda de 900 pb, la cual es la esperada con este juego de primers (Figura 39).

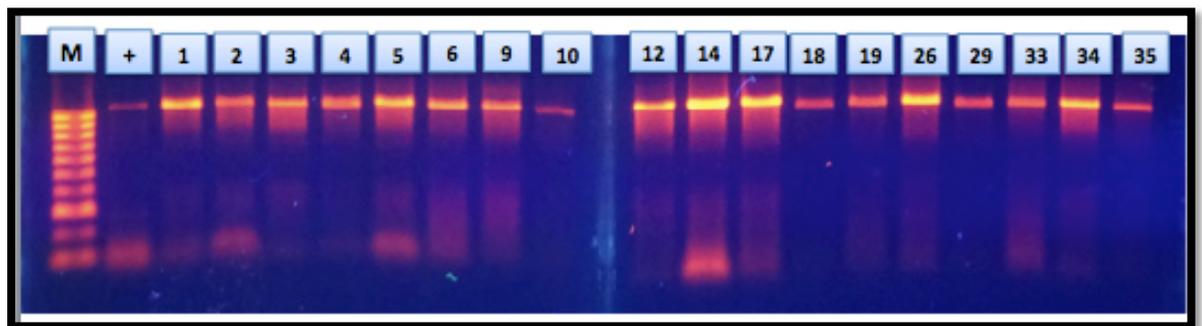


Figura 39. Validación de oligonucleótido 2420 en aislamientos clínicos. (M) Marcador de peso molecular Hyperlander 1kb. (+) ATCC 2633 *C. parapsilosis* (1-6,9-10,12,14,17-19,26,29,33-35), un total de 19 cepas clínicas identificadas como *C. parapsilosis*.

Las 16 cepas restantes fueron analizadas con el oligo 3830 para *C. orthopsilosis* en el programa CORT55. Sólo una cepa fue identificada como *C. orthopsilosis* (Figura 40).

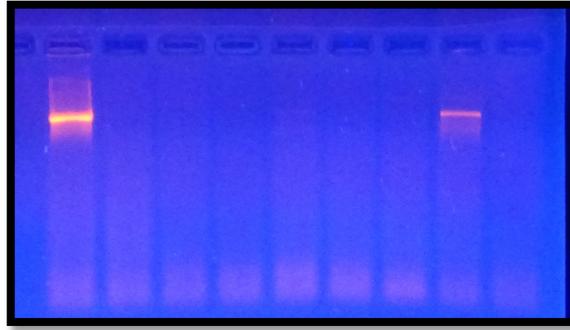


Figura 40. Validación de oligonucleótido 3830 en aislamientos clínicos. De las 16 cepas restantes sólo una cepa (32) presentó amplificación.

Por último se tomó la decisión de tomar 5 cepas al azar de las 15 faltantes e identificarlas utilizando ITS1 y 2. Éstos amplicones tuvieron una banda de 600 pb, tamaño que se suele obtener cuando se trata de una especie del género *Candida* (Figura 42).

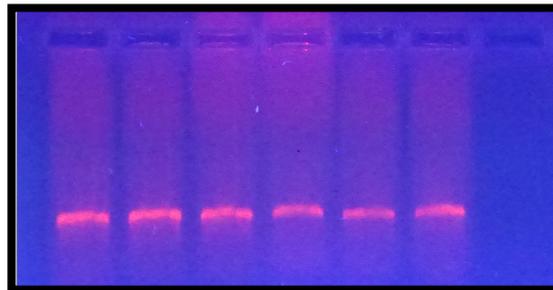


Figura 41. Producto de 600 pb de PCR amplificado con ITS1 y 2.

7.7 Comparación de secuencias obtenidas con base de datos Genbank

Los fragmentos amplificados y purificados se enviaron al LANGEBIO-CINVESTAV en Irapuato. Las secuencias obtenidas fueron proporcionadas en formato FASTA (ANEXO 3) y fueron alineadas con el programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor (Copyright © 1997-2007 Tom Hall) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) con la finalidad de verificar que éstas coincidieran entre sí, y junto con la revisión de los electroferogramas se corrigieron los

errores mostrados. Posteriormente se tomaron las secuencias en formato FASTA y se realizaron alineamientos locales en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

El alineamiento por BLAST determinó que las 19 secuencias obtenidas tras el uso de los oligos 2420 para *C. parapsilosis* poseen un 99% de identidad con el gen SAPP2 (GenBank. Número de acceso AF339513.1). De igual manera la secuencia obtenida de la cepa 32 identificada como *C. orthopsilosis* presentó un 89% de identidad al utilizar los oligonucleótidos 3830 para el gen SAP8 (GenBank. Número de acceso XM_003867480).

Por otra parte las cepas identificadas por la secuenciación de ITS1 y 2 mostraron alta porcentaje de identidad con *C. glabrata* (cepas 7, 8, 29 y 30), *C. lusitanae* (cepa 11) y *C. tropicalis* (cepa 31).

7.8 Análisis filogenéticos

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando la herramienta MUSCLE de MEGA5 y en base a este se construyó un análisis filogenético por el método de Neighbor joining, el cual muestra la relación de las diferentes secuencias de aspartil-proteínasa. Se analizaron las 20 secuencias SAPP2 de *C. parapsilosis*, las dos secuencias de SAP8 de *C. orthopsilosis* y las secuencias SAP8 de *C. albicans*, también se incluyeron las secuencias génicas de genes reportados en las bases de datos. Se utilizó el coeficiente de Jaccard (Tanimoto) para comparar el juego de variables y se generó un bootstrap de 1000 réplicas, resultando el árbol que se muestra en la Figura 43.

En este análisis filogenético encontramos 5 clados, de los cuales 4 muestran la variabilidad que se presenta entre las secuencias del gen SAPP2, mismo que permitió la identificación de *C. parapsilosis*. Se pueden observar además que éstas se encuentran cerca de la secuencia de referencia. Mientras que en el quinto clado se encuentran agrupadas las secuencias ortólogas a SAP8 de *C. albicans* y *C. orthopsilosis* quienes están más cerca a la secuencia obtenida de la cepa ATCC de *C. parapsilosis*.

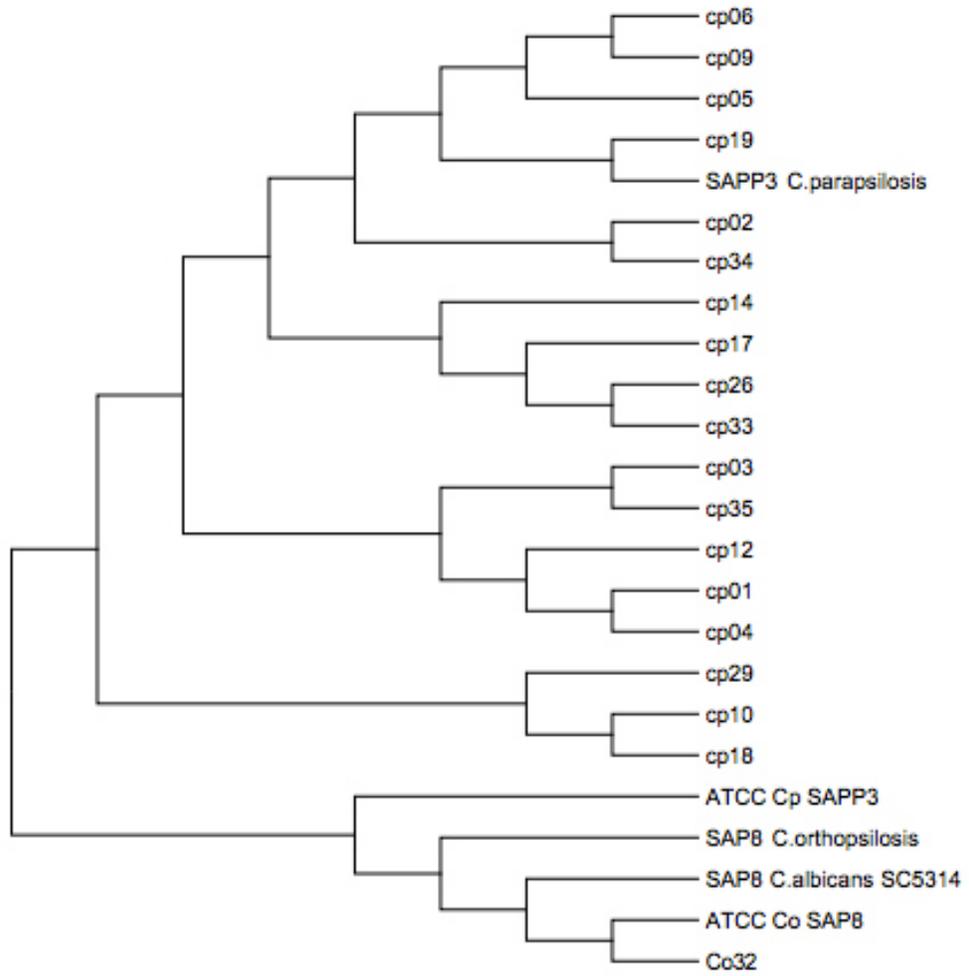


Figura 42. Análisis filogenético que muestra la relación y variabilidad entre las diferentes secuencias de aspartil-proteinasa.

8. DISCUSIÓN

Natura non facit saltum – “La naturaleza no procede por saltos” – es un principio filosófico formulado por Aristóteles, adoptado por Darwin en su libro “El origen de las especies” y citado por Leibniz desde el siglo 17 como: ”La gran cadena de los seres”. En este principio la evolución se desarrolla gradualmente como una acumulación de pequeñas e incontables modificaciones (Wuketits, 1996).

Estas modificaciones que van desde la duplicación de genes individuales, segmentos cromosomales, hasta la duplicación de cromosomas y/o genomas enteros son una gran fuente primaria de evolución en levaduras, a pesar de que estos eventos suelen ser comunes, no está claro cómo la duplicación de genes mantiene el éxito evolutivo ni con qué frecuencia se producen estos eventos (Lynch y Conery, 2000).

Mediante la comparación de familias multigénicas se ha comprobado la participación de ALS (adhesinas), LIP(lipasas), PLB (fosfolipasas B) y SAP (aspartil-proteinasa) en la virulencia de algunas especies del género *Candida* (Singaravelu *et. al.* 2013). La comparación de familias génicas en *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* mostró que la familia SAP es la que presenta alta sintenia y conservación en número de genes, a excepción del gen SAP8, que en *C. albicans* se mantiene conservado a diferencia de SAP8 en *C. orthopsilosis* que presenta rearrreglos en el acomodo de sus genes, mismos que se mostraban expandidos. Por otra parte SAPP1 de *C. parapsilosis* (ortólogo de SAP8) presenta una duplicación, al igual que su parálogo SAPP3.

Pero esta familia no fue la única que presentó estas modificaciones pues, todas las familias génicas estudiadas presentaron al menos una duplicación de uno de sus miembros.

La expansión en secuencias génicas ya ha sido descrita anteriormente por Butler *et. al.*, (2009). Este grupo de investigación describió *grosso modo* algunos eventos de duplicación principalmente en *C. albicans*, analizaron la evolución de la patogenicidad así como la reproducción sexual en cinco genomas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. glabrata*), señalando la expansión de genes en 21 de 9209 familias involucradas en la virulencia de *C. albicans*.

Entre estas familias destacan las lipasas, transportinas de oligopéptidos y adhesinas, las cuales están ausentes en *Saccharomyces* spp. por lo que es muy probable que sean de gran importancia para las adaptaciones y la virulencia del género *Candida*.

Igualmente en trabajos posteriores de Butler (2012) especifican que las familias génicas asociadas a la patogénesis de *Candida* spp. se expandieron en *C. parapsilosis* con respecto a *C. orthopsilosis*, reportando previamente lo observado en la familia génica de las adhesinas la cual se asocia con la adhesión, la adquisición de hierro, la formación de biopelículas y la endocitosis (Hoyer, 2001). Ellos mencionan que hay 5 genes ALS en *C. parapsilosis* (uno en el cromosoma 5, y cuatro repeticiones en tándem en el cromosoma 4 que corresponden a *ALS6-ALS7* de *C. albicans*), y al menos tres en *C. orthopsilosis* (un ortólogo del gen de cromosoma 5 y al menos dos genes en tándem en el loci de cromosoma 4).

Ante estas expansiones de genes; surge la interrogante:

¿Es posible que la emergencia de *C. parapsilosis* se deba a la duplicación de genes implicados en su virulencia?

Es una realidad que la emergencia y reemergencia de algunas enfermedades infecciosas ha sido al incremento de factores de oportunidad que predisponen a un individuo; enfermedades autoinmunes, diabetes, neoplasias, terapias inmunodepresoras, trasplantes, uso indiscriminado de antibióticos y/o drogas son ejemplos de estos factores los cuales favorecen a que microorganismos poco infecciosos tengan éxito.

C. parapsilosis forma parte de la microflora normal en el sistema tegumentario, por lo que a menudo es aislado de manos de trabajadores sanitarios, favoreciendo a la contaminación de catéteres y/o sondas para la alimentación parenteral de pacientes inmunosuprimidos (Barchiesi *et al.* 2004; Clark *et al.* 2004, Dizbay *et al.* 2008)

La presencia de estos genes ayudan a *C. parapsilosis* a la adherencia celular en dispositivos médicos, formando biopelículas y con ello matriz extracelular para la secreción de enzimas degradadoras, las cuales le permiten a la levadura persistir en la infección.

Sería factible pensar que estas eventos de duplicación están generando presión selectiva en *C. parapsilosis*, de hecho Butler y colaboradores sugirieron que estos eventos son

adaptaciones asociadas con la virulencia de estas levaduras; sobre todo cuando se observa una expansión génica de un gen que está involucrado con infecciones en piel por *C. albicans*.

En general se puede pensar que la duplicación de genes es un mecanismo evolutivo de la mayoría de los genes, pues si un segmento de DNA duplicado es lo suficientemente largo para incluir un gen entero o un grupo de genes, el organismo con la duplicación tendrá múltiples copias de estos; sin embargo si una única secuencia (gen ancestral) es suficiente para el genoma, la acumulación de copias adicionales no ofrece en realidad ninguna ventaja selectiva (Chieh-Wu *et al.* 2014).

O bien después de la duplicación, uno de los duplicados pierde presión selectiva mientras que la otra copia continúa suministrando a la célula su función original, por lo que las duplicaciones pueden acumular mutaciones (inserciones y deleciones) que pueden tener efectos diferentes al grado de dejar de ser funcional o bien adquirir una función nueva (Gogarten y Olendzenski, 1999).

Al conocer la relación sinténica entre los genomas estudiados (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*) fue posible observar cómo los cambios evolutivos entre especies han definido bien a las mismas. Por un lado tenemos la fragmentación y translocación entre los cromosomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, mientras que por otra parte observamos una fragmentación cromosomal total entre *C. albicans* y *C. parapsilosis*.

La primera comparación genómica entre *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* fue realizada en el 2012 por Butler *et. al*, después de la secuenciación y ensamblaje del genoma de *C. orthopsilosis*, observándose reordenamientos significativos en las estructuras de los cromosomas con respecto a *C. parapsilosis*. Su análisis muestra que la mayor parte de los cromosomas de *C. orthopsilosis* poseen al menos un evento de translocación en comparación con *C. parapsilosis*, y que además los dos genomas difieren por un mínimo de 7 pasos de translocaciones recíprocas. (Tabla 28)

Al analizar sus resultados con los nuestros existe concordancia, pues la fragmentación cromosomal que se observa entre estos genomas es recíproca. Encontramos que dos locus de diferentes cromosomas conforman un cromosoma completo de la otra especie,

eso es constante menos en 1 de los 8 cromosomas, el cromosoma 6 de *C. parapsilosis* que es sinténico al cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*. La única gran discrepancia es en qué cromosomas se presentan estas translocaciones. En la siguiente tabla se presenta la comparación de los resultados obtenidos en ambos estudios. Es importante señalar que los genomas disponibles en la base de datos Candida genoma (los cuales fueron ensamblados por este grupo de investigación) constantemente son curados, por lo que es posible que algunos de los resultados genómicos presentados por ellos en el 2012 estén sujetos a errores.

Tabla 28. Comparación de resultados observados de las translocaciones cromosomales entre *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*.

Resultados obtenidos		Butler <i>et. al</i> , 2012	
<i>C.parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>
Cromosoma 1	Cromosoma 6 y 8	Cromosoma 1	Cromosoma 2 y 6
Cromosoma 2	Cromosoma 2 y 6	Cromosoma 2	Cromosoma 1 y 4
Cromosoma 3	Cromosoma 5 y 8	Cromosoma 3	Cromosoma 5 y 8
Cromosoma 4	Cromosoma 1 y 3	Cromosoma 4	Cromosoma 4 y 5
Cromosoma 5	Cromosoma 1	Cromosoma 5	Cromosoma 2 y 4
Cromosoma 6	Cromosoma 7	Cromosoma 6	Cromosoma 6 y 8
Cromosoma 7	Cromosoma 2	Cromosoma 7	Cromosoma 7
Cromosoma 8	Cromosoma 2 y 5	Cromosoma 8	Cromosoma 1 y 3

Es complicado poder establecer qué genoma originó al otro o si éstos presentan un ancestro en común, pero sí podemos asegurar que desde la separación de ambas especies se sigue presentado una alta conservación entre sus secuencias.

La pérdida de sintenia es algo que se muestra tras la comparación de *C. albicans* y *C. parapsilosis* y así mismo entre *C. albicans* y *C. orthopsilosis*. Una gran cantidad de translocaciones cromosomales fueron observadas mediante circle plot. Algo muy diferente a la alta sintenia que presenta *C. albicans* y *C. dubliniensis*, donde los cambios evolutivos al nivel genómico han sido escasos (Jackson *et. al*, 2009).

A pesar de que el grupo CTG comparte características morfológicas y genéticas que las relacionan entre sí como algunos mecanismos de patogénesis (Butler *et. al* 2009), éstas levaduras poseen también una gran variabilidad.

Conociendo acerca de la similitud/variabilidad y el papel de cada gen aspartil-proteinasa en *C. albicans*, sabemos que estos están agrupados en tres grupos: SAP1-3, SAP4-6 y SAP9-10, quedando excluidos SAP7 y 8; en éste último gen (SAP8) existen estudios *in vitro* que demuestran que es regulado por la temperatura y que sugieren que suele expresarse preferencialmente durante micosis superficiales (Naglik *et al*, 2004).

Decidimos diseñar nuestros marcadores moleculares en base a SAP8 debido a que genes ortólogos a este en *C. parapsilosis* (SAPP3) y *C. orthopsilosis* (SAP8) presentan duplicaciones génicas y a su importancia en el proceso de infección en sistema tegumentario de donde éstas especies suelen aislarse.

Es correcto afirmar que en los últimos años se ha presentado un incremento en la incidencia de *C. parapsilosis*, pero también es importante señalar que *C. glabrata* es otra importante especie que ha aumentado en el número de candidiasis (Turner, 2014; Mallet, 2012; Lass-florl, 2009; Pfaller y Diekema, 2007).

Con los marcadores seleccionados en este trabajo se ha logrado la diferenciar entre el complejo parapsilosis y además de otras especies de interés médico como lo son *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *C. zelandoides*.

Al analizar los resultados obtenidos y la literatura consultada surgen dos interrogantes:

¿Cuáles fueron los métodos implementados para la identificación de *C. parapsilosis* en la literatura ya reportada? y por consiguiente ¿Estos métodos están identificando de manera correcta estas levaduras?

Estas interrogantes surgen tras el análisis propio de este trabajo, pues para la realización del mismo fueron analizadas 35 cepas, identificando molecularmente mediante el uso de nuestros propios marcadores a 19 cepas como *C. parapsilosis*; solamente se identificaron a 6 de las 15 restantes mediante el uso de ITS (recordemos que 1 cepa fue

identificada como *C. orthopsilosis*); las cuales mostraron un alto porcentaje de identidad con *C. lusitanea* y principalmente *C. glabrata*.

Estos resultados obtenidos confirman dos cosas: la primera que bajo pruebas microbiológicas convencionales es difícil identificar a *C. parapsilosis* del resto de las levaduras, incluso utilizando un agar selectivo como lo es CHROMagar.

Aunque diversos autores han descrito el fenotipo de *C. parapsilosis* así como el de *C. glabrata*, estos resultados se tienen que reafirmar con pruebas bioquímicas, incluso la misma ficha técnica de CHROMagar Candida Medium aclara que para la identificación directa de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* ha sido documentado en numerosos estudios, sin embargo si se presenta crecimiento de colonias que poseen un color de rosa claro a oscuro o de malva a violeta, o bien si muestran su color crema natural, deben identificarse mediante los métodos estándar, en pocas palabras este no es un medio diferencial para *C. parapsilosis* ni *C. glabrata*, mucho menos con otras especies como *C. lusitanea* y *C. guilliermondii*.

Y segundo que mediante secuenciación del fragmento ITS1 e ITS2 de la secuencia de DNA ribosomal 18S ha sido posible confirmar la excelencia de nuestros marcadores, pues no han producido un producto de amplificación en especies *Candida* que no sean las de interés. Por otro lado la presencia en nuestro cepario de falsos *C. parapsilosis*, nos indica que las identificaciones microbiológicas no están exentas de errores lo que nos genera la pregunta ¿Bajo qué parámetros microbiológicos o métodos moleculares fueron identificadas estas levaduras?

La mejor técnica para la identificación del complejo parapsilosis es la reportada por Tavanti, aunque esta no es ni sencilla ni económica. Pocos estudios epidemiológicos mencionan como *C. parapsilosis* es identificado (De Toro *et. al*, 2010; Enger *et. al*, 2001).

Por lo que nuestros marcadores moleculares ofrecen una excelente identificación de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*. Estos marcadores basados en los genes aspartil-proteinasa SAPP3 (2420 para *C. parapsilosis*), SAP8 (3830 para *C. orthopsilosis*) y SAP8 (S8 para *C. albicans*) han logrado la amplificación de secuencias filogenéticamente variables.

9. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se describen los primeros marcadores moleculares para PCR punto final con los cuales es posible identificar a *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* del resto de las especies del género *Candida*. Los oligonucleótidos fueron referidos como 2420 y 3830 con amplicones 1000 y 900 pb, respectivamente. Es importante señalar que en este estudio *C. metapsilosis* fue excluido debido a la falta de secuencias de genes disponibles para esta especie.

Estos marcadores moleculares han sido diseñados a partir de la comparación de locus sinténicos entre algunas de las principales familias génicas involucradas en la patogenicidad de estas levaduras.

Además del diseño de estos marcadores se realizó la comparación de los genomas completos de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, con la cual se observaron translocaciones cromosomales en todos los análisis, con la diferencia que en *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, las translocaciones son la evidencia de una fragmentación parcial en los cromosomas y que a pesar de ello, ambos genomas siguen presentando alta sintenia. A diferencia de la comparación de *C. albicans* con *C. parapsilosis* donde la fragmentación cromosomal ha sido total y con esto se ha perdido la sintenia entre estas levaduras.

No sólo se compararon los genomas completos, sino de igual manera se compararon las familias génicas estudiadas, donde fueron observados eventos de duplicación en al menos un miembro de cada familia génica en *C. parapsilosis* y que al analizar estas secuencias con el resto de los genes ortólogos y parálogos se observaron secuencias nucleotídicas diferentes, indicando que estos eventos de duplicación no son recientes y han generado mutaciones.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo representa una contribución al área de la salud para el temprano diagnóstico de *Candida parapsilosis*. Así mismo deja hallazgos que conllevan a la realización de estudios más detallados como:

1. La caracterización de un número mayor de aislados clínicos utilizando nuestros marcadores moleculares diseñados en comparación con la técnica molecular propuesta por Tavanti.
2. Validar y caracterizar cada uno de los eventos de duplicación descritos, así como observar la variabilidad que estos pueden poseer.
3. Aunque no se mencionó mucho debido a que no era uno de los objetivos específicos, se diseñó un marcador molecular que diferencia a *C. albicans* de *C. dubliniensis*, esto fue sólo probado en cepas ATCC, por lo tanto otro importante estudio sería validar estos marcadores en cepas de origen médico para poder seguir con la correcta identificación de especies de *Candida*.
4. Una vez que sea ensamblada la tercera especie perteneciente al complejo parapsilosis, *C. metapsilosis*, diseñar un marcador molecular para su identificación.

11. LITERATURA CONSULTADA

Agatensi L, Franchi F, Mondello F. 1991. Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. *J Clin Pathol* 44:826-830.

Andreeva N. S., Rumsh L.D. 2001. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci.* 10: 2439-50

Ashford, B. 1928. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8:507–538

Ayatollahi, M, S. A. E. Khalesi, B. Shahidi, S. Aghighi, F. Sharifi y F. Aram. 2007. Rapid Molecular Diagnosis for *Candida* species using PCR-RFLP. *Biotechnology.* 6(4):583-587

Baillie GS, Douglas LJ. 1998 Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1900-5.

Barchiesi, F., Spreghini, E., Maracci, M., Fothergill, AW, Baldassarri, I., Rinaldi, MG Scalise, G. 2004. In vitro activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 48 , 3317 a 3322.

Barns, S.M., Lane, D.J., Sogin, M.L., Bibeau, C. y Weisburg, W.G. 1991. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J.Bacteriol.* 173: 2250-2255.

Becker K. (2000). Molecular methods for diagnostic and typing of yeasts. *Mycoses.* 43:40-47.

Blankenship, J.R., y Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 588–594.

Bonifaz A. (2012). *Micología Médica Básica.* Mc Graw Hill: México pp 321-347

Bouchonville K, Forche A, Tang KE, Selmecki A, Berman J. 2009 Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 8:1554–1566.

Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459: 657- 662.

Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., & Dubreucq, E. 2004. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 111(1), 41-50.

Calderone AR, Fonzi AW. 2001 Virulence factors of *C. albicans*. *Trends Microbiol*;9(1):327-35.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. (1995) Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis. *J. Dent. Res.* 74: 1152-11

Camacho DP, Gasparetto A, svidzinski Ti. The effect of chlor- hexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia* 2007;163:261- 266.

Colombo AL, Nucci M, salomao R. (999 High rate of non-al- bicans candidemia in brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol infect Dis* 34:281-286.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.*;44:2816–23.

Chibana, H., Beckerman, J.L., Magee, P.T., 2000. Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res.* 10, 1865–1877.

Chaffin WL. (1998) Cell wall and secreted proteins of *C. albicans*. Identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:130-80. 43.

Chang-Chang H., S. Ning Leaw, A. Huey Huasing, T. Lan Wu y T. Chang Chang. 2001. Rapid identification of yeast in positive blood cultures by a Multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology.* 39 (10): 3466-3471

Clark TA. 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4468–4472.

Crump JA, Collignon PJ. 2000 Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ;19:1-8.

De Bernardis F, Lorenzini R, Verticchio R, 1989 isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol*;27:2598-2603.

De Toro, M., Torres, M. J., Maite, R., & Aznar, J. 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clinical Microbiology and Infection*,17(3), 418-424.

Dismukes WE; Pappas PG; Sobel JD. 2003. *Clinical Mycology*. Oxford University Press, Inc. pp. 143-175.

Dizbay M., Fidan I, Kalkanci A, Sari N, Yalcin B, Kustimur S, D Arman.2010. High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: epidemiology and antifungal susceptibility. *Scand. J. Infect. Dis.* 42:114–120

Enger, L., Joly, S., Pujol, C., Simonson, P., Pfaller, M., & Soll, D. R. 2001. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 658-669.

Forche A, Abbey D, Pisithkul T, 2011 Stress Alters Rates and Types of Loss of Heterozygosity in *Candida albicans*. *mBio*. 2

Franza M. Wuketits 1986 Evolution as a Cognition Process: Towards an Evolutionary Epistemology. [REVIEW] *Biology and Philosophy* 1 (2):191-206.

Fundyga, R. E., R. J. Kuykendall, W. Lee-Yang, and T. J. Lott. 2004. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect. Genet. Evol.* 4:37

Gacser A, et al. 2007. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117(10):3049-58

Gatica JL, Goic I, Martínez MA, Reid I, Céspedes P, Arias MC, Ovalle A y Musted H. 2002. Utilidad del agar cromocandida para el diagnóstico diferencial de *Candida* spp. aisladas de muestras vaginales. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 67(4):300-4.

Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin D. 2011. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3257–3261

Garza Zaragoza, E. 2012. Caracterización taxonómica y molecular de *Candida* spp. en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Ghannoum MA. 2000 Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 3:122-43.

Haynes K. 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 9 (12): 591-6

Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. 2011. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Med. Microbiol.* 60:477–480

- Horváth P, Nosanchuk JD, Hamari Z, Vágvölgyi C, Gácsér A.** 2012 .La identificación de la duplicación de genes y el papel de secretada aspartil proteinasa 1 en *Candida parapsilosis* virulencia. *J Infect Dis.* 205 (6): 923-933.
- Hostetter MK.** 1994 Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 7:29-42.
- Hoyer, L.L.** 1995 *Candida albicans* ALS1:domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol . Microbiol .* 15, 39–54
- Hoyer, L.L. et al .** 1998 *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.* 33, 451–459
- Hoyer, L.L. et al .** 1998 Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J . Bacteriol .* 180, 5334–5343
- Hoyer, L.L. and Hecht, J. E .** 2000 The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*. *Yeast* 16, 847–855
- Hoyer, L.L. and Hecht, J. E .** 2001. The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* 18, 49–60
- Inglis DO, Arnaud MB, Binkley J, Shah P, Skrzypek MS, Wymore F, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G.** 2012. The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D667-74.
- Jackson, A. P., Gamble, J. A., Yeomans, T., Moran, G. P., Saunders, D., Harris, D., & Berriman, M.** 2009. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome research*, 19(12), 2231-2244.
- Joachim, H. y S. Polayes.** 1940. Endocarditis subaguda y micosis sistémica (Monilia). *JAMA* 205 -208.
- Kavanagh D.** 2005) *Fungi. Biology and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd. pp 176-183.
- Kim, S. K., K. El Bissati, and C. Ben Mamoun.** 2006. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 152:2885–2894.
- Laffey, S.F. y Butler, G.** 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* 151: 1073-81

Land SW, Eschenauer GA, Carver PL. 2009. Evolving role of early antifungals in the adult intensive care unit. *Crit Care Med.* 37:1580-93

Lass-Flori C 2009 The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52: 197–205.

Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, 2010. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *international journal of medical micro- biology.* iJMM300:265-270.

Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. 1992 Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* (30):3249-3254.

Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinell P. 2007. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solution by PCR. *Journal of Clinical Pathology.* 60:1035-1039.

Lin D, Wu L.C., Rinaldi M.G. y Lehmann, P.F. 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1815–1821.

Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A. y Diekema, D.J. 2008. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 46: 374–376.

Logue, M. E., S. Wong, K. H. Wolfe, and G. Butler. 2005. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL1 allele at its mating type locus. *Eukaryot. Cell* 4:1009–1017.

Lynch, M., & Conery, J. S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494), 1151-1155.

Mallet, S., Weiss, S., Jacques, N., Leh-Louis, V., Sacerdot, C., & Casaregola, S. (2012). Insights into the life cycle of yeasts from the CTG clade revealed by the analysis of the *Milleromyces* (*Pichia*) *farinosa* species complex. *PloS one*, 7(5), e35842.

McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bounoux ME, 2008 Al Multilocus secuencia de mecanografía revela que la estructura de la población de *Candida dubliniensis* es significativamente menos divergentes que la de *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* ; 46 : 652-64 10.1128

McManus, B. A., & Coleman, D. C. 2014. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 166-178.

McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW. 2001. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *J Clin Infect Dis.* 33: 641-7.

Medrano, D. J., R. S. Brilhante, A. Cordeiro Rde, M. F. Rocha, S. H. Rabenhorst, and J. J. Sidrim. 2006. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48:17–20.

Mendoza Y., Moncada D., Arroyo S., Sánchez MC., Manzano P., Arenas R. 2013. Candidemias en un hospital general de la Ciudad de México: estudio de sensibilidad a antifúngicos con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo. *Dermatol Rev Mex.* 57:155-158.

Mirhendi H., Makimura K., Khoramizadeh M., y Yamaguchi H. 2006. A One Enzyme PCR-RFLP Assay for identification of six medically important *Candida* species. *Japan Journal of Medical Mycology.* 47:225-229.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via apolymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.

Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O., & Hube, B. 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular microbiology*, 6(10), 915-926.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003a;67:400–428

Nakamura, T., and H. Takahashi. 2006. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J. Infect. Chemother.* 12:132–138.

Neugnot V, et al. 2002. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269(6):1734-45

Nosek, J., L. Adamikova, J. Zemanova, L. Tomaska, R. Zufferey, and C. B. Mamoun. 2002. Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida* 15:135–138

Orberá-Raton T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología.* 21: 15-19

Odds, F. C. 1987. *Candida* infections: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 15:1-5.

Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., and Bliss, J.M. 2013 *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 32:e206-e216.

Parra-Ortega, B., Cruz-Torres, H., Villa-Tanaca, L., Hernandez-Rodriguez, C. 2009. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 505– 512.

Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:133–163.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, and S. A. Messer. 2001. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 39:3254–3259.

Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. 2012. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *PLoS One.*;7:e35750.

Rodero, L., G. Davel, M. Soria, W. Vivot, S. Cordoba, C. E. Canteros, and A. Saporiti. 2005. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 37:189–195.

Roy B, Meyer SA. 1998. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 36:216-218.

Ruiz-Aragón, J., García-Martos, P., Puerto, J. L., Marín P., Saldarreaga A., Moya P. 2003. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. *Rev Diagn Biol* [online]. vol.52, n.1

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354

Santiago-Sotero y Ramírez-Prado. 2012 pfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. *Biotechniques.* 53(5):299-300.

Santos, M. A., and M. F. Tuite. 1995. The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids. Res.* 23:1481– 1486.

Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring harbor Laboratory Press .

Scherer S, Stevens DA. 1987 Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 25:675-679.

Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P. yRyang, D.W. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida species* recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1244–1248.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W. y Azeredo, J. 2011. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 288- 305.

Silva A. P., Miranda I. M., Lisboa C., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G. 2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2392–23

Singaravelu K, 2014 Determinantes genéticos de la virulencia - *Candida parapsilosis*. *Rev Iberoam Micol* 31 1: 16-21

Song JW, Shin JH, Shint DH, 2005 Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol* 43:657-661.

Souza AC., Ferreira R., Goncalvez S., Quindós G., Eraso E., Bizerra F., Marcelo. 2012. Accurate Identification of *Candida parapsilosis* (Sensu Lato) by Use of Mitochondrial DNA and Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* July; 50(7): 2310–2314.

Sther F, Kretschmar M, Schaller M, Schafer W, Hube B 2000. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Mycoses*, 43: 17-21.

Sturtevant J, Calderone R. 1997. *C. albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol* 14:90-97. 44.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141: 1507–1521.

Tamura NK, Gasparetto A, svidzinski Ti. 2003 Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia*, 156:269-272.

Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43:284–292

Treviño-Rangel R de J, Garza-González E, González JG, González G. 2012. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria.* 14(56):157-165

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:606-625.

Turner, S. A., & Butler, G. 2014. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(9), a019778.

Van Asbeck, E.C., Clemons, K.V. y Stevens, D.A. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.* 35: 283-309.

White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics, p. 315–322 *In* Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., editors. (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. y Edmond, M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39: 309–317.

Wuketits, F. 1996: Evolutionary epistemology A challenge to science and philosophy», en *Concepts and approaches on evolutionary epistemology*. Reidel Publishing Company, Holanda, pp. 1-29

11.1 Material electrónico:

Internet 1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Revisado el 26 de Septiembre de 2013

Internet 2: www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm Revisado el 5 de Octubre de 2013

Internet 3: www.broadinstitute.org Revisado el 5 de Octubre de 2013

Internet 4: www.geneious.com Revisado el 7 de febrero de 2014

Internet 5: www.agcol.arizona.edu/software/symap Revisado el 15 de marzo de 2014

Internet 6: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) Revisado el 10 de agosto de 2014

Internet 7: (<http://www.idtdna.com>) Revisado el 15 de agosto de 2014

12. ANEXOS

ANEXO 1

Estándares establecidos para el diseño de marcadores moleculares.

Longitud del oligonucleótido

- Preferentemente entre 18 y 24 bases.

Temperatura de fusión (T_f)

- Ambos oligonucleotídicos deben diseñarse de forma que tengan temperaturas de fusión similares, los mejores resultados se obtienen con T_f de 55 a 72 °C.

Especificidad

- Los primers han de elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN molde que debe amplificarse.

Secuencias complementarias del oligonucleótido

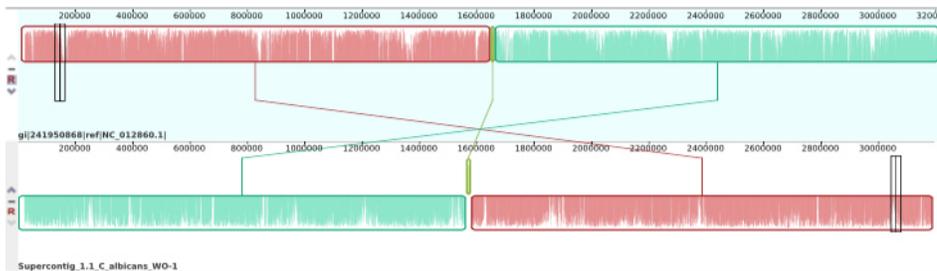
- El diseño no debe incluir ninguna homología interna del primer de más de 3 pares de bases. Estas zonas de auto-homología, pueden formar estructuras con cambios bruscos u horquillas, capaces de interferir con la hibridación al ADN molde.
- Una homología parcial entre primers en las regiones centrales de dos oligonucleótidos puede interferir con la hibridación.

Contenido de G/C y los tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G)

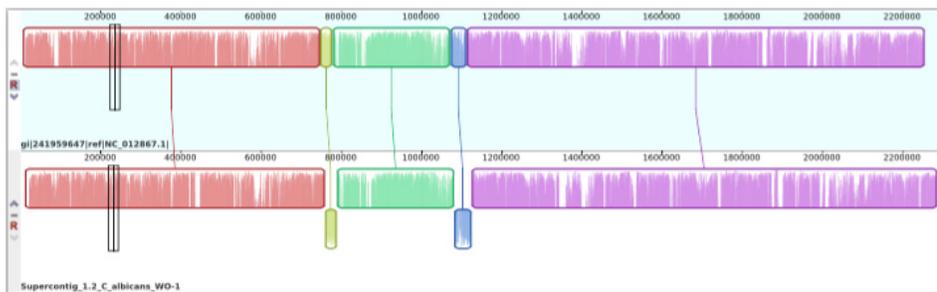
- Contenido de GC entre 45 y un 55 %.
- La secuencia no debe contener tramos de poli-G ni poli-C que puedan favorecer la hibridación inespecífica.
- Evitar los tramos de poli-A y poli-T, ya que pueden abrir tramos del complejo primer-ADN molde, reduciendo la eficacia de la amplificación.
- También evitarse los tramos de polipirimidina (T, C) y polipurina (A, G).

ANEXOS 2

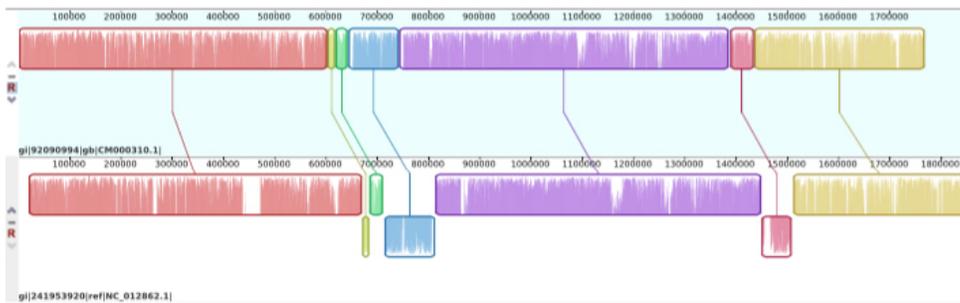
12. 2. 1 Comparación de los cromosomas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Mejores alineamientos)



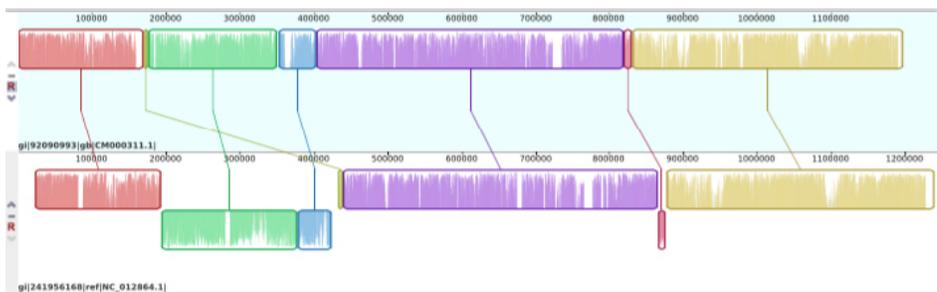
Cromosoma 1 de *C. albicans* y cromosoma 1 *C. dubliniensis*



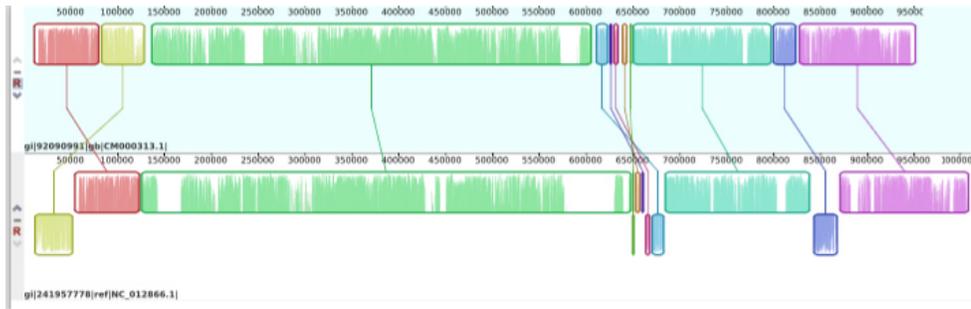
Cromosoma 2 de *C. albicans* y cromosoma 2 *C. dubliniensis*



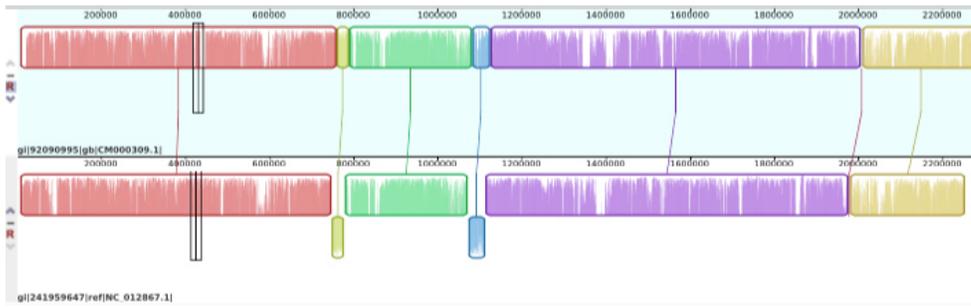
Cromosoma 3 de *C. albicans* y cromosoma 3 *C. dubliniensis*



Cromosoma 5 de *C. albicans* y cromosoma 5 *C. dubliniensis*



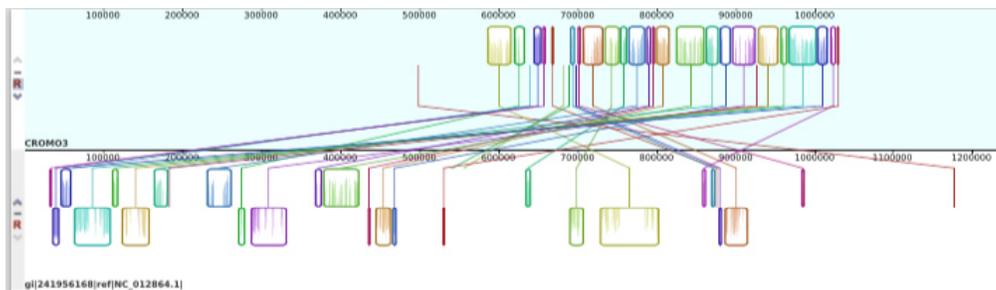
Cromosoma 7 de *C. albicans* y cromosoma 7 *C. dubliniensis*



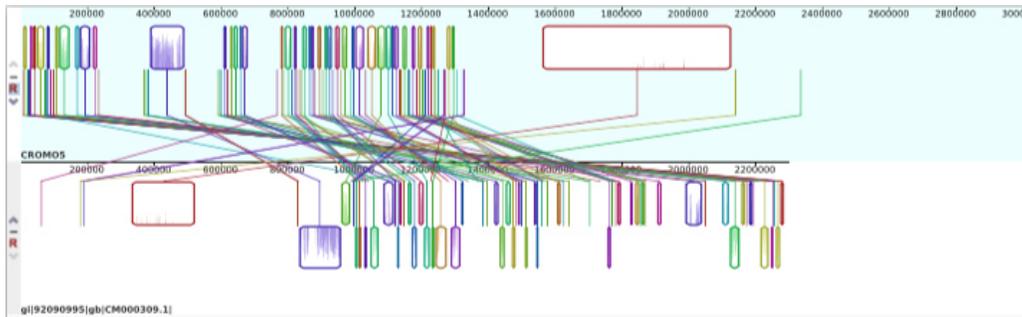
Cromosoma R de *C. albicans* y cromosoma R *C. dubliniensis*

12. 2. 2 Comparación de los cromosomas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*

(Mejores alineamientos)

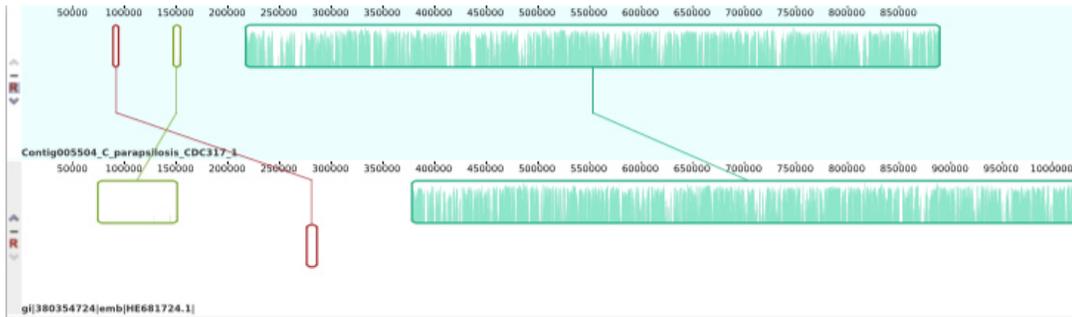


Cromosoma 5 de *C. albicans* y cromosoma 3 *C. parapsilosis*

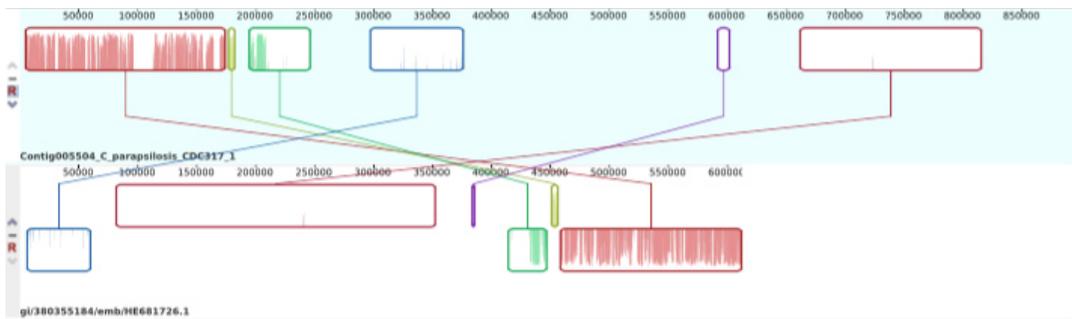


Cromosoma R de *C. albicans* y cromosoma 5 de *C. parapsilosis*

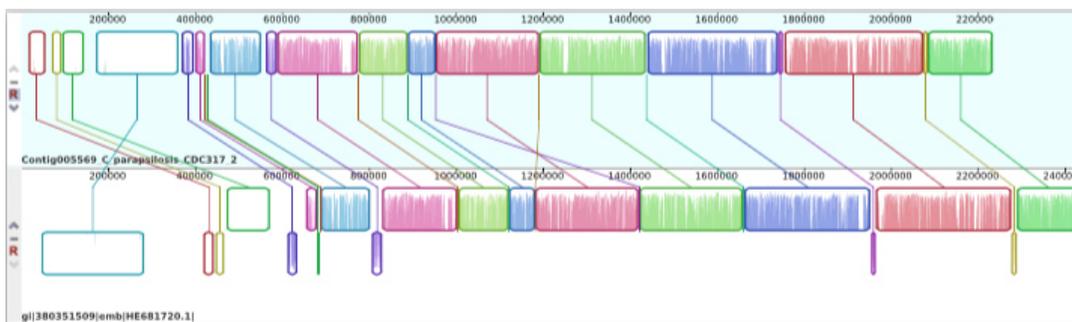
12. 2. 3 Comparación de los cromosomas de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*



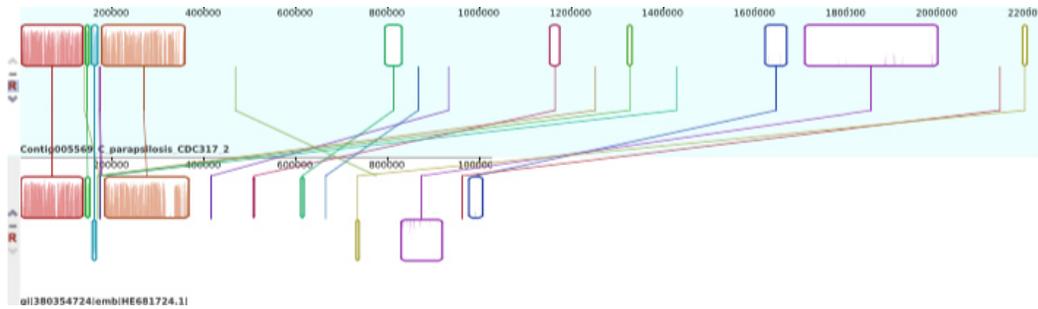
Cromosoma 1 de *C. parapsilosis* y cromosoma 6 de *C. orthopsilosis*



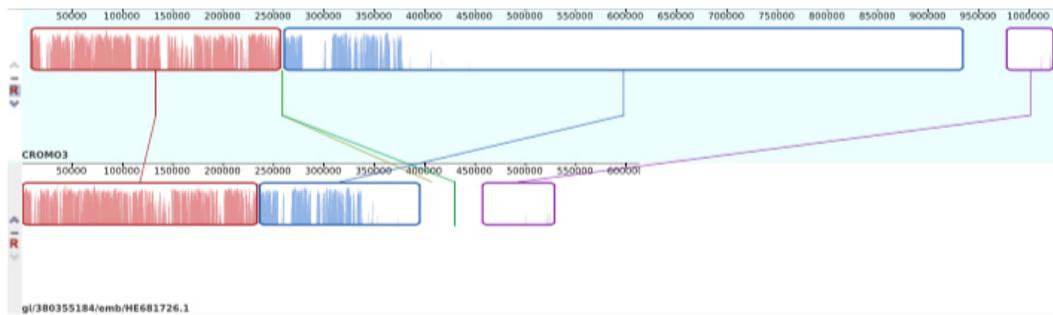
Cromosoma 1 de *C. parapsilosis* y cromosoma 8 de *C. orthopsilosis*



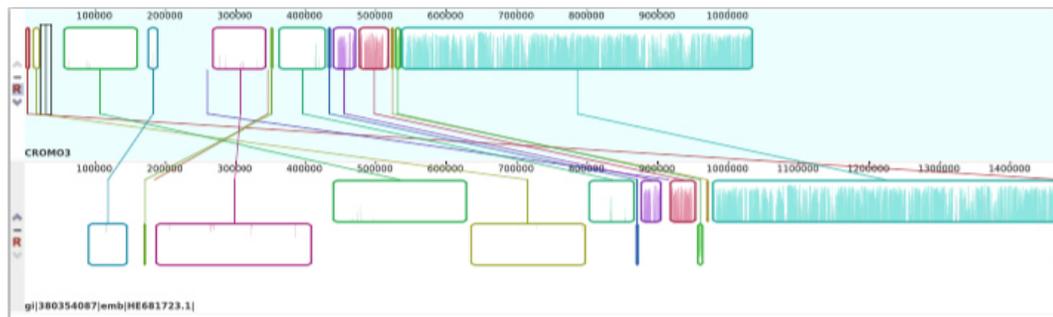
Cromosoma 2 de *C. parapsilosis* y cromosoma 2 de *C. orthopsilosis*



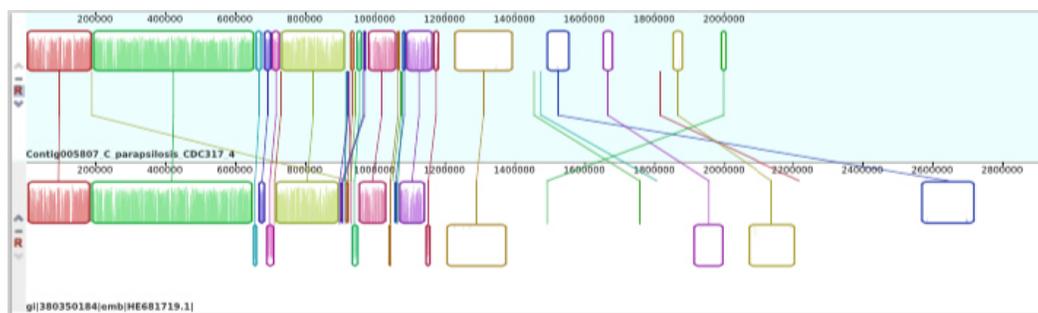
Cromosoma 2 de *C. parapsilosis* y cromosoma 6 de *C. orthopsilosis*



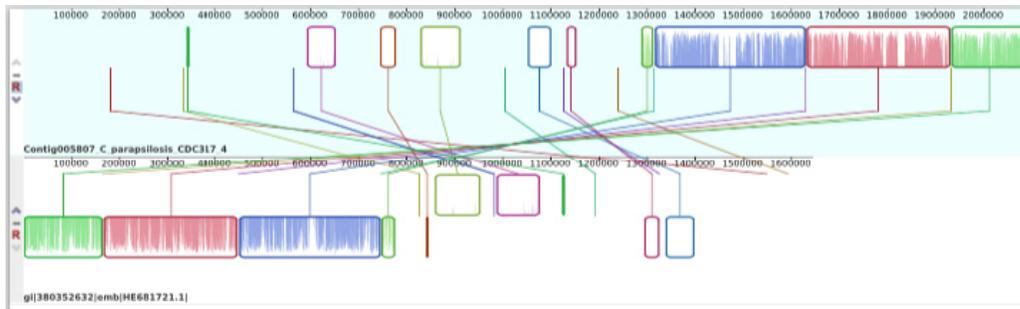
Cromosoma 3 de *C. parapsilosis* y cromosoma 8 de *C. orthopsilosis*



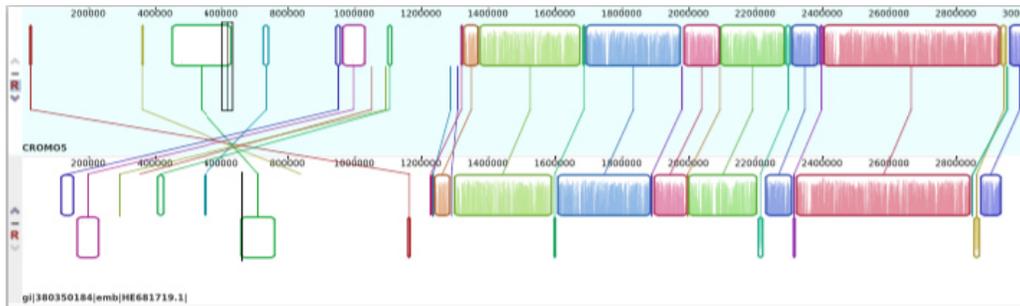
Cromosoma 3 de *C. parapsilosis* y cromosoma 5 de *C. orthopsilosis*



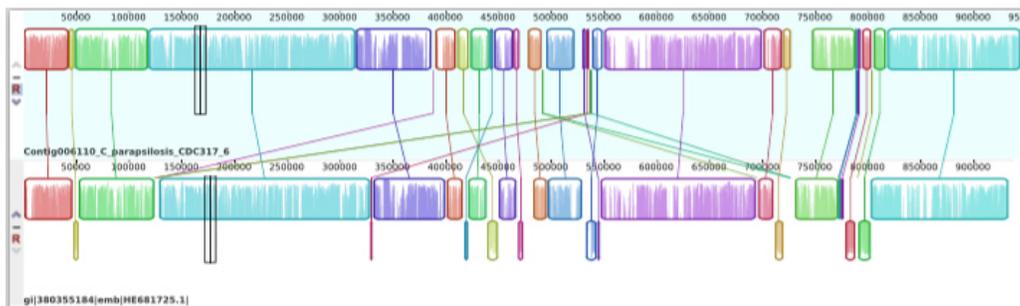
Cromosoma 4 de *C. parapsilosis* y cromosoma 1 de *C. orthopsilosis*



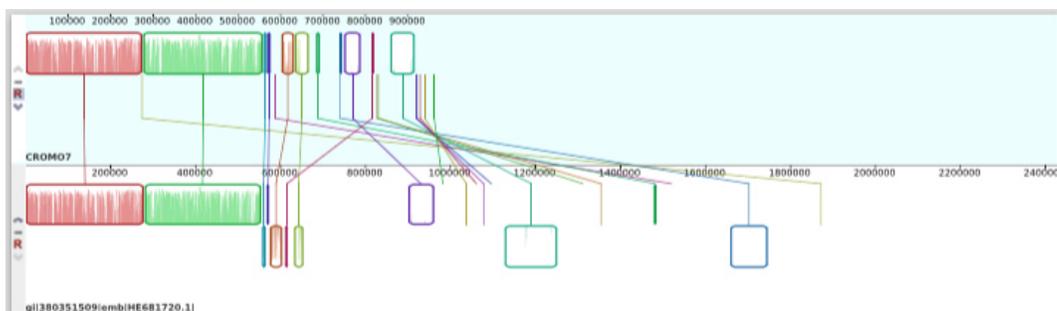
Cromosoma 4 de *C. parapsilosis* y cromosoma 3 de *C. orthopsilosis*



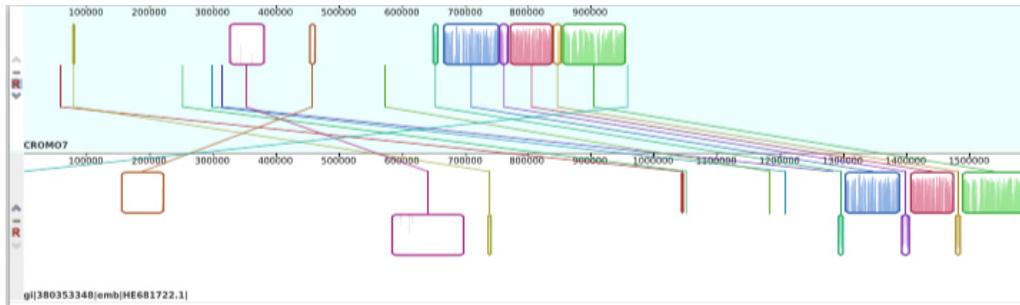
Cromosoma 5 de *C. parapsilosis* y cromosoma 1 de *C. orthopsilosis*



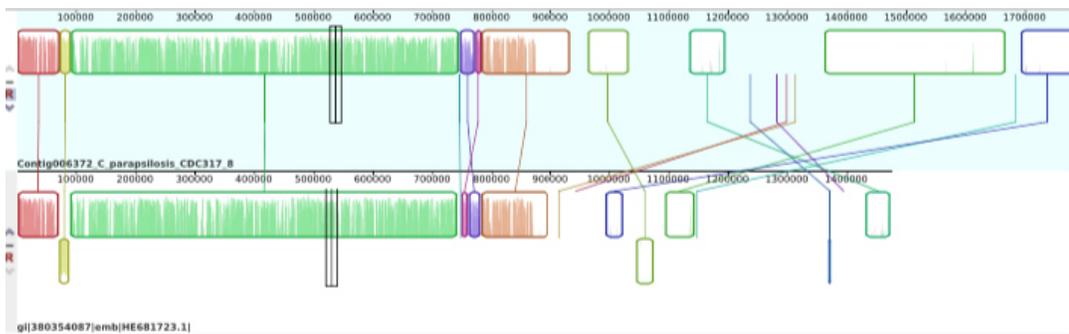
Cromosoma 6 de *C. parapsilosis* y cromosoma 7 de *C. orthopsilosis*



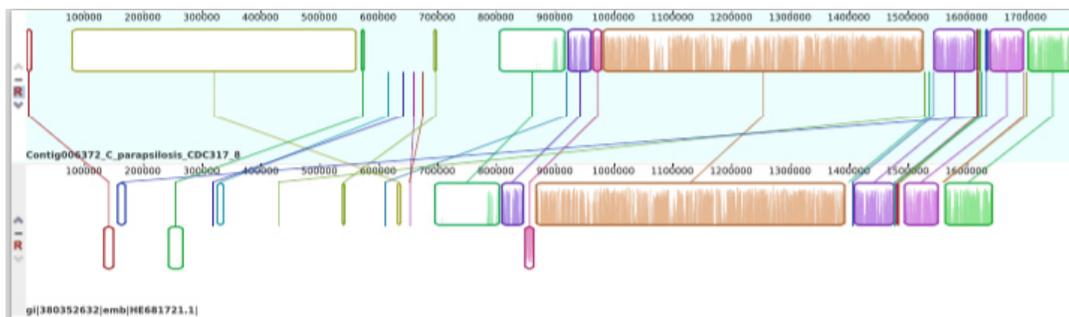
Cromosoma 7 de *C. parapsilosis* y cromosoma 2 de *C. orthopsilosis*



Cromosoma 7 de *C. parapsilosis* y cromosoma 4 de *C. orthopsilosis*



Cromosoma 8 de *C. parapsilosis* y cromosoma 5 de *C. orthopsilosis*



Cromosoma 8 de *C. parapsilosis* y cromosoma 3 de *C. orthopsilosis*

ANEXO 3

Secuencias obtenidas

Nombre de la secuencia: Cp01	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 932 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 CATTATAACC GTGTATCTTG TTGAGCGAGC GTCTCCATTG TGA CTGTGCGA AGGACCTGCT 61 TATGGTATCC GTATTTTCAGT TGGTTCAAAT AGGCAAGAAC AAC AAGTGGT TCTCGACACT 121 GGTTCAGTG ATTTCTGGGT CATTGATGCA AATTCATCTT GCACAAAAGA GGGCACTGAG 181 TGCAAAAAAT ATGGTACATT CGATCCAGAC ACCTCAACTT CATTCAATTA CTTGGCTTC 241 CTTTTTGCAA TTGTATTCGG TGATAAAACT TCTTCGATAG GTCTCTGGGC AGAGGATACA 301 GTTCAGATTG GTGATATTAC GCTTACTAAC CAAAGTTTTG CAGATGTTTC TTTAACTTCG 361 GCAATTC AAG GGGTCATGGG TCTTTCACGC CCCCAACCTG ACAGTCCCAA TGCTAGGTTT 421 GATAGTGTC CTGTAACATT GAAAAACAG GGTAAAATCA AGACCAATGC TTA CTCTTTG 481 TATTTGAACT CACCAGGTGC AGCTACTGGT ACGATTATTT TTGGTGGTGT TGATAATGCA 541 AAGTATTCTG GAAAGCTCAT TGAAGAGTCT GTGGTTC TCG ATCAACATTT TCAATCAAC 601 TTGCAATCTC TCAATTATGA TGGCAATAAA GAATCAGCAG GTGTTGGCGT TTTGCTAGAT 661 TCCGGAAGTA CAATCAGCTA CTTACCAGAT AGAATCGTTG CTGATCTTGC TGAAAAGGCT 721 GGTGCAAGGG CGGTACCAGC CGGATTGACC GGAGACTTTT ATTTTATCGA TTGTGATGCC 781 AAACCTGAGG GTAACGCTAC ATTCACTTTT GACAATGGTG CCGAAATTTT AGTTCCATTA 841 ACTGAATTTG TCACTCAAAG TACCAATGAA TTTTGCCCTT GGGGCTTGCA AAGTTCTGAC 901 AACTGGGCG GTATCATATC TCTGTGGGTG AA </pre>			
Nombre de la secuencia:Cp02	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 911 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TCCTTTACCG GATATCGAGA TTGAGTATCA TCTCCATTGT ACTTCGAAGG ACCTGCTTAT 61 GGTATCCGTA TTTCAAGTTG TTCAAATAGG CAAGAACAAC AAGTGGTCTT CGACACTGGT 121 TCCAGTGATT TCTGGGTCAT TGATGCAAAT TCATCTTGCA CAAAAGAGGG CACTGAGTGC 181 AAAAAATATG GTACATTGGA TCCAGACACC TCAACCTCAT TCAATTACCT TGGCTTCCTT 241 TTTGCAATTG TATTCGGTGA TAAAACTTCT TCGATAGGTC TCTGGGCAGA GGATACAGTT 301 CAGATTGGTG ATATTACGCT TACTAACCAA AGTTTTGCAG ATGTTTCTTT AACTTCGGCA 361 ATTCAAGGGG TCATGGGTCT TTCACGCCCC CAACCTGACA GTCCCAATGC TAGGTTTGAT 421 AGTGTCCCTG TAACATTGAA AAAACAGGGT AAAATCAAGA CCAATGCTTA CTCTTTGTAT 481 TTGAACCTCAC CAGGTGCAGC TACTGGTACG ATTATTTTTG GTGGTGTGA TAATGCAAAG 541 TATTCTGGAA AGCTCATTGA AGAGTCTGTG GTTCTGGATC AACATTTTTT AATCAACTTG 601 CAATCTCTCA ATTATGATGG CAATAAAGAA TCAGCAGGTG TTGGCGTTTT GCTAGATTCC 661 GGAAGTACAA TCAGCTACTT ACCAGATAGA ATCGTTGCTG ATCTTGCTGA AAAGGCTGGT 721 GCAAGGGCGG TACCAGCCGG ATTGACCGGA GACTTTTATT TTATCGATTG TGATGCCAAA 781 CCTGAGGGTA ACGCTACATT CACTTTTGAC AATGGTGCCG AAATTTTCAGT TCCATTA ACT 841 GAATTTGTCA CTC AAAGTAC CAATGAATTT TGCCCTTGGG GCTTGCAAAG TTCTGACACA 901 CTGGGCGAGA C </pre>			

Nombre de la secuencia:Cp03	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1083 pb	Clave de acceso NCBI: ----
1 TTTACAATC GACATTCGTA TGATTCAGTA GCATCTCCAT TGACTGTGCG AAGGACCTGC 61 TTATGGTATC CGTATTTTCAG TTGGTTCAAA TAGGCAAGAA CAACAAGTGG TTCTCGACAC 121 TGGTTCAGT GATTTCTGGG TCATTGATGC AAATTCATCT TGCACAAAAG AGGGCACTGA 181 GTGCAAAAAA TATGGTACAT TCGATCCAGA CACCTCAACC TCATTCAATT ACCTTGGCTT 241 CCTTTTTGCA ATTGTATTCG GTGATAAAAC TTCTTCGATA GGTCTCTGGG CAGAGGATAC 301 AGTTCAGATT GGTGATATTA CGCTTACTAA CCAAAGTTTT GCAGATGTTT CTTTAACTTC 361 GGCAATTCAA GGGGTCATGG GTCTTTCACG CCCCCAACCT GACAGTCCCA ATGCTAGGTT 421 TGATAGTGTC CCTGTAACAT TGA AAAAACA GGGTAAAATC AAGACCAATG CTTACTCTTT 481 GTATTTGAAC TCACCAGGTG CAGCTACTGG TACGATTATT TTTGGTGGTG TTGATAATGC 541 AAAGTATTCT GGAAGCTCA TTGAAGAGTC TGTGGTTCTG GATCAACATT TTTCAATCAA 601 CTTGCAATCT CTCAATTATG ATGGCAATAA AGAATCAGCA GGTGTTGGCG TTTTGTAGA 661 TTCGGGAAGT ACAATCAGCT ACTTACCAGA TAGAATCGTT GCTGATCTTG CTGAAAAGGC 721 TGGTGCAAGG GCGGTACCAG CCGGATTGAC CGGAGACTTT TATTTTATCG ATTGTGATGC 781 CAAACCTGAG GGTAACGCTA CATTCACTTT TGACAATGGT GCCGAAATTT CAGTTCCATT 841 AACTGAATTT GTCACTCAA GTACCAATGA ATTTTGCCCT TGGGGCTTGC AAAGTTCTGA 901 CACACTGGGC GTATCATACT CTGTGTGGTG GAATCACCCA CATCCCATTA AGGGTCACTG 961 ACACCTCGCG ACCTATGTGC AAAGTGATTG TGCCTTACCT CTACGGTTTG GGCACCACAT 1021 GCAAAAAAAT AAAAAGTGTC TCGACTAGAC GGGGCGGCCT GCCTTGTGCT ACTTAGCCAT 1081 ATG			
Nombre de la secuencia:Cp04	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 933 pb	Clave de acceso NCBI: ----
1 CTTACCTCTG TACTCGATTT TAGAGCTAGC GTCTCCATTG TGACGTGTCG AAGGACCTGC 61 TTATGGTATC CGTATTTTCAG TTGGTTCAAA TAGGCAAGAA CAACAAGTGG TTCTCGACAC 121 TGGTTCAGT GATTTCTGGG TCATTGATGC AAATTCATCT TGCACAAAAG AGGGCACTGA 181 GTGCAAAAAA TATGGTACAT TCGATCCAGA CACCTCAACC TCATTCAATT ACCTTGGCTT 241 CCTTTTTGCA ATTGTATTCG GTGATAAAAC TTCTTCGATA GGTCTCTGGG CAGAGGATAC 301 AGTTCAGATT GGTGATATTA CGCTTACTAA CCAAAGTTTT GCAGATGTTT CTTTAACTTC 361 GGCAATTCAA GGGGTCATGG GTCTTTCACG CCCCCAACCT GACAGTCCCA ATGCTAGGTT 421 TGATAGTGTC CCTGTAACAT TGA AAAAACA GGGTAAAATC AAGACCAATG CTTACTCTTT 481 GTATTTGAAC TCACCAGGTG CAGCTACTGG TACGATTATT TTTGGTGGTG TTGATAATGC 541 AAAGTATTCT GGAAGCTCA TTGAAGAGTC TGTGGTTCTG GATCAACATT TTTCAATCAA 601 CTTGCAATCT CTCAATTATG ATGGCAATAA AGAATCAGCA GGTGTTGGCG TTTTGTAGA 661 TTCGGGAAGT ACAATCAGCT ACTTACCAGA TAGAATCGTT GCTGATCTTG CTGAAAAGGC 721 TGGTGCAAGG GCGGTACCAG CCGGATTGAC CGGAGACTTT TATTTTATCG ATTGTGATGC 781 CAAACCTGAG GGTAACGCTA CATTCACTTT TGACAATGGT GCCGAAATTT CAGTTCCATT 841 AACTGAATTT GTCACTCAA GTACCAATGA ATTTTGCCCT TGGGGCTTGC AAAGTTCTGA 901 CACACTGGGC GGATGACACA TTGTGTGAGA GAA			
Nombre de la secuencia:Cp05	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1039 pb	Clave de acceso NCBI: ----
1 TACCAGCAAT CTAGATTGAG GAGCATCTCC ATTGTACTTC GAAGGACCTG CTTATGGTAT 61 CCGTATTTCA GTTGGTTCAA ATAGGCAAGA ACAACAAGTG GTTCTCGACA CTGGTTCCAG 121 TGATTTCTGG GTCATTGATG CAAATTCATC TTGCACAAA GAGGGCACTG AGTGCAAAAA 181 ATATGGTACA TTCGATCCAG ACACCTCAAC CTCATTCAAT TACCTTGGCT TCCTTTTTGC 241 AATTGTATTC GGTGATAAAA CTTCTTCGAT AGGTCTCTGG GCAGAGGATA CAGTTCAGAT 301 TGGTGATATT ACGCTTACTA ACCAAAGTTT TGCAGATGTT TCTTAACTT CGGCAATTCA 361 AGGGGTCATG GGTCTTTCAC GCCCCCAACC TGACAGTCCC AATGCTAGGT TTGATAGTGT 421 CCCTGTAACA TTGAAAAAAC AGGGTAAAAT CAAGACCAAT GCTTACTCTT TGTATTTGAA 481 CTCACCAGGT GCAGCTACTG GTACGATTAT TTTTGGTGGT GTTGATAATG CAAAGTATTC 541 TGGAAAAGCTC ATTGAAGAGT CTGTGGTTCT GGATCAACAT TTTTCAATCA ACTTGCAATC 601 TCTCAATTAT GATGGCAATA AAGAATCAGC AGGTGTTGGC GTTTTGTAG ATTCGGGAAG 661 TACAATCAGC TACTTACCAG ATAGAATCGT TGCTGATCTT GCTGAAAAGG CTGGTGCAAG 721 GCGGTACCA GCCGGATTGA CCGGAGACTT TTATTTTATC GATTGTGATG CCAAACCTGA 781 GGGTAAACGCT ACATTCACCT TTGACAATGG GTGCCGAAAT TTCAGTTCCA TTAACCTGAAT 841 TTGTCACTCA AAGTACCAAT GAATTTTGCC CTTGGGGCTT GCAAAGTTCT GACACACTGG 901 GCGTATCACT CTCTCTTGTG TATAGAGAAG CCCACACCTT TTCGATATCC TGGGAAAAC 961 CGCACCCACG GTGTACAGGA AATTGAATTA CCGCGTGGAA TTTCAATACA CCGTGTACCA 1021 AAAATTGGAT AAACCCCTT			

Nombre de la secuencia: Cp06	Organismo: <i>C. pararapsiosis</i>	Longitud: 1037 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 AGTTACCGTT GCATCTAGAT GAGGAGCATC TCCATTCGCT ACTTCGAAGG ACCTGCTTAT 61 GGTATCCGTA TTTCAAGTTGG TTCAAATAGG CAAGAACAAC AAGTGGTTCT CGACTGCTG 121 TCCAGTGATT TCTGGGTCAT TGATGCAAAT TCATCTTGCA CAAAAGAGGG CACTGAGTGC 181 AAAAAATATG GTACATTGGA TCCAGACACC TCAACCTCAT TCAATTACCT TGGCTTCCTT 241 TTTGCAATTG TATTCGGTGA TAAAACCTTCT TCGATAGGTC TCTGGGCAGA GGATACAGTT 301 CAGATTGGTG ATATTACGCT TACTAACCAA AGTTTTGCAG ATGTTTCTTT AACCTCGGCA 361 ATTCAAGGGG TCATGGGTCT TTCACGCCCC CAACCTGACA GTCCCAATGC TAGGTTTGAT 421 AGTGTCCCTG TAACATTGAA AAAACAGGGT AAAATCAAGA CCAATGCTTA CTCTTTGAT 481 TTGAACCTAC CAGGTGCAGC TACTGGTACG ATTATTTTTG GTGGTGTGTA TAATGCAAAG 541 TATTCTGGAA AGCTCATTGA AGAGTCTGTG GTTCTGGATC AACATTTTTT AATCAACTTG 601 CAATCTCTCA ATTATGATGG CAATAAAGAA TCAGCAGGTG TTGGCGTTTT GCTAGATTCC 661 GGAAGTACAA TCAGCTACTT ACCAGATAGA ATCGTTGCTG ATCTTGCTGA AAAGGCTGGT 721 GCAAGGGCGG TACCAGCCGG ATTGACCCGA GACTTTTTATT TTATCGATTG TGATGCCAAA 781 CCTGAGGGTA ACGCTACATT CACTTTTGAC AATGGTGCCG AAATTTCACT TCATTAACCT 841 GAATTTGTCA CTCAAAGTAC CAATGAATTT TGCCCTTGGG GCTTGCAAAG TTCTGACACA 901 CTGGGGCGGAC ACACTCTCTC TTTAGAAAAA AAGACCACAC CTTTTTCAAT TCTTTGAGTA 961 TACTAAAAAC AAAGTTAGCA GAGAATTGGG AGCCCCCTTG AATTGAAATA CTAAGAGACC 1021 CTATATTTGG ATTCCGC </pre>			
Nombre de la secuencia: Cp09	Organismo: <i>C. pararapsiosis</i>	Longitud: 926 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TAGCGAGCAT CTATGATGAG GAGCATCTCC ATTGTACTTC GAAGGACCTG CTTATGGTAT 61 CCGATTTTCA GTTGGTTCAA ATAGGCAAGA ACAACAAGTG GTTCTCGACA CTGGTCCAG 121 TGATTTCTGG GTCATTGATG CAAATTCATC TTGCACAAAA GAGGGCACTG AGTGCAAAAA 181 ATATGGTACA TTCGATCCAG ACACCTCAAC CTCATTTCAAT TACCTTGGCT TCCTTTTTGC 241 AATTGTATTC GGTGATAAAA CTTCTTCGAT AGGTCTCTGG GCAGAGGATA CAGTTCAGAT 301 TGGTGATATT ACGCTTACTA ACCAAAAGTTT TGCAGATGTT TCTTTAACTT CGGCAATTCA 361 AGGGGTCATG GGTCTTTTAC GCCCCCAACC TGACAGTCCC AATGCTAGGT TTGATAGTGT 421 CCCTGTAACA TTGAAAAAAC AGGGTAAAAAT CAAGACCAAT GCTTACTCTT TGTATTTGAA 481 CTCACCAGGT GCAGCTACTG GTACGATTAT TTTTGGTGGT GTTGATAATG CAAAGTATTC 541 TGGAAAGCTC ATTGAAGAGT CTGTGGTTCT GGATCAACAT TTTTCAATCA ACTTGCAATC 601 TCTCAATTAT GATGGCAATA AAGAATCAGC AGGTGTTGGC GTTTTGTAG ATTCCGGGAA 661 TACAATCAGC TACTTACCAG ATAGAATCGT TGCTGATCTT GCTGAAAAGG CTGGTGCAAG 721 GCGGGTACCA GCCGGATTGA CCGGAGACTT TTATTTTATC GATTGTGATG CCAAACCTGA 781 GGGTAACGCT ACATTCACCT TTGACAATGG TGCCGAAATT TCAGTTCCAT TAACTGAATT 841 TGCTACTCAA AGTACCAATG AATTTTGCCC TTGGGGCTTG CAAAGTCTG ACACACTGGG 901 CGGTATCATA TTCTCTGTGT GTGAGA </pre>			
Nombre de la secuencia: Cp10	Organismo: <i>C. pararapsiosis</i>	Longitud: 908 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TAAGGGGGCC AGTGACGTGC AGTACTCCTA TGTACTCCGA AGGACCTGCT CATGGTATCC 61 GTATTCAGT TGGTTCAAAT AGGCAAGAAC AACAAGTGGT TCTCGACACT GGTTCAGTG 121 ATTTCTGGGT CATTGATGCA AATTCATCTT GCACAAAAGA GGGCACTGAG TGCAAAAAAT 181 ATGGTACATT CGATCCAGAC ACCTCAACCT CATTCAATTA CCTTGGCTTC CTTTTTGCAA 241 TTGTATTCGG TGATAAAACT TCTTCGATAG GTCTCTGGG AGAGGATACA GTTCAGATTG 301 GTGATATTAC GCTTACTAAC CAAAGTTTTG CAGATGTTTC TTTAACTTCG GCAATTCAAG 361 GGGTCATGGG TCTTTCACGC CCCCACCTG ACAGTCCAA TGCTAGGTTT GATAGTGTCC 421 CTGTAACATT GAAAAACAG GGTAAAATCA AGACCAATGC TTAATCTTTG TATTTGAACT 481 CACCAGGTGC AGCTACTGGT ACGATTATTT TTGGTGGTGT TGATAATGCA AAGTATTCTG 541 GAAAGTCTCAT TGAAGAGTCT GTGGTTCTGG ATCAACATTT TCAATCAAC TTGCAATCTC 601 TCAATTATGA TGGCAATAAA GAATCAGCAG GTGTTGGCGT TTTGCTAGAT TCCGGAAGTA 661 CAATCAGCTA CTTACCAGAT AGAATCGTTG CTGATCTTGC TGAAAAGGCT GGTGCAAGGG 721 GCGGTACCAG CCGGATTGAC CGGAGACTTT TATTTTATCG ATTGTGATGC CAAACCTGAG 781 GGTAACGCTA CATTCACTTT TGACAATGGT GCCGAAATTT CAGTTCCATT AACTGAATTT 841 GTCACTCAAA GTACCAATGA ATTTTGCCCT TGGGGCTTGC AAAGTCTGA CACTGCGG 901 GGACACCC </pre>			

Nombre de la secuencia:Cp12	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 931 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 ATAACCGGGA ATCGATGATG AGATAGCGTC TCCATTGTGA CTGTCGAAGG ACCTGCTTAT 61 GGTATCCGTA TTTCAGTTGG TCTCAAATAG GCAAGAACAA CAAGTGGTTC TCGACACTGG 121 TTCCAGTGAT TTCTGGGTCA TTGATGCAAA TTCATCTTGC AAAAAAGAGG GCACTGAGTG 181 CAAAAAATAT GGTACATTTC ATCCAGACAC CTCAACCTCA TTCAATTACC TTGGCTTCCT 241 TTTTGCAATT GTATTCCGGT ATAAAACTTC TTCGATAGGT CTCTGGGCAG AGGATACAGT 301 TCAGATTGGT GATATTACGC TTAATAACCA AAGTTTTGCA GATGTTTCTT TAACTTCGGC 361 AATTCAAGGG GTCATGGGTC TTTTACGCCC CCAACCTGAC AGTCCCAATG CTAGGTTTGA 421 TAGTGTCCCT GTAACATTGA AAAAAACAGG TAAAATCAAG ACCAATGCTT ACTCTTTGTA 481 TTTGAECTCA CCAGGTGCAG CTAAGGTGAC GATTATTTTT GGTGGTGTGG ATAATGCAAA 541 GTATTCTGGA AAGCTCATTG AAGAGTCTGT GGTCTGGGAT CAACATTTTT CAATCAACTT 601 GCAATCTCTC AATTATGATG GCAATAAAGA ATCAGCAGGT GTTGGCGTTT TGCTAGATTC 661 CGGAAGTACA ATCAGCTACT TACCAGATAG AATCGTTGCT GATCTTGCTG AAAAGGCTGG 721 TGCAAGGGCG GTACCAGCCG GATTGACCCG AGACTTTTAT TTTATCGATT GTGATGCCAA 781 ACCTGAGGGT AACGCTACAT TCACCTTTGA CAATGGTGCC GAAATTTTCA TTCCATTAAAC 841 TGAATTTGTC ACTCAAAGTA CCAATGAATT TTGCCCTTGG GGCTTGCAAA GTTCTGACAC 901 ACTGGGCGTA TGACACTCTG TGTGTGTGAG A </pre>			
Nombre de la secuencia:Cp14	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 931 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 CTTTAAACGG GAAAGAGATT CGATAGCATC TCCATTGTAC TTCGAAGGAC CTGCTTATGG 61 TATCCGTATT TCAGTTGGTT CAAATAGGCA AGAACAACAA GTGGTTCTCG AACTGGTTC 121 CAGTGATTTT TGGGTATTG ATGCAAATTC ATCTTGACA AAAGAGGGCA CTGAGTGCAA 181 AAAATATGGT ACATTCGATC CAGACACCTC AACCTCATT CAAATACCTG GCTTCCTTTT 241 TGCAATTGTA TTCGGTGATA AAACCTTCTC GATAGGTCTC TGGGCAGAGG ATACAGTTCA 301 GATTGGTGAT ATTACGCTTA CTAACCAAAG TTTTGCAGAT GTTTCTTTAA CTTCGGCAAT 361 TCAAGGGGTC ATGGGTCTTT CACGCCCCCA ACCTGACAGT CCCAATGCTA GGTTTGATAG 421 TGTCCCTGTA ACATTGAAAA AACAGGGTAA AATCAAGACC AATGCTTACT CTTTGTATTT 481 GAACTACCA GGTGCAGCTA CTGGTACGAT TATTTTTGGT GGTGTTGATA ATGCAAAGTA 541 TTCTGGAAA GTCATTGAAG AGTCTGTGGT TCTGGATCAA CATTTTTCAA TCAACTTGA 601 ATCTCTCAAT TATGATGGCA ATAAAGAATC AGCAGGTGTT GGCCTTTTGC TAGATTCCGG 661 AAGTACAATC AGCTACTTAC CAGATAGAAT CGTTGCTGAT CTGTGCTGAA AGGCTGGTGC 721 AAGGGCGGTA CCAGCCGGAT TGACCCGAGA CTTTTATTTT ATCGATTGTG ATGCCAAACC 781 TGAGGGTAAC GCTACATTCA CTTTTGACAA TGGTGCCGAA ATTTTCACTT CATTAACTGA 841 ATTTGTCACT CAAAGTACCA ATGAATTTTG CCCTTGGGGC TTGCAAAGTT CTGACACACT 901 GGGCAGACAC ACATCTGTGT GTGTGAAGAG A </pre>			
Nombre de la secuencia: Cp17	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1006 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 AACGCGCAGA GACAGTAGAT CAGTATTCAT CCTCCATTGT ACTTCGAAGG ACCTGCTTAT 61 GGTATCCGTA TTTCAGTTGG TTCAAATAGG CAAGAACAAC AAGTGGTTCT CGACACTGGT 121 TCCAGTGATT TCTGGGTCAT TGATGCAAAT TCATCTTGCA CAAAAGAGGG CACTGAGTGC 181 AAAAAATATG GTACATTTCG TCCAGACACC TCAACCTCAT TCAATTACCT TGGCTTCCTT 241 TTTGCAATTG TATTCCGGTG TAAAACTTCT TCGATAGGTC TCTGGGCAGA GGATACAGTT 301 CAGATTGGTG ATATTACGCT TACTAACCAA AGTTTTGCAG ATGTTTCTTT AACTTCGGCA 361 ATTCAGGGGG TCATGGGTCT TTCACGCCCC CAACCTGACA GTCCCAATGC TAGGTTTGTAT 421 AGTGTCCCTG TAACATTGAA AAAACAGGGT AAAATCAAGA CCAATGCTTA CTCTTTGTAT 481 TTGAACTCAC CAGGTGCAGC TACTGGTACG ATTATTTTTG GTGGTGTGTA TAATGCAAAG 541 TATTCTGGAA AGCTCATTGA AGAGTCTGTG GTTCTGGATC AACATTTTTT AATCAACTTG 601 CAATCTCTCA ATTATGATGG CAATAAAGAA TCAGCAGGTG TTGGCGTTTT GCTAGATTCC 661 GGAAGTACAA TCAGCTACTT ACCAGATAGA ATCGTTGCTG ATCTTGCTGA AAAGGCTGGT 721 GCAAGGGCGG TACCAGCCGG ATTGACCCGA GACTTTTTAT TTATCGATTG TGATGCCAAA 781 CCTGAGGGTA ACGCTACATT CACTTTTTGAC AATGGTGCCG AAATTTTCACT TCCATTAAC 841 GAAATTTGTC CTCAAAGTAC CAATGAATTT TGCCCTTGGG GCTTGCAAAG TTCTGACACA 901 CTGGGCGGCA CCCCTCTGTG TGTGTGTGAG AGAGAAACCC CCTCTTCTCT TTTGTGTATC 961 ACCCCCCCTC TGCACAATTT TGCAGACACT TTTCTCACCC ACAAGT </pre>			

Nombre de la secuencia:Cp18	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1089 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<p>1 ATGTAAACAG GCACAAACGG GAGCCTCACC CAATTTTCCG AAGGACCTGC TCATGGTATC 61 CGTATCCCAG TTGGTTCAAA TAGGCAAGAA CAACAAGTGG TTCTCGACAC TGGTTCCAGT 121 GATTTCTGGG TCATTGATGC AAATTCATCT TGCACAAAAG AGGGCACTGA GTGCAAAAAA 181 TATGGTACAT TCGATCCAGA CACCTCAACC TCATTCAATT ACCTTGGCTT CCTTTTGGCA 241 ATTGTATTTC GTGATAAAAC TTCTTCGATA GGTCTCTGGG CAGAGGATAC AGTTCAGATT 301 GGTGATATTA CGCTFACTAA CCAAAGTTTT GCAGATGTTT CTTTAACTTC GGCAATTCAA 361 GGGGTCATGG GTCTTTACAG CCCCCAACCT GACAGTCCCA ATGCTAGGTT TGATAGTGTG 421 CCTGTAACAT TGA AAAACA GGGTAAAATC AAGACCAATG CTTACTCTTT GTATTTGAAC 481 TCACCAGGTG CAGCTACTGG TACGATTATT TTTGGTGGTG TTGATAATGC AAAGTATTCT 541 GGAAGCTCA TTGAAGAGTC TGTGGTCTG GATCAACATT TTTCAATCAA CTGCAATCT 601 CTC AATTATG ATGGCAATAA AGAATCAGCA GGTGTTGGCG TTTTGCTAGA TTCCGG AAGT 661 ACAATCAGCT ACTTACCAGA TAGAATCGTT GCTGATCTTG CTGAAAAGGC TGGTGCAAGG 721 GCGGTACCAG CCGGATTGAC CGGAGACTTT TATTTTATCG ATTGTGATGC CAAACCTGAG 781 GGTAAACGCTA CATTCACTTT TGACAATGGT GCCGAAATTT CAGTTCATT AACTGAATTT 841 GCACTCAA GTACCAATGA ATTTTGCCT TGGGGCTTGC AAAGTTCTGA CACTGGGC 901 GGATCACCTC TTGTGGGGA GACGTATCCC CCACACTCCC CAAATAAAAA GAAATTACCA 961 CACAAGAGAC AGGATCACTA AATCTGAGAA TGCCAATTC ACCTTACATT GCCTACGAAT 1021 TTGCTATATA TGTATTATTA TTCATTGCAT ATACCACCA CCCCAGACC ATATATGTTT 1081 TTTTCTAG</p>			
Nombre de la secuencia: Cp19	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1011 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<p>1 GTAAGGGCG CTAGAAGATT AGTATCATCT CCATTGTACT TCGAAGGACC TGCTTATGGT 61 ATCCGTATTT CAGTTGGTTC AAATAGGCAA GAACAACAAG TGGTCTCGA CACTGGTTCC 121 AGTGATTCTT GGGTCATTGA TGCAAATTC TCTTGCACAA AAGAGGGCAC TGAGTGCAA 181 AAATATGGTA CATTGATCC AGACACCTCA ACCTCATTCA ATTACCTTGG CTTCTTTTTT 241 GCAATTGTAT TCGGTGATAA AACTTCTTCG ATAGGTCTCT GGGCAGAGGA TACAGTTCAG 301 ATTTGGTGATA TTACGCTTAC TAACCAAAGT TTTGCAGATG TTTCTTAAAC TTCGGCAATT 361 CAAGGGGTCA TGGGTCTTTC ACGCCCCCAA CCTGACAGTC CCAATGCTAG GTTTGATAGT 421 GTCCCTGTAA CATTGAAAAA ACAGGGTAAA ATCAAGACCA ATGCTTACTC TTTGTATTG 481 AACTCACCAG GTGCAGCTAC TGGTACGATT ATTTTGGTG GTTTGATAA TGCAAAGTAT 541 TCTGGAAGC TCATTGAAGA GTCTGTGGTT CTGGATCAAC ATTTTCAAT CAACTTGCAA 601 TCTCTCAATT ATGATGGCAA TAAAGAATCA GCAGGTGTTG GCGTTTTGCT AGATTCCGGA 661 AGTACAATCA GCTACTTACC AGATAGAATC GTTGCTGATC TTGCTGAAAA GGCTGGTGCA 721 AGGGCGGTAC CAGCCGGATT GACCCGAGAC TTTTATTTA TCGATTGTGA TGCCAAACCT 781 GAGGGTAACG CTACATTCAC TTTTGACAAT GGTGCCGAAA TTTCACTTCC ATTAAGTAA 841 TTTGTCACT AAAGTACCAA TGAATTTTGC CCTTGGGGCT TGCAAAGTTC TGACACACTG 901 GGCGACATCT CATGTGCTGC TGTGAGAGAG AGGAACACAC TCTTCTATTA TATAGTAAAA 961 ATCACACGTC TGCGCAGTGT TTGTGAGGGC CTAAAGAAA AGGCACCCAG A</p>			
Nombre de la secuencia:Cp26	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1037 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<p>1 ATAATACCG AGCTGAAGAT CAGCTAGCTT CTTCCATTG TACTTCGAAG GACCTGCTTA 61 TGGTATCCGT ATTTCAAGTT GTTCAAATAG GCAAGAACAA CAAGTGGTTC TCGACTGG 121 TTCCAGTGAT TTCTGGGTCA TTGATGCAAA TTCATCTTGC AAAAAAGAGG GCACTGAGTG 181 CAAAAATAT GGTACATTTC ATCCAGACAC CTC AACCTCA TTCAATTACC TTGGCTTCT 241 TTTTGC AATT GTATTCCGGT ATAAAACCTT TTCGATAGGT CTCTGGGCAG AGGATACAGT 301 TCAGATTGGT GATATTACGC TTAACAACCA AAGTTTTGCA GATGTTTCTT TAAGTTCGGC 361 AATTCAAGGG GTCATGGGTC TTTACGCCCC CCAACCTGAC AGTCCCAATG CTAGGTTTGA 421 TAGTGTCCCT GTAACATTGA AAAAAACAGG TAAAATCAAG ACCAATGCTT ACTCTTTGTA 481 TTTGAACTCA CCAGGTGCAG CTA CTGCTGAT GATTATTTTT GGTGGTGTG ATAATGCAA 541 GTATTCTGGA AAGCTCATTG AAGAGTCTGT GGTCTGGAT CAACATTTTT CAATCAACTT 601 GCAATCTCTC AATTATGATG GCAATAAAGA ATCAGCAGGT GTTGGCGTTT TGCTAGATT 661 CGGAAGTACA ATCAGCTACT TACCAGATAG AATCGTTGCT GATCTTGCTG AAAAGGCTGG 721 TGCAAGGGCG GTACCAGCCG GATTGACCCG AGACTTTTAT TTTATCGATT GTGATGCCAA 781 ACCTGAGGGT AACGCTACAT TCACTTTTGA CAATGGTGCC GAAATTTTCA TTCCATTAAC 841 TGAATTTGTC ACTCAAAGTA CCAATGAATT TTGCCCTTGG GGCTTGCAA GTTCTGACAC 901 ACTGGGGTAC ATCTCTTTG TGTGTGAGAG AATAGACCAC CCCCCCCCA AAATTTGTAAT 961 TCCATTATCT CGTCTTCTA TGAATATGGC TCCTTGCAAA TAGATTTTAA AACGAGTGAG 1021 GAACTGACT CAGATAT</p>			

Nombre de la secuencia: Cp29	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 910 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TACGGAGGCC AGAAGACGCG CGAGATTCAC CGATTACTAC GAAGGACCTG CTCATGGTAT 61 CCGTATCCCA GTTGGTTCAA ATAGGCAAGA ACAACAAGTG GTTCTCGACA CTGTTCCAG 121 TGATTTCTGG GTCATTGATG CAAATTCATC TTGCACAAAA GAGGGCACTG AGTGCAAAAA 181 ATATGGTACA TTCGATCCAG ACACCTCAAC CTCATTCAAT TACCTTGGCT TCCTTTTTGC 241 AATTGTATTC GGTGATAAAA CTCTTTCGAT AGGTCTCTGG GCAGAGGATA CAGTTCAGAT 301 TGGTGATATT ACGCTTACTA ACCAAAGTTT TGCAGATGTT TCTTTAACTT CGGCAATTCA 361 AGGGGTCATG GGTCTTTCAC GCCCCCAACC TGACAGTCCC AATGCTAGGT TTGATAGTGT 421 CCCTGTAACA TTGAAAAAAC AGGGTAAAT CAAGACCAAT GCTTACTCTT TGTATTTGAA 481 CTCACCAGGT GCAGCTACTG GTACGATTAT TTTTGGTGGT GTTGATAATG CAAAGTATTC 541 TGAAAAGCTC ATTGAAGAGT CTGTGGTCTT GGATCAACAT TTTTCAATCA ACTTGCAATC 601 TCTCAATTAT GATGGCAATA AAGAATCAGC AGGTGTTGGC GTTTTGCTAG ATTCCGGAAG 661 TACAATCAGC TACTTACCAG ATAGAATCGT TGCTGATCTT GCTGAAAAGG CTGGTGCAAG 721 GGCGGTACCA GCCGGATTGA CCGGAGACTT TTATTTTATC GATTGTGATG CCAAACCTGA 781 GGGTAACGCT ACATTCACTT TTGACAATGG TGCCGAAATT TCAGTTCCAT TAACTGAATT 841 TGCTACTCAG AGTACCAATG AATTTTGCCC TTGGGGCTTG CAAAGTTCTG ACACACTGGG 901 CGTATATACC </pre>			
Nombre de la secuencia: Cp33	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1003 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TTGCGAGCAT GACATTCAAG TATCTCTCCA TTGTACTTCC AAGGACCTGC TTATGGTATC 61 CGTATTTTCCG TTGGTTCAAA TAGGCAAGAA CAACAAGTGG TTCTCGACAC TGGTTCAGT 121 GATTTCTGGG TCATTGATGC AAATTCATCT TGACAAAAAG AGGGCACTGA GTGCAAAAAA 181 TATGGTACAT TCGATCCAGA CACCTCAACC TCATTCAATT ACCTTGGCTT CCTTTTTGCA 241 ATTGTATTCG GTGATAAAAC TTCTTCGATA GGTCTCTGGG CAGAGGATAC AGTTCAGATT 301 GGTGATATTA CGCTTACTAA CCAAAGTTTT GCAGATGTTT CTTTAACTTC GGCAATTCAA 361 GGGGTCATGG GTCTTTCACG CCCCCAACCT GACAGTCCCA ATGCTAGGTT TGATAGTGTC 421 CCTGTAACAT TGAAAAAACA GGGTAAAAATC AAGACCAATG CTTACTCTTT GTATTTGAAC 481 TCACCAGGTG CAGCTACTGG TACGATTATT TTTGGTGGTG TTGATAATGC AAAGTATTCT 541 GGAAAGCTCA TTGAAGAGTC TGTGGTCTCG GATCAACATT TTTCAATCAA CTTGCAATCT 601 CTCAATTATG ATGGCAATAA AGAATCAGCA GGTGTTGGCG TTTTGCTAGA TTCCGGAAGT 661 ACAATCAGCT ACTTACCAGA TAGAATCGTT GCTGATCTTG CTGAAAAGGC TGGTGAAGG 721 GCGGTACCAG CCGGATTGAC CGGAGACTTT TATTTTATCG ATTTGTGATG CAAACCTGAG 781 GGTAACGCTA CATTCACTTT TGACAATGGT GCCGAAATTT CAGTTCCATT AACTGAATTT 841 GTCACCTAAA GTACCAATGA ATTTTGCCCT TGGGGCTTGC AAAGTTCTGA CACTGCGG 901 GTACATACAT CTCTTTTGAT AGAACTAGCC CCCCATTGCG GATTAAATG AAATCTCACC 961 TCCACCGTCC TTTAGACGGA GGGGGGTTCT TCCATTGCCC CTT </pre>			
Nombre de la secuencia: Cp34	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 930 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 ATAAGCAAAG CTAGAAGATT CAGTATCATC TCCATTGTAC TTCGAAGGAC CTGCTTATGG 61 TATCCGTATT TCAGTTGGTT CAAATAGGCA AGAACAACAA GTGGTTCTCG AACTGGTTC 121 CAGTGATTTT TGGGTCATTG ATGCAAATTC ATCTTGACA AAAGAGGGCA CTGAGTGCAA 181 AAAATATGGT ACATTCGATC CAGACACCTC AACCTCATT CATTACCTTG GCTTCCTTTT 241 TGCAATTGTA TTCGGTGATA AAACCTCTTC GATAGGTCTC TGGGCAGAGG ATACAGTTCA 301 GATTGGTGAT ATTACGCTTA CTAACCAAAG TTTTGCAGAT GTTTCTTTAA CTTCGGCAAT 361 TCAAGGGGTC ATGGGTCTTT CACGCCCCCA ACCTGACAGT CCCAATGCTA GGTTTGATAG 421 TGTCCTGTGA ACATTGAAAA AACAGGGTAA AATCAAGACC AATGCTTACT CTTTGATTTT 481 GAACTACCA GGTGCAGCTA CTGGTACGAT TATTTTGGT GGTGTTGATA ATGCAAAGTA 541 TTCTGAAAAG CTCATTGAAG AGTCTGTGGT TCTGGATCAA CATTTTTCAA TCAACTTGCA 601 ATCTCTCAAT TATGATGGCA ATAAAGAATC AGCAGGTGTT GCGTTTTTC TAGATTCCGG 661 AAGTACAATC AGCTACTTAC CAGATAGAAT CGTTGCTGAT CTTGCTGAAA AGGCTGGTGC 721 AAGGGCGGTA CCAGCCGGAT TGACCCGAGA CTTTTATTTT ATCGATTGTG ATGCCAAACC 781 TGAGGGTAA CACTACATTCA CTTTTGACAA TGGTGCCGAA ATTTCAAGTT CATTAACTGA 841 ATTTGTCACT CAAAGTACCA ATGAATTTTG CCCTTGGGGC TTGCAAAGTT CTGACACACT 901 GGCGTGAACC TCTGTGTGTG GGGGGGAGG </pre>			

Nombre de la secuencia: Cp35	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 1236 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TGTATGCTAG CATCGAGATT GAGTAGCATC TCCATTGTAC TGTCGAAGGA CCTGCTTATG 61 GTATCCGTAT TTCAGTTGGT TCAAATAGGC AAGAACAACA AGTGGTTCTC GACTCTGGTT 121 CCAGTGATTT CTGGGTCATT GATGCAAATT CATCTTGAC AAAAGAGGGC ACTGAGTGCA 181 AAAAATATGG TACATTCGAT CCAGACACCT CAACCTCATT CAATTACCTT GGCTTCCTTT 241 TTGCAATTGT ATTCGGTGAT AAAACTTCTT CGATAGGTCT CTGGGCAGAG GATACAGTTC 301 AGATTGGTGA TATTACGCTT ACTAACCAAAA GTTTTGCAGA TGTTTCTTTA ACTTCGGCAA 361 TTCAAGGGGT CATGGGTCTT TCACGCCCCC AACCTGACAG TCCCAATGCT AGGTTTGATA 421 GTGTCCTGT AACATTGAAA AAACAGGGTA AAATCAAGAC CAATGCTTAC TCTTTGATT 481 TGAATCACC AGGTGCAGCT ACTGGTACGA TTATTTTTGG TGGTGTGAT AATGCAAAGT 541 ATTCTGGAAA GCTCATTGAA GAGTCTGTGG TTCTGGATCA ACATTTTTCA ATCAACTTGC 601 AATCTCTCAA TTATGATGGC AATAAAGAAT CAGCAGGTGT TGGCGTTTTG CTAGATTCCG 661 GAAGTACAAT CAGTACTTA CCAGATAGAA TCGTTGCTGA TCTTGCTGAA AAGGCTGGTG 721 CAAGGGCGGT ACCAGCCGGA TTGACCGGAG ACTTTTATTT TATCGATTGT GATGCCAAAC 781 CTGAGGGTAA CGTACATTC ACTTTTGACA ATGGTGCCGA AATTTAGTT CCATTAAGT 841 AATTTGTAC TCAAAGTACC AATGAATTTT GCCCTTGGGG CTGCAAAGT TCTGACACAC 901 TGGGCAGTAT AATATCTCTG TGTGGGAGAC GGGGACAATT TTATTTGTAA TCGACTCA 961 CTTTAGCAAT TCTGTCAGAA GAGAATTGTA CTCTCGCTCG GGAATGACCA CCGCTGCAAC 1021 AAATGATTTT TTGTGTCTGC AACAGTGTAT TGCCCCGAC ATAAGATTCT GCATAATATA 1081 CTTAGATCCT TTCCTGAGAT GTTTGACCGC TAATTAACGG ATTGCTACCT TACAGGAATC 1141 TGGGCGAAA TCTTTTCACT CGGGAGTTTC TCCTCGATGC GTCTCTCAA TATTAGAAAG 1201 AGAGGTTGCA AAACAATCA CACGGA </pre>			
Nombre de la secuencia: CpATCC	Organismo: <i>C. pararapsilosis</i>	Longitud: 922 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 TAGTCAGAGC AGCGAGTAGG TGGAGTGCAT CTTGGCTGGC CGTGCCTGCC CCTACGCCAC 61 TCTAGTCGAG TTAGATCATA TAGGCCTAAC AGGTGTGGTT CTCGACTCTG GGTCCAGCGA 121 TTTCTGGGTC ATTGATGCAA ATTCATCTTG CACAAAAGAG GGCAGTGAAGT GCAAAAAATA 181 TGGTACATTC GATCCAGACA CCTCAACCTC ATTCAATTAC CTTGGCTTCC TTTTGTCAAT 241 TGTATTCGGT GATAAACTT CTTGATAGG TCTCTGGGCA GAGGATACAG TTCAGATTGG 301 TGATATTACG CTTACTAACC AAAGTTTTGC AGATGTTTCT TTAACCTCGG CAATTCAAGG 361 GGTGATGGT CTTTCACGCC CCCAACCTGA CAGTCCCAAT GCTAGGTTTG ATAGTGTCCC 421 TGTAACATTG AAAAAACAGG GTAAAATCAA GACCAATGCT TACTCTTGT ATTTGAACTC 481 ACCAGGTGCA GCTACTGGTA CGATTATTTT TGGTGGTGTG GATAATGCAA AGTATTCTGG 541 AAAGCTCATT GAAGAGTCTG TGGTTCTGGA TCAACATTTT TCAATCAACT TGCAATCTCT 601 CAATTATGAT GGCAATAAAG AATCAGCAGG TGTTGGCGTT TTGCTAGATT CCGGAAGTAC 661 AATCAGCTAC TTACCAGATA GAATCGTTGC TGATCTTGCT GAAAAGGCTG GTGCAAGGGC 721 GGTACCAGCC GGATTGACCG GAGACTTTTA TTTTATCGAT TGTGATGCCA AACCTGAGGG 781 TAACGCTACA TTCACTTTTG ACAATGGTGC CGAAATTTCA GTTCCATTAA CTGAATTTGT 841 CACTCAAAGT ACCAATGAAT TTTGCCCTTG GGGCTTGCAA AGTTCTGACA CACTGCGCGG 901 TACTCAAATC TTTGGGTGAG AT </pre>			

Nombre de la secuencia: Co32	Organismo: <i>C. orthopsilosis</i>	Longitud: 1256pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 ATTAAC⁷GCG AACATGGGGA CGAAGTGTGA TCGCATTGGC TTTACTTGCG CAAGAGCCAG 61 AAGAGGCTGT GTTGCAGCAT AGTGGCCTTT TTTGGACACA TCAACAAC⁷TT TGGATATCAC 121 CTTTGGAAAT AGCACCATTA GAGTTC⁷CGT GGCAGATTG GTTATTGAAT CTACCTCTGG 181 CTCAACATGC TATTTAGGAT TATTCGAA⁷CA ATCTTTAAAC ACCTCGTATA TTTTATTTGG 241 TGACAA⁷TGT TTGAGAAATG CTTATGTTGT CTATGATTG GAAGATAATG AAGTCCATAT 301 TGGTCAAGCC TATTATACTG GCGATGAAGA TATTGAAATT GTTGAACAAA ACGTTCCTAC 361 CGAAGGAGGA CAGAAACCTA CTTCGACTGG AGCTGAATCT TCGAATGAGA CTGGAAGTGG 421 AAACACCA⁷GT GAAAGCAGCA ATGAACCTGA ATCTGAATCA TCCTCCTCGT CTGAATCTTC 481 ATCTACT⁷GGC TCTAGTGGAA AGAAAAATAT TGCCTTGTC⁷A ATGTATTTCAG TGTCTGGGAG 541 TTACAT⁷TTT GGAGGTGTAT TGACTTCATT TGTTTTGGTT ATTTAATCTT GTTATTTGTG 601 TTGCAT⁷CTA TTGAAATCAA GTGATCTATT GTTAGAAACC TGATGTAAGC ATATTTGTAG 661 AAGCGACACA TATATACCTG AAACATGAT TTGACAAAAT TTTTAGCTAC TCTTTAAGT 721 GACAAA⁷TTA CTGTAACTA CTCTCGAAAA TGTGATGCCA TCGGGTTTGA AATAAGGTTT 781 ATACAA⁷TAT AGAAGCATCA TGCAAAACAG AAATTGCTGT GTTTCAA⁷AAT ACTTCTTACG 841 TATTAGAGAG CCATATCGGT CTCAAATCAA GGAATAATAA ATCGAATCTA AATTGTAATA 901 CAACGAAGTA ACTAAAATAA AGCAGACTTT GAAATCTCTG GCAACTAAAT CGGCTAAGAG 961 GTCTTAACT GCAGAAATAC TAGAGTCAGT AGTGTACTTA ACTTGAGCAA TTGAAATTGT 1021 GTAGCA⁷CCA AGTTGTAAG GAGATTGGCG GTGTCTCAA⁷A AAATTGTCAC CTTAAATAGC 1081 CTTGAA⁷GTT ACTTGAATAG CCCCAGAAGA CACGTGCAAT CACATTTGAT AGACATATTT 1141 CTGAGTGGTA CTGCAGTGTG GGCCAGT⁷TT CAAAGCTTAC TGTACTGGAC AGAGGGTCGT 1201 GGTGTGCACA AGGGAAAACC TCGCATTGCG TTACTTGGCG CGCAGAGACC GCAGGA </pre>			
Nombre de la secuencia:CoATCC	Organismo: <i>Corthopsilosis</i>	Longitud: 1218 pb	Clave de acceso NCBI: ----
<pre> 1 ACTTAATGGA CGAAATGTCC GGATCATATG TGCAGCAGTC ATCGGATGGT ACTTGACGCA 61 TATAGTTGCG GATGCTTGAC ATAGTATGAT TGTGATTATG AAAAGGACAC ATCAACAAC⁷T 121 TTGGATATCA CCTTTGGAAA TAGCACCATT AGAGTTCCCG TGGCAGATTT GGTATTGAA 181 TCTACCTCTG GCTCAACATG CTATTTAGGA TTATTCGAAC AATCTTTAAA CACCTCGTAT 241 ATTTTATTTG GTGACAATGT GTT⁷SAGAAAT GCTTATGTTG TCTATGATTT GGAAGATAAT 301 GAAGTCCATA TTGGTCAAGC CTATTATACT GGCGATGAAG ATATTGAAAT TGTGAAACAA 361 AACGTTCTTA CCGAAGGAGG ACAGAAACCT ACTTCGACTG GAGCTGAATC TTCGAATGAG 421 ACTGGAAGTG GAAACACCAG TGAAGCAGC AATGAACCTG AATCTGAATC ATCCTCCTCG 481 TCTGAATCTT CATCTACTGG CTCTAGTGGA AAGAAAAATA TTGCCTTGTC AATGTATTCA 541 GTGTCGTGGA GTTACATTTT TGGAGGTGTA TTGACTTCAT TTGTTTTGGT TATTTAATCT 601 TGTTATTTGT GTTGCATTCT ATTGAAATCA AGTGATCTAT TGTTAGAAAC CTGATGTAAG 661 CATATTTGTA GAAGCGACAC ATATATACCT GAAACTATGA TTTGACAAAA TTTT⁷TAGCTA 721 CTCTTTTAACT TGACAAATTT ACTGTAACT ACTCTCGAAA ATGTGATGCC ATCGGGTTTG 781 AAATAAGGTT TATACAATTA TAGAAGCATC ATGCAAAACA GAAATTGCTG TGTTTCAA⁷AA 841 TACTTCTTAC GTATTAGAGA GCCATATCGG TCTCAAATCA ATGGAATAAT AAATCGAATC 901 TAAATTGTAA TACAACGAAG TAACTAAAAA TAAAGCAGAC TTTTAAATC CCTGACAAC⁷T 961 AAATCGGCTA AGAGGTCTTA AACTGCAGAA ATACTAGAGT CAGTAGTGTA CTTAACTTGA 1021 GCAATTGAAA TTGTGTTAGC ATCAAGTCT AACGAGATAT GCGTGTCTCA AAAATGTCAC 1081 CTAAAATAGC TGAATGTAAC TGAATACCA GAGACACGTG CCATCACAAT TTGATAGACA 1141 TATTCTGAGT TGGTACTGTA AGTCTGCCGA GTTCCAAC⁷TA AACGTAGTTG AGCGAAGAGG 1201 TCTCTGGGTG TGCACAAA </pre>			