

Metagenómica en onicomycosis. El análisis de un caso que revela el posible papel de *Malassezia globosa* en la patogénesis

Metagenomics in Onychomycosis. Analysis of a Case with a Possible Role of *Malassezia globosa* in the Pathogenesis

Omar Fernando Cruz-Correa,¹ Lourdes Ramírez-Hobak,² Roberto Arenas³ y Xavier Soberón⁴

¹ Maestro en ciencias, Departamento de Farmacogenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.

² Residente de segundo año de dermatología, Departamento de Dermatología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Ciudad de México.

³ Jefe de la Sección de Micología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Ciudad de México.

⁴ Doctor en ciencias, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México.

En todos los ambientes del planeta Tierra, desde ecosistemas terrestres y acuáticos hasta nichos dentro y fuera del cuerpo humano (como la piel o el intestino), existen gran diversidad de bacterias, arqueas, hongos y virus que forman comunidades que interactúan entre sí y con elementos externos.

Se conoce como metagenoma al conjunto de toda la información genética de todos estos organismos que componen una comunidad determinada,¹ y como análisis metagenómico al estudio de la estructura y dinámica de estas comunidades.

El análisis metagenómico ha permitido asociar cambios en la abundancia y composición de las comunidades microbianas con procesos patológicos, como obesidad, diabetes y trastornos neurológicos, entre muchos otros. Lo anterior ha ayudado a entender las interacciones entre hospederos y patógenos, y de esta manera proponer nuevas estrategias terapéuticas.^{2,3}

En un principio se favorecían los enfoques dirigidos a genes marcadores específicos para realizar una clasificación taxonómica de los organismos que conforman una comunidad (el más conocido es la subunidad 16S del ARN ribosomal). Sin embargo, cada vez se utiliza más la secuenciación directa de todo el material genético, ya sea ADN (metagenoma completo) o ARN (metatranscriptoma), gracias a su capacidad para proveer información sobre la composición y capacidad funcional de una población de microorganismos, reduciendo los sesgos asociados a la amplificación por PCR de estos genes marcadores en una colección de organismos diferentes.^{4,5}

Se han descrito las poblaciones que interactúan en diversas partes del organismo, como el pulmón y el in-

testino. En dermatología se ha descrito microbioma de piel sana y de enfermedades, como acné, psoriasis y dermatitis atópica. No existen hasta ahora descripciones del microbioma de pelo y uñas.⁶

Por una parte, la piel contiene muchos microorganismos comensales; y por otra, estudios recientes indican que la microbiota protege contra la invasión de organismos patógenos pero que también posee la capacidad de producir enfermedad cuando su composición cambia.⁷

La importancia de conocer cómo interactúan las poblaciones de microorganismos en la piel y otros sitios, como pelo y uñas, radica en la comprensión de los procesos patogénicos que ocurren en el organismo y la aplicación de este conocimiento a otros aspectos, como el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cutáneas.

Realizamos una prueba piloto con secuenciación de nueva generación de ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído de la uña de un paciente con diagnóstico de onicomycosis por *Trichophyton rubrum* por cultivo y reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Se clasificó de manera taxonómica mediante el software Kraken⁸ con bases de datos que contienen los genomas de bacterias, arqueas, virus y hongos.

Se realizó una amplificación por PCR utilizando dos juegos diferentes de iniciadores, el primero para permitir la identificación de varios dermatofitos con la capacidad de ocasionar onicomycosis (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*) y el segundo para identificar exclusivamente *T. rubrum*.

Un total de 6 532 960 lecturas pasaron el control de calidad. De ellas, 96.5% (6 304 855) corresponden al genoma

CORRESPONDENCIA

Xavier Soberón ■ xsoberon@inmegen.gob.mx ■ Teléfono: 53501900, ext. 1901
Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809, Col. Arenal, CP 14610, Ciudad de México

humano (por alineamiento con el programa bowtie-2)⁹ y fueron retiradas de análisis posteriores.

Del total de 228105 lecturas de buena calidad que no correspondieron al genoma humano, 29.13% (66438) fueron clasificadas como pertenecientes a hongos, 14.97% (34154) pertenecientes a bacterias, arqueas y virus, mientras que el restante 55.9% (127513 lecturas) permaneció como no clasificado.

Las cinco especies más frecuentes en cuanto a abundancia de secuencias pertenecen todas al reino *fungi*. En primer lugar *Malassezia globosa*, seguida por *Trichophyton rubrum*, *Sordaria macrospora*, *Penicillium rubens* y *Aspergillus fischeri* (gráfica 1).

Entre las especies bacterianas más frecuentes se encuentra en primer lugar *Niastella koreensis* (bacteria aislada

en 2006 del suelo de un campo cultivado con gin-seng en Corea) y *Chitinophaga pinensis* (que cuenta con la capacidad de degradar quitina, un componente de la pared celular fúngica y del exoesqueleto de artrópodos).

Los *phyla* más frecuentes son *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Microsporidia* para el caso de hongos, mientras que para el caso de bacterias son *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* (gráfica 2).

Debido a que la onicomicosis produce una gran concentración de hongos en la uña, es de esperarse que los organismos más frecuentes sean hongos.

La clasificación a nivel de *phyla* permite comparar los resultados obtenidos con los reportados para otros análisis metagenómicos que utilizan la subunidad 16S del rARN para obtener la abundancia y frecuencia de bacterias y ar-

Gráfica 1. Clasificación a nivel de especie.

Abundancia relativa de secuencia correspondiente a cada una de las 40 especies más abundantes en la comunidad.

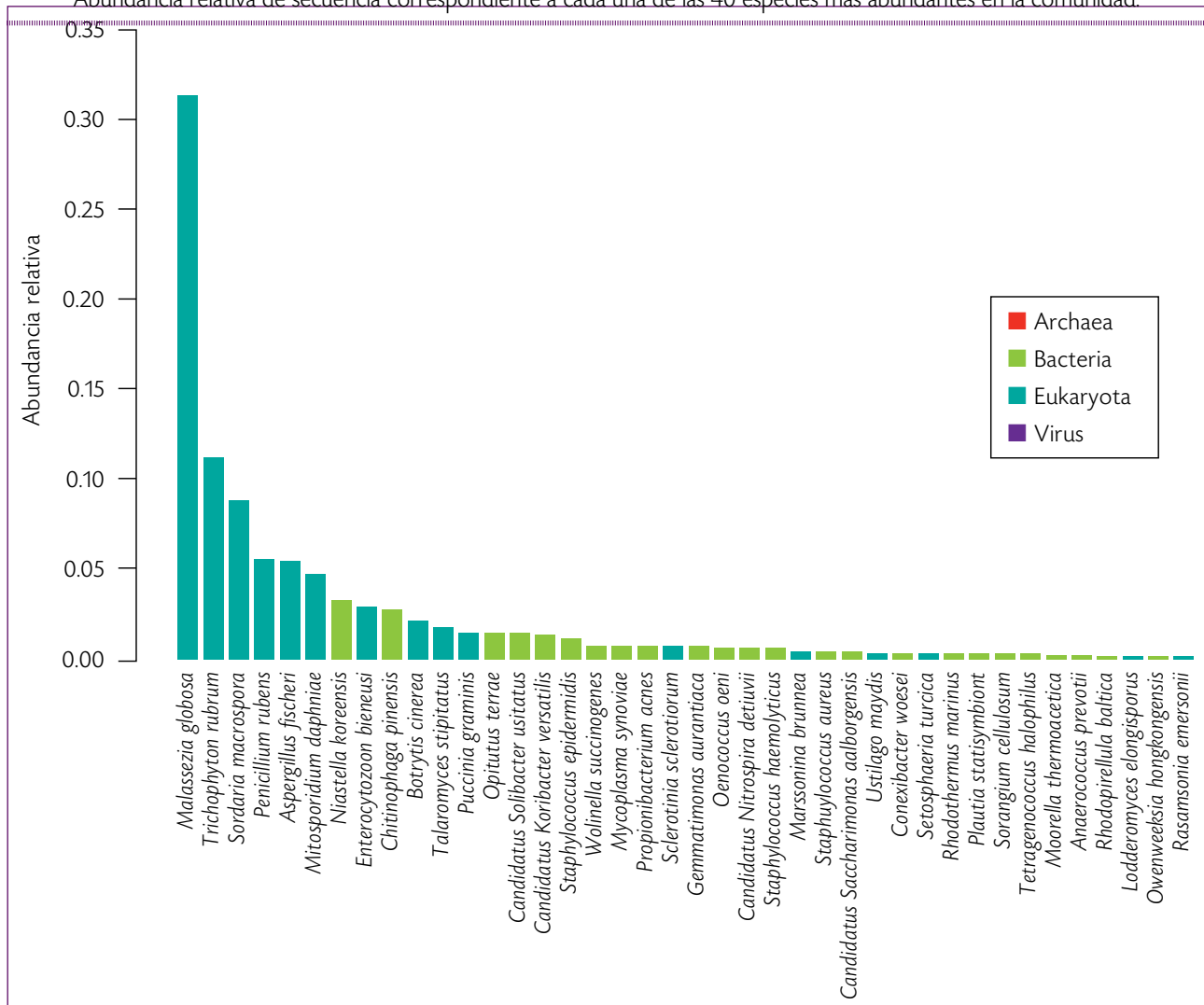
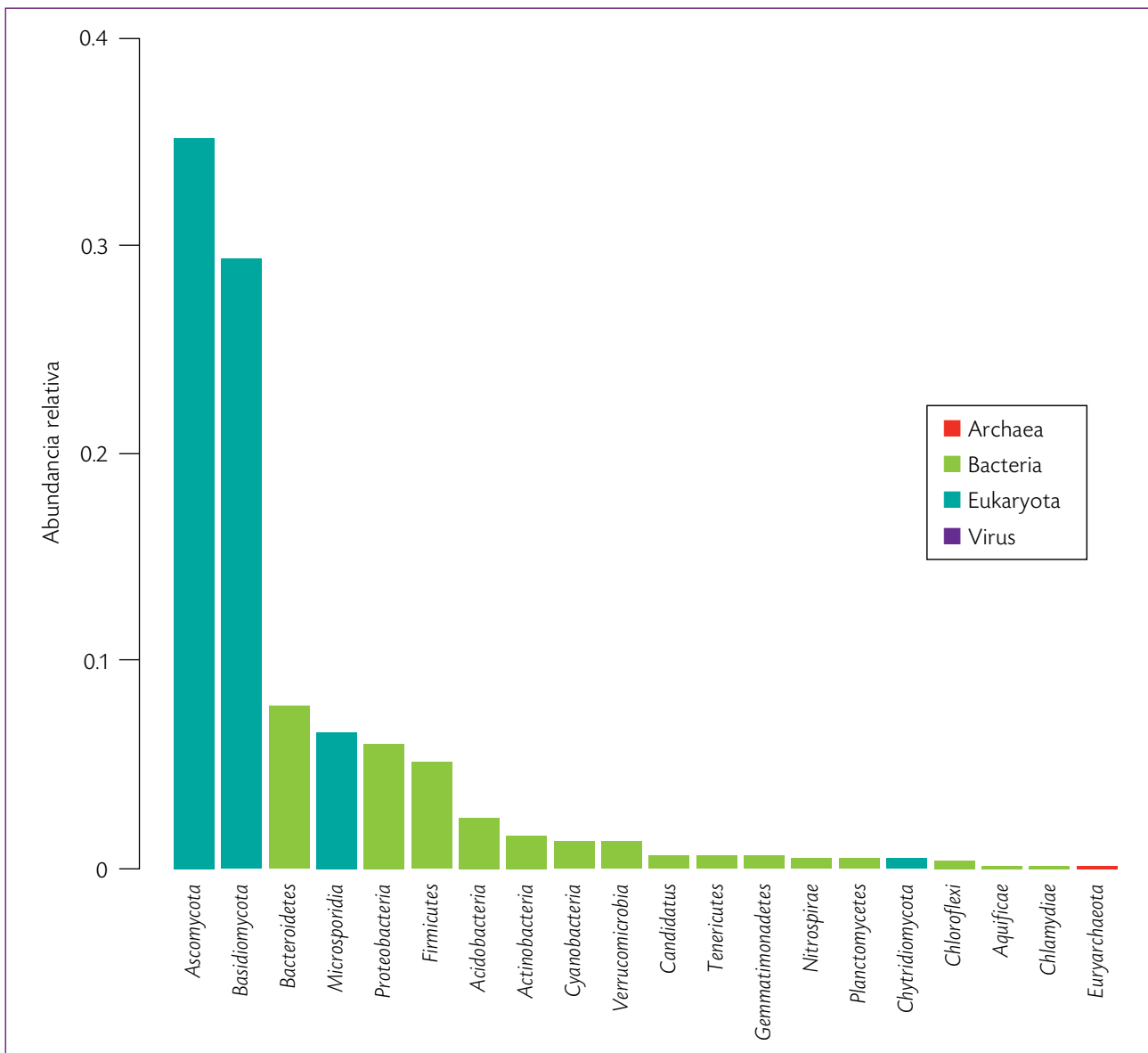


Figura 2. Clasificación a nivel de *phylum*.

Abundancia relativa de secuencia correspondiente a los *phyla* más abundantes en la comunidad.



queas. Así, cuatro de los cinco *phyla* de bacterias más frecuentes (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*) han sido reportados también como los más frecuentes en análisis metagenómicos (por 16S) de la piel humana.

Los resultados concuerdan con los obtenidos a través de la amplificación por PCR para identificar dermatofitos con la capacidad de ocasionar onicomicosis. Específicamente, durante la clasificación taxonómica un gran número de lecturas se asignaron como pertenecientes a *T. rubrum*, mientras que ninguna lectura fue asignada ni a *T. mentagrophytes* ni a *M. canis*.

Muchas especies de *Malassezia* se han reconocido como flora normal y patógena del ser humano; éste es un hongo levaduriforme dimórfico presente en la piel en zonas seboreicas, como piel cabelluda, cara y tórax principalmente. La mayoría de la evidencia del papel de *Malassezia* en la piel sana y enferma proviene de estudios con antifúngicos y cómo estos disminuyen los niveles de la levadura.¹⁰

La proporción de lecturas que se encontraron correspondientes a *Malassezia* son más abundantes que las de *T. rubrum*, el cual se considera el patógeno causante de oni-

comicosis en este paciente. La proporción tan alta sugiere que este organismo puede jugar un papel importante en la onicomosis. Es necesario realizar más estudios que comprueben la relación entre estos dos microorganismos.

El conocimiento de cómo interaccionan las poblaciones de microorganismos en la uña y otros microbiomas nos ayudará a comprender mejor los procesos salud-enfermedad en el ser humano.

Agradecimientos:

Al doctor en ciencias Rigoberto Hernández Castro y al doctor Ramón F. Fernández Martínez, por su colaboración en el estudio molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 1998; 5(10): R245-9.
2. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486(7402): 207-14.
3. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 2015; 31(1): 69-75.
4. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA *et al.* Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics* 2012; 13(1): 47-58.
5. Moore-Connors JM, Dunn KA, Bielawski JP, Van Limbergen J. Novel strategies for applied metagenomics. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22(3): 709-18.
6. Drago L, De Grandi R, Altomare G *et al.* Skin microbiota of first cousins affected by psoriasis and atopic dermatitis. *Clinical and Molecular Allergy* 2016; 14: 2-3.
7. Di Domizio J, Pagnoni A, Huber M *et al.* The skin microbiota: a colossus steps into the spotlight. *Revue Medicale Suisse* 2016; 12(512): 660-4.
8. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology* 2014; 15(3): 15:R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46
9. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012; 9(4): 357-U354.
10. Prohic A, Jovovic Sadikovic T, Krupalija-Fazlic M *et al.* Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. *Int J Dermatol* 2015; 55(5): 494-504.