

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Técnicas moleculares para el estudio de la expresión génica en hongos

Imagen tomada del artículo

ARTÍCULO DE REVISIÓN

LAS TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA, CON UN ENFOQUE EN MODELOS DE HONGOS. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y APLICACIONES ACTUALES

Francisco Padilla-Garfias*(1), Minerva Georgina Araiza-Villanueva (1), Antonio Peña Díaz (1)

(1) Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, CDMX, México.

*Autor de correspondencia correo E: fpadilla@ifc.unam.mx

RESUMEN

Las técnicas moleculares para el análisis de la expresión génica, a lo largo del tiempo, han sido objeto de una evolución significativa y son ahora fundamentales para comprender la regulación genética en diversos organismos, entre ellos los hongos. Desde las técnicas clásicas como *Northern blot* y el ensayo de protección contra RNAsa, hasta las herramientas más modernas como la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR) y la secuenciación de próxima generación (*Next Generation Sequencing*; NGS) de ácido ribonucleico (RNA), estas metodologías han revolucionado la investigación genética. Estos enfoques permiten estudiar de manera precisa la cantidad y variabilidad de la expresión génica, facilitando la identificación de genes clave y revelando patrones de expresión y regulación genética. Con aplicaciones cada vez más elaboradas, estas técnicas proporcionan una visión detallada de la dinámica genética, contribuyendo significativamente al avance del conocimiento en biología molecular y genética. En esta revisión realizamos un recorrido histórico de las principales técnicas utilizadas para estudiar la expresión génica, haciendo énfasis en estudios realizados en hongos, con el objetivo de proporcionar una perspectiva sobre la utilidad e importancia de estas metodologías.

PALABRAS CLAVE

técnicas moleculares, expresión génica, regulación genética, análisis de RNA, regulación de genes en hongos,

ABSTRACT

Molecular techniques for gene expression analysis have significantly evolved over time and are now fundamental to understanding gene regulation in diverse organisms, including fungi. From the classical techniques such as Northern Blot and RNase Protection Assay to more modern tools such as Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and Next Generation Sequencing (NGS) of ribonucleic acid (RNA), these methodologies have revolved genetic research. These techniques enable precise study of gene expression levels and variability, facilitating identification of key genes and revealing patterns of gene expression and regulation. With increasingly sophisticated applications, these approaches provide detailed insight into gene dynamics, significantly contributing to the advancement of knowledge in molecular biology and genetics. In this review we provide a historical overview of the main techniques used to study gene expression, with an emphasis on studies conducted in fungi, with the aim to provide a perspective on the utility and importance of these methodologies.

PALABRAS CLAVE

molecular techniques, gene expression, gene regulation, RNA analysis, gene regulation in fungi

Introducción

La expresión génica en todos los organismos, incluyendo los hongos, se refiere al proceso mediante el cual la información genética almacenada en el DNA (ácido desoxirribonucleico) se transcribe al RNA (ácido ribonucleico) el cual puede posteriormente traducirse en proteínas, o cumplir funciones celulares, por ejemplo, regulatorias. Este proceso de flujo de la información genética es fundamental para llevar a cabo diversas funciones celulares, como la adaptación ambiental, la patogénesis, o las interacciones simbióticas, entre otras (1).

El estudio de la expresión génica en hongos y levaduras es crucial, dado que proporciona información sobre los procesos biológicos subyacentes en estos organismos. Además, permite comprender las respuestas biológicas ante diversos estímulos, como la exposición a agentes antifúngicos o la patogénesis, así como las adaptaciones a los cambios en el ambiente y las reacciones ante modificaciones genéticas. Este conocimiento puede ser aplicado a áreas como la biotecnología y la investigación básica (2).

Los estudios con enfoque transcriptómico son esenciales para comprender la adaptabilidad de los organismos, incluyendo su impacto en la salud humana, medio ambiente e investigación. El uso de técnicas avanzadas como la transcriptómica y la genómica funcional ha contribuido significativamente a mejorar nuestra comprensión de la expresión génica en hongos y los impactos en su fisiología (3).

Las técnicas de estudio de la expresión génica en los hongos son fundamentales para comprender cómo

los genes se expresan o reprimen en respuesta a diferentes condiciones ambientales o señales internas (4).

Cada técnica utilizada para entender la transcriptómica y genómica tiene su lugar en la investigación, y la elección depende de la pregunta científica que se pretenda abordar, los recursos disponibles y la idoneidad para analizar la expresión génica en hongos, como se ilustra en la figura 1 (4). En la actualidad, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), base fundamental de la secuenciación del RNA (RNA-Seq), son cada vez más populares debido a su capacidad para proporcionar información detallada y global sobre la expresión génica (5), dejando en desuso metodologías como *Northern blot*, ensayo de protección de RNAsa (*RNase Protection Assay*, RPA), la visualización diferencial del RNA mensajero (mRNA) mediante reacción en cadena de la polimerasa (*differential display of mRNA by PCR*, DD-PCR), el análisis en serie de la expresión génica (*Serial Analysis of Gene Expression*, SAGE) y los microarreglos de DNA (3,5). Sin embargo, estas últimas técnicas siguen siendo útiles y todavía se aplican en casos específicos en los que pueden ser más convenientes.

Este trabajo presenta y compara de manera concisa los métodos genéticos utilizados en el perfilado de la expresión génica en diferentes organismos, como se resume en la Tabla 1 y clasificándolos según su fundamento como se muestra en la figura 2; pero a lo largo de la revisión se hace hincapié en su aplicación al estudio de los hongos.

Northern blot

El *Northern blot* es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular, que permite la detección directa y la cuantificación de RNA, principalmente mRNA, en muestras biológicas (6). Originalmente desarrollada por James Alwine y George Stark en 1977 (7), esta técnica de hibridación tomó su nombre por su semejanza con el *Southern blot*, una técnica previamente desarrollada por Edwin Southern para la detección de DNA (8). Desde entonces, el *Northern blot* se convirtió en un pilar fundamental para estudiar la expresión génica y la regulación a nivel de RNA.

El fundamento del *Northern blot* radica en la hibridación entre una sonda marcada y el RNA objetivo (Fig. 1, Fig. 2). El proceso se inicia con la extracción del RNA total de la muestra de interés, seguido de su separación por tamaño mediante electroforesis en gel (9). Los fragmentos de RNA son luego transferidos a una membrana sólida, como polivinil fluoruro (PVDF) o nitrocelulosa, donde se inmovilizan. Al inicio de la aplicación de esta técnica el RNA se transfería a membranas de diazobenceno-ximetilo (DBM) para garantizar su transferencia y adherencia covalente en la membrana (7).

Posteriormente se procede a la hibridación con una sonda de RNA marcada con métodos radioactivos o no radioactivos, que es complementaria a la secuencia del RNA de interés (Fig. 1). La detección de la hibridación revela la presencia y la cantidad de un RNA específico en la muestra (10).

El *Northern blot* se ha utilizado para investigar la expresión génica y la regulación de RNA en diferentes condiciones (6); no solo permite evaluar los niveles de un transcripto, sino también su integridad, así como la distinción entre variantes de *splicing* alternativo. Esta técnica permite tanto la determinación del tamaño como la abundancia relativa de mRNA específicos, lo que facilita la comparación directa de los niveles de mRNA entre muestras en una sola membrana (Tabla 1) (11,12). Su fortaleza radica en su simplicidad y alta especificidad, lo que permite el uso de sondas de hibridación con homología parcial. Una vez que se estandariza la técnica, el costo de ejecutar múltiples geles es bajo. Además, los *blots* pueden almacenarse durante períodos prolongados y rehibridarse si es necesario (11).

Sin embargo, el *Northern blot* tiene algunas limitaciones (Tabla 1); por ejemplo, al no poder cuantificarse la cantidad de transcripto, se le considera semicuantitativo (12). Además, existe el riesgo de degradación del mRNA durante la electroforesis, lo que compromete tanto la calidad como la cuantifica-

ción de la muestra. Su sensibilidad es relativamente baja, en comparación con técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR), y la detección con múltiples sondas puede resultar desafiante. Otra desventaja, que no es exclusiva de esta técnica, es la necesidad de cierta capacitación para llevar a cabo la metodología, ya que se requiere especial atención en el manejo del bromuro de etidio (EtBr), dietilpironcarbonato (DEPC) y luz ultravioleta (UV), además de que altas dosis de radioactividad y formaldehído representan riesgos tanto para los trabajadores como para el medio ambiente (11). No obstante, se han implementado algunas estrategias para superar estas limitaciones, como el uso de sondas de RNA antisentido altamente específicas, membranas de níquel cargadas positivamente para mejorar la sensibilidad y el enriquecimiento del mRNA mediante la selección con oligo dT (11,12).

A pesar de sus limitaciones, el *Northern blot* sigue siendo una herramienta valiosa para realizar comparaciones relativas de los niveles de RNA mensajero (mRNA) e investigaciones cualitativas sobre mRNA específicos. Por ejemplo, Reisinger y colaboradores (13) demostraron su eficacia en la caracterización de diferentes líneas celulares que producen un anticuerpo recombinante, lo que ilustra su idoneidad para evaluar las relaciones entre las cadenas pesadas y ligeras.

Los RNA pequeños (sRNA), como los microRNA (miRNA), los RNA de interferencia pequeños (siRNA) y los RNA que interactúan con PIWI (piRNA), son reguladores clave de los transcriptomas y proteomas de los organismos mediante su interacción con cadenas complementarias del mRNA. La abundancia y expresión de estos sRNA son relevantes para la función biológica de cualquier organismo. El *Northern blot* ha sido ampliamente utilizado para estudiar sRNA, siendo una técnica semi-cuantitativa, económica y fácilmente disponible. Aunque la NGS proporciona una visión general de la población de sRNA, el *Northern blot* complementa y valida los resultados, proporcionando información sobre la secuencia y longitud, lo que lo convierte en una metodología confiable para estudiar miRNA y otros sRNA en diversos organismos. Además, el *Northern blot* permite determinar con precisión la abundancia de miRNA y otros sRNA, así como identificar la isoforma de tamaño más abundante (14).

En un estudio sobre el virus del herpes simple 1 (VHS-1), se utilizó la técnica de *Northern blot* para investigar seis miRNA expresados durante la infección lítica en diversas líneas celulares. Esta técnica permitió detectar con gran especificidad tanto los

| Técnica | Importancia | Limitaciones |
|--|--|---|
| <i>Northern blot</i> | Permite la detección y cuantificación de RNA específico. Es útil para examinar la presencia, tamaño y abundancia relativa de mRNA en muestras de hongos. | Requiere una cantidad significativa de RNA. Baja sensibilidad para RNA de baja abundancia. |
| <i>RNase Protection Assay</i> | Similar al Northern blot, pero con una mayor sensibilidad. Permite la identificación de mRNA específicos y la cuantificación precisa. | Requiere cantidades considerables de RNA. Es más laborioso que algunas técnicas más recientes. La técnica puede ser costosa y complicada. |
| <i>Differential Display of mRNA by PCR</i> | Ayuda a identificar genes diferencialmente expresados. Puede revelar cambios en la expresión génica en diferentes condiciones. | Menos sensible y más propenso a errores que otras técnicas modernas. Dificultad para identificar genes específicos en mezclas complejas de RNA. |
| <i>cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism (cDNA-AFLP)</i> | Permite la identificación de cambios en la expresión génica sin necesidad de secuenciación. | Requiere optimización y validación experimental. Menos preciso que técnicas basadas en secuenciación. |
| <i>Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)</i> | Facilita la cuantificación global de los niveles de expresión génica. | Costosa y compleja en términos de análisis bioinformático. Menos utilizada con la popularización de técnicas de secuenciación masiva. |
| Microarreglos de DNA | Permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes. | Sensibilidad limitada para RNA de baja abundancia. Dependiente de la calidad de las sondas y de la anotación genómica. |
| <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)</i> | Proporciona cuantificación precisa y sensible de la expresión génica. | Alta sensibilidad a la variabilidad experimental. Analiza un número limitado de genes simultáneamente. |
| <i>RNA-Seq, Next Generation Sequencing, NGS</i> | Permite la secuenciación masiva y cuantificación de transcritos a nivel de todo el genoma. | Costosa y requiere capacidad computacional. La interpretación de los datos puede ser compleja. |

Tabla 1. Comparación de la importancia y limitaciones de las técnicas utilizadas para estudiar la expresión de genes.

premiRNA como los miRNA maduros. Al caracterizar la expresión de ambos tipos de miRNA en diferentes condiciones, el estudio reveló diferencias en la biogénesis de los miRNA entre la infección lítica y latente, y descubrió un mecanismo regulador que bloquea la exportación nuclear de los pre-

miRNA, dependiendo de la proteína viral ICP27 y de la síntesis del DNA viral (15).

En un modelo de bacterias, el *Northern blot* se ha utilizado con ligeras modificaciones para detectar RNA endógenos pequeños de ~14 nucleótidos (nt) en extractos de RNA total de bacterias. En parti-

cular, este tipo de RNAs tan pequeños suele no detectarse con éxito con un *Northern blot* convencional; sin embargo, este método modificado se aplicó con éxito a la detección de RNA diminutos de dos modelos diferentes, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (16).

El análisis mediante *Northern blot* se ha utilizado en hongos para investigar la expresión génica y la regulación a nivel de RNA en *Aspergillus fumigatus*, un hongo filamento patógeno oportunista que puede causar infecciones pulmonares graves en humanos inmunocomprometidos. En un estudio realizado por Amich y colaboradores (17), se empleó para analizar la expresión de un gen de resistencia a antifúngicos, llamado *cdr1B*. Los resultados revelaron una sobreexpresión significativa de *cdr1B* en cepas resistentes a azoles, lo que sugiere un papel importante de este gen en la resistencia de este hongo a antifúngicos.

Recientemente, se reportó una modificación a la técnica de *Northern blot*, la cual se probó en *Schizosaccharomyces pombe*. Esta técnica permitió cuantificar los niveles relativos de modificaciones de bases en múltiples RNA de transferencia (tRNA). A la técnica en cuestión se le nombró hibridación positiva en ausencia de modificaciones o PHAM y se utilizó para caracterizar cuatro deficiencias de enzimas de modificación del tRNA (TMEs). Estas enzimas son importantes, ya que muchas modificaciones del tRNA están vinculadas a la expresión génica alterada, y las deficiencias debidas a mutaciones en las TMEs son responsables de numerosas enfermedades (18).

El método de *Northern blot* PHAM requiere menos inversión que otros métodos utilizados actualmente, como la secuenciación. Además, el uso de dos sondas en este método proporciona una mayor sensibilidad y especificidad, ya que se tienen dos sondas de DNA que se unen al mismo tRNA, una se une a una región con modificaciones postranscripcionales, mientras que la otra sonda se une a una región no modificada, garantizando que la detección sea específica y reproducible. Un solo PHAM *blot* se puede utilizar para analizar múltiples tRNA específicos, y puede detectar y cuantificar algunas modificaciones que no pueden identificarse mediante los métodos de secuenciación (18).

En resumen, el *Northern blot* es una técnica clásica pero poderosa que ha sido fundamental para estudiar la expresión y la regulación génica a nivel de RNA. Aunque es superada en sensibilidad por métodos más modernos, sigue siendo una herramienta valiosa en el arsenal del biólogo molecular para la caracterización de RNA específicos en diversas condi-

ciones biológicas. En cuanto a su uso en modelo de hongos, el *Northern blot* ha sido una herramienta importante que ha permitido avances significativos para la comprensión de la biología molecular de especies patógenas y su interacción con los hospedadores.

Ensayo de protección de RNAsa (RNase Protection Assay, RPA)

El ensayo de protección de RNAsa (RPA) surgió en la década de 1980 como una herramienta para investigar la expresión génica y la estabilidad del RNA en diversos sistemas biológicos (19). Este método demostró ser adecuado para cuantificar los transcriptos de mRNA, además de definir los sitios de inicio de la transcripción y delimitar los extremos 3' del RNA y las uniones de empalme (20).

El RPA se basa en la capacidad de las proteínas ribonucleasas, conocidas también como RNAsas, para degradar RNA de manera específica. En el RPA, el RNA de interés se hibrida con una sonda previamente marcada, ya sea radioactivamente (radio-marcada) o marcada con marcadores no radioactivos, como moléculas fluorescentes o luminiscentes (sonda no isotópica). Esta sonda está diseñada para ser complementaria a la secuencia objetivo (20), y actúa como protectora del RNA frente a la degradación por las RNAsas (Fig. 1). Después de la hibridación, se eliminan los RNA no hibridados y se cuantifica la señal de la sonda, proporcionando información sobre la cantidad de RNA objetivo presente en la muestra (21–23).

El RPA es una técnica de hibridación (Fig. 2) que implica los siguientes pasos: 1) aislamiento del RNA, 2) generación y purificación de la sonda, 3) hibridación, 4) digestión con RNAsa, y 5) separación y detección de los fragmentos protegidos. Para la hibridación se utilizan sondas de RNA radio-marcadas que se preparan mediante transcripción *in vitro* de plásmidos o plantillas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que contienen promotores de bacteriófagos (20). Una vez obtenidas las sondas se puede proceder al primer paso, que es la hibridación entre ellas y la molécula en cuestión, y se lleva a cabo en solución. Posteriormente se trata la mezcla sonda/RNA con RNAsa específica contra RNA monocatenario para degradar todo el RNA monocatenario restante. En este paso, el híbrido sonda/mRNA queda protegido de la degradación por RNAsas, mientras que la sonda libre es digerida. A continuación, se utiliza un gel desnaturalizante para medir la cantidad de sonda protegida y visualizar mediante autorradiografía (sondas marcadas radiactivamente) o mediante un procedimiento de detección secundario (sondas marcadas no radiac-

tivamente). El resultado obtenido muestra la cantidad de RNA de interés que estaba presente en la muestra (Fig. 1). Un paso importante en esta metodología es utilizar un exceso molar de la sonda sobre la muestra a estudiar en la reacción de hibridación, ya que así la intensidad del fragmento protegido será directamente proporcional a la cantidad de RNA blanco en la mezcla de la muestra, lo cual permite obtener resultados cuantitativos. La cuantificación del nivel de mRNA mediante RPA requiere el uso de controles internos adecuados. Los controles internos más utilizados incluyen los genes de mantenimiento expresados constitutivamente, como el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la β -actina, la ciclofilina y los RNA ribosomales 18S y 28S (23).

Los ensayos de RPA han demostrado ser extremadamente sensibles para la detección y cuantificación de especies de mRNA en mezclas complejas de RNA celular total (23), ya que pueden utilizarse para discriminar entre blancos estrechamente relacionados, por ejemplo, miembros de familias multigénicas, diseñando sondas para que abarquen las regiones en las que los genes relacionados difieren más (24). Además, como el tamaño de las sondas utilizadas en los ensayos de protección contra nucleasas es una variable que se puede ajustar, las sondas pueden diseñarse para proteger fragmentos de diferentes tamaños. Esta característica permite el análisis simultáneo de varios mRNA diferentes en la misma muestra de RNA total (25). El ensayo RPA también se puede utilizar para estudiar variantes del *splicing* o del promotor, lo cual es sumamente útil en cronobiología para estudiar el perfil temporal de expresión de los genes circadianos y los efectos de la manipulación genética sobre estas oscilaciones (22, 26-29).

Como se ha mencionado previamente una gran ventaja del RPA es su alta sensibilidad y la detección y cuantificación simultáneas de múltiples blancos de mRNA (de hasta 10 o 12) en una única muestra de RNA (21). Este método es tan sensible que permite la detección, cuantificación y caracterización de mRNA específicos de hasta 4000 copias en una mezcla compleja de RNA celular total o mRNA (Tabla 1) (20,30).

La RPA es ampliamente aceptada; complementa la información obtenida por la RT-qPCR, con la ventaja de que no requiere un paso de transcripción inversa. Además, proporciona datos adicionales que no pueden obtenerse de la RT-qPCR, como el tamaño y la integridad de un transcripto específico. También puede sustituir al análisis de *Northern blot*, en el que las limitaciones de sensibilidad, especificidad,

y resolución suelen verse comprometidas por la incapacidad de cargar grandes cantidades de RNA en el gel, la transferencia ineficiente del gel a la membrana del *blot* y la hibridación cruzada o inespecífica entre las sondas y las moléculas de RNA blanco. Además, la hibridación en solución en el RPA favorece la detección de transcriptos poco frecuentes (31). Asimismo, los ensayos de RPA son adecuados para mapear posiciones de uniones externas e internas en el RNA, como los sitios de iniciación y terminación de la transcripción y los límites intrón/exón. Estas reacciones también pueden realizarse como ensayos múltiples para analizar simultáneamente varios transcriptos, siempre que los fragmentos protegidos presenten tamaños diferentes (31,32). Además, su alta sensibilidad y especificidad han sido utilizadas para la detección y cuantificación de miRNA (32).

Las principales limitaciones del RPA son la falta de información sobre el tamaño del transcripto y que cuenta con baja sensibilidad, en comparación con otras técnicas como RT-qPCR, ya que solo es capaz de detectar entre 4000-5000 copias del transcripto (Tabla 1) (21).

Otra desventaja del RPA es que el ensayo puede ser difícil de establecer para un nuevo gen porque las condiciones de hibridación y digestión deben determinarse empíricamente. Además, la sonda radiomarcada es susceptible a la formación de estructuras secundarias estables que pueden generar productos no deseados resistentes a la RNAsa. Asimismo, las sondas radiomarcadas de alta actividad específica sólo pueden utilizarse durante unos pocos días porque tienden a sufrir radiolisis rápidamente (33).

Desde su implementación el RPA ha sido utilizado en diversos modelos biológicos. En modelos murinos se ha utilizado para el análisis simultáneo de varias quimiocinas, con el objetivo de obtener una visión completa de su participación en los procesos inflamatorios e infecciosos (34).

En el 2004, Cloutier y colaboradores (35) implementaron un método de RPA para detectar múltiples transcriptos de la fase latente y lítica del herpes virus-8 (HHV-8). Con este método lograron detectar y cuantificar tres genes HHV-8 latentes (marco de lectura abierto (ORF 71-72-73) y tres líticos (ORF 74-K4-K2) en células 293T transfectadas con vectores de expresión del HHV-8. También analizaron los transcriptos de dos genes que codifican para la enzima GAPDH y ciclofilina, que utilizaron con fines de normalización. Los resultados obtenidos indicaron que el método es específico, sensible, y permite el monitoreo simultáneo de la expresión de genes latentes y líticos del HHV-8 (35).

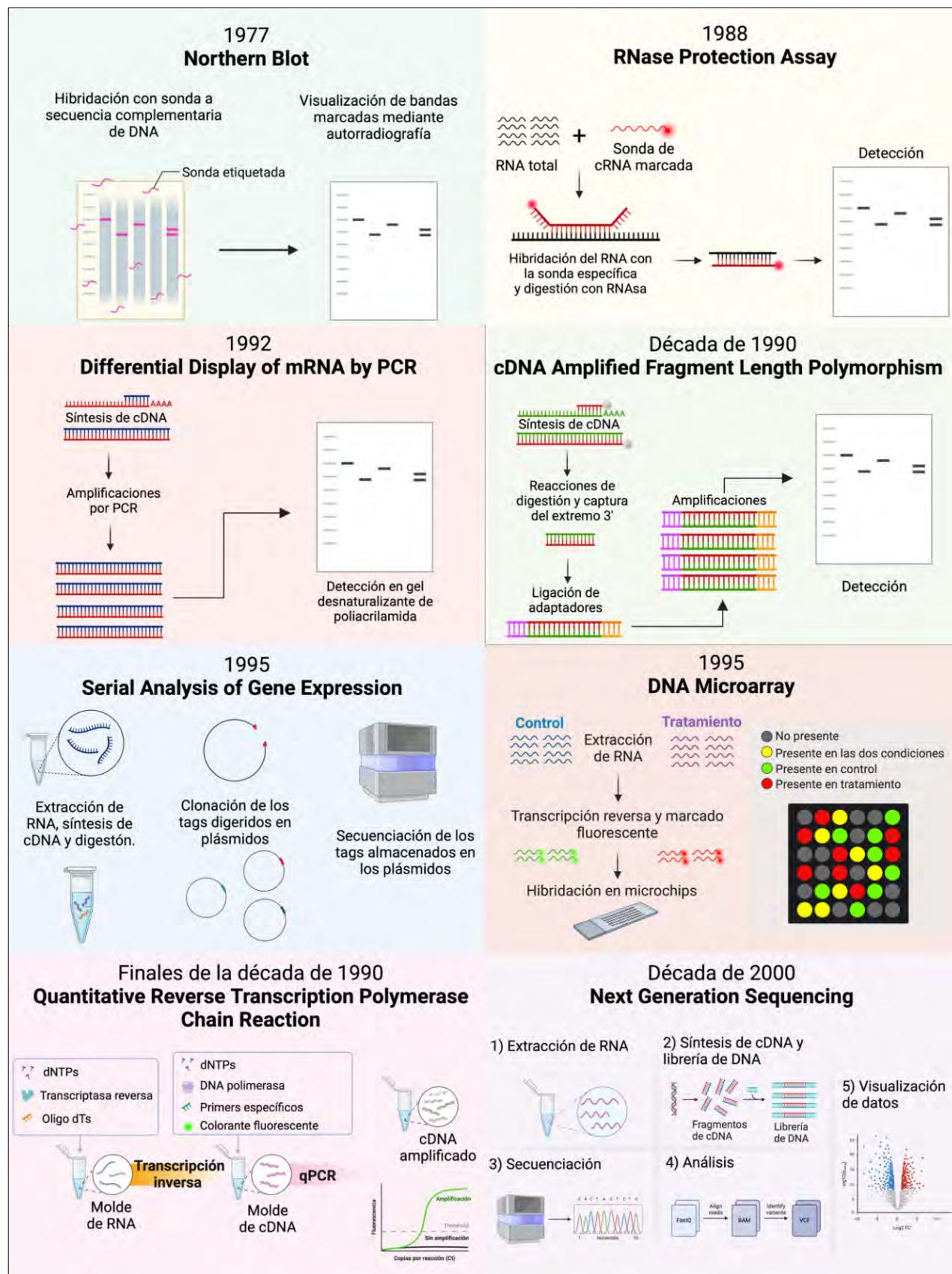


Figura 1. Principales técnicas de biología molecular utilizadas para analizar la expresión génica.

El RPA también se ha utilizado para estudiar el *splicing* alternativo y la poliadenilación del pre-mRNA generados por parvovirus durante la infección (36). Incluso, actualmente el RPA sigue siendo utilizado para estudios relacionados con SARS-CoV-2, en donde se observa que la inactivación fotodinámica (PDI) altera la integridad de las partículas de HcoV, permitiendo la digestión del RNA viral por ribonucleasas exógenas. Utilizando lenti-virus pseudotipados con la proteína Spike (S) del SARS-CoV-2, se reportó un efecto antiviral fuerte y dependiente de la luz de PhytoQuin, que impedía la entrada mediada por S en células humanas (37,38).

En bacterias, se logró identificar un intrón en *Bacillus cereus* ATCC 10987, *B.c.I4*, que se empalma 56 nt río abajo del sitio de empalme 3' esperado *in vivo*. En un estudio se confirmó mediante el ensayo RPA que el segmento de 56 pares de bases (pb) forma parte de la molécula de RNA intrón, descubriéndose así un nuevo sitio de *splicing* de *B.c.I4* (38).

En el contexto del estudio de los hongos, utilizando un protocolo de protección contra RNAsas se monitorearon los niveles de transcripción de *sib1+* y *sib2+* en células cultivadas en ausencia o presencia de hierro o del quelante de hierro Dip en la levadura *S. pombe*. Estos genes codifican, respectivamente, para una sideróforo sintetasa y una L-ornitina N5-oxigenasa que participan en la biosíntesis del ferri-cromo. En este estudio se observó que ambos genes se expresaban fácilmente en presencia de Dip, mientras que su expresión disminuía fuertemente en condiciones basales o de abundancia de hierro (39).

El RPA ha tenido un impacto significativo en la investigación biológica y médica, al proporcionar una herramienta precisa y sensible para estudiar la expresión génica y la biología del RNA.

Visualización diferencial del mRNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Differential Display of mRNA by PCR, DD-PCR*)

En la década de 1990, la biología molecular experimentaba un rápido avance con el descubrimiento de nuevas técnicas dedicadas a estudiar la expresión génica. La DD-PCR surgió como una alternativa innovadora para comparar los patrones de expresión génica entre diferentes muestras biológicas. Fue desarrollada por Liang y Pardee (40), con el objetivo de comparar los perfiles de expresión génica entre diferentes condiciones experimentales.

La DD-PCR se basa en la transcripción reversa del mRNA total a DNA complementario (cDNA), utilizando oligonucleótidos oligo-dT, seguida por la amplificación de fragmentos de cDNA mediante PCR,

utilizando oligonucleótidos específicos y condiciones de PCR diseñadas para resaltar las diferencias en la expresión génica (Fig. 2). Los productos de PCR se separan posteriormente en un gel de poliacrilamida y se visualizan para comparar los perfiles de expresión génica entre las muestras (Fig. 1) (41).

El método original de DD-PCR proponía como necesarios 12 oligonucleótidos oligo(dT): 11 Ts para anclar el oligonucleótido en el sitio de poliadenilación 3' y dos bases adicionales (por ejemplo 5'-T₁₁GC). De este modo, cada oligonucleótido oligo(dT) reconoce 1/12 de la población de mRNA, ya que existen 12 combinaciones de las dos últimas bases 3', excluyendo la T en el penúltimo punto. La amplificación del cDNA requería de oligonucleótidos con secuencias arbitrarias diseñadas para unirse a los cDNA a distancias aleatorias de las colas de poli(A). Estos oligonucleótidos debían ser cortos (de 6 a 7 pb) para permitir un alineamiento frecuente cerca del final de las cadenas de cDNA. Liang y Pardee (40) comprobaron que el uso de un oligonucleótido oligo(dT) para retrotranscribir el RNA, junto con el oligonucleótido arbitrario de 10 bases (para amplificar cDNA), daba resultados específicos y reproducibles.

Casi inmediatamente, Liang y colaboradores refinaron la DD-PCR con algunas optimizaciones clave (40). Estas incluían la reducción del número de oligonucleótidos anclados de 12 a 4; se determinó también que la cantidad inicial de RNA total podía ser tan pequeña como 200 µg y que el RNA poli(A) no era necesario (40). Desde su concepción en 1992, la DD-PCR suscitó un gran interés, ya que se trataba de un método atractivo que combinaba el análisis comparativo de varias muestras con la sensibilidad de la PCR. Sin embargo, en sus primeros años de uso se identificaron pocos genes nuevos de interés, lo que sugirió que el método requería de mayores modificaciones para mejorar considerablemente el muestreo de genes expresados diferencialmente y aislar genes relevantes.

Una de las ventajas de la DD-PCR es que permite identificar genes expresados diferencialmente en diversos sistemas *in vitro* e *in vivo*, sin depender del conocimiento previo de la secuencia ni de la disponibilidad de clonas de cDNA (42). Además, la DD-PCR se puede realizar con pequeñas cantidades de RNA total (<100 ng), por lo que es adecuada para perfiles de transcripción de muestras que se sabe producen cantidades limitadas de RNA, como muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Tabla 1). Esta técnica implica una cantidad relativamente pequeña de pasos por lo que se puede realizar en cualquier laboratorio capaz de aislar y manipular RNA y DNA y realizar PCR y

electroforesis en gel. Desde una perspectiva financiera, la DD-PCR es relativamente económica y varias empresas proveedoras de biotecnología como *Gene-Hunter* (Nashville, TN), QIAGEN (Valencia, CA), Ambion, Inc. (Austin, TX) tienen kits disponibles para ayudar a aplicar la técnica DD-PCR (43).

Además, a diferencia de los sistemas basados en chips, la DD-PCR ofrece la posibilidad de descubrir nuevas transcripciones, variantes o RNA extraños de patógenos (44). Sin embargo, la DD-PCR carece del componente cuantitativo de técnicas como *Northern blot*, la RPA o la RT-qPCR (Tabla 1) (42).

Se han realizado diversas mejoras al protocolo inicial, enfocadas principalmente en ajustes de los conjuntos de oligonucleótidos, la mejora de la reproducibilidad de la huella, eliminación de falsos positivos y confirmación de la expresión diferencial de los clones candidatos, así como en la adaptación para la huella dirigida y automatizada (40,45,46). A pesar de estos avances, la DD-PCR clásica presenta limitaciones, ya que genera etiquetas de secuencias expresadas (EST) cortas, que principalmente representan la región 3' no traducida (UTR) de los mRNA. Dado que la secuencia de los extremos 3' cortos no codificantes carece en su mayoría de información relevante para la clasificación de genes y la predicción de su función, la utilidad de la información proporcionada por la DD-PCR es limitada en muchos casos dentro del contexto de la descripción de genes (42).

La DD-PCR ha sido una herramienta valiosa en la investigación biológica, permitiendo la identificación de genes diferencialmente regulados en diferentes contextos experimentales. Con esta técnica se han identificado numerosos genes, incluidos candidatos a supresores tumorales, genes que regulan el desarrollo, la diferenciación y la función celular y muchos otros (45,46).

La DD-PCR se ha aplicado en diversos modelos biológicos eucarióticos, incluyendo mamíferos, plantas y hongos. En un modelo murino se aplicó para identificar la expresión genética, en músculos faciales de ratas normales y desnervadas (músculos cigomáticos, elevador nasolabial y canino) (47). En este mismo modelo también se estudiaron los mecanismos involucrados en el proceso de remodelación cardíaca después de un infarto al miocardio (48). También se identificaron genes que responden a la progesterona y estrógenos en el hipotálamo ventromedial de ratas hembra (49,50).

En el caso específico de los hongos, la DD-PCR se ha utilizado para estudiar cambios en los perfiles de expresión génica inducidos por choque térmico y la despresión del catabolismo de carbono en

Saccharomyces cerevisiae (51). En *Candida albicans*, los estudios mediante DD-PCR identificaron *TIF-2*, que puede desempeñar un papel en la regulación positiva de las fosfolipasas, y los genes relacionados con el estrés *CIP1* y *CIP2* (52). En *Histoplasma capsulatum* y *C. albicans*, identificaron los genes involucrados en la interacción huésped-patógeno (41). En *Cryphonectria parasitica* se utilizó DD-PCR para estudiar el efecto del hipovirus CHV1-713, el cual inhibe la virulencia de este hongo y se observó una alteración en la vía de señalización CPG-1 (53). También, más recientemente, esta técnica permitió identificar que el gen que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (*GPDI*) es inducido durante estrés osmótico y salino en aislados de *S. cerevisiae* (54).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados de cDNA (cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism, cDNA-AFLP)

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados de cDNA (cDNA-AFLP) es una técnica robusta y confiable que se basa en la técnica de polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados de DNA o AFLP, la cual toma huellas génicas con base en la amplificación, mediante PCR (Fig. 2), de fragmentos obtenidos por la digestión del cDNA, por endonucleasas de restricción (55).

La técnica de AFLP, utilizada para DNA genómico (gDNA) fue desarrollada por la compañía Dutch Keygene, pero Vos y colaboradores (55) la publicaron por primera vez con el propósito de generar huellas génicas. Posteriormente su uso se amplió para analizar la expresión génica; fueron Bachem y colaboradores (56) los primeros en describir su uso.

El método para RNA se basa en la retrotranscripción del RNA total de la muestra, utilizando oligos-dT. El cDNA resultante se extrae posteriormente con fenol y se precipita con etanol (según el método original) (56). Posteriormente, el cDNA se trata según los protocolos normales de AFLP en gDNA, en donde se hace una digestión completa del cDNA mediante enzimas de restricción como *AseI* y *TaqI*, seguida de la amplificación de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos que puedan surgir debido a mutaciones en la secuencia de DNA cercanas a los sitios de restricción. Estos polimorfismos pueden identificarse mediante electroforesis, donde los patrones de los fragmentos amplificados de DNA se visualizan como bandas que difieren en número y tamaño (Fig. 1), lo que constituye un patrón específico altamente reproducible debido a la naturaleza restringida de la técnica (55,56). Desde su desarrollo, se han publicado varias modificaciones del protocolo cDNA-AFLP original (57,58).

Las principales ventajas del cDNA-AFLP en comparación con técnicas como los microarreglos, es que permite el análisis de la expresión de todo el genoma en cualquier especie sin conocimiento previo de la secuencia y que se pueden analizar tanto genes conocidos como desconocidos (59). Otras ventajas significativas de cDNA-AFLP sobre los microarreglos de DNA son los costos iniciales relativamente bajos y su alta especificidad, lo que permite perfilar la expresión de genes homólogos como los miembros de familias de genes (Tabla 1) (58).

En comparación con técnicas como SAGE, el cDNA-AFLP es más versátil, y las etiquetas obtenidas son entre 10 y 30 veces más largas, lo que permite una mayor caracterización sin la necesidad de grandes bases de datos (59).

La técnica cDNA-AFLP también tiene una serie de limitaciones, ya que este procedimiento requiere mucho tiempo, y trabajo, y no es muy susceptible de automatización. Además, cuando las etiquetas tienen una longitud insuficiente para caracterizar funcionalmente el transcripto de interés, puede ser necesaria la identificación de la secuencia completa de los cDNA obtenidos (58). Además, los conjuntos de datos obtenidos por separado, a diferencia de los datos de SAGE y microarreglos, no se pueden comparar ni fusionar fácilmente (Tabla 1) (59).

En plantas, la técnica fue utilizada en *Nicotiana tabacum* para detectar genes poco expresados y distinguir entre secuencias homólogas, el cDNA-AFLP permitió identificar qué genes perciben un perfil de expresión regulado por el ciclo celular, como histonas, factores de replicación, ciclinas, y cinasas dependientes de ciclinas, entre otros (59).

Asimismo, en la bacteria patógena de plantas *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) subsp. *carotovora* (Ecc), se realizó cDNA-AFLP para determinar los genes expresados diferencialmente en Eca y Ecc durante infección en plantas. (60).

Algunos hongos en los que se ha aplicado la técnica de cDNA-AFLP incluyen *Puccinia striiformis*, un patógeno biotrófico del trigo. En este caso, se detectaron genes tanto del trigo como de *P. striiformis* asociados al proceso de infección (61). Otro ejemplo relevante es *Botrytis cinerea*, un hongo patógeno que afecta las manzanas, en el que se empleó el análisis de polimorfismo (cDNA-AFLP) para identificar genes expresados en *B. cinerea* por el control biológico con la cepa Kh5 de *Pichia anomala* (62). Asimismo, *Brachypodium distachyon* es un hongo en el cual se encontraron genes que responden al estrés salino (63). También *Hyaloperonospora parasitica*, hongo responsable del mildiú en la col china

se estudió mediante esta técnica para identificar genes regulados durante su infección (64).

Análisis en serie de la expresión génica (*Serial Analysis of Gene Expression, SAGE*)

En 1995 se desarrolló una metodología novedosa, denominada análisis en serie de la expresión génica (*Serial Analysis of Gene Expression, SAGE*). Esta técnica permite el análisis cuantitativo y simultáneo de un gran número de transcritos (65). Además, permite crear perfiles de expresión génica en diferentes estados y condiciones de la célula (65,66).

La identificación y cuantificación de transcritos mediante la técnica SAGE se basa en la secuenciación de *tags* (fragmentos de cDNA obtenidos a partir del mRNA de la muestra) concatenados entre sí (Fig. 2), teniendo en cuenta que cada *tag* representa un mRNA específico de la muestra (Fig. 1). Para esta técnica, el mRNA extraído de la muestra es atrapado en la cola de poli-A por secuencias de timina unidas a biotina; esas secuencias de timina sirven como oligonucleótidos para poder sintetizar el cDNA mediante una transcriptasa inversa; el cDNA se extrae mediante el uso de perlas que contienen estreptavidina (proteína sintetizada por *Streptomyces avidinii*, caracterizada por su alta afinidad por la biotina), para posteriormente ser fragmentado por una enzima de anclaje (enzima de restricción, AE). Los fragmentos del cDNA no unido a las perlas se eliminan por medio de lavados, mientras que el cDNA unido a las perlas se liga a dos adaptadores en reacciones independientes, una de ellas con extremos cohesivos, y otra con sitios de restricción para una enzima de etiquetado (*tagging enzyme, TE*) y una secuencia corta complementaria a la secuencia contraria; las dos reacciones se combinan y se repite la reacción de digestión con la TE para obtener fragmentos de ~10 pb que se ligarán para formar los di-tags. Los di-tags se amplifican por PCR y se ligan para formar concatámeros (molécula de DNA con copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en serie) más largos, que son clonados en un vector y posteriormente secuenciados (Fig. 1) (5).

El resultado de SAGE es una lista de tags o etiquetas de secuencias cortas y el número de veces que se observa cada tag en la secuenciación, lo cual refleja el nivel de expresión del gen al que corresponde cada tag. Utilizando bases de datos de secuencias se puede determinar con cierta seguridad de qué mRNA “original” se extrajo el tag. Pueden aplicarse métodos estadísticos a las listas de etiquetas y recuentos de diferentes muestras para determinar si existe expresión diferencial de genes (65–67).

Originalmente, la técnica SAGE se desarrolló para estudiar e identificar marcadores de cáncer de páncreas, basado en la premisa de que una secuencia de tags de 9-10 pb puede ser suficiente para identificar de forma única un gen (65). Posteriormente, la técnica se refinó y se generaron las metodologías LongSAGE, RL-SAGE y SuperSAGE, las cuales utilizaron tags de 26 pb que los hacían mucho más específicos. La implementación de la metodología SuperSAGE se desarrolló en hojas de arroz (*Oryza sativa*) infectadas con *Magnaporthe grisea*, para analizar las interacciones huésped-hospedero (68), actualmente se siguen implementando variaciones en el protocolo original para mejorar la utilidad de la técnica en determinadas condiciones.

La principal ventaja de la técnica SAGE es que permite realizar análisis simultáneos y cuantitativos de un gran número de transcritos, gracias a que se miden los niveles absolutos de mRNA, y no necesariamente se requiere información preexistente de los genes de interés (5,65,69). La verdadera utilidad de la técnica se potencia cuando se tiene un genoma previamente anotado, haciendo coincidir las secuencias de los tags con genes previamente anotados (Tabla 1) (69,70).

Entre las desventajas de esta técnica están que suele ser costosa, laboriosa, y propensa a errores de secuenciación (70). Además, requiere una gran cantidad de RNA total inicial, lo que la hace inaplicable para organismos en los cuales los protocolos de extracción de RNA total incluyen pasos adicionales por lo que disminuye la calidad y cantidad del RNA obtenido (5). Otra desventaja es que, debido a la corta longitud de las secuencias de los tags, más de un gen puede compartir estas secuencias. Sin embargo, esta deficiencia se puede resolver mediante la implementación de SuperSAGE o LongSAGE (Tabla 1) (5,65,69).

SAGE se convirtió en una herramienta ampliamente utilizada para realizar perfiles de expresión génica a gran escala, utilizando células de seres humanos, animales, levaduras y plantas (67).

Durante varios años, la metodología SAGE y sus variantes se utilizaron para estudiar los perfiles transcriptómicos de varios hongos. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* se estudió el cambio en la expresión génica inducido por el ácido oleico, y se encontró que se sobreexpresaban el 20 % de los genes, en su mayoría mRNA que codifican para enzimas de la β -oxidación peroxisomal necesarias para la degradación de los ácidos grasos (71). En el hongo fitopatógeno *M. grisea* se identificaron los genes que se sobreexpresan durante la infección en plantas (72); en *Ustilago maydis* se identificaron los que parti-

cian en la regulación de la actividad de la proteína cinasa A, la biogénesis del ribosoma y el metabolismo del fosfato (73); y en hongos patógenos de plantas como *Blumeria graminis* y patógenos de mamíferos como *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides posadasii* y *Trichophyton rubrum* se identificaron genes responsables de la virulencia y la proliferación en el hospedero, con el objetivo de encontrar fármacos que puedan frenar su desarrollo (74).

Microarreglos de DNA (DNA microarray)

Los microarreglos de DNA (biochips de DNA o chips de DNA) son una tecnología que se usa para analizar la expresión génica que, al igual que el *Northern blot* evolucionó a partir del *Southern*. En la década de 1970 se realizaron los primeros estudios donde se analizaba la expresión génica basándose en la hibridación (Fig. 2), donde regiones de DNA se hibridaron con una sonda radiomarcada de DNA o RNA. Después, a finales de la misma década, se produjeron matrices ordenadas (75,76) y desde entonces se realizaron múltiples modificaciones a la técnica hasta llegar al año 1995 cuando se publicó el primer estudio en el que se utilizó la palabra "microarray", que explicaba cómo se podía controlar la expresión de 45 genes de *Arabidopsis*. El arreglo se construyó mediante la impresión robotizada a alta velocidad del cDNA sobre vidrio (77).

La tecnología explotó el principio de la hibridación (Fig. 2) con secuencias complementarias, entre el cDNA transcrit inversamente a partir de una muestra biológica de RNA y una sonda prediseñada de cDNA fija en un portaobjetos (78). Un microarreglo, por lo tanto, consiste en una biblioteca prediseñada de sondas sintéticas de ácido nucleico inmovilizadas y dispuestas espacialmente sobre una matriz sólida (79).

La implementación y el acelerado uso de los microarreglos permitió dar paso a la era ÓMICA, con el objetivo de cuantificar y caracterizar la expresión total de los RNA, es decir, realizar análisis transcriptómicos (5). La preparación de un microarreglo para estudiar un perfil de expresión génica requiere dos componentes básicos e indispensables. Por un lado, el soporte en el que se fijan las sondas (que puede ser una membrana o un chip de vidrio) y la preparación de las muestras de RNA que se hibridan en el soporte (79).

Varias empresas, como Agilent y Affymetrix ofrecen soportes a medida con un número determinado de sondas. Los soportes también pueden construirse con un fin determinado y normalmente se utilizan robots para "imprimir" sondas prediseñadas que se

unirán al soporte (80), esas sondas no son otra cosa más que las secuencias específicas a las que se les ha asignado un espacio en el soporte.

La preparación de la muestra consiste en aislar y extraer el mRNA de las células de interés, las cuales pueden ser del mismo tipo, pero en diferentes condiciones experimentales, ya que una servirá como control y otra como experimental para realizar el análisis de expresión génica (81), el siguiente paso es etiquetar el mRNA, mediante una reacción de transcripción inversa. Para producir una hebra complementaria de cDNA que contenga nucleótidos marcados con una sonda fluorescente, la muestra control se puede etiquetar con un fluoróforo y la muestra experimental con otro diferente (por ejemplo, la cianina 3 y la cianina 5 o Alexa555 y Alexa647) (5,81); después, las muestras marcadas diferencialmente se hibridan con la matriz; es decir, se coloca el cDNA etiquetado en el chip de DNA donde se hibridan con sus sondas complementarias (en el caso de los chips de dos colores, las dos poblaciones de cDNA etiquetadas se mezclan para hibridaciones simultáneas con sus objetivos en el chip). Posteriormente, se realizan múltiples lavados para eliminar las secuencias no hibridadas; el chip hibridado se excita con un láser para obtener la intensidad de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de muestra presente en cada punto. Con las intensidades de fluorescencia se crea una imagen digital que permite realizar la cuantificación, si se desea calcular la expresión relativa entre dos muestras, etiquetadas con fluoróforo diferente; la imagen resultante se analiza calculando la proporción de los dos colorantes (Fig. 1) (81).

La tecnología de los microarreglos impulsó la genómica funcional; es decir la identificación de los genes implicados en ciertos procesos celulares, suponiendo que sus niveles de expresión son proporcionales a los niveles de proteínas, lo que permite entender el funcionamiento celular (5). Entre las principales ventajas de esta técnica, destaca que un solo experimento puede proporcionar rápidamente información sobre la expresión de miles de genes de todo el genoma en el organismo de interés, para comparar los patrones de expresión entre dos estados cualesquiera, indicando qué genes están regulados positiva o negativamente entre las muestras control y experimentales (80). Los microarreglos son reproducibles y suficientemente sensibles, aunque a menudo conviene aplicar una metodología confirmatoria (5); por ejemplo, RT-qPCR (Tabla 1).

Aunque los microarreglos han sido una poderosa herramienta y han permitido entender algunas enfermedades, procesos biológicos, entre otros, tienen algunas limitaciones. Debido a que se monitorean genomas completos o genes preseleccionados, la

detección de mutaciones, *splicing* alternativo o secuencias desconocidas está limitada en este método (Tabla 1) (80). Para llevar a cabo un experimento con microarreglos se requieren reactivos costosos y equipos especializados para imprimir las sondas, etiquetar el objetivo, realizar la hibridación, cuantificar las señales de hibridación, etc. (5), y en la mayoría de las ocasiones todo lo involucrado está sujeto a los parámetros de un fabricante (82). También se sabe que, en el uso y análisis de los microarreglos, pocas veces se aplica la normalización y estandarización de la metodología (82,83), además de que el rigor estadístico que se utiliza no es robusto (84). Los microarreglos poco a poco han entrado en desuso debido a los avances de las metodologías basadas en NGS (5,82).

Los microarreglos han sido una metodología ampliamente aplicada en investigación médica y biología molecular de plantas y hongos, que a lo largo de los años han sido utilizados con múltiples enfoques. Por ejemplo, Breakspear y Momany (85) enlistaron los primeros cincuenta estudios de expresión génica mediante el uso de microarreglos en hongos filamentosos, clasificándolos como cambios en el metabolismo, en el desarrollo celular, patogénesis, simbiosis y aplicaciones industriales. Garaizar y colaboradores (86) recabaron la información relacionada con la patogénesis, la biología celular, la susceptibilidad a los antifúngicos y el diagnóstico de *C. albicans*, y años después se reportaron los cambios en la expresión génica de esta levadura durante la infección de riñones en mamíferos (87). En *S. cerevisiae* se utilizaron para estudiar la regulación de la biogénesis de la pared celular (88), para estudiar la respuesta a metales pesados como el cadmio (89) y compuestos químicos tóxicos (90). En levaduras no convencionales como *Debaryomyces hansenii* se utilizaron para analizar los efectos ocasionados en presencia de NaCl y cambios de pH con un enfoque hacia el metabolismo energético (91).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (*Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), es una técnica que surgió como una variante de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) (Fig. 2), que ha sido ampliamente utilizada para detectar RNA una vez que se construyó la molécula de cDNA de manera cuantitativa en diferentes ámbitos de la biología molecular. Es tan robusta que desde sus orígenes se ha utilizado para cuantificar la expresión génica (a partir del mRNA), cuantificación de patógenos (bacterias y virus), diagnóstico molecular, y la validación de datos obtenidos por

otras técnicas, como los microarreglos de DNA (92,93).

En 1992, Higuchi y colaboradores reportaron por primera vez el uso de la PCR cuantitativa (qPCR), utilizando DNA, oligonucleótidos, la Taq polimerasa, y como colorante el EtBr, el cual aumentaba su fluorescencia en presencia de DNA de doble cadena (dsDNA) (94). Desde entonces la metodología ha sufrido múltiples modificaciones hasta la versión que se utiliza hoy en día. Tal ha sido su importancia, que

en los últimos años se volvió popular gracias a su aplicación para el diagnóstico de COVID-19 (95).

La RT-qPCR aplicada al análisis de expresión génica es la combinación de tres pasos: 1) la reacción de transcripción inversa para convertir el mRNA en cDNA dependiente de la transcriptasa inversa, también conocida como retrotranscriptasa (RT), 2) la amplificación del cDNA mediante PCR y 3) la detección y cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real (96); el paso 2 y 3 se hacen de manera simultánea (Fig. 1).

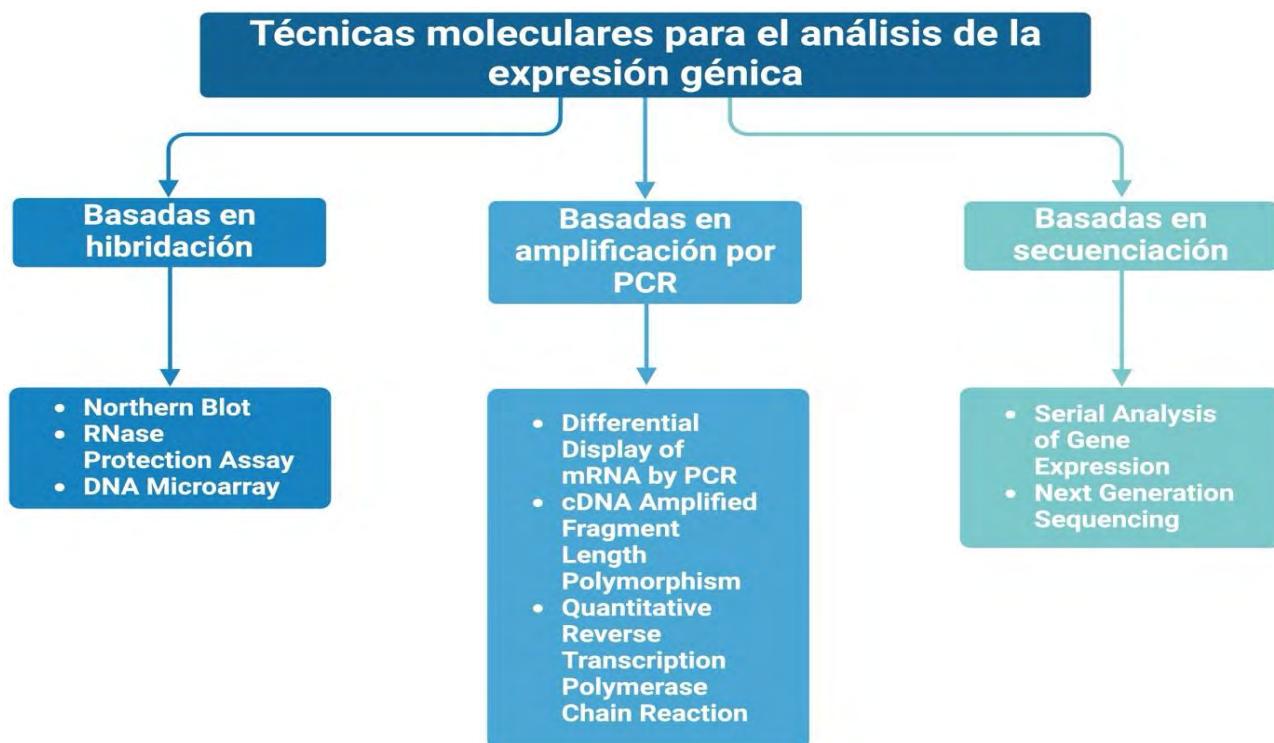


Figura 2. Clasificación de las técnicas de biología molecular usadas en el análisis de la expresión de genes de acuerdo con su fundamento metodológico.

Para el paso 1 se debe realizar el diseño experimental de extracción del mRNA (mediante el método que mejor se adapte a nuestras necesidades) que representará una instantánea de los transcritos que nos interesan. Después de la extracción del mRNA, se debe realizar una digestión con una DNasa I, la cual elimina la contaminación por DNA producto de la extracción. Una vez inactivada la DNasa I, se utilizan oligos-dT que se unirán a la cola poli-A de las moléculas de mRNA, con el fin de cebar las reacciones catalizadas por una RT, y así sintetizar el cDNA (97).

Los pasos 2 y 3, que comprenden la PCR en tiempo real, se basan exactamente en el mismo principio que la PCR tradicional (PCR de punto final). También consta de tres pasos: a) desnaturación de la plantilla del cDNA (que se lleva a cabo a unos

94-95 °C durante unos segundos para separar las hebras dobles de cDNA); b) hibridación de los oligonucleótidos (previamente diseñados, para amplificar fragmentos de aproximadamente unos 200 pb, la cual se lleva a cabo a alrededor de 50-60 °C; y c) extensión de oligonucleótidos (específicos para los genes de interés) para amplificar o sintetizar hebras de DNA complementarias en una temperatura de 68-72 °C, esto para permitir que la DNA polimerasa lleve a cabo la reacción. El tiempo y las temperaturas para cada paso varían dependiendo de diferentes factores, como el tamaño de la plantilla, el porcentaje de citosina-guanina (C-G) y la DNA polimerasa que se esté utilizando (98). Estos pasos suelen repetirse durante 20 a 50 ciclos (5).

Durante la qPCR, un gráfico de la concentración de DNA a lo largo del tiempo muestra una fase de

retraso, seguida de una fase exponencial y luego una fase de saturación. Durante la fase exponencial, las moléculas de DNA sintetizadas son proporcionales a los niveles de DNA iniciales. Una característica clave de la qPCR es que el DNA amplificado se mide momentáneamente conforme la reacción progresá, mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan a la dsDNA producto de la PCR (5). Este es un nuevo enfoque en comparación con la PCR estándar, donde el producto amplificado se detecta sólo al final (94). Cabe mencionar que, para poder detectar y cuantificar la fluorescencia, es necesario un termociclador especial, entre los que destacan los diseñados por las empresas *Applied Biosystems*, *QIAGEN* o *Bio-Rad*.

La visualización en tiempo real de los amplicones puede llevarse a cabo mediante dos métodos: 1) utilizando colorantes intercalantes de dsDNA, como el SYBR Green (99), el cual se une al dsDNA y fluoresce cuando está unido; o 2) sondas fluorescentes, como TaqMan, que contienen un reportero fluorescente en un extremo y un *quencher* en el extremo opuesto (99,100). Durante los ciclos de PCR, los incrementos graduales en la concentración de DNA producen un aumento en la intensidad de la fluorescencia, permitiendo así la cuantificación del DNA presente en la muestra.

La detección en tiempo real del ciclo qPCR genera una curva de amplificación con tres fases clave: iniciación, exponencial, y meseta, que sirven como base para la cuantificación. Durante la amplificación, la fluorescencia inicial baja establece el nivel de referencia, y el umbral, el cual se rebasa en la fase exponencial, que se utiliza para cuantificar mediante el ciclo de cuantificación (C_t o C_q) (92).

El uso de un gen de referencia constante, como los que codifican para la GAPDH o β-actina, es crucial para la cuantificación, aunque los niveles pueden variar en ciertas condiciones, requiriendo compatibilidad con el experimento (101).

En cuanto a los métodos de cuantificación, se pueden elegir entre absolutos y relativos. La cuantificación absoluta implica estándares de concentración conocidos para el gen de referencia y el de interés, generando una curva estándar para cuantificar las muestras. La cuantificación relativa calcula la relación entre el gen de referencia y el de interés, utilizando el método doble delta C_t (2^{-ΔΔCq}). Este enfoque suele utilizarse para comparar muestras en dos condiciones. La precisión depende de mantener constante al gen de referencia (102).

La RT-qPCR se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios donde se trabaja con biología molecular y expresión génica, ya que es altamente sensible y

específica. Al utilizar el método de cuantificación correcto se pueden obtener valores numéricos y reales sobre la expresión de un gen de interés; suele ser una técnica rápida comparada con las otras metodologías, y se pueden estudiar genes de baja expresión a la vez, con una poca cantidad de RNA (Tabla 1) (103). Por otro lado, comparado con otras metodologías se deben tener varios controles internos sobre el experimento. Si no se trabaja con el cuidado preciso, es una metodología susceptible a contaminaciones; se deben elegir los genes de referencia correctos que no cambien su expresión con el tratamiento, y aún sigue siendo una metodología algo costosa (Tabla 1) (104).

Los primeros usos que se dieron a esta metodología fueron para estudiar la expresión génica, transcriptasa inversa, etc., pero actualmente se usa más con un fin aplicado, por ejemplo, al diagnóstico de enfermedades infecciosas, perfiles de expresión génica en cáncer, validación de resultados de genómica funcional, detección de biomarcadores en medicina personalizada, o identificación de enfermedades como en el diagnóstico de COVID-19 (95).

La RT-qPCR se utiliza en hongos y levaduras para investigar la respuesta génica a diversas condiciones, estrés o etapa del crecimiento celular, revelando información sobre la regulación génica y los mecanismos de adaptación. Además, se emplea en la detección y cuantificación de especies específicas en entornos ambientales, clínicos e industriales. La versatilidad de la RT-qPCR permite adaptarla a una variedad de estudios según los objetivos específicos de la investigación en hongos filamentosos y levaduras (105–107).

RNA-Seq: Secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS)

La secuenciación del RNA (RNA-Seq) es una técnica que se basa en la secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) (Fig. 2) que permite analizar la expresión génica y descubrir nuevos transcritos de RNA en una muestra biológica. Se basa en la secuenciación masiva y paralela de fragmentos de cDNA obtenidos experimentalmente a partir de una muestra de RNA, proporcionando una visión detallada y global de la transcripción en una célula o tejido específico (108).

El RNA-Seq permite analizar el transcriptoma, que abarca todos los transcritos en una célula o tejido, para conocer su cantidad en una etapa de desarrollo o condición fisiológica específica (108,109). Este enfoque es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma, revelar constituyentes moleculares de células y tejidos, y comprender el desa-

rollo y las enfermedades. Los objetivos clave de la transcriptómica incluyen catalogar todos los tipos de transcritos, determinar la estructura transcripcional de los genes y cuantificar los niveles de expresión de cada transcripto durante el desarrollo y en diversas condiciones (3,108).

La metodología del RNA-Seq evolucionó como una alternativa poderosa a las técnicas tradicionales, como los microarreglos de DNA y la RT-qPCR, que presentaban limitaciones en términos de sensibilidad y capacidad de descubrimiento (3).

En la mitad de la década de 2000, con la introducción de las tecnologías NGS, surgió el RNA-Seq como una herramienta innovadora para analizar la expresión génica. La NGS ha posibilitado la secuenciación a gran escala de manera más rápida y eficiente en comparación con los métodos convencionales. El enfoque tradicional de secuenciación, conocido como Sanger, y utilizado desde la década de 1970, era lento y costoso (108). Sin embargo, la necesidad de secuenciar grandes cantidades de DNA en un tiempo menor impulsó el desarrollo de nuevas tecnologías. La introducción de plataformas como Illumina, Roche 454, SOLiD y Ion Torrent a mediados de la década de 2000 marcó el inicio de la era de la NGS (110). La NGS ha sido tan importante que gracias a ella en el 2001 se pudo reportar la secuencia completa del genoma humano (111).

La plataforma más utilizada es la desarrollada por Illumina, por lo que la metodología descrita es la implementada por tal empresa. Antes de llegar a la secuenciación debe de construirse la biblioteca de cDNA, y para ello debe aislarse el RNA por el método que mejor se adapte, para después ser tratado con DNase I. Posteriormente se determina la calidad y cantidad del RNA total para poder hacer la selección del mRNA, utilizando perlas magnéticas fusionadas con oligos-dT para atrapar el mRNA por su extremo 3' rico en A (112); posteriormente se sintetiza el cDNA utilizando una RT. Luego se amplifican los fragmentos de cDNA por PCR (113); los amplicones se fragmentan con enzimas, sónicacción o nebulizadores, seguido de la selección de tamaño para eliminar secuencias pequeñas o seleccionar un margen ajustado de longitudes de secuencia, y finalmente ser secuenciados (Fig. 1) (114).

Los datos generados por la secuenciación se mapean en un genoma de referencia, y a través de análisis bioinformáticos se cuantifica la abundancia de cada transcripto. Es importante destacar que en ciertos casos los datos de RNA-Seq pueden ser empleados sin la necesidad de un genoma de referencia. En estas situaciones, se forman "contigs" a partir de los datos utilizando herramientas como SPAdes o

Trinity. Estos "contigs" pueden luego ser utilizados para predecir ORFs y ser anotados con bases de datos como eggNOG (108,109).

El análisis posterior incluye la identificación de genes diferencialmente expresados, la detección de isoformas alternativas y el descubrimiento de nuevos transcritos (108). Normalmente, para el análisis bioinformático se utilizan *pipelines* como el desarrollado con el programa *snakePipes* (2.5.0) (115). A grandes rasgos, el control de calidad de los datos brutos procedentes de las líneas de secuenciación debe de analizarse con FastQC (*Babraham Bioinformatics*) y se visualiza con MultiQC (116). Los adaptadores se eliminan utilizando Cutadapt (117), y después con RNA STAR (118) se realiza la alineación de los datos de RNA-Seq con el genoma de referencia, para poder realizar el recuento de lecturas mediante un programa como *feature-Counts* (119), y con el fin de estimar la expresión génica en las muestras. Por último, se utiliza DESeq2 (120) para normalizar los datos y realizar el análisis de expresión génica diferencial.

Las primeras aplicaciones que se le dieron al RNA-Seq se centraron en organismos modelo y líneas celulares, demostrando su capacidad para proporcionar perfiles de expresión génica más precisos y completos que los microarreglos de DNA. A medida que la tecnología avanzaba, su aplicación se extendió a una variedad de organismos y condiciones biológicas (109).

En el ámbito de la micología, el RNA-Seq ha sido ampliamente utilizado en estudios para entender la regulación génica, la respuesta a estrés ambiental, la identificación de genes patogénicos y la elucidación de rutas metabólicas. Investigaciones en levaduras y hongos filamentosos han revelado información valiosa sobre la adaptación a condiciones adversas y la virulencia, evidenciado en búsquedas en bases de datos como PubMed (108,109).

Es una técnica con una alta sensibilidad y resolución, que permite detectar niveles bajos de expresión, proporciona detalles sobre isoformas, no requiere información previa sobre secuencias de RNA, lo que permite el descubrimiento de nuevos transcritos, al igual que un enfoque multipropósito porque se puede utilizar para cuantificar la expresión génica, identificación de variantes de genes, y análisis de fusiones génicas (Tabla 1) (3). A pesar de la gran cantidad de ventajas de esta metodología, sigue caracterizándose por ser muy costosa, requerir de recursos computacionales importantes para poder analizar un conjunto de datos, y además la calidad de los resultados depende de la precisión del genoma de referencia utilizado (Tabla 1) (109).

Recientemente se han desarrollado múltiples trabajos transcriptómicos en hongos con diversos objetivos, destacando el estudio del hongo dimórfico *Sporothrix schenckii* al exponerlo a estrés térmico (121); el análisis de las vías metabólicas para producir metabolitos secundarios del parásito nematodo *Hirsutella minnesotensis* que permite entender cómo coloniza a su hospedero (122); el estudio transcriptómico para entender cómo el hongo *Stemphylium lycopersici* coloniza la planta de tomate (123), por ejemplificar algunos. Pero es evidente que la mayoría de los trabajos que implican RNA-Seq en hongos están relacionados con entender el ciclo celular y de vida del hongo, respuestas a estrés, comparación entre cepas, diferenciación celular, factores de patogenicidad, etc.

En resumen, esta es una técnica muy moderna que sigue en constante evolución y que ha desplazado a otras debido a todas las ventajas que se han descrito.

Conclusiones

Las técnicas para estudiar los perfiles de expresión de los genes en hongos son esenciales para tener una comprensión más profunda y detallada de los mecanismos que regulan la expresión génica en diferentes condiciones ambientales. Cada uno de los métodos mencionados a lo largo de esta revisión, tiene sus propias ventajas y limitaciones, las que fueron brevemente resumidas y comparadas en la Tabla 1.

Como se observa en la figura 1, estas técnicas moleculares han experimentado avances significativos en las últimas décadas. El principio metodológico de cada una ha permitido clasificarlas de acuerdo con su fundamento en tres grupos: basadas en hibridación con sondas específicas, en amplificación por PCR, y en secuenciación, como se puede observar en la figura. 2.

Actualmente, las tecnologías de NGS, como RNA-Seq, son populares por su gran capacidad para analizar la expresión global de los genes en hongos y diversos organismos. Cada una de las tecnologías mencionadas se siguen utilizando a pesar de sus desventajas; por lo tanto, la elección de la técnica más adecuada dependerá de la pregunta de investigación específica, los recursos disponibles, y las características de la muestra.



Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada a Francisco Padilla-Garfias (CVU 904691) quien es estudiante de doctorado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y a la DGAPA-UNAM por la beca otorgada a Minerva Araiza-Villanueva.

Referencias

1. Kalkanci A, Kadioglu A, Wilson D, Jacobsen MD. Gene expression in fungi. *IMA Fungus*. 2011;2(1):29–32.
2. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. *Biol Rev*. 2020;95(5):1198–1232.
3. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631–656.
4. Antonieto ACC, Silva RN. Transcriptomics in *Trichoderma reesei*. En: Aigner AR, Martzy R, editores. *Trichoderma reesei* Methods and Protocols. 1a ed. Nueva York, NY: Humana; 2020. p. 251–269.
5. Moustafa K, Cross JM. Genetic approaches to study plant responses to environmental stresses: An overview. *Biology (Basel)*. 2016;5(2):1–18.
6. Wang Z, Yang B. Northern blotting and its variants for detecting expression and analyzing tissue distribution of miRNAs. En: Harwood AJ, editor. *Basic DNA and RNA Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 58. Berlin: Springer; 2010. p. 83–100.
7. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5350–5354.
8. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975;98(3):503–517.
9. Krumlauf R. Northern blot analysis. En: Harwood AJ, editor. *Basic DNA and RNA Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 58. New York: Humana Press; 1996. p. 113–122.

- 10.** Murphy D. Northern blotting. En: Murphy D, Carter DA, editores. *Transgenesis Techniques. Methods in Molecular Biology*, vol. 18. New York: Humana Press; 1993. p. 337-340.
- 11.** Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, Friess H. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc.* 2009;4(1):37-43.
- 12.** Böhm-Hofstätter H, Tschernutter M, Kunert R. Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal cell line characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(2):419-425.
- 13.** Reisinger H, Steinfellner W, Stern B, Katinger H, Kunert R. The absence of effect of gene copy number and mRNA level on the amount of mAb secretion from mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;81(4):701-710.
- 14.** Martinho C, Lopez-Gomollon S. Detection of microRNAs by Northern blot. En: Dalmay T, editor. *MicroRNA Detection and Target Identification. Methods in Molecular Biology*, vol. 2630. New York: Humana; 2023. p. 45-53.
- 15.** Pérez-Torralba C, Ruiz-Olivares M, Sanbonmatsu-Gámez S, Expósito-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Increased infections by herpes simplex virus type 1 and polymicrobials of the genital tract, in the general population of a Spanish middle city. *Rev Esp Quimioter.* 2021;34(4):320-329.
- 16.** Beckmann BM, Grünweller A, Weber MHW, Hartmann RK. Northern Blot detection of endogenous small RNAs (approximately 14 nt) in bacterial total RNA extracts. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(14):e147.
- 17.** Amich J, Vicentefranqueira R, Mellado E, Ruiz-Carmuega A, Leal F, Calera JA. The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cell Microbiol.* 2014;16(4):548-564.
- 18.** Khalique A, Mattijssen S, Maraia RJ. A versatile tRNA modification-sensitive northern blot method with enhanced performance. *RNA.* 2022; 28(3):418-432.
- 19.** Zinn K, Dimaio D, Maniatis T. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. *Cell.* 1983; 34(3):865-879.
- 20.** Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12(18):7035-7056.
- 21.** Qu Y, Boutjdir M. RNase protection assay for quantifying gene expression levels. En: Zhang J, Rokosh G, editores. *Cardiac Gene Expression. Methods in Molecular Biology*, vol. 366. New York: Humana Press; 2007. p. 145-58.
- 22.** Emery P. RNase Protection Assay. Rosato E, editor. *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology*, vol. 362. New York: Humana Press; 2007. p. 249-258.
- 23.** Goldrick M, Kessler D. RNA analysis by nuclease protection. *Curr Protoc Neurosci.* 2003;23(1):5.1.1-5.1.30.
- 24.** Brown PC, Thorgeirsson SS, Silverman JA. Cloning and regulation of the rat *mdr2* gene. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(16):3885-3891.
- 25.** Burton EA, Tinsley JM, Holzfeind PJ, Rodrigues NR, Davies KE. A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(24):14025-14030.
- 26.** Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature.* 1990; 343(6258):536-540.
- 27.** Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MP, Young MW. Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science.* 270(5237):808-810.
- 28.** Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 1998; 93(6):929-937.
- 29.** Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell.* 1998; 95(5):669-679.
- 30.** Gilman M. Ribonuclease protection assay. *Curr Protoc Mol Biol.* 1993;24(1) 4.7.1-4.7.8.
- 31.** Romero-López C, Barroso-delJesus A, Menendez P, Berzal-Herranz A. Analysis of mRNA abundance and stability by ribonuclease protection assay. En: Vancura A, editor. *Transcriptional Regulation. Methods in Molecular Biology*, vol. 809. New York: Springer; 2012. p. 197-210.

- 32.** Lee Y. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002; 21(17):4663–4670.
- 33.** Carey MF, Peterson CL, Smale ST. The RNase protection assay. En: *Cold Spring Harb Protoc.* 2013; 2013(3): 276–285.
- 34.** Müller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J Immunol Methods.* 2001; 249(1–2):155–165.
- 35.** Cloutier N, Gravel A, Flamand L. Multiplex detection and quantitation of latent and lytic transcripts of human herpesvirus-8 using RNase protection Assay. *J Virol Methods.* 2004; 122(1):1–7.
- 36.** Venkatesh LK, Fasina O, Pintel DJ. RNase mapping and quantitation of RNA isoforms. En: Jin H, Gassmann W, editores. *RNA Abundance Analysis. Methods in Molecular Biology*, vol. 883. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 103-17.
- 37.** Duguay BA, Herod A, Pringle ES, Monro SMA, Hetu M, Cameron CG, et al. Photodynamic inactivation of human coronaviruses. *Viruses.* 2022;14(1)1-19.
- 38.** Stabell FB, Tourasse NJ, Ravnun S, Kolstø AB. Group II intron in *Bacillus cereus* has an unusual 3' extension and splices 56 nucleotides downstream of the predicted site. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(5):1612–1623.
- 39.** Mercier A, Labbé S. Iron-dependent remodeling of fungal metabolic pathways associated with ferrichrome biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(12):3806–3817.
- 40.** Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992;257(5072):967–971.
- 41.** Sturtevant J. Applications of Differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(3):408–427.
- 42.** Jurecic R, Nachtman RG, Colicos SM, Belmont JW. Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. *Anal Biochem.* 1998;259(2):235–244.
- 43.** Mong JA, Krebs C, Pfaff DW. Perspective: microarrays and differential display PCR—tools for studying transcript levels of genes in neuroendocrine systems. *Endocrinology.* 2002;143(6):2002–2006.
- 44.** Steinau M, Rajeevan MS. RNA profiling in peripheral blood cells by fluorescent differential display PCR. *Methods Mol Biol.* 2009;496:211–222.
- 45.** McClelland M. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends in Genetics.* 1995;11(6):242–246.
- 46.** Tugores A, Belmonte JCI. Differential display of eukaryotic mRNA. En: Sharpe PT, Mason I, editores. *Molecular Embryology. Methods in Molecular Biology*, vol. 461. New York: Humana Press; 2008. p. 569-580.
- 47.** Kitahara T, Kiryu S, Takeda N, Kubo T, Kiyama H. Up-regulation of ferritin heavy chain mRNA expression in the rat skeletal muscle after denervation: detected by means of differential display. *Neurosci Res.* 1995;23(4):353–360.
- 48.** Zhu YZ, Zhu YC, Stoll M, Unger T. Identification of regulated genes in rat heart after myocardial infarction by means of differential mRNA display. *Jpn Heart J.* 2000;41(1):59–66.
- 49.** Krebs CJ, Pfaff DW. Expression of the *SCAMP-4* gene, a new member of the secretory carrier membrane protein family, is repressed by progesterone in brain regions associated with female sexual behavior. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;88(1–2):144–154.
- 50.** Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(23):12816–12821.
- 51.** Gancedo JM. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998;62(2):334–361.
- 53.** Hong YM, Park SW, Choi SY. Expression of the *CIP1* gene induced under cadmium stress in *Candida* sp. *Mol Cells.* 1998;8(1):84–89.
- 53.** Chen B, Gao S, Choi GH, Nuss DL. Extensive alteration of fungal gene transcript accumulation and elevation of G-protein-regulated cAMP levels by a virulence-attenuating hypovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(15):7996–8000.
- 54.** Edris S, Mutwakil M H Z, Sabir J S M, Ramadan A M, Gadalla N O, Shokry A M, et al. Identification of *GPDI* gene from yeast via fluorescence differential display-polymerase chain reaction (FDD-PCR). *Afr J Biotechnol.* 2012;11(35):8653–8664.

- 55.** Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T van de, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(21):4407–4414.
- 56.** Bachem CWB, Van Der Hoeven RS, De Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant J.* 1996;9(5):745–753.
- 57.** Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, et al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics.* 2003;269(2):173–179.
- 58.** Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJT. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1399–1413.
- 59.** Breyne P, Zabeau M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol.* 2001;4(2):136–142.
- 60.** Dellagi A, Birch PRJ, Heilbronn J, Lyon GD, Toth IK. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microbiology.* 2000;146(1):165–171.
- 61.** Wang X, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang C, Liu B, et al. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis*. sp. *BMC Genomics.* 2009;10:289.
- 62.** Massart S, Jijakli MH. Identification of differentially expressed genes by cDNA-amplified fragment length polymorphism in the biocontrol agent *Pichia anomala* (strain Kh5). *Phytopathology.* 2006;96(1):80–86.
- 63.** Kim DY, Hong MJ, Jang JH, Seo YW. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in *Brachypodium distachyon*. *Genes Genomics.* 2012;34(5):475–484.
- 64.** Xiao D, Liu ST, Wei YP, Zhou DY, Hou XL, Li Y, et al. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in incompatible interaction between infected non-heading Chinese cabbage and *Hyaloperonospora parasitica*. *Hortic Res.* 2016;3(1):16034.
- 65.** Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995;270(5235):484–487.
- 66.** Hu M, Polyak K. Serial analysis of gene expression. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1743–1760.
- 67.** Anisimov S. Serial analysis of gene expression (SAGE): 13 years of application in research. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008;9(5):338–350.
- 68.** Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, et al. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(26):15718–15723.
- 69.** Berndt A, Logan C. Serial analysis of gene expression. En: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editores. *Encyclopedia of Neuroscience.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2009. p. 3674–3679.
- 70.** van Ruijsen F, Ruijter JM, Schaaf GJ, Asgharnegad L, Zwijnenburg DA, Kool M, et al. Evaluation of the similarity of gene expression data estimated with SAGE and Affymetrix GeneChips. *BMC Genomics.* 2005;6(1):91.
- 71.** Kal AJ, van Zonneveld AJ, Benes V, van den Berg M, Koerkamp MG, Albermann K, et al. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol Biol Cell.* 1999;10(6):1859–1872.
- 72.** Irie T, Matsumura H, Terauchi R, Saitoh H. Serial analysis of gene expression (SAGE) of *Magnaporthe grisea*: genes involved in appressorium formation. *Molecular Genetics and Genomics.* 2003;270(2):181–189.
- 73.** Larraya LM, Boyce KJ, So A, Steen BR, Jones S, Marra M, et al. Serial analysis of gene expression reveals conserved links between protein kinase A, ribosome biogenesis, and phosphate metabolism in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.* 2005;4(12):2029–2043.
- 74.** Kronstad J. Serial analysis of gene expression in eukaryotic pathogens. *Infect Disord Drug Targets.* 2006;6(3):281–297.
- 75.** Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1975;72(10):3961–3965.
- 76.** Gergen JP, Stern RH, Wensink PC. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(8):2115–2136.
- 77.** Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns

- with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467–470.
78. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):291–302.
79. Alonso-Betanzos A, Bolón-Canedo V, Morán-Fernández L, Sánchez-Maroño N. A review of microarray datasets: where to find them and specific characteristics. En: Bolón-Canedo V, Alonso-Betanzos A, editores. *Microarray Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*, vol. 1986. New York: Humana; 2019. p. 49–65.
80. Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA Microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine*. 2007;13(9–10):527–541.
81. Diaz E, Barisone GA. DNA Microarrays: sample quality control, array hybridization and scanning. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(49):1–5.
82. Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;101(1):2.1.1–2.1.11.
83. Altman N. Replication, variation and normalisation in microarray experiments. *Appl Bioinformatics*. 2005;4(1):33–44.
84. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet*. 2001;29(4):365–371.
85. Breakspear A, Momany M. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology*. 2007;153(1):7–15.
86. Garaizar J, Brena S, Bikandi J, Rementeria A, Pontón J. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(7):987–998.
87. Walker LA, MacCallum DM, Bertram G, Gow NAR, Odds FC, Brown AJP. Genome-wide analysis of *Candida albicans* gene expression patterns during infection of the mammalian kidney. *Fungal Genetics and Biology*. 2009;46(2):210–219.
88. Rodríguez-Peña JM, Pérez-Díaz RM, Alvarez S, Bermejo C, García R, Santiago C, et al. The ‘yeast cell wall chip’ – a tool to analyse the regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2005;151(7):2241–2249.
89. Momose Y, Iwahashi H. Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Environ Toxicol Chem*. 2001;20(10):2353.
90. Ehrenreich IM, Bloom J, Torabi N, Wang X, Jia Y, Kruglyak L. Genetic architecture of highly complex chemical resistance traits across four yeast strains. *PLoS Genet*. 2012; 8(3):e1002570.
91. Sánchez NS, Calahorra M, Ramírez J, Peña A. Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biol*. 2018;122(10):977–990.
92. Bustin S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002;29(1):23–39.
93. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7).
94. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*. 1992;10(4):413–417.
95. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeL real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2020;58(5).
96. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995–1001.
97. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559–1582.
98. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209–219.
99. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*. 2000;285(2):194–204.
100. Yang DK, Kweon CH, Kim BH, Lim SI, Kim SH, Kwon JH, et al. TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of

- Japanese encephalitis* virus. *J Vet Sci*. 2004;5(4):345–351.
- 101.** de Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*. 2007;2(9):e898.
- 102.** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.
- 103.** Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes*. 2022;13(12):2387.
- 104.** Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F, Torriani S. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(7):4116–4122.
- 105.** Teste MA, Duquenne M, François JM, Parrou JL. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol*. 2009;10:99.
- 106.** Wang X, Glawe DA, Weller DM, Okubara PA. Real-time PCR assays for the quantification of native yeast DNA in grape berry and fermentation extracts. *J Microbiol Methods*. 2020;168:105794.
- 107.** Archer M, Xu J. Current practices for reference gene selection in RT-qPCR of *Aspergillus*: outlook and recommendations for the future. *Genes*. 2021;12(7):960.
- 108.** Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):57–63.
- 109.** Deshpande D, Chhugani K, Chang Y, Karlsberg A, Loeffler C, Zhang J, et al. RNA-seq data science: from raw data to effective interpretation. *Front Genet*. 2023; 14:997383.
- 110.** Gondane A, Itkonen HM. Revealing the history and mystery of RNA-Seq. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(3):1860–74.
- 111.** Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921.
- 112.** Masters TL, Hilker CA, Jeraldo PR, Bhagwate A V, Greenwood-Quaintance KE, Eckloff BW, et al. Comparative evaluation of cDNA library construction approaches for RNA-Seq analysis from low RNA-content human specimens. *J Microbiol Methods*. 2018;154:55–62.
- 113.** Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5(7):621–628.
- 114.** Vvedenskaya IO, Goldman SR, Nickels BE. Preparation of cDNA libraries for high-throughput RNA sequencing analysis of RNA 5' ends. *Methods Mol Biol*. 2015;1276:211–228.
- 115.** Bhardwaj V, Heyne S, Sikora K, Rabbani L, Rauer M, Kilpert F, et al. snakePipes: facilitating flexible, scalable and integrative epigenomic analysis. *Bioinformatics*. 2019;35(22):4757–4759.
- 116.** Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047–3048.
- 117.** Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17(1):10.
- 118.** Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
- 119.** Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923–930.
- 120.** Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
- 121.** He D, Zhang X, Gao S, You H, Zhao Y, Wang L. Transcriptome analysis of dimorphic fungus *Sporothrix schenckii* exposed to temperature stress. *International Microbiology*. 2021;24(1):25–35.
- 122.** Lai Y, Liu K, Zhang X, Zhang X, Li K, Wang N, et al. Comparative genomics and transcriptomics analyses reveal divergent lifestyle features of nematode endoparasitic fungus *Hirsutella minnesotensis*. *Genome Biol Evol*. 2014;6(11):3077–3093.
- 123.** Zhang D, Chi W, Wang C, Dai H, Li J, Li C, et al. Pathogenic process-ssassociated transcriptome analysis of *Stemphylium lycopersici* from tomato. *Int J Genomics*. 2022;2022:1–12.