



PRESERVACIÓN MODIFICADA Y DESCRIPCIÓN DE LA FUNGALISINA PARA *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

MODIFIED PRESERVATION AND FUNGALYSIN DESCRIPTION FOR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

Olga Cristina Lozano Camelo¹, Adriana Carolina Rojas Arias², Kelly Johanna Ávila Méndez¹ y Silvio Alejandro López-Pazos*¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño, Carrera 3 Este 47A-15, Bogotá D.C., Colombia.

²Fundación Universitaria Agraria de Colombia, Calle 170 No. 54a-10, Bogotá D.C., Colombia.

*Autor para correspondencia: alejandrolopezpazos@uan.edu.co

Manuscrito recibido el 10 de marzo de 2021. Aceptado, tras revisión, el 12 de noviembre de 2021. Publicado el 1 de septiembre de 2022.

Resumen

Batrachochytrium dendrobatidis es un hongo patógeno que causa quitridiomycosis, una afección cutánea que resulta en la reducción de las poblaciones de anuros en todo el mundo, debido a las fungalisinas, su factor de virulencia más importante. Los mapas de *B. dendrobatidis* (<http://www.bd-maps.net/>) contienen la información sobre los aislamientos relacionados con *B. dendrobatidis*. Una alternativa disponible para la reconstitución de cepas de *B. dendrobatidis* es a partir de células criopreservadas, los métodos para esto se basan en el protocolo de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Recientemente, gran parte del interés en la investigación de *B. dendrobatidis* se ha centrado en la secuenciación de su ADN, se encuentran disponibles los genomas de *B. dendrobatidis* JAM81 y *B. dendrobatidis* JEL423. OBJETIVO. Evaluar una forma modificada del protocolo de la OIE para la criopreservación de cepas de *B. dendrobatidis* y el análisis *in silico* de su fungalisina. Se modificó el protocolo de la OIE utilizando la cepa de *B. dendrobatidis* EV001, enfocado en los ítems de concentraciones de criopreservantes, antibióticos y recuperación, desde -80°C , y evaluación de viabilidad microscópica en agar hidrolizado con triptona y gelatina. Además se utilizó Bioinformática para la determinación de características bioquímicas de la fungalisina de la cepa de *B. dendrobatidis* JAM81. El protocolo modificado de la OIE resultó útil para la recuperación de la viabilidad de la cepa *B. dendrobatidis* EV001. La caracterización de la fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 mostró un peso molecular de 85 kDa, punto isoeléctrico de 8,33 y estructura terciaria característica que indicó que la proteína es una metaloproteína, tiene un dominio PepSY para la inhibición de proteasas, y un dominio catalítico asociado a destrucción de barreras proteicas.

Palabras clave: *Batrachochytrium dendrobatidis*, anura, patógeno, zoospora, criopreservación, fungalisina.

Abstract

Batrachochytrium dendrobatidis is a pathogenic fungus causing chytridiomycosis, a cutaneous affection resulting in reduction on Anura populations around the world, because of fungalysins, the most important virulence factor. The *B. dendrobatidis* maps (<http://www.bd-maps.net/>) is the dataset of information about the *B. dendrobatidis* -related isolates. An alternative available for reconstitution of *B. dendrobatidis* strains from cryopreserved cells include methods relying on the World Organization for Animal Health (OIE) protocol. Most recently, much of the interest in the *B. dendrobatidis* research has focused on its DNA sequencing, especially *B. dendrobatidis* JAM81 and *B. dendrobatidis* JEL423 genomes. OBJECTIVE. To evaluate a modified form from OIE protocol for *B. dendrobatidis* strain criopreservation, and *in silico* analysis of *B. dendrobatidis* fungalysin. OIE protocol was modified using *B. dendrobatidis* EV001, focused on cryopreservant concentrations, antibiotics and recovering to -80°C , and microscopic viability evaluation on Tryptone Gelatin hydrolyzed agar. Besides, Bioinformatics was used for the determination of biochemical characteristics from a *B. dendrobatidis* JAM81 fungalysin. Modified OIE protocol was useful by viability, recovering *B. dendrobatidis* EV001 strain. The characterization of *B. dendrobatidis* JAM81 fungalysin showed a molecular weight of 85 kDa, isoelectric point of 8.33, and tertiary structure among others. This indicated that the protein is a metalloproteinase, it has a PePSY domain for protease inhibition, and a catalytic domain that destroy protein barriers.

Keywords: *Batrachochytrium dendrobatidis*, anura, pathogen, zoospore, cryopreservation, fungalysin.

Forma sugerida de citar: Lozano Camelo, O., Rojas Arias, A., Ávila Méndez, K. y López-Pazos, S. (2022). Preservación modificada y descripción de la fungalisina para *Batrachochytrium dendrobatidis*. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 36(2):32-44. <http://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.03>.

IDs Orcid:

Olga Cristina Lozano Camelo: <https://orcid.org/0000-0001-6563-2365>
Adriana Carolina Rojas Arias: <https://orcid.org/0000-0001-5428-7754>
Kelly Johanna Ávila Méndez: <https://orcid.org/0000-0002-7155-2924>
Silvio Alejandro López-Pazos: <https://orcid.org/0000-0002-3682-4162>

1 Introducción

Existen varias causas de reducción de la población de anfibios, entre ellas el consumo comercial; las especies introducidas, el uso de la tierra, los contaminantes, el cambio climático, y los patógenos. Hay más de 4.000 especies relacionadas con los anuros; adicionalmente, las áreas tropicales de América tienen una alta diversidad de anuros (32% están en Sudamérica). Por ejemplo, la región de Cali (Colombia) tiene un alto índice de diversidad anurana (35 especies), el área de Pichincha (Ecuador) tiene una alta riqueza de especies anuranas (20 especies), y la región de Bolívar (Venezuela) reportó 26 especies (Duellman, 1988). Colombia tiene una riqueza de especies anuranas (Flechas y col., 2017; Lynch, Ruiz-Carranza y Ardila-Robayo, 1997), pero hay más de 50 especies amenazadas (Fisher y Garner, 2020; Sluijs y col., 2017; Rueda-Almonacid, Lynch y Amézquita, 2004). Las enfermedades infecciosas son uno de los factores que afectan el estado de los anuros, y entre ellas se encuentra la quitridiomycosis, una enfermedad causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que tiene efectos dañinos en ranas y sapos en todo el país. *B. dendrobatidis* tiene afinidad con la dermis queratinizada (Lindauer y col., 2019; Green, Gray y Miller, 2010; Vredenburg y col., 2010; Berger y col., 1998) y parece afectar a los anuros de acuerdo con las especies, la síntesis de alcaloides, o la relación entre la piel y la temperatura ambiental. *B. dendrobatidis* aumenta durante el período de lluvia, pues los ecosistemas de agua estimulan la presencia de patógenos en el hospedador (Richmond y col., 2009); por ejemplo, se ha reportado la enfermedad en un total de seis áreas en Colombia: Amazonas, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Nariño y Valle del Cauca, que tienen un clima tropical con poca variación de temperatura y alta humedad (Flechas y col., 2017; Vásquez-Ochoa y col., 2012; Velásquez y col., 2008).

B. dendrobatidis consta de dos etapas: una etapa de zoospora que es móvil y flagelada, y que inicia la colonización en la piel de la rana. Una vez dentro de un huésped, la zoospora puede desarrollar un tejido que se convierte en un zoosporangio (o esporangio), que contiene la siguiente generación de esporas, renovando el ciclo. El zoosporangio prematuro está presente en las células viables que causan hiperqueratosis y alteración del equilibrio hídrico-electrolito, y el zoosporangio maduro predomina en los estra-

tos queratinizados exteriores. Los tubos de descarga se encuentran en la superficie de la piel de la rana, liberando zoosporas en el medio ambiente (Rosenblum y col., 2010). El genoma de *B. dendrobatidis* tiene una alta tasa de cambio en los linajes, promoviendo una evolución patógena: la NPH (la nueva hipótesis del patógeno) que se basa en un modelo de propagación invasor en nuevos ecosistemas o huéspedes, y LA EPH (la hipótesis del patógeno endémico), que se centra en la enfermedad causada por *B. dendrobatidis* como consecuencia de una alteración entre patógeno-anura-ambiente (Scheele y col., 2019; Rosenblum y col., 2009).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE-World Organization for Animal Health, 2012) describió el método de crioconservación de *B. dendrobatidis*, que se basa exclusivamente en el cultivo de microorganismos para aumentar la concentración de zoosporas y zoosporangio; este consiste en el uso de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 10% de suero fetal bovino (FBS) a -80°C . Durante la descongelación, los cultivos deben someterse a 43°C , lactosa y antibióticos.

La evidencia sugiere que la actividad enzimática de *B. dendrobatidis* influye directamente en su grado de patogenicidad. La penetración de *B. dendrobatidis* en las células epidérmicas de la rana probablemente requiere enzimas digestivas. Una cepa de referencia de *B. dendrobatidis* se cultiva y se utiliza para producir proteasas, que degradan la caseína y la gelatina. La información sobre las bases genéticas e interacciones a nivel molecular conducen a la expresión génica de proteasas de serina y metalopeptidasa de fundalisina, dos genes relacionados con la patogénesis y que han sido identificados en otros hongos (Rosenblum y col., 2010). *B. dendrobatidis* sintetiza las fungalisina-metalopeptidasas, una clase de proteínas que son esenciales para los microorganismos como *Trichophyton sp.* y *Microsporium sp.* un gen de fungalisina-metalopeptidasas de *B. dendrobatidis*, que tiene altos niveles de expresión en zoosporangios (McDonald y col., 2020; Rosenblum y col., 2009). Este trabajo evalúa los cambios en el protocolo de la OIE para la criopreservación de *B. dendrobatidis* y la posterior recuperación de este microorganismo, junto con la descripción *in silico* de su fungalisina.

2 Materiales y Métodos

2.1 Cepa

Se utilizó la cepa *B. dendrobatidis* EV001, donada por Universidad de los Andes (Bogotá-Colombia). *B. dendrobatidis* EV001 representa la primera cepa aislada en Colombia (de Ubaqué, Cundinamarca), que fue recuperada de *Rheobates palmatus* (Flechas y col., 2013). El medio de cultivo utilizado de *B. dendrobatidis* corresponde a una mezcla de triptona y gelatina hidrolizada (TGH) (triptona al 1%, gelatina hidrolizada al 0,4%, agar al 1%). Se utilizó caldo de triptona al 1% para la producción de zoosporas, y se examinaron las células de *B. dendrobatidis* EV001 bajo un microscopio, usando tinción azul de lactofenol y rojo Congo.

2.2 Criopreservación de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Se aplicó un método modificado de conservación de la OIE a *B. dendrobatidis* EV001. Se diluyó una porción de 2,0 ml de medio de triptona de 1 semana de inoculado con *B. dendrobatidis* EV001, y 13 ml de medio de triptona fresco en un matraz de cultivo celular de 25 cm², y se incubó a temperatura ambiente durante 4 días con agitación suave. Se hizo un raspado de las paredes del matraz, luego se centrifugó el producto a 1700 g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, y se suspendió el pellet en 0,6 ml de caldo de triptona que contenía DMSO al 10% y se congeló a -80 °C. Un mes después, el pellet congelado se colocó en baño de agua a 43 °C durante 30 s y se transfirió al medio TGH sin lactosa ni antibióticos. Se utilizó un diseño aleatorio con tres repeticiones.

2.3 Fungalisina para *Batrachochytrium dendrobatidis*

Se realizó un análisis bioinformático del factor de virulencia similar a la fungalisina utilizando la secuencia de aminoácidos correspondiente del genoma de *B. dendrobatidis* JAM81 depositado en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ID NCBI: XP_006675712.1). Se realizó una comparación entre la fungalisina para *B. dendrobatidis* JAM81 y

la fungalisina para *Aspergillus* (Protein Data Bank ID: 4k90) con Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se utilizó la herramienta ProtParam de ExPASy (<http://www.expasy.org/>) para la descripción teórica de la fungalisina para *B. dendrobatidis* (punto isoeléctrico, peso molecular, hidropaticidad, residuos positivos e índice alifático). Los dominios funcionales se determinaron utilizando la base de datos de dominio conservado (CDD) de NCBI. Se calculó un modelo tridimensional (3D) de la fungalisina para *B. dendrobatidis* JAM81 mediante el modelado homológico, utilizando el modelo suizo (Swiss-model) (<https://swissmodel.expasy.org/>), el cual fue sometido a su perfeccionamiento usando 3Drefine (<http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/index.html>) y validado aplicando QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>). La figura se visualizó utilizando Jmol (<https://www.bioinformatics.org/firstglance/fgjj/>).

3 Resultados

3.1 Morfología del *B. dendrobatidis* EV001

Se observó la viabilidad de *B. dendrobatidis* EV001 mediante el crecimiento en el medio TGH y sus estructuras morfológicas. *B. dendrobatidis* EV001 muestra colonias granulares y cremosas (Figura 1A). De igual forma, se observa una morfología parecida a una cacerola al usar tinción azul de lactofenol bajo el microscopio, lo cual es una característica de la quitridiomycosis (Figura 1B).

Se cultivó el *B. dendrobatidis* EV001 en un medio de TGH con el fin de determinar la morfología de las zoosporas, zoosporangios, tubo de descarga y rizoides (Figuras 2 y 3) para establecer los estadios de desarrollo de *B. dendrobatidis* (Figura 4).

3.2 Método de criopreservación de *B. dendrobatidis*

El método de criopreservación de *B. dendrobatidis* basado en el protocolo de la OIE (OIE-World Organization for Animal Health, 2012) fue modificado como se muestra en la Tabla 1. Se confirmó la viabilidad de *B. dendrobatidis* EV001 en el medio TGH (Figura 5).

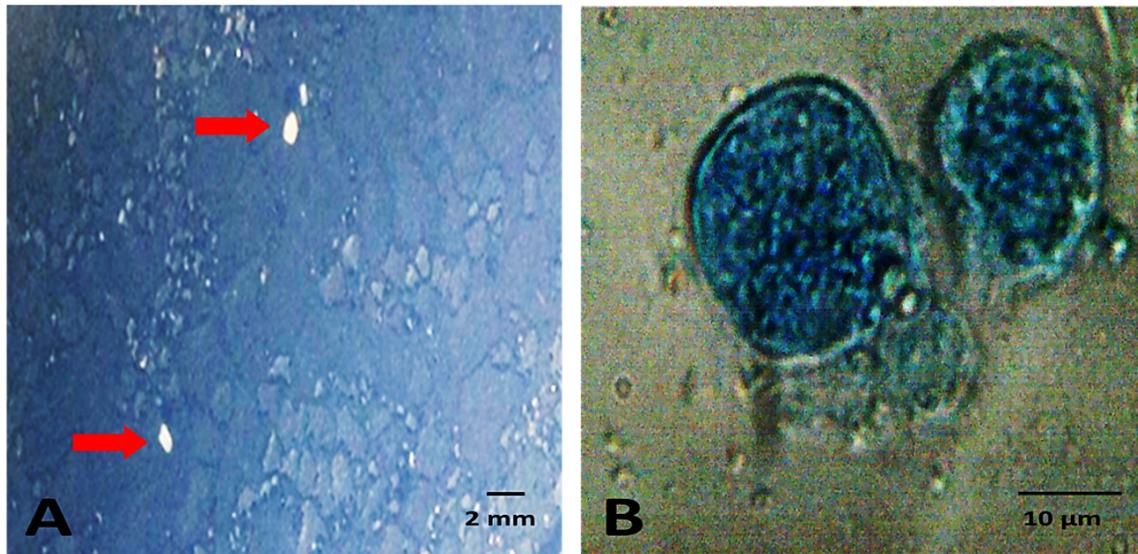


Figura 1. Morfología macroscópica y microscópica de *B. dendrobatidis*. (A) Colonias granulares de *B. dendrobatidis* EV001 en medio TGH (flechas). (B) morfología tipo cacerola de *B. dendrobatidis* EV001 (microscopía óptica en una lente 40×), normalmente tienen 10–40 µm de diámetro (Berger y col., 2005).

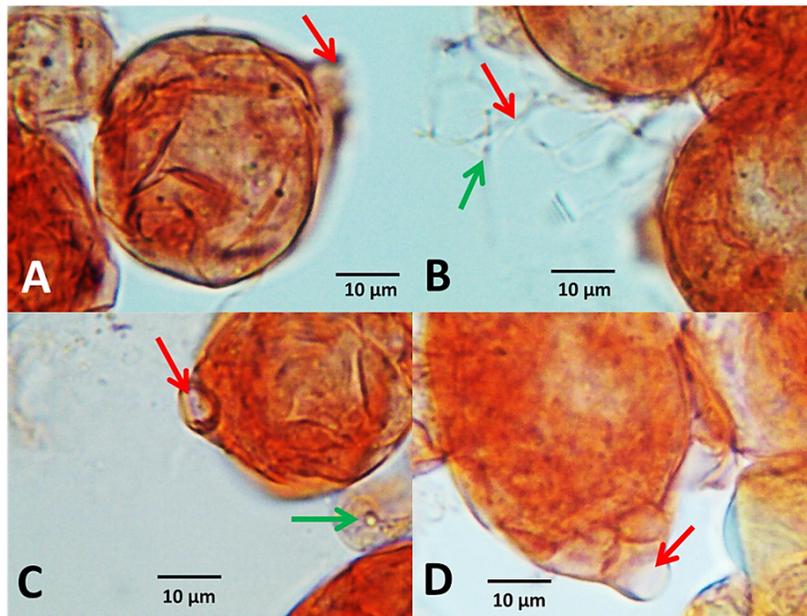


Figura 2. Morfología de *B. dendrobatidis* EV001 en la TGH utilizando la tinción rojo congo. (A). Zoosporangio y tubo abierto de descarga de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). (B). Zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 con tejido (flecha roja) y rizoides (flecha verde). (C) Zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 con tubo de descarga abierto (flecha roja), que contiene celulosa y quitina, y un zoosporo (flecha verde). (D) Zoosporangio inoperculado de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). Microscopía óptica en una lente 100×. El zoosporangio normalmente tiene 10–40 µm de diámetro (Berger y col., 2005).

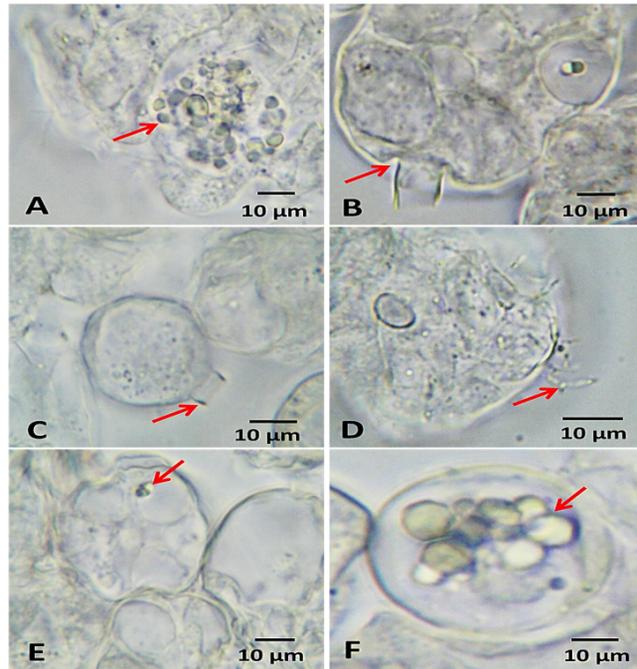


Figura 3. Examen microscópico de montaje húmedo de *B. dendrobatidis* EV001. (A) Zoosporangio y zoosporas internas de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). (B) Zoosporangio con dictiosomas de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). (C) Zoosporangio y tubo de descarga de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). (D) Rizoides de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja) (E) Zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja) (F) Plasmalema y sáculos interiores de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja). Microscopía óptica en una lente 40×. Las zoosporas suelen tener de 0,7 a 6,0 µm de diámetro (Berger y col., 2005).

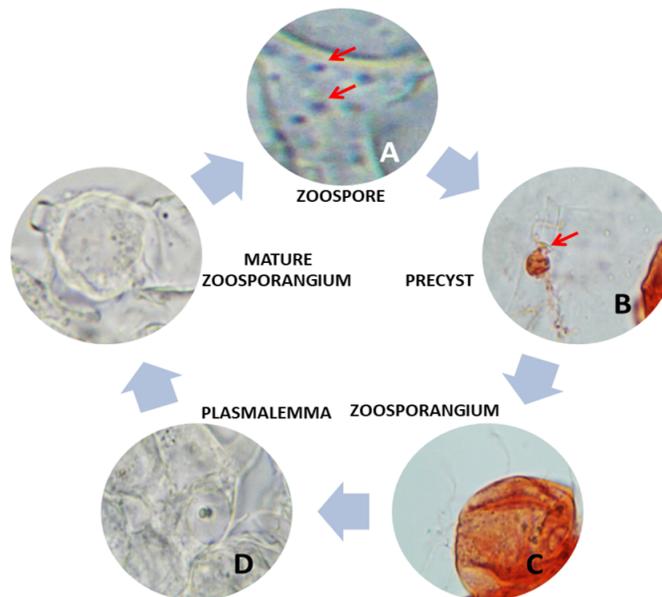
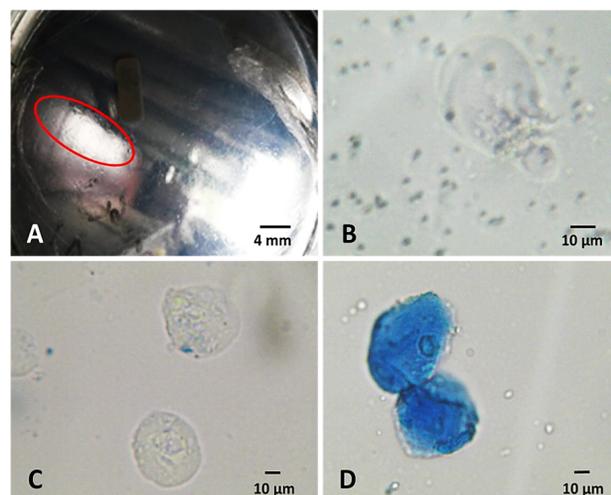


Figura 4. Ciclo de vida de *B. dendrobatidis* EV001. (A) Zoosporas de *B. dendrobatidis* EV001 (flechas rojas). (B) Zoosporas de *B. dendrobatidis* EV001 que forman tejido (pre-quistes) (flecha roja). (C) Zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 con tejido y rizoides. (D) Plasmalema, sáculos y zoosporas de *B. dendrobatidis* EV001. (E) Zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 antes de la liberación de zoosporas. Microscopía óptica en lentes 100× (A, B, C) y 40× (D, E).

Tabla 1. Propuesta de modificación del método de la OIE (OIE-World Organization for Animal Health, 2012) dedicado a la criopreservación de *B. dendrobatidis* utilizando *B. dendrobatidis* EV001.

CRIOPRESERVACIÓN	
Protocolo OIE	Cambios
Tomar 2 ml de caldo de cultivo con crecimiento activo (una semana). Añadir 13 ml de caldo nuevo en un matraz de cultivo celular de 25 cm ² ml. Incubar 3-4 días. Los cultivos deben tener una gran cantidad de zoosporas activas y zoosporangio en el caldo. Raspar las paredes del matraz de cultivo celular y centrifugar a 1700 g cada 10 min	Ninguno
Vierta el sobrenadante	El sobrenadante se inactivó con hipoclorito al 2,5 % (el sobrenadante contiene zoosporas activas)
Suspenda el sedimento en 1 ml 10% DMSO y 10% FBS en caldo y congele.	Se utilizaron 0,6 ml de DMSO al 5% y al 10%, y no se utilizó FBS. El proceso de congelación se aplicó a -80 °C durante un mes
DESCONGELAMIENTO	
Coloque los viales directamente del nitrógeno líquido al agua (43 °C). Agite durante 30 segundos.	Ninguno
Verter el contenido en el agar TGhL complementado con lactosa (TGhL) y antibióticos.	El contenido del vial se vierte directamente en el medio TGH. No se utilizaron antibióticos ni lactosa.
Pipetee el crioprotector líquido sobre la muestra (en la placa de Petri).	No se ha aplicado en este trabajo.
Ponga 1 ml de solución salina débil (0,001 M KH ₂ PO ₄ ; 0,0001 M MgCl ₂ ; 0,00002 M CaCl ₂) en la muestra transferida e incube. Examine los cultivos durante 7-10 días para ver si hay movimiento de zoosporas.	Todo el proceso está diseñado para ser lo más cuidadoso posible y evitar riesgos de contaminación y reducir la cantidad de manipulación necesaria hasta observar el crecimiento colonial.

**Figura 5.** *B. dendrobatidis* EV001 después de la criopreservación. A. Se observa el medio TGh con colonias translúcidas de *B. dendrobatidis* EV001 20 días después de la descongelación (círculo rojo). B. Zoosporangio y zoosporas de *B. dendrobatidis* EV001. C. Esporangio de *B. dendrobatidis* EV001 con tubo de descarga. D. Azul de lactofenol, zoosporangio de *B. dendrobatidis* EV001 (flecha roja), zoosporas (tinción de azul de lactofenol). Microscopía óptica en un lente 40×

3.3 Análisis bioinformático de la fungalisina

Según el análisis bioinformático, las predicciones muestran que la fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 tiene una vida media superior a 20 horas, un peso molecular de 85 kDa, un punto isoeléctrico de 8,33, un índice alifático de 59,68 (tiene una alta tolerancia a la temperatura, similar a otras proteínas), y una hidropaticidad de -0.625 (proteína hidrófila). La fungalisina de *B. dendrobatidis* se modeló utilizando una fungalisina estándar de *Aspergillus* como plantilla (PDB: 4k90) (Figura 6) (identidad: 40,75%,

cobertura de consulta: 45%, valor E: $1E-82$). El modelo teórico 3D corresponde a 368 residuos (46,8%) de F237 a G604 (Figura 7). Los alfa-hélices en el modelo están formados por 126 residuos (34,23%), 46 residuos con una conformación beta-lámina (12,5%) y 196 residuos que forman bucles (53,26%). La señal de EXXXD se encuentra entre los residuos 407 y 411, y la señal EXXXD se encuentra entre los residuos 437 y 441. Sobre la base de los resultados de la CDD, la fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 tiene un dominio de PepSY (propéptido peptidasa) que va de I164 a V230, y la región catalítica está entre los residuos Y239 y A590 (Fernández y col., 2013).

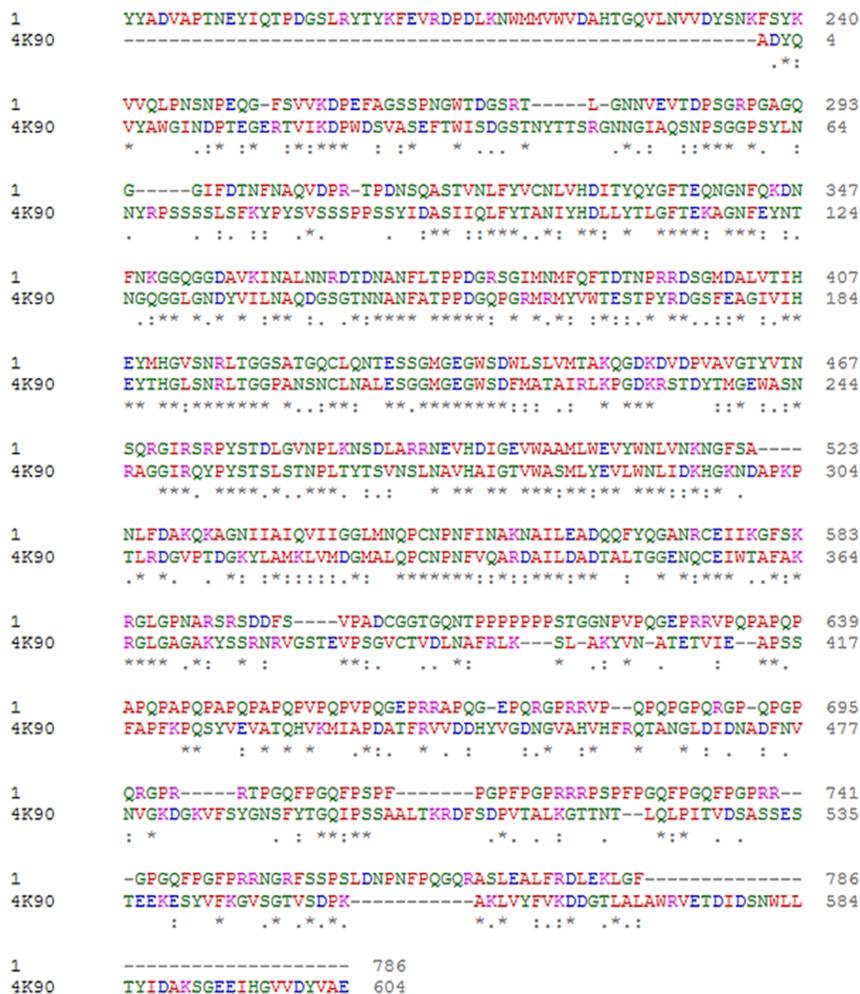


Figura 6. Alineación de secuencia de fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 y fungalisina de *A. fumigatus*. El número 1 representa la fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 y 4k90 corresponde a la secuencia de fungalisina de *A. fumigatus*. Los asteriscos indican identidad, los dos puntos representan sustituciones conservadas y el punto indica una sustitución semiconservada. Los colores representan las características de aminoácidos según la Omega Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

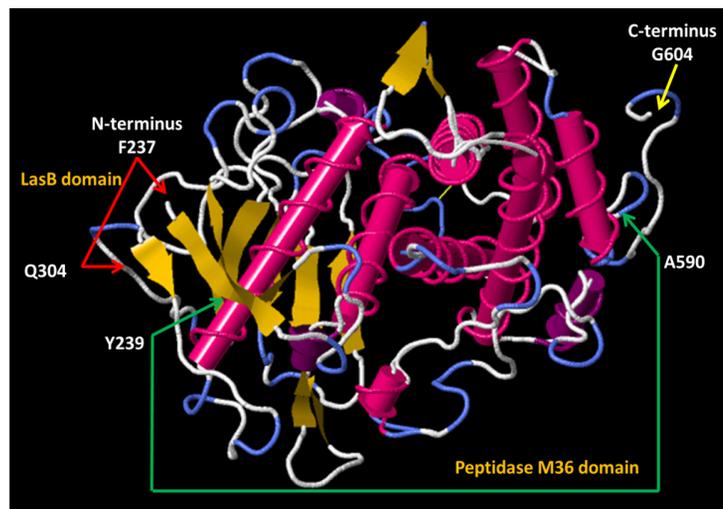


Figura 7. Modelo 3D de fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81. Se indican los extremos N-terminal (F237) y el residuo C-terminal G604 (flecha amarilla). Las flechas amarillas son hojas beta y los tubos rosas son hélices. Se determinan dos dominios, el dominio LasB (F237-Q304, flechas rojas) está relacionado con las metaloproteasas dependientes del zinc, y el dominio peptidasa M36 (Y239-A590, flechas verdes) es típico de las fungalisinas.

4 Discusión

4.1 Morfología de *B. dendrobatidis* EV001

La *B. dendrobatidis* tiene una primera etapa que consiste en una zoospora flagelada que coloniza la piel de la anura. Posteriormente, las zoosporas de *B. dendrobatidis* se convierten en talos esféricos que producen nuevas zoosporas reproducidas asexualmente dentro de las células epidérmicas de la piel de la rana, y luego se liberan zoosporas infecciosas en la superficie de la piel (Greenberg, Palen y Mooers, 2017; Kilpatrick, Briggs y Daszak, 2010). Es importante analizar este microorganismo en la medida en que sea relevante para comprender los patógenos emergentes que se diseminan rápidamente (cosmopolitas), además de su naturaleza agresiva hacia los anuranos (Rosenblum y col., 2009). Las interacciones entre anuras y *B. dendrobatidis* no se comprenden completamente (De León y col., 2019).

Cabe señalar que el zoosporangio de *B. dendrobatidis* tiene una estructura refractiva y una abundante presencia de zoosporas en análisis de montaje húmedo (Robinson y col., 2020; Berger y col., 1998). Los portaobjetos con azul de lactofenol eran similares a los portaobjetos húmedos. El azul de lactofenol es un agente de tinción a base de azul metílico y lactofenol, el primer componente sirve como colorante de quitina micótica y el lactofenol (fenol, ácido lác-

tico, glicerol, agua) es un medio de montaje (Leck, 1999). El rojo congo ha demostrado ser una excelente herramienta para la identificación de *B. dendrobatidis*, que actúa de manera similar al azul de lactofenol al teñir la quitina fúngica (Slifkin y Cumbie, 1988). Las características de *B. dendrobatidis* EV001 corresponden a las observaciones hechas por expertos: presencia de zoosporas, zoosporangio refractivo o tubo de descarga, entre otros (Briggs y Burgin, 2004; Berger y col., 1998).

4.2 Método de crioconservación de *B. dendrobatidis*

Al mismo tiempo, se aplicaron análisis para la crioconservación tales como pruebas de prácticas asepticas mediante técnicas como el almacenamiento a temperatura criogénica con DMSO al 5%. Un mes después se llevó a cabo el procedimiento de descongelación utilizando el medio TGh. Se determinó que el agitado con el contenedor hacia abajo (tapa abajo) fue positivo para el crecimiento de *B. dendrobatidis* EV001, junto con los matraces de sellado de cultivo y su mantenimiento en condiciones asepticas de laboratorio. Se evaluaron otros crioprotectores: 10% de leche de la piel, 10% de DMSO con caldo TGhL y 10% de DMSO con caldo TGhL y 10% de FBS. Estos ensayos se realizaron utilizando un congelador a -80°C y nitrógeno líquido. La evaluación destacó

una mejor recuperación con DMSO y FBS a los 4-5 días usando congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultado que fue similar para el nitrógeno líquido a los 7-14 días (Boyle y col., 2003).

Cabe destacar que no se emplearon antibióticos para evitar la contaminación microbiana, lo que reduce la selección artificial (Brem, Parris y Padgett-Flohr, 2013). Estos resultados a menudo se pueden lograr con el uso estricto de condiciones asépticas que implican un conjunto de seguridad biológica y la esterilización de material, entre otros procedimientos. El medio de crecimiento también puede contaminarse debido a la triptona, que es la mayor fuente nutricional de los microorganismos. Por lo tanto, se observó contaminación de *Penicillium sp.* y *Bacillus sp.* en nuestro trabajo. Otros autores han descrito que la manipulación de *B. dendrobatidis* requiere un examen periódico de matraces y viales para minimizar el impacto de las variables de contaminación, y que es necesario desarrollar un conjunto apropiado de pasos (al menos cada 14-21 días en agar, al menos cada 4-5 meses en caldo, y almacenamiento a $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Boyle y col., 2003). Se sugiere el uso de lactosa (Flechas y col., 2012), sin embargo, no fue necesario en nuestro estudio. El medio TGH es ideal porque la *B. dendrobatidis* crece mejor en la triptona o en la leche peptonizada, y no requiere azúcares adicionales, pues la *B. dendrobatidis* sintetiza las proteasas que pueden degradar la caseína y la gelatina (Piotrowski, Annis y Longcore, 2004).

Por otra parte, la solución salina débil sustituye al agua de los estanques como medio natural de *B. dendrobatidis* (Boyle y col., 2003). En este trabajo, se omitió una solución salina débil sin efectos sobre la recuperación de *B. dendrobatidis*. Por lo tanto, se dice que cuando se modifican las condiciones ambientales y fisicoquímicas para este microorganismo, como se ha visto en los medios de cultivo, se pueden producir cambios en el tamaño del zoosporangio (Garcés y col., 2003). En cuanto a las observaciones de los estadios del ciclo de *B. dendrobatidis*, se observó una formación de zoosporangio joven (proceso de germinación), que se puede determinar en el tubo de descarga en caldo de triptona al 1% relacionado con la humedad para la liberación de zoosporas; los tubos más largos se pueden observar en medios líquidos, sin embargo, la liberación de zoosporas debe ocurrir en medios sólidos.

Los requisitos de zoosporangio en la piel de la rana pueden ser variables e impredecibles en la ocurrencia, sin embargo, *B. dendrobatidis* puede ser viable usando caldo de triptona al 1%, y se pueden observar sus rizoides con rojo congo (Berger y col., 2005). Este enfoque puede ser particularmente eficaz para laboratorios más pequeños, especialmente aquellos con recursos limitados, y puede ser muy útil en el estudio de *B. dendrobatidis* si se aplican buenas prácticas de microbiología.

4.3 El análisis bioinformático de la fungalisina

Los genes relacionados de la fungalisina de *B. dendrobatidis* (aproximadamente 25) se expresan principalmente en el zoosporangio (76%) y sólo un pequeño porcentaje se expresa en la zoospora (Rosenblum y col., 2008). Se ha descrito la estructura experimental 3D de una fungalisina de *A. fumigatus* (AfuMep) y se han encontrado parámetros relevantes para estos factores de virulencia, tales como presencia de propéptidos que eliminan las proteasas huéspedes (residuos 19-245), y el dominio catalítico C-terminal (residuos 245-634) que degradan las proteínas de la matriz extracelular (elastina y colágeno). Se encontró que la fungalisina pertenece a las metaloproteasas de zinc M36. En este artículo se describe la fungalisina como una proteína no glicosilada de 68 kDa que contiene una señal catalítica HEXXH para el reconocimiento de átomos de zinc, que implica 12 alfa-hélices (35%) y 22 hojas beta (12%).

La fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 cumple con los requisitos de la familia M36 relativos al peso molecular (85 kDa), la eliminación de hélices y láminas, la señal metaloproteasa HEXXH, y un residuo de R470, considerado como el elemento importante en el plegado, y la actividad catalítica de esta enzima, porque las elastasas y las termolisinas tienen un ion de calcio cerca del ion de zinc (16 \AA) del sitio catalítico y tienen la capacidad de proteger la enzima de la autólisis. La AfuMep y la fungalisina de *B. dendrobatidis* JAM81 tienen una R470 que protege estos factores de virulencia (Fernández y col., 2013).

Los mecanismos que subyacen al proceso de la quitridiomycosis no están completamente claros, sin embargo, se han presentado varias hipótesis (Berger y col., 2005). La susceptibilidad de la rana a *B.*

dendrobatidis está relacionada con la forma en que los anfibios toman su agua directamente a través de la piel, preservando la homeostasis animal, y reflejando el hecho de que la *B. dendrobatidis* inhibe los canales de sodio que están relacionados con la quitridiomycosis. Se determinó que la rana transporta sodio al plasma, por lo que los canales epiteliales de sodio y su influencia en los riñones de anfibios son importantes en este proceso, y existe un deterioro de la función cardíaca antes de la muerte (Campbell y col., 2012). El *B. dendrobatidis* es un patógeno no específico, y no afecta a todas las especies de anfibios por igual (Strauss y Smith, 2013) posiblemente debido a la microbiota cutánea o péptidos antimicrobianos, y podría desempeñar un papel importante en la defensa contra los hongos (Flechas y col., 2013; Berger, Speare y Hyatt, 1999). El *B. dendrobatidis* tiene hospederos y reservorios alternativos como nematodos y cangrejos de río, pero las infecciones en otros vertebrados no son letales (Rosenblum y col., 2010; Strauss y Smith, 2013).

5 Conclusión

Este trabajo muestra una descripción de *B. dendrobatidis* EV001 como introducción a un método de criopreservación modificado, que sería una contribución significativa para los laboratorios centrados en esta área; de igual forma, se añade un modelo teórico de fungalisina como contribución para comprender los factores de virulencia de este patógeno de anura.

Agradecimientos

Los autores agradecen a S. Flechas y a la Universidad de Los Andes (Bogotá-Colombia) por brindar las cepas de *B. dendrobatidis* EV001. Este proyecto no ha recibido financiación de alguna institución, o el sector privado.

Referencias

Berger, L., R. Speare y A. Hyatt (1999). «Declines and disappearances of Australian frogs». En: *Environment Australia*. Cap. Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions, págs. 23-33.

- Berger, L. y col. (1998). «Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.15, 9031-9036. Online: <https://bit.ly/3wrwXea>.
- Berger, L. y col. (2005). «Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*». En: *Diseases of aquatic organisms* 68.1, 51-63. Online: <https://bit.ly/3kX4oQp>.
- Boyle, D. y col. (2003). «Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes». En: *Diseases of aquatic organisms* 56.1, 59-64. Online: <https://bit.ly/3NbJU2p>.
- Brem, F., M. Parris y G. Padgett-Flohr (2013). «Re-isolating *Batrachochytrium dendrobatidis* from an amphibian host increases pathogenicity in a subsequent exposure». En: *PLoS One* 8.5, e61260. Online: <https://bit.ly/3w3BioN>.
- Briggs, C. y S. Burgin (2004). «Congo Red, an effective stain for revealing the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in epidermal skin scrapings from frogs». En: *Mycologist* 18.3, 98-103. Online: <https://bit.ly/3L16jhf>.
- Campbell, C. y col. (2012). «Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis». En: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44.3, 431-434. Online: <https://bit.ly/3P9bcZ7>.
- De León, M. y col. (2019). «*Batrachochytrium dendrobatidis* infection in amphibians predates first known epizootic in Costa Rica». En: *PLoS One* 14.12, e0208969. Online: <https://bit.ly/3FFjRhA>.
- Duellman, W. (1988). «Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American tropics». En: *Annals of the Missouri Botanical Garden* 14.2, 79-104. Online: <https://bit.ly/3Fz8AiC>.
- Fernández, D. y col. (2013). «A functional and structural study of the major metalloprotease secreted by the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*». En: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69.10, 1946-1957. Online: <https://bit.ly/38f3lso>.
- Fisher, M. y T. Garner (2020). «Chytrid fungi and global amphibian declines». En: *Nature Reviews Microbiology* 18.6, 332-343. Online: <https://go.nature.com/3svcXpL>.
- Flechas, S. y col. (2012). «Surviving chytridiomycosis: differential anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* activity in bacterial isolates from three

- lowland species of *Atelopus*». En: *PloS one* 7.9, e44832. Online: <https://bit.ly/3yvN4d3>.
- Flechas, S. y col. (2013). «Characterization of the first *Batrachochytrium dendrobatidis* isolate from the Colombian Andes, an amphibian biodiversity hotspot». En: *EcoHealth* 10.1, 72-76. Online: <https://bit.ly/3w5GrfO>.
- Flechas, S. y col. (2017). «Current and predicted distribution of the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Colombia, a hotspot of amphibian biodiversity». En: *Biotropica* 49.5, 685-694. Online: <https://bit.ly/3yvFDmn>.
- Garcés, E. y col. (2003). *Morfología y clasificación de los hongos*. Unibiblos.
- Green, D., M. Gray y D. Miller (2010). «Amphibian Ecology and Conservation: A handbook of techniques». En: Oxford, University Press. Cap. Disease monitoring and biosecurity, págs. 481-501.
- Greenberg, D., W. Palen y A. Mooers (2017). «Amphibian species traits, evolutionary history and environment predict *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns, but not extinction risk». En: *Evolutionary applications* 10.10, 1130-1145. Online: <https://bit.ly/3N8RBXa>.
- Kilpatrick, A., C. Briggs y Pe. Daszak (2010). «The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians». En: *Trends in ecology & evolution* 25.2, 109-118. Online: <https://bit.ly/37DRhk2>.
- Leck, A. (1999). «Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts». En: *Community Eye Health* 12.30, 24. Online: <https://bit.ly/3sse8pT>.
- Lindauer, A. y col. (2019). «Quantifying *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* viability». En: *EcoHealth* 16.2, 346-350. Online: <https://bit.ly/3ssGwrl>.
- Lynch, J., P. Ruiz-Carranza y M. Ardila-Robayo (1997). «Biogeographic patterns of Colombian frogs and toads (Patrones biogeográficos de las ranas y los sapos de Colombia)». En: *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 21.N80, págs. 237-248.
- McDonald, C. y col. (2020). «Gene expression varies within and between enzootic and epizootic lineages of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in the Americas». En: *Fungal Biology* 124.1, 34-43. Online: <https://bit.ly/3MiCXME>.
- OIE-World Organization for Animal Health (2012). «Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals». En: World Organization for Animal Health. Cap. Infection with *Batrachochytrium dendrobatidis*. Págs. 1-18.
- Piotrowski, J., S. Annis y J. Longcore (2004). «Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians». En: *Mycologia* 96.1, 9-15. Online: <https://bit.ly/3ssugYC>.
- Richmond, J. y col. (2009). «Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity». En: *Bioscience* 59.4, 311-320. Online: <https://bit.ly/37DWCb4>.
- Robinson, K. y col. (2020). «Isolation and maintenance of *Batrachochytrium salamandrivorans* cultures». En: *Diseases of aquatic organisms* 140, 1-11. Online: <https://bit.ly/3kYRy3Y>.
- Rosenblum, E. y col. (2008). «Global gene expression profiles for life stages of the deadly amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.44, 17034-17039. Online: <https://bit.ly/39V13yY>.
- Rosenblum, E. y col. (2009). «Genome-wide transcriptional response of *Silurana* (*Xenopus*) tropicalis to infection with the deadly chytrid fungus». En: *PloS one* 4.8, e6494. Online: <https://bit.ly/3ssXneg>.
- Rosenblum, E. y col. (2010). «A molecular perspective: biology of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*». En: *Diseases of aquatic organisms* 92.2-3, 131-147. Online: <https://bit.ly/3w46Jzj>.
- Rueda-Almonacid, J., J. Lynch y A. Amézquita (2004). *Libro Rojo de los Anfibios de Colombia*. Conservación Internacional Colombiana.
- Scheele, B.C. y col. (2019). «Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity». En: *Science* 6434.363, 1459-1463. Online: <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>.
- Slifkin, M. y R. Cumbie (1988). «Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi». En: *Journal of Clinical Microbiology* 26.5, 827-830. Online: <https://bit.ly/3L3Poe8>.
- Sluijs, A. Spitzen-van der y col. (2017). «Fragile coexistence of a global chytrid pathogen with amphibian populations is mediated by environment and demography». En: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284.1864, 20171444. Online: <https://bit.ly/3suffHQ>.
- Strauss, A. y K. Smith (2013). «Why does amphibian chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) not occur everywhere? An exploratory study in

- Missouri ponds». En: *PloS one* 8.9, e76035. Online: <https://bit.ly/3Pcpc45>.
- Vásquez-Ochoa, A. y col. (2012). «Detección y cuantificación de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios de las regiones andina central, oriental, Orinoquia y Amazonia de Colombia». En: *Herpetotropicos* 8.1-2, 13-21. Online: <https://n9.cl/qd3q4>.
- Velásquez, E. y col. (2008). «Infección por el hongo quitrido *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cordillera occidental de Colombia». En: *Herpetotropicos* 4.2, 65-70. Online: <https://n9.cl/wrh4y>.
- Vredenburg, V. y col. (2010). «Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions». En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.21, 9689-9694. Online: <https://bit.ly/3Nd79Jv>.