



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

Comparación experimental de métodos
de extracción del ADN de
Aspergillus fumigatus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ LUCIA GONZALEZ MALDONADO

ASESORAS:

M. en C. IDALIA CARMEN AVILA MIYAZAWA
DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

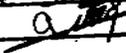
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Beatriz Lucía
González Maldonado

FECHA: 14 de septiembre de 2005

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Comparación experimental de métodos de extracción
del ADN de Aspergillus fumigatus

que presenta la pasante: Beatriz Lucía González Maldonado
con número de cuenta: 9401651 - 2 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2005

PRESIDENTE	<u>QFI. Andrea Becerril Osnaya</u>	<u>Andrea Becerril Osnaya</u>
VOCAL	<u>MC. Idalia Carmen Avila Miyazawa</u>	<u>Idalia Carmen Avila Miyazawa</u>
SECRETARIO	<u>MC. Marina L. Morales Galicia</u>	<u>Marina L. Morales Galicia</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	<u>Susana E. Mendoza Elvira</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFI. Ma. Elena Mondragón Esquivel</u>	<u>Ma. Elena Mondragón Esquivel</u>

**A todos aquellos que confían en su fuerza interna y
mantienen su fe inquebrantable hasta el final . . .**

México, Pumas, Universidad

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto: IN211703.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme las puertas al conocimiento.

A la M. en C. Idalia Ávila y a la Dra. Gabriela Barcenás, por sus palabras de aliento, enseñanzas y dedicación para el desarrollo del presente trabajo.

A la M. en C. Alma Virginia Lara Sagahon, por el gran apoyo y el tiempo brindado para la realización de la parte estadística.

A la QFB María Eugenia Rosales, por todo el tiempo y paciencia durante mi estancia en el laboratorio de Inmunología.

A mi familia, a mis amigos y a mi pareja (*amor est vitae essentia*), por ser una gran inspiración para seguir adelante cada día.

Índice

	Hoja
Lista de Abreviaturas	i
Índice de Figuras, Gráficas y Tablas	iii
Resumen	v
1. Generalidades	1
1.1 Características de las principales especies de <i>Aspergillus</i>	1
1.1.1 Morfología colonial y microscópica del <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
1.2 Aspectos clínicos de la aspergilosis	5
1.2.1 Manifestaciones clínicas	6
1.2.2 Diagnóstico y tratamiento	8
1.2.3 Prevención	10
1.2.4 El sistema inmune y la aspergilosis	10
1.3 Biología molecular del <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.3.1 Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.3.2 La extracción del ADN de <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
2. Justificación	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. Materiales y métodos	22
4.1 Diagrama de flujo general	22
4.2 Resiembra y cosecha del <i>A. fumigatus</i>	23
4.3 Descripción de los métodos elegidos para la extracción de ADN fúngico	23
4.4 Determinación de la pureza y concentración del ADN de <i>A. fumigatus</i>	28

4.5	Corrimiento electroforético de las muestras de ADN	29
4.6	Comparación de la temperatura de almacenamiento de las muestras de ADN	29
4.7	Análisis estadístico de los resultados obtenidos	29
5.	Resultados	30
5.1	Métodos de extracción de ADN de hongos filamentosos aplicados a <i>A. fumigatus</i>	30
5.2	Determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN	32
5.3	Análisis de los rendimientos promedio obtenidos en cada método	32
5.4	Análisis de la pureza de ADN de cada método de extracción	38
5.5	Correlación del rendimiento con la pureza de cada método	45
5.6	Evaluación de las muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa	46
5.7	Efecto de la temperatura en la conservación de las muestras de ADN de <i>A. fumigatus</i>	48
6.	Discusión	51
7.	Conclusiones	57
8.	Referencias	59
9.	Anexos	64

Lista de Abreviaturas

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm
ABPA	Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica
AC	Aspergilosis Cutánea
AcK	Acetato de Potasio
AcNa	Acetato de Sodio
AcNH ₄	Acetato de Amonio
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AI	Aspergilosis Invasiva
AIA	Alcohol Isoamílico
BAL	Lavado broncoalveolar (Broncoalveolar Lavage)
BE	Buffer de Extracción
BTE	Buffer de Tris HCl-Borato-EDTA
CA	Citosina-Adenina
ChI	Cloroformo
CMN	Células Mononucleadas
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetil Amonio
CV	Coefficiente de Variación
DEM	Desviación Estándar Muestral
DNAsa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad Óptica
EDTA	Etilendiamino Tetraacetato Sódico
ELISA	Inmunoensayo asociado a enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
g	Gramos
g	Gravedades (unidad de centrifugación que relaciona las rpm con el radio del rotor de la centrifuga)
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
M	Concentración Molar
MA	Macrófagos Alveolares
MEA	Agar Extracto de Malta (Malt Extract Agar)
µg	Microgramos

mg	Miligramos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
mtDNA	ADN mitocondrial
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
P	Valor de Probabilidad
pb	Pares de Bases
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PDA	Agar Dextrosa Papa (Potato Dextrose Agar)
Phe	Fenol Equilibrado
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
rDNA	ADN ribosomal
RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar)
SDB	Caldo Dextrosa Sabouraud (Sabouraud Dextrose Broth)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
TAMO	Trasplante Alogénico de Médula Ósea
TCAR	Tomografía Computarizada de Alta Resolución
TE	Buffer de Tris HCl-EDTA
TGI	Tracto Gastrointestinal
USA	Estado Unidos de Norteamérica
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Índice de Figuras, Gráficas y Tablas

	Hoja
Figuras	
1.1 Esquema de la cabeza aspergilar de <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
5.1 Corrimientos electroforéticos de las muestras de ADN de <i>A. fumigatus</i> extraídas por el método 6 (Panel A) y por el método 8 (Panel B)	47
Gráficas	
5.1 Rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de <i>Aspergillus fumigatus</i>	35
5.2 Pureza promedio de cada método de extracción de ADN de <i>Aspergillus fumigatus</i>	41
5.3 Correlación del rendimiento con la pureza de cada método de extracción de ADN de <i>Aspergillus fumigatus</i>	45
Tablas	
1.1 Datos históricos del género <i>Aspergillus</i> (Denning, D., et al, 2002; Kwon-Chung, K., 1992; Rippon, J., 1990)	2
1.2 Características de la morfología colonial y microscópica de las especies más comunes de <i>Aspergillus</i> (Larone, D., 1987)	3
4.1 Métodos reportados para la extracción del ADN de <i>Aspergillus fumigatus</i> en orden cronológico	24
5.1 Clasificación de los métodos de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> de acuerdo al tipo de lisis	31
5.2 Clasificación de los métodos de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> de acuerdo al grado de dificultad	31
5.3 Valores de DO a 260 nm y 280 nm, relación de DO ₂₆₀ /DO ₂₈₀ y concentración de ADN en µg/µL de las muestras obtenidas por triplicado utilizando el método 14.	32
5.4 Rendimiento promedio (µg de ADN/g de muestra de hongo) con DEM* y CV** de cada triplicado de los métodos de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> .	33
5.5 Comparación del rendimiento promedio experimental de cada método con los valores reportados por los autores	34
5.6 Análisis de varianza de un factor ($p < 0.05$) para los rendimientos promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	36

5.7	Comparación del rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> por medio de la Prueba de Tukey ($p < 0.05$)	37
5.8	Comparación del rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	38
5.9	Pureza promedio (A_{260}/A_{280}) de los triplicados de cada método con DEM* y CV** para los métodos de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	39
5.10	Comparación de la pureza promedio (A_{260}/A_{280}) de cada método con los valores reportados por los autores	40
5.11	Análisis de varianza de un solo factor ($p < 0.05$) para la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	42
5.12	Comparación de la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i> mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$)	43
5.13	Comparación de la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	44
5.14	Análisis de varianza de la correlación del rendimiento con la pureza	45
5.15	Comparación de las concentraciones inicial y después de un mes de almacenamiento a 4° C y -20° C (con la DEM*) de cada método de extracción de ADN de <i>A. fumigatus</i>	48
5.16	Análisis de varianza para determinar el efecto del método de extracción y el efecto de la temperatura de conservación de las muestras ADN de <i>A. fumigatus</i> , considerando como variables al método y a la temperatura ($p < 0.05$)	49
5.17	Comparación y diferencias promedio de las concentraciones inicial y después de un mes de almacenamiento a 4° C y a -20° C de las muestras ADN de <i>A. fumigatus</i> ($p < 0.05$)	50

Resumen

La aspergilosis, enfermedad emergente en personas inmunosuprimidas, ha tenido un gran impacto en receptores de trasplante de médula ósea y de órganos sólidos. Existen técnicas rutinarias de diagnóstico que no han mostrado resultados efectivos; actualmente, la detección del ADN de *A. fumigatus* ha surgido como una herramienta para el auxilio del diagnóstico. La obtención del ADN fúngico puro y en cantidad suficiente para su estudio es imprescindible para utilizarse en las diversas técnicas de biología molecular.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue realizar la evaluación experimental de métodos de extracción del ADN de *A. fumigatus* reportados en la literatura.

De una revisión bibliográfica se eligieron 12 métodos de extracción de ADN fúngico, los cuales se llevaron a cabo por triplicado; mediante espectrofotometría se determinó el rendimiento y la pureza de cada uno de los extractos de ADN fúngico obtenidos, y se realizó un análisis estadístico para encontrar diferencias significativas entre los métodos evaluados.

Los extractos de ADN fueron almacenados a 4° C y a -20° C durante un mes para observar el efecto de la temperatura en la conservación de las muestras. Finalmente, se realizaron corrimientos electroforéticos en gel de agarosa al 0.7% de las muestras obtenidas para observar la integridad del ADN obtenido.

Los métodos basados en lisis enzimática, presentaron los mejores valores de rendimiento, un alto grado de pureza y una fácil realización en un periodo corto; los métodos basados en la lisis por sonicación, también mostraron buenos resultados en rendimiento y pureza; sin embargo, son de larga realización, impidiendo la extracción de muestras simultáneamente y dependen de la disponibilidad del equipo; mientras que los métodos por lisis mecánica-química, térmica-mecánica-química y térmica-química, tuvieron rendimiento y pureza bajos.

Los corrimientos electroforéticos mostraron una integridad aceptable del ADN obtenido por los diferentes métodos. La concentración y estabilidad de las muestras de ADN fúngico son ligeramente afectadas después de un mes de conservación independientemente de la temperatura de almacenamiento (4° C o -20° C).

Se concluye que los métodos 8 y 14 basados en lisis enzimática pueden ser utilizados en la extracción del ADN de *A. fumigatus* y servir de apoyo al diagnóstico de la aspergilosis utilizando la técnica de la PCR.

1. Generalidades

*Duda siempre de ti mismo,
hasta que los datos no dejen lugar a dudas.
(Luis Pasteur)*

La importancia de las infecciones fúngicas ha aumentado en los últimos años; los cambios demográficos y en la tecnología, el uso diverso de la tierra, los viajes interculturales, la interrupción de las medidas de salud pública, el incremento del número de hospederos susceptibles y la evolución de la resistencia fúngica son situaciones que propician el desarrollo de infecciones fúngicas. La población en hospitales es más susceptible a padecerlas, debido a las condiciones intrínsecas del paciente, tales como la granulocitopenia, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), trasplante, trauma o quemaduras graves, debilidad o malnutrición severas; así como por la inmunosupresión originada por la quimioterapia, el tratamiento con corticosteroides o con otros inmunosupresores (Dixon, D., et al, 1996).

Entre las infecciones fúngicas emergentes más importantes se encuentra la aspergilosis. Este término involucra una serie de entidades clínicas de tipo oportunista que incluyen manifestaciones alérgicas, superficiales e invasivas, causadas por algunas especies del género *Aspergillus* (Bonifaz, A., 1994).

1.1 Características de las principales especies de *Aspergillus*

La familia *Aspergillaceae* está compuesta por más de 180 especies (Abarca, L., 2000); se trata de un género mitospórico que presenta estado imperfecto, por lo que se engloba en la subdivisión *Deuteromycotina*; muy pocas especies, como el *A. nidulans* presentan un estado de reproducción sexual, estas se incluyen en la subdivisión *Ascomycotina* (Bonifaz, A., 1994).

El género *Aspergillus* fue reconocido en 1729 por el sacerdote Micheli, botánico florentino, quien observó su parecido con el aspergilo, instrumento que le servía para rociar (del latín "*aspergillum*" que significa rociar o aspergir) y lo describió en *Nova Plantarum Genera* (Bonifaz, A., 1994; Kwon-Chung, K., 1992; Rippon, J. 1990; Denning, D., et al, 2002). Desde esta fecha, se han suscitado diversos acontecimientos respecto a la historia de este hongo (Tabla 1.1, pág. 2).

Tabla 1.1 Datos históricos del género *Aspergillus* (Denning, D., et al, 2002; Kwon-chung, K., 1992; Rippon, J., 1990)

AÑO	ACONTECIMIENTO
1729	Micheli reconoce el género <i>Aspergillus</i>
1842	Primeros casos en una granja en Edimburgo
1859	Cramer observa a <i>A. niger</i> en infección ótica
1863	Fresenius reconoce la especie <i>A. fumigatus</i>
1887	Se reconoce la enfermedad alérgica
1890	Siebermann registra la presencia de <i>A. flavus</i> y <i>A. nidulans</i> en la otomicosis
1897	Rénon publica una revisión de aspergilosis y observa la relación entre los pacientes afectados y su trabajo en granjas alimentando cerdos
1938	Deve define las bolas fúngicas (aspergiloma pulmonar)
1939	Henrici describe 2 endotoxinas de <i>A. fumigatus</i> , una hemolítica y otra pirogénica
1953	Rankin (Gloucester, Inglaterra) describe la aspergilosis invasiva en un paciente que murió de anemia aplásica
1960	Se legaliza a la anfotericina B como antifúngico en el tratamiento de la aspergilosis
1965	Raper y Fennell publican <i>The genus Aspergillus</i> , donde aceptan 132 especies divididas en 18 grupos
1970 - 1982	Aumentan los casos de aspergilosis por alteración del sistema inmune (trasplante y cáncer)
1980 a la fecha	Se eleva el número de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y aspergilosis, como entidad oportunista
1999	Ingreso al mercado del itraconazol, segunda opción terapéutica

La mayoría de las especies de este género conciernen al humano en varios aspectos; *A. nidulans* ha sido uno de los organismos modelo que ha contribuido enormemente a la comprensión de la genética, al poseer un estado sexual que es factible de análisis meiótico. El *A. niger*, uno de los pocos hongos con utilidad industrial, se emplea para la producción de ácido cítrico y en la expresión heteróloga de enzimas, aunque también es patógeno ocasional del humano. *A. oryzae* es utilizado en el noreste de Asia, en la producción de sake y otros alimentos fermentados. Por otro lado, *A. flavus* es un notable patógeno tanto de humanos como de plantas y es un productor de aflatoxinas, la principal micotoxina en comestibles; otras especies se han considerado como productoras de alérgenos y de micotoxinas, incluyendo a *A. clavatus* y *A. versicolor* (Brookman, J. y Denning, D., 2000).

Las especies del género *Aspergillus* se caracterizan por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán a las conidias. El conidióforo característico de *Aspergillus* es una estructura unicelular que posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, llamadas fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se designan como uniseriadas, mientras que aquellas que presentan fiálides y métulas, son biseriadas (Abarca, L., 2000; Kwong-Chung, K., 1992). La Tabla 1.2 muestra las principales características morfológicas de las especies de *Aspergillus* más comunes.

Tabla 1.2 Características de la morfología colonial y microscópica de las especies más comunes de *Aspergillus* (Larone, D., 1987)

ESPECIE	PATOGENICIDAD	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
<i>A. niger</i>	Contaminante; causa enfermedad en la debilidad inmunológica	Negro - marrón; reverso incoloro; granular a flocosa	Cabeza conidial biseriada; vesícula esférica; conidias globosas muy rugosas
<i>A. flavus</i>	Asociado con la producción de aflatoxinas (micotoxicosis)	Verde; reverso blanco; lanosa a flocosa	Cabezas uni y biseriadas; vesícula esférica y cubierta por métulas; conidias elipsoidales, rugosas o lisas
<i>A. terreus</i>	Raramente causa enfermedad	Marrón; reverso blanco; aterciopelada o flocosa, con surcos radiales	Cabezas biseriadas, vesículas de forma variable con métulas sólo en la mitad; conidias lisas
<i>A. nidulans</i>	Raramente causa enfermedad	Verde oscuro; reverso incoloro a naranja; aterciopelada, plana o con surcos	Cabeza biseriada; vesículas hemisféricas con métulas sólo en la parte superior; conidias esféricas y rugosas

1.1.1 Morfología colonial y microscópica del *Aspergillus fumigatus*

El *A. fumigatus* es el agente etiológico más común de la aspergilosis y uno de los miembros principales del género; es la especie termofílica y oportunista más común presente en el aire (Denning, D., et al, 2002). Este hongo filamentoso

infecta varios sitios debido a la debilidad intrínseca en el sistema inmune o a alteraciones provocadas por el tratamiento inmunosupresor; su elevada esporulación permite concentraciones de 1 - 100 conidias/m³ en el aire (Larone, D., 1987; Latgé, J., 2003).

A. fumigatus crece en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), Agar Dextrosa Papa (PDA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Czapek Dox, aunque es comúnmente encontrada como contaminante en los medios de cultivo. Esta especie es termofílica, ya que puede crecer a 55° C y mantenerse viable a 70° C, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 25° C y los 28° C (Bonifaz, A., 1994; Abarca, L., 2000; Kwong-Chung, K., 1992).

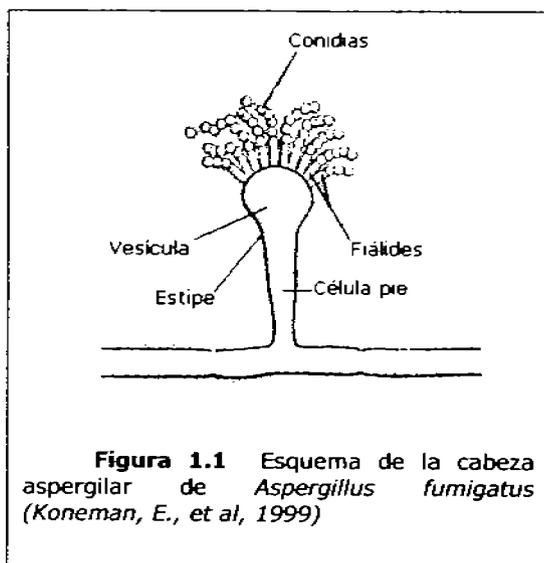
Las colonias se desarrollan en 5 días, alcanzando de 3 a 5 cm. La textura de la colonia es aterciopelada a flocosa, plana o con surcos radiales y no posee un borde bien definido; presenta un color verde-azulado a verde-grisáceo, aunque en ocasiones muestra un halo micelial blanco alrededor de la colonia; al reverso de ella, raras veces se observa un pigmento ocre (Bonifaz, A., 1994). Los aislamientos clínicos pueden dar lugar a colonias más flocosas y blanquecinas porque tienen una menor esporulación. Se han descrito siete variedades en esta especie, aunque no todas han sido aceptadas (Abarca, L., 2000).

La cabeza aspergilar de *A. fumigatus* mide de 20 a 50 µm y está formada por hifas reproductivas que presentan conidióforos cortos no ramificados, no septados, ligeramente pigmentados o incoloros y lisos. El conidióforo se alarga en la punta para formar una vesícula piriforme, de cuya mitad superior nacen fiálides que miden de 80 a 100 µm de diámetro cada una (Kwong-Chung, K. 1992).

La fiálide puede tener un núcleo o más; cada uno de ellas se reduce en el ápice para formar un tubo productor de conidias. El núcleo se divide en la fiálide, pasa al tubo conidial y un septo se origina para separar la primera conidia. La producción repetida de conidias de cada fiálide resulta en una cadena de esporas con la más antigua en la punta y la más joven en el botón (cadena basipétala) (Kwong-Chung, K. 1992).

Las conidias producidas son verdes, lo que determina el color de la cabeza conidial, y son redondas (1 a 2 µm), lisas o ligeramente rugosas, además de ser muy hidrofóbicas y fácilmente llevadas por el aire cuando maduran (Bonifaz, A., 1994; Kwong-Chung, K. 1992).

La figura 1.1 muestra un esquema de las partes principales de la cabeza aspergilar de *A. fumigatus*.



1.2 Aspectos clínicos de la aspergilosis

La aspergilosis es una enfermedad cosmopolita; en cualquier población, la inhalación excesiva de esporas u otros componentes de *A. fumigatus*, pueden producir pneumonitis por hipersensibilidad. En un principio, se relacionaba con la ocupación; las personas que se dedicaban al manejo de granos, alimento y reproducción de aves, entre otras, inhalaban diferentes cantidades de esporas que saprofitaban estos productos y desarrollaban alergia a pesar de tener un sistema inmune funcional (Brookman, J. y Denning, D., 2000; Patterson, R., 1997).

Las diversas especies del género *Aspergillus* son importantes hongos contaminantes del medio ambiente; se aíslan frecuentemente del aire, tierra, materia orgánica en descomposición, paredes de refrigeradores y de construcciones, bolsas de diálisis rotas, lentes de contacto, medicamentos abiertos, líquidos para aseo, ductos de aire, plantas y en especial, de alimentos contaminados (Bonifaz, A., 1994; Rippon, J., 1990).

La aspergilosis, como infección oportunista, puede estar ligada a diversos factores predisponentes; los pacientes con alto riesgo de padecerla son aquellos

con un elevado grado de desnutrición, con diversos tipos de cáncer (linfomas, leucemias, carcinomas o mielomas), pacientes con SIDA o los receptores de trasplante alogénico por la inmunosupresión a la que son sometidos (Brookman, J. y Denning, D., 2000).

1.2.1 Manifestaciones clínicas

La principal vía de ingreso al organismo es la respiratoria, pues el tamaño de las conidias es lo suficientemente pequeño para alcanzar los alvéolos pulmonares, aunque también pueden ingresar por heridas expuestas, el tracto gastrointestinal (TGI), los ojos y los oídos. Las entidades clínicas de la aspergilosis han sido bien definidas y se clasifican en:

- i) formas pulmonares: se clasifican de acuerdo al sitio afectado del tracto respiratorio y a la colonización e invasión micelial; incluyen a la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilomas y aspergilosis invasiva (AI);
- ii) formas superficiales: comprenden a la aspergilosis cutánea (AC), ótica y oftálmica (Kwon-Chung, K., 1992; Bonifaz, A., 1994; Latgé, J., 1999).

Los síntomas que caracterizan a las formas pulmonares son tos constante, expectoración mucopurulenta, hemoptisis leve o grave, fiebre moderada, disnea, astenia y adinamia (Bonifaz, A., 1994; Kwon-Chung, K., 1992).

La ABPA es la complicación alérgica más severa y se define como la consecuencia de la reacción crónica inflamatoria por la inhalación de las esporas del medio ambiente (Bonifaz, A., 1994; Wark, P. y Gibson, P., 2001). El *Aspergillus* ocasiona la enfermedad por la liberación de alérgenos, factores de virulencia y proteasas. Los factores de virulencia liberados provocan

- i) deterioro del aclaramiento mucociliar,
- ii) disminución de la acción fungicida de las proteínas y el complemento en el fluido de las vías aéreas,
- iii) inhibición de la fagocitosis y de la capacidad de fagocitar de los macrófagos y neutrófilos,
- iv) degradación de las proteínas de la matriz extracelular (Wark, P. y Gibson, P., 2001).

La ABPA sigue el mismo curso que el asma clásica, con infiltrados pulmonares transitorios ocasionados por el aumento de inmunoglobulinas (IgE e IgG) y eosinófilos que se manifiestan como rinitis, alveolitis y asma, presentándose también rinorrea, edema de la mucosa nasal, estornudos constantes, lagrimeo y prurito nasal (Latgé, J., 1999; Wark, P., Gibson, P., 2001; Bonifaz, A., 1991). Los infiltrados proceden a bronquiectasis pulmonar y, en pacientes no tratados, prosigue de fibrosis pulmonar a fallo respiratorio (Latgé, J., 1999). El intercambio de gases puede ser normal, aunque se reduce con el transcurso de la enfermedad y no hay un criterio temprano que indique si el paciente perderá la función pulmonar (Kwon-Chung, K., 1992).

Los aspergilomas, también referidos como bolas fúngicas, se producen por la aspiración constante de esporas; en un inicio, el hongo invade espacios pulmonares previamente causados por tuberculosis, sarcoidosis, abscesos, histoplasmosis o carcinomas, hasta dar origen a masas de micelio compacto embebidas en moco con estructuras esporulantes en la periferia (Latgé, J., 1999). El aspergiloma genera irritación bronquial y obstrucción pero no invade tejidos; algunos autores afirman que es el resultado de la aspergilosis alérgica crónica. La hemoptisis puede ser masiva y fatal; el paciente es asintomático y el aspergiloma se detecta por radiografías realizadas para evaluar otra enfermedad alérgica. Si un aspergiloma se rompe espontáneamente, se puede formar otro en el mismo sitio (Kwon-Chung, K., 1992; Bonifaz, A., 1994).

La AI, una forma clínica de reciente aumento en su frecuencia, ocurre persistentemente en pacientes con neutropenia (enfermedad granulomatosa crónica, lupus eritematoso sistémico, leucemia aguda, SIDA y quemaduras) y en aquellos que reciben altas dosis de corticosteroides, como los receptores de trasplante alogénico de médula ósea (TAMO) y de órganos sólidos (Denning, D., 1998; Buckingham, S. y Hansell, D. 2003). La infección fúngica nosocomial ha estado asociada con la construcción en el área inmediata al hospital y con sistemas de ventilación contaminados (Paya, C. 1993).

La AI se inicia por la inhalación de esporas, dando origen a lesiones pulmonares crónicas; con el proceso avanzado, se genera trombosis, bronconeumonía hemorrágica y necrosis localizada, por lo que la infección puede avanzar a otros órganos, tales como bazo, TGI, sistema nervioso central (SNC) y corazón (Bonifaz, A., 1994; Denning, D., 1998).

La AC es muy poco frecuente y por lo tanto permanece pobremente caracterizada; se puede clasificar como:

- i) AC primaria: incluye la infección de los sitios de catéter intravenoso, infecciones asociadas con adhesivos (cintas y preparaciones oclusivas), con heridas de quemaduras, quirúrgicas y traumáticas;
- ii) AC secundaria: implica infecciones causadas por extensión directa de la primaria y lesiones embólicas (Van Burik, J., et al 1998).

Los individuos más susceptibles a desarrollar AC son los pacientes con VIH, con quemaduras, los neonatos, los individuos con cáncer y receptores de órganos sólidos y de TAMO. También pacientes saludables pueden desarrollar AC, por exposición a elevados niveles de esporas o heridas quirúrgicas, aunque las infecciones son raras (Van Burik, J., et al 1998).

Diferentes especies de *Aspergillus* pueden saprofitar el conducto auditivo externo sin invasión, especialmente cuando está húmedo. Los pacientes presentan disminución en la audición, picazón, dolor y flujo en el canal auditivo; la otoscopia revela crecimiento verdusco o negro borroso. En los ojos, donde sí hay invasión del tejido se observa queratitis y endoftalmitis, que se generan después de traumatismo o cirugía del globo ocular (Bonifaz, A., 1994).

1.2.2 Diagnóstico y Tratamiento

La ABPA es un síndrome difícil de diagnosticar; los criterios clásicos para el diagnóstico definitivo son asma, eosinofilia periférica, reactividad inmediata en la piel a extractos antigénicos de *A. fumigatus*, niveles elevados de IgE total, historia de infiltrados pulmonares y bronquiectasis central. Estos criterios son raramente encontrados en un paciente y no se observan al mismo tiempo, por lo que no son específicos (Latgé, J., 1999; Wark, P. y Gibson, P., 2001). Para el tratamiento de ABPA se han utilizado corticosteroides que suprimen la respuesta inflamatoria provocada por el *A. fumigatus*, aunque se requieren periodos de tratamiento muy prolongados con altas dosis (Greenberger, P., 2002; Malo, J., 2003). La inmunoterapia, que incluye antiproteinasas, antagonistas de interleucina (IL) 8, inhibidores de las enzimas de los neutrófilos y la IL-10, aún está en estudio (Wark, P. y Gibson, P.; 2001).

El diagnóstico del aspergiloma es usualmente presuntivo y se basa en encuentros radiológicos y de tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) logrando demostrar estados tempranos de aspergiloma y puede utilizarse cuando la radiografía no es concluyente. Las opciones de tratamiento para el aspergiloma dependen de la sintomatología, la severidad de la enfermedad pulmonar y la condición general del paciente. La resección quirúrgica provee el mejor resultado, pero pocos pacientes son candidatos convenientes a cirugía porque la mayoría tienen la enfermedad avanzada. Otras estrategias son paliativas e involucran el control de la hemotipsis (Buckingham, S. y Hansell, D. 2003).

El diagnóstico de la AI se ha apoyado en diversas técnicas tales como:

- i) la histología, pero la biopsia no puede ser obtenida de pacientes inmunocomprometidos (Williason, E. y Lenning, J. 1999),
- ii) la detección de anticuerpos por inmunodifusión, radioinmunoensayo, inmunoensayo asociado a enzimas (ELISA) (Becker, M., et al, 2000, Bretagne, S., et al, 1998), hemaglutinación pasiva e inmunotransferencia, aunque no son confiables en el diagnóstico temprano (Andriole, V. 1993),
- iii) las pruebas de gabinete (rayos X y TCAR) (Denning, D. 2000).

Cuando se da tratamiento no es muy efectivo, reflejándose en una mortalidad excedente al 65% (Denning, D. 2000; Williason, E. y Lenning, J. 1999). La anfotericina B es el apoyo principal para el tratamiento de la AI, pero ocasiona toxicidad en médula ósea y riñón; si se administra junto con ciclosporina, la nefrotoxicidad aumenta y puede confundirse con rechazo. El itraconazol oral también es de gran utilidad ya que ha demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* (Paya, C. 1993; Walsh, T. y Lee, J. 1993; Sionov, E., Segal, E., 2003).

La AC puede detectarse por biopsia del tejido dañado, aunque en la mayor parte de los casos el diagnóstico se realiza en una fase tardía, cuando la resección es necesaria. Un resultado efectivo en el tratamiento del paciente quemado con aspergilosis involucra agentes antimicóticos intravenosos y tópicos, y en algunos casos, la amputación del miembro afectado; el itraconazol ha sido exitosamente usado en el tratamiento de la AC. El tratamiento de la aspergilosis ótica consiste en el lavado cuidadoso del canal auditivo externo con peróxido de hidrógeno y el uso de un agente tópico para reducir la inflamación (Van Burik, J. et al. 1998).

1.2.3 Prevención

Para una buena profilaxia, es necesario identificar primero los factores de riesgo; aquellos pacientes con factores predisponentes específicos deben ser monitoreados cuidadosamente. La prevención en la diseminación de esporas en el ambiente hospitalario es una estrategia para reducir la aspergilosis nosocomial. La utilización de flujo laminar ha sido estudiada y se encontró que reduce la incidencia de aspergilosis; los filtros high-efficiency particulate air (HEPA) reducen aún más la incidencia de AI. También se han utilizado pequeñas dosis de itraconazol vía oral y anfotericina B intranasal, observándose una disminución en la frecuencia de AI en pacientes neutropénicos, receptores de trasplante y en curso de quimioterapia; sin embargo, el riesgo de padecer o sufrir una recaída de aspergilosis sigue siendo alto (Paya, C. 1993; Walsh, T. y Lee, J. 1993).

1.2.4 El sistema inmune y la aspergilosis

La aspergilosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los pacientes inmunocomprometidos y la segunda causa de infecciones fúngicas más comunes. La arquitectura celular completa es desconocida, pero el análisis químico sugiere que contiene principalmente glucano, quitina y galactomanana, siendo esta última el principal componente antigénico del hongo (Latgé, J., 2001).

Cuando las conidias son llevadas por el aire, son inhaladas y transferidas a través del tracto respiratorio a los alvéolos, donde, si no son rápidamente eliminadas por el aclaramiento mucociliar, se enlazan a las células del epitelio respiratorio. Si el pulmón es dañado por la terapia inmunosupresora, se facilita el enlace de las conidias y se reducen la eficacia antimicrobiana de los péptidos y proteínas de la superficie epitelial (Latgé, J., 2003).

Mientras están unidas al epitelio, la colonización o la invasión dependen del nivel de defensas del hospedero; *A. fumigatus* puede colonizar las vías aéreas y las cavidades, más tarde invadirá el tejido pulmonar. El ataque del hongo al tejido implica el reconocimiento del ligando galactomanana-proteína en la superficie de la célula huésped, o a un componente de la membrana del epitelio o endotelio, tal como el fibrinógeno, laminina o fibronectina (Roilides, E., et al, 1998).

Durante la germinación de la conidia ocurre la producción de varias enzimas, incluyendo las proteasas y fosfolipasas; la penetración de las barreras alveolares y la invasión al tejido pueden ser acompañadas por varios mecanismos

- i) las proteasas digieren las uniones intercelulares,
- ii) las fosfolipasas hidrolizan la membrana celular,
- iii) puede ocurrir una disrupción mecánica de la célula por la ingestión de la conidia, que permanece viable y germinando (Roilides, E., et al, 1998).

Dos líneas de defensa son responsables de la inmunidad innata del hospedero contra *A. fumigatus*, los macrófagos alveolares (MA) y los neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Los MA ingieren conidias inhaladas y las destruyen, previniendo la germinación y la invasión. Estos fagocitos, al no poseer la capacidad de producir metabolitos dependientes de oxígeno, tienen actividad fagocítica potente y mecanismos no oxidativos antifúngicos. La muerte de la conidia empieza de 6 – 8 h después de la fagocitosis, la velocidad de la muerte es lenta, con solo un 10 % o menos en la reducción de la viabilidad de la conidia (Latgé, J., 2001).

Los MA son capaces de reconocer y enlazar conidias en ausencia de opsoninas; las enzimas como la elastasa y proteasa, producidas por *A. fumigatus* juegan un papel importante en el intento del hongo por sobrevivir a la fagocitosis o para cruzar las membranas y barreras anatómicas (Roilides, E., et al, 1998).

Los PMN, la segunda línea de defensa, y las células mononucleadas (CMN), son llamados al sitio de infección; las conidias que escapan a los MA son destruidas por éstas células, previniendo el establecimiento de la enfermedad invasiva. Cuando los PMN son defectuosos, las CMN sustituyen algunas de sus funciones, de tal forma que el daño a la función de los MA, combinado con defectos cualitativos o cuantitativos (neutropenia) de los PMN, resulta en la invasión de tejido y parece ser la principal razón del desarrollo de la AI (Latgé, J., 2003).

En el hospedero normal las citocinas (factor de necrosis tumoral α , el interferon γ y la IL-12) contribuyen a la respuesta natural contra las infecciones de *Aspergillus*; el daño a su producción, ocasionado por la inmunodepresión, puede favorecer al crecimiento y propagación del hongo (Roilides, E., et al, 1998; Latgé, J., 2001).

En el paciente con alteraciones inmunológicas, los macrófagos poseen mecanismos de fagocitosis defectuosos. Los corticosteroides inhiben las actividades antifúngicas de las CMN, los PMN y los MA, evitando la interacción entre los lisosomas y la membrana fagocítica, permitiendo que la conidia germine dentro del MA y lo elimine (Lalgé, J., 2001). La ciclosporina A, un agente inmunosupresor ampliamente utilizado en los trasplantes, afecta la defensa fagocítica contra *A. fumigatus*, al suprimir su actividad contra la destrucción de hifas; si se combina con corticosteroides induce una inmunosupresión importante (Roilides, E., et al, 1998).

1.3 Biología molecular del *Aspergillus fumigatus*

Las limitaciones de las técnicas de cultivo, histológicas y de gabinete han dado origen a la búsqueda de técnicas de biología molecular que auxilien al diagnóstico, tipificación del hongo y al análisis relacionado con la patogenia de la aspergilosis (Chen, S., et al, 2002).

Los estudios moleculares y genéticos del *Aspergillus* se han centrado en tres especies; *A. nidulans* es la mejor estudiada, también se ha investigado al *A. niger*, y al *A. fumigatus*, que no ha sido bien caracterizado; a partir de los modelos utilizados para el *A. nidulans* se han realizado algunas comparaciones entre estas dos especies (Brookman, J y Denning, D. 2000).

La secuenciación del genoma del *A. fumigatus* comenzó en 2001, por un grupo de científicos que involucra al Institute Wellcome Trust Sanger, The Institute for Genomic Research, la Universidad de Salamanca, la Universidad Complutense, el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid y el Instituto Pasteur (Denning, D. et al 2002; Wortman, J., et al, 2004). El aislado clínico utilizado para la secuenciación y el análisis del genoma del *A. fumigatus* fue el AF293, considerado de un tamaño total de 14300 pares de bases (pb) y 9544 genes; solamente 4300 de ellos se han estimado como funcionales (Kim, H., et al, 2004; Nierman, W. et al, 2004; Brookman, J y Denning, D. 2000; www.aspergillus.man.ac.uk).

1.3.1 Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de *Aspergillus fumigatus*

Las técnicas que mayor impacto han tenido en el estudio del *A. fumigatus* son: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), los

patrones de bandeo originados por la restricción enzimática (RFLP, Restriction Fragments Length Polymorphism), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA) y los microsatélites (Brookman, J y Denning, D. 2000; Williamson, E. y Lenning, J. 1999).

La PCR se basa en el uso de la ADN polimerasa para generar copias idénticas, llamadas amplicones, a partir de un ADN blanco que es flanqueado por medio de oligonucleótidos cebadores, tanto en la dirección 3' como en la 5'; el primer paso consiste en la desnaturalización de la cadena de ADN nativo mediante la elevación de la temperatura (92° C - 95° C); posteriormente, la temperatura disminuye (50° C - 55° C) para que se unan los cebadores a las zonas complementarias del ADN desnaturalizado. En el último paso del ciclo, la temperatura aumenta (70° C - 72° C) para que la ADN polimerasa pueda elongar a los iniciadores y genere una cadena de ADN idéntica a la del ADN blanco. Este ciclo se puede repetir hasta un máximo de 40 veces para obtener una buena cantidad de amplicones (Perera, J., et al, 2002). Los iniciadores más comúnmente utilizados en la PCR del ADN de *A. fumigatus* son aquellos que enlazan regiones altamente conservadas del gene 18 S del rDNA (Hebart, H., et al, 2000; Skladny, H., et al, 1999; Zhao, F., et al, 2001).

La muestra de mayor utilidad para detectar AI por PCR es la sangre total, debido a que la sensibilidad de la técnica en plasma es más baja (Löeffler, J., et al, 2000). Otra muestra que también se ha utilizado en la PCR, es el lavado broncoalveolar (BAL, bronchoalveolar lavage), aunque en algunos pacientes es inadecuada y difícil la toma de muestra de este espécimen (Chen, S., et al, 2002; Skladny, H., et al, 1999).

A partir de la PCR, se han desarrollado otras técnicas basadas en ella, tales como la PCR-anidada (nested-PCR) (Zhao, F., et al, 2001; Kawamura, S., et al, 1999; Skladny, H., et al, 1999), la PCR enlazada a ELISA (PCR linked ELISA) (Löeffler, J., et al, 2000; Einsele, H., et al, 1997) y la PCR en tiempo real (Real Time PCR) (Costa, C., et al, 2002; Kabir, S., et al, 2003), las cuales se han utilizado en menor proporción en la investigación de *Aspergillus*.

El RFLP es otro método utilizado en la tipificación de *A. fumigatus*; las enzimas que han mostrado utilidad son la Sal I, Xho I y Xba I (Lin, D., et al, 1995; Rinyou, E., et al, 1995). El análisis de RFLP consume mucho tiempo, requiere grandes

cantidades de ADN y la electroforesis, transferencia e hibridación lleva más de 5 días para un número limitado de muestras (Bart-Delabesse, E., et al, 1998; Varga, J. y Tóth, B., et al, 2003).

El RAPD es el método comúnmente utilizado para la tipificación de cepas de *A. fumigatus*, el desarrollo de huellas génicas de los aislados de las cepas y es de gran utilidad en estudios epidemiológicos (Rinyu, E., et al, 1995). Durante el RAPD, un iniciador sencillo es usado para amplificar fragmentos de ADN a temperatura baja de alineamiento y los productos de amplificación se analizan por electroforesis. Este método ofrece la ventaja de que se realiza rápidamente, permitiendo el estudio de varios aislados en pocos días y puede generar sondas especie-específicas usadas en la tipificación de aislados del hongo. La desventaja es que cada iniciador posee un poder discriminatorio diferente; además, el análisis llega a ser complicado por el gran número de bandas y geles. A la fecha, el iniciador R108 (GTATTGCCCT) brinda la mejor diferenciación de cepas, aunque otros iniciadores y sus combinaciones también han dado resultados satisfactorios (Lin, D., et al, 1995; Varga, J. y Tóth, B., et al, 2003).

La búsqueda de microsatélites, repeticiones de pares de bases en tandem, es otra técnica aplicada a la genotipificación del *A. fumigatus*. Estos marcadores genéticos altamente polimórficos son lo suficientemente cortos para ser analizados por PCR, combinada con electroforesis y evitando la necesidad de hibridación (Varga, J. y Tóth, B., et al, 2003). El método es rápido y, en contraste al RAPD, usa iniciadores únicos y secuencias específicas flanquean al microsatélite. Cuatro citosina-adenina (CA) repetidos que muestran poder discriminatorio para *A. fumigatus* han sido identificados a la fecha: (CA)₉, (CA)₂₅, (CA)₂C(CA)₂₃, (CA)₈ y (CA)₂₁ (Bart-Delabesse, E., et al, 1998).

1.3.2 La extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus*

Los métodos de detección de ácidos nucleicos han llegado a ser una herramienta común en la identificación y diagnóstico microbiológico. El primer paso para su desarrollo es la extracción exitosa de ADN a partir de la muestra problema, ya que se eliminan sustancias presentes en el material biológico que son a menudo desconocidas y pueden interferir en el manejo del material genético (Chen, S., et al, 2002).

Los métodos para extracción de ADN fúngico han sido probados en cultivo puro, sangre inoculada con esporas del hongo, muestras clínicas (sangre completa, plasma, suero o BAL) y cultivos expuestos al ambiente (Velegraki, A., et al, 1999; Samarrai, T., Schmid, J., 2000).

De manera general, los hongos filamentosos ofrecen resistencia a los procedimientos comunes de extracción de ADN por la presencia de la pared de quitina que es difícil de romper, las nucleasas, los polisacáridos, los pigmentos y las proteínas, que, además de obstaculizar el proceso de extracción, contaminan y alteran el extracto de ADN (Müller, F., et al, 1998).

Los métodos que se han utilizado en la extracción del ADN del *A. fumigatus* han sido tanto comerciales como caseros; los kits comerciales tienen la ventaja de que son rápidos, aunque su costo es elevado (Löeffler, J., et al, 1997). Los métodos caseros son relativamente económicos, aunque en su mayoría son de realización difícil, larga y con riesgo de contaminación, lo que disminuye su utilidad en el laboratorio clínico, donde se requiere procesar numerosas muestras (Cenis, J., 1992; Graham, G., et al, 1994; Van Burik, J., et al, 1998).

1.3.3.1 Kits comerciales para la extracción de ADN

Diferentes kits de extracción de ADN de células humanas han sido probados en la extracción del ADN fúngico; Löeffler, J. y colaboradores (1997) compararon los kits QIAmp Tissue (QIAGEN, Estados Unidos de Norteamérica, USA), GeneReleaser (BioVentures, USA), DNA Puregene D 6000 (Gentra, USA), Dynabeads DNA DIRECT (DynaL, Noruega) y DNAzol (Molecular Research Center, USA), previo un tratamiento enzimático para la formación de esferoplastos, utilizando sangre inoculada con diferentes concentraciones de esporas de *A. fumigatus*; los autores concluyen que el ADN extraído con el QIAmp Tissue tiene un rendimiento y pureza similar al método enzimático utilizado. Sin embargo, las diferencias del tiempo de realización son muy grandes, reportando que para los kits va de 3 a 5 h, mientras que para el método casero es de más de 8 h, aunque el costo por muestra trabajada es mucho más elevado si se utilizan los kits (Löeffler, J., et al, 1997).

El QIAmp Tissue utiliza una columna cuya membrana adsorbe específicamente al ADN mientras que los contaminantes pasan a través de ella. Los cationes divalentes y las proteínas, inhibidores de procesos posteriores (como la PCR), son

completamente removidos en dos pasos de lavado y el ADN es eluido en agua o en buffer. El kit ha sido exitosamente usado en la extracción de ADN genómico, mitocondrial y viral desde sangre y otros fluidos. Su utilización en hongos filamentosos ha resultado buena (Löeffler, J., et al, 1997; www.qiagen.com).

El GeneReleaser permite la rápida extracción de ADN y ácido ribonucleico (ARN); está compuesto de materiales poliméricos que facilitan la liberación de ADN de células o cualquier otro material. Al igual que el anterior, segrega durante la lisis a los inhibidores y a los agentes que interfieren con la amplificación. El GeneReleaser logra la lisis de la muestra directamente en el tubo de amplificación en el termociclador y el tiempo se puede disminuir si se utiliza un protocolo para microondas. Las muestras de origen incluyen sangre, esputo y muestras de biopsias. Löeffler demostró que posee la misma sensibilidad que el QIAmp y el método casero, aunque el ADN fúngico extraído con este kit presentó impurezas en el corrimiento electroforético (Löeffler, J., et al, 1997; www.bioventures.com).

El kit de purificación de DNA Puregene D 6000 utiliza lisis enzimática para digerir la pared celular; después de la precipitación de las proteínas, se hidrata al ADN. El tiempo de realización para muestras de sangre inoculadas con *A. fumigatus* es de aproximadamente 5 h, con una sensibilidad mucho menor que la reportada para el QIAmp (Löeffler, J., et al, 1997; www.gentra.com).

El Dynabeads DNA DIRECT es un kit diseñado para la separación sencilla y rápida de ADN genómico de alta calidad. El proceso de separación de ADN se realiza después de la lisis celular y la adsorción del ADN a la superficie de la columna del Dynabeads. Posteriormente, se realiza la separación magnética del complejo DNA-Dynabeads y un lavado para remover cualquier residuo que pueda ser contaminante potencial en la PCR. El complejo es resuspendido y el ADN puede ser eluido de los Dynabeads seguido de una incubación a 65° C. El tiempo de realización es de 4 h y su costo es 10 veces mayor que el del método enzimático utilizado (Löeffler, J., et al, 1997; www.dynalbiotech.com).

El DNAzol es un kit que permite la separación de ADN genómico a partir de muestras líquidas o sólidas de origen animal, humano o vegetal. El procedimiento está basado en un nuevo detergente de guanidina que hidroliza el ácido ribonucleico (RNA) y promueve la precipitación selectiva del ADN del lisado celular. Löeffler demostró que el ADN fúngico extraído con este kit es

relativamente impuro y que su tiempo de realización es de 4 horas (Löeffler, J., et al, 1997; www.mrcgene.com).

1.3.3.2 Métodos caseros de extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus*

Los métodos caseros que resultan exitosos en la extracción del ADN de *A. fumigatus* generalmente incluyen una combinación de las diferentes técnicas de ruptura de la pared y membrana celulares, como la lisis enzimática, química, mecánica o térmica (Bainbridge, B., et al, 1990). Los principales protocolos de extracción utilizan sustancias con una toxicidad intrínseca muy fuerte, en el Anexo 9.4 (pág. 67) se muestra un glosario con los efectos de toxicidad de las sustancias más comúnmente utilizadas en los procedimientos de extracción de ADN.

Algunos de estos compuestos como el fenol y el cloroformo son indispensables porque provocan la ruptura de la pared al precipitar y solubilizar a las proteínas y otros componentes; por lo tanto, el ADN se mantendrá en la fase acuosa de la solución y podrá ser purificado por precipitación después de la separación de las fases. El método clásico de extracción orgánica con estos compuestos es muy largo debido a que la preparación previa del fenol para mantenerlo equilibrado (a pH constante) y libre de impurezas, consume tiempo y no siempre se lleva a cabo con éxito (Anexo 9.3.1, pág. 64). La elaboración correcta del fenol es imprescindible para lograr que la extracción del ADN sea buena (Müller, F., et al, 1998; Sambrook, J. y Russell, D., 2001).

La lisis enzimática se ha probado en la extracción del ADN de hongos filamentosos; las enzimas más utilizadas son las β -1,3-glucanasas, como la zimolasa y la liticasa; estas enzimas hidrolizan los polímeros de glucosa en los enlaces β -1,3-glucano para formar esferoplastos (células con restos de pared celular) o protoplastos (células desprovistas totalmente de pared celular) que son osmóticamente inestables. Una vez que se forman los esferoplastos, la liberación del ADN del núcleo se lleva a cabo por medio de algún agente químico como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y posteriormente se purifica por precipitación con etanol (Scott, J. y Schekman, R., 1980; Kitamura, K., et al, 1974).

Algunos métodos enzimáticos aplicados a la extracción del ADN de *A. fumigatus* utilizan la zimolasa en la ruptura de la pared, aunque esta enzima es de mayor utilidad en levaduras que en hongos filamentosos (Löeffler, J., et al, 1997). Por su parte, la liticasa ha demostrado efectividad en la formación de protoplastos

pues tiene una gran actividad contra la pared celular, además de que se evitan las impurezas encontradas en las preparaciones comerciales de zimolasa, tales como la β -1,3-gluconasa, proteasa, mananasa, amilasa, xilanasa, fosfatasa y trazas de DNasa (Van Burik, J., et al, 1998).

Un multicomponente enzimático, Novozyme 234, obtenido a partir de *Trichoderma harzianum* resultó de gran utilidad en la obtención de protoplastos; sin embargo, este producto ha sido discontinuado, por lo que algunos autores proponen sustituirlo por el Glucanex, una mezcla de β -glucanasas, que ha demostrado una efectividad similar a la del Novozyme 234 (Jung, K., et al, 2000).

La pulverización con nitrógeno líquido, un método de rompimiento inicial de la pared, es un ejemplo de lisis mecánica que ha mostrado rendimientos elevados. El micelio seco y congelado, obtenido a partir de un cultivo en medio líquido, se pone en contacto con el nitrógeno líquido y se pulveriza en un mortero o con ayuda de un aparato homogenizador. Este método puede resultar peligroso para la persona que lo realiza si no se realiza con extremo cuidado o bajo el resguardo de una campana de flujo laminar. La lisis de la pared por este método puede aplicarse a muestras clínicas, aunque su realización es muy larga, y provocaría un retraso grande en la extracción y en el diagnóstico, donde es necesario tratar un número de muestras elevado (Müller, F., et al, 1998; Bainbridge, B., et al, 1990).

La lisis mecánica de la pared celular también se puede lograr por la velocidad de choque y el grado de colisión entre las células del hongo y alguna superficie de contacto, como las perlas de vidrio o las propias paredes del tubo en el que se encuentre el micelio. Sin embargo, se ha demostrado que la lisis mecánica no es efectiva si se emplea sola, por lo que se apoya en otras formas de lisis para romper la pared y separar el ADN del lisado. Así, se pueden aplicar largos periodos de vortexing o sonicación para provocar la colisión y aumentar la velocidad de choque entre las partículas, en presencia de detergentes como el SDS o el bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB), de tal forma que se asegure la ruptura de la pared celular del hongo (Van Burik, J., et al, 1998).

La extracción del ADN por medio de la ruptura térmica de la pared celular consiste en sumergir el micelio suspendido en un buffer de lisis, en nitrógeno líquido para facilitar el congelamiento; inmediatamente se coloca en baño de agua a punto de ebullición para provocar el descongelamiento brusco. Este ciclo de

congelación-descongelación se efectúa en varias ocasiones para asegurar la lisis. El cambio de temperatura tan violento provoca el shock térmico de la membrana celular, de tal manera que la pared celular queda debilitada y así será susceptible a la ruptura química. Este procedimiento no requiere el uso de sustancias como el fenol, pues el shock térmico provoca la desnaturalización de las proteínas y la liberación del ADN se logra con sustancias menos tóxicas. Sin embargo, los ciclos de congelación-descongelación deben repetirse tantas veces como sea necesario para asegurar la lisis, por lo que este procedimiento se puede prolongar demasiado (Bainbridge, B., et al, 1990; Samarraí, T. y Schmid, J., 2000).

Aunque la lisis química es más exitosa para la extracción de ADN de bacterias, levaduras y células humanas, se ha intentado utilizarla en hongos filamentosos con algunos fallos. El CTAB, es un detergente catiónico muy utilizado en la extracción en plantas, que libera el ADN de las proteínas por solubilización de la membrana celular. El ADN y el CTAB forman un complejo, que se puede separar por los lavados posteriores. Este detergente se ha utilizado en la extracción de ADN del *Aspergillus*, mostrando cierto grado de éxito (Velegraki, A., et al, 1999). Otra sustancia utilizada que ha mostrado resultados interesantes es el cloruro de bencilo, el cual separa el ADN de los polisacáridos gracias a su reacción con los grupos hidroxilo residuales, con lo que el ADN obtenido es fácilmente liberado con una centrifugación sencilla (Zhu, H., et al, 1993).

2. Justificación

*La travesía de las mil millas comienza con un paso
(Lao Tse)*

La aspergilosis es una enfermedad emergente en personas inmunosuprimidas que ha tenido un gran impacto en receptores de trasplante de médula ósea y órganos sólidos, así como en pacientes con alteraciones hematológicas. La iniciación de la terapia antifúngica apropiada es esencial para reducir la morbilidad y mortalidad en estos pacientes además de lograr que su esperanza y calidad de vida aumente; el diagnóstico temprano de la enfermedad es un factor limitante para la aplicación de la terapia. Debido a que las técnicas diagnósticas de rutina no son efectivas en la aspergilosis, se ha estudiado la detección del ADN de *A. fumigatus* como un apoyo prometedor para el diagnóstico.

Anteriormente se ha descrito que la obtención de un ADN fúngico puro, libre de contaminantes y en cantidad suficiente para su estudio, es imprescindible para utilizarlo en las diversas técnicas de biología molecular y sea de provecho en el diagnóstico. No obstante, la mayoría de los métodos para la obtención del ADN son costosos, largos o de difícil realización; además de que se debe considerar la contaminación con carbohidratos, nucleasas y pigmentos.

Asimismo, es importante resaltar que para que un método se considere ideal, los costos de las sustancias a utilizar así como sus respectivas toxicidades deben de ser bajos, de tal forma que los desechos que se produzcan no sean altos para que los costos no se incrementen, y que la toxicidad, tanto de los materiales utilizados como de los desechos producidos, no sea elevada.

Por lo tanto, es importante comparar los diferentes métodos de extracción de ADN fúngico que se han utilizado para evaluar, bajo condiciones experimentales, sus características de rendimiento, pureza, reproducibilidad, grado de dificultad en su realización así como el tiempo para llevarlos a cabo. De esta forma, se podrá recomendar algún método que será probado, en trabajos futuros, en la extracción del ADN del hongo a partir de muestras clínicas y se utilice como método de rutina en el manejo del ADN y el diagnóstico de la aspergilosis.

3. Objetivos

Amor ingenii neminem unquam divitem fecit
(Petronio)

3.1 Objetivo general

Evaluar en forma experimental métodos de extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus* reportados hemerográficamente, comparando el rendimiento, la pureza y la complejidad de cada uno, eligiendo al más recomendable para que se pueda utilizar como método de rutina en la obtención del ADN necesario en el diagnóstico molecular de la aspergilosis.

3.2 Objetivos particulares

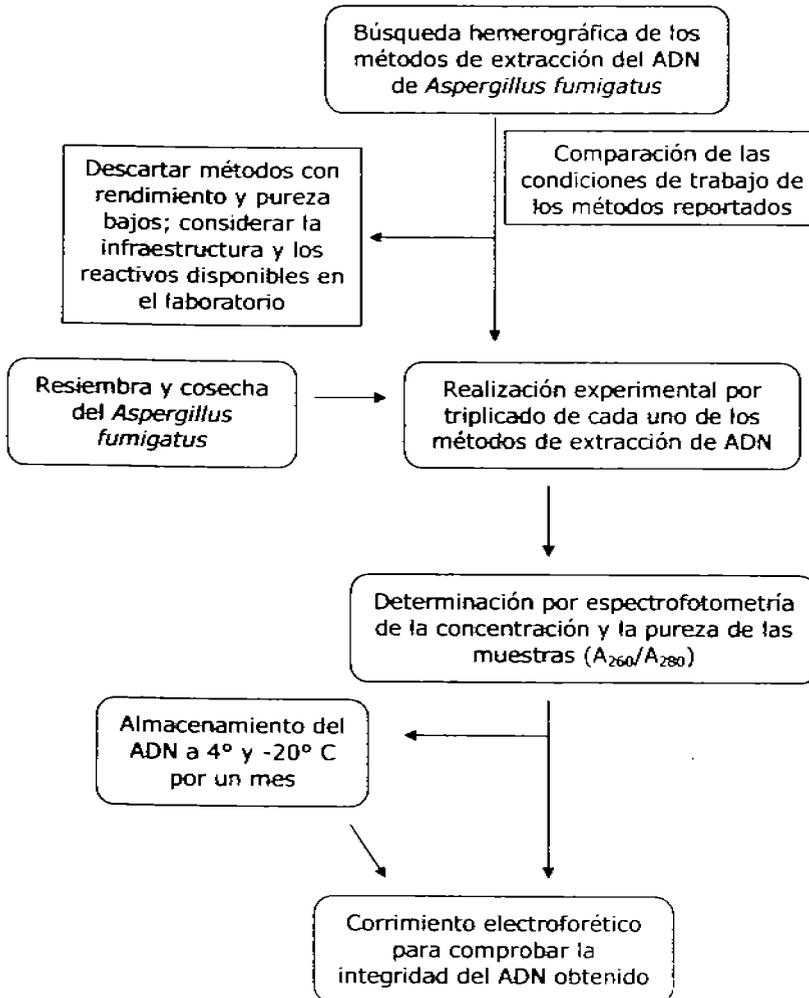
- 3.2.1 Realizar una revisión hemerográfica para obtener los métodos utilizados para la extracción del ADN de *Aspergillus spp.*
- 3.2.2 Comparar los métodos reportados con base a los criterios de tiempo de realización, rendimiento, pureza y disponibilidad de material y equipo, para elegir a aquellos que se llevarán a cabo experimentalmente.
- 3.2.3 Agrupar los métodos elegidos con base al tipo de lisis que utilizan.
- 3.2.4 Determinar mediante la realización experimental de los métodos, cual presenta un mayor rendimiento y mejor pureza en la extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus*.
- 3.2.5 Observar sobre gel de agarosa la integridad del ADN obtenido por los diferentes métodos de extracción.
- 3.2.6 Comparar el efecto de las temperaturas de almacenamiento del ADN a 4° C y a -20° C, para determinar cuál es la más adecuada para su conservación.

4. Materiales y métodos

Fata viam incipient
(Virgilio)

4.1 Diagrama de flujo general

Las etapas realizadas para llevar a cabo el presente trabajo de tesis se describen con detalle en los siguientes subcapítulos, las cuales se resumen en el diagrama de flujo que se presenta a continuación:



4.2 Resiembra y cosecha del *A. fumigatus*

La cepa de *A. fumigatus* (donación del Laboratorio de Micología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, InDRE) se resembró en tubos de SDA (Dibico, México; Anexo 9.1.1, pág. 64) por la técnica de sembrado por punto, este agar se utiliza como medio de mantenimiento o de crecimiento del *A. fumigatus*. Los tubos sembrados se colocaron en incubación durante 72 h a 30° C para permitir la esporulación del hongo; después de este periodo, se conservaron a 4° C hasta su uso. Una muestra de sembrado se examinó al microscopio con la tinción de azul de algodón (Anexo 9.2; pág. 64) para observar las clásicas cabezas conidiales del hongo.

Los tubos sembrados se utilizaron para obtener una suspensión de esporas con buffer salino de fosfatos (PBS, Anexo 9.3.2; pág. 65), con la que se inoculó el caldo dextrosa Sabouraud (SDB; Bioxon, México; Anexo 9.1.2; pág. 64) utilizándose 5 mililitros (mL) de la suspensión de esporas para 300 mL de caldo.

El caldo inoculado se incubó a 30° C por 48 h a 120 revoluciones por minuto (rpm) para permitir la esporulación del hongo; el micelio se separó por filtración al vacío en papel Whatman número 4 y se colocó en congelación por 72 h. Una vez congelado, el hongo fue distribuido en tubos eppendorf con espátula estéril, se pesó entre 50 y 55 miligramos (mg) de micelio en cada tubo; estos se almacenaron a -20° C hasta su uso.

4.3 Descripción de los métodos elegidos para la extracción de ADN fúngico

A partir de la búsqueda hemerográfica se lograron encontrar 17 métodos para la extracción del ADN de diferentes hongos, los cuales se resumen en la tabla 4.1 (pág. 24). Los primeros métodos descartados fueron el 1 (Spentch, C., et al, 1982), 2 (Garber, R. y Yoder, O., 1983) y 3 (Reader, U. y Broda, P., 1985) porque su tiempo de realización superaba las 50 h, además de que los dos primeros reportan un rendimiento muy bajo. El método 4 (Bainbridge, B., et al), y el 15 (Müller, F. et al), no fueron realizados debido a que se carecía de las enzimas quitinasa, β -glucuronidasa y del complejo enzimático Novozyme, que al término del presente trabajo sigue discontinuado.

Los métodos elegidos se ordenaron de acuerdo al rendimiento reportado para ser realizados por triplicado. Algunos de ellos fueron modificados para adecuarlos a las condiciones del laboratorio.

Tabla 4.1 Métodos reportados para la extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus* en orden cronológico

MÉTODO	REFERENCIA	% DE RENDIMIENTO	PUREZA (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1*	Spencht, C., et al, 1982	0.000425 - 0.00045	1.9 - 2.0
2*	Garber, R., Yoder, O., 1983	0.000416 - 0.00125	NR ⁺
3*	Reader, U., Broda, P., 1985	NR ⁺	1.9 - 2.0
4**	Bainbridge, B., et al, 1990	0.05 - 60	NR ⁺
5	Cenis, J., 1992	NR ⁺	NR ⁺
6	Zhu, H., et al, 1993	0.009 - 0.011	NR ⁺
7	Graham, G., et al, 1994	NR ⁺	1.85 - 1.92
8	Loeffler, J., et al, 1997	NR ⁺	NR ⁺
9	Van Burik, J., et al, 1998	0.072 - 0.074	1.6 - 1.7
10	Van Burik, J., et al, 1998	0.026 - 0.0453	0.77 - 1.554
11	Van Burik, J., et al, 1998	0.01 - 0.014	1.392 - 1.462
12	Van Burik, J., et al, 1998	0.011 - 0.012	1.446 - 1.478
13	Van Burik, J., et al, 1998	0.013 - 0.039	1.667 - 1.722
14	Van Burik, J., et al, 1998	0.010 - 0.020	1.564 - 1.643
15**	Müller, F., et al, 1998	NR ⁺	NR ⁺
16	Velegraki, A., et al, 1999	NR ⁺	NR ⁺
17	Samarral, T., Schmid, J., 2000	0.034 - 0.087	NR ⁺

+ NR No Reportado
 * Método descartado por su tiempo de realización largo
 ** Método descartado por no contar con las enzimas reportadas

4.3.1 Método 5 modificado (Cenis, J., 1992); lisis por sonicación

El micelio se sonicó 40 minutos en ciclos de 3 minutos y un minuto de descanso, en presencia de 1 mL de buffer de extracción (BE) (200 milimolar (mM) Tris pH 8.5, 250 mM cloruro de sodio (NaCl), 25 mM etilendiamino tetraacetato sódico (EDTA), 0.5 % SDS). Se adicionaron 600 microlitros (µL) de acetato de sodio (AcNa) 3 M pH 5.0 (Anexo 9.3.9; pág. 67) y se colocó 10 minutos a -20° C, para después centrifugarse en microcentrifuga (Biofuge pico, Kendro Sorvall, Alemania) por 15 minutos a 1584 X g (gravedades, unidad de centrifugación que

relaciona las rpm con el radio del rotor de la centrifuga) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol y se lavó con etanol al 70 % (Anexo 9.3.11; pág. 67) y se disolvió en 200 μ L de buffer Tris-EDTA (TE, Anexo 9.3.3; pág. 65). El volumen del sobrenadante se dividió en dos tubos nuevos para ser almacenados a 4° C o a -20° C durante un mes. Este último paso se llevó a cabo para todas las muestras de ADN obtenidas por cada método.

4.3.2 Método 6 (Zhu, H., et al, 1993); lisis química

El micelio se resuspendió en 250 μ L de BE (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 40 mM EDTA), 50 μ L SDS 10 % (Anexo 9.3.10; pág. 67) y 150 μ L cloruro de bencilo, y se agitó en vortex (Velp Scientifica, Italia) hasta que la mezcla se tornó lechosa. La preparación se incubó durante 30 minutos a 30° C y cada 5 minutos se retiró de la incubación para agitarla en vortex. Al término del periodo de incubación, se agregaron 150 μ L AcNa 3 M pH 5.0 y la solución se colocó en hielo durante 15 minutos; se homogenizó y centrifugó en microcentrifuga (Biofuge primo R, Kendro Sorvall, Alemania) a 4° C por 15 minutos a 6000 X g. El sobrenadante se colectó y el ADN se precipitó con isopropanol utilizándose 100 μ L TE para resuspenderlo.

4.3.3 Método 7 modificado (Graham, G., et al, 1994); lisis térmica-química

El micelio se sometió a 20 ciclos de congelación en nitrógeno líquido (1 minuto) – agitación en vortex (1 minuto) – reposo en agua a 80° C (1 minuto); se adicionaron 200 μ L de BE (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1.4 molar (M) NaCl, 20mM EDTA); y se mezcló por inversión suave, se incubó por 20 minutos a 55° C y centrifugó durante 5 minutos a 7826 X g. El sobrenadante se colectó y se adicionó un volumen de cloroformo (ChI) : alcohol isoamílico (AIA) (24:1, Anexo 9.3.6; pág. 66), se invirtió por 2 minutos y centrifugó un minuto a 7826 X g. La fase acuosa se colectó y se adicionó 1/10 volúmenes de acetato de amonio (AcNH_4) 7.5 M (Anexo 9.3.7; pág. 66), 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión suave para precipitar el ADN. Se centrifugó un minuto a 315 X g y el sobrenadante se retiró. El ADN se lavó con etanol al 70 % y se disolvió en 200 μ L de buffer TE.

4.3.4 Método 8 modificado (Löeffler, J., et al, 1997); lisis enzimática

El micelio se suspendió en 500 μL de BE (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 28 mM β -mercaptoetanol) más 500 unidades (U) de liticasa, se sometió a incubación durante 45 minutos a 37° C y se centrifugó por 15 minutos a 7826 X g; posteriormente se trató con 500 μL de 1 M Tris - 10 mM EDTA y 500 μL de SDS al 10 % durante 45 minutos a 65° para lisar los plastos. La solución se incubó con acetato de potasio (Ack) 3 M (Anexo 9.3.8; pág. 67) a -20° C por 40 minutos. El ADN se precipitó con isopropanol frío y se purificó con etanol al 70 %, se secó al aire y finalmente se resuspendió en 100 μL de buffer TE.

4.3.5 Método 9 (Van Burik, J., et al, 1998); lisis mecánica-química

Se suspendieron 50 mg de micelio en 667 μL de BE (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0,) y se le adicionaron 500 mg de perlas de vidrio (1.1 - 1.5 mm de diámetro) lavadas en ácido, 667 μL fenol (Phe):Chl:AIA en una proporción de 24:24:1 (Anexo 9.3.1; pág. 64) y se sometió a agitación en vortex por 30 minutos. La fase acuosa fue transferida a un eppendorf nuevo y se repitió el proceso de extracción dos veces con un volumen igual de Phe:Chl:AIA y una vez con Chl:AIA (24:1). El ADN se precipitó con AcNH₄ 3 M (Anexo 9.3.7; pág. 66) seguido por dos volúmenes de etanol al 100%. La pastilla de ADN se resuspendió en 100 μL de buffer TE y 1 μL de ribonucleasa (RNAsa) a 500 microgramos (μg)/mL (94 U/mg). La preparación se incubó por 1 hora a 37° C y se centrifugó a 11270 X g por 12 minutos. El sobrenadante se dividió como se indica en el método 5.

4.3.6 Método 10 modificado (Van Burik, J., et al, 1998); lisis térmica-química-mecánica

El micelio se sometió a los ciclos de congelación-descongelación descritos en el método 7; se adicionaron 500 mg de perlas de vidrio lavadas en ácido y se agitó en vortex por 30 minutos. El precipitado se suspendió en 833 μL de BE (200 mM Tris pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y se colocó en una plataforma giratoria (Red Rotor, Hoefer, USA) por 30 minutos. Los ácidos nucleicos se extrajeron dos veces con 833 μL Phe:Chl:AIA, una vez con 833 μL Chl:AIA y se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol. El RNA y los restos celulares se removieron como se describe en el método 9.

4.3.7 Método 11 (Van Burik, J., et al, 1998); lisis por sonicación

El micelio se suspendió en 1 mL de BE (1 % CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA); se sonicó por 40 minutos (en ciclos de 3 minutos de sonicación y 1 minuto de descanso) a 55° C y 47 kHz en presencia de 500 mg de perlas de vidrio; seguido a esto, se centrifugó por 10 minutos a 7826 X *g* y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en buffer TE y 500 µg/mL RNasa tal como se describe en el método 9.

4.3.8 Método 12 (Van Burik, J., et al, 1998); lisis por sonicación

Este método es idéntico al método 11, con excepción que no se adicionaron las perlas de vidrio durante la sonicación.

4.3.9 Método 13 modificado (Van Burik, J., et al, 1998); lisis térmica-química

El micelio se sometió a los ciclos de congelación-descongelación descritos en el método 7. El precipitado se suspendió en 1 mL de BE (1% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA) y el tubo se incubó en hielo por 1 hora. El ADN se extrajo de acuerdo a lo descrito en el método 9.

4.3.10 Método 14 (Van Burik, J., et al, 1998); lisis enzimática

El micelio se resuspendió en 833 µL de BE (50 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA, 20 % 2-mercaptoetanol), a los cuales se les adicionaron 300 U de liticasa y la preparación se incubó 3 horas a 37° C. El núcleo se lisó con 100 µL SDS 10 % durante 20 minutos a 65° C; se adicionaron 200 µL de AcK 3 M e incubó en hielo por 25 minutos y se centrifugó a 4° C durante 30 minutos a 13000 X *g*. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en buffer TE y 500 µg/mL de RNasa tal como se describe en el método 9.

4.3.11 Método 16 modificado (Velegraki, A., et al, 1999); lisis mecánica-química

El micelio se suspendió en 500 µL de BE (2% CTAB, 700 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 2% 2-mercaptoetanol) y se colocaron 5 a 6 perlas de vidrio de 1.1 a 1.6 milímetros de diámetro y se agitó en vórtex 3 minutos. Las suspensiones se incubaron 30 minutos a 65° C con agitación; posteriormente se transfirieron a un tubo nuevo y se le adicionaron 500 µL ChI:AIA homogenizando

por inversión. Para separar las fases se centrifugó durante 15 minutos a 7826 X g a temperatura ambiente, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionó un volumen igual de isopropanol. La pastilla se resuspendió en buffer de lavado (76 % etanol, AcK 10 mM) incubándose por 15 minutos a temperatura ambiente. La solución se trató con RNAsa en 10 mM Tris-HCl-EDTA pH 7.6 a 37° C por 10 minutos. El buffer de lavado se removió por centrifugación y la pastilla se lavó con etanol al 70% y más tarde se resuspendió en 200 µL de buffer TE.

4.3.12 Método 17 modificado (Samarrai, T. y Schmid, J., 2000); lisis térmica-química

El micelio se sometió a los ciclos de congelación-descongelación descritos en el método 7 y posteriormente se resuspendió con 5 ciclos de pipeteo suave en 833 µL de BE (40 mM Tris-acetato, 20 mM AcNa, 1 mM EDTA, 1% SDS pH 7.8), hasta que la viscosidad de la suspensión se redujo. Se adicionaron 2 µL de RNAsa (10 mg/mL) y la mezcla se incubó 5 minutos a 37° C; después se adicionaron 275 µL de NaCl 5 M (Anexo 9.3.12; pág. 67) y se mezcló por inversión 50 veces. La preparación se centrifugó durante 20 minutos a 4° C y 13000 X g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 667 µL de Chl y 667 µL de Phe. La solución se mezcló aproximadamente 50 veces hasta que se tornó lechosa y se centrifugó por 20 minutos. La fase acuosa se extrajo con un volumen igual de Chl. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol frío al 95 % (Anexo 9.3.11; pág. 67), se resuspendió en 833 µL de buffer de lisis y se mezcló por pipeteo. A la preparación se le adicionaron 275 µL de NaCl 5 M y se invirtió varias veces. La suspensión se extrajo con Chl como se describió antes. El ADN se lavó 3 veces con etanol frío al 70 %, se secó y se disolvió en 50 µL de buffer TE.

4.4 Determinación de la pureza y concentración del ADN de *A. fumigatus*

La determinación de la concentración de ADN de las muestras obtenidas se realizó en un espectrofotómetro (UV 1101, WPA, Inglaterra) a 260 nanómetros (nm). La lectura que se obtiene multiplica por 30.05 para expresar la concentración de ADN en µg/µL. El factor se obtiene de la siguiente forma:

$$\frac{601 * 50 \mu\text{g/mL}}{1000} = 30.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

donde 601 es la dilución realizada a la muestra para leer en el espectrofotómetro, 50 µg/mL es la concentración de ADN de doble cadena que equivale a una

densidad óptica de 1, y 1000 es el factor de conversión para expresar la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Posteriormente se leyó a 280 nm para determinar la relación A_{260}/A_{280} que determina la pureza de la muestra; para obtenerla, se divide la lectura de absorbancia que se obtuvo a 260 nm entre la lectura obtenida a 280 nm. Mientras más cercana se encuentre esta relación a 1.8, la muestra es más pura. Si está por debajo de 1.6 indica contaminación por proteínas, y si supera el 2.0 indica contaminación con RNA.

4.5 Corrimiento electroforético de las muestras de ADN

Después de que se obtuvieron las muestras y que se determinaron sus concentraciones y su pureza, se analizaron por medio de un corrimiento electroforético utilizando geles de agarosa al 0.7 %, teñidos con bromuro de etidio (Anexo 9.3.5; pág. 66), para conocer la integridad del ADN. La fluorescencia de las bandas fue evaluada visualmente; el corrimiento electroforético se realizó en buffer de Tris-HCl-borato-EDTA (BTE, ver Anexo 9.3.4; pág. 66).

4.6 Comparación de la temperatura de almacenamiento de las muestras de ADN

Para analizar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la conservación e integridad de las muestras de ADN, el volumen obtenido de la solución de ADN de cada método se dividió en dos tubos y se colocaron en refrigeración (4° C) y congelación (-20° C) durante un mes de almacenamiento. Posterior a este periodo, se determinó nuevamente la concentración de ADN de cada muestra, tanto de las refrigeradas como de las congeladas, y se realizó un segundo corrimiento electroforético con el que se comprobó la estabilidad y la integridad de las muestras.

4.7 Análisis estadístico de los resultados obtenidos

Los resultados del rendimiento y pureza promedio fueron sometidos a un análisis de varianza, en el programa "Statistica For Windows 95/98/2000/NT (version:5.5, Series 0900-A-N4)", para conocer las diferencias significativas entre los resultados de rendimiento y pureza, y establecer si los métodos son diferentes entre sí.

5. Resultados

*La fuerza no proviene de la capacidad física,
sino de la voluntad indomable
(Mahatma Gandhi)*

5.1 Métodos de extracción de ADN de hongos filamentosos aplicados a *A. fumigatus*.

La investigación bibliográfica de los métodos de extracción de ADN de hongos filamentosos brindó un total de 17 métodos basados en diferentes tipos de lisis de la pared celular de los hongos; inicialmente estos métodos se ordenaron cronológicamente y se les asignó un número de acuerdo a este criterio que conservaron a lo largo del trabajo, tal como se resumió en la Tabla 4.1 (pág 24).

Los métodos fueron analizados cuidadosamente para elegir aquellos que se realizaron en el laboratorio; uno de los criterios para seleccionarlos fue que los tiempos de realización no fueran tan prolongados, por lo que los métodos 1 (Spencht, C., et al, 1982), 2 (Garber, R. y Yoder, O., 1983) y 3 (Reader, U. y Broda, P., 1985) se descartaron porque su tiempo de realización superaba las 50 h en el primer paso de la extracción, además de que los dos primeros reportan un rendimiento bajo. Los reactivos y equipos a utilizar también fueron una limitante considerada para la selección o para realizar alguna modificación a ciertos métodos. Por lo tanto, los métodos 4 (Bainbridge, B., et al, 1990), y el 15 (Müller, F. et al, 1998) fueron descartados al carecer de las enzimas que utilizaban.

Los métodos elegidos fueron ordenados finalmente de acuerdo al rendimiento reportado por los autores y este fue el criterio que se siguió para analizarlos.

Es importante mencionar que el método 5 (Cenis, J., 1992) también fue aplicado a la extracción de ADN de plantas; otros métodos tales como el 8 (Löeffler, J. et al, 1997) y el 16 (Velegraki, A. et al, 1999) fueron realizados sobre sangre completa inoculada con una concentración conocida de esporas, por lo que incluían un paso previo de lisis de eritrocitos y leucocitos, el cual se eliminó debido a que en el presente trabajo se inició la extracción de ADN a partir de un cultivo puro de *A. fumigatus*.

Otros métodos que también tuvieron modificaciones fueron los que utilizaban la pulverización como forma de lisis; a los métodos 7, 10, 13, 16 y 17 se les

aplicaron ciclos de congelación-descongelación en lugar del paso de pulverización, de esta forma se evitó la dispersión y un contacto mayor con el hongo.

Otra modificación fue la que se aplicó al método 8, que utiliza la enzima zimolasa; al no contar con ésta se utilizó la liticasa, que también es una β -glucanasa y, por lo tanto, tiene una actividad similar a la que Loeffler y colaboradores (1997) utilizaron.

Una última modificación se aplicó al método 5, Ceniz y colaboradores (1992) recomiendan el uso de un homogenizador de tejidos para macerar y lisar al hongo; dado que los volúmenes de reacción utilizados fueron sumamente pequeños y para tratar de evitar la dispersión del hongo en el ambiente de trabajo, esta forma de lisis se sustituyó por la sonicación en presencia de perlas de vidrio.

El tipo de lisis en que se basaba cada método permitió clasificarlos utilizando este criterio, tal como se describe en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Clasificación de los métodos de extracción de ADN de *A. fumigatus* de acuerdo al tipo de lisis

TIPO DE LISIS	MÉTODO
Térmica-química	7, 13, 17
Sonicación	5, 11, 12
Química	6
Enzimática	8, 14
Mecánica-química	9, 16
Térmica-química-mecánica	10

Otro criterio que también permitió clasificarlos fue el grado de dificultad en su realización, que se detalla en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Clasificación de los métodos de extracción de ADN de *A. fumigatus* de acuerdo al grado de dificultad

GRADO DE DIFICULTAD	MÉTODO
Sencillo	6, 8, 9, 14
Medio	7, 10, 13, 16,
Complicado	5, 11, 12, 17

5.2 Determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN

Para realizar la cuantificación de la cantidad de ADN presente en las muestras obtenidas por los diferentes métodos de extracción mencionados anteriormente, se realizaron lecturas de absorbancia por duplicado de cada extracto a una longitud de onda de 260 nm y de 280 nm. La lectura a 260 nm permitió realizar el cálculo de la concentración de ácido nucleico en las muestras; una densidad óptica (DO) de 1 corresponde aproximadamente a 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de ADN de doble cadena.

La relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$) proporciona un estimado de la pureza del ácido nucleico obtenido. Las preparaciones de ADN deben tener valores $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ de 1.8; si existe contaminación con proteínas o fenol, este valor es significativamente menor, y la cuantificación de la cantidad de ácido nucleico no es precisa.

Como un ejemplo de lo anterior, en la Tabla 5.3 se citan las lecturas de DO a 260 nm y 280 nm por duplicado de cada preparación obtenida por el método 14; a partir de estos datos se logró obtener el valor de la relación $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ promedio para cada repetición del método, así como de la concentración en μg de ADN/ μL de solución de la muestra obtenida.

Tabla 5.3 Valores de DO a 260 nm y 280 nm, relación de $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ y concentración de ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de las muestras obtenidas por triplicado utilizando el método 14

REALIZACIÓN	$\text{DO}_{260 \text{ nm}}$	$\text{DO}_{280 \text{ nm}}$	$\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$	ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ (Promedio)	ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Promedio)
1a	0.040	0.025	1.6	1.2020	1.8	1.3222
	0.048	0.024	2.0	1.4424		
2a	0.035	0.021	1.6667	1.0518	1.8095	1.1420
	0.041	0.021	1.952	1.2321		
3a	0.040	0.025	1.6	1.2020	1.6540	1.2171
	0.041	0.024	1.708	1.2321		

5.3 Análisis de los rendimientos promedio obtenidos en cada método

Los resultados de las concentraciones de ADN, los volúmenes finales de cada muestra y el peso original de la muestra fúngica trabajada, se utilizaron para obtener el rendimiento en μg de ADN/g de muestra inicial de hongo.

En la Tabla 5.4 se muestra el rendimiento de las tres repeticiones realizadas para cada método, así como el valor promedio, con su respectiva desviación estándar muestral (DEM) y coeficiente de variación (CV). Estos valores indican que los rendimientos de las muestras obtenidas por los métodos 6 y 12 se encuentran muy alejados entre sí, por lo que fueron excluidos del análisis estadístico.

Tabla 5.4 Rendimiento promedio (μg de ADN/g de muestra de hongo) con DEM* y CV** de cada triplicado de los métodos de extracción de ADN de *A. fumigatus*.

MÉTODO	TRIPLICADO	μg ADN/g MUESTRA	PROMEDIO \pm DEM*	CV**
9. Van Burik, J. et al, 1998	9(1)	478.23	861.2966 \pm 680.67	64.53
	9(2)	1647.19		
	9(3)	458.47		
17. Samarrai, T., Schmid, J., 2000	17(1)	1351.61	1345.0033 \pm 206.02	12.51
	17(2)	1547.64		
	17(3)	1135.76		
10. Van Burik, J. et al, 1998	10(1)	1555.01	1107.20 \pm 438.88	32.37
	10(2)	1088.77		
	10(3)	677.82		
13. Van Burik, J. et al, 1998	13(1)	1030.48	1303.08 \pm 237.85	14.90
	13(2)	1410.47		
	13(3)	1468.30		
14. Van Burik, J. et al, 1998	14(1)	4843.23	4548.33 \pm 335.72	6.03
	14(2)	4182.97		
	14(3)	4618.79		
6. Zhu, H. et al, 1993	6(1)	1379.64	7294.28 \pm 6252.59	69.99
	6(2)	6665.84		
	6(3)	13837.36		
7. Graham, G. et al, 1994	7(1)	987.75	1104.9333 \pm 113.83	8.41
	7(2)	1215.09		
	7(3)	1111.96		
12. Van Burik, J. et al, 1998	12(1)	12116.38	11357.01 \pm 2379.57	17.11
	12(2)	13264.22		
	12(3)	8690.44		
11. Van Burik, J. et al, 1998	11(1)	8589.87	9513.6933 \pm 801.66	6.88
	11(2)	9924.86		
	11(3)	10026.35		
5. Cenis, J., 1992	5(1)	15081.31	16506.4333 \pm 1328.72	6.57
	5(2)	17711.19		
	5(3)	16726.80		
16. Velegraki, A. et al, 1999	16(1)	7323.70	6325.89 \pm 1119.67	14.45
	16(2)	5114.99		
	16(3)	6538.98		
8. Löeffler, J. et al, 1997	8(1)	11421.38	10152.3233 \pm 1106.79	8.90
	8(2)	9648.55		
	8(3)	9387.04		

* DEM: desviación estándar muestral; **CV: coeficiente de variación

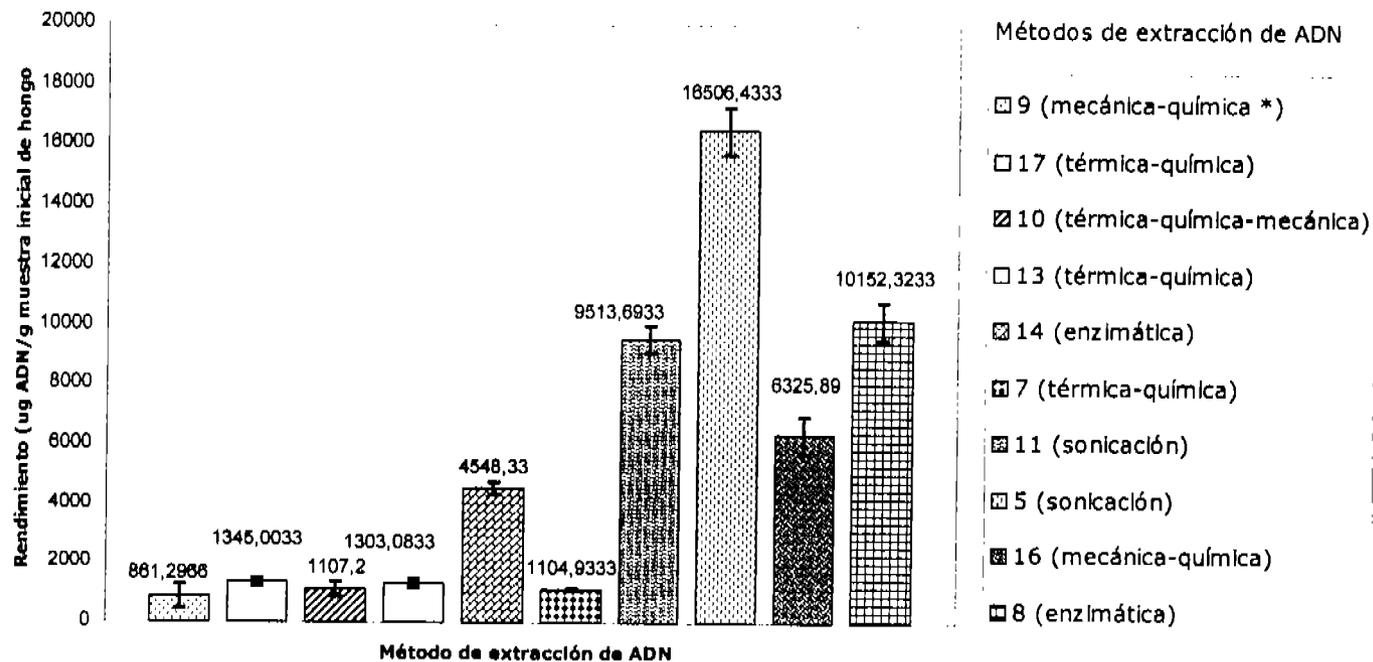
En la Tabla 5.5 se muestra la comparación de los valores de rendimiento promedio experimentales con los datos reportados por los autores; se puede observar que todos los valores experimentales superan a los datos reportados.

Tabla 5.5 Comparación del rendimiento promedio experimental de cada método con los valores reportados por los autores

MÉTODO	RENDIMIENTO PROMEDIO (μg ADN/g de muestra)	% RENDIMIENTO	% RENDIMIENTO REPORTADO
9. Van Burik, J. et al, 1998	861.2966	0.0750	0.072 - 0.074
17. Samarrai, T., Schmid, J., 2000	1345.0033	0.1338	0.034 - 0.087
10. Van Burik, J. et al, 1998	1107.20	0.1085	0.026 - 0.0453
13. Van Burik, J. et al, 1998	1303.08	0.1304	0.013 - 0.039
14. Van Burik, J. et al, 1998	4548.33	0.4547	0.010 - 0.020
6. Zhu, H. et al, 1993	7294.28	0.7292	0.009 - 0.011
7. Graham, G. et al, 1994	1104.9333	0.1105	NR*
12. Van Burik, J. et al, 1998	11357.01	1.1363	0.011 - 0.012
11. Van Burik, J. et al, 1998	9513.6933	0.9519	0.01 - 0.014
5. Cenis, J., 1992	16506.4333	1.6497	NR*
16. Velegraki, A. et al, 1999	6325.89	0.6198	NR*
8. Löeffler, J. et al, 1997	10152.3233	0.9816	NR*
*NR: no reportado			

Los métodos de extracción de ADN que se sometieron al análisis estadístico son presentados en la Gráfica 5.1 (pág. 35), donde se observa el rendimiento promedio de cada método en μg de ADN/g de muestra inicial de hongo, así como el error estándar de cada uno. En este gráfico se puede observar que los métodos que presentan un alto rendimiento son el 5, 8 y 11 (de 16506.43 a 9513.69 μg de ADN/g de muestra), mientras que los de menor rendimiento son 7, 9, 10, 13 y 17 (de 1345.00 a 861.29 μg de ADN/g de muestra), quedando con rendimiento medio los métodos 14 y 16 (4548.33 y 6325.89 μg de ADN/g de muestra, respectivamente).

Gráfica 5.1 Rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de *Aspergillus fumigatus*



*Tipo de lisis

Para determinar las diferencias significativas entre los valores de rendimiento promedio de los métodos de extracción de ADN, se realizó un análisis de varianza de un solo factor cuyos resultados se observan en la Tabla 5.6; este análisis mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), por lo que posteriormente se realizó una Prueba de Tukey.

Tabla 5.6 Análisis de varianza de un factor ($P < 0.05$) para los rendimientos promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus*

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	p*
Entre grupos	764982211.7	9	84998023.52	147.37	2.7289×10^{-16}
Dentro de los grupos	11534804.76	20	576740.2378	66	
Total	776517016.4	29			

*El valor de probabilidad (P) indica que existen diferencias significativas entre los valores de rendimiento promedio

En la Tabla 5.7 (pág 37) se observa la comparación por pares de los métodos utilizados. Los números que aparecen en negritas indican que no hay diferencia significativa entre el rendimiento del par de métodos comparados.

Tabla 5.7 Comparación del rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus* por medio de la Prueba de Tukey ($p < 0.05$)

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	5 (16506.4333)*	7 (1104.933)	8 (10152.32)	9 (861.2967)	10 (1107.2966)	11 (9513.6933)	13 (1303.08)	14 (4548.33)	16 (6325.69)	17 (1345.003)
5		0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864	0.00017864
7	0.00017864		0.00017864	0.99999338	1.0000	0.00017864	0.99999893	0.00077891	0.00018591	0.99999416
8	0.00017864	0.00017864		0.00017864	0.00017864	0.98641855	0.00017864	0.00017864	0.00032407	0.00017864
9	0.00017864	0.999993**	0.00017864		0.99999285	0.00017864	0.99999395	0.00042218	0.00017875	0.99816507
10	0.00017864	1.0000	0.00017864	0.99999285		0.00017864	0.99999899	0.00078404	0.00018591	0.99999464
11	0.00017864	0.00017864	0.98641855	0.00017864	0.00017864		0.00017864	0.00018674	0.00171953	0.00017864
13	0.00017864	0.99999893	0.00017864	0.99999395	0.99999899	0.00017864		0.00142729	0.00018638	1.0000
14	0.00017864	0.00077891	0.00017864	0.00042218	0.00078404	0.00018674	0.00142729		0.17990023	0.00163221
16	0.00017864	0.00018591	0.00032407	0.00017875	0.00018591	0.00171953	0.00018638	0.17990023		0.00018662
17	0.00017864	0.99999416	0.00017864	0.99816507	0.99999464	0.00017864	1.0000	0.00163221	0.00018662	

* El número indicado entre paréntesis es el valor de rendimiento promedio de cada método de extracción
 ** Los números en negritas indican que no hay diferencias significativas entre los métodos de extracción comparados

La Tabla 5.8 muestra un resumen de la comparación por pares de los métodos utilizados, donde se puede observar que los métodos se agrupan considerando que no existió diferencia significativa entre ellos en: grupo A (métodos 7, 9, 10, 13 y 17), grupo B (métodos 14 y 16); grupo C (métodos 8 y 11) y grupo D (método 5); los grupos están en forma ascendente con respecto a los valores de rendimiento obtenidos por cada método.

Tabla 5.8 Comparación del rendimiento promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus*

MÉTODO DE EXTRACCIÓN*	RENDIMIENTO PROMEDIO (μg de ADN/g de muestra)
9 ^a	861.2967
7 ^a	1104.933
10 ^a	1107.2966
13 ^a	1303.08
17 ^a	1345.003
14 ^b	4548.33
16 ^b	6325.89
11 ^c	9513.6933
8 ^c	10152.32
5 ^d	16506.4333
*Los métodos que no presentan diferencias significativas tienen el mismo superíndice	

5.4 Análisis de la pureza de ADN de cada método de extracción

Con ayuda de la lectura a 280 nm se pudo calcular la relación A_{260}/A_{280} que define el grado de pureza de cada muestra de ADN extraído. En la Tabla 5.9 (pág. 39) se puede observar el resultado de esta relación para cada método por triplicado, el promedio de ellos, su desviación estándar muestral (DEM) y su coeficiente de variación (CV).

Con el método 6 se obtuvieron resultados con un CV muy alto, por lo que se decidió excluirlo del análisis estadístico. Es importante tener presente que este método también fue descartado del análisis estadístico considerando los valores de rendimiento.

Tabla 5.9 Pureza promedio (A_{260}/A_{280}) de los triplicados de cada método con DEM* y CV** para los métodos de extracción de ADN de *A. fumigatus*

MÉTODO	TRIPLICADO	A_{260}/A_{280}	PROMEDIO \pm DEM*	CV**
9. Van Burik, J. et al, 1998	9(1)	1.2770	1.3900 \pm 0.1115	6.55
	9(2)	1.5000		
	9(3)	1.3930		
17. Samarrai, T., Schmid, J., 2000	17(1)	0.7915	0.8097 \pm 0.1267	12.78
	17(2)	0.9445		
	17(3)	0.6930		
10. Van Burik, J. et al, 1998	10(1)	1.0000	1.1481 \pm 0.1697	12.07
	10(2)	1.1111		
	10(3)	1.3333		
13. Van Burik, J. et al, 1998	13(1)	1.1250	1.0417 \pm 0.0722	5.66
	13(2)	1.0000		
	13(3)	1.0000		
14. Van Burik, J. et al, 1998	14(1)	1.8000	1.7712 \pm 0.1057	4.87
	14(2)	1.8595		
	14(3)	1.6540		
6. Zhu, H. et al, 1993	6(1)	1.0455	1.5235 \pm 0.4163	22.31
	6(2)	1.7185		
	6(3)	1.8065		
7. Graham, G. et al, 1994	7(1)	1.0355	1.0990 \pm 0.0566	4.20
	7(2)	1.1175		
	7(3)	1.1440		
12. Van Burik, J. et al, 1998	12(1)	1.9030	1.9455 \pm 0.0444	1.86
	12(2)	1.9915		
	12(3)	1.9420		
11. Van Burik, J. et al, 1998	11(1)	1.9795	1.9903 \pm 0.0684	2.80
	11(2)	2.0635		
	11(3)	1.9280		
5. Cenis, J., 1992	5(1)	1.9360	1.9446 \pm 0.0223	0.94
	5(2)	1.9700		
	5(3)	1.9280		
16. Velegraki, A. et al, 1999	16(1)	1.6375	1.6693 \pm 0.0929	4.54
	16(2)	1.5965		
	16(3)	1.7740		
8. Loeffler, J. et al, 1997	8(1)	1.9460	1.8273 \pm 0.1033	4.61
	8(2)	1.7575		
	8(3)	1.7785		

* DEM: desviación estándar muestral; **CV: coeficiente de variación

En la Tabla 5.10 se muestra la comparación de los valores de pureza promedio obtenidos en el presente trabajo con los datos reportados por los autores; se puede observar que los métodos 7, 9 y 13 resultaron con un pureza menor a la reportada; en el caso de los métodos 11, 12, y 14 la pureza experimental resultó mayor; sólo el método 10 se encontró en el rango de pureza que reportaron los autores. Los autores de los métodos 5, 6, 8, 16 y 17 no reportaron pureza.

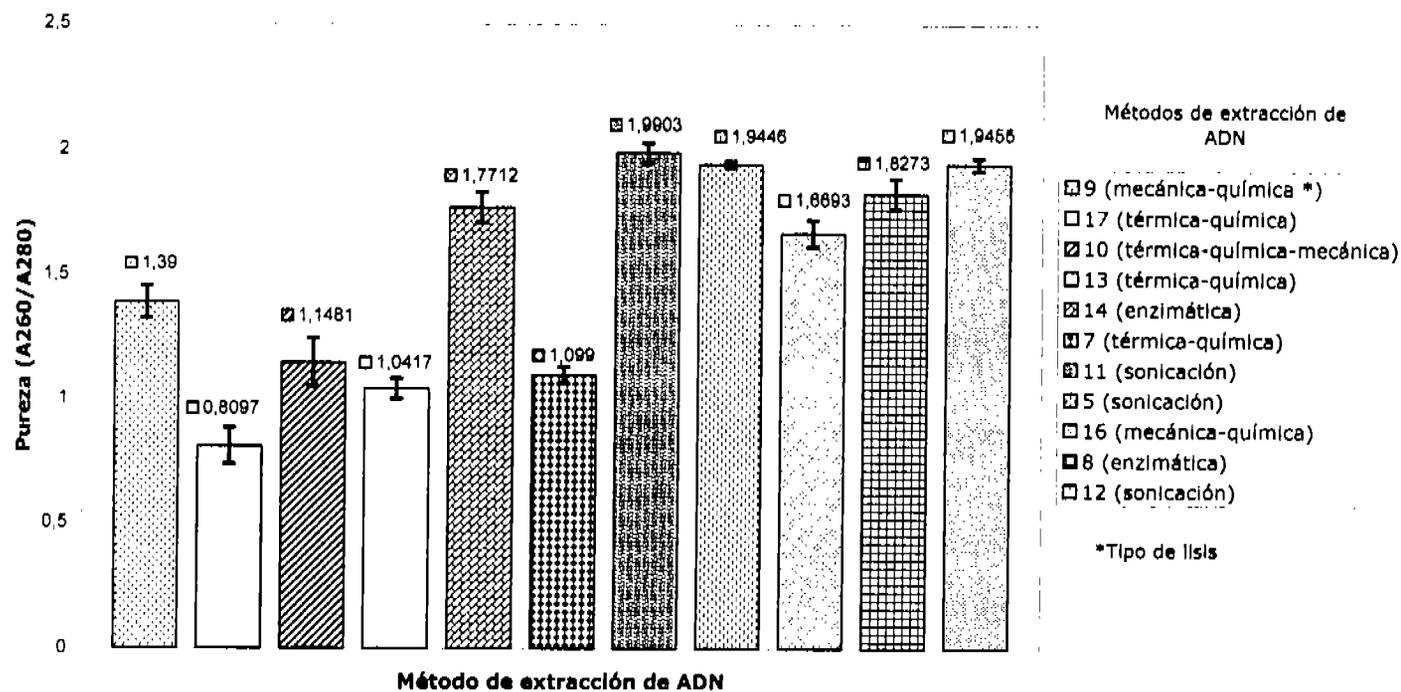
Tabla 5.10 Comparación de la pureza promedio (A_{260}/A_{280}) de cada método con los valores reportados por los autores

MÉTODO	PUREZA PROMEDIO (A_{260}/A_{280})	PUREZA REPORTADA (A_{260}/A_{280})
9. Van Burik, J. et al, 1998	1.3900	1.6 - 1.7
17. Samarrai, T., Schmid, J., 2000	0.8097	NR*
10. Van Burik, J. et al, 1998	1.1481	0.77 - 1.554
13. Van Burik, J. et al, 1998	1.0417	1.667 - 1.722
14. Van Burik, J. et al, 1998	1.7712	1.564 - 1.643
6. Zhu, H. et al, 1993	1.5235	NR*
7. Graham, G. et al, 1994	1.0990	1.85 - 1.92
12. Van Burik, J. et al, 1998	1.9455	1.446 - 1.478
11. Van Burik, J. et al, 1998	1.9903	1.392 - 1.462
5. Cenis, J., 1992	1.9446	NR*
16. Velegraki, A. et al, 1999	1.6693	NR*
8. Loeffler, J. et al, 1997	1.8273	NR*

*NR: no reportada

En la Gráfica 5.2 (pág. 41) se representan los métodos que fueron sometidos al análisis de varianza; en ella se observa que los métodos con una pureza apropiada de acuerdo a la literatura (1.7 - 1.9) son el 5, 8, 11, 12 y 14; los que presentan una pureza media (1.3 - 1.6) son el 9 y 16 mientras que los métodos con pureza baja (0.8 - 1.2) son el 7, 10, 13 y 17.

Gráfica 5.2 Pureza promedio de cada método de extracción de ADN de *Aspergillus fumigatus*



El análisis de varianza de un solo factor de los valores de pureza promedio mostró que existían diferencias significativas entre ellos tal como se observa en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11 Análisis de varianza de un solo factor ($p < 0.05$) para la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus*

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F	P
Entre los métodos	5.482851403	10	0.54828514	58.361842	1.73293×10^{-13}
Dentro de los métodos	0.206680813	22	0.009394582		
Total	5.689532216	32			
*El valor de probabilidad indica que existen diferencias significativas entre los valores de pureza promedio					

Posteriormente, se realizó una Prueba de Tukey cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.12 (pág. 43); los números en negritas indican que existe diferencia significativa entre el par de métodos comparados.

Tabla 5.12 Comparación de la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus* mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Métodos de extracción	5 (1.9447*)	7 (1.0990)	8 (1.8273)	9 (1.3900)	10 (1.1481)	11 (1.9903)	12 (1.9455)	13 (1.0417)	14 (1.7712)	16 (1.6693)	17 (0.80967)
5		0.000201	0.910773	0.000213	0.000201	0.999938	1.000	0.000201	0.531858	0.061059	0.000201
7	0.000201		0.000201	0.040370	0.999881	0.000201	0.000201	0.999538	0.000201	0.000208	0.042211
8	0.91077**	0.000201		0.000756	0.000201	0.814070	0.907198	0.000201	0.999613	0.653100	0.000201
9	0.000213	0.040370	0.000756		0.14015	0.00020	0.000213	0.008221	0.003258	0.055009	0.000206
10	0.000201	0.999881	0.000201	0.14015		0.000201	0.000201	0.949461	0.000202	0.00023	0.010866
11	0.999938	0.000201	0.614070	0.00020	0.000201		0.999948	0.000201	0.232895	0.017749	0.000201
12	1.000	0.000201	0.907198	0.000213	0.000201	0.999948		0.000201	0.525389	0.059750	0.000201
13	0.000201	0.999538	0.000201	0.008221	0.949461	0.000201	0.000201		0.000201	0.000202	0.17597
14	0.531858	0.000201	0.999613	0.003258	0.000202	0.232895	0.525389	0.000201		0.961749	0.000201
16	0.061059	0.000208	0.653100	0.055009	0.00023	0.017749	0.059750	0.000202	0.961749		0.000201
17	0.000201	0.042211	0.000201	0.000206	0.010866	0.000201	0.000201	0.175970	0.000201	0.000201	

* El número indicado entre paréntesis es la pureza promedio de cada método de extracción
 ** Los números en negritas indican que no hay diferencias significativas entre los métodos de extracción comparados

En la Tabla 5.13 se muestra el resumen de la comparación por pares de los métodos, donde se observa que es posible agrupar a los métodos, considerando el grado de pureza y sus diferencias significativas, en métodos con pureza baja (17 y 13), media (7, 9, 10, 16) y alta (5, 8, 11, 12, 14); este último grupo corresponde al de pureza adecuada según lo observado en la Gráfica 5.2.

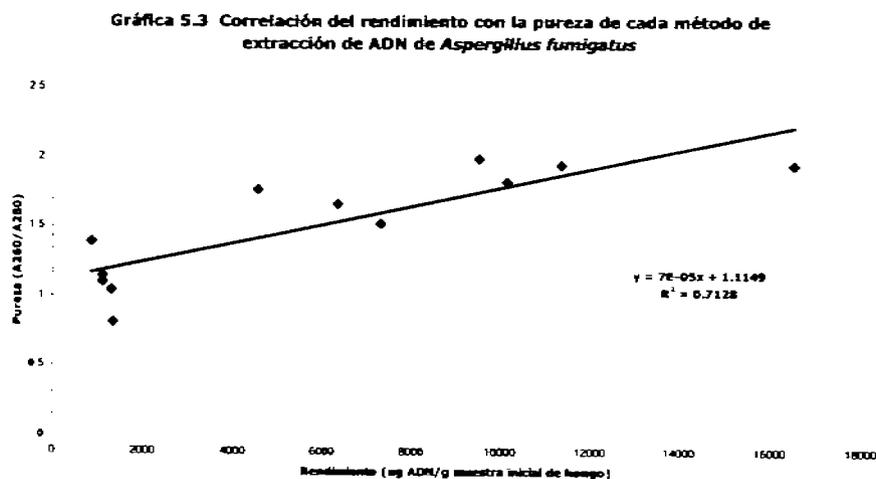
Tabla 5.13 Comparación de la pureza promedio de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus*

MÉTODO DE EXTRACCIÓN*	PUREZA (A_{260}/A_{280})
17 ^a	0.80967
13 ^{a,b}	1.0417
7 ^b	1.0990
10 ^{b,c}	1.1481
9 ^{c,d}	1.3900
16 ^{d,e}	1.6693
14 ^{e,f}	1.7712
8 ^{e,f}	1.8273
5 ^{e,f}	1.9447
12 ^{e,f}	1.9455
11 ^{e,f}	1.9903

*Los métodos que no presentan diferencias significativas entre ellos tienen superíndices iguales.

5.5 Correlación del rendimiento con la pureza del ADN de cada método

La correlación entre la pureza y el rendimiento de los métodos de extracción de ADN de hongo se muestra en la Gráfica 5.3, observándose que la correlación es adecuada ($R^2 = 0.7128$).



Para determinar si hay relación entre estas variables y que la pendiente sea diferente de cero, se realizó una Prueba de T. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 5.14, donde se observa que la P para la pendiente es menor a 0.05, lo que indica que la pendiente es significativa y por lo tanto sí existe relación entre el rendimiento y la pureza obtenidos.

5.14 Análisis de varianza de la correlación del rendimiento con la pureza ($P < 0.05$)

	COEFICIENTES	ERROR TÍPICO	ESTADÍSTICO t	P
ORDENADA AL ORIGEN	1.1148580	0.1037982	10.7406205	0.0000008227
PENDIENTE	0.0006695	0.0001344	4.98135673	0.00055231

5.6 Evaluación de las muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa

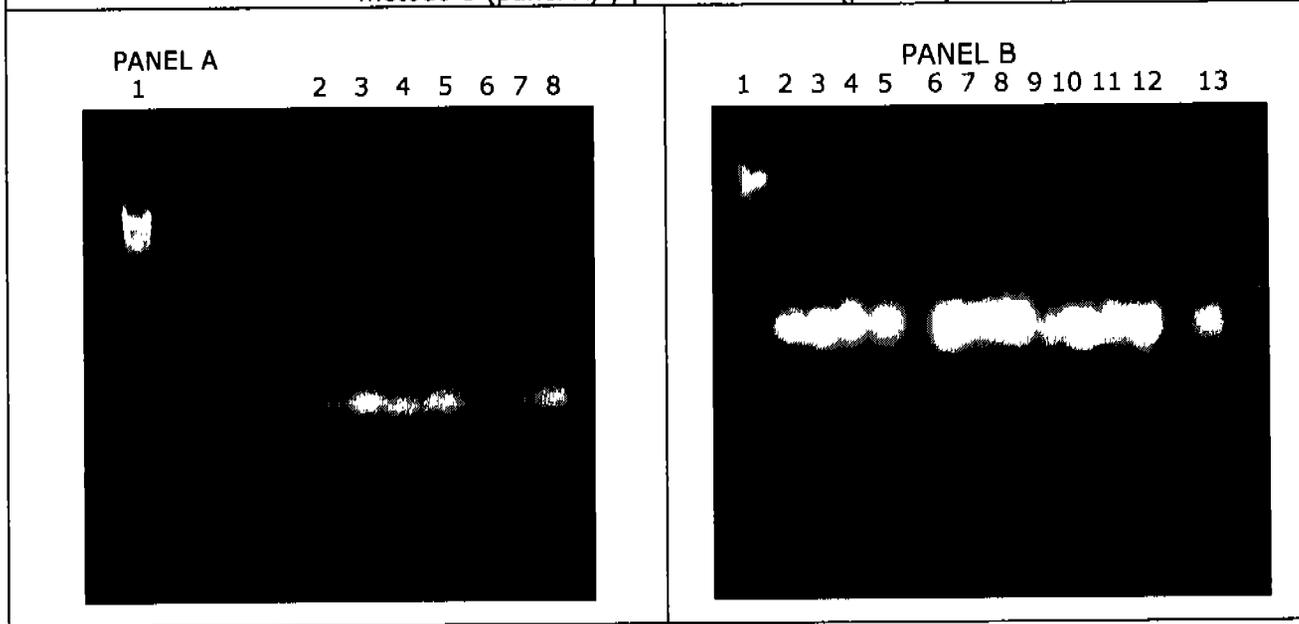
Los primeros corrimientos electroforéticos se realizaron en geles de agarosa al 1 % y no se lograron observar las bandas de ADN, por lo que la concentración de la agarosa se fue disminuyendo, encontrándose que a una concentración de 0.7 % se consiguió observar el ADN extraído de *A. fumigatus*. En todos los corrimientos electroforéticos se colocaron diferentes concentraciones (desde 2 hasta 8 μg de ADN/ μL) de cada muestra obtenida; en todas las electroforesis efectuadas se incluyó un ADN mitocondrial humano, de concentración conocida, como testigo.

En el Panel A de la Figura 5.1 (pág. 47) se muestra la imagen del corrimiento electroforético de las muestras de ADN recién obtenidas por el método 6; en el carril 1 se observa el ADN testigo, en los carriles 2 al 5 se observan las concentraciones 2, 4, 6 y 8 μg de ADN/ μL , respectivamente, correspondientes a la muestra 2 obtenida por método 6; los carriles 6 al 8 corresponden a las concentraciones 2, 4 y 6 μg de ADN/ μL de la muestra 3 obtenida por el método 6. De esta misma forma se confirmó la integridad del ADN obtenido en todas las muestras de los métodos analizados (resultados no mostrados).

Además, se puede observar en la Figura 5.1, que las intensidades de las bandas de ADN fueron en aumento con respecto a la concentración colocada, tanto en las muestras de reciente obtención (Panel A), así como en las muestras conservadas a 4° y -20° C durante un mes (Panel B, se describe posteriormente).

Es importante destacar que las bandas obtenidas indican que el ADN extraído está íntegro, debido a que sólo se observa una banda en cada carril. Este comportamiento electroforético fue el mismo para todas las muestras de ADN de *A. fumigatus* obtenidas por los diferentes métodos y conservadas a 4° C y -20° C (resultados no mostrados).

Figura 5.1 Corrimientos electroforéticos de las muestras de ADN de *A. fumigatus* extraídas por el método 6 (panel A) y por el método 8 (panel B)



5.7 Efecto de la temperatura en la conservación de las muestras de ADN de *A. fumigatus*

En una segunda fase de la experimentación se determinó la estabilidad de las muestras de ADN obtenidas por los métodos 5, 6, 8, 11, 12 y 16 cuando se conservan a 4° C y a -20° C durante un mes.

En la Figura 5.1, Panel B (pág. 46) se ejemplifica el corrimiento electroforético de las muestras obtenidas por el método 8 después de un mes de conservación; el carril 1 corresponde al ADN testigo; en los siguientes carriles (2 y 3, 13 y 6, 9 y 10) se colocaron las muestras conservadas a 4° C, a concentraciones de 3 y 6 µg de ADN/µL respectivamente; seguidas de las muestras conservadas a -20° C (en los carriles 4 y 5, 7 y 8, 11 y 12) a las mismas concentraciones, para cada una de las tres muestras obtenidas por este método.

En la Tabla 5.15 se muestran las concentraciones promedio de las muestras, en µg de ADN/µL de solución, de cada método incluido en este análisis, considerándose la concentración inicial del ADN recién obtenido, la concentración después de un mes de conservación a 4° C y la concentración después de un mes de conservación a -20° C.

Tabla 5.15 Comparación de las concentraciones inicial y después de un mes de almacenamiento a 4° C y -20° C de cada método de extracción de ADN de *A. fumigatus*

MÉTODO	CONCENTRACIÓN INICIAL (µg de ADN/µL)	CONSERVADO A 4° C (µg de ADN/µL)	CONSERVADO A -20° C (µg de ADN/µL)
5	5.8698	5.7596	5.6093
6	1.9032	1.4726	1.3723
8	5.2488	4.9683	4.7679
11	5.0384	4.7980	4.8381
12	3.7249	3.7019	3.6794
16	3.2705	2.9248	3.1252

Para determinar el efecto de la temperatura de conservación en la concentración de ADN, se utilizó la misma muestra que se dividió en dos. Por lo tanto, se empleó un análisis de varianza para un experimento con un factor con diseño con observaciones repetidas (concentración inicial, a 4° C y a -20° C) y otro factor con diseño completamente aleatorio (método de extracción).

Los resultados del análisis de varianza se encuentran en la Tabla 5.16; se comprobó que los valores utilizados cumplieran con la normalidad y homogeneidad de varianza (resultados no mostrados).

Tabla 5.16 Análisis de varianza para determinar el efecto del método de extracción y el efecto de la temperatura de conservación de las muestras ADN de *A. fumigatus*, considerando como variables al método y a la temperatura ($P < 0.05$)

	GL* DEL EFECTO	CUADRADO MEDIO DEL EFECTO	GL* DEL ERROR	CUADRADO MEDIO DEL ERROR	VALOR DE F	P
EFFECTO DEL MÉTODO	5	20.79417	12	1.4465968	14.37454	0.0001033*
EFFECTO DE LA TEMPERATURA	2	0.411986	24	0.0273209	15.07953	0.000057*
EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE LAS VARIABLES	10	0.039659	24	0.0273209	1.451612	0.21800**
* GL Grados de libertad						
*Indica que hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones por efecto del método del que provienen las muestras y por la temperatura a la que son almacenadas las muestras.						
**El número en negritas indica que la interacción de las variables no es significativa.						

Por medio de este análisis se determinó que hay diferencias significativas entre las concentraciones de las muestras por efecto del método del que provienen y por la temperatura a la que son almacenadas.

Este mismo análisis indica que la interacción de las variables consideradas no es significativa, por lo que el método de extracción y la temperatura de conservación afectan de manera independiente a la concentración de las muestras de ADN obtenidas.

En la Tabla 5.17 se observa la comparación de los promedios de las concentraciones obtenidas en las diferentes condiciones de almacenamiento. La comparación de la concentración inicial contra las concentraciones a 4° C y a -20° C, respectivamente indica que hay diferencias significativas entre ellas, lo que demuestra que después de un mes de conservación, la concentración original de la muestra disminuye significativamente con respecto a la concentración de las muestras a 4° C y a -20° C.

Tabla 5.17 Comparación y diferencias promedio de las concentraciones inicial y después de un mes de almacenamiento a 4° C y a -20° C de las muestras ADN de *A. fumigatus* ($p < 0.05$)

COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES		MEDIA DE LAS DIFERENCIAS	ERROR ESTÁNDAR	P
Inicial	4° C	0.23840556	0.0586419	0.00026832*
Inicial	-20 C	0.28056111	0.0586419	0.000032647*
4° C	-20 C	0.04215556	0.0586419	0.47713661**
*Indica que hay diferencia significativa cuando se compara la concentración inicial con las concentraciones a 4° C y -20° C, respectivamente.				
**El número en negritas indica que no hay diferencia significativa entre las temperaturas de conservación.				

La media de las diferencias (Tabla 5.17) indica la disminución promedio entre la concentración inicial con respecto a las concentraciones después de un mes de almacenamiento a 4° C y a -20° C. Como se mencionó anteriormente, esta disminución en las concentraciones es significativa.

La comparación de las concentraciones promedio de las muestras conservadas a 4° C y -20° C no presenta diferencias significativas, por lo que se puede decir que las temperaturas de conservación utilizadas en el presente trabajo no influyeron en la estabilidad del ADN en un periodo de un mes.

6. Discusión

Fas est et ab hoste doceri
(*Evangelio de San Mateo*)

Los métodos de extracción de ADN son el primer paso para el uso de las técnicas de biología molecular, tanto en el diagnóstico como en la investigación. Entre las propiedades que hacen que un método de extracción sea aceptable están un rendimiento y pureza elevados, tiempo de realización corto, reducir el empleo de equipo sofisticado y usar reactivos con baja toxicidad.

Durante el presente trabajo se evaluaron en el laboratorio 12 métodos diferentes para la extracción de ADN de *A. fumigatus*, un hongo filamentoso cuya pared de quitina muestra una elevada resistencia a la ruptura, con la finalidad de encontrar el mejor método para utilizarlo de manera rutinaria en el desarrollo de técnicas de biología molecular en el laboratorio.

Algo que llama la atención en los resultados de este trabajo, es que los rendimientos promedio obtenidos superan al rendimiento reportado por los autores de los diferentes métodos. Por ejemplo, los métodos 6, 11 y 14 presentaron un rendimiento de 0.7292, 0.9519 y 0.4547 %, mientras que el rendimiento reportado por los autores son 0.009, 0.01 y 0.02 %, respectivamente (Tabla 5.5).

Una explicación a lo anterior puede ser que las condiciones experimentales utilizadas por los autores de cada método no son detalladas a fondo y que las circunstancias en las que se desarrollaron los métodos reportados en el presente trabajo hayan diferido un poco, lo que se puede explicar la discrepancia en los rendimientos obtenidos.

Asimismo, las modificaciones que se realizaron en los métodos: 5 (lisis en homogenizador de tejidos modificada a lisis por sonicación), 7, 10, 13 y 17 (cambio de pulverización del micelio por ciclos de congelación-descongelación) y 8 (cambio de zimolasa por el uso de líticasa), pueden ser otras razones que posiblemente contribuyeron a mejorar la eficiencia de los métodos aumentando los rendimientos obtenidos.

Además las muestras pueden contaminarse fácilmente por esporas presentes en el ambiente de trabajo, sea de origen externo al laboratorio o de muestras procesadas con anterioridad; esta es una de las principales causas de encontrar un falso incremento en el rendimiento de la extracción (Müller, F., et al 1998; Velegraki, A., et al 1999).

Considerando lo anterior, es importante considerar que el manejo adecuado de las muestras durante la extracción puede reflejarse en la obtención de rendimientos aceptables. Por lo que se recomienda que las muestras sean extraídas en campana de flujo laminar, con el fin de evitar contaminación externa y de disminuir el riesgo de trabajar con el hongo. Además, si el ADN extraído va a ser utilizado en procesos posteriores, como PCR, RAPD, entre otros, es necesario que cada paso se realice en habitaciones físicamente separadas, para disminuir el grado de contaminación.

El grado de pureza es un parámetro importante en la evaluación de los métodos de extracción de ADN, debido a que sustancias presentes en los extractos, tales como las proteínas, las nucleasas o los carbohidratos, pueden alterar los resultados de pasos posteriores, principalmente en el desarrollo de técnicas de biología molecular, como la PCR y el RAPD (Müller, F., et al 1998; Chen, S., et al, 2002). La determinación de la pureza es importante para evaluar la efectividad de los métodos de extracción de ADN, así como si las condiciones de trabajo fueron adecuadas.

Por lo tanto, otra característica importante que se analizó en el presente trabajo fue el grado de pureza; comparando la pureza obtenida con la reportada en la literatura para ADN de doble cadena ($A_{260}/A_{280} = 1.8$) (Tabla 5.10) se mostró que los métodos 7, 9 y 13 dieron una pureza menor a la reportada por los autores (Graham, G., et al, 1994; Van Burik, J., et al, 1998); en el caso de los métodos 11, 12, y 14, la pureza experimental superó a la pureza reportada (Van Burik, J., et al, 1998); sólo el método 10 se encontró en el rango de pureza reportado (Van Burik, J., et al, 1998). Los autores de los métodos 5, 6, 8, 16 y 17 no reportaron este parámetro (Cenis, J., 1992; Zhu, H., et al, 1993; Loeffler, J., et al, 1997; Velegraki, A., et al, 1999; Samarrai, T. y Schmid, J., 2000).

El método 6 se basa en la lisis química por la acción del cloruro de bencilo, que destruye la pared celular del hongo por su reacción con los grupos OH de los

polisacáridos (Zhu, H., et al, 1993). El análisis estadístico de los rendimientos de este método demostró que no es reproducible (Tabla 5.4), por lo que fue descartado para utilizarlo en la extracción del ADN de *A. fumigatus* y no fue considerado en las pruebas estadísticas realizadas posteriormente.

El método 12, basado en la lisis por sonicación, también fue descartado por presentar resultados que no son reproducibles; sin embargo, el método 11, similar al 12 que también utiliza la lisis por sonicación pero con el uso de perlas de vidrio, mostró resultados favorables, tal como se discutirá más adelante.

Los métodos que utilizan lisis térmica-química, mecánica-química y térmica-química-mecánica (métodos 7, 9, 10, 13 y 17) tienen un rendimiento similar entre ellos (Tabla 5.7 y 5.8), esto implica que cualquiera de estos métodos puede ser utilizado para obtener rendimientos de 900 a 1300 μg de ADN/g de muestra.

La técnica original de los métodos 7, 10, 13 y 17 indica un paso inicial de pulverización del micelio con nitrógeno líquido; este paso puede resultar peligroso para la persona que lo realiza si no se lleva a cabo con extremo cuidado o bajo el resguardo de una campana de flujo laminar, además de que se promueve la dispersión de esporas del hongo en el ambiente de trabajo. Este paso se sustituyó utilizando lisis térmica (ciclos de congelación-descongelación) lo que probablemente influyó incrementando los rendimientos de estos métodos con los reportados en la literatura.

La pureza es baja para los métodos 13 y 17 y resultó media para los métodos 7, 9 y 10, por lo que se puede decir que el método 9 es uno de los mejores de este grupo, al considerar que su rendimiento promedio es bueno y es uno de los que presentan una realización más fácil, aunque el grado de pureza del extracto obtenido no es el adecuado. No obstante, el método 9 utiliza sustancias tóxicas como el fenol y cloroformo; por lo tanto esto podría considerarse como una desventaja.

Los métodos 8 y 11 muestran que la forma de lisis utilizada por ellos da un rendimiento promedio muy parecido (Tablas 5.7 y 5.8), por lo que la lisis enzimática con tratamiento posterior con SDS al 10%, así como la sonicación en presencia de perlas de vidrio y el detergente CTAB (utilizado en la extracción de ADN vegetal), brinda rendimientos similares.

Los dos métodos anteriores corresponden a los que presentaron un grado de pureza adecuado; el de más fácil y corta realización es el 8, debido a que sólo es necesario colocar al hongo en presencia de la liticasa en un medio adecuado para que la enzima actúe y llevar a cabo la lisis del hongo; mientras que el método 11 requiere un largo paso de sonicación para lograrla, además de que con éste último solo se puede procesar una muestra a la vez.

Es necesario recordar que el método 12, muy parecido al 11, fue descartado porque no presentó resultados reproducibles en su rendimiento; Van Burik y colaboradores (1998) demostraron que el método 11 brindaba mejores resultados de rendimiento al incluir durante la sonicación perlas de vidrio, sin embargo, la falta de reproducibilidad del método 12 no es mencionado en la publicación. A pesar de que en el presente trabajo se encontró similitud en los resultados, se considera que el método 11 es mejor que el 12 de acuerdo a su reproducibilidad.

Los siguientes métodos son el 14 y el 16 con rendimientos similares (4548.33 y 6325.89 μg de ADN/g de muestra), que corresponden a lisis enzimática y mecánica-química, respectivamente. El método 14 mostró una pureza adecuada y su realización es sencilla, mientras que el método 16 observó una pureza media y un grado de dificultad medio. Por lo que el método 14 sería el más adecuado de este grupo.

Es importante destacar que tanto el método 14 como el 8 utilizan lisis enzimática con liticasa, por lo que se podría esperar que ambos presentaran un rendimiento similar; sin embargo, el método 8 presenta un rendimiento mucho mayor que el método 14 (10152.32 y 4548.33 μg de ADN/g de muestra, respectivamente). Esta diferencia en el rendimiento se puede deber a que el tiempo de lisis de los protoplastos es mayor en el método 8, lo que da lugar a una mayor liberación del ADN contenido en ellos.

Aunque algunos autores destacan que la formación de protoplastos utilizando liticasa es muy difícil en hongos filamentosos (Graham, G., et al, 1994; Cenis, J., 1992), técnicas más recientes mencionan el uso de esta enzima como una de las mejores formas de extracción de ADN para estos hongos (Chen, S., et al 2002; Loeffler, J., et al, 1997; Van Burik, J., et al, 1998).

Tal como se observó en este estudio, la lisis enzimática es una buena forma de extracción de ADN de *A. fumigatus*; los dos métodos (8 y 14) que utilizaron este

tipo de lisis son sencillos de realizar de tal forma que se pueden procesar numerosas muestras a la vez; presentan una pureza adecuada y la liticasa es una enzima muy comercial, por lo que se puede elegir cualquiera de estos dos métodos como el adecuado en la extracción de ADN de *A. fumigatus*.

El método 8 original proponía el uso de la zimolasa en su metodología. Esta enzima es más eficaz en la formación de plastos de levaduras que en hongos filamentosos (Löeffler, J., et al, 1997), por lo que se sustituyó por la liticasa, encontrándose buenos resultados con su uso.

El método 5 fue el único cuyo rendimiento no era similar a ninguno de los anteriores (Tabla 5.7 y 5.8); a pesar de que presenta una pureza adecuada y el rendimiento más alto de todos los métodos efectuados, su realización no es sencilla, a causa de que se basa en la sonicación para lisis a las células fúngicas, que como se mencionó anteriormente, es un paso muy largo (2 h por cada muestra) que sólo permite procesar una muestra a la vez y, por lo tanto, un máximo de tres muestras por día; además de que la extracción depende de la disponibilidad del equipo.

El método 5 en comparación con el método 11, que también utiliza a la lisis por sonicación, es más sencillo pues no se requiere el paso de extracción con fenol y cloroformo, lo que también lo hace un método más seguro.

De esta forma, se puede observar que los métodos que presentaron los mejores resultados considerando un rendimiento alto y una pureza adecuada son: el método 8, que utiliza lisis enzimática, y el método 5, que se basa en la lisis por sonicación.

A pesar de que la sonicación es la forma de lisis más efectiva para obtener un elevado rendimiento y una pureza adecuada, representa un medio de contaminación al procesar múltiples muestras en el mismo equipo, si la limpieza del sonicador no se lleva a cabo concienzudamente. Además, este método no podría utilizarse en el diagnóstico clínico, donde sería necesario llevar a cabo demasiadas extracciones en poco tiempo.

Es probable que en el diagnóstico clínico de rutina sea de mayor utilidad el método enzimático, ya que es más fácil de realizar y la técnica permite procesar muestras simultáneamente.

En los corrimientos electroforéticos se observó que el ADN de *A. fumigatus* obtenido por los diferentes métodos, estaba íntegro debido a que sólo se observó una banda única de ADN sobre los geles de agarosa, tal como se ve en la Figura 5.1, Panel A; esto demuestra que los métodos de extracción realizados son efectivos.

En las electroforesis realizadas no se incluyó un marcador de peso molecular pues la finalidad principal de los corrimientos electroforéticos era demostrar la presencia de ADN en los extractos obtenidos; por lo tanto, faltó demostrar si los métodos extraen ADN de elevado peso molecular, tal como lo describen algunos autores (Löeffler, J., et al, 1997; Van Burik, J., et al, 1998; Graham, G., et al, 1994; Cenis, J., 1992).

Una vez que se obtuvieron los extractos de ADN de *A. fumigatus*, fueron almacenados durante un mes a 4° y -20° C para observar el efecto de éstas temperaturas en la conservación de la muestras, evaluando concentración e integridad de las mismas.

Los corrimientos electroforéticos mostraron que los extractos de ADN permanecían íntegros después de este periodo de almacenamiento, pues solamente se observaba una banda única de ADN en el gel (Figura 5.1, Panel B).

El análisis de las concentraciones mostró que no hay diferencia significativa entre ambas temperaturas de conservación durante el periodo de estudio. Graham y colaboradores (1994) explican que el extracto de ADN que obtuvieron permanece estable durante seis meses a 4° C; esto podría sugerir que el tiempo de almacenamiento estudiado en el presente trabajo fue corto para poder determinar cual de ambas temperaturas conserva mejor los extractos de ADN, por lo que se propone que se amplíe el tiempo de almacenamiento y se evalúe mensualmente tanto la integridad como la concentración de las muestras, para poder definir a la mejor temperatura de conservación.

7. Conclusiones

*El autor debe estar en su obra como Dios en el universo:
presente en todas partes, pero en ninguna visible.
(Gustave Flaubert)*

1. Se encontraron 17 métodos para la extracción del ADN fúngico como resultado de la revisión hemerográfica.
2. Se lograron realizar experimentalmente 12 métodos para la extracción del ADN de *Aspergillus fumigatus* a partir de un cultivo puro, evaluando la concentración, pureza e integridad del ADN obtenido.
3. Con base al tipo de lisis utilizada en cada uno de los métodos se agruparon en: térmica-química (métodos 7*, 13*, 17*), por sonicación (métodos 5*, 11 y 12), química (método 6), enzimática (métodos 8* y 14), mecánica-química (métodos 9 y 16*) y térmica-química-mecánica (método 10*).
4. Los métodos 8* y 14 basados en lisis enzimática presentaron los mejores valores de rendimiento, un alto grado de pureza y fácil realización en un periodo corto; por lo que resultaron ser los más recomendables.
5. El método 5* basado en la lisis por sonicación presentó el valor de rendimiento más alto y una pureza adecuada no recomendándose por ser de larga realización; el método 11 presentó resultados similares al anterior, teniendo como otro inconveniente un proceso muy laborioso; mientras que los métodos 9, 10*, 13*, 7* y 17* tuvieron rendimiento y pureza bajos.
6. Las modificaciones realizadas a los métodos 5*, 7*, 8*, 10*, 13* y 17* permitieron obtener un rendimiento más eficiente que los valores reportados por los autores.
7. Los corrimientos electroforéticos demostraron que el ADN extraído por los diferentes métodos se obtuvo en una forma íntegra.
8. La concentración y la estabilidad de las muestras de ADN de *A. fumigatus* es ligeramente afectada después de un mes de conservación independientemente de la temperatura de almacenamiento (4° C ó -20° C).

*Método modificado respecto a la referencia hemerográfica consultada.

Perspectivas

Debido a que no se consideró un estudio minucioso de los costos de los métodos, en estudios futuros se puede ampliar el trabajo tomando en cuenta el aspecto económico aunado a los otros parámetros para la selección de los métodos.

Asimismo, para un estudio más completo de las condiciones de almacenamiento, sería necesario evaluar la concentración y la integridad del ADN de las muestras durante un lapso de tiempo mayor para confirmar el efecto de la temperatura en la conservación de las muestras.

Finalmente, otro aspecto importante por evaluar en trabajos posteriores, podría ser que el material genómico extraído por los métodos más recomendados en el presente trabajo, se utilice en técnicas de biología molecular, como la PCR.

8. Referencias

- Abarca, L. *Taxonomía e Identificación de Especies Implicadas en la Aspergilosis Nosocomial*. Revista Iberoamericana de Micología 2000 17: S79 - S84
- Andriole, V. *Infections with Aspergillus species*. Clinical Infectious Disease 1993 17 (Suppl 2): S481 - S486
- Bainbridge, B., Spreadbury, C., Scalise, F., Cohen, J., *Improved Methods for the Preparation of High Molecular Weight DNA from Large and Small Scale Cultures of Filamentous Fungi*. FEMS Microbiology Letters. 1990, 66: 113 - 118
- Bart-Delabesse, E., Humbert, J., Delabesse, E., Bretagne, S., *Microsatellite Makers for Typing Aspergillus fumigatus Isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36 (9): 2413 - 2418
- Becker, M., Marie, S., Willemse, D., Verbrugh, H., Bakker-Woudenberg, I. *Quantitative Galactomannan Detection is Superior to PCR in Diagnosing and Monitoring Invasive Pulmonary Aspergillosis in an Experimental Rat Model*. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38 (4): 1434 - 1438
- Bonifaz, A. *Micología Médica Básica*. Mendez Editores. México, 1994.
- Bretagne, S., Costa, J., Bart-Delabesse, E., Dhédin, N., Rieux, C., Cordonnier, C., *Comparison of Serum Galactomannan Antigen Detection and Competitive Polymerase Chain Reaction for Diagnosing Invasive Aspergillosis*. Clinical Infection Disease 1998 26: 1407 - 1412
- Brookman, J., Denning, D. *Molecular Genetics in Aspergillus fumigatus*. Current Opinion in Microbiology 2000, 3:468 - 474
- Buckingham, S., Hansell, D. *Aspergillus in the Lung: Diverse and Coincident Forms*. European Radiology 2003 13(8):1786-800
- Cenis, J. *Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification*. Nucleic Acids Research. 1992, 20 (9): 2380
- Chen, S., Halliday, C., Meyer, W. *A Review of Nucleic Acid-based Diagnostic Tests for Systemic Mycoses with an Emphasis on Polymerase Chain Reaction-based Assays*. Medical Mycology 2002 40: 333 - 357
- Costa, C., Costa, J., Desterke, C., Botterel, F., Cordonnier, C., Bretagne, S. *Real Time PCR Coupled with Automated DNA Extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis*. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40 (6): 2224 - 2227
- Denning, D. *Invasive Aspergillosis*. Clinical Infectious Disease 1998 26: 781-805
- Denning, D. *Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis*. The Lancet 2000, 355:423

- Denning, D., Anderson, M., Turner, G., Latgé, J., Bennet, J. *Sequencing the Aspergillus fumigatus Genome*. Lancet Infect Diseases 2002, 2:251 - 253
- Dixon, D., Mc Neil, M., Cohen, M., Gellin, B., La Montagne, J. *Fungal Infections: A Growing Threat*. Public Health Reports 1996, 111(3): 227 - 235
- Einsele, H., Herbart, H., Roller, G., Loeffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C., Bowden, R., Van Burik, J., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. *Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by Using Molecular Probes*. Journal of Clinical Microbiology 1997, 35 (6): 1353 - 1360
- Garber, R., Yoder, O. *Isolation of DNA from Filamentous Fungi and Separation into Nuclear, Mitochondrial, Ribosomal and Plasmid Components*. Analytical Biochemistry. 1983, 135: 416 - 422
- Graham, G., Mayers, P., Henry, R. *A Simplified Method for the Preparation of Fungal Genomic DNA for PCR and RAPD Analysis*. Biotechniques. 1994, 16 (1): 48 - 49
- Greenberger, P. *Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002, 110 (5): 685 - 692
- Herbart, H., Loeffler, J., Meisner, C., Serey, F., Schmidt, D., Böhme, A., Martin, H., Engel, A., Bunjes, D., Kern, W., Schumacher, U., Kanz, L., Einsele, H. *Early Detection of Aspergillus Infection after Allogeneic Stem Cell Transplantation by Polymerase Chain Reaction Screening*. Journal of Infection Disease, 2000 181: 1213 - 1219
- Jung, K., Ovechkina, Y., Prigozhina, N., Oakley, E., Oakley, B. *The Use of beta-D-glucanase as a Substitute for Novozym 234 in Immunofluorescence and Protoplasting*. Fungal Genetics Letters, 2000 47: 65 - 66
- Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., Itoh, K. *Quantitative Measurement of Fungal DNA Extracted by Three Different Methods Using Real Time Polymerase Chain Reaction*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003 96 (4): 337 - 343
- Kawamura, S., Maeski, S., Noda, T., Hirakata, Y., Tomono, K., Tashiro, T., Kohno, S. *Comparison between PCR and Detection of Antigen in Sera for Diagnosis of pulmonary Aspergillosis*. Journal of Clinical Microbiology 1999, 37: 218 - 220
- Kim, H., Shamblin, C., Chen, D., Yu, Y., Sarria, S., Wortman, J., Huang, J., May, G., Denning, D., Anderson, M., Zaas, A., Nierman, W. *Functional Genomic Studies of Aspergillus fumigatus Pathogenesis Using DNA Microarrays*. Resumen del primer encuentro de la Aspergillus Genomics Research Policy Committee Publications (documento 14), Abril 2004, Copenhagen
- Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y. *Lysis of Viable Yeast Cells by Enzymes of Arthrobacter luteus*. Journal of General Applied Microbiology 1974, 20: 323 - 344
- Koneman, E. Allen, S., William, J., Schreckenberger, P., Winn, W. *Diagnóstico Microbiológico*. 5 ED. Médica Panamericana. Argentina, 1999.
- Kwon-Chung, K. J. *Medical Micology*. Lea & Febiger. USA, 1992.

- Larone, D. *Medically Important Fungi, a guide to identification*. 2 ED. Elsevier. USA, 1987
- Latgé, J. *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, 12:310 – 350
- Latgé, J. *The Pathobiology of Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*. 2001 9 (8): 382 – 389
- Latgé, J. *Aspergillus fumigatus, A Saprotropic Pathogenic Fungus*. *Mycologist* 2003 17: 56 – 61
- Lin, D., Lehman, P., Hamory, B., Padhye, A., Durrý, E., Pinner, R., Lasker, B. *Comparison of Three Typing Methods for Clinical and Environmental Isolates of Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995 33 (6): 1596 – 1601
- Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., Einsele, H. *Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, 35 (12): 3311 – 3312
- Loeffler, J., Hebart, H., Brauchle, U., Schumacher, U., Einsele, H. *Comparison Between Plasma and Whole Blood Specimens for Detection of Aspergillus DNA by PCR*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000 38 (10):3830 – 3833
- Malo, J. *Antifungal Therapy for Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003 111 (5): 934 – 935
- Müller, F., Werner, K., Kasai, M., Francesconi, A., Chanock, S., Walsh, T. *Rapid Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeast and Filamentous Fungi by High Speed Cell Disruption*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, 36: 1625 – 1629
- Nierman, W., Feldblyum, T., Khouri, H., May, N., Quail, M., Wortman, J., Arroyo, J., Kim, K., Anderson, M., Denning, D. *Sequencing and Analysis of Aspergillus fumigatus Af 293*. Resumen del primer encuentro de la Aspergillus Genomics Research Policy Committee Publications (documento 31), Abril 2004, Copenhagen
- Patterson, R. *Aspergillus, a Never-Ending Story*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1997. 130 (6): 548 – 549
- Paya, C. *Fungal Infections in Solid-Organ Transplantation*. *Clinical Infectious Disease* 1993 16: 677 – 678
- Perera, J., Tormo, A., García, J. *Ingeniería Genética*. Vol I. Síntesis. España, 2002
- Reader, U., Broda, P. *Rapid Preparation of DNA from Filamentous Fungi*. *Letter in Applied Microbiology*. 1985, 1: 17 – 20
- Rinyu, E., Varga, J., Ferenczy, L. *Phenotypic and Genotypic Analysis of Variability in Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995 33(10): 2567 – 2575
- Rippon, J. *Micología Médica, Hongos y Actinomicetos Patógenos*. 3 ED. Mc Graw-Hill. México, 1990

- Roilides, E., Katsifa, H., Walsh, T. *Pulmonary Host Defences Against Aspergillus fumigatus*. Research in Immunology, 1998, 149: 456 – 465
- Samarrai, T., Schmid, J. *A Simple Method for Extraction of Fungal Genomic DNA*. Letters in Applied Microbiology. 2000, 30: 53 – 56
- Sambrook, J., Russell, D. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Vol. I. 3 ED CSHL Press. USA, 2001
- Scott, J. y Schekman, R. *Lyticase: Endoglucanase and Protease Activities That Act Together in Yeast Cell Lysis*. Journal of Bacteriology 1980, 142: 414 – 423.
- Sionov, E., Segal, E. *Polyene and Cytokine Treatment of Experimental Aspergillosis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003, 39: 221 – 227
- Składny, H., Buchheidt, D., Baust, C., Krieg-Schneider, F., Seifarth, W., Leib-Mösch, C., Hehlmann, R. *Specific Detection of Aspergillus Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 1999 37 (12):3865 - 3871
- Spencht, C., Di Russo, C., Novotny, C., Ullrich, R. *A Method for Extracting High-Molecular-Weight Deoxyribonucleic Acid from Fungi*. Analytical Biochemistry. 1982, 119: 158 – 163
- Van Burik, J., Colven, R., Spach, D. *Cutaneous Aspergillosis*. Journal of Clinical Microbiology 1998 36 (11): 3115 – 3121
- Van Burik, J., Schreckhise, R., White, T., Bowden, R. *Comparison of Six Extraction Techniques for Isolation of DNA from Filamentous Fungi*. Medical Micology. 1998, 36: 299 – 303
- Varga, J., Tóth, B., *Genetic Variability and Reproductive Mode of Aspergillus fumigatus Infection*. Genetics and Evolution 2003, 3: 3- 17
- Velegraki, A., Kambouris, M., Kostourou, A., Chavelakis, G., Legakis, N. *Rapid Extraction of Fungal DNA from Clinical Samples for PCR Amplification*. Medical Micrology. 1999, 37: 69 – 73
- Walsh, T., Lee, J. *Prevention of Invasive Fungal Infections in Patients with Neoplastic Diseases*. Clinical Infection Diseases 1993: 17 (Suppl 2): S468 – S480
- Wark, P., Gibson, P. *Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: New Concepts of Pathogenesis and Treatment*. Respirology 2001, 6: 1 – 7
- Williamson, E. y Lenning, J. *Molecular Approaches for the Diagnosis and Epidemiological Investigation of Aspergillus Infection*. Mycoses 1999 42 (Suppl 2) 7 – 10
- Wortman, J., Huang, J., Kulkarni, R., Lu, C., Anderson, M., Pertea, M., Majoros, W., Allen, J., Haas, B., Angiuoli, S., Creasy, T., White, O., Salzberg, S., Nierman, W. *Automated Annotation and Analysis of the Aspergillus fumigatus Genome*. Resumen del primer encuentro de la Aspergillus Genomics Research Policy Committee Publications (documento 43), Abril 2004, Copenhagen

Zhao, F., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., Wang, D., *Identification of Aspergillus fumigatus and Related Species by Nested PCR Targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions*. Journal of Clinical Microbiology 2001 39 (6): 2261 - 2266

Zhu, H., Qu, F., Zhu, L. *Isolation of Genomic DNAs from Plants, Fungi and Bacteria Using Benzyl Chloride*. Nucleic Acids Research. 1993, 21 (22): 5279 - 5280

www.aspergillus.man.ac.uk

www.qiagen.com

www.bioventures.com

www.gentra.com

www.dynalbiotech.com

www.mrcgene.com

9. Anexos

Anexo 9.1 Medios de cultivo

9.1.1 Agar Dextrosa Sabouraud en tubo (SDA, Dibico, México)

De acuerdo al número de tubos que se deseen obtener, se prepara el volumen necesario (10 mL de medio por cada tubo), colocando 65 g de medio liofilizado por cada litro de agua destilada.

El medio se esteriliza a 121° C por 15 minutos y se permite gelificar con el tubo inclinado a 30 grados aproximadamente. Los tubos preparados se someten a prueba de esterilidad a 30° C durante 24 horas. Pueden conservarse a 4° C hasta su uso.

9.1.2 Caldo dextrosa Sabouraud (SDB, Bioxon, México)

Se preparan 300 mL de caldo en un matraz, colocando 30 g de medio liofilizado por cada litro de agua destilada. El medio se esteriliza a 121° C por 15 minutos y se somete a prueba de esterilidad a 30° C durante 24 horas. Si el caldo no es inoculado después de la prueba de esterilidad puede conservarse a 4° C hasta por un mes.

Anexo 9.2 Colorante Azul de lactofenol

Este colorante es utilizado para la tinción de hongos filamentosos. Para preparar 100 mL del colorante, se utiliza la siguiente formulación:

fenol	20 g
ácido láctico	20 mL
glicerol	40 mL
H ₂ O destilada	20 mL

Los ingredientes se disuelven por completo en baño de agua caliente. Se adicionan 0.05 g de azul de algodón. Si es necesario, se filtra y se guarda en frasco gotero ámbar a temperatura ambiente.

Anexo 9.3 Preparación de buffers y soluciones

9.3.1 Fenol equilibrado

El fenol grado reactivo se coloca en frasco ámbar cerrado y se funde a 65° C en baño de agua (**Precaución:** evitar el contacto con piel, ojos y mucosas,

potencial cancerígeno; es recomendable utilizar bata, guantes, goggles y cubreboca).

Una vez fundido, se agrega 8-hidroxiquinoleína a concentración final de 0.1 % y se homogeniza. Se agrega un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y se determina el pH del Tris-HCl (es necesario esperar a que se separen debidamente las fases); el Tris-HCl se retira con pipeta Pasteur y se repite este paso hasta que el fenol haya equilibrado, es decir, que el pH del Tris-HCl sea de 8.0.

Cuando el fenol esté equilibrado, el Tris-HCl se retira y se adiciona Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 y se almacena a 4° C. El fenol se utiliza también en combinación con cloroformo y alcohol isoamílico, en una proporción 24:24:1, de tal forma que para preparar aproximadamente 15 mL de esta solución se miden 7.2 mL de fenol equilibrado, 7.2 mL de cloroformo y 300 µL de alcohol isoamílico; esta solución siempre se debe mezclar por inversión antes de usarse y se almacena a 4° C. La solución se debe desechar cuando se observe decolorada y es necesario realizar una preparación nueva.

9.3.2 Buffer de fosfatos salino (PBS)

El PBS se prepara de acuerdo a la siguiente fórmula:

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.34 g
K ₂ HPO ₄	1.21 g
H ₂ O destilada	1 L

El pH se ajusta a 7.2; la solución se puede esterilizar a 121° C por 15 minutos y se almacena a temperatura ambiente.

9.3.3 Buffer Tris HCl-EDTA (TE) para suspender el ADN

La concentración de este buffer es 10 mM Tris a pH 8.0, 1 mM EDTA. Para preparar 15 mL de esta solución, se pesan 23.64 mg de Tris-HCl y se disuelven en un volumen adecuado para ajustar el pH a 8.0. A esta solución se agregan 5.60 mg de EDTA y se agrega el volumen necesario de agua destilada para aforar a 15 mL. Esta solución puede conservarse a temperatura ambiente o en refrigeración (4° C).

9.3.4 Buffer de Tris-HCl-borato-EDTA (TBE) para corrimiento de electroforesis

El TBE se prepara de acuerdo a la siguiente fórmula

Tris-HCl	10.3 g
Ácido bórico	5.5 g
EDTA	0.93 g
H ₂ O destilada	1 L
ajustar pH a 8.0	

El buffer puede almacenarse a temperatura ambiente.

9.3.5 Gel de agarosa para corrimiento de electroforesis

La agarosa se pesa de acuerdo al porcentaje, ya que puede ser utilizada a 0.5, 0.7 o 1.0 %; se disuelve en 45 mL de buffer TBE 5X (22.5 mL de ddH₂O y 22.5 mL de TBE). Calentar a ebullición hasta disolución total. Cuando disminuya la temperatura de la solución a 45° C, agregar 7.5 µL de bromuro de etidio y homogenizar (**Precaución:** evitar el contacto con el bromuro de etidio y los vapores que genera al contacto con la agarosa, potencial cancerígeno). En el soporte para el gel, colocar el peine apropiado y después se vacía la agarosa para que gelifique (aproximadamente 1 hora).

9.3.6 Cloroformo:alcohol isoamílico (ChI:AIA) 24:1

Para preparar 15 mL de esta solución deben tomarse 14.4 mL de cloroformo y adicionarse 600 µL de alcohol isoamílico. La solución se mezcla por inversión y se almacena a 4° C.

9.3.7 Acetato de amonio (AcNH₄) 3 M y 7.5 M

El AcNH₄ 3 M se prepara tomando 3.4691 g; mientras que para el AcNH₄ 7.5 M se pesan 8.6727 g. La sal se disuelve en 15 mL de agua bidestilada, respectivamente; las soluciones se someten a ultrafiltración para evitar impurezas y contaminantes que afecten el proceso de extracción. Las soluciones se almacenan a temperatura ambiente.

9.3.8 Acetato de potasio (AcK) 3 M

Se pesan 4.4168 g de la sal y se disuelven en 15 mL de agua bidestilada; como en el caso del AcNH_4 , la solución se filtra para evitar impurezas y se almacena a temperatura ambiente.

9.3.9 Acetato de sodio (AcNa) 3 M a pH 5.0

Se pesan 6.1241 g de AcNa y se disuelven en un volumen adecuado; una vez disuelta, la solución debe ajustarse a pH 5.0. Posteriormente se afora a 15 mL finales. La solución se somete a ultrafiltrado y se almacena a temperatura ambiente.

9.3.10 Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %

Para preparar 50 mL de SDS al 10 % deben pesarse 5 g del detergente y se disuelven en un volumen adecuado de agua bidestilada, para después aforarse a 50 mL. Esta solución debe conservarse a temperatura ambiente (el SDS precipita cuando se somete a temperaturas bajas).

9.3.11 Etanol al 70 y 95 %

La solución de etanol 70 % requiere 70 mL de etanol absoluto; mientras que la solución al 95 % se prepara con 95 mL de etanol absoluto. Estos volúmenes se aforan a 100 mL cada uno; las soluciones se pueden almacenar a temperatura ambiente o bajo refrigeración.

9.3.12 Cloruro de sodio (NaCl) 5 M

Para preparar 15 mL de NaCl 5 M, se pesan 4.383 g de la sal y se disuelven en 15 mL de agua bidestilada. La solución se somete a ultrafiltración para eliminar impurezas que afecten el proceso de extracción; se puede almacenar a temperatura ambiente o bajo refrigeración.

Anexo 9.4 Glosario de toxicidad de los principales reactivos utilizados en la extracción de DNA

Acetato de amonio: causa irritación en ojos, piel y tracto respiratorio; si se ingiere, ocasiona dolor abdominal, náusea y vómito, la ingestión de altas cantidades provoca diuresis y envenenamiento sistémico por amonio.

Acetato de potasio: causa irritación del tracto respiratorio y enrojecimiento de ojos y piel; dosis elevadas producen disturbios gastrointestinales; tiene efecto diurético.

Acetato de sodio: causa irritación en piel, ojos y tracto respiratorio; es investigado como mutágeno.

Agarosa: ligeramente flamable; es incompatible con los ácidos y los oxidantes fuertes; el contacto con piel y ojos causa irritación.

Alcohol isoamílico: causa irritación y enrojecimiento en ojos y piel; provoca dolor de cabeza, náusea, mareo, vómito y diarrea. Altas concentraciones pueden provocar narcosis y muerte; es investigado como cancerígeno.

Alcohol isopropílico: altamente inflamable. Por inhalación provoca dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, náusea, vómitos, vértigo, somnolencia e irritación del tracto respiratorio, ojos y piel. La exposición prolongada puede producir pérdida de conocimiento. El contacto prolongado con la piel puede producir dermatitis.

Bromuro de etidio: incompatible con agentes oxidantes fuertes; ligeramente inflamable. Irritante para la piel, ojos y tracto respiratorio. Peligro potencial de mutagénesis y genotoxicidad

Cloroformo: por inhalación produce tos, somnolencia, dolor de cabeza, náuseas; en la piel y ojos produce enrojecimiento y dolor. Si hay ingestión provoca dolor abdominal y vómitos. Se ha estudiado a esta sustancia como carcinógeno para los seres humanos.

Cloruro de bencilo: altamente corrosivo, causa quemaduras, severa irritación y enrojecimiento en cualquier área de contacto. La inhalación e ingestión genera tos, edema pulmonar, dolor y quemaduras de garganta y estómago, y como consecuencia la muerte.

Cloruro de sodio: causa irritación en los ojos; dosis elevadas causan vómito y diarrea.

CTAB: causa severa irritación a la piel, ojos, tracto respiratorio y gastrointestinal; los síntomas incluyen náusea, vómito, diarrea.

EDTA: causa Irritación de la piel, ojos y tracto respiratorio; tiene baja toxicidad, pero cantidades altas pueden causar alteraciones gástricas debido al desbalance osmótico por el secuestro de iones.

Etanol absoluto: altamente Inflamable; la inhalación provoca tos, somnolencia, dolor de cabeza y fatiga; seca la piel y en los ojos hay enrojecimiento, dolor y sensación de quemazón. Si se Ingiere induce sensación de quemazón, confusión, vértigo, dolor de cabeza, falta de concentración y pérdida del conocimiento.

Fenol: combustible; la inhalación produce sensación de quemazón, tos, vértigo, dolor de cabeza, náuseas, jadeo, vómitos, pérdida del conocimiento que procede a shock, colapso, efecto anestésico local, convulsiones, coma, muerte. En los ojos se induce pérdida de visión, quemaduras profundas graves. Si es ingerido provoca dolor abdominal, convulsiones, diarrea, dolor de garganta, coloración oscura de la orina. Su vapor es corrosivo para los ojos, la piel y el tracto respiratorio y su inhalación puede originar edema pulmonar.

2 - mercaptoetanol: altamente peligroso, sus vapores irritan las mucosas y el tracto respiratorio, provocando dolor de garganta, alteraciones respiratorias, tos, enrojecimiento y dolor en los ojos; si se Ingiere, ocasiona vómito, dolor abdominal y de garganta.

SDS: nocivo en contacto con la piel, irrita ojos y piel; se requiere vigilancia médica hasta, por lo menos, 48 horas después de un accidente.

Tris-base y Tris-HCl: causa irritación de ojos, piel y tracto respiratorio. Origina irritación y enrojecimiento de la boca, esófago y TGI, provocando náusea, diarrea y vómito. Una dosis elevada ocasiona debilidad, colapso y coma.