



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Implementación de la reacción en
cadena de la polimerasa (PCR) empleando el par
de iniciadores 18S-A1/18S-A2 para la identificación
de *Aspergillus***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

HUGO AXEL CEJA RANGEL

ASESORAS:

DRA. GABRIELA BARCENAS MORALES

M. EN C. IDALIA C. AVILA MIYAZAWA



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
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 :
Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
empleando el par de iniciadores 18S-A1/18S-A2 para la
identificación de Aspergillus.

que presenta el pasante: Hugo Axel Ceja Rangel
con número de cuenta: 300290244 para obtener el título de :
Químico Farmaceutico Biólogo

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 17 de Febrero de 2009

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Gabriela Barcenás Morales</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Leticia Cubillo Carrillo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. C. Maritere Domínguez Rojas</u>	

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto las puertas y formarme como un profesional.

A mi tutora, la Dra. Gabriela Barcenas Morales por su orientación y dedicación de su tiempo para la realización de este trabajo, así como las facilidades otorgadas para llevarlo a cabo.

A mi tutora, la M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa por sus palabras de aliento, su apoyo y dedicación de tiempo a la realización del presente trabajo.

Gracias a mi tío el Dr. Javier Cabiedes Contreras por asesorarme en la escritura de este trabajo.

Gracias a los integrantes del jurado, el MVZ. Gerardo Cruz, El Dr. Enrique Salas, la M. en C. Maritere Domínguez y a la QFB. Leticia Cubillo, por su orientación y tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo.

Gracias a dios por permitirme superarme y ser mejor ser humano cada día.

DEDICATORIAS

Para mis padres Samuel Ceja y Blanca Rangel, sin su ayuda no sería lo que soy ahora, gracias por su inmenso apoyo y palabras de aliento, los amo, nunca lo olviden.

Para mis hermanos, Diego y Denisse, gracias por estar conmigo y para que luchen por obtener lo que quieren.

Para Diana, gracias por tu inmensa ayuda, por estar conmigo y apoyarme en todo. Ich liebe dich.

Para mis amigos, Leti (gracias por tu ayuda y orientación), María (chucha), Pedro Bautista, Miriam y Nadia Ibarra, Marduck, Jacobo, Dalila y Carmen, gracias a todos por estar conmigo y los gratos momentos que vivimos juntos.

Y para todos aquellos que me ayudaron y me dieron animo para seguir adelante, gracias.

ÍNDICE

Figuras y Tablas

Lista de abreviaturas

Resumen

INTRODUCCION

Generalidades de *Aspergillus fumigatus*

Patogenia de *A. fumigatus*

Respuesta inmune y la aspergilosis

Manifestaciones clínicas

Diagnóstico de las aspergilosis

Pruebas microbiológicas y de histología

Pruebas de imagen

Pruebas inmunológicas

Métodos de biología molecular

Tratamiento

Aspectos generales del genoma de *A. fumigatus*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Componentes de la PCR

Electroforesis en geles de agarosa

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

Objetivo general

Objetivos particulares

METODOLOGÍA

Diagrama de flujo general

Preparación de medios de cultivo

Crecimiento y conservación de *A. fumigatus*

Microcultivos

Obtención del micelio de *A. fumigatus* por inoculación de esporas

Extracción de DNA de *A. fumigatus*
Estandarización de la cantidad de enzima empleada, diluyente óptimo y tiempo de incubación del hongo
Cuantificación y determinación de la pureza del material genético de *A. fumigatus*
Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de la integridad del DNA extraído
Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Aspergillus fumigatus*
Determinación del porcentaje de gel de agarosa óptimo para el corrimiento de los amplicones resultantes de la PCR
Características de los iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus* y de los iniciadores de β actina utilizados en la PCR
Cuantificación de los iniciadores
Estandarización de la PCR para la amplificación del fragmento de gen 18S rRNA y de β actina de *Aspergillus fumigatus*
Electroforesis en gel de agarosa para la observación de los amplicones de la PCR
Análisis de la intensidad de amplicon empleando el programa Kodak 1D 3.6

RESULTADOS

Conservación, crecimiento e identificación de la cepa de *A. fumigatus*
Extracción y cuantificación de DNA de los cultivos de *A. fumigatus*
Análisis de la integridad del DNA de *A. fumigatus*
Determinación del porcentaje óptimo de agarosa en geles para el análisis de los productos de las PCRs
Estandarización de la PCR para la amplificación de genes de *A. fumigatus*
Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación de los fragmentos de genes de 18S rRNA y β actina de *Aspergillus*
Evaluación de la especificidad de los iniciadores 18S A1/ 18S A2 con DNA diferentes
Determinación semicuantitativa de la intensidad de los amplicones de 504 pb del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

Perspectivas

ANEXO

BIBLIOGRAFÍA

INDICE DE FIGURAS

- Características de las hifas sexuales de *A. fumigatus*
- Representación de la reacción en cadena de la polimerasa
DNA resultante en el transcurso de los ciclos
- A. fumigatus* estructuras sexuales típicas de género y especie
- Análisis de la integridad del DNA de *A. fumigatus*
- Análisis electroforético de los amplicones en geles de
agarosa a diferentes porcentajes
- Análisis electroforético para la detección del producto
específico de β actina en gel de agarosa al 2%
- Análisis electroforético de la titulación de DNA y de $MgCl_2$,
con concentración de iniciadores a 40 nM para la amplificación de un
fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*
- Titulación de DNA y de $MgCl_2$, con concentración de iniciadores
a 2 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de
A. fumigatus mediante el análisis electrofororético
- Análisis electroforético de la titulación de DNA y concentración de
 $MgCl_2$, con concentración de iniciadores de 1 nM
para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*
- Titulación de iniciadores a 40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM para la
amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*
mediante el análisis electrofororético
- Titulación de DNA de hongo, humano y bacteria, y de
concentración de $MgCl_2$ con 40 nM de iniciadores para la
amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*
para definir la especificidad de los mismos
- Análisis electroforético de la titulación de DNA de bacteria y humano e
iniciadores (40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM) para la amplificación de un fragmento
del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*
- Análisis electroforético de la titulación de DNA fúngico
y humano, concentración de $MgCl_2$ con concentración de

iniciadores de 2 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*

Análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas obtenidas mediante el corrimiento electroforético de los productos de la PCR con los iniciadores 18S A1/18S A2

INDICE DE TABLAS

Propiedades del genoma *Aspergillus fumigatus* Af293

Características de los iniciadores 18S A1, 18S A2 y de los iniciadores de β actina

Técnica de PCR para la estandarización de la amplificación del gen de β actina

Estandarización de la técnica de PCR utilizando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus*

Técnica de la PCR para la amplificación del fragmento 18S rRNA *Aspergillus* con DNA fúngico, de humano y de *Bordetella spp.*

Condiciones de trabajo de la técnica de la PCR para la obtención de productos analizados con programa Kodak 1D 3.6

Concentración y valores de pureza de las muestras de DNA de *A. fumigatus* obtenidas con diferentes cantidades de liticasa

Valores de concentración y pureza del DNA de *A. fumigatus*, de cultivos de 24 y 72 horas para obtención de micelios

Resumen

La aspergilosis, enfermedad emergente en personas inmunosuprimidas, ha tenido un gran impacto en receptores de trasplante de medula ósea y órganos sólidos. Existen técnicas de gabinete que no tienen la eficacia para realizar el diagnóstico adecuado, principalmente la técnica serológica de detección de galactomanano y el cultivo microbiológico de esputo e inmunohistoquímica de biopsia de tejido infectado, entre otras.

Actualmente, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el DNA de *Aspergillus* ha surgido como una herramienta para el auxilio del diagnóstico. La obtención de DNA fúngico puro y en cantidad suficiente para su estudio es imprescindible para su realización.

El objetivo principal del presente trabajo, fue lograr la estandarización de la técnica de la PCR para la detección de DNA fúngico con el propósito de ser aplicada como una prueba más confiable y sensible para el diagnóstico temprano de aspergilosis.

Para lograr el propósito de este estudio, se empleó una cepa pura de *Aspergillus fumigatus*, la cual se identificó mediante la técnica de microcultivo; asimismo se determinó la cantidad óptima de la enzima liticosa y el tipo de diluyente (agua desionizada o PBS) para el realizar el pretratamiento del hongo y la posterior extracción de su DNA, relacionando la influencia del tiempo de crecimiento del cultivo en Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) con el rendimiento de DNA extraído.

Posteriormente se determinaron las condiciones óptimas de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *Aspergillus fumigatus* empleando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 y de un control interno del sistema (β actina), que sirve para observar la funcionalidad del sistema y de los reactivos, por lo que se estandarizaron 3 componentes importantes (cantidad de DNA del hongo, concentración de $MgCl_2$ y concentración de iniciadores).

También se determinó el porcentaje óptimo de agarosa en los geles, con el cual se deben realizar los corrimientos electroforéticos de los productos de las PCR, adicionalmente, se analizó la intensidad de bandas de los amplicones en los geles de agarosa con ayuda del software Kodak 1D 3.0, obteniendo los valores en unidades arbitrarias de intensidad (UAI) para evaluar las mejores condiciones de amplificación.

Los resultados indicaron que las condiciones más adecuadas para el pretratamiento del hongo y la extracción de su DNA se lograron empleando 500 U de liticosa resuspendidas en PBS, con 24 horas de crecimiento fúngico en medio de cultivo CDS; con respecto a las condiciones óptimas de la PCR, estas se presentaron al utilizar 250 ng de DNA, 5 mM de $MgCl_2$ y 2 nM de iniciadores obteniéndose valores de intensidad de las bandas de 50 UAI, además de que se demostró como se elimina la inespecificidad de la técnica de la PCR cuando se empleó DNA de otras especies (humano y bacteriano). Finalmente para la amplificación de

un fragmento del gen de β actina, se logró la obtención del producto específico esperado empleando 1000 ng de DNA, 10 mM de $MgCl_2$ y 40 nM de iniciadores.

Con la realización del presente trabajo se logró el desarrollo y la implementación de la técnica de la PCR para identificar a *A. fumigatus*, permitiendo la obtención de resultados prometedores, los cuales se podrían utilizar como una herramienta adicional para el diagnóstico de la aspergilosis, y ser una valiosa aportación que ayude a un adecuado tratamiento en el control de la infección temprana causada por este hongo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de *Aspergillus fumigatus*

El género *Aspergillus* es de los hongos más comunes ampliamente diseminados en el ambiente, crecen en hojas muertas, granos almacenados, suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición como estiércol de aves y fertilizantes, teniendo una distribución universal, en las casas se puede encontrar en el polvo y los alimentos. La Figura 1.1. muestra la estructura general de *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (Alcalá, L., *et al*, 2008), el cual se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios, estas se desprenden a partir de fiálides y a su vez de métulas que son parte de las vesículas. Las características macroscópicas del hongo son: micelio blanco, reverso incoloro, amarillento, marrón rojizo o verde, textura aterciopelada a flocosa, plana o con surcos radiales, las esporas son de característico color café oscuro similar al humo, es clasificado como un hongo filamentoso hialino ubicuo (Abarca, M., 2000).

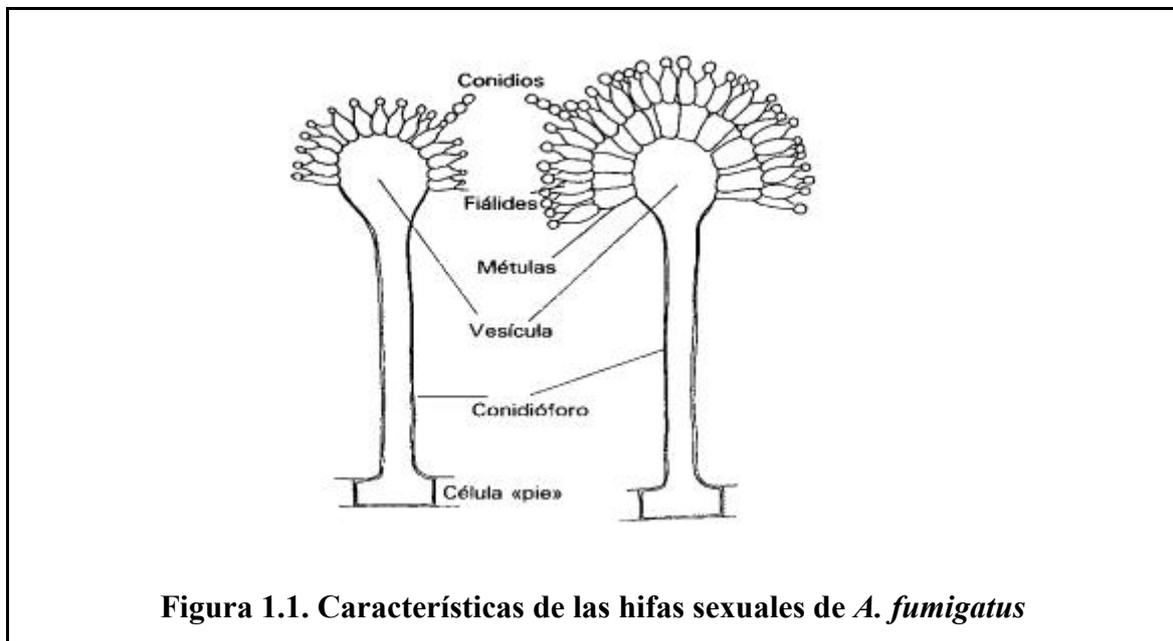


Figura 1.1. Características de las hifas sexuales de *A. fumigatus*

Los hongos considerados como oportunistas, incluido el género *Aspergillus*, de los cuales sin duda el más importante es *A. fumigatus*, responsable de la mayoría de los procesos patógenos ocasionados por este género, al aumentar el número de casos de individuos inmunocomprometidos. Aunque varias especies pueden estar implicadas, *A.*

fumigatus y *A. flavus* son las especies patógenas más frecuentes (Latgé, J., *et al*, 1999). Se han descrito brotes nosocomiales de aspergilosis, relacionados con trabajos de construcción en áreas del hospital o sus alrededores, donde están internados enfermos con neutropenia o receptores de trasplantes. Otro factor favorecedor a que se presente la enfermedad lo constituye el tratamiento prolongado con inmunosupresores del tipo de los corticoides. Algunas cavidades generadas previamente por hongos patógenos u oportunistas observadas en los pulmones pueden haber sido causadas por infecciones previas por otros agentes infecciosos como histoplasmosis, tuberculosis, sarcoidosis, absceso pulmonar, fibrosis quística u otras alteraciones como cáncer pulmonar (Tekaiia, F. y Latgé, J., 2005).

Las aspergilosis constituyen un grupo de enfermedades que en los últimos años han alcanzando una gran importancia, por su participación en el desarrollo de asma alérgico, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma y aspergilosis invasora (Latgé, J., 1999). La patología mas grave asociada a *A. fumigatus* es la aspergilosis invasiva, alteración que afecta mayormente a individuos inmunocomprometidos, por lo que se trata de una patología directamente relacionada con personas que han sido sometidas a trasplante y aquellos que se encuentran bajo terapias con fármacos citotóxicos. En 1993, Spreadbury y colaboradores reportaron que la aspergilosis también se relaciona con pacientes con fibrosis quística. En el paciente inmunocomprometido, especialmente neutropénico, la enfermedad adopta una forma invasiva y diseminada grave, ya que al crecer el hongo puede generar múltiples complicaciones como: compresión de tejidos e insuficiencia respiratoria, exceso de secreciones mucosas, etc. (Spreadbury, *et al*, 1993; Sanchez, V., *et al*, 2003).

1.1.1. Patogenia

Entre las infecciones sistémicas graves causadas por hongos patógenos, la incidencia de aspergilosis aparece en segundo lugar, sólo superada por las infecciones por *Candida*, sin embargo, las aspergilosis son las que producen una mayor mortalidad (Sutton P, *et al*, 1994).

La aspergilosis se produce como consecuencia de la inhalación de esporas contenidas en el aire, por lo que los senos paranasales y los pulmones son los sitios en que se asienta primariamente la enfermedad. Las esporas, también pueden invadir el oído externo y la piel traumatizada, y en personas inmunocompetentes pueden actuar como un potente alérgeno, colonizar bronquios o cavidades preexistentes, donde posteriormente se desarrollan (Koneman, E., 1999).

Entre los factores involucrados en la patogenia de este hongo, se encuentran: el tamaño pequeño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que puedan causar infección; su capacidad de crecer a 37 ° C, le facilita afectar al humano; su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y su gran capacidad para invadir vasos sanguíneos (Arnou, P. M., *et al*, 1978). También se encuentra la liberación de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos, como la elastasa, la restrictocina, la fumigatoxina, serinproteasa alcalina, metaloproteasa, aspártico-proteasa, quimi tripsina, las cuales actúan rompiendo elastina en el tejido pulmonar y degradan colágeno, fibrinógeno y laminina, las toxinas poseen también una potente acción histolítica. Especial importancia se le ha dado a la actividad de elastasa de *A. fumigatus* porque degrada la elastina que se encuentra en los pulmones y por eso tiende a ser el órgano más afectado por el hongo (Holden DW, *et al*, 1994).

Sin embargo, las moléculas antes mencionadas no son las únicas que causan daño a su hospedero, también han sido descritas otras como: Mitogilina de 40 kDa, con acción citotóxica (Moser M, *et al*. 1992); una metaloproteasa de alrededor de 40 kDa, con actividad colagenolítica (Holden DW, *et al*, 1994); galactomanano, antígeno secretado al medio (Latgé JP, *et al*, 1994); una proteína similar a las proteínas de choque térmico que podría jugar un papel importante en la inmunoregulación contra la aspergilosis (Kumar, A., *et al*, 1993); factores cilioinhibidores que ayudan a la adherencia en tejidos (Amitani, R., *et al*, 1995); y la gliotoxina, que es una toxina secretada por el hongo, con efecto inmunosupresor *in vivo* (Bauer, J., *et al*, 1989). También algunos componentes de la pared celular como: la β (1-3)-glucano, galactomanoproteínas (Afmp1 y Afmp2), enzimas quitina sintetasas, y la inhibición de la producción de metabolitos dependientes de oxígeno (NO, H₂O₂). Además, el hongo produce diversas toxinas como serinproteasas, alérgenos (Asp fl), proteasas y fosfolipasas B y C. Algunos genes y moléculas se han relacionado con la evasión de la

respuesta inmune, como la capa *rodlets*, y la melanina-DHN de los conidios (Koneman, E., 1999).

La capacidad de adaptarse a los cambios a distintas condiciones tróficas es un atributo esencial para la virulencia de *A. fumigatus*, por citar algunas: la obtención de hierro mediante sideróforos de tipo hidroxamato (ornitina monooxigenasa/SidA) obtención de fósforo (*fos1*, *fos2* y *fos3*), cascadas de transducción de señales que regulan la morfogénesis y/o la utilización de nutrientes como el nitrógeno (*rasA*, *rasB*, *rhbA*), ruta de señales de transducción de AMPc-Pka, la activación y expresión de algunos genes a una temperatura de 37 °C (Latgé JP, *et al*, 1994).

1.1.2. Respuesta inmune y la aspergilosis

En los últimos años, el conocimiento de la relación entre este patógeno y la respuesta inmune del hospedero, existe mayor información y por lo tanto se han abierto nuevas vías de investigación. Se ha detectado la participación en la infección tanto de células no especializadas (endoteliales, epiteliales de la traquea y alveolos) como especializadas (células asesinas naturales o NK y células dendríticas). Los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP) y los receptores que reconocen esos patrones (PRR); como por ejemplo los receptores tipo Toll (TLR-2 y TLR-4) pueden influir en la respuesta inflamatoria y el perfil de citocinas dominante, y por tanto en la respuesta de linfocitos T cooperadores (Th) contra la infección. Dos líneas de defensa son responsables de la inmunidad innata del hospedero contra *A. fumigatus*, los macrófagos alveolares (mayormente) y los neutrófilos (Lagté, *et al*, 2001).

Por otra parte, con respecto a la adhesión de las esporas 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 del hospedero a un componente de la membrana del epitelio o endotelio, tal como el fibrinogeno, laminina o fibronectina (Roilides, E., *et al*, 1998).

Cuando existe una falla de la respuesta en conjunto de células polimorfonucleares, macrófagos y células mononucleares, resulta en la invasión del tejido y parece ser la principal razón de la aspergilosis invasiva (Latgé, *et al*, 2003). Las citocinas normales que contribuyen en el control de la infección por el hongo son: factor de necrosis tumoral α , el interferon γ y la interleucina 12 (Roilides, E., *et al*, 1998).

1.1.3. Manifestaciones clínicas

Es muy importante reconocer que *Aspergillus* puede ser un colonizador con capacidad de causar enfermedad alérgica, infección local o cuadros invasivos de gran gravedad. Por lo tanto, se debe diferenciar cada aspergilosis para tratarla adecuadamente. (Arenas, G., *et al*, 2003).

Dentro de las clasificadas como enfermedades alérgicas producidas por el género *Aspergillus*, se encuentra la aspergilosis alérgica que afecta principalmente a pacientes asmáticos y su principal causa es por la inhalación de esporas que se pueden encontrar en el medio ambiente. También la sinusitis y sinusitis alérgica, en la que los senos paranasales están ocupados por moco rico en eosinófilos e hifas. La rinosinusitis aguda afecta, principalmente a pacientes inmunocomprometidos, mientras que la crónica puede aparecer en pacientes inmunocompetentes. En el primer caso no es rara la afectación de tejidos contiguos e incluso llega a afectar el sistema nervioso central por extensión local o por vía sanguínea, con otras complicaciones severas como producción de infartos cerebrales, meningitis o abscesos intracraneales (Arenas, G., *et al*, 2003).

Otra es la aspergilosis broncopulmonar alérgica donde el paciente presenta eosinofilia, infiltrados pulmonares hemorrágicos, y molestias pulmonares; las IgE totales y las IgG *anti-Aspergillus* en suero están elevadas. En casos crónicos puede aparecer fibrosis pulmonar con pérdida gradual de la función pulmonar. La exposición prolongada vuelve susceptible a un individuo a presentar una respuesta inmune alérgica. Los síntomas aparecen varias horas después de la exposición y consisten en tos seca, disnea y, en ocasiones, fiebre. El mucus puede obstruir la vía aérea y causar disminución del volumen pulmonar; a menudo la enfermedad evoluciona a bronquiectasias y fibrosis. Por mecanismo de hipersensibilidad también puede producirse broncoalveolitis alérgica (Arenas, *et al*, 2003).

Dentro de las enfermedades clasificadas como aspergiloma, solo se ubica el aspergiloma o bola fúngica, son producidos por colonización del hongo de cavidades previamente formadas durante otras infecciones (tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis o bronquiectasias). Pueden ser asintomáticos o cursar con salida de sangre procedente del tracto respiratorio, sobreinfección bacteriana o invasión tisular. Cuando el agente llega al alveolo sano, es eliminado por los macrófagos alveolares, pero si se introducen en cavidades preformadas, epitelizadas donde no hay macrófagos, puede desarrollarse una masa miceliar. En individuos inmunocompetentes el aspergiloma provoca enfermedad cavitaria en el 10 a 15% de los pacientes (Latgé, J., 1999).

Finalmente, la última clasificación son las aspergilosis invasivas (AI), las cuales se caracterizan por la infección diseminada a diferentes órganos vitales, afectando uno o varios tejidos, pudiendo ser invasiva o seminvasiva. Por otra parte, se puede desarrollar después de trasplante de órganos en pacientes inmunocomprometidos, con cáncer, SIDA y pacientes con neutropenia (Florent M., *et al*, 2006). Es la principal causa de muerte en pacientes con tratamientos hematológicos. La incidencia es estimada de 5 a 25% en pacientes con leucemia aguda, y 0.5 a 5% después de tratamiento citotóxico de enfermedades sanguíneas y trasplante de órganos sólidos, más comúnmente en trasplante de corazón y pulmón (19 a 26%) y enumerado en orden decreciente: hígado, corazón, pulmón, y destinatarios de trasplante de riñón (1 a 10%) (Latgé, J., 1999).

La aspergilosis pulmonar invasiva (API) es la más importante y común que se presenta en los pacientes inmunocomprometidos, es una infección fúngica necrosante de tejidos invadidos. Como agente infeccioso tiene un importante tropismo vascular, ocasiona trombosis y necrosis isquémica con la consecuente formación de cavidades. Según el grado de deterioro inmunitario puede adoptar la forma crónica o aguda. En los últimos años la enfermedad API ha ido en aumento. En pacientes con leucemia, la incidencia oscila entre el 5-24%, y en trasplantados de órganos sólidos entre el 1 y el 10% (Warnock, D., 2007). Las manifestaciones clínicas suelen comenzar con la aparición de fiebre, seguida de síntomas respiratorios, dolor torácico, tos, taquipnea o tos con sangre. La infección puede diseminarse por vía circulatoria y extenderse a otros tejidos, produciendo hemorragias en ocasiones fatales y complicaciones severas (Blanco, J., *et al*, 1998).

Entre otras aspergilosis invasivas se citan la aspergilosis invasiva aguda del pulmón, traqueobronquitis y aspergilosis bronquial obstructiva (Blanco, J., *et al*, 1998) y aspergilosis pulmonar necrosante crónica (Lalgé, 1999). Todas las anteriores con síntomas muy parecidos, variando principalmente en la gravedad de la enfermedad.

Actualmente, las AI son reconocidas como una de las principales infecciones fúngicas en pacientes con cáncer, solo que la verdadera incidencia es subestimada por los malos métodos de diagnóstico. En contraste es raramente encontrada en pacientes inmunocompetentes (Lalgé, J., 1999).

1.1.4. Diagnóstico de las aspergilosis

Los métodos diagnósticos para la detección de las diversas aspergilosis, se dividen en varios tipos, los más comúnmente usados, se describen a continuación.

1.1.4.1 Pruebas microbiológicas y de histología

El diagnóstico de la forma invasiva se hace por demostración de la presencia y la invasión del agente fúngico en el tejido infectado (biopsia) y el aislamiento del microorganismo en cultivo, aunque los datos clínicos y radiológicos son de gran ayuda, el diagnóstico de aspergilosis invasiva debe ser establecido mediante la combinación de datos histológicos (visualización de hifas del género de *Aspergillus*) y microbiológicos (visualización de hifas en el examen en fresco y aislamiento de *Aspergillus* en cultivo), dado que ninguno de ellos puede, por sí sólo, asegurar el diagnóstico. Las tinciones histológicas más utilizadas son la tinción de PAS (Ácido peryódico Schiff) o Gomori metanamina-plata y hematoxilina-eosina, que permiten visualizar filamentos septados con ramificaciones en ángulo agudo, aunque esta última no es útil cuando hay necrosis (Pemán, J., 2000).

Una ventaja es que *Aspergillus* no es exigente en sus requerimientos nutritivos, tiende a crecer bien en casi todos los medios de cultivo (SDA, CDS), tanto para bacterias como para hongos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y los

micelios pueden ser visibles a las 48 horas de incubación sobre el medio de cultivo utilizado, aunque también crece a los 25 °C (Pemán, J., 2000).

En la interpretación de los resultados microscópicos, se debe tener en cuenta que *Aspergillus spp.* puede ser un contaminante del ambiente, estar presente en los alimentos ingeridos o ser saprofitas de la orofaringe o la garganta, por lo que la presencia de hifas en esputo no implica padecimiento de la enfermedad. Por otra parte, algunos autores han demostrado recientemente que la centrifugación de la muestra y el examen en fresco del sedimento incrementan de forma importante la utilidad del procedimiento. La visualización directa se realiza con KOH, con o sin componentes fluorescentes, como el blanco de calcoflúor. El examen en fresco para hongos de muestras procedentes de pacientes inmunosuprimidos debe ser realizado con rapidez por un experto, dado que la información que el profesional proporcione puede ser de trascendencia vital para el paciente (Pemán, J., 2000).

Siempre que sea posible, es importante demostrar la presencia del hongo patógeno por cultivo para distinguir la aspergilosis de otras infecciones por hongos filamentosos. Los cultivos sanguíneos tienen una utilidad limitada ya que los resultados no suelen ser positivos incluso en casos de infección diseminada. El lavado broncoalveolar (BAL), la aspiración percutánea transtorácica o la biopsia toracoscópica asistida por video son procedimientos estándar para establecer el diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva. Siempre que sea factible, se cultivan las muestras obtenidas a través de estos procedimientos en medios específicos para el crecimiento óptimo de las especies de *Aspergillus* (Munoz, P., *et al*, 2003; Horvath, JA, *et al*, 1996). No obstante, es probable que los resultados de los exámenes citológico y patológico, los frotis directos y los cultivos resulten falsos negativos para las muestras clínicas de los pacientes que están recibiendo tratamiento antimicótico sistémico y en los casos en los que no pudo efectuarse un procedimiento diagnóstico directamente en el área afectada. Por lo tanto, la falta de cultivos o frotis directos positivos no descarta el diagnóstico de aspergilosis invasiva. Además, aislar las especies de *Aspergillus* de las muestras clínicas por medio de procedimientos invasivos puede resultar poco práctico en pacientes graves, con concentraciones bajas de plaquetas o con trastornos avanzados de coagulación. En consecuencia, a menudo se utilizan otros síntomas de infección (tos con

sangre, fiebre) en la evaluación de pacientes en riesgo de contraer aspergilosis invasiva (Munoz, P., *et al*, 2003; Horvath, JA, *et al*, 1996).

1.1.4.2. Pruebas de imagen

Otro diagnóstico fundamental es el radiológico que se realiza a partir de la visualización de cavidades con una masa opaca rodeada de aire que se mueve cuando el paciente cambia de postura. Las imágenes se observan mucho mejor empleando tomografía axial computarizada (TAC) o resonancia magnética que utilizando radiología simple. El diagnóstico radiológico siempre debe acompañarse de la presencia de niveles altos de IgG contra *Aspergillus* y la presencia, generalmente intermitente, de tinciones de las secreciones respiratorias y cultivos para *Aspergillus*. En ocasiones los aspergilomas pueden localizarse en los senos maxilares dando lugar a cefalea, rinorrea y secreción postnasal. La tomografía axial computarizada, el empleo de rayos X y la tomografía computarizada de alta resolución (CT scan), también ayudan a definir cavidades ocupadas por el hongo (Arenas, G., *et al*, 2003).

1.1.4.3. Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas de detección de anticuerpos constituyen un método diagnóstico de gran utilidad en los aspergilomas, ya que aproximadamente el 90% de los pacientes tienen títulos altos de anticuerpos. La técnica más utilizada es la inmunodifusión, aunque se han desarrollado otras con mayor sensibilidad, como los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, BALISA, electroinmunotransferencia), radioinmunoensayo e inmunofluorescencia indirecta (Arenas, G., *et al*, 2003). Las pruebas inmunológicas más importantes se citan a continuación:

La detección del antígeno galactomanano parece ser una prueba útil en el diagnóstico temprano en pacientes con aspergilosis invasiva (AI). Cuando existe AI, el antígeno es liberado en la sangre y pueden ser detectados, en suero, orina, lavado bronquioalveolar, fluido pericardial y fluido cerebrospinal (Verweij., *et al*, 1999). El ELISA detecta el polisacárido galactomanano específico de hongos y en conjunto con el empleo de la técnica de la PCR, se confirma el diagnóstico de aspergilosis (Florent M,

et al, 2006). La técnica de ELISA se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, el anticuerpo que detecta galactomanano (anti-galactomanano), esta adherido al soporte donde se llevara a cabo la reacción con el antígeno presente o no en la muestra biológica y a su vez se agrega un segundo anti-galactomanano marcado con una enzima, por lo tanto la reacción quedará inmovilizada y será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un elisometro (Verweij., *et al*, 1999).

La técnica de ELISA tiene un límite de detección de 0.5 a 1 ng de galactomanano/mL, con una sensibilidad y especificidad cercana al 96% (Maertens, *et al*, 1997) se han reportado falsos positivos de la reactividad del ELISA sin AI, este podría ser causado por la absorción del galactomanano a través del tracto gastrointestinal, inducida por daño en el mismo (Blijlevens, *et al*, 2000), también se han reportado falsos negativos, pero se desconoce su origen.

La detección del β -D-glucano se puede determinar con alta sensibilidad y especificidad (Einsele, *et al*, 1997), el cual es un componente de la pared del hongo, por lo que solo lo contienen los micromicetos y es un buen indicador de infección fúngica sistémica, es detectable en sangre y otros fluidos estériles. El método depende de la activación del glucano por el factor de coagulación G (extraído de cangrejo) el cual inmunoprecipita al entrar en contacto con este polisacárido, por lo tanto la reacción se lleva a cabo sobre placas de vidrio y se visualiza si hay o no formación de precipitado al reaccionar la muestra problema con el factor de coagulación G, el método reporta especificidad y sensibilidad del 90% (Verweij, *et al*, 2000). La utilidad de la detección del (1-3)- β -D-glucano en el diagnóstico de la aspergilosis invasora se ve limitada por la escasez de estudios, la dificultad para obtener las pruebas comercializadas tradicionales y su alto costo (Mori T, *et al*, 1995). Los resultados falso positivos de glucano pueden presentarse en diversos contextos, como a través de tubos para muestras de sangre, tamices y filtros de membrana del tipo en profundidad para procesamiento de sangre contaminados con glucanos, y pruebas *in vitro* que utilizan diversos antibióticos (p. ej., algunas cefalosporinas, carbapenemas y ampicilina más sulbactam) (Marty, FM, *et al*, 2006).

También se usa la prueba intradérmica para detectar hipersensibilidad contra *Aspergillus*, donde se inyecta un extracto de varias especies del género del hongo (dependiendo de la marca comercial) y se observa si después de 2 a 3 días, hubo inflamación de la zona inyectada.

En general los métodos empleados para la detección tienen alta especificidad, pero la sensibilidad es baja, que hace necesario un seguimiento prospectivo y seriado de los pacientes. En la actualidad no forman parte del conjunto de técnicas diagnósticas de uso común en hospitales (Péman, J., 2000).

1.1.4.4. Métodos de biología molecular

Las limitaciones en el diagnóstico de infecciones con micromicetos han dado lugar al desarrollo e investigación de técnicas de laboratorio que permitan un diagnóstico más rápido y específico; así es como empezó el desarrollo de la técnica de la PCR para su identificación, en conjunto y apoyo con las demás técnicas, comúnmente aplicadas cuando se sospecha de aspergilosis. (Chen, S., *et al*, 2002).

Los géneros de *Aspergillus* más estudiados por técnicas de biología molecular son tres principalmente: *A. nidulans*, *A. niger*, y por último el menos estudiado y menos desarrollado es *A. fumigatus*. A partir de los estudios con los iniciadores del hongo mencionado, se han hecho comparaciones entre los estudios de estas especies (Brookman, J y Denning, D. 2000).

Algunos de los primeros estudios de Biología molecular en *A. fumigatus* se iniciaron en 2001 por el 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; www.aspergillus.man.ac.uk).

PCR. Es la técnica más estudiada, en los últimos años se han hecho esfuerzos para lograr la identificación de DNA de hongo en muestras biológicas, las investigaciones de mayor impacto son realizadas sobre la amplificación del fragmento 18S rRNA el cual codifica para un gen multicopia íntegro de los genomas fúngicos conocido como DNA ribosomal (R Bialek, *et al*, 2007). Existen varios protocolos para

la detección de DNA fúngico en muestras humanas mediante la PCR, las más recientes emplean iniciadores universales, que detecta un gran número de hongos (Walsh J. *et al*, 1995, Einsele *et al*, 1997, Van Buriel, *et al*, 1998); por otro lado, algunas evaluaciones detectan la amplificación específica de productos mediante hibridación con sondas marcadas con radiactividad, otros estudios han reportado que la PCR logra detectar el DNA fúngico con alta sensibilidad usando sangre completa (Einsele, *et al*, 1997) evidenciando la presencia de *A. fumigatus* dos días posteriores a la aparición de los primeros síntomas clínicos (Herbart H, *et al*, 2000).

Además de detectar la presencia de DNA fúngico, la PCR es de gran ayuda para realizar el seguimiento de la terapia antifúngica; por otra parte, se han realizado distintos estudios para identificar material genético a partir de diferentes muestras (plasma, suero y sangre completa), por ejemplo, cuando se extrajo DNA a partir de muestras de plasma en comparación con muestras de sangre completa, la sensibilidad fue distinta para ambas, siendo mejor en sangre completa (Loeffler, *et al*, 2000).

La PCR ha demostrado ser una herramienta útil para la detección de DNA fúngico (R., Bialek, *et al*, 2007). Por otra parte, el mecanismo por el cual el DNA del hongo es liberado al torrente sanguíneo es desconocido, se sospecha que es liberado a través de las hifas que infectan al tejido, eso facilita una mejor identificación de material genético proveniente del microorganismo (Herbart H, *et al*, 2000).

Otros métodos en desarrollo e investigación clínica son: Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP), amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA) y el estudio de los microsatélites (Brookman, J y Denning, D. 2000; Williamson, E., y Lenning, J, 1999).

La técnica de RFLP es un método utilizado en la tipificación de *A. fumigatus*; las enzimas de mayor utilidad son *Sal I*, *Xho I* y *Xba I* (Lin, D., *et al*, 1995; Rinyou, E., *et al*, 1995). El análisis y realización de RFLP requiere mucho tiempo (electroforesis, transferencia e hibridación) y grandes cantidades de DNA. El proceso dura más de 5 días para un número limitado de muestras, es por eso que no es una opción viable para

uso común de diagnóstico (Bart-Delabesse, E., *et al*, 1998; Varga, J. y Toth, B., *et al*, 2003).

El RAPD es otro método usado en la tipificación de cepas de *A. fumigatus*, el desarrollo de huellas génicas de los aislados de las cepas es de gran utilidad en estudios epidemiológicos (Rinyou, E., *et al*, 1995). Es una técnica parecida la PCR solo que los iniciadores tienen diferentes poderes discriminatorios. El oligonucleótido de mayor uso es el R108 (GTATTGCCCT) el cual brinda la mejor diferenciación de cepas, aunque otros iniciadores y sus combinaciones también han dado buenos resultados (Lin, D., *et al*, 1995; Varga, J., y Toth, B., *et al*, 2003).

El primer paso para el desarrollo de las técnicas mencionadas anteriormente es la extracción exitosa de material genético 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 DNA (Chen, S., *et al*, 2002).

Los métodos de extracción son a partir de diferentes muestras como: sangre total inoculada con esporas del hongo, cultivo puro, muestras clínicas (sangre total, plasma, suero o BAL) y cultivos expuestos al medio ambiente (Velegraki, A., *et al*, 1999; Samarraï, T., Schmid, J., 2000). Para extraer el DNA se debe romper la pared celular total del hongo, por ello, las técnicas de extracción deben ser muy agresivas.

Los métodos que se han utilizado para la extracción son tanto comerciales como métodos caseros. De los métodos comerciales, los más comunes son: QIAmp Tissue (QIAGEN, USA), GeneReleaser (BioVentures, USA), DNA puregene D 6000 (Gentra, USA), Dynabeads DNA Direct (DynaL, Noruega) y DNAzol (Molecular Research Center, USA) de mayor costo pero son de extracción rápida, segura y de buen rendimiento (Loeffler, J., *et al*, 1997); en tanto que los métodos caseros, éstos son más tardados, laboriosos y se corre mayor riesgo de contaminación. Se usan muy poco en laboratorios de diagnóstico, donde se requiere procesar un gran número de muestras (Cenis, J., 1992; Graham, G., *et al*, 1994; van Burik, J., *et al*, 1998), pero con fines de investigación en búsqueda de las condiciones óptimas de la PCR para el presente estudio, se empleó el método enzimático de Loeffler en conjunto con un método

químico desarrollado por González para la extracción de DNA (Loeffler, J., *et al*, 1997; González, B., *et al*, 2005). Además se debe mencionar la importancia de tener controlados las condiciones medio ambientales, ya que se pueden llegar a tener falsos positivos por la presencia de hongo dispersos en el aire y es depositado en los tubos donde se va llevar a cabo la PCR.

1.1.5. Tratamiento

Con frecuencia, no se requiere de un tratamiento a base de medicamentos antifúngicos en casos de aspergilosis leves; sin embargo, si un paciente está expectorando sangre, es posible que sí sea necesario y en este caso se requiere asistencia médica (Arenas, G., *et al*, 2003). El fármaco de primera línea más usado en el tratamiento es la anfotericina B intravenosa, a dosis de 0.7-1.5 mg/kg/día, para pacientes con aspergilosis invasiva; pero su toxicidad ha dado lugar al uso de derivados lipídicos, como la anfotericina liposomal, el complejo lipídico y la dispersión coloidal, estas formulaciones disminuyen de forma muy importante la toxicidad y permiten administrar dosis mucho más elevadas (hasta 5mg/Kg/día). También se puede utilizar fluconazol, itraconazol o voriconazol, usados como tratamiento de consolidación tras la administración inicial de anfotericina B en aspergilosis. Se han utilizado también combinaciones de anfotericina B con otros antifúngicos como la 5-fluorocitosina, o con rifampicina, aunque no hay resultados concluyentes (Arenas, G., *et al*, 2003).

1.2. Aspectos generales del genoma de *A. fumigatus*

El genoma de *A. fumigatus* consta de 8 cromosomas y un fragmento MT (mitocondrial), el DNA que tiene presenta una forma lineal. Para el presente estudio, el fragmento del gen que se amplificó mediante la PCR, fue el que codifica para 18S rRNA, un gen multicopia muy conservado en el género de *Aspergillus* (Loeffler, *et al*, 2001, 1997; Einsele, *et al*, 1997). La secuenciación del genoma de *A. fumigatus* y el estudio de la expresión de genes durante los procesos infecciosos mediante el uso de microarreglos y biochips de DNA, permitirán en un futuro no muy lejano ampliar los conocimientos sobre los mecanismos involucrados en la virulencia del hongo (Rementeria A., *et al*, 2005).

Cabe mencionar que el genoma del hongo *A. fumigatus* en comparación con otros genomas de otras especies de *Aspergillus*, difiere en un 1.2% de nucleótidos y por lo tanto estos son únicos en su DNA y contiene alrededor de 9630 genes (Rokas, A., *et al*, 2007), dependiendo de la cepa secuenciada que se reporta en la literatura.

Estudios recientes comparando tres especies de *Aspergillus* han demostrado que sólo comparten el 68% de las proteínas. Además, tienen el genoma de un tamaño muy diferente. "*A. oryzae*" lo tiene un 31% más grande que "*A. fumigatus*" y un 24% más que "*A. nidulans*". El 30% de los 9.500 a 14.000 genes identificados es nuevo para la ciencia y su función y estructura, son desconocidas (William, C., *et al*, 2005).

En la siguiente tabla se describe de forma general, algunas de las características del genoma de *A. fumigatus*.

Tabla 1.1. Propiedades del genoma *A. fumigatus* Af293 (William, C., *et al*, 2005)

Genoma nuclear	Información general
Tamaño (Mb)	28.81
G-C contenido (%)	49.9
Número de genes	9,926
% de genes codificantes	50.1
% de genes con intrones	77.0
Genes con función desconocida	3,288
Número de tRNA / Número de 5S rRNA	179/33
Tamaño del genoma mitocondrial (pb)	31,892
G-C contenido (%)	25.4
Número de genes	16
% de genes que codifican	44.1
% de genes con intrones	6.2
Número de tRNA	33

1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, ofrece una alternativa a la clonación basada en vectores como medio de generar múltiples copias de DNA a partir de una muestra. Actualmente, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante el termociclador.

La PCR imita la forma en la que el DNA se replica de forma natural en el interior de la célula. Para llevar a cabo la técnica se aísla el DNA que va a ser amplificado *in vitro* y se aplica calor para separar las dos cadenas de la molécula. Una vez que ha disminuido la temperatura de la reacción, los iniciadores gen específicos y complementarios, se unen al DNA. Los nucleótidos y la enzima DNA polimerasa sintetiza una cadena complementaria de cada segmento, obteniendo de nuevo moléculas de DNA de doble cadena. Cada ciclo de calentamiento y enfriamiento duplica la cantidad de DNA presente en el tubo Eppendorf, por lo que en unas cuantas horas se pueden obtener millones de copias de un fragmento de DNA (Luque, J., *et al*, 2001).

La PCR consiste básicamente en tres pasos (Innis, *et al*, 1997):

1. Desnaturalización.- La desnaturalización del DNA es estrictamente requerida para la separación de hebras DNA, se debe tanto a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre pares de bases, como de las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas al desnaturalizarse. Las dos hebras del DNA se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes, solo de puentes de hidrógenos que se forman entre las bases púricas y/o pirimídicas.

La desnaturalización puede llevarse a cabo por calentamiento, generalmente a temperaturas mayores de 68 ° C y menores de 97 ° C. La temperatura de desnaturalización debe ser superior a la de fusión (T_m) de la región de DNA que se desea amplificar. La temperatura de fusión (T_m , *del ingles, melting temperature*), se relaciona directamente con la desnaturalización y depende del contenido en pares de bases C≡G o A=T de la cadena de DNA. Cuando los pares de bases C≡G son mas abundantes que las bases A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C≡G es más fuerte que en A=T.

2. Alineamiento.- Se llama así debido a que en esta etapa las hebras sencillas de DNA se unen a los oligonucleótidos sintéticos. Esta etapa semeja en gran medida al método de hibridación de DNA, aunque en este caso, el DNA se une a una hebra corta (< 30 nucleótidos) de nucleótidos sintéticos que servirán para iniciar la reacción. Esta etapa también se denomina etapa de templado debido a la disminución de temperatura que permite la reasociación de las hebras sencillas del DNA tras la desnaturalización térmica. Los iniciadores se unen a una región específica y complementaria del DNA original en dirección 5'→3'. Esta etapa requiere una disminución rápida de la temperatura por debajo de la T_m (temperatura de fusión) de los oligonucleótidos de forma que suceda la hibridación. El rango de temperatura más usado es de 37 a 65 °C y se mantienen entre 10 y 20 segundos (puede ser más largo dependiendo del tamaño de los oligonucleótidos).

3. Elongación de la cadena de DNA.- En esta etapa se amplifica o sintetiza la cadena complementaria del DNA por la DNA polimerasa. El sustrato de la enzima son los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs). La síntesis de la cadena complementaria se lleva a cabo en la dirección 5'→3' a partir del extremo 3'-OH de cada iniciador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización y así se va incrementando el número de nuevas cadenas dependiendo el número de ciclos (Karp, G., 2006). El número de hebras nuevas de DNA formado se calculan como: $2^n = \text{número de hebras nuevas}$ (donde $n = \text{número de ciclos}$).

Las siguientes figuras representan los pasos generales de la PCR y el número resultante de copias (amplicon) en cada corrida de la misma (Figura 1.2 y Figura 1.3, respectivamente).

Figura 1.2. Representación de la reacción en cadena de la polimerasa (Carr, MS.,

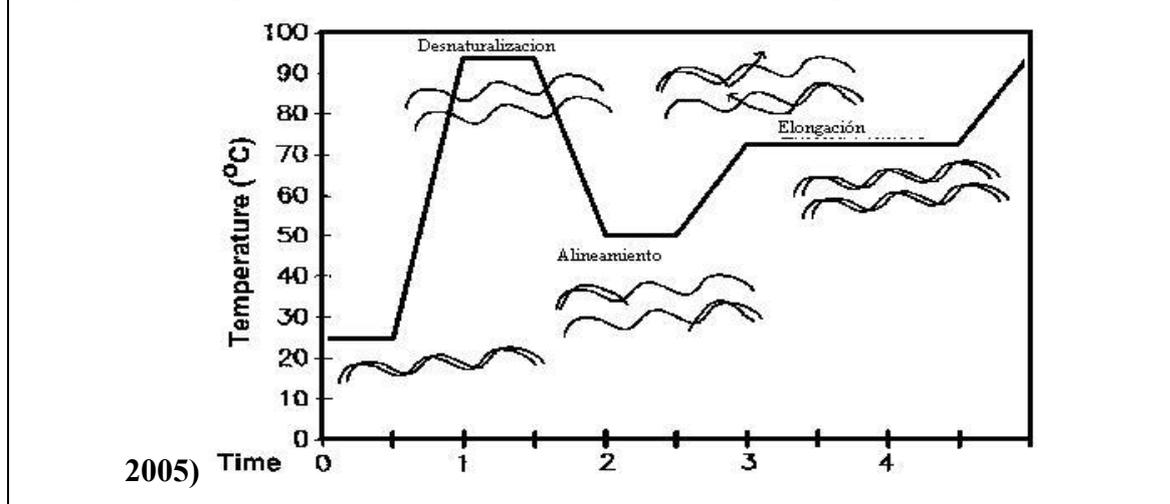
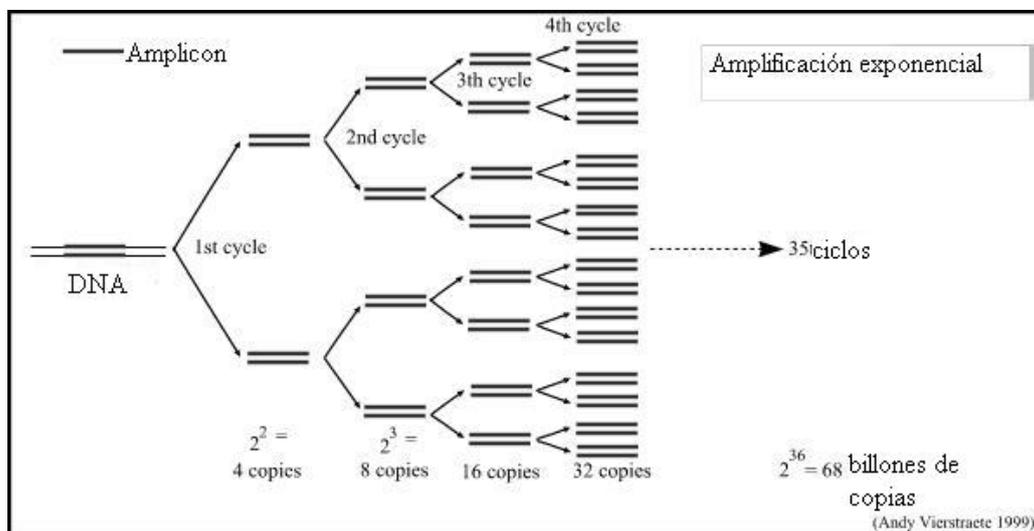


Figura 1.3. DNA resultante en el transcurso de los ciclos (Vierstraete, A., 1999)



Adicionalmente a las tres etapas repetidas cíclicamente, se añade una etapa al inicio y una al final. La inicial implica elevar la temperatura por arriba de la etapa de desnaturalización, logrando la inactivación de proteasas y nucleasas de la muestra y, al mismo tiempo, es posible asegurar la completa desnaturalización del DNA. La

etapa final consiste en la prolongación de la última elongación a fin de permitir que se completen todos los fragmentos. Las tres etapas mencionadas se repiten cíclicamente. El número de ciclos puede variar entre 20 y 40 ciclos (Innis, *et al*, 1997).

1.3.1. Componentes de la PCR

Los componentes utilizados en la PCR son los siguientes: desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs; dATPs, dTTPs, dGTPs y dCTPs) que son el sustrato para la síntesis de la cadena complementaria nueva de DNA, estos son: Guanina, Citosina, Timina y Adenina y deben de estar en cantidades proporcionales para una óptima replicación de DNA, dos iniciadores complementarios a las dos hebras del DNA de tamaño variable de entre 20 hasta 50 nucleótidos que identificarán el fragmento de DNA molde que posteriormente la DNA polimerasa (la enzima DNA polimerasa más utilizada es de *Thermus aquaticus*, la cual resiste altas temperaturas sin sufrir desnaturalización, ni perder su actividad enzimática) los usara para comenzar la elongación del material genético, iones de magnesio (Mg^{2+}), que sirven como coenzima de la DNA polimerasa para su óptimo funcionamiento, solución amortiguadora que mantiene el pH óptimo para la DNA polimerasa, DNA polimerasa o mezcla de polimerasas para replicación de DNA molde por medio de la adición los dNTP's a la nueva cadena y DNA molde, que será el que amplificará. Finalmente el uso del termociclador, que es el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo (Luque, J., *et al*, 2001; Innis, M., *et al*, 1997). Posteriormente los productos se separan y se visualizan en gel de agarosa.

1.3.2. Electroforesis en geles de agarosa

Esta técnica permite separar fragmentos de DNA en función de su tamaño al aplicar una corriente eléctrica a un gel en el interior del cual se ha introducido una mezcla de fragmentos. Los fragmentos se desplazan desde el polo negativo al polo positivo, esto es debido a la carga negativa presente en el esqueleto azúcar-fosfato, de tal modo que los fragmentos más pequeños se mueven más rápido que los más grandes. Cuando la corriente cesa, los fragmentos de DNA se han distribuido a lo largo del gel,

situándose los más pequeños más cerca del polo positivo, adoptando una apariencia similar a un código de barras. Cada barra contiene un fragmento de DNA de un tamaño determinado. Adicionalmente puede utilizarse una secuencia complementaria de un DNA como sonda para buscar un fragmento específico en el patrón de bandas (Luque, J., 2001).

En fragmentos simples de DNA (una sola cadena) y RNA, dichas moléculas tienden a plegarse de forma compleja y a migrar de forma más complicada, según la estructura terciaria formada tras el plegamiento. Sin embargo, compuestos que puedan romper los enlaces de puente de hidrógeno, como el hidróxido de sodio o la formamida, son empleados para 'desplegar' las moléculas plegadas y permitir que la velocidad de migración dependa únicamente del tamaño y no de la estructura formada tras el plegamiento. Los fragmentos de DNA se revelan empleando bromuro de etidio, el cual se intercala entre la molécula de DNA y emite fluorescencia al ser sometido a luz ultravioleta (UV) (Luque, J., 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La aspergilosis es una enfermedad muy agresiva que afecta principalmente al pulmón y es causada por varias especies del género *Aspergillus*. Las personas más afectadas son las inmunocomprometidas, ya sea resultado de trasplantes de médula ósea, quimioterapia, tratamiento con fármacos inmunosupresores, así como pacientes con alteraciones hematológicas (neutropenia, leucemia) (Latgé, J., 1999); el poder dar inicio a la terapia antifúngica apropiada es esencial para reducir la morbilidad y la mortalidad en estos pacientes, además de lograr que su esperanza de vida aumente; siendo el diagnóstico uno de los factores limitantes para poder ofrecer un tratamiento adecuado para la aspergilosis. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de una técnica de evaluación temprana, eficaz, rápida y reproducible para el diagnóstico de esta enfermedad.

Entre las pruebas diagnósticas de aspergilosis, existen las microbiológicas, de imagen, histológicas, inmunológicas y de biología molecular, pero es necesario el uso de varias de ellas para llegar a un diagnóstico correcto.

Es por eso que en el presente trabajo se realizó la estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lograr la amplificación del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*, por lo que se trabajaron muestras de cultivos puros para así establecer las mejores condiciones para la identificación de material genético fúngico mediante la detección del producto específico empleando el par de iniciadores 18S-A1 y 18S-A2; resultando ser importante el establecimiento de las condiciones óptimas de la PCR, para que pueda considerarse un método de diagnóstico adecuado en la detección temprana de aspergilosis, y posiblemente ser usado como técnica de detección de presencia de DNA fúngico en muestras de origen diverso. Esta técnica podría complementar a otras como una herramienta más en el diagnóstico de los diferentes tipos de aspergilosis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar las condiciones óptimas para la amplificación de un gen específico (18S rRNA) de *Aspergillus* empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.2. Objetivos particulares

3.2.1. Lograr el crecimiento y conservación de cultivos puros de *Aspergillus fumigatus*.

3.2.2. Realizar la extracción del DNA de muestras del cultivo de *Aspergillus fumigatus* empleando un método enzimático.

3.2.3. Cuantificar diferentes preparaciones de DNA de *Aspergillus fumigatus*, mediante espectrofotometría UV, además de evaluar la integridad de las muestras obtenidas a partir del hongo en estudio por método electroforético en geles de agarosa.

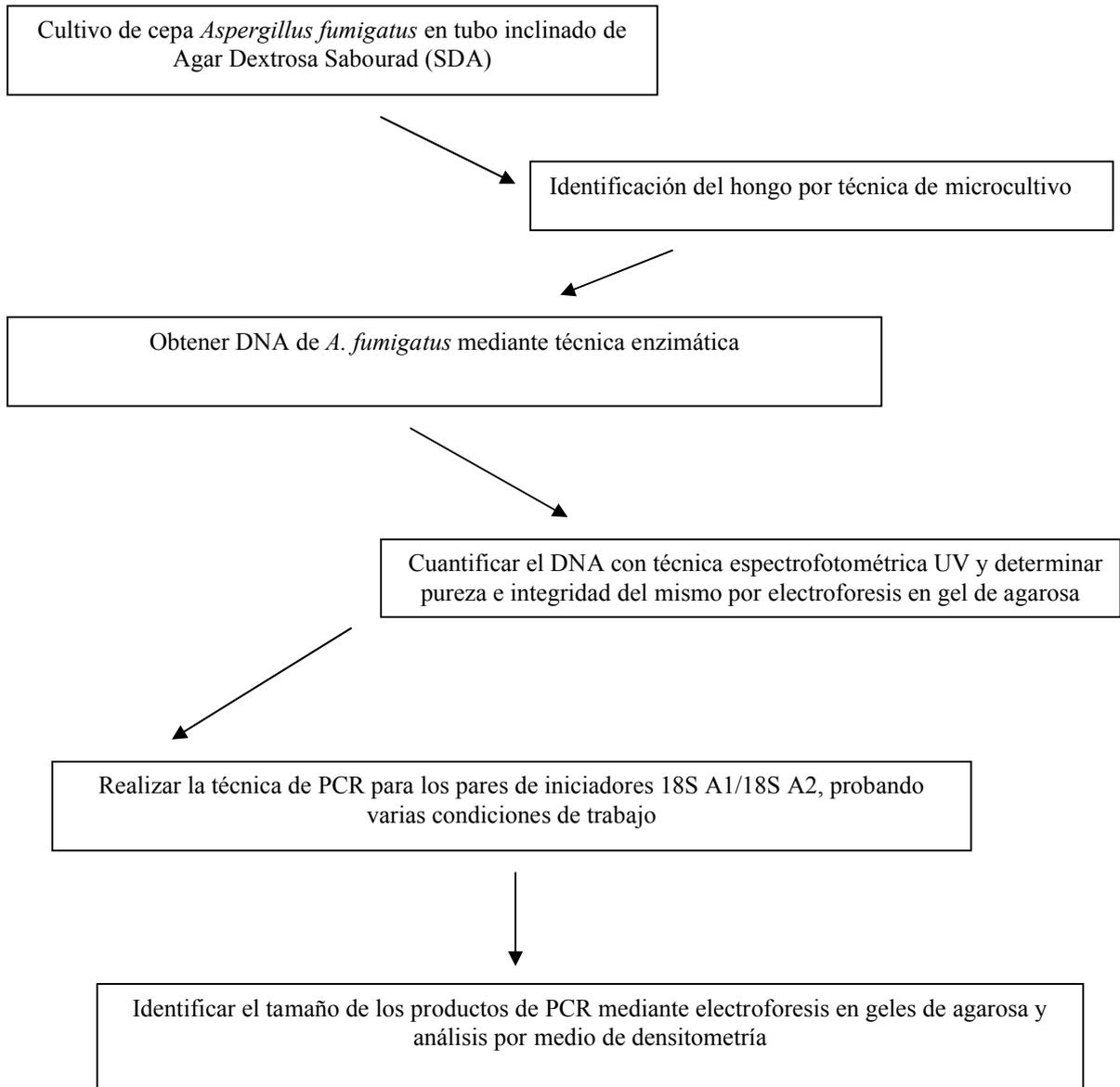
3.2.4. Establecer las condiciones de trabajo de la PCR, usando el par de iniciadores 18S A1 y 18S A2 para amplificar una región específica del DNA de *Aspergillus*, incluyendo el par de iniciadores para β actina como control interno del sistema.

3.2.5. Identificar el amplicon (producto de 504 pb) de la región específica de DNA de *Aspergillus fumigatus*, en geles de agarosa usando una escalera de pares de bases.

3.2.6. Determinar la intensidad de la banda del producto mediante análisis semicuantitativo empleando el programa Kodak 1D 3.6, para corroborar que la técnica de la PCR cumpla con las condiciones más adecuadas para su realización.

4. METODOLOGÍA

4.1. Diagrama de flujo general



4.2. Preparación de medios de cultivo

Se contó con un cultivo fúngico donado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) identificado previamente como *A. fumigatus*.

Se eligió el medio de cultivo Dextrosa Sabouraud (SD), en agar y caldo, el primero fue empleado para la conservación (en tubo inclinado) y corroboración del hongo (en microcultivo), y el segundo para su cosecha. Para la preparación del Agar Dextrosa Sabouraud (SDA; Dibico, Cat 1007-A), se pesaron 3 g de medio liofilizado y se agregaron 100 mL de agua destilada. Se recomienda hidratar el medio por 10 minutos y calentarlo a 65 ° C para facilitar su disolución, después se procedió a la esterilización del mismo en autoclave a 121 ° C, a 15 lb por 15 minutos, se sacó del autoclave, se dejó enfriar y se hicieron alícuotas de 5-7 ml, en tubos de vidrio esteriles de 150 mm x 13mm con taparosca. Se colocaron en posición horizontal con un ángulo de inclinación de alrededor de 15 grados, dejando gelificar en esa posición (González, B., 2005).

Se preparó el microcultivo a partir del medio sólido SDA al 3%, para ello se sirvió en cajas petri estériles de 20 mL dejando gelificar a temperatura ambiente.

El Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS; BD Bioxon, 0097R83 SSA) al 3% se preparó en un matraz, colocando 9 g de medio liofilizado en 300 ml de agua destilada. El medio se esterilizó en autoclave a 121 ° C, a 15 lb, por 15 minutos.

Los 3 medios (en tubo inclinado, en caja petri y en matraz) se sometieron a prueba de esterilidad a 37 ° C durante 24 horas. La esterilidad se verificó mediante observación de la ausencia de cualquier tipo de crecimiento microbiano, cada medio se conservó a 4 ° C hasta su uso (González, B., 2005).

4.3. Crecimiento y conservación de *A. fumigatus*

Se inocularon tubos inclinados con medio SDA con la cepa de *A. fumigatus*, por técnica en estría (o picadura), con ayuda de una asa bacteriológica en forma de L para hongos, tomando un inóculo abundante (pesado). Se cerraron los tubos y se incubaron a 37° C durante 72 horas. Posteriormente de las 72 horas de incubación del hongo, se revisaron los tubos de SDA, si había crecimiento se procedía a la identificación de sus

estructuras aéreas (hifas sexuales), de no haberlo, se hicieron observaciones periódicas (cada 24 horas). Los tubos de agar SDA con los crecimientos del hongo pueden mantenerse en refrigeración durante meses hasta un par de años conservando sus características. Se prosiguió con la técnica de microcultivo.

4.4. Microcultivos

Se preparó el sistema del microcultivo, colocando el triángulo de vidrio en una caja petri sobre este se puso un portaobjetos al que se le colocó un cuadro de medio SDA (3%) de 1.5 cm por lado aproximadamente y 3 cm de grosor en el cual se sembró el hongo por técnica de 4 puntos en los 4 lados del cubo de agar, posteriormente se puso un cubreobjetos sobre la superficie del cubo de SDA, finalmente se adicionaron de 10 a 15 mL de agua glicerinada al 5% a la caja petri para humedecer el sistema. Se selló y se incubó a 37 ° C durante una semana. El método anterior se realizó con material estéril y bajo condiciones asépticas.

Transcurrido el tiempo de incubación del microcultivo (de 3 a 7 días), en un nuevo portaobjetos se añadió una gota de azul de algodón (ver anexo 8.1), se despegó cuidadosamente el cubreobjetos de la parte superior del cubo de SDA del microcultivo y se colocó sobre el portaobjetos anterior, se dejó durante 15 minutos, éste se lavó dejando caer en un extremo, un chorro de agua ligero de agua destilada, lo anterior se hizo en la tarja, inclinando un poco el portaobjetos para que fluyera el agua (o también se puede hacer el lavado con etanol al 95%). Se secó cuidadosamente con un trozo de papel y por último se observó al microscopio con el objetivo de 40X (Koneman, 1999). Nota: para inactivar el hongo del microcultivo, se recomienda agregar a la caja petri alrededor de 5 ml (o el volumen necesario que no alcance a tocar el portaobjeto) de una solución de formol al 10%.

Posteriormente se buscan las típicas cabezas conidiales de género y especie del hongo, para poderlo identificar y tener la certeza de trabajar con el micromiceto deseado. Después de que las hifas asexuales fueron identificadas como *A. fumigatus*, se procedió a prepararlo para la extracción de DNA, utilizando 3 tubos con crecimiento del hongo.

Los tubos con la cepa que no se emplearon, se mantuvieron en refrigeración hasta su uso posterior.

4.5. Obtención del micelio de *A. fumigatus* por inoculación de esporas

Se utilizó el crecimiento fúngico de tres tubos con agar inclinado, de los cuales se extrajo una suspensión de esporas, agregando de 1.5 a 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, del inglés *Phosphate buffer solution*; Anexo 8.2) por tubo, se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se adicionaron las suspensiones de esporas al Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) directamente de cada tubo, finalmente se incubó 72 horas (*Loeffler, J., et al, 1997*) en baño María a 37 ° C con agitación (120 rpm).

Debido a que no se obtuvo una cantidad adecuada de DNA al completar el procedimiento de la obtención de micelios, se necesito estandarizar el tiempo óptimo de cultivo del hongo en CDS para mejorar el rendimiento de DNA obtenido, para ello se realizó el mismo procedimiento de obtención de micelio, con la única diferencia que éste se dejó incubando 24 horas.

Posteriormente se filtró el caldo a vacío, donde primero se colocaron 50 mL de solución de benzal (o cloro) concentrada en un matraz kitazato para eliminar las esporas del caldo que llegaran a pasar el filtro (papel Whatman número 4), éste fue colocado en el embudo y se fue añadiendo poco a poco el medio de CDS con el cultivo del hongo para recuperar los micelios. Cuando se terminó de filtrar el caldo, se dejó 10 minutos adicionales conectado el vacío para extraer toda el agua posible. Fue recuperado el papel filtro y se enrolló con cuidado para introducirlo con ayuda de unas pinzas en un tubo cónico de 50 mL, dejándolo en congelación por 48-72 horas a una temperatura de -20 ° C.

El micelio congelado que quedó adherido al papel filtro se recuperó con una espátula estéril tomando 50 a 55 mg del mismo, colocándolos en tubos Eppendorf (de 1.5 mL), para la posterior extracción de DNA (*Gonzalez, B., 2005*).

4.6. Extracción de DNA de *A. fumigatus*

Para extraer el material genético del hongo, se utilizó una técnica enzimática, esta tiene como propósito romper la pared del hongo mediante el uso de la enzima liticasa, y así liberar el contenido celular; además, el uso de acetato de potasio (AcK) y de alcohol etílico, fue para eliminar la mayor cantidad de contaminantes proteicos de las muestras.

Se trabajó con liticasa en presentación de 260 U/ mg de liofilizado, conteniendo en total 192.3 mg de enzima, correspondiendo aproximadamente a 50,000 U por frasco (SIGMA, L4025-50UK), las condiciones óptimas de pre-tratamiento de DNA del hongo trabajadas fueron utilizando 500 U de liticasa contenidas en 100 μ l de PBS (las condiciones que se estandarizaron de la enzima se explican en el punto 4.6.1), para la extracción del material genético se trabajaron dos pasos. El Paso 1: pre-tratamiento del hongo y el Paso 2: extracción y purificación de DNA, la metodología para cada uno de ellos se describe a continuación.

Paso 1: A 55 mg de micelio congelado (tiempo de crecimiento del hongo en CDS de 24 horas), se le agregaron 450 μ L de Buffer de Extracción (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA y 28 mM β -mercaptoetanol) (ver anexo 8.3), después se adicionaron 500 U (contenidas en 50 μ L de PBS) de liticasa para que quedara a un volumen total de 500 μ L.

Paso 2: Se incubó durante 45 minutos a 37 ° C, se centrifugó durante 15 minutos a 7826 X g (9300 rpm). Se decantó el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100 μ L, se trató con 500 μ L de solución Tris (Tris 1 M, 10 mM EDTA; ver anexo 8.4), además de 500 μ L de SDS al 10 % durante 45 minutos a 65 ° C para lisar los plastos. A esta suspensión se le agregaron 650 μ L de acetato de potasio (ver anexo 8.5) y se incubó a -20 ° C durante 40 minutos. Se centrifugó a 1000X g (3300 rpm) por 20 minutos para separar proteínas, se obtuvo el sobrenadante, en un tubo de 1.5 mL, a este se le adicionaron nuevamente 650 μ L de acetato de potasio, se dejaron en congelación a -20 ° C durante 40 minutos. Se centrifugó a 1000 X g (3300 rpm) por 20 minutos extrayendo el sobrenadante. Todo lo anterior se realizó con la finalidad de eliminar las proteínas.

Para precipitar el DNA disuelto en el sobrenadante, se le agregaron 750 μ L de alcohol isopropílico frío (Técnica química, N° de Cat. A 1730), se agitó levemente y se centrifugó a 2000 X g (6500 rpm) durante 3-5 minutos; se decantó conservando la pastilla. Con la finalidad de eliminar restos contaminantes proteicos de la muestra de DNA, a la pastilla obtenida se le agregó 1 mL de etanol al 70% (Baker, N° de Cat. 9000-03; Anexo 8.6), se agitó levemente, se centrifugó a 2600 X g (9000 rpm) y se decantó para resuspender el sedimento; finalmente se adicionaron 100 μ L de amortiguador de conservación (Tris-EDTA; Anexo 8.7) o en caso de ser necesario se agregó mayor volumen para que el DNA extraído se pudiera disolver completamente (Löeffler, *et al*, 1999). La solución de DNA puede congelarse o refrigerarse meses hasta años, conservando sus propiedades.

4.6.1. Estandarización de la cantidad de enzima empleada, diluyente óptimo y tiempo de incubación del hongo

Para la extracción del DNA, se prepararon 2 soluciones madre (ver anexo 8.11): solución A) 50,000 U/5 mL en PBS y solución B) 50,000 U/10 mL en agua desionizada; se eligieron estos dos disolventes debido a que las instrucciones del producto liofilizado no especificaban con precisión este punto.

Para lo anterior, se trabajaron 3 diferentes cantidades de la enzima (50, 250 y 500 U), y como se emplearon las dos soluciones madres, las cantidades y volúmenes utilizados (U/ μ L) quedaron de la siguiente manera:

Solución A en PBS: 50/5, 250/25 y 500/50 U/ μ L.

Solución B en agua desionizada: 50/10, 250/50 y 500/100 U/ μ L.

Se trabajó con las 6 condiciones anteriores, para llevar a cabo la extracción de DNA a partir de 55 mg de micelio congelado (de 24 horas de crecimiento). Se empleó la misma metodología de pre-tratamiento y extracción de DNA, del Paso 1, primero se colocó la cantidad de buffer de extracción necesario para completar al final 500 μ L y después se agregó la cantidad de U/ μ L de liticasa a probar, la metodología de Paso 2 fue la misma para todos los casos.

Finalmente, se optimizó el tiempo de cultivo del hongo para ver como influía con respecto al rendimiento de la extracción de DNA, por lo que una vez obtenida la cantidad de 500 U de enzima para 55 mg de micelio para la digestión del hongo, se probó la misma técnica de extracción de DNA, comparando dos tiempos de cultivo en CDS (a 24 y a 72 horas), cada condición se realizó 6 veces.

4.7. Cuantificación y determinación de la pureza del material genético de *A. fumigatus*

La cuantificación se realizó empleando un espectrofotómetro de luz ultravioleta UV (UV 1101 Biotech photometer). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 280 y de 260 nanómetros (nm).

El valor de la densidad óptica (D.O.) obtenido a 260 nm es utilizado para la cuantificación del DNA, realizando los cálculos siguientes:

$$\frac{50 \times Fd}{1000} = Fc$$

$$X \text{ en } \mu\text{g}/\mu\text{L} = Fc \times A_{260}$$

donde:

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se refiere a la concentración de DNA de cadena doble que equivale a un valor de D.O. de 1.0.

Fc= Factor de conversión.

Fd = factor de dilución, obtenida a partir de la dilución que se efectuó a la muestra, en agua desionizada.

1000 corresponde al factor de conversión para expresar el resultado de concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

X es el resultado de la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La lectura a 280 nm se utilizó para medir la concentración de proteínas, que sirve para determinar la pureza de las muestras, que es el resultado del cociente A_{260} / A_{280} . Para obtener la cantidad de DNA total en μg , se multiplicó la cantidad total de

volumen en la que se resuspendió el DNA obtenido por la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ calculada.

Para la interpretación de los resultados de pureza se tiene establecido el siguiente criterio: cuando el valor de la relación es cercano a 1.8 (1.7-1.9), el DNA obtenido está sin contaminantes. El valor de 1.6 o por debajo de éste, indica que la muestra esta contaminada con proteínas y finalmente si el valor se ubica igual o por arriba de 2.0, la muestra esta contaminada con RNA.

4.8. Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de la integridad del DNA extraído

Para conocer la integridad del DNA extraído de las muestras, se corrieron electroforesis en geles de agarosa (Gibco, BRL, N° de Cat. 15510-019; Anexo 8.9) al 0.7% en amortiguador TBE 0.5X (Tris-borate-EDTA; ver anexo 8.8). La mezcla de agarosa y TBE se calentó 2 minutos en horno de microondas y se dejó entibiar, y posteriormente de una solución madre de bromuro de etidio (10 mg/mL; ver anexo 8.12) se adicionaron 3 μL por cada 100 mL de gel de agarosa (cantidad final de 30 μg BrEt); finalmente, en la cámara de electroforesis se depositó el volumen correspondiente de la solución de agarosa, 45 mL o 110 mL, con el peine de 12 carriles o de 30 carriles, respectivamente. Para la colocación de las muestras en el gel de agarosa, se mezclaron sobre un pedazo de parafilm, 10 μL de muestra de DNA y 5 μL de amortiguador de carga 0.5X (ver anexo 8.10). Las muestras se dispensaron en los carriles seleccionados, se cerró el sistema y se corrió la electroforesis a 50 Volts durante 50 minutos aproximadamente. Los corrimientos se analizaron en el trasiluminador de luz UV y se registraron con fotografías (cámara Canon G6 Supershot).

4.9. Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Aspergillus fumigatus*

La PCR es una técnica de biología molecular que amplifica un fragmento de DNA plantilla que se quiera estudiar, en el presente trabajo se implementó esta técnica usando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 (Invitrogen, Co.) para obtener el

amplicon del gen 18S rRNA de *Aspergillus* cuyo tamaño es de 504 pb. Es importante que los componentes de la PCR se encuentren en concentraciones o cantidades óptimas para obtener el producto esperado, por lo que se estandarizó la cantidad de DNA, la concentración de MgCl₂, la concentración de los pares de iniciadores, tanto de 18S A1/18S A2 como de β actina (control interno del sistema), y en el caso de ser necesario, agregar algún otro componente importante como la albúmina sérica bovina (ASB) para obtener la amplificación óptima.

4.9.1. Determinación del porcentaje de gel de agarosa óptimo para el corrimiento de los amplicones resultantes de la PCR

El determinar el porcentaje de agarosa para el gel, es útil para obtener un corrimiento con buena resolución de las bandas, por lo que se procedió a evaluar tres concentraciones para la preparación de éstos (0.7, 1.0 y 2.0 %) y se corrieron en los mismos, varios amplicones previamente identificados.

4.9.2. Características de los iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus* y de los iniciadores de β actina utilizados en la PCR

En la **Tabla 4.1.** se muestran los iniciadores (Invitrogen, Co.) para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA del hongo y del fragmento del gen de β actina, los primeros son específicos para identificar el género fúngico *Aspergillus* los cuales son altamente conservados (Einsele, H., *et al*, 1997; Loeffler, *et al*, 1999).

En cuanto a los iniciadores del gen de β actina (control interno del sistema) que amplifican un producto de 273 pb, se utilizaron para evaluar y confirmar que los reactivos empleados se encontraran en buenas condiciones para llevar a cabo la PCR.

Tabla 4.1. Características de los iniciadores 18S A1, 18S A2 y de los iniciadores de β actina.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)
18S A1	AAT GGA GGG CAA GTC TGG TG	504
18S A2	CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG	
β actina S**	GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GG	273
β actina AS**	TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT ACG	

**Control interno del sistema

4.9.3. Cuantificación de los iniciadores

La determinación de la molaridad de los 2 pares de iniciadores, se hizo mediante lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 260 nm; los cuales estaban liofilizados y se resuspendieron en 200 μ L de agua inyectable, posteriormente se realizaron diluciones de 1:500 o 1:601 en celda espectrofotométrica para obtener las lecturas, datos que permitieron preparar las soluciones madre de 1×10^{-6} M y así poder usarlos en la PCR.

La fórmula para determinar **em (extinción molar)** es:

Por cada base púrica o pirimídicas del iniciador empleado, se sigue la siguiente fórmula:

$$Em = \Sigma G (12000) + \Sigma A (16000) + \Sigma T (9600) + \Sigma C (7000)$$

Simbología; G= guaninas T=timinas A=adeninas C=citosinas Σ =sumatoria

Después de obtener la D.O.260 se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración molar de iniciador} = \frac{\text{D.O.260} \times \text{dilución de la muestra}}{Em}$$

Nota: la dilución de la muestra es variable, por ejemplo si se realizó una dilución de 1:500; la D.O. (a 260 nm) se multiplica por 500.

Es importante señalar como se obtuvieron las concentraciones de iniciadores para utilizarlos en las PCR, para ello se realizaron diluciones a partir de la solución madre de 1×10^{-6} M, para obtener la concentración final en el vial Eppendorf de PCR.

Para preparar las soluciones 1, 2 y 4 nM se hicieron las siguientes diluciones de la solución madre: 1:40, 1:20, 1:10, respectivamente; y para la de 40 nM, finalmente se tomó directamente de la solución madre, es importante que las diluciones se hagan en el momento de la realización de la PCR.

4.9.4. Estandarización de la PCR para la amplificación del fragmento de gen 18S rRNA y de β actina de *Aspergillus fumigatus*

Con el propósito de establecer las condiciones de trabajo para la realización de la técnica de la PCR para los iniciadores 18S A1/18S A2 y de β actina humana, se partió de los siguientes componentes: amortiguador de PCR 10X; $MgCl_2$ a 50 mM; dNTP's a 10 mM; ASB a 200 μ g/ mL; iniciadores de β actina a 1×10^{-6} M cada uno; iniciadores 18S a 1×10^{-6} M cada uno; DNA plantilla de *Aspergillus* a 1 μ g/vial; Taq polimerasa a 5 U/ μ L y agua inyectable para ajustar los volúmenes finales de la PCR a 50 μ L (Löeffler, *et al*, 1999).

Los reactivos que se utilizaron en el presente trabajo son de las marcas Invitrogene para la Taq polimerasa; Promega para los dNTP's y para el marcador (escalera) de 100 pares de bases.

Todos los corrimientos de PCR se realizaron en un Termociclador marca Biometra T Gradient. Como control negativo se incluyeron en cada corrimiento un tubo con todos los componentes del sistema, pero sin DNA plantilla. El producto se puede conservar a 4 ° C durante varios meses.

Para la estandarización del control interno del sistema de la PCR (β actina), se trabajaron combinaciones de las siguientes condiciones: 2 cantidades de DNA, 500 y 1000 ng/vial, tres concentraciones de $MgCl_2$, a 2.5, 5.0 y 10.0 mM y se usaron dos concentraciones de iniciadores 1.0 y 40 nM, sin ASB (Albúmina sérica bovina). Se

trabajaron las siguientes condiciones del termociclador para llevar a cabo la PCR para β actina: precalentado de 5 min a 92 ° C; 40 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno: desnaturalización 30 seg. a 92 ° C, alineamiento 30 seg. a 53 ° C y elongación 30 seg. a 72 ° C; finalmente un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos. Debido a que no se obtuvieron amplificadas a estas condiciones, se realizó otra PCR para la amplificación de beta actina con la única diferencia que éste no incluía un precalentamiento (ya que este parámetro pudo haber influido en los resultados negativos), pero no se volvieron a tener amplificadas. Por lo tanto surgió la necesidad de cambiar el esquema de trabajo a las condiciones del termociclador para la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA: 35 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno: desnaturalización 30 segundos a 94 ° C, alineamiento 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; finalmente un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Es importante mencionar que fue necesario el uso de ASB, la cual se agregó a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, porque en los corrimientos iniciales sin el uso de ASB no hubo amplificación de los productos específicos; por lo tanto en la literatura se encontró el uso de ASB para optimizar las condiciones de dicha reacción (Loeffler, *et al*, 1997).

En la **Tabla 4.2.**, se muestran las características de trabajo para la amplificación de β actina, las cuales fueron: DNA 500 y 1000 ng, concentración de MgCl_2 2.5, 5.0 y 10 mM y concentración de iniciadores a 1 nM y 40 nM.

Tabla 4.2. Componentes para la técnica de PCR para la estandarización de la amplificación del gen de β actina.

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (μ L)
Buffer PCR 10X	1X	5
ASB 1 mg/mL	0.2 μ g/ μ L	10
MgCl ₂ 50 mM	2.5mM, 5mM y 10mM	2.5, 5 y 10, respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador β actina S (1 x 10 ⁻⁶ M)	40, 1.0 nM	2
Iniciador β actina AS (1 x 10 ⁻⁶ M)	40, 1.0 nM	2
DNA plantilla 1 μ g/ μ L	500 y 1000 ng	0.5 y 1, respectivamente
H ₂ O inyectable	-	cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/ μ L	2 U/ μ L	0.4
Volumen final	-	50
Condiciones del termociclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.		

Para la estandarización de la amplificación del fragmento 18S rRNA de *Aspergillus*, se trabajaron con 5 cantidades de DNA (100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/vial), tres de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM) y cuatro de iniciadores (40 nM, 4.0 nM, 2.0 nM y 1.0 nM)(ver **Tabla 4.3.**). Además se incluyó el control interno del sistema, con las condiciones óptimas de amplificación obtenidas (MgCl₂ 10.0 mM, iniciadores 40 nM y 1000 ng/vial de DNA molde), estas tres concentraciones resultaron de la estandarización lograda por medio de los corrimientos de la PCR explicados en la **Tabla 4.2.**

Tabla 4.3. Estandarización de la técnica de PCR utilizando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus*.

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR 10X	1X	5
ASB 1 mg/mL	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10
MgCl ₂ 50 mM	2.5 mM, 5.0 mM, 10.0 mM	2.5, 5, 10, respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador 18S A1 1×10^{-6} M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
Iniciador 18S A2 1×10^{-6} M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
DNA Hongo 1 $\mu\text{g}/\text{vial}$	100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/ vial, respectivamente	0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 respectivamente
H ₂ O inyectable		cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/ μL	2 U/ μL	0.4
Volumen final 50		50
Condiciones del termiclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.		

Una vez obtenidas las condiciones de estandarización de la técnica de la PCR para el DNA del hongo, se determinaron las características de corrimiento de ésta reacción con DNA de hongo (*A. fumigatus*), de humano y de bacteria (*Bordetella spp.*), para confirmar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus*, por ello se usaron diferentes cantidades de DNA por reacción (250, 500 y 1000 ng), concentraciones de MgCl₂ (2.5 y 5.0 mM) y de iniciadores (40.0, 4.0, 2.0 y 1.0 nM).

Tabla 4.4. Componentes para la técnica de la PCR empleando DNA fúngico, de humano y de *Bordetella spp.*

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR 10X	1X	5
MgCl ₂ 50 mM	2.5, 5 mM	2.5 y 5 respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
ASB 1 mg/ mL	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10
Iniciador 18S A1 1 x 10 ⁻⁶ M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
Iniciador 18S A2 1 x 10 ⁻⁶ M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
DNA hongo, DNA bacteria, DNA humano 1 $\mu\text{g}/\text{vial}$	250, 500, 1000, ng/ vial	0.25, 0.5, 1, respectivamente
H ₂ O inyectable	---	cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/ μL	2 U/ μL	0.4
Volumen final		50

Condiciones del termociclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

4.10. Electroforesis en gel de agarosa para la observación de los amplicones de la PCR.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el procedimiento 4.9.1., los productos de las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2%, para identificar los amplicones correspondientes. Además del marcador de pares de bases (pb), se incluyó en cada corrimiento de electroforesis un amplicon previamente obtenido de β actina de 274 pb y/o de 18S rRNA de 504 pb en gel de agarosa, para que sirviera de referencia del tamaño de los productos esperados.

4.11. Análisis de la intensidad de amplicon empleando el programa Kodak 1D 3.6

Se utilizó el programa de computadora (Kodak 1D 3.6) para medir la intensidad de las bandas obtenidas en la electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, por lo que se realizó el análisis de los productos de interés que se amplificaron utilizando las condiciones óptimas de la PCR determinadas en experimentos previos durante el presente trabajo; con respecto a los valores de intensidad, el programa los reporta en unidades arbitrarias de intensidad (UAI); asimismo, se empleó el DNA del hongo (*A. fumigatus*) y el DNA de humano, para corroborar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2.

Cabe señalar que todas las muestras que se evaluaron en este proceso, fueron reproducidas nuevamente, es decir, se repitió el procedimiento de la PCR para la obtención de dichos amplicones.

La **Tabla 4.5.** muestra las condiciones de la PCR que dieron amplificación del fragmento del gen de 18S rRNA y del fragmento del gen de β actina, el análisis de intensidad se realizó con la finalidad de seleccionar las condiciones óptimas que permitieron realizar la técnica de la PCR con mayor confiabilidad y veracidad.

Tabla 4.5. Condiciones de trabajo de la técnica de la PCR para la obtención de productos analizados con programa Kodak 1D 3.6.

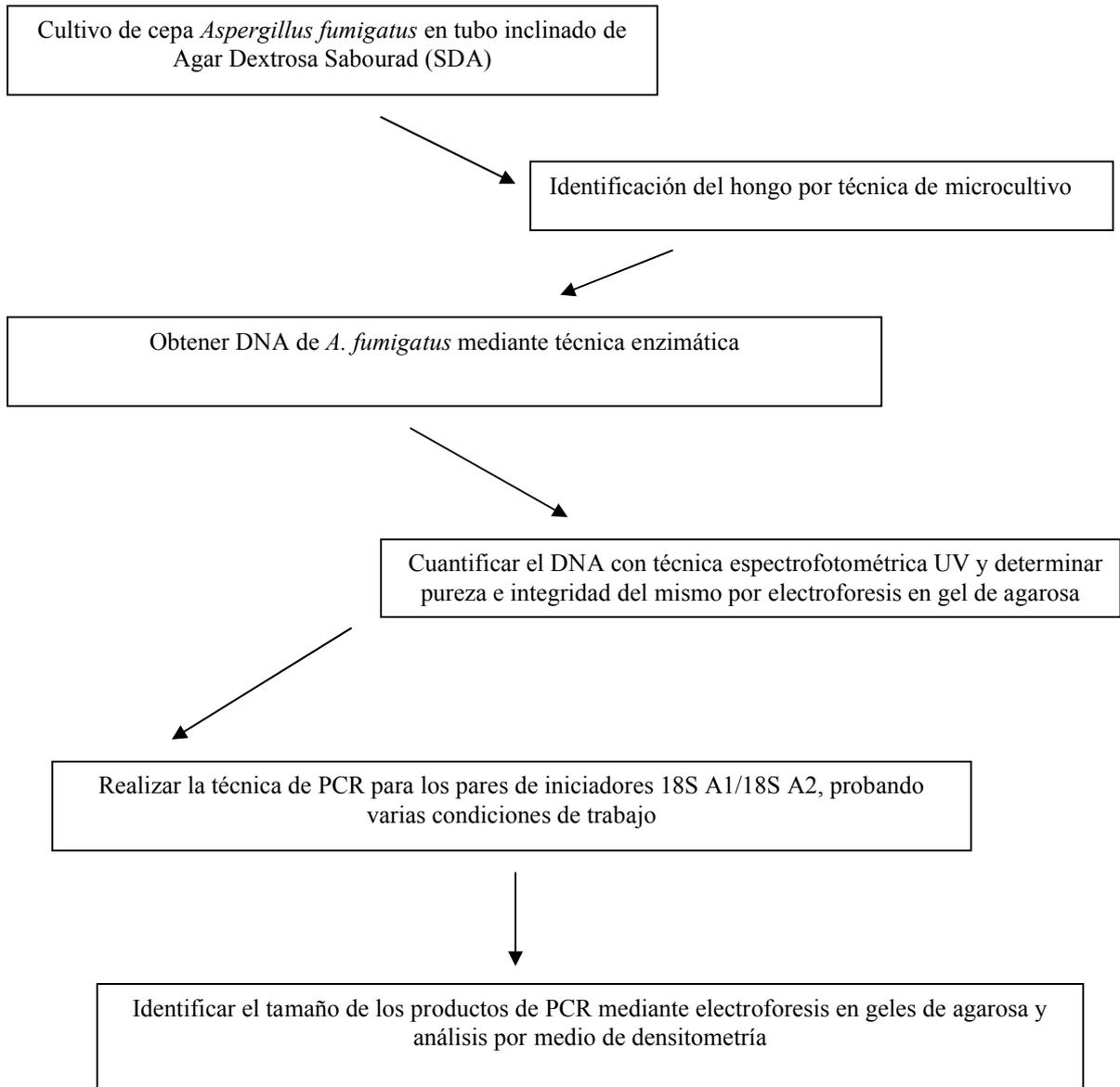
Muestra Componente y [C] final en vial de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8
	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum
PCR buffer 10X	5	5	5	5	5	5	5	5
MgCl ₂ (2.5, 5, 10 mM)	2.5	2.5	5	5	2.5	2.5	10	10
ASB (200 µg/mL)	10	10	10	10	10	10	10	10
dNTP's (0,5 mM)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Inic S (40 nM) <i>Af</i>	2	2						
Inic AS (40 nM) <i>Af</i>	2	2						
Inic S (2 nM) <i>Af</i>			2	2	2	2		
Inic AS (2 nM) <i>Af</i>			2	2	2	2		
Inic S (40 nM) β actina							2	2
y AS (40 nM) β actina							2	2
DNA plantilla (250,500,1000 ng/vial)	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	1	1
H ₂ O	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp
Taq pol/PCR buffer (1:1)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

Todas las unidades expresadas en la Tabla 4.5 están en µL. El número ubicado arriba de la muestra indica el número de carril donde se encuentra el amplicon obtenido en el gel de agarosa al 2%.

Hum= DNA Humano; ***Af***= DNA de *A. fumigatus*; **Inic**= Iniciador; **S**= sentido; **AS**= Antisentido; **Taq Pol**= Taq polimerasa; **cbp**= cuanto baste para

4. METODOLOGÍA

4.1. Diagrama de flujo general



4.2. Preparación de medios de cultivo

Se contó con un cultivo fúngico donado por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) identificado previamente como *A. fumigatus*.

Se eligió el medio de cultivo Dextrosa Sabouraud (SD), en agar y caldo, el primero fue empleado para la conservación (en tubo inclinado) y corroboración del hongo (en microcultivo), y el segundo para su cosecha. Para la preparación del Agar Dextrosa Sabouraud (SDA; Dibico, Cat 1007-A), se pesaron 3 g de medio liofilizado y se agregaron 100 mL de agua destilada. Se recomienda hidratar el medio por 10 minutos y calentarlo a 65 ° C para facilitar su disolución, después se procedió a la esterilización del mismo en autoclave a 121 ° C, a 15 lb por 15 minutos, se sacó del autoclave, se dejó enfriar y se hicieron alícuotas de 5-7 ml, en tubos de vidrio esteriles de 150 mm x 13mm con taparosca. Se colocaron en posición horizontal con un ángulo de inclinación de alrededor de 15 grados, dejando gelificar en esa posición (González, B., 2005).

Se preparó el microcultivo a partir del medio sólido SDA al 3%, para ello se sirvió en cajas petri estériles de 20 mL dejando gelificar a temperatura ambiente.

El Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS; BD Bioxon, 0097R83 SSA) al 3% se preparó en un matraz, colocando 9 g de medio liofilizado en 300 ml de agua destilada. El medio se esterilizó en autoclave a 121 ° C, a 15 lb, por 15 minutos.

Los 3 medios (en tubo inclinado, en caja petri y en matraz) se sometieron a prueba de esterilidad a 37 ° C durante 24 horas. La esterilidad se verificó mediante observación de la ausencia de cualquier tipo de crecimiento microbiano, cada medio se conservó a 4 ° C hasta su uso (González, B., 2005).

4.3. Crecimiento y conservación de *A. fumigatus*

Se inocularon tubos inclinados con medio SDA con la cepa de *A. fumigatus*, por técnica en estría (o picadura), con ayuda de una asa bacteriológica en forma de L para hongos, tomando un inóculo abundante (pesado). Se cerraron los tubos y se incubaron a 37° C durante 72 horas. Posteriormente de las 72 horas de incubación del hongo, se revisaron los tubos de SDA, si había crecimiento se procedía a la identificación de sus

estructuras aéreas (hifas sexuales), de no haberlo, se hicieron observaciones periódicas (cada 24 horas). Los tubos de agar SDA con los crecimientos del hongo pueden mantenerse en refrigeración durante meses hasta un par de años conservando sus características. Se prosiguió con la técnica de microcultivo.

4.4. Microcultivos

Se preparó el sistema del microcultivo, colocando el triángulo de vidrio en una caja petri sobre este se puso un portaobjetos al que se le colocó un cuadro de medio SDA (3%) de 1.5 cm por lado aproximadamente y 3 cm de grosor en el cual se sembró el hongo por técnica de 4 puntos en los 4 lados del cubo de agar, posteriormente se puso un cubreobjetos sobre la superficie del cubo de SDA, finalmente se adicionaron de 10 a 15 mL de agua glicerinada al 5% a la caja petri para humedecer el sistema. Se selló y se incubó a 37 ° C durante una semana. El método anterior se realizó con material estéril y bajo condiciones asépticas.

Transcurrido el tiempo de incubación del microcultivo (de 3 a 7 días), en un nuevo portaobjetos se añadió una gota de azul de algodón (ver anexo 8.1), se despegó cuidadosamente el cubreobjetos de la parte superior del cubo de SDA del microcultivo y se colocó sobre el portaobjetos anterior, se dejó durante 15 minutos, éste se lavó dejando caer en un extremo, un chorro de agua ligero de agua destilada, lo anterior se hizo en la tarja, inclinando un poco el portaobjetos para que fluyera el agua (o también se puede hacer el lavado con etanol al 95%). Se secó cuidadosamente con un trozo de papel y por último se observó al microscopio con el objetivo de 40X (Koneman, 1999). Nota: para inactivar el hongo del microcultivo, se recomienda agregar a la caja petri alrededor de 5 ml (o el volumen necesario que no alcance a tocar el portaobjeto) de una solución de formol al 10%.

Posteriormente se buscan las típicas cabezas conidiales de género y especie del hongo, para poderlo identificar y tener la certeza de trabajar con el micromiceto deseado. Después de que las hifas asexuales fueron identificadas como *A. fumigatus*, se procedió a prepararlo para la extracción de DNA, utilizando 3 tubos con crecimiento del hongo.

Los tubos con la cepa que no se emplearon, se mantuvieron en refrigeración hasta su uso posterior.

4.5. Obtención del micelio de *A. fumigatus* por inoculación de esporas

Se utilizó el crecimiento fúngico de tres tubos con agar inclinado, de los cuales se extrajo una suspensión de esporas, agregando de 1.5 a 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, del inglés *Phosphate buffer solution*; Anexo 8.2) por tubo, se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se adicionaron las suspensiones de esporas al Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) directamente de cada tubo, finalmente se incubó 72 horas (*Loeffler, J., et al, 1997*) en baño María a 37 ° C con agitación (120 rpm).

Debido a que no se obtuvo una cantidad adecuada de DNA al completar el procedimiento de la obtención de micelios, se necesitó estandarizar el tiempo óptimo de cultivo del hongo en CDS para mejorar el rendimiento de DNA obtenido, para ello se realizó el mismo procedimiento de obtención de micelio, con la única diferencia que éste se dejó incubando 24 horas.

Posteriormente se filtró el caldo a vacío, donde primero se colocaron 50 mL de solución de benzal (o cloro) concentrada en un matraz kitazato para eliminar las esporas del caldo que llegaran a pasar el filtro (papel Whatman número 4), éste fue colocado en el embudo y se fue añadiendo poco a poco el medio de CDS con el cultivo del hongo para recuperar los micelios. Cuando se terminó de filtrar el caldo, se dejó 10 minutos adicionales conectado el vacío para extraer toda el agua posible. Fue recuperado el papel filtro y se enrolló con cuidado para introducirlo con ayuda de unas pinzas en un tubo cónico de 50 mL, dejándolo en congelación por 48-72 horas a una temperatura de -20 ° C.

El micelio congelado que quedó adherido al papel filtro se recuperó con una espátula estéril tomando 50 a 55 mg del mismo, colocándolos en tubos Eppendorf (de 1.5 mL), para la posterior extracción de DNA (*Gonzalez, B., 2005*).

4.6. Extracción de DNA de *A. fumigatus*

Para extraer el material genético del hongo, se utilizó una técnica enzimática, esta tiene como propósito romper la pared del hongo mediante el uso de la enzima liticasa, y así liberar el contenido celular; además, el uso de acetato de potasio (AcK) y de alcohol etílico, fue para eliminar la mayor cantidad de contaminantes proteicos de las muestras.

Se trabajó con liticasa en presentación de 260 U/ mg de liofilizado, conteniendo en total 192.3 mg de enzima, correspondiendo aproximadamente a 50,000 U por frasco (SIGMA, L4025-50UK), las condiciones óptimas de pre-tratamiento de DNA del hongo trabajadas fueron utilizando 500 U de liticasa contenidas en 100 μ L de PBS (las condiciones que se estandarizaron de la enzima se explican en el punto 4.6.1), para la extracción del material genético se trabajaron dos pasos. El Paso 1: pre-tratamiento del hongo y el Paso 2: extracción y purificación de DNA, la metodología para cada uno de ellos se describe a continuación.

Paso 1: A 55 mg de micelio congelado (tiempo de crecimiento del hongo en CDS de 24 horas), se le agregaron 450 μ L de Buffer de Extracción (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA y 28 mM β -mercaptoetanol) (ver anexo 8.3), después se adicionaron 500 U (contenidas en 50 μ L de PBS) de liticasa para que quedara a un volumen total de 500 μ L.

Paso 2: Se incubó durante 45 minutos a 37 ° C, se centrifugó durante 15 minutos a 7826 X g (9300 rpm). Se decantó el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100 μ L, se trató con 500 μ L de solución Tris (Tris 1 M, 10 mM EDTA; ver anexo 8.4), además de 500 μ L de SDS al 10 % durante 45 minutos a 65 ° C para lisar los plastos. A esta suspensión se le agregaron 650 μ L de acetato de potasio (ver anexo 8.5) y se incubó a -20 ° C durante 40 minutos. Se centrifugó a 1000X g (3300 rpm) por 20 minutos para separar proteínas, se obtuvo el sobrenadante, en un tubo de 1.5 mL, a este se le adicionaron nuevamente 650 μ L de acetato de potasio, se dejaron en congelación a -20 ° C durante 40 minutos. Se centrifugó a 1000 X g (3300 rpm) por 20 minutos extrayendo el sobrenadante. Todo lo anterior se realizó con la finalidad de eliminar las proteínas.

Para precipitar el DNA disuelto en el sobrenadante, se le agregaron 750 μL de alcohol isopropílico frío (Técnica química, N° de Cat. A 1730), se agitó levemente y se centrifugó a 2000 X g (6500 rpm) durante 3-5 minutos; se decantó conservando la pastilla. Con la finalidad de eliminar restos contaminantes proteicos de la muestra de DNA, a la pastilla obtenida se le agregó 1 mL de etanol al 70% (Baker, N° de Cat. 9000-03; Anexo 8.6), se agitó levemente, se centrifugó a 2600 X g (9000 rpm) y se decantó para resuspender el sedimento; finalmente se adicionaron 100 μL de amortiguador de conservación (Tris-EDTA; Anexo 8.7) o en caso de ser necesario se agregó mayor volumen para que el DNA extraído se pudiera disolver completamente (Löeffler, *et al*, 1999). La solución de DNA puede congelarse o refrigerarse meses hasta años, conservando sus propiedades.

4.6.1. Estandarización de la cantidad de enzima empleada, diluyente óptimo y tiempo de incubación del hongo

Para la extracción del DNA, se prepararon 2 soluciones madre (ver anexo 8.11): solución A) 50,000 U/5 mL en PBS y solución B) 50,000 U/10 mL en agua desionizada; se eligieron estos dos disolventes debido a que las instrucciones del producto liofilizado no especificaban con precisión este punto.

Para lo anterior, se trabajaron 3 diferentes cantidades de la enzima (50, 250 y 500 U), y como se emplearon las dos soluciones madres, las cantidades y volúmenes utilizados (U/ μL) quedaron de la siguiente manera:

Solución A en PBS: 50/5, 250/25 y 500/50 U/ μL .

Solución B en agua desionizada: 50/10, 250/50 y 500/100 U/ μL .

Se trabajó con las 6 condiciones anteriores, para llevar a cabo la extracción de DNA a partir de 55 mg de micelio congelado (de 24 horas de crecimiento). Se empleó la misma metodología de pre-tratamiento y extracción de DNA, del Paso 1, primero se colocó la cantidad de buffer de extracción necesario para completar al final 500 μL y después se agregó la cantidad de U/ μL de liticasa a probar, la metodología de Paso 2 fue la misma para todos los casos.

Finalmente, se optimizó el tiempo de cultivo del hongo para ver como influía con respecto al rendimiento de la extracción de DNA, por lo que una vez obtenida la cantidad de 500 U de enzima para 55 mg de micelio para la digestión del hongo, se probó la misma técnica de extracción de DNA, comparando dos tiempos de cultivo en CDS (a 24 y a 72 horas), cada condición se realizó 6 veces.

4.7. Cuantificación y determinación de la pureza del material genético de *A. fumigatus*

La cuantificación se realizó empleando un espectrofotómetro de luz ultravioleta UV (UV 1101 Biotech photometer). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 280 y de 260 nanómetros (nm).

El valor de la densidad óptica (D.O.) obtenido a 260 nm es utilizado para la cuantificación del DNA, realizando los cálculos siguientes:

$$\frac{50 \times Fd}{1000} = Fc$$

$$X \text{ en } \mu\text{g}/\mu\text{L} = Fc \times A_{260}$$

donde:

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se refiere a la concentración de DNA de cadena doble que equivale a un valor de D.O. de 1.0.

Fc= Factor de conversión.

Fd = factor de dilución, obtenida a partir de la dilución que se efectuó a la muestra, en agua desionizada.

1000 corresponde al factor de conversión para expresar el resultado de concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

X es el resultado de la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La lectura a 280 nm se utilizó para medir la concentración de proteínas, que sirve para determinar la pureza de las muestras, que es el resultado del cociente A_{260} / A_{280} . Para obtener la cantidad de DNA total en μg , se multiplicó la cantidad total de

volumen en la que se resuspendió el DNA obtenido por la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ calculada.

Para la interpretación de los resultados de pureza se tiene establecido el siguiente criterio: cuando el valor de la relación es cercano a 1.8 (1.7-1.9), el DNA obtenido está sin contaminantes. El valor de 1.6 o por debajo de éste, indica que la muestra esta contaminada con proteínas y finalmente si el valor se ubica igual o por arriba de 2.0, la muestra esta contaminada con RNA.

4.8. Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de la integridad del DNA extraído

Para conocer la integridad del DNA extraído de las muestras, se corrieron electroforesis en geles de agarosa (Gibco, BRL, N° de Cat. 15510-019; Anexo 8.9) al 0.7% en amortiguador TBE 0.5X (Tris-borate-EDTA; ver anexo 8.8). La mezcla de agarosa y TBE se calentó 2 minutos en horno de microondas y se dejó entibiar, y posteriormente de una solución madre de bromuro de etidio (10 mg/mL; ver anexo 8.12) se adicionaron 3 μL por cada 100 mL de gel de agarosa (cantidad final de 30 μg BrEt); finalmente, en la cámara de electroforesis se depositó el volumen correspondiente de la solución de agarosa, 45 mL o 110 mL, con el peine de 12 carriles o de 30 carriles, respectivamente. Para la colocación de las muestras en el gel de agarosa, se mezclaron sobre un pedazo de parafilm, 10 μL de muestra de DNA y 5 μL de amortiguador de carga 0.5X (ver anexo 8.10). Las muestras se dispensaron en los carriles seleccionados, se cerró el sistema y se corrió la electroforesis a 50 Volts durante 50 minutos aproximadamente. Los corrimientos se analizaron en el trasiluminador de luz UV y se registraron con fotografías (cámara Canon G6 Supershot).

4.9. Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Aspergillus fumigatus*

La PCR es una técnica de biología molecular que amplifica un fragmento de DNA plantilla que se quiera estudiar, en el presente trabajo se implementó esta técnica usando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 (Invitrogen, Co.) para obtener el

amplicon del gen 18S rRNA de *Aspergillus* cuyo tamaño es de 504 pb. Es importante que los componentes de la PCR se encuentren en concentraciones o cantidades óptimas para obtener el producto esperado, por lo que se estandarizó la cantidad de DNA, la concentración de MgCl₂, la concentración de los pares de iniciadores, tanto de 18S A1/18S A2 como de β actina (control interno del sistema), y en el caso de ser necesario, agregar algún otro componente importante como la albúmina sérica bovina (ASB) para obtener la amplificación óptima.

4.9.1. Determinación del porcentaje de gel de agarosa óptimo para el corrimiento de los amplicones resultantes de la PCR

El determinar el porcentaje de agarosa para el gel, es útil para obtener un corrimiento con buena resolución de las bandas, por lo que se procedió a evaluar tres concentraciones para la preparación de éstos (0.7, 1.0 y 2.0 %) y se corrieron en los mismos, varios amplicones previamente identificados.

4.9.2. Características de los iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus* y de los iniciadores de β actina utilizados en la PCR

En la **Tabla 4.1.** se muestran los iniciadores (Invitrogen, Co.) para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA del hongo y del fragmento del gen de β actina, los primeros son específicos para identificar el género fúngico *Aspergillus* los cuales son altamente conservados (Einsele, H., *et al*, 1997; Loeffler, et al, 1999).

En cuanto a los iniciadores del gen de β actina (control interno del sistema) que amplifican un producto de 273 pb, se utilizaron para evaluar y confirmar que los reactivos empleados se encontraran en buenas condiciones para llevar a cabo la PCR.

Tabla 4.1. Características de los iniciadores 18S A1, 18S A2 y de los iniciadores de β actina.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)
18S A1	AAT GGA GGG CAA GTC TGG TG	504
18S A2	CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG	
β actina S**	GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GG	273
β actina AS**	TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT ACG	

**Control interno del sistema

4.9.3. Cuantificación de los iniciadores

La determinación de la molaridad de los 2 pares de iniciadores, se hizo mediante lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 260 nm; los cuales estaban liofilizados y se resuspendieron en 200 μ L de agua inyectable, posteriormente se realizaron diluciones de 1:500 o 1:601 en celda espectrofotométrica para obtener las lecturas, datos que permitieron preparar las soluciones madre de 1×10^{-6} M y así poder usarlos en la PCR.

La fórmula para determinar **em (extinción molar)** es:

Por cada base púrica o pirimídicas del iniciador empleado, se sigue la siguiente fórmula:

$$Em = \Sigma G (12000) + \Sigma A (16000) + \Sigma T (9600) + \Sigma C (7000)$$

Simbología; G= guaninas T=timinas A=adeninas C=citosinas Σ =sumatoria

Después de obtener la D.O.260 se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración molar de iniciador} = \frac{\text{D.O.260} \times \text{dilución de la muestra}}{Em}$$

Nota: la dilución de la muestra es variable, por ejemplo si se realizó una dilución de 1:500; la D.O. (a 260 nm) se multiplica por 500.

Es importante señalar como se obtuvieron las concentraciones de iniciadores para utilizarlos en las PCR, para ello se realizaron diluciones a partir de la solución madre de 1×10^{-6} M, para obtener la concentración final en el vial Eppendorf de PCR.

Para preparar las soluciones 1, 2 y 4 nM se hicieron las siguientes diluciones de la solución madre: 1:40, 1:20, 1:10, respectivamente; y para la de 40 nM, finalmente se tomó directamente de la solución madre, es importante que las diluciones se hagan en el momento de la realización de la PCR.

4.9.4. Estandarización de la PCR para la amplificación del fragmento de gen 18S rRNA y de β actina de *Aspergillus fumigatus*

Con el propósito de establecer las condiciones de trabajo para la realización de la técnica de la PCR para los iniciadores 18S A1/18S A2 y de β actina humana, se partió de los siguientes componentes: amortiguador de PCR 10X; $MgCl_2$ a 50 mM; dNTP's a 10 mM; ASB a 200 μ g/ mL; iniciadores de β actina a 1×10^{-6} M cada uno; iniciadores 18S a 1×10^{-6} M cada uno; DNA plantilla de *Aspergillus* a 1 μ g/vial; Taq polimerasa a 5 U/ μ L y agua inyectable para ajustar los volúmenes finales de la PCR a 50 μ L (Löeffler, *et al*, 1999).

Los reactivos que se utilizaron en el presente trabajo son de las marcas Invitrogene para la Taq polimerasa; Promega para los dNTP's y para el marcador (escalera) de 100 pares de bases.

Todos los corrimientos de PCR se realizaron en un Termociclador marca Biometra T Gradient. Como control negativo se incluyeron en cada corrimiento un tubo con todos los componentes del sistema, pero sin DNA plantilla. El producto se puede conservar a 4 ° C durante varios meses.

Para la estandarización del control interno del sistema de la PCR (β actina), se trabajaron combinaciones de las siguientes condiciones: 2 cantidades de DNA, 500 y 1000 ng/vial, tres concentraciones de $MgCl_2$, a 2.5, 5.0 y 10.0 mM y se usaron dos

concentraciones de iniciadores 1.0 y 40 nM, sin ASB (Albúmina sérica bovina). Se trabajaron las siguientes condiciones del termociclador para llevar a cabo la PCR para β actina: precalentado de 5 min a 92 ° C; 40 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno: desnaturalización 30 seg. a 92 ° C, alineamiento 30 seg. a 53 ° C y elongación 30 seg. a 72 ° C; finalmente un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos. Debido a que no se obtuvieron amplificadas a estas condiciones, se realizó otra PCR para la amplificación de beta actina con la única diferencia que éste no incluía un precalentamiento (ya que este parámetro pudo haber influido en los resultados negativos), pero no se volvieron a tener amplificadas. Por lo tanto surgió la necesidad de cambiar el esquema de trabajo a las condiciones del termociclador para la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA: 35 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno: desnaturalización 30 segundos a 94 ° C, alineamiento 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; finalmente un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Es importante mencionar que fue necesario el uso de ASB, la cual se agregó a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, porque en los corrimientos iniciales sin el uso de ASB no hubo amplificación de los productos específicos; por lo tanto en la literatura se encontró el uso de ASB para optimizar las condiciones de dicha reacción (Loeffler, *et al*, 1997).

En la **Tabla 4.2.**, se muestran las características de trabajo para la amplificación de β actina, las cuales fueron: DNA 500 y 1000 ng, concentración de MgCl_2 2.5, 5.0 y 10 mM y concentración de iniciadores a 1 nM y 40 nM.

Tabla 4.2. Componentes para la técnica de PCR para la estandarización de la amplificación del gen de β actina.

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR 10X	1X	5
ASB 1 mg/mL	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10
MgCl_2 50 mM	2.5mM, 5mM y 10mM	2.5, 5 y 10, respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5

Iniciador β actina S (1×10^{-6} M)	40, 1.0 nM	2
Iniciador β actina AS (1×10^{-6} M)	40, 1.0 nM	2
DNA plantilla 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	500 y 1000 ng	0.5 y 1, respectivamente
H ₂ O inyectable	-	cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/ μL	2 U/ μL	0.4
Volumen final	-	50
Condiciones del termociclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.		

Para la estandarización de la amplificación del fragmento 18S rRNA de *Aspergillus*, se trabajaron con 5 cantidades de DNA (100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/vial), tres de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM) y cuatro de iniciadores (40 nM, 4.0 nM, 2.0 nM y 1.0 nM)(ver **Tabla 4.3.**). Además se incluyó el control interno del sistema, con las condiciones óptimas de amplificación obtenidas (MgCl₂ 10.0 mM, iniciadores 40 nM y 1000 ng/vial de DNA molde), estas tres concentraciones resultaron de la estandarización lograda por medio de los corrimientos de la PCR explicados en la **Tabla 4.2.**

Tabla 4.3. Estandarización de la técnica de PCR utilizando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus*.

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR 10X	1X	5
ASB 1 mg/mL	0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	10
MgCl ₂ 50 mM	2.5 mM, 5.0 mM, 10.0 mM	2.5, 5, 10, respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
Iniciador 18S A1 1×10^{-6} M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
Iniciador 18S A2 1×10^{-6} M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
DNA Hongo 1 $\mu\text{g}/$ vial	100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/ vial, respectivamente	0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 respectivamente
H ₂ O inyectable		cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/ μL	2 U/ μL	0.4
Volumen final 50		50
Condiciones del termiclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.		

Una vez obtenidas las condiciones de estandarización de la técnica de la PCR para el DNA del hongo, se determinaron las características de corrimiento de ésta reacción con DNA de hongo (*A. fumigatus*), de humano y de bacteria (*Bordetella spp.*), para confirmar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2 de *Aspergillus*, por ello se usaron diferentes cantidades de DNA por reacción (250, 500 y 1000 ng), concentraciones de MgCl₂ (2.5 y 5.0 mM) y de iniciadores (40.0, 4.0, 2.0 y 1.0 nM).

4.10. Electroforesis en gel de agarosa para la observación de los amplicones de la PCR.

Componente de la PCR y [C] de solución madre	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR 10X	1X	5
MgCl ₂ 50 mM	2.5, 5 mM	2.5 y 5 respectivamente
dNTP's 10 mM	0.5 mM	2.5
ASB 1 mg/ mL	0.2 µg/µL	10
Iniciador 18S A1 1 x 10 ⁻⁶ M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
Iniciador 18S A2 1 x 10 ⁻⁶ M	1.0, 2.0, 4.0, 40 nM	2
DNA hongo, DNA bacteria, DNA humano 1 µg/ vial	250, 500, 1000, ng/ vial	0.25, 0.5, 1, respectivamente
H ₂ O inyectable	---	cbp
Buffer PCR 10X	5X	0.4
Taq polimerasa 5 U/µL	2 U/ µL	0.4
Volumen final		50

Condiciones del termociclador: se corrieron 35 ciclos, consistiendo cada uno de tres etapas: desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, alineamiento de 30 segundos a 62 ° C y elongación de 2 minutos a 72 ° C; y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el procedimiento 4.9.1., los productos de las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2%, para identificar los amplicones correspondientes. Además del marcador de pares de bases (pb), se incluyó en cada corrimiento de electroforesis un amplicon previamente obtenido de β actina de 274 pb y/o de 18S rRNA de 504 pb en gel de agarosa, para que sirviera de referencia del tamaño de los productos esperados.

4.11. Análisis de la intensidad de amplicon empleando el programa Kodak 1D 3.6

Se utilizó el programa de computadora (Kodak 1D 3.6) para medir la intensidad de las bandas obtenidas en la electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, por lo que se realizó el análisis de los productos de interés que se amplificaron utilizando las condiciones óptimas de la PCR determinadas en experimentos previos durante el presente trabajo; con respecto a los valores de intensidad, el programa los reporta en unidades arbitrarias de intensidad (UAI); asimismo, se empleó el DNA del hongo (*A. fumigatus*) y el DNA de humano, para corroborar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2.

Cabe señalar que todas las muestras que se evaluaron en este proceso, fueron reproducidas nuevamente, es decir, se repitió el procedimiento de la PCR para la obtención de dichos amplicones.

La **Tabla 4.5.** muestra las condiciones de la PCR que dieron amplificación del fragmento del gen de 18S rRNA y del fragmento del gen de β actina, el análisis de intensidad se realizó con la finalidad de seleccionar las condiciones óptimas que permitieron realizar la técnica de la PCR con mayor confiabilidad y veracidad.

Tabla 4.5. Condiciones de trabajo de la técnica de la PCR para la obtención de productos analizados con programa Kodak 1D 3.6.

Muestra Componente y [C] final en vial de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8
	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum	<i>Af</i>	Hum
PCR buffer 10X	5	5	5	5	5	5	5	5
MgCl ₂ (2.5, 5, 10 mM)	2.5	2.5	5	5	2.5	2.5	10	10
ASB (200 µg/mL)	10	10	10	10	10	10	10	10
dNTP's (0,5 mM)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Inic S (40 nM) <i>Af</i>	2	2						
Inic AS (40 nM) <i>Af</i>	2	2						
Inic S (2 nM) <i>Af</i>			2	2	2	2		
Inic AS (2 nM) <i>Af</i>			2	2	2	2		
Inic S (40 nM) β actina							2	2
y AS (40 nM) β actina							2	2
DNA plantilla (250,500,1000 ng/vial)	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	1	1
H ₂ O	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp	cbp
Taq pol/PCR buffer (1:1)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

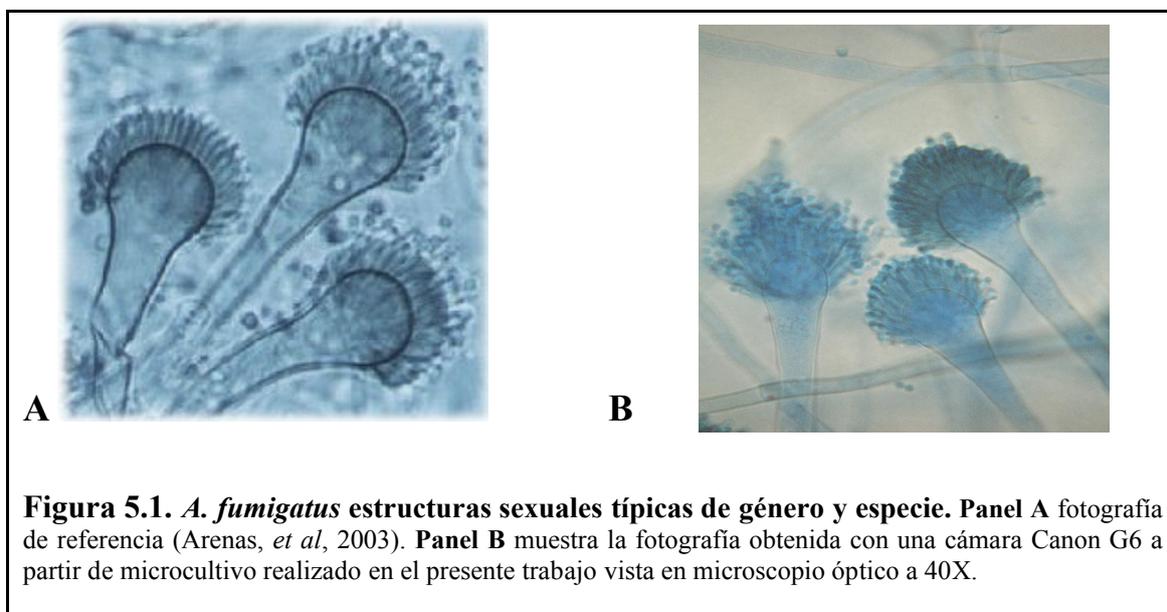
Todas las unidades expresadas en la Tabla 4.5 están en µL. El número ubicado arriba de la muestra indica el número de carril donde se encuentra el amplicon obtenido en el gel de agarosa al 2%.

Hum= DNA Humano; ***Af***= DNA de *A. fumigatus*; **Inic**= Iniciador; **S**= sentido; **AS**= Antisentido; **Taq Pol**= Taq polimerasa; **cbp**= cuanto baste para

5. RESULTADOS

5.1. Conservación, crecimiento e identificación de la cepa de *A. fumigatus*

Se logró el crecimiento del micromiceto sobre el tubo inclinado en medio sólido SDA, el cual mostró un color café claro sobre la base y un color café oscuro típico de las esporas del mismo sobre su superficie, a partir de lo anterior se realizó un microcultivo para apreciar las hifas sexuales (conidias, conidióforos) teñidas con azul de algodón. En la **Figura 5.1.** se presentan las típicas cabezas conidiales de *A. fumigatus*, en el Panel B se pueden apreciar los conidióforos obtenidos del microcultivo realizado en el presente trabajo (fotografía tomada en el microscopio óptico -Olympus- usando una cámara Canon G6), se observa como la morfología de las cabezas conidiales de la cepa trabajada es igual a la reportada en la literatura en Panel A (Arenas, *et al*, 2003).



5.2. Extracción y cuantificación de DNA de los cultivos de *A. fumigatus*

La técnica utilizada fue una lisis enzimática (método desarrollado por Loeffler, J. *et al*, 1997), que sirvió para romper la pared de quitina del hongo. Se realizaron varias extracciones de DNA usando diferentes cantidades de liticasa (50 U, 250 U y 500 U) para obtener la cantidad óptima de trabajo. En la **Tabla 5.1.** se muestran los resultados de las concentraciones y de la pureza del DNA obtenidos con las diferentes

concentraciones de liticasa. La enzima liofilizada se resuspendió en agua desionizada o en PBS (ver anexo 8.11.).

Como se puede ver en dicha tabla, el mejor rompimiento de la pared fúngica se obtuvo con 500 U de liticasa disuelta con PBS (muestra A3), con una concentración total de DNA extraído de 273.0 μg y de pureza de 1.82. Cabe señalar que las muestras de esporas del hongo (para este experimento) tuvieron 24 horas de crecimiento en medio CDS, para ambos diluyentes y las diferentes cantidades enzima empleada en cada uno de los experimentos.

Tabla 5.1. Concentración y valores de pureza de las muestras de DNA de *A. fumigatus* obtenidas con diferentes cantidades de liticasa

Identificación de Muestras	Unidades de enzima/ Diluyente		Pureza ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$)	Concentración DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad total de DNA (μg)
A1	50 U	PBS	1.12	2.0	224.0
A2	250 U		1.20	2.2	180.0
A3	500 U		1.82	1.9	273.0
B1	50 U	H ₂ O	0.61	2.0	122.0
B2	250 U		0.26	2.4	78.0
B3	500 U		0.24	1.8	72.0

Una vez obtenidas las condiciones anteriores de digestión del hongo, se realizaron nuevas extracciones de DNA del hongo usando 500 U de enzima diluida en PBS para determinar como es que influye el tiempo de incubación para obtención del micelio, en la extracción de DNA y en la pureza del mismo. En la **Tabla 5.2.** se precisan los diferentes tiempos de incubación de esporas del hongo en el medio CDS, las muestras del 1 al 6, corresponden a micelios donde el tiempo de cultivo fue de 72 horas; las muestras del 7 al 12, corresponden a micelios resultantes de cultivo de 24 horas. Para la extracción de DNA todas las muestras se trataron de la misma manera.

Los valores de rendimiento del DNA, de los cultivos de 24 horas, estuvieron entre 0.64 y 1.82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de pureza entre 1.6 a 2.2. Los cultivos de 72 horas dieron rendimientos menores de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y valores de pureza entre 1.1 y 1.9. En base a los resultados de la **Tabla 5.2.** se puede mencionar que los valores de concentración y pureza del DNA obtenido de las muestras con crecimiento de 24 horas resultaron ser más aceptables que los obtenidos de las muestras con crecimiento de 72 horas. Indicando que el tiempo de cultivo del hongo es importante en la obtención de un DNA de buena calidad, que garantice la amplificación de los fragmentos del gen 18S rRNA y de β actina por la técnica de la PCR.

Se obtuvo el promedio del material genético extraído de las muestras de 24 horas de crecimiento de esporas del hongo en medio CDS, a partir de la muestra A3 (Tabla 5.1) y de las muestras 7 a la 12 (Tabla 5.2.), se reportó que fue de 139 μg de DNA, asimismo se obtuvo el promedio de las muestras con 72 horas de crecimiento fúngico de las muestras 1 a la 6 (Tabla 5.2.) y se reportó que se extrajo 60 μg de DNA.

Tabla 5.2. Valores de concentración y pureza del DNA de *A. fumigatus*, de cultivos de 24 y 72 horas para obtención de micelios

Muestra del micelio	Tiempo de incubación del hongo	Concentración DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Pureza
1	72 horas	0.32	1.2
2		0.33	1.1
3		0.36	1.2
4		0.96	1.8
5		0.45	1.7
6		0.77	1.9
7	24 horas	1.34	1.6
8		0.64	2.0
9		0.88	1.7
10		1.12	2.0
11		1.20	2.2
12		1.82	1.9
Todas las muestras se encontraban en un volumen final de 100 μL de buffer de conservación			

5.3. Análisis de la integridad del DNA de *A. fumigatus*

Para evaluar la integridad del DNA extraído de *A. fumigatus* en el experimento anterior, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, en la **Figura 5.2.** se muestra la imagen del corrimiento electroforético de las muestras de DNA obtenidas (identificadas en cada carril de la misma manera que en la tabla anterior), no se observa degradación del DNA en ninguna de ellas y en todas se puede apreciar la banda de material genético.



Figura 5.2. Resultados del análisis de la integridad del DNA de *A. fumigatus*. Los carriles 1 al 6 son cultivos de 72 horas de crecimiento del hongo; los carriles del 7 al 12, corresponden a cultivos de 24 horas. El DNA fue teñido con Bromuro de etidio (BrEt). El volumen dispensado de cada muestra fue de 10 μ L por carril.

5.4. Determinación del porcentaje óptimo de agarosa en geles para el análisis de los productos de las PCRs.

Debido a que la definición de las bandas correspondientes a los productos amplificados en la reacción de la PCR dependen de la concentración de agarosa en los geles, se probaron las concentraciones de 0.7, 1.0 y 2.0 %. La **Figura 5.3.** muestra los resultados de estos corrimientos, observándose que la concentración en la que mejor se desplazaron y presentaron una resolución más clara las bandas de los productos de la PCR, fue en el gel de 2.0 % (Panel C), donde se aprecian los productos de amplificación del fragmento del gen 18S rRNA de 504 pb como bandas compactas e intensas, lo que los hace fácilmente identificables. Con el gel de 0.7% (Panel A), en ninguno de los carriles se alcanza a observar la banda con dichas características, lo que no permite la identificación del producto amplificado. Por último, en los geles de 1% (Panel B) se observaron bandas aceptables de los productos de 274 pb y 504 pb, del gen de β actina y del gen 18S rRNA, respectivamente. Por otro lado, aunque se observó que en ambos geles de agarosa preparados al 1% y al 2% se obtuvieron buenas resoluciones de las bandas, finalmente se eligió utilizar el gel de agarosa al 2% para asegurar una buena visualización de los productos amplificados, además de que coincidió con lo referido por la literatura para el análisis de los amplicones de *A. fumigatus*, por lo tanto los corrimientos posteriores se realizaron en geles a esa concentración (Loeffler, *et al*, 1997, 2001; Einsele, *et al*, 1997).

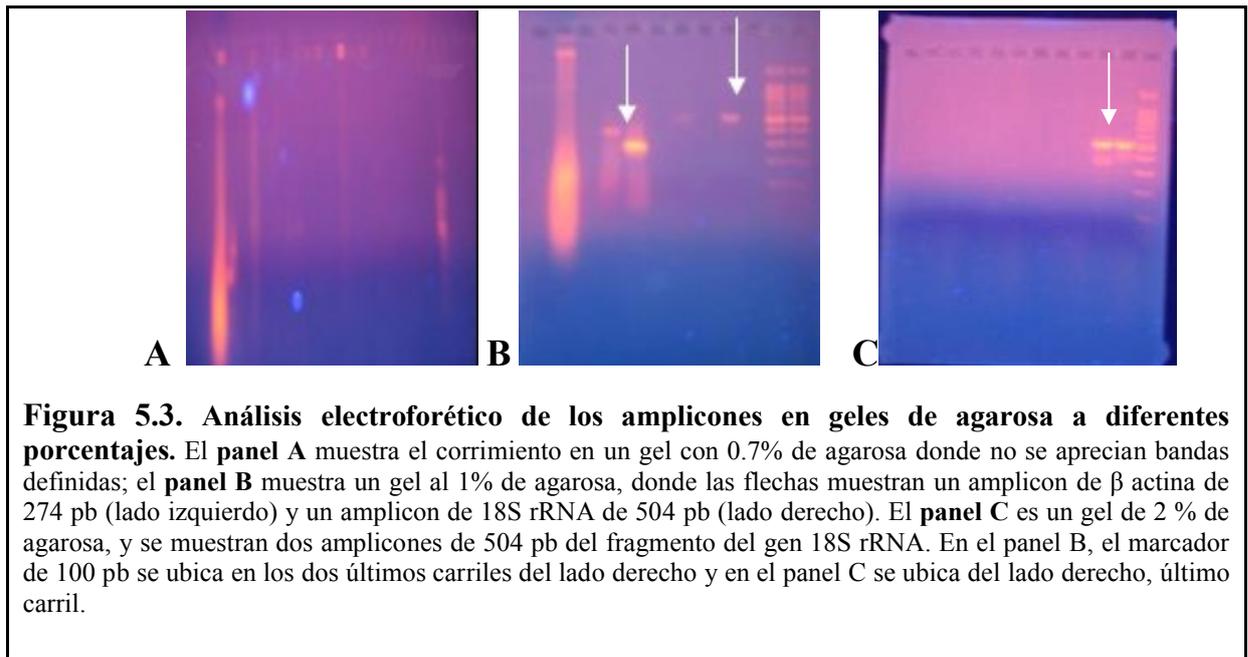


Figura 5.3. Análisis electroforético de los amplicones en geles de agarosa a diferentes porcentajes. El **panel A** muestra el corrimiento en un gel con 0.7% de agarosa donde no se aprecian bandas definidas; el **panel B** muestra un gel al 1% de agarosa, donde las flechas muestran un amplicon de β actina de 274 pb (lado izquierdo) y un amplicon de 18S rRNA de 504 pb (lado derecho). El **panel C** es un gel de 2 % de agarosa, y se muestran dos amplicones de 504 pb del fragmento del gen 18S rRNA. En el panel B, el marcador de 100 pb se ubica en los dos últimos carriles del lado derecho y en el panel C se ubica del lado derecho, último carril.

5.5. Estandarización de la PCR para la amplificación de genes de *A. fumigatus*

Para la estandarización de la técnica de PCR, se evaluaron 3 parámetros importantes durante el presente trabajo, que fueron: la cantidad de DNA, la concentración de $MgCl_2$ y la concentración de ambos pares iniciadores (β actina y 18S A1/18S A2); los resultados se describen en los siguientes subcapítulos.

5.5.1. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación de los fragmentos de genes de 18S rRNA y β actina de *Aspergillus*

Se realizó la estandarización de la técnica de la PCR, para ello fue importante establecer las condiciones de un control interno del sistema. El gen que se eligió fue el de β actina, por ser un gen constitutivo, que codifica una proteína del citoesqueleto (William, C., *et al*, 2005; Loeffler, *et al*, 2001).

Para la estandarización del control interno del sistema de la PCR (β actina), se trabajaron las combinaciones de las siguientes condiciones: 2 cantidades de DNA, 500 y 1000 ng/vial, se varió la concentración de $MgCl_2$, a 2.5, 5.0 y 10.0 mM y se usaron dos

concentraciones de iniciadores 1.0 y 40 nM, donde no estaba incluido el uso de la albúmina sérica bovina (ASB). Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: un precalentamiento de 5 min a 92 ° C, 40 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno (desnaturalización 30 seg. a 92 ° C, alineamiento 30 seg. a 53 ° C y elongación 30 seg. a 72 ° C); y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

No se logró la amplificación del producto esperado para β actina (datos no mostrados). Utilizando condiciones de trabajo similares a las anteriores, se corrió una nueva PCR para β actina con la única diferencia que éste no incluía un precalentamiento (para determinar si este influyó en que los resultados obtenidos anteriores fueran negativos), pero de igual manera, no se volvió a obtener el amplicon específico de 274 pb (resultados no mostrados).

Por lo tanto surgió la necesidad de tratar de amplificar el producto del gen de β actina cambiando las condiciones del termociclador a las reportadas para la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA, que fueron: 35 ciclos que consistían en 3 etapas cada uno (desnaturalización 30 seg. a 94 ° C, alineamiento 30 seg. a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C); y un ciclo final de elongación a 72 ° C durante 5 minutos. Se incluyó la adición de ASB para todos los corrimientos posteriores.

Se siguieron manteniendo las mismas combinaciones de trabajo descritas anteriormente para las cantidades y concentraciones de reacción de la PCR para β actina, por lo tanto los resultados se muestran en la **Figura 5.4.** donde se detectaron productos específicos de β actina usando 10.0 mM de $MgCl_2$, 40 nM de iniciadores y 1000 ng/vial de DNA hongo (Carril: 1 y 2); no obstante que ambos carriles son duplicados, el carril 2 tiene una mayor intensidad de la banda del producto obtenido, lo cual se puede deber a variación en el pipeteo del volumen dispensado de la muestra en el carril del gel de agarosa. Precisando que no se obtuvieron resultados positivos empleando concentraciones menores de 10 mM de $MgCl_2$ ni la concentración de iniciadores a 1 nM. Asimismo, cuando se utilizaron 500 ng de DNA no se obtuvieron productos en ninguna combinación con concentración de iniciadores y concentración de $MgCl_2$ (datos no mostrados).

Finalmente, los resultados demostraron que las condiciones óptimas de amplificación del fragmento del gen de β actina, fue con las siguientes condiciones de la PCR: **MgCl₂ a 10.0 mM, iniciadores a 40 nM y con 1000 ng/vial de DNA hongo**, por lo tanto, en los corrimientos posteriores se incluyó el control interno del sistema utilizando las condiciones óptimas descritas anteriormente.

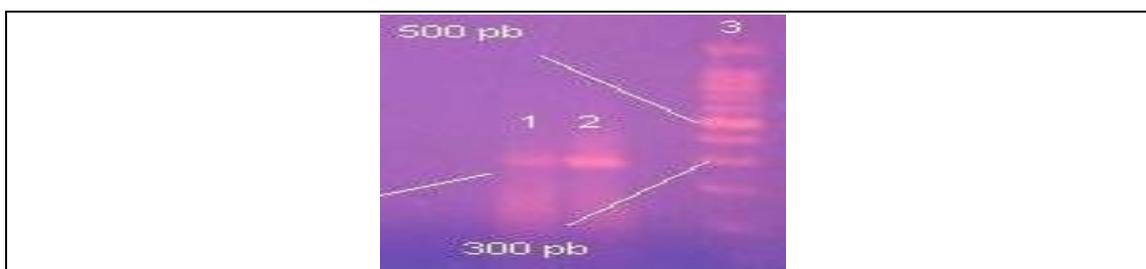


Figura 5.4 Análisis electroforético para la detección del producto específico de β actina en gel de agarosa al 2%.

Los carriles 1 y 2 muestran el producto del gen β actina con 1000 ng de DNA molde; 10.0 mM de cloruro de magnesio y 40 nM de iniciadores para β actina. El carril 3 muestra el marcador de 100 pb. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Obtenidas las condiciones óptimas para el control interno del sistema (β actina), se procedió con la estandarización de la amplificación del fragmento del gen de 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Para la estandarización de la amplificación del fragmento 18S rRNA de *Aspergillus*, lo que se planteó manejar en esta parte del trabajo fue la combinación de las siguientes condiciones: cuatro concentraciones de iniciadores (40 nM, 4.0 nM, 2.0 nM y 1.0 nM), cinco cantidades de DNA fúngico (100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/vial) y tres concentraciones de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM); en todos los corrimientos también se incluyó ASB a una concentración de 0.2 μ g/ μ L; asimismo, se trabajó el control interno del sistema, el cual se corrió bajo las condiciones óptimas determinadas anteriormente, además se incluyó un control negativo, que contienen todos los reactivos de reacción de la PCR, a excepción del DNA molde.

La **Figura 5.5.** muestra el análisis electroforético de los resultados obtenidos mediante la titulación de la cantidad de DNA fúngico (100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/vial), y la titulación de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM), todos los corrimientos de PCR a

una concentración constante de 40 nM de iniciadores, se incluyó un amplicon de 274 pb y otro de 504 pb (previamente obtenido).

Se registraron amplicones con las siguientes características de reacción de la PCR: 100, 250, 500, 1000 y 2000 ng de DNA/vial; MgCl₂ de 2.5 y 5.0 mM, también hubo productos cuando se emplearon las mismas cantidades de DNA anteriores y concentración de 10 mM de MgCl₂, donde no se observó amplicon con 1000 ng de DNA (carril R).

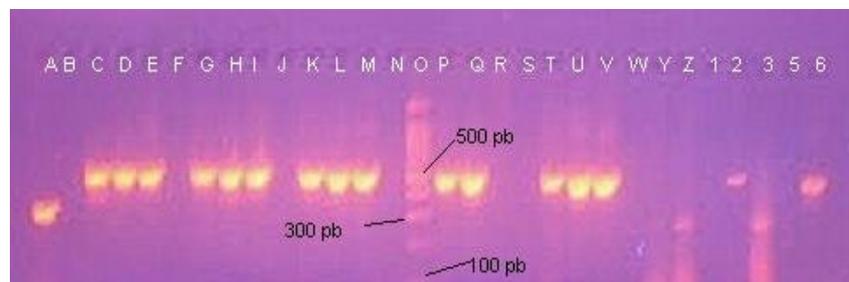


Figura 5.5. Análisis electroforético de la titulación de DNA y de MgCl₂, con concentración de iniciadores a 40 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Carriles, A = Amplicon de 274 pb (previamente obtenido), 6= amplicon de 504 pb (previamente obtenido); de C a E = 100 ng de DNA de hongo; de G a I = 250 ng de DNA; de K a M = 500 ng de DNA; de P a R = 1000 ng de DNA; de T a V = 2000 ng de DNA, concentraciones de MgCl₂ 2.5, 5.0 y 10.0 mM, respectivamente; O = marcador de 100 pb; Z y 3 = controles internos del sistema de 274 pb.

Carriles B, F, J, N, S, W, Y, 1 y 2 = carriles vacíos. Gel de agarosa al 2%.

El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Cuando se intentó amplificar el fragmento del gen de 18S rRNA de *A. fumigatus* empleando una concentración constante de 4 nM de iniciadores, no se obtuvieron productos en ninguna de las combinaciones con cantidades de DNA (250, 500 y 1000 ng/vial), ni en ninguna concentración de MgCl₂ empleada (2.5, 5.0 y 10.0 mM) (resultados no mostrados).

En otro experimento se utilizaron los iniciadores a una concentración de 2 nM, en donde se realizó la titulación de cantidad de DNA fúngico (250, 500, 1000 y 2000 ng/vial), y de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM); se incluyó un amplicon de 504 pb (previamente obtenido).

Los resultados anteriores se muestran en la **Figura 5.6.** donde se observa la obtención de los productos del fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* de 504 pb, solo cuando se utilizaron: 250 ng de DNA y 5.0 mM de MgCl₂ (carril C); asimismo, cuando se utilizaron 500 ng de DNA y con 2.5 mM de MgCl₂ (carril E).



Figura 5.6. Titulación de DNA y de MgCl₂, con concentración de iniciadores a 2 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* mediante el análisis electrofororético.

Carriles, A = Amplicon de 274 pb (previamente obtenido); B, C y D = 250 ng de DNA; E, F y G = 500 ng de DNA; H, I y J = 1000 ng de DNA; K, L y N = 2000 ng de DNA, cada cantidad de DNA con concentraciones de MgCl₂ 2.5, 5.0 y 10.0 mM, respectivamente; M=marcador de 100 pb. Gel de agarosa al 2%. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

En la **Figura 5.7.** se muestran los resultados empleando una concentración constante de 1 nM de iniciadores en todos los casos, además se realizó la determinación de la cantidad de DNA fúngico (100, 250, 500, 1000 y 2000 ng/vial), y de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10.0 mM), se incluyó un amplicon de 274 pb (previamente obtenido) (se muestra en círculo rojo). Se observaron productos amplificados cuando se utilizaron las siguientes condiciones: 250 ng de DNA, con 2.5 y 5.0 mM de MgCl₂ (carriles H e I, respectivamente); 500 ng de DNA con 5.0 mM de MgCl₂ (carril N); y con 1000 ng de DNA con 2.5 mM de MgCl₂ (carril Q); 2000 ng de DNA con 5.0 mM de MgCl₂ (carril U).



Figura 5.7. Análisis electroforético de la titulación de DNA y concentración de MgCl₂, con concentración de iniciadores de 1 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Carril A = amplicon de 274 (previamente obtenido); carriles C a F = 100 ng de DNA fúngico; carriles H a J = 250 ng de DNA; carriles M a O = 500 ng de DNA; carriles Q a S = 1000 ng de DNA; y carriles T a V = 2000 ng de DNA, con concentraciones de MgCl₂ 2.5, 5.0 y 10.0 mM en cada cantidad de DNA respectivamente. El carril L = Marcador de 100 pb. Carril X= control negativo. Gel de agarosa al 2%. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

De acuerdo a lo obtenido en el experimento anterior, fue necesario determinar la titulación de los iniciadores (1.0, 2.0, 4.0, y 40 nM), usando cantidades constantes de 250 ng DNA fúngico y solo se utilizó 5.0 mM de MgCl₂ en todos los corrimientos.

La **Figura 5.8.** muestra el resultado de lo descrito anteriormente, donde se observan los amplicones obtenidos con las siguientes condiciones de reacción de PCR: a 40 nM de iniciadores (carril 1), a 4.0 nM de iniciadores (carril 3) y a 2.0 nM de iniciadores (carril 5); en las otras condiciones empleadas no se observaron productos.



Figura 5.8. Titulación de iniciadores a 40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* mediante el análisis electrofororético.

Todas las reacciones tuvieron 250 ng de DNA fúngico y 5.0 mM de MgCl₂. Carril 1 = 40 nM de iniciadores; carril 3 = 4 nM de iniciadores; carril 5 = 2 nM de iniciadores; y carril 6 = 1 nM de iniciadores. Carriles 9 y A = controles internos del sistema; carril C = marcador de 100 pb. Carriles 2, 4, 8 y B= vacíos. Carril 7= control negativo. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con

desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos. Gel de agarosa al 2%.

5.5.2. Evaluación de la especificidad de los iniciadores 18S A1/ 18S A2 con DNA diferentes

Para confirmar la especificidad de los iniciadores 18S rRNA de *Aspergillus fumigatus* se usó DNA del hongo, DNA de humano y DNA de *Bordetella spp.* Como planteamiento general, lo que se hizo fue lo siguiente: se usaron diferentes cantidades de DNA por vial (250, 500 y 1000 ng), de MgCl₂ (2.5, 5.0 mM) y de iniciadores (40.0, 4.0, 2.0 y 1.0 mM) las cuales se describen a continuación.

En la **Figura 5.9.** se presenta la imagen del gel de la electroforesis correspondiente a la titulación de la cantidad de DNA fúngico, humano y bacteriano (250, 500 y 1000 ng), y de la concentración de MgCl₂ (2.5 y 5.0 mM); todas a una concentración constante de 40 mM de iniciadores y habiendo incluido un amplicon de 504 pb (previamente obtenido). En las reacciones en las que se observa amplificación, las condiciones de la PCR fueron: **DNA humano** a 250 ng, con 2.5 y con 5.0 mM de MgCl₂ (carril I y carril J, respectivamente); DNA humano a 500 ng, con 2.5 y 5 mM de MgCl₂ (carril K y carril L, respectivamente); 1000 ng de DNA humano, con 2.5 mM y 5.0 de MgCl₂ (carriles M y N, respectivamente). En la misma figura, para **DNA de bacteria:** con 250 ng de DNA, con 2.5 y 5.0 mM de MgCl₂ (carril P y Q respectivamente); 500 ng de DNA, con 5.0 mM MgCl₂ (carril S); y 1000 ng de DNA, con 5.0 mM de MgCl₂ (carril U). Por último, con el **DNA de *Aspergillus fumigatus*,** se observó amplificación con todas las condiciones probadas, es decir: 250, 500 y 1000 ng/vial de DNA hongo; empleando el MgCl₂ a concentraciones de 2.5 y 5.0 mM para cada cantidad de DNA (carriles B al G). Los carriles W, Y y Z presentan el control interno del sistema de DNA fúngico, humano y bacteria, respectivamente, lo cual demostró que las condiciones de PCR fueron adecuadas para este corrimiento particular.

En la misma figura 5.9. se puede apreciar que las bandas más intensas se obtuvieron utilizando 5.0 mM de MgCl₂ (carriles J, L y N para DNA humano y carriles Q, S y U para DNA bacteria) en comparación con las de 2.5 mM de MgCl₂ (carriles I, K

y M para DNA humano y carril P para DNA de bacteria). Una posible explicación para la amplificación de fragmentos del gen 18S rRNA de *Aspergillus fumigatus* en muestras de DNA humano y de *Bordetella spp* es debido a que existe inespecificidad cuando hay exceso de reactivos de PCR.; es por eso que es de suma importancia definir las condiciones óptimas de cada uno de los componentes de la reacción para llevar a cabo la estandarización de dicha técnica.

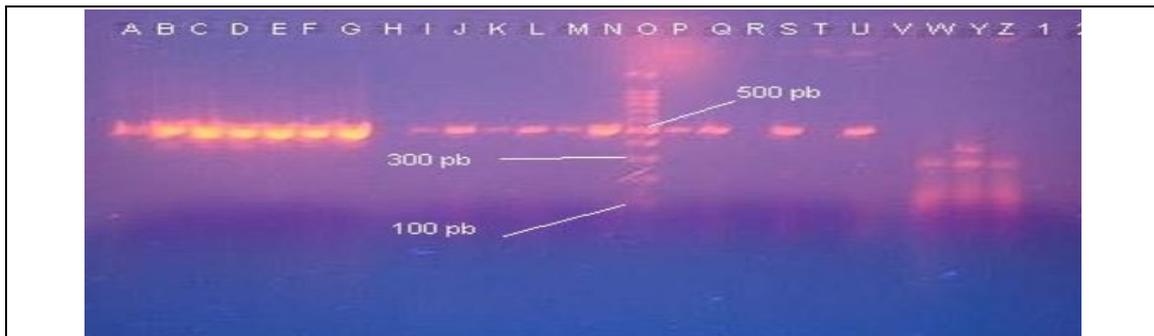


Figura 5.9. Titulación de DNA de hongo, humano y bacteria, y de concentración de MgCl₂ con 40 nM de iniciadores para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* para definir la especificidad de los mismos.

Concentración de MgCl₂ de 2.5 y 5.0 mM en cada cantidad de DNA titulada, respectivamente. Carriles: B y C = 250 ng/vial de DNA de *A.f* (*Aspergillus fumigatus*); D y E = 500 ng de DNA de *A.f*; F y G = 1000 ng de DNA de *A.f*; I y J = 250 ng/vial de DNA humano; K y L = 500 ng/vial de DNA humano; M y N = 1000 ng/vial de DNA humano; P y Q = 250 ng/vial de DNA de *Bordetella spp*; R y S = 500 ng/vial de DNA de *Bordetella spp*; T y U = 1000 ng/vial de DNA de *Bordetella spp*; W, Y y Z = controles internos del sistema (hongo, humano y bacteria, respectivamente). Carril O = marcador de 100 pb; carril A = amplicon de 504 pb (previamente obtenido); Carril V = control negativo; carriles 1 y H = vacío. Gel de agarosa al 2%. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Por los resultados obtenidos anteriormente, se decidió continuar trabajando solo con las cantidades de 250 ng y 500 ng dependiendo del DNA analizado, así que en el siguiente experimento se decidió realizar la titulación de la concentración de los iniciadores (1.0, 2.0, 4.0, y 40 nM), con una cantidad constante de 250 ng de DNA fúngico; para DNA humano y de bacteria se tituló el DNA (250 y 500 ng), todos los corrimientos se trabajaron con 5.0 mM de MgCl₂ y se incluyó un amplicon de 504 pb (previamente obtenido). Los resultados de lo descrito anteriormente se muestran en la **Figura 5.10**. donde se presenta la imagen del gel de la electroforesis de los amplicones obtenidos, se observaron productos a 40 nM de iniciadores, con 250 ng de DNA fúngico (carril B) y con 2 nM de iniciadores con 250 ng DNA hongo (carril D). Con DNA humano a: 40 nM de iniciadores, 250 ng de DNA (carril G); y 500 ng de DNA (carril

K). Con DNA de bacteria, hubo amplificado a: 40 nM de iniciadores, 250 ng de DNA (carril P); y 500 ng de DNA (carril T).

Cuando se utilizaron 4 nM de iniciadores (carriles H y L, DNA humano; carriles Q y U, DNA bacteria), 2 nM (carriles I y M, DNA humano; carriles R y V, DNA bacteria), y 1 nM de iniciadores (carriles J y N, DNA humano; carriles S y W, DNA bacteria), no se registraron productos utilizando DNA diferente.

Respecto a las condiciones necesarias para la amplificación del producto de interés usando el DNA fúngico se observó que solo hubo amplificación del DNA del hongo cuando se trabajó con 2 nM de iniciadores, a 250 ng de DNA con 5 mM de $MgCl_2$ (carril D) y en los DNA diferentes no se observaron productos empleando concentraciones iguales y menores de 4 nM de iniciadores, por lo que estos resultados fueron determinantes para obtener las condiciones óptimas de la PCR.



Figura 5.10 Análisis electroforético de la titulación de DNA de bacteria y humano e iniciadores (40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM) para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Carril A = amplicon de 504 pb (previamente obtenido); DNA molde de hongo a 250 ng/vial en los carriles B, C, D y E, con 40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM de iniciadores, respectivamente; en los carriles G, H, I y J, 250 ng de DNA humano, carriles K, L, M y N, 500 ng de DNA humano, con 40, 4.0, 2.0 y 1.0 nM de iniciadores, respectivamente; en los carriles P, Q, R, S, T, U, V y W corresponden a DNA bacteriano, ubicados de la misma forma que los anteriores. Carril O= marcador de 100 pb y en carriles X y Z= amplicon de beta actina, carril Y = control negativo. Carril F= carril vacio. En todos los corrimientos se mantuvo la concentración de MgCl₂ a 5.0 mM. Gel de agarosa al 2%. El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

De acuerdo a lo obtenido en los resultados anteriores (**Figura 5.10.**), posteriormente se eligió trabajar con una concentración constante de 2 nM de iniciadores, además se realizaron las titulaciones de DNA de humano y DNA del hongo (250, 500 y 1000 ng), concentración de MgCl₂ (2.5, 5.0 y 10 mM) y se incluyeron un amplicones de 504 y 274 pb (previamente obtenidos).

En la **Figura 5.11.** se muestran los resultados que registraron amplicones, solo fueron a las condiciones de DNA del hongo: iniciadores a 2 nM, 250 ng/vial de DNA hongo con 5.0 mM de MgCl₂ (carril C) y 500 ng de DNA hongo MgCl₂ con 2.5 mM (carril E). No hubo productos en ninguna condición trabajada de DNA humano con las condiciones descritas anteriormente.

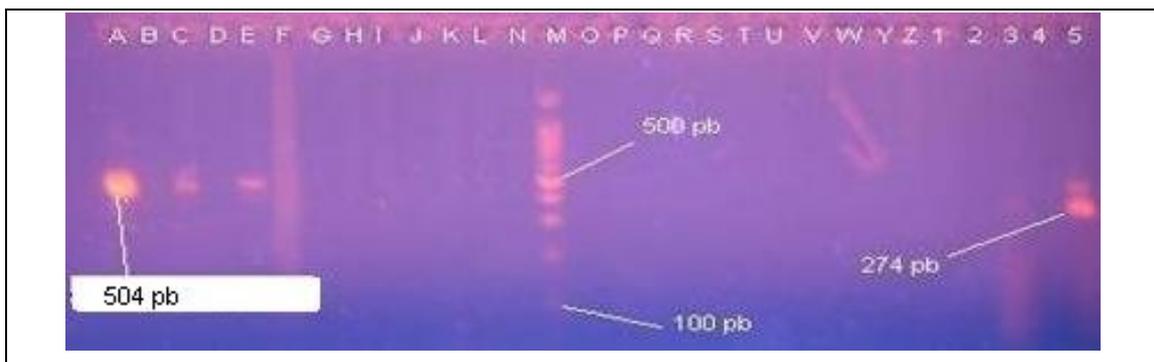


Figura 5.11. Análisis electroforético de la titulación de DNA fúngico y humano, concentración de MgCl₂ con concentración de iniciadores de 2 nM para la amplificación de un fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Carriles B, C y D = 250.0 ng/vial de DNA de hongo; E, F y G = 500.0 ng/vial de DNA del hongo; H, I y J = 1000 ng/vial de DNA de hongo; K, L y N = 2000 ng/vial de DNA de hongo, con concentraciones de MgCl₂ de 2.5, 5.0 y 10.0 mM en cada cantidad de DNA respectivamente; O, P y Q = 250.0 ng/vial de DNA humano; R, S y T = 500.0 ng/vial de DNA humano; U, V y W = 1000 ng/vial de DNA humano; Y, Z y 1 = 2000 ng/vial de DNA humano; M = marcador de 100 pb; 4 = control negativo; 2 y 3 = vacíos. Carril 5= amplicon de 274 pb (previamente obtenido; carril A = amplicon de 504 pb (previamente obtenido).

El corrimiento de la PCR fue de 35 ciclos, cada uno con desnaturalización por 30 segundos a 94 ° C, alineamiento por 30 segundos a 62 ° C y elongación 2 minutos a 72 ° C; por último un paso de elongación a 72 ° C durante 5 minutos.

Con todos los resultados descritos en este subcapítulo, se logró el establecimiento de las condiciones para demostrar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2 sobre la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA de *Aspergillus* y no hubo amplificación cuando se usó DNA plantilla de origen humano o de *Bordetella spp.*, por lo que se decidió utilizar las siguientes condiciones de trabajo: concentración de **iniciadores 2 nM, 250 ng/vial de DNA hongo con 5.0 mM de MgCl₂**, para evitar que exista inespecificidad por exceso de reactivos de la PCR.

5.6. Determinación semicuantitativa de la intensidad de los amplicones de 504 pb del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*

La cantidad de los productos de las PCRs del fragmento de gen 18S rRNA fue medida en unidades arbitrarias de intensidad (UAI) con el programa Kodak 1D 3.6. Es importante indicar que su intensidad se midió con la finalidad de semi-cuantificar en el gel de agarosa la intensidad de la banda correspondiente al producto amplificado específicamente, y así mismo comparar en forma más precisa, cuales fueron las condiciones óptimas de trabajo de la PCR para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA específico para *Aspergillus* tratando de evitar la inespecificidad de la reacción de los iniciadores 18S A1/18S A2 sobre la amplificación con DNA diferente.

En esta parte del trabajo, se analizaron solo tres condiciones particulares que habían demostrado amplificación del fragmento del gen 18S rRNA (empleando las condiciones del termociclador para amplificar el mismo fragmento), las cuales fueron las siguientes: en 2 corrimientos independientes utilizando 500 ng DNA fúngico, 2.5

mM de MgCl₂, pero en el primero se emplearon 40.0 nM de iniciadores y en el segundo 2.0 nM de iniciadores; y por último se trabajó con 250 ng DNA fúngico, 5 mM de MgCl₂ y 2.0 nM de iniciadores, por otro lado, se utilizaron las 3 mismas condiciones de la PCR descritas anteriormente para amplificar DNA humano, posteriormente los resultados fueron comparados con el objeto de corroborar la especificidad de los iniciadores 18S A1/18S A2. Además cabe señalar que no se realizaron las condiciones de la PCR con DNA del hongo y DNA humano utilizando 4 nM y 1 nM de iniciadores en esta parte del presente trabajo, debido a que en experimentos previos se había observado que empleando dichas condiciones, no se obtenían amplicones, por lo tanto no fueron consideradas para ser analizadas durante el estudio de intensidad de banda.

En la **Figura 5.12.** se aprecian los resultados obtenidos de lo descrito anteriormente empleando el programa Kodak 1D 3.6, la intensidad de las bandas analizadas correspondieron a las obtenidas con las siguientes condiciones: 500 ng DNA fúngico, 2.5 mM de MgCl₂ y 2.0 nM de iniciadores, obteniéndose un valor de intensidad de 55 UAI (carril 4); utilizando 250 ng DNA fúngico, 5 mM de MgCl₂ y 2.0 nM de iniciadores se registraron 50 UAI (carril 6); y cuando se empleo 1000 ng DNA fúngico, 10.0 mM de MgCl₂ y 40.0 nM de iniciadores se obtuvieron 33 UAI (carril 10). Así mismo, cuando se utilizó el DNA humano, se observaron productos empleando las siguientes condiciones: 500 ng DNA humano, 2.5 mM de MgCl₂ y 40.0 nM de iniciadores (carril 8) obteniéndose 78 UAI; por otra parte, no se apreciaron amplicones usando 500 ng DNA humano, 2.5 mM de MgCl₂ y 2.0 nM de iniciadores y utilizando 250 ng DNA humano, 5 mM de MgCl₂ y 2.0 nM de iniciadores no se obtuvieron productos (0 UAI) (carril 9 y 11, respectivamente).

De acuerdo a los resultados de amplicones obtenidos durante toda la estandarización para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA del hongo *A. fumigatus*, se sugiere que las condiciones óptimas obtenidas fueron: **a 2 nM de iniciadores, cantidad de DNA del hongo de 250 ng y 5.0 mM de MgCl₂.** Esta amplificación se corroboró en tres experimentos, que se realizaron en forma independiente; los corrimientos electroforéticos en geles de agarosa que muestran los resultados correspondientes a estas muestras se observan en la Figura 5.6 (carril C), Figura 5.8 (carril 5) y Figura 5.12 (carril 6). La realización de la técnica de la PCR con estas condiciones permite la amplificación del producto específico para un fragmento del gen

de 18S rRNA del genero *Aspergillus*, en cantidades detectables, y garantiza la eliminación de productos inespecíficos que pueden ser amplificados debido a un exceso de reactivos de la PCR.

Sin embargo, si se viera la necesidad de aumentar la cantidad de DNA fúngico empleada para la realización de la PCR, podrían utilizarse las condiciones de 2.0 nM de iniciadores, cantidad de 500 ng DNA y 2.5 mM de MgCl₂, donde también se obtuvo 55 UAI del producto amplificado (Figura 5.12., carril 4); asimismo, estos resultados se corroboraron en dos experimentos independientes, empleando las mismas condiciones de trabajo, los cuales se observan en la Figura 5.11. (carril E) y Figura 5.12. (carril 4), comprobando que también podrían ser una buena alternativa como condiciones de trabajo para realizar la técnica de la PCR.



Figura 5.12. Análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas obtenidas mediante el corrimiento electroforético de los productos de la PCR empleando los iniciadores 18S A1/18S A2. Carril 1= Marcador de 100 pb; Volumen dispensado de cada muestra en el gel de agarosa fue de 10 μ L. Se emplearon las condiciones del termociclador para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus*.

Carril	Características de reacción	Intensidad de banda (UAI)
2	Amplicon de 504 pb (previamente obtenido)	87
Fragmento del gen 18S rRNA		
3 y 7**	500 ng DNA fúngico, 2.5 mM MgCl ₂ y 40.0 nM de iniciadores	92
8	500 ng DNA humano, 2.5 mM de MgCl ₂ y 40.0 nM de iniciadores	78
6	250 ng DNA fúngico, 5 mM de MgCl ₂ y 2.0 nM de iniciadores	50
11	250 ng DNA humano, 5 mM de MgCl ₂ y 2.0 nM de iniciadores	0
4	500 ng DNA fúngico, 2.5 mM de MgCl ₂ , y 2.0 nM de iniciadores	55
9	500 ng DNA humano, 2.5 mM de MgCl ₂ y 2.0 nM de iniciadores	0
Amplificación de β actina		
10	1000 ng DNA fúngico, 10.0 mM de MgCl ₂ y 40.0 nM de iniciadores	33
**Valor promedio de UAI		

6. DISCUSIÓN

La aspergilosis es una enfermedad causada por *A. fumigatus* que es un hongo común ampliamente diseminado en el ambiente, por lo tanto tiene una distribución universal. Su importancia como agente infeccioso oportunista es mayor, al aumentar la población de individuos inmunocomprometidos (Latgé, J., *et al*, 1999). En los últimos años, se ha observado que las aspergilosis invasivas (AI) van en incremento, causando la muerte de más pacientes, debido a la falta de un diagnóstico rápido y eficaz (Warnock, D., *et al*, 2007), por lo tanto la importancia del desarrollo e implementación de técnicas para su diagnóstico.

Generalmente, el diagnóstico de las AI se hace por el aislamiento del microorganismo en cultivo a partir de biopsias o muestras de líquidos y secreciones corporales del área infectada (como el cultivo de esputo); entre los exámenes de evaluación más comunes están: la prueba cutánea de *Aspergillus* para detectar hipersensibilidad, donde se observa si hay inflamación local del área inyectada, biopsia de tejidos infectados, broncoscopia con lavado broncoalveolar (BAL) que detecta el área infectada *in vivo*, radiografía del tórax para observar cavidades invadidas por el micromiceto, prueba en suero sanguíneo para detectar anticuerpos contra *A. fumigatus* o precipitina *Aspergillus* específica, ELISA para la detección del antígeno galactomanano y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La elección del método de extracción de DNA es de suma importancia para el uso del material genético en las técnicas de biología molecular empleadas, tanto en diagnóstico como en la investigación, ya que en la literatura se reporta que el método de extracción tiene efecto significativo sobre la sensibilidad de la técnica de PCR (Jewtuchowicz, V. M., *et al*, 2007). Entre las propiedades que hace que un método de extracción sea aceptable, están el rendimiento y la pureza del material genético, el tiempo de realización corto, la reducción del empleo de equipo sofisticado y el uso de reactivos con baja toxicidad.

Otro aspecto importante a considerar es el tipo de muestra o material que se empleará como fuente para llevar a cabo la extracción del DNA. Es por eso que para la

realización del presente trabajo se eligió un método enzimático (Loeffler, *et al*, 1999) como pretratamiento en el rompimiento de la pared de quitina fúngica, posteriormente para la extracción de DNA, se utilizó el método químico reportado por González, debido a que fue considerado un método de fácil extracción y de un proceso corto de elaboración (González, B., 2005).

Asimismo, otro propósito inicial que se estableció en el presente estudio fue la confirmación de que se estaba trabajando con el hongo deseado (*A. fumigatus*) y verificación de que la cepa no estuviera contaminada con hongos medio ambientales; por lo que se realizó la técnica de microcultivo, la cual permite la identificación de cabezas conidiales (teñidas con azul de algodón) adheridas a un cubreobjetos y que posteriormente se observaron en el microscopio óptico empleando el objetivo de 40X, para poder compararlas con las reportadas en la literatura. De acuerdo a las características fenotípicas observadas, las cuales fueron: conidios esféricos a ovoides producidos en cadena, los conidióforos nacen en hifas superficiales los cuales tienen paredes delgadas, que se engruesan gradualmente para formar vesículas piriformes y cabezas conidiales verdosas, con lo que se corroboró que se trataba del hongo *Aspergillus fumigatus*.

Con respecto a la evaluación de la técnica de ruptura de la pared de quitina de *A. fumigatus*, la cual presenta una elevada resistencia a la lisis química, fue necesaria la determinación de la cantidad óptima de unidades de la enzima liticasa para que permitiera la digestión de la pared del hongo, y así posteriormente facilitar la extracción del DNA fúngico; también se necesitó determinar el tipo de diluyente más adecuado para la resuspensión de la enzima, así como el tiempo de crecimiento óptimo para extraer el material genético y los mejores rendimientos de dicho material de interés se obtuvieron usando 500 U de enzima resuspendida en PBS, utilizando 55 mg de muestra sólida de hongo (micelios), por lo tanto, si comparamos la cantidad de enzima empleada, podemos apreciar que éstos coincidieron con lo reportado por González, que empleó el mismo método químico, aunque la autora no especifica en que tipo de diluyente se resuspendió la enzima liofilizada (González, B., 2005).

Con respecto al análisis de la comparación de los tiempos de incubación de cultivo en medio CDS, se demostró que el crecimiento más adecuado de *A. fumigatus* es

por 24 horas, ya que permitió extraer mayor cantidad de DNA, obteniéndose un mejor rendimiento de material genético (un promedio de 139 μg de DNA a partir de 55 mg de micelios), a diferencia de los micelios con crecimiento de 72 horas, donde se obtuvo menos DNA (en promedio 60 μg); estas diferencias con respecto a los tiempos de crecimiento fúngico se pueden deber a que la pared de quitina del hongo aún no es lo suficientemente gruesa (a las 24 horas de crecimiento fúngico), por lo que la digestión fue más fácil usando 500 U de liticasa (Werner-Washburne M., B., *et al*, 1993.). Así mismo, las muestras de 24 horas de incubación, presentaron valores de puridades más aceptables (de 1.6 a 2.2) que los mostrados por las muestras de 72 horas (de 1.1 a 1.9).

Al comparar el promedio obtenido de las cantidades de DNA que se consideraron las más adecuadas en el presente trabajo (empleando un periodo de incubación de 24 horas para el crecimiento fúngico), no coinciden con lo reportado por González, donde obtiene cantidades de 558 μg de DNA a partir de una muestra sólida de 55 mg de micelio (utilizando 72 horas de crecimiento), la discrepancia se puede atribuir a que el tamaño de inóculo empleado haya sido diferente en ambos trabajos (González, B., 2005).

En otros trabajos solo reportan tiempos de cultivo de 72 horas, sin embargo, en estos estudios no realizaron la evaluación comparando estos dos periodos de incubación, y como se mencionó anteriormente, la cantidad de esporas empleadas para inocular en medio CDS puede reflejar variaciones en los resultados obtenidos en otros trabajos (Loeffler, *et al*, 1997; González, B., 2005); por otra parte, no se encontraron reportes bibliográficos donde se mencione que el tiempo de cultivo del hongo en CDS fuera de 24 horas, por lo que un punto muy importante que aporta la realización del presente estudio, es que el tiempo de incubación del cultivo de *A. fumigatus* para la obtención del micelio es crítico para lograr los mejores rendimientos en la extracción de DNA fúngico; así como, la influencia del tamaño del inóculo empleado para el crecimiento del hongo en el medio CDS.

El corrimiento electroforético de las muestras para el análisis del estado de integridad del DNA, permitió observar que todos los DNAs extraídos se encontraban íntegros, con lo cual se define que la técnica de lisis química-enzimática es un buen método de pretratamiento y da buenos resultados de extracción de DNA.

Otra de las evaluaciones importantes en el presente trabajo fue la determinación del porcentaje óptimo de agarosa en gel utilizada para la identificación de los amplicones, comparando las concentraciones de 0.7%, 1.0% y 2%; se confirmó que el gel preparado al 2.0 % fue en donde mejor se visualizaron los productos de la PCR (presentando una mejor resolución), este resultado coincide con algunos artículos que reportan el mismo porcentaje para observar e identificar los amplicones de *Aspergillus fumigatus* (Loeffler, *et al*, 1997; Loeffler, *et al*, 2001; Varga, J., *et al*, 2003; Einsele, *et al*, 1997).

En el presente trabajo se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del DNA de *Aspergillus*, amplificando el fragmento del gen 18S rRNA (el cual es un gen multicopia presente en todo el genoma del hongo; Loeffler, *et al*, 1997), mediante el uso de los iniciadores 18S A1/18S A2, con el fin de lograr la correcta identificación del hongo. Esta técnica incluye como componentes, al DNA molde, soluciones amortiguadoras, cloruro de magnesio, los dNTPs, ambos iniciadores y la enzima DNA polimerasa, todos estos reactivos deben estar presentes en concentraciones óptimas para que en caso de presencia del DNA de interés se logre la amplificación del producto específico.

Hay reactivos y condiciones involucrados en la técnica de PCR que influyen en la especificidad de la reacción, como la temperatura de alineamiento, que al ser mayor favorece la especificidad de la reacción; así como la concentración de cloruro de magnesio, que cuando se usa más del requerido resulta baja especificidad, en tanto que si se disminuye demasiado, la actividad de la enzima decae, pudiendo ser nula la amplificación del producto. Respecto al DNA plantilla, se debe optimizar su concentración pues en exceso se producen amplificaciones inespecíficas y una cantidad deficiente produce baja eficiencia en la cantidad de productos de PCR (Barrera, *et al*, 1993).

Considerando los reportes realizados por algunos autores acerca de la concentraciones y cantidades óptimas de los componentes de la PCR, se tomaron en cuenta algunas de sus condiciones de trabajo para la estandarización de la técnica de la PCR; por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron tres componentes importantes

como son la cantidad de DNA empleada (ng), la concentración de MgCl₂ (mM) y la concentración de iniciadores (nM).

Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron diferentes condiciones de trabajo para lograr la estandarización de la técnica de la PCR para la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* utilizando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 dando un producto específico de 504 pb. Se compararon las combinaciones de las siguientes condiciones de la PCR: cinco cantidades de DNA plantilla, tres concentraciones de MgCl₂ y cuatro concentraciones de iniciadores.

Es importante mencionar que se empleó ASB para llevar a cabo la técnica de la PCR, la cual se agregó a una concentración de 0.2 µg/µL, porque en la literatura se encontró el uso de ASB para optimizar las condiciones de dicha reacción (Loeffler, *et al*, 1997).

Con respecto a la cantidad óptima de DNA del hongo, se encontró que fue de 250 ng, evidenciado por la presencia del producto específico de 504 pb, esta cantidad de DNA resultó ser diferente a la reportada y sugerida por Loeffler y colaboradores, siendo de 100 ng de DNA, esta discrepancia probablemente se deba principalmente a que emplearon diferentes marcas comerciales de reactivos utilizados en la PCR y al origen del material genético, ya que ellos obtuvieron el DNA a partir de muestras de sangre completa (Loeffler, *et al*, 1997, 2001).

Por otro lado, para la concentración de MgCl₂, se encontró que las concentraciones óptimas fueron 5.0 y 2.5 mM, ya que utilizando ambas se evidenciaron los productos específicos de 504 pb.

En la literatura refieren varias concentraciones de MgCl₂, Loeffler menciona una concentración de 10 mM, por otro lado, Innis recomienda concentraciones de 1.5 mM y Barrera recomienda en el corrimiento general de la PCR un rango de 0.5 a 2.5 mM de MgCl₂ (Innis, *et al*, 1997; Barrera, *et al*, 1993; Loeffler, *et al*, 1997); como se puede observar, existe un amplio rango de concentraciones de MgCl₂, por lo que se considera que lo obtenido en el presente trabajo, se encuentra dentro de lo recomendado por estos autores.

Dentro de las observaciones más importantes que se apreciaron para llevar a cabo la prueba de la PCR para la detección de DNA de *Aspergillus*, se puede mencionar que la cantidad empleada de DNA del hongo, depende mucho de la concentración de cloruro de magnesio que se utilice, por ejemplo, cuando se usan 500 ng/vial de DNA plantilla, se necesita menos MgCl₂ (2.5 mM) y cuando se trabaja con 250 ng/ vial de DNA plantilla, se requiere mayor concentración de MgCl₂ (5.0 mM).

Así mismo, en cuanto a la concentración óptima de iniciadores 18S A1/18S A2, se observó que estos jugaron un papel muy importante durante la estandarización de la técnica de la PCR para la detección específica de DNA de *Aspergillus*, debido a que la concentración usada de los iniciadores marco la diferencia para eliminar la inespecificidad en la amplificación del producto usando el DNA de diferentes especies, demostrándose que estos deben ser usados a concentraciones de 2 nM, ya que en caso de emplearse a concentraciones muy altas (40 nM) se obtiene una amplificación inespecífica por exceso de este reactivo.

Cabe hacer mención que la concentración óptima de iniciadores determinada en el presente estudio (2 nM) resultó ser diferente a la reportada en trabajos de Loeffler y Einsele, donde la concentración de iniciadores que ellos trabajan es de 0.1 nM (Loeffler, *et al*, 1997, 2001; Einsele, *et al*, 1999), aunque se puede considerar que la concentración más adecuada de iniciadores obtenida en el presente trabajo, es muy cercana a la sugerida por estos autores. Además en la literatura se encontró que se reportan otras concentraciones de iniciadores, se sugiere emplear de 100 a 500 nM dependiendo del fragmento de DNA que se quiere amplificar (Innis, *et al*, 1997 y Kabir, S., *et al*, 2003).

Para evaluar la operatividad del sistema se debe incluir un control interno del mismo, con el objetivo de asegurar el correcto funcionamiento de éste y de los reactivos empleados, fue por ese motivo que se incluyó en cada corrida de la PCR al par de los iniciadores para amplificar el fragmento del gen de β actina, resultando un producto de 274 pb. El incluir este control interno en cada PCR fue de suma importancia, porque evaluó la integridad del DNA molde y evidenció la funcionalidad de los reactivos del sistema en cada corrida.

Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron diferentes condiciones de trabajo para lograr la estandarización de la técnica para la amplificación del fragmento del gen β actina de *Aspergillus*. Se compararon las combinaciones de las siguientes condiciones de la PCR: dos cantidades de DNA, tres concentraciones de $MgCl_2$ y dos concentraciones de iniciadores.

Se observaron productos específicos de β actina, haciendo el corrimiento de la PCR con las condiciones del termociclador para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA, y empleando una cantidad de 1000 ng de DNA, concentración de $MgCl_2$ a 10 mM y concentración de iniciadores β actina a 40 nM. Las cantidades empleadas de los dos primeros componentes de la reacción coinciden con las reportadas en el trabajo de Avila; sin embargo, la concentración de iniciadores fue diferente (Avila, I., 2005).

Es importante señalar que de acuerdo a reportes bibliográficos, fue necesario el uso de ASB, la cual se agregó a una concentración de 0.2 $\mu g/\mu L$, porque en los corrimientos iniciales (realizados en el presente trabajo) sin el uso de ASB no hubo amplificación de los productos específicos de β actina (Loeffler, *et al*, 1997).

Por último, se evaluó la intensidad de banda de los productos obtenidos con el apoyo de un programa computarizado Kodak 1D 3.6, su intensidad se midió con la finalidad de semi-cuantificar en el gel de agarosa la intensidad de la banda correspondiente al producto amplificado específicamente, y así mismo comparar en forma más precisa, cuales fueron las condiciones óptimas de trabajo de la PCR para amplificar el fragmento del gen 18S rRNA específico para *Aspergillus*, tratando de evitar la inespecificidad de la reacción.

Una vez analizadas las bandas con el programa se compararon los valores de intensidad, encontrándose que se obtienen muy buenos resultados empleando las dos siguientes condiciones: 2 nM de iniciadores, 250 ng de DNA del hongo, y 5.0 mM de $MgCl_2$, con una intensidad de banda de 50 UAI, así como 2 nM de iniciadores, 500 ng de DNA fúngico y 2.5 mM de $MgCl_2$ dando 55 UAI; comprobándose que no hay productos inespecíficos en estas condiciones de la PCR cuando se utilizan como plantillas DNA de diferentes especies. No se encontraron reportes en la literatura de

análisis de intensidad de bandas como el que se realizó en este estudio, para que se pudiera comparar lo obtenido en el presente trabajo.

La contribución del presente trabajo es prometedor para poder aplicar la técnica de la PCR para el posible diagnóstico temprano de las aspergilosis invasivas empleando el par de iniciadores 18S A1/18S A2 que detectan DNA específico del hongo *Aspergillus*, por lo que una vez validado un método como éste, podría tener un importante impacto en reducir la morbilidad y mortalidad de pacientes con aspergilosis invasivas, además de que se considera (con respecto a su costo), que esta técnica es más económica y accesible en comparación con el precio de un kit comercial.

Lo anterior da pauta a la realización de futuros estudios considerando la posible aplicación de dicha técnica en la detección del hongo en diferentes tipos de muestras obtenidas de pacientes postrasplantados, con cáncer e inmunocomprometidos, permitiendo el diagnóstico temprano, confiable y efectivo de la aspergilosis. Es importante señalar que la detección de DNA del presente trabajo solo es específica de género, y no de especie (Willem, J, *et al*, 1994), por lo tanto es de importancia realizar una técnica complementaria que sea capaz de identificar la especie fúngica para así poder complementar el ensayo de la PCR como una herramienta en el diagnóstico específico para *A. fumigatus*.

Finalmente, cabe mencionar que las investigaciones continúan para lograr la estandarización de la técnica de PCR en conjunto con la detección de antígenos del hongo mediante ELISA, principalmente galactomanano (Bretagne S, *et al*, 1998; Van Burik JA, *et al*, 1998); reportes de estudios realizados hasta la fecha, han indicado que el suero parece ser la muestra de elección para el diagnóstico de la AI mediante la técnica de la PCR. A pesar de todos los esfuerzos científicos realizados en la última década, el diagnóstico precoz y específico de las AI sigue siendo un reto para lograr el diagnóstico correcto.

7. CONCLUSIONES

7.1. Se logró el crecimiento, identificación y conservación de la cepa de *A. fumigatus* para utilizarla en la extracción de material genético.

7.2. Se definió que las condiciones óptimas de crecimiento del hongo para el pretratamiento con lisis enzimática, fue a las 24 horas de cultivo en el medio CDS.

7.3. Se determinó que la cantidad de la enzima liticosa necesaria para la ruptura de la pared del hongo (55 mg de micelio) fue de 500 U disuelta en PBS. Este pretratamiento junto con el método de extracción de DNA resultaron ser adecuados para la obtención de material genético integro.

7.4. Se considera que el gel de agarosa al 2% fue apropiado para el corrimiento electroforético de los amplicones obtenidos.

7.5. Para la amplificación del control interno (β actina; amplicon de 274 pb) las características de reacción más apropiadas fueron: 10 mM de $MgCl_2$, 40 nM de iniciadores y 1000 ng de DNA molde.

7.6. Las condiciones optimas de trabajo de la PCR para lograr la amplificación del fragmento del gen 18S rRNA de *A. fumigatus* (amplicon de 504 pb), fueron las siguientes: 2 nM de iniciadores (18S A1 y 18S A2), 5.0 mM de $MgCl_2$ y 250 ng de DNA molde.

Perspectivas

Debido a que esta prueba solo es presuntiva, este trabajo se debe complementar con un estudio de otro par de iniciadores que amplifiquen una región del gen específica de especie de *A. fumigatus* para que ambas pruebas evidencien la presencia del DNA del hongo. Así mismo, es necesario realizar un estudio empleando la técnica de la PCR, donde se lleve a cabo el análisis con un número representativo de muestras clínicas (suero o sangre) de pacientes con aspergilosis e individuos sanos, para poder evaluar las condiciones óptimas de trabajo de dicha técnica como una herramienta en el diagnóstico confirmativo de esta enfermedad.

8. ANEXO

8.1. Preparación del Azul de algodón-lactofenol para tinción de micromicetos (Koneman, E., 1999)

Fenol, cristales	20 g
Ácido Láctico	20 ml
Glicerol	40 ml
Agua destilada	20 ml

Disolver los componentes usando baño maría de agua caliente. Añadir 0.05g de azul de algodón (Azul de Poirier). Guardar en frasco ámbar de vidrio.

8.2. Solución Buffer de Fosfatos (PBS)

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0.34 g
K ₂ HPO ₄	1.12g
H ₂ O destilada	1 L

El pH se ajusta a 7.2; la solución preparada se puede esterilizar y se almacena a temperatura ambiente.

8.3. Buffer de Extracción (BE) pH 7.5

50mM de Trizma (Sigma)(C₄H₁₁NO₃-HCl) pH 7.5 (A)

10mM EDTA (B)

28mM β-mercaptoetanol (C)

Se prepararon 20 ml de BE, mezclando 305 mg de A, 186 mg de B y 110 mg de C, en agua destilada y se verifica pH con potenciómetro, si se requiere se ajusta pH a 7.5

8.4. Solución Tris (1 M Trizma- 10mM EDTA)

Se pesaron 248.2 mg de EDTA y 1.83 g de Trizma, se mezclaron en 15 ml de agua destilada hasta disolución total y se almacena a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

8.5. Acetato de potasio (AcK) 3 M

Se pesan 4.468 g de AcK y se disuelven en 15 ml de agua destilada. Se filtra para evitar impurezas y se almacena a temperatura ambiente.

8.6. Solución de etanol al 70% y al 90%

Se colocan 70 ml y 90 ml, de etanol absoluto en probeta respectivamente y se aforan a 100 ml con agua destilada. Se almacenan en tubos de plástico o de vidrio a temperatura ambiente, perfectamente tapados.

8.7. Buffer de conservación

La concentración de este buffer es de 10 mM trizma-1 mM EDTA a pH 8. Para preparar 15 ml, se pesan 23.85 mg de trizma y se disuelven en un volumen adecuado para ajustar el pH a 8, a esta solución se le agregan 5.6 mg de EDTA y se afora a 15 ml. Puede guardarse a temperatura ambiente o en refrigeración.

8.8. BTE (Tris-borate-EDTA)

Haga un concentrado (5x) de TBE, pesando 54 g de Tris (FW = 121.14) y 27.5 g de ácido bórico (FW = 61.83) disolviéndose ambos en aproximadamente 900 mL en agua desionizada. Añada 20 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y ajuste la solución en un volumen final de 1 L. Esta solución puede ser almacenada a temperatura ambiente pero un precipitado se formará en soluciones más viejas. Almacene en botellas de cristal y deseche si un precipitado se ha formado.

8.9. Preparación de gel de agarosa para electroforesis

Dependiendo de la concentración se pesa la cantidad de agarosa. En el caso del gel de agarosa al 0.7%, para preparar 45 ml de gel, se pesan 315 mg de agarosa y se disuelven

en matraz Erlenmeyer por calor en horno de microondas por 30 segundos, con 45 ml de BTE 0.5 X (Tris-borate-EDTA) recientemente preparado, asegurando que la mezcla se mantenga dentro del matraz Erlenmeyer y se agita hasta disolución total, se deja enfriar a temperatura ambiente a alrededor de 40 o 50 ° C, se añaden de 1.35 µL BrEt a una concentración de 10 mg/ ml, se agita levemente, se vacía (antes de que gelifique) en la cámara de electroforesis, y se coloca un peine de 12 u 8 carriles, después de gelificación, se retira el peine, quedando listo para poner las muestras en los carriles correspondientes y después correr la electroforesis.

8.10 Buffer loading 5X

50% Glicerol + 15 mM EDTA + 0.6% Azul de bromofenol

8.11 Liticasa (SIGMA, L4025-50UK)

Se prepararon 2 soluciones madre:

Solución A) 50000 U de liticasa diluida en 5 mL de PBS y Solución B) 50000 U de liticasa diluida en 10 mL agua desionizada

Se disolvieron agitando suavemente hasta obtener una solución traslúcida, ambas se alícuotaron en viales de 500 µL y se conservaron en congelación.

8.12 Bromuro de Etidio (BrEt) 10 mg/mL

Solo se disuelven los 10 mg de BrEt en agua destilada, el BrEt es muy soluble y se preparan los mL que se vayan a emplear.

Las marcas de los reactivos empleados fueron: Sigma, Invitrogene, Baker, Dibico, Bioxon, Gibco.

9. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía básica

Arenas R. G. (2003). **“Micología médica ilustrada”**. México. McGraw-Hill Interamericana.

Avila, I., (2005) **“Detección de citomegalovirus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en pacientes con afecciones hematológicas, tratados con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas”**. Tesis de Maestría en Ciencias. FES Cuautitlán. UNAM

González, B. (2005) **Comparación experimental de métodos de extracción de DNA de *A. fumigatus***. Tesis de licenciatura QFB. FES Cuautitlán. UNAM

Innis Michael A., Gelfand David H., Sninsky John J., White Thomas J., (1997). **“PCR protocols”**. A guide to methods and applications . Academic Press Inc.

Luque, J. y Herráez, A. 2001. **“Biología Molecular e Ingeniería Genética”**. Editorial Harcout. Madrid, España. Pág.:188-192

Microsoft ® Encarta ® 2006. © 1993-2005 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

Karp, G. (2006) **“Biología celular y molecular, conceptos y experimentos”**. 4ta. Ed. McGraw-hill. Mex. Pp. 834- 837

Koneman, E., (1999). **“Microbiología diagnóstica”**. 5 Ed. Médica panamericana. Argentina

Panduro, A., (2000). **“Biología molecular en la clínica”** McGraw-Hill Interamericana. México

Sánchez Vega José Trinidad; Jorge Tay Zavala. (2003). **“Fundamentos de microbiología y parasitología médicas”**. México, D.F.

Artículos científicos

Abarca, ML. (2000). “**Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis**”. Rev Iberoam Micol. 2000 Sep; 17(3):S79-84.

Abarca Ma. Lourdes (2000). “**Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial**”. Rev Iberoam Micol 2000; 17: S79-S84

Alcalá, L., *Aspergillus* y aspergilosis, sitio web: Control calidad SEIMC, consultada el 6 de Diciembre de 2008. URL: http://www.seimc.org/control/revi_Mico/asperguillus.htm.

A. Rokas, G. Payne, N.D. Fedorova, S.E. Baker, M. Machida, J. Yu, D. Ryan Georgianna, Ralph A. Dean, *et al.* (2007). “**What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*?**”. Studies in Mycology 59: 11–17.

Amalia del Palacio, María Soledad Cuétara y José Pontón (2003) “**El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora**”. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 90-98.

Amitani R, Taylor G, Elezis EN, et al. (1995), “**Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium**”. Infect Immun. 63: 3266-3271.

Arnou, P. M., R. L. Andersen, P. D. Mainous, and E. J. Smith, (1978). “**Pulmonary aspergillosis during hospital renovation**”. Am. Rev. Respir. Dis. 118:49–53.

Bauer J, Gareis M, Bott A, Gedek B. (1989). “**Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus***”. J Med Vet Mycol, 27:45-50.

Bart-Delabesse, E., Humbert, J., Delabesse, E., Bretagne, S., (1998). **“Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* Isolates”**. Journal of clinical Microbiology, 36 (9); 2413- 2418.

Bart-Delabesse E, Marmorat-Khuong A, Costa JM, et al. (1996) **“Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction”**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 15:24-25.

Bialek, R., F., Konrad, J., Kern, C., Aepinus, L., Cecenas, G., Gonzalez, G., Just-Nubling, B., Willinger, E., Presterl, C., Lass-Florl, V., Rickerts (2005) **“based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue”**. J Clin Pathol; 58:1180–1184.

Blanco, J., Guedeja-Marrón, J., Caballero, J., García, M., (1998). **“Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio”**. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 10-15.

Blijlevens, NM., Donnelly, JP., De pauw, BE., (2000). **“Mucosal barrier injury; biology, pathology, clinical counterparts an consecuenses of intensive treatment for hematological malignancy: an overview”**. Bone Marrow Transplant. 25: 1269-78.

Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, et al. (1995) **“Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR”**. J Clin Microbiol; 33:1164-1168.

Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, et al. (1998) **“Comparison of serum galactomannan antigen detectionand competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis”**. Clin Infect Dis; 26:1407-1412.

Brookman, J., Denning, D. (2000), **“Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*”**. Current opinion in Microbiology 3: 468-474.

Brown, M. J., S. A. Worthy, J. D. A. Flint, and N. L. Müller. (1998). “**Invasive aspergillosis in the immunocompromised host: utility of computed tomography and bronchoalveolar lavage**”. Clin. Radiol. 53:255–257.

Carr, MS., **The polymerase chain reaction**, sitio web: Images and figures 2005, consultada el 15 de Noviembre de 2008. URL: http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html

Chen, S., Halliday, C., Meyer, W. (2002) “**A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays**”. Medical Mycology, 40: 333-357.

Cennis, J., (1992). ”**Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification**”. Nucleic acids research”, 20 (9): 2380.

Denning, D., Anderson, M., Turner, G. Latgè, J., Bennet, J. (2002). “**Sequencing the Aspergillus fumigatus genome**”. Lancet Infect diseases, 2: 251-253.

Einsele, H., et al. (1997). “**Detection and identification of fungal pathogens in Blood by using molecular probes**”. Journal of clinical Microbiology. pp. 1353-1360. Vol 35. Nro. 6

Florent M., Sandrine Katsahian, Anne Vekhoff, Vincent Levy,3 Bernard Rio, Jean-Pierre Marie, Anne Bouvet, and Muriel Cornet (2006). “**Prospective Evaluation of a Polymerase Chain Reaction–ELISA Targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematological Malignancies**”. The Journal of Infectious Diseases; 193:741–7.

Holden DW, Tang CM, Smith JM. (1994). “**Molecular genetics of *Aspergillus* pathogenicity**”. Antonie van Leeuwenhoek, 65:251-255.

Horvath JA, Dummer S. (1996). “**The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis**”. Am J Med; 100:171–8

Jewtuchowicz V. M., J. L. Finquelievich , E. Durán, M. T. Mujica, C. A. Iovannitti. (2007). **“Comparación de métodos de extracción de ADN de sangre para detectar ADN fúngico por PCR”**. Revista Argentina de Microbiología. 39: 15-18.

Kabir, S., Rajendran, N., Amemiya, T., Itoh, K., (2003). **“Quantitative measure of fangal DNA extrated by three diferents methods using PCR RT”**. Journal of Bioscience and bioengineering, 96 (4); 337-343.

Kumar A, Reddy LV, Sochanik A, Kurup VP. (1993). **”Isolation and characterization of a recombinant heat shock protein of *Aspergillus fumigatus*”**. J Allergy Clin Immunol, 91:1024-1030.

Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, et al (1994). **“Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*”**. Infect Immun, 62:5424-5433.

Latgé, J. (1999) **“*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis”**. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 12, número 2, pag. 310-350.

Latgé, J. Calderone R. (2005) **“Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections”**. Curr Opin Microbiol; 5(4):355-8.

Latgé JP. (2001) **“The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*”**. Trends in Microbiology. Volume 9, Issue 8, 1, Pages 382-389.

Latgé, JP, Fontain T. (2003) **“Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins”**. Glycobiology; 13(3):169-77.

Lin, D., Lehman, P., Hamory, B., Padhye, A., Durry, E., Pinner, R., Lasker, E., (1995). **“Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*”**. Journal of clinical Microbiology. 33 (6): 1596 – 1601.

Loeffler, J., (1997). “ **Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens**”. Journal of Clinical Microbiology. 35 (12). Pags. 3311-3312.

Loeffler, J., (2001) “ **Nucleic acid sequence-based amplification of Aspergillus RNA in blood samples**” . Journal of clinical Microbiology. vol. 39, Nro. 4, p. 1626-1629.

Maertens, J., Varhaegen, J., Demuynck, H., *et al* (1999). “**Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomanan by a sandwich ELISA technique for hematological patients at risk for IA**”. J Clin Microbiol. 37: 3223-8.

Marty, FM, Lowry CM, Lempitski SJ, Kubiak DW, Finkelman MA, Baden LR. (2006). “**Reactivity of (1→3)-beta-D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials**”. Antimicrob Agents Chemother; 50:3450–3.

Melchers WJG, Verweig PE, Van der Hurk P, *et al.* (1994) “**General primer-mediated PCR for detection of Aspergillus species**”. J Clin Microbiol; 32: 1710-1717.

Mori T, Fujimoto M, Sakae K, Shin H, Sakakibara T, Yamaki T. (1995). “**A case of subarachnoid hemorrhage with acute subdural hematoma due to head injury: a case report**” No Shinkei Geka; 23(3):249-52. Japanese.

Moser M, Cramer R, Menz G, *et al.* (1992). “**Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity**”. J Immunol, 149:454-460.

Munoz, P., Alcala L, Sanchez Conde M, *et al* (2003). “**The isolation of *Aspergillus fumigatus* from respiratory tract specimens in heart transplant recipients is highly predictive of invasive aspergillosis**”. Transplantation; 75:326–9.

Obayashi T, Yoshida M, (1995) “**Plasma (1-3)- β -Dglucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes**”. Lancet; 345: 17-20.
Pemán, J., (2000). “**Diagnóstico de la aspergilosis invasiva**”. Rev Iberoam Micol; 17: S90-S92.

R Bialek, F Konrad, J Kern, C Aepinus, L Cecenas, G M Gonzalez, G Just, Nußling, *et al.* (2007) “**PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue**”. J Clin Pathol ;58:1180–1184.

Rinyou, E., Varga, J., Ferenczy, L., (1995). “**Phenotypic and genotypic analysis of variability in *A. fumigatus***”. Journal of Clinical Microbiology, 33(10): 2567-2575.

Roilides, E., Katsifa, H., Walsh, T., (1998). “**Pulmonary host defences against *Aspergillus fumigatus***”. Research in immunology. 149: 456-465.

Samarrai, T., Schmid, J., A., (2000). “**Simple method for extraction of fungal genomic DNA**”. Letters in applied Microbiology. 30 : 53 – 56.

Spreadbury C, Holden D, Aufaufre-Brown A, Baineridge B, Cohen J. (1993) “**Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction**”. J Clin Microbiol, 31:615-621.

Sutton P, Newcombe NR, Waring P, Mullbacher A. (1994) “**In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi**”. Infect Immun; 62:1192-1198.

Tekaia, F., Latgé, J. (2005). “***Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen?**” Current Opinion in Microbiology. Elsevier. 8; 385-392 (www.sciencedirect.com).

Williamson, E. y Lenning, J., (1999). **“Molecular approaches for the diagnosis and epidemiological investigation of *Aspergillus* infection”**. Mycoses. 42 (Suppl 2).

Varga, J., Tóth, B., (2003). **“Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus* infection”**. Genetics and Evolution. 3: 3-17.

Varga János, Krisztina Rigó, Sándor Kocsubé, Balázs Farkas, Károly Pál (2003) **“Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species”**. Research in Microbiology 154: 593–600, Elsevier.

Van burik, J., Schreckhise, R., White, T., Bowden, R., (1998). **“Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi”**. Medical Mycology. 36 : 299 – 303.

Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, et al. (1998) **“Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens”**. J Clin Microbiol; 36:1169-1175.

Verweij PE, Latgé JP, Rijs AJMM, et al. (1995) **“Comparison of antigen detection and PCR assay in BAL fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients”**. J Clin Microbiol; 33:3150-3153.

Verweij, PE., Brinkman, K., Kremers, HPH., Kullberg, BJ. (1999). **“Aspergilosis meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management”**. J clin microbial. 37:1186-1189.

Verweij, PE., Weemaes, CM., Curfs, JHAJ. (2000). **“Failure detecting circulating *Aspergillus* markers in patients with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis”**. J Clin Microbiol. 38: 3900-1

Velegraki, A., Kambouris, M., Kostorou, A., Chavelakis, G., Legakis, N. (1999). **“Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification”**. Medical Micology. 37 : 69 – 73.

Vierstracte, A., **Principle of PCR**, consultada el 20 de Julio de 2008. URL: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Warnock, D. (2007). “**Trends in the epidemiology of invasive fungal infections**”. Jpn, J. Med. Mycol. Vol 48,1-12.

Werner-Washburne M., B. E., Johnston G.C., & R.A, Singer. (1993). “**Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae***”. Microbiological Reviews 57: 383-401.

Willem, J, G., Melchers, L., Paule, V., Vandenhurk, P., vanbelkum, A., Depauw, B., (1994) “**General Primer-Mediated PCR for Detection of Aspergillus Species**”. Journal of Clinical Microbiology. Vol.32, No.7, p.1710-1.

William, C., Pain, A., Anderson, M, J., Wortman, R., Stanley, H., Arroyo, J., *et al* , (2005) “**Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus***”. Nature. Letters. Vol. 439. Pag. 1151-56.