



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE *Aspergillus flavus* POR MEDIO
DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

DÍAZ VERA JOSÉ RAÚL

ASESORES: DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA

M. en C. JOSEFINA MORENO LARA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Cuando nací mi padre era un ser que a veces aparecía para aplaudir mis últimos logros. Cuando me iba haciendo mayor, era una figura que me enseñaba la diferencia entre el bien y el mal. Durante mi adolescencia era la autoridad que me ponía límites a mis deseos. Ahora que soy adulto, es el mejor consejero y amigo que tengo.

Mi madre fue la mujer más linda que jamás conocí. Todo lo que soy, se lo debo a mi madre. Atribuyo todos mis éxitos en esta vida a la enseñanza moral, intelectual y física que recibí de ella. Tus brazos siempre se abren cuando necesito un abrazo. Tu corazón sabe comprender cuándo necesito una amiga. Tus ojos sensibles se endurecen cuando necesito una lección. Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar.

Una vez pensé que mi hermano Ricardo me cuidaría para siempre me guiaría y estaría conmigo... fui egoísta, nunca pensé en él.

Mi hermano es fuerte, pero tiene sentimientos, me cuida, pero tiene una vida, sabe mucho, pero ha cometido errores, lo admiro, pero no es un ser perfecto. Nos peleamos mucho, pero nunca dejara de ser mi hermano y yo soy parte de él.

Gracias a ti mi hermano por haber nacido antes que yo, por no mostrarme el mundo, si no por aprender juntos de él, llevándome de la mano. Gracias porque sin ti no habría podido hacer esto.

A mi hermano Javier, sé que tú eres fuerte y débil a la vez, pero con todas tus cualidades y defectos, sé que nos queremos. Me cuidas, reñimos, no somos perfectos, lloramos, y jugamos, pero nunca dejamos de ser hermanos. Y por este medio me permito decirte cuanto te estimo; y si otras veces me encuentras huraño sin motivo no pienses qué flojera, igual puedes contar conmigo, gracias por hacerme tu compadre (adoro a mi ahijado Ulises).

A mi novia y compañera Evelyn Cardona Morales, que en todo momento me apoya y me brinda ánimos sin importar la situación, de quien he aprendido mucho en este tiempo y



quien es mi motivo a superarme para poder lograr ser una mejor persona en lo profesional y en lo personal, con la que quiero compartir mi vida y formar una familia. Gracias por entenderme y comprenderme y sobre todo por aguantarme, yo sé que no es sencillo y que te esfuerzas por siempre darme tu mejor sonrisa, gracias por llegar a mi vida en el peor momento y ayudarme a superar todo, te amo flacuchis.

A mi tía Lupina, que siempre me apoya y me da una sonrisa, por siempre quererme sin importar mis errores, por ser parte importante en nuestras vidas desde hace unos años que llegaste a nuestra casa, la cual también ya es tuya.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Montiel Sosa por todo el apoyo en la realización de este proyecto, así como a sus enseñanzas durante la carrera, la realización del servicio social y mi tesis; y por brindarme su amistad en todo momento.

A los sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara por toda su asesoría y tiempo dedicado a este trabajo, así como la amistad brindada durante todo este tiempo, por compartir sus experiencias profesionales y personales, así como todas sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez y a la M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes por su apoyo en la aportación de las cepas de *Aspergillus flavus* para la realización de este proyecto.

A la Q.F.B. Angélica Saldaña Martínez por todas sus enseñanzas y principalmente por darle un toque de alegría y risas a este proyecto.

A mi amiga Elizabeth Murcia Vargas por todo el tiempo compartido en el laboratorio, que fue bastante jajaja, por apoyarme en la experimentación y por la gran amistad y confianza que hemos tenido.

A mis amigos de toda la carrera Felipe Baltazar Rueda y Damian Zamora Rodríguez no solo por compartir alegrías y tristezas, sino por compartir clases, exámenes y vueltas a, y sobre todo por lo compartido por tanto tiempo en la cancha de basquetbol.

Al proyecto PAPIME Clave PE203211 para la realización de este trabajo de investigación.

A la UNAM por ser la máxima casa de estudios la cual me brindo todo su apoyo y me dejo formar parte de ella, así como a todos mis profesores quienes con su apoyo, enseñanzas y amistad formaron la persona que soy ahora.



ÍNDICE

***Índice de figuras* ----- 7**

***Índice de tablas*----- 9**

***Introducción* -----10**

***Terminología*-----11**

***Abreviaturas.* -----12**

***ANTECEDENTES* -----13**

***CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DEL GÉNERO Aspergillus* -----16**

 1.1.1 Historia-----16

1.2 Morfología-----17

 1.2.1 Identificación-----19

 1.2.2 Cultivos-----19

 1.2.3 Ambiente-----20

1.3 Micotoxinas -----22

 1.3.1 Aflatoxinas-----23

 1.3.2. Mecanismos de Acción-----26

1.4. Presencia de mohos aflatoxigénicos y de aflatoxinas-----26

 1.4.1. Control e Inactivación-----27

1.5 NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. -----27

 1.5.1 Métodos utilizados para determinar aflatoxinas.-----28

***CAPÍTULO 2. APLICACIÓN DE LA PCR*-----30**

2.1 PCR-----30

 2.1.1 Fundamento e importancia-----31

 2.1.2 Ciclo de amplificación-----33

 2.1.3 Esquema general de la PCR. -----34

 2.1.3.1 Comienzo de la PCR-----34

 2.1.3.2 Desnaturalización-----34

 2.1.3.3 Alineamiento/Unión del cebador-----35

 2.1.3.4 Extensión/Elongación de la cadena-----35

 2.1.3.5 Elongación Final-----35

 2.1.3.6 Conservación-----36



2.1.3.7 Optimización de la PCR	37
2.2 La electroforesis y el revelado	37
2.3 Secuenciación de DNA	38
2.3.1 Los inicios de la secuenciación	38
2.3.2 Secuenciación de Maxam-Gilbert	39
2.3.3 Métodos de terminación de la cadena	41
2.3.4 Automatización y preparación de las muestras	44
<i>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</i>	45
3.1 Objetivo General	45
3.1.1 Objetivo particular 1	45
3.1.2 Objetivo particular 2	45
3.1.3 Objetivo particular 3	45
3.1.4 Objetivo particular 4	45
3.1.5 Cuadro Metodológico	46
3.1.6 Descripción del cuadro metodológico	47
3.1.7 Actividad Preliminar	47
3.2 MATERIALES	48
3.2.1 Material Biológico	48
3.2.2 Reactivos	48
3.2.3 Equipo Utilizado	49
3.3 MÉTODOS	50
3.3.1 Extracción de DNA	50
3.3.2 Cuantificación de DNA por medio del equipo Nanodrop	51
3.3.3 PCR	52
3.3.4 Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	54
3.3.5 Preparación del Gel de Agarosa	54
3.3.6 Electroforesis	56
3.3.7 Fotografía de los Geles	58
3.3.8 Purificación de DNA	58
3.3.9 Secuenciación	59
<i>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	60
<i>CONCLUSIONES</i>	72
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	74
<i>ANEXO 1</i>	78
<i>ANEXO 2</i>	82

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Conidióforo de <i>Aspergillus flavus</i>	16
Figura 2. Estructuras morfológicas de <i>Aspergillus flavus</i>	17
Figura 3. Efecto del pH y la Temperatura sobre la velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i>	21
Figura 4. Estructura molecular de las aflatoxinas.....	25
Figura 5. Termociclador marca Apollo ATC 401.....	32
Figura 6. Ciclo de Amplificación de la PCR.....	33
Figura 7. Grado de amplificación según el número de ciclos.....	36
Figura 8. Cámara para Electroforesis	38
Figura 9. Cámara de revelado del producto obtenido de la PCR.....	38
Figura 10. Electroferograma de la secuenciación de la Cepa 28 de <i>Aspergillus flavus</i>	40
Figura 11. Posicionamiento relativo en la secuencia de DNA	41
Figura 12. Cebadores con marcaje fluorescente.....	43
Figura 13. Vista del inicio de un ejemplo de lectura con el terminador.....	44
Figura 14. Cuadro Metodológico.....	46
Figura 15. Lectura de la Concentración de DNA de <i>Aspergillus flavus</i>	53
Figura 16. Programa para el termociclador con temperaturas, ciclos y tiempos.....	54
Figura 17. Preparacion del gel de agarosa al 0.7%.....	56
Figura 18. Muestras para Electroforesis.....	56
Figura 19. Cámara de Electroforesis.....	57
Figura 20. Fotodocumentador Modelo DI -HD.....	58
Figura 21. Fotografía de un gel de agarosa	63



Figura 22. Fotografía de un gel de agarosa64

Figura 23. Fotografía de un gel de agarosa65

Figura 24. Utilización del programa Sequencher para realizar el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas de las cepas productoras y no productoras y una secuencia de referencia que corresponde a la región del gene mitocondrial del citocromo b del *Aspergillus flavus*.....67

Figura 25. Electroferogramas comparativos de la región en la que se aprecia la presencia de guanina en la posición 495 en las cepas con fenotipo productor de aflatoxinas.....69

Figura 26. Cuadro del Programa Sequencher 4.1.4 donde muestra que no hay alguna enzima de corte.....71



Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características de los grupos/secciones de <i>Aspergillus</i>	18
Tabla 2. Temperatura y Actividad de Agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Eurotium</i>	21
Tabla 3. Micotoxinas de interés producidas por las especies de <i>Aspergillus</i> y sus efectos tóxicos.....	24
Tabla 4. Diferencias entre <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	24
Tabla 5. Principales propiedades físico-químicas de las aflatoxinas.....	25
Tabla 6. Límite máximo de concentración de aflatoxinas.....	28
Tabla 7. Preparación de las muestras para PCR	53
Tabla 8. Preparación para gel de agarosa al 0.7%.....	55
Tabla 9. Cepas de <i>Aspergillus flavus</i>	61
Tabla 10. Cuantificación de DNA de <i>Aspergillus flavus</i>	61

Introducción

Algunos hongos como *Aspergillus flavus* que crecen sobre materiales vegetales producen toxinas con efectos indeseables para plantas y animales. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, producidas por hongos toxigénicos que se desarrollan en productos alimenticios.

La micotoxicosis es una intoxicación provocadas por micotoxinas. La incidencia de micotoxicosis aguda es un problema de salud animal, ya que los alimentos deteriorados por hongos se desechan o se destinan a consumo animal. Mientras que para el hombre tiene mayor importancia la toxicidad crónica, asociada al consumo de pequeñas cantidades de micotoxinas durante periodos prolongados [14].

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza comúnmente en los laboratorios de investigación para amplificar el DNA. Asimismo, se emplea en una variedad de tareas, tales como la detección de enfermedades hereditarias, detección de patógenos en el hombre, animales, plantas, y alimentos, e investigación en biología molecular. La PCR ha sido adaptada para ser usada como una herramienta de tipificación. La ventaja de la PCR es su habilidad para producir literalmente millones de copias de un segmento de DNA particular con alta fidelidad en un tiempo de 3 a 4 horas.

Y debido a las ventajas de la técnica se pretende una diferenciación de las cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo, de una forma rápida y precisa en el sistema de producción de materia prima, cosecha, transporte, almacenaje y en alimentos procesados.

Por lo cual en este trabajo se pretende desarrollar un protocolo utilizando la técnica de PCR que permita la diferenciación de cepas de *Aspergillus flavus* de una manera rápida, confiable ya que gracias a la PCR se puede identificar con una muy alta probabilidad alguna mutación, delección o inserción de algún nucleótido en la secuencia del DNA.

Terminología

Aflatoxina: Toxina producida por *Aspergillus flavus* y otros hongos, en granos y alimentos almacenados. Puede ser carcinogénica en animales, incluido el hombre.

Amplificado: Producto resultante de la PCR. Fragmentos específicos de DNA dúplex multiplicados durante la reacción.

Alineamiento: Apareamiento de bases. DNA asociado por enlaces de hidrógeno a una secuencia complementaria, formando un polinucleótido de doble cadena.

***Aspergillus flavus*:** Hongo que se suele asociar con aspergilosis pulmonar y se cree que causa con frecuencia infecciones de córnea, además de ser alergénico.

Cepa: Es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

DNA: El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como DNA, es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

DNA diana: DNA molde. Fragmento al que se dirige la PCR, delimitado por los primers.

Elongación: Extensión, replicación, polimerización: Etapa de la PCR en la que la DNA polimerasa amplifica al DNA diana a partir de los primers.

Fenotipo: Es la expresión del genotipo en un determinado ambiente.

Mismatching: Se refiere a la presencia de al menos un nucleótido en una hebra de una molécula de DNA, que no es el complemento de los nucleótidos en el lugar correspondiente en la otra hebra.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Amplificación Génica.

Plásmido: Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.

Primer: Cebador, oligonucleótido. Secuencia corta de DNA de cadena simple, que apareada a una hebra de DNA molde puede ser elongada en su extremo 3' por una DNA polimerasa.



Teleomorfo: Estado perfecto de un hongo, es decir que posee la capacidad de reproducirse de forma sexuada.

Abreviaturas.

BrEt: Bromuro de Etidio

μl: Microlitro

Ng: Nanogramo

Pb: Pares de bases.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos.

ANTECEDENTES

México es un país muy poblado que tiene que producir grandes cantidades de granos que forman parte importante en la dieta de los mexicanos. Los productos agrícolas son invadidos por diversos insectos y hongos. El trigo y el maíz son los cereales más susceptibles al ataque de estos organismos que degradan su calidad en diversas formas [20]. Los granos también pueden ser invadidos por hongos de almacén, siendo *Aspergillus* y *Penicillium* los principales géneros de hongos que se presentan. Durante su desarrollo en los granos los hongos causan diferentes clases de daños, siendo los más importantes la pérdida de capacidad de germinación, decoloración, calentamiento y producción de micotoxinas. Existen varios métodos de control de plagas, pero desgraciadamente las sustancias químicas empleadas en el control de insectos han provocado el desarrollo de resistencia, contaminación ambiental y riesgos de salud pública. Así mismo, actualmente no existe ningún método de control de hongos, sólo medidas preventivas como monitorear la temperatura y la humedad del grano [14].

Las técnicas basadas en ácidos nucleicos son consideradas metodologías de las más novedosas. Estas consisten en técnicas basadas en el estudio de secuencias específicas de DNA de cada especie, las principales técnicas de este tipo son: la hibridación del DNA, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y la Amplificación Polimórfica del DNA en forma aleatoria (RAPD). La principal ventaja de estas técnicas, es que debido a que el DNA es una molécula que se encuentra en todo tipo de células de un mismo individuo y contiene la misma información genética no importa el origen de la muestra. La información contenida en el DNA es mayor que la encontrada en proteínas, debido a que esta molécula es relativamente termoestable, por lo que es menos susceptible a ser degradada durante el procesamiento de los alimentos, y aun degradada parcialmente permite identificar diferencias [17].

Aspergillus flavus es un hongo frecuentemente asociado con productos vegetales particularmente maní, maíz, algodón y nueces, cultivados en áreas de clima tropical y subtropical. Su importancia radica en su habilidad para producir aflatoxinas [22].

Estudios realizados sobre poblaciones de *A. flavus* procedentes de suelos y cultivos en diversas áreas geográficas han demostrado una gran diversidad en las características morfológicas, así como en la capacidad toxigénica y colonizadora de las cepas aisladas. El conocimiento de las subpoblaciones toxigénicas de *A. flavus* en cada región puede ser de mucha utilidad en las prácticas agronómicas locales. Además, se ha sugerido que la severidad de la contaminación de un determinado cultivo en una región puede estar en parte determinada por el potencial toxigénico de las cepas presentes [22].

Por otra parte, y como es común entre diferentes cepas de hongos toxigénicos, las cepas de *A. flavus* difieren en cuanto a la producción de las toxinas, desde no productoras a altamente productoras. El conocimiento de las diferencias regionales en cuanto a las características morfológicas y toxigenicidad de las poblaciones de *A. flavus* puede ayudar a entender la dinámica poblacional como también brindar importante información que puede ser utilizada en la implementación de medidas de control efectivas para reducir la contaminación de aflatoxinas en el campo. Por ejemplo, una estrategia probable es el uso de cepas de *A. flavus* no toxigénicas, como agentes de control biológico, para prevenir la contaminación a través de exclusión competitiva de las cepas toxigénicas en el campo, tal como ha sido ensayado con éxito en cultivos de maní y algodón [4].

El DNA mitocondrial (mtDNA) se hereda por vía materna y no se recombina. Por lo tanto, el mtDNA puede dar una visión ampliada de las diferencias genéticas entre las especies y permitir la determinación de las relaciones entre especies estrechamente relacionadas [7]. El gene mitocondrial del citocromo b (cob), ha sido elegido para realizar una investigación filogenética en las aves, mamíferos y peces. Las secuencias del gene citocromo b se han determinado para sólo unas pocas especies de hongos, aunque el análisis del mtDNA por RFLP se ha convertido en un método útil para la taxonomía de los hongos. Wang utilizó

por primera vez las secuencias de citocromo b para el análisis filogenético de los hongos [27].

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde [27].

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de DNA; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad, identificar personas o hacer investigación científica sobre el DNA amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo [27].

La presencia de micotoxinas en los alimentos constituye un serio peligro para la salud humana y animal. Su estabilidad frente a diversos agentes, tanto físicos como químicos, hace que sea difícil eliminarlas de los alimentos una vez producidas. Por lo tanto, el control del problema radica en la prevención del desarrollo de los hongos toxigénicos en los substratos susceptibles. Por lo anterior es conveniente contar con una estrategia metodológica que permita de manera eficiente y rápida reconocer cepas de hongos con diferente fenotipo productor de la toxina [27].

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a la clase de hongos conocidos como los Hyphomycetes, la cual pertenece a la división de hongos conocidos como los Deuteromycota. Esta división incluye los estados conidiales, de los hongos que pueden o no tener el estado teleomórfo o anamórfo. Los hongos se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas. El *Aspergillus* es un hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), el tipo de hongos opuesto a las levaduras, éstas últimas compuestas de una sola célula redondeada. El hábitat natural del *Aspergillus* son el heno y el compostaje [22].

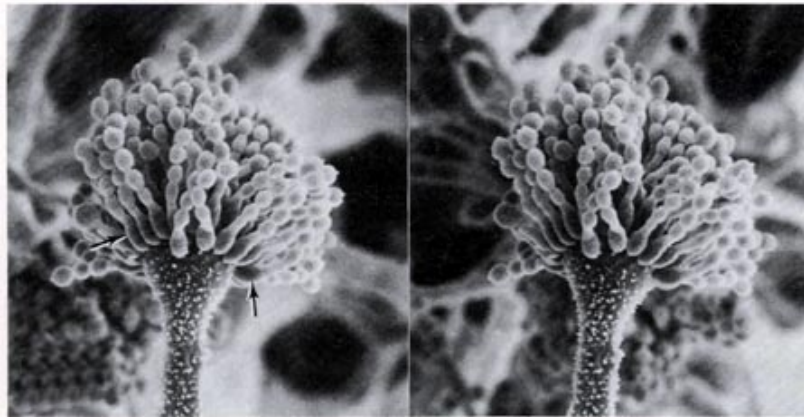


Figura 1. Conidioforo de *Aspergillus flavus*

1.1.1 Historia

En 1729 el *Aspergillus* fue catalogado por primera vez por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli, quien usó el nombre "*Aspergillum*" por parecerse el hongo al instrumento usado para dispersar agua bendita (Figura 1). La descripción hecha por Micheli de este género de hongo en su obra *Nova Plantarum Génera* tiene importancia histórica, al ser reconocido como el punto inicial de la ciencia de la micología [27].

1.2 Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Figura 2) y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato [11].

En los *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos *Aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos [11].

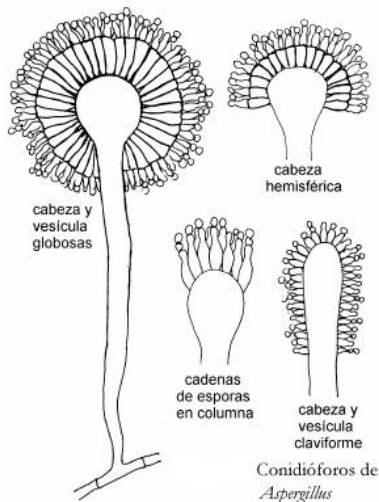


Figura 2. Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de los conidios, han permitido agrupar los *Aspergillus* en secciones o grupos como se indica en la Tabla 1. Peterson eliminó las secciones *Versicolor* y *Usti* e incluyó a las especies en la sección *Nidulantes*, además transfirió una parte de la sección *Wentii* a la *Cremeri* y la otra

(*Petromyces*) a la *Flavi* en base a las relaciones filogenéticas surgidas de las secuencias de los fragmentos de DNA ribosomal [18].

Los hongos teleomorfos poseen meiosporas en ascas que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. Según Kozakiewicz la ornamentación superficial de las ascosporas que se observa con el microscopio electrónico de barrido, es una de las características más fidedignas para la identificación de las especies [11].

Tabla 1. Características de los grupos/secciones de *Aspergillus* [11]

SECCIÓN	GRUPO	CONIDIOS	MÉTULA	VESÍCULA	CONIDIÓFORO	OTROS
<i>Aspergillus</i>	<i>A glaucus</i>	Verde, rugoso	No	Globosa a espatulada	Liso	Cleistotecio amarillo o anaranjado, osmófilo
<i>Candidi</i>	<i>A candidus</i>	Blanco	Si	Globosa	Liso	Esclerocio
<i>Cervini</i>	<i>A cervinus</i>	Anaranjado	No	Globosa	Liso	
<i>Circumdati</i>	<i>A ochraceus</i>	Amarillo	Si	Globosa	Liso o Rugoso	Esclerocio amarillo
<i>Clavati</i>	<i>A clavatus</i>	Verde claro	No	Claviforme	Liso	
<i>Cremeri</i>	<i>A cremeus</i>	Verde pardo	Si / No	Globosa	Liso	Cleistotecio crema, osmófilo
<i>Flavipedes</i>	<i>A flavipes</i>	Pálido, canela	Si	Espatulada	Liso, Pardo	Célula de Hülle
<i>Flavi</i>	<i>A flavus</i>	Verde pardo	Si / No	Globosa	Rugosa	Esclerocio
<i>Fumigati</i>	<i>A fumigatus</i>	Verde azulado	No	Espatulada	Liso	
<i>Nidulantes</i>	<i>A nidulans</i>	Verde oscuro	Si	Espatulada	Liso, Pardo	Ascosporos rojos, células de Hülle
<i>Nigri</i>	<i>A niger</i>	Negro	Si / No	Globosa	Liso	Esclerocio
<i>Ornati</i>	<i>A ornatibus</i>	Aceituna, verde amarillento	No	Espatulada	Liso	

1.2.1 Identificación

Tradicionalmente la identificación se hace en base a las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas [10], debido a la necesidad de conocer el contaminante para orientar la búsqueda de micotoxinas en un producto. Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales [27] y técnicas moleculares en base al polimorfismo del DNA nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra- e inter-específico [9].

1.2.2 Cultivos

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura pero los *Aspergillus* osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre Czapek-sacarosa 20%. La temperatura de incubación es de 25°C pero para algunos miembros de la sección *Fumigati* es conveniente 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras [11].

Para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos mohos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia aunque restringida, si el número no es demasiado grande. Si solamente interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* se suele sembrar sobre el medio AFAP que es selectivo para dichas especies [19]. Con el fin de identificar los *Aspergillus* se suele sembrar en placas de Malta-Glucosa, Czapek-Levadura, Czapek- Glicerol o Czapek-Sacarosa 20% incubando a 5, 25 y 37°C registrando las características macro y micro-morfológicas para acceder a la clave.

El volumen de medio vaciado en la caja de Petri influye sobre el diámetro de las colonias y otras características macroscópicas por ejemplo, en Czapek-Levadura, un espesor mayor hace que *A. flavus* produzca más esclerocios y el reverso de la colonia sea más oscuro

mientras *A. terreus* esporula menos. Un volumen mayor de Malta-Glucosa mejora el crecimiento micelial de *A. terreus* y *A. versicolor* en detrimento de la esporulación. Algunas de las razones para tal comportamiento son una mayor disponibilidad de nutrientes y un cambio más lento en la actividad del agua o el pH [28].

Con el fin de comprobar que los medios utilizados son adecuados para observar la velocidad de crecimiento y las características macro y microscópicas, es conveniente sembrar cepas obtenidas de una colección de referencia [28]. La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se mantienen durante mucho tiempo mediante sucesivas resiembras [10].

La temperatura, a la cual el material con el hongo es transportado al laboratorio y preservado antes de su análisis, puede influir en la flora aislada a continuación. Si unos granos con alta humedad se mantienen a 12°C se facilitará el aislamiento de los *Penicillium* aunque anteriormente hayan predominado los *Aspergillus*. Por otra parte, sobre los materiales con baja actividad de agua será más frecuente el aislamiento de *Aspergillus* [28].

1.2.3 Ambiente

La ubicuidad de los *Aspergillus* es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación [6].

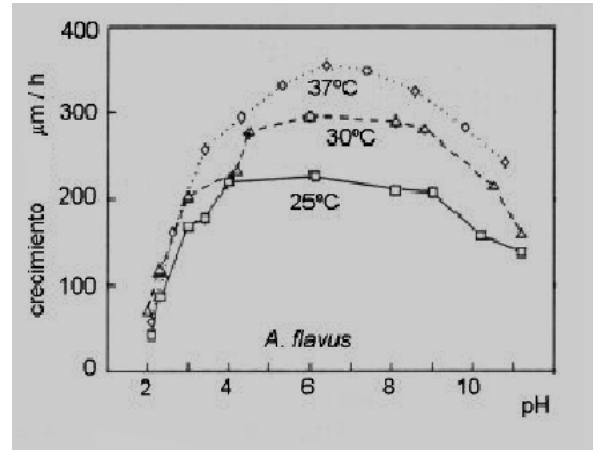


Figura 3. Efecto del pH y la Temperatura sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* [22].

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 0-5°C para *A. glaucus* hasta 50-55°C para *A. fumigatus*, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Si unos granos con un contenido de humedad del 15% no fueron afectados por los *Aspergillus* durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C^[11]. La figura 3 muestra el efecto del pH del medio y la temperatura de incubación sobre la velocidad de crecimiento radial de la colonia de *A. flavus*, y en la Tabla 2 se observan los valores de temperatura y actividad de agua para el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* [22].

Tabla 2. Temperatura y Actividad de Agua requeridas para el desarrollo de algunas especies de *Aspergillus* y *Eurotium* [30].

ESPECIE	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	OPTIMO	MINIMO	OPTIMO
<i>A. flavus</i>	6-45	35-37	0.78	0.95
<i>A. candidus</i>	3-44	25-32	0.75	0.90-0.98
<i>A. fumigatus</i>	10-55	40-42	0.85	0.98-0.99
<i>A. restrictus</i>	9-40	30-31	0.71	0.96
<i>A. versicolor</i>	4-39	25-30	0.98	0.95

1.3 Micotoxinas

Sin duda alguna el grupo más importante de los *Aspergillus* toxigénicos son los mohos aflatoxigénicos *A. flavus*, clasificado en la sección *Flavi* de *Aspergillus* [30].

Son varios los metabolitos secundarios de los *Aspergillus flavus* que son considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y otros, algunos de los cuales también son producidos por especies de *Penicillium*, por ejemplo ácido ciclopiazónico y ocratoxinas [30].

Es común que las condiciones óptimas para el crecimiento de las especies toxinógenas no coincidan con las que facilitan la producción de micotoxinas. Así, mientras el desarrollo óptimo de *A. flavus* ocurre a 36°C con una actividad del agua de 0.95, la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C a una actividad de 0.99, aunque pueda ser formada aún a 15°C con una actividad de agua de 0.95. Por otra parte, con una actividad del agua óptima *A. versicolor* produce la mayor cantidad de esterigmatocistina a pH 5.6. Aunque el pH sea fácil de medir es difícil de controlar porque a medida que crece el hongo cambia el pH del sustrato [30].

Tanto en el campo como en el almacenamiento los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir que habiendo un desarrollo fúngico apreciable, no se encuentre la cantidad de micotoxina esperada. Debido a su estabilidad las micotoxinas pueden persistir aun cuando hayan muerto las esporas. Además influyen los requerimientos nutricionales de la especie particular. Por ejemplo una escasa disponibilidad de Zn, elemento necesario para la biosíntesis de aflatoxinas, puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos sustratos [13]. En general, el aumento de los metabolitos secundarios es una respuesta al "stress". Si éste es causado por un biocida en concentración subletal, provoca un aumento de la biosíntesis de micotoxinas [30].

Con el fin de conocer la situación de peligro se buscan las micotoxinas en los productos alimenticios y forrajeros, pero muchas veces hay que comenzar por el aislamiento e identificación de los mohos para preveer cuales toxinas podrían estar presentes. El análisis cuantitativo de las micotoxinas se hace mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por espectrofotometría, fluorometría o espectrometría de masas, cromatografía en capa fina (TLC) con densitometría de las manchas fluorescentes o coloreadas y los inmunoensayos. Estos últimos son muy sensibles debido a que hay una interacción altamente específica entre el anticuerpo y la toxina, por lo que tales análisis pueden hacerse con poca purificación de la muestra [23].

1.3.1 Aflatoxinas

La palabra aflatoxina está formada por las siguientes letras: la primera letra “A” es por el género *Aspergillus*, las siguientes 3 letras “FLA” es por la especie *flavus* y el nombre “TOXIN” que significa veneno [14].

Las aflatoxinas (Tabla 3) son compuestos heterocíclicos formados predominantemente por las especies, *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios, producidos por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 [14].

Las letras B y G se refieren a los colores azul (blue) y verde (green) de fluorescencia observados bajo la luz ultravioleta de onda larga, esta propiedad de fluorescencia de las aflatoxinas ha llegado a ser la base para la cuantificación por métodos fisicoquímicos; y los números se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar cromatografía de capa fina [14].

Generalmente AFB1 es encontrada en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, y con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica, y el órgano que más afecta es el hígado [14].

Tabla 3. Micotoxinas de interés producidas por las especies de *Aspergillus* y sus efectos tóxicos [14].

Micotoxina	Toxicidad	Especies productoras
Aflatoxina B₁ y B₂	Lesiones hepáticas agudas, cirrosis, cancerígenas (hígado), teratogénicas inmunosupresoras.	<i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>
Acido Ciclopiazónico	Degeneración y necrosis de varios órganos, toxicidad oral baja.	<i>A. flavus</i>

A. flavus, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen aflatoxinas B1 y B2 (Tabla 4) mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* forman además aflatoxinas G1 y G2 [18]. Las cepas Africanas y Argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus* producen también aflatoxina G1 [4]. El porcentaje de cepas productoras de toxinas es mayor en *A. parasiticus* que en *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* que crecen moderadamente a 42°C pero no se desarrolla *A. pseudotamarii* ni *A. caelatus* [10].

 Tabla 4. Diferencias entre *A. flavus* y *A. parasiticus*

Especie	Conidios	Esclerocios	Toxinas
<i>A. flavus</i>	Lisos o ligeramente rugosos, de tamaño variable	Grandes, rugosos	Aflatoxinas B ₁ y B ₂ , acido ciclopiazónico
<i>A. parasiticus</i>	Manifiestamente rugosos, varían poco en tamaño	Grandes, rugosos	Aflatoxinas B y G

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas, estos compuestos están formados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona responsable de la fluorescencia y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina [14].

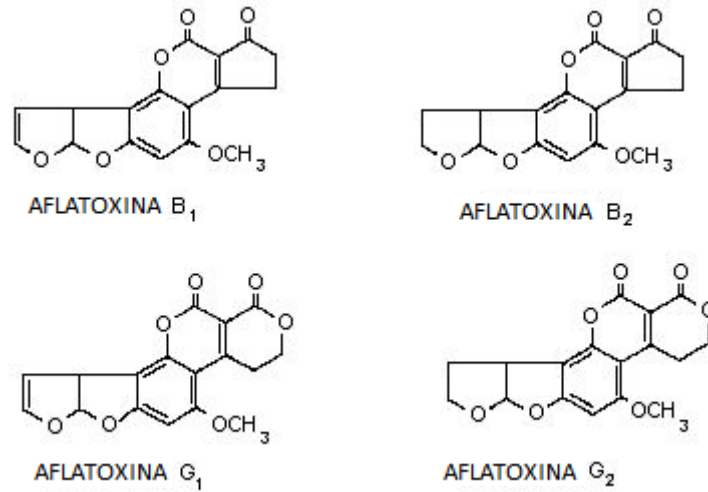


Figura 4. Estructura molecular de las aflatoxinas.

En la Tabla 5 se muestran algunas de las propiedades físico-químicas de las aflatoxinas y en la Figura 4 las estructuras moleculares de las mismas [14].

Tabla 5. Principales propiedades físico-químicas de las aflatoxinas.

Características	Aflatoxinas			
	B1	B2	G1	G2
Formula Química	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₁ H ₁₄ O ₇
Peso Molecular	312	314	328	330
Punto de fusión (°C)	268-269	287-289	244-249	230
Fluorescencia	425 nm	425 nm	450 nm	425 nm

1.3.2. Mecanismos de Acción

La aflatoxina B₁ es metabolizada en el hígado por el sistema oxidasa mixta, dando lugar a intermediarios muy reactivos, como el epóxido 2,3 de la aflatoxina B₁. La unión de estos intermediarios reactivos con el DNA determina una interrupción de la transcripción y una proliferación celular anormal que origina mutagénesis o carcinogénesis. Las aflatoxinas también inhiben la incorporación de oxígeno por los tejidos al actuar en la cadena transportadora de electrones inhibiendo varias enzimas, lo que determina una disminución de la producción de ATP [11].

1.4. Presencia de mohos aflatoxigénicos y de aflatoxinas

A. flavus está muy extendido por la naturaleza y aunque *A. parasiticus* probablemente lo está menos, su distribución real o verdadera es difícil de establecer por la tendencia de incluir a ambos bajo la denominación de *A. flavus*. En un estudio muy amplio de los mohos del género alimenticio, *A. flavus* fue uno de los mohos más frecuentes de los frutos secos y semillas oleaginosas. *A. flavus* fue la especie más abundante de los cacahuates y el que ocupó el segundo lugar en el maíz. Las semillas de soya y sorgo también contienen poblaciones considerables de *A. flavus* [27].

A. flavus presenta una gran afinidad por los frutos secos y las semillas oleaginosas. El maíz, cacahuete y semillas de algodón son las cosechas más importantes que invaden estos mohos y en bastantes ocasiones la invasión tiene lugar antes de la recolección y no durante su almacenamiento. Los cacahuates se contaminan mientras se encuentran en la tierra si padecen sequia u otros factores estresantes. En los granos de maíz las lesiones de los insectos permiten que penetren los mohos aflatoxigénicos [27].

Los cereales y las especias son los sustratos de *A. flavus*, sin embargo, la producción de aflatoxinas en estos alimentos casi siempre se debe a una mala desecación o manipulación o

a un almacenamiento deficiente, sin que las concentraciones de aflatoxinas alcancen generalmente valores significativos [27].

1.4.1. Control e Inactivación

El control de las aflatoxinas de los alimentos se basa generalmente en técnicas de selección que separan los productos afectados (frutos secos, granos y semillas). En el maíz, semillas de algodón e higos la búsqueda de aflatoxinas se realiza examinándolos a luz UV: las porciones que emiten fluorescencia suelen estar contaminadas [27].

Las aflatoxinas se destruyen parcialmente mediante diversos tratamientos químicos. Los agentes oxidantes, como el ozono y el peróxido de hidrógeno eliminan las aflatoxinas de las harinas de cacahuates contaminados [27].

El sistema más reciente de control de las aflatoxinas en los géneros alimenticios, especialmente cacahuete, es evitar que las plantas se contaminen con cepas de mohos aflatoxigénicos, la contaminación precoz de las plantas con cepas de *A. flavus* no toxigénicas evita la infección posterior con cepas toxigénicas [27].

1.5 NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Objetivo y campo de aplicación

Esta Norma Oficial Mexicana, establece el límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos. Esta Norma

Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación [15].

- De los límites permitidos para consumo animal.

Los cereales con una concentración mayor de 20 µg/kg de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la siguiente tabla [15].

Tabla 6. Límite máximo de concentración de aflatoxinas

Especie/etapa de producción	Límite máximo µg/kg
Aves (excepto pollos de engorda)	100
Cerdos en engorda:	
Entre 25 y 45 kg	100
Mayores de 45 kg	200
Maduros destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Maduros destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización	300

1.5.1 Métodos utilizados para determinar aflatoxinas.

- Métodos basados en técnicas cromatográficas.

La cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés TLC) ha sido uno de los métodos de elección para la investigación y determinación de micotoxinas. En la TLC normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar, siendo los componentes de las muestras, con características más polares, arrastradas más despacio y permitiendo la separación de las micotoxinas.

- Métodos basados en técnicas inmunológicas (ELISA).

Se han desarrollado métodos de detección de toxinas en hongos micotoxigénicos basados en la utilización de técnicas inmunológicas empleando anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra antígenos más o menos específicos de especies potencialmente productoras de micotoxinas. El problema de estos anticuerpos es que pueden dar reacciones cruzadas con otras especies fúngicas debido a la falta de especificidad de los antígenos o anticuerpos elegidos, son incapaces de discernir entre cepas productoras y no productoras de micotoxinas de una misma especie. La técnica más utilizada de inmunoensayo enzimático sobre fase sólida es ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

- Cromatografía de inmunoafinidad.

Es un método que establece la detección de contaminación de aflatoxinas utilizando columnas de inmunoafinidad y la cuantificación, utilizando tanto los métodos fluorométricos como HPLC.

- Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales.

Se han probado medios de cultivo especiales para aislar e identificar a los hongos que favorecen la producción de las micotoxinas, y su presencia se puede detectar en la misma placa donde se está desarrollando la colonia de hongos mediante la aplicación de la luz UV.

CAPÍTULO 2. APLICACIÓN DE LA PCR

2.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde [23].

El ácido desoxirribonucleico, frecuentemente abreviado como ADN (y también DNA, del inglés *deoxyribonucleic acid*), es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos conocidos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria [10].

Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades simples conectadas entre sí, como si fuera un largo *tren* formado por *vagones*. En el ADN, cada *vagón* es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina *A*, timina *T*, citosina *C* o guanina *G*) y un grupo fosfato que actúa como enganche de cada *vagón* con el siguiente. Lo que distingue a un *vagón* (nucleótido) de otro es, entonces, la base nitrogenada, y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética: por ejemplo, una secuencia de ADN puede ser *ATGCTAGATCGC...* En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por unas conexiones denominadas puentes de hidrógeno [10].

Esta técnica de PCR sirve para amplificar un fragmento de DNA; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causante de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el DNA amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo [24].

2.1.1 Fundamento e importancia

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California SA, en la década de 1980 [23].

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del DNA) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean DNA polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras con corrección de errores (Pfu, Vent) [26].



Figura 5. Termociclador marca Apollo ATC 401

Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado Termociclador (Figura 5), que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los termocicladores más antiguos que carecían de este sistema, solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos [24].

Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de DNA para la secuenciación, la filogenia basada en DNA, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y tests de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas [24].

2.1.2 Ciclo de amplificación

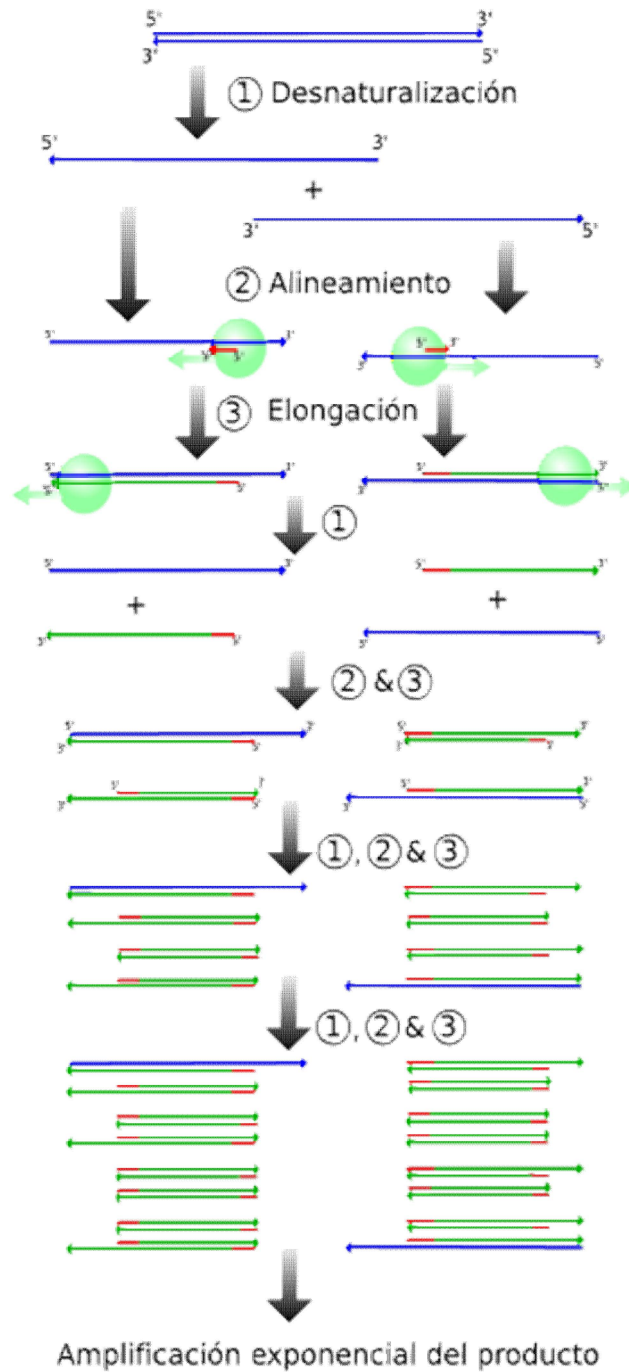


Figura 6. Ciclo de Amplificación de la PCR [24].

2.1.3 Esquema general de la PCR.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos de temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura (> 90°C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción, y la temperatura de unión de los primers [26].

2.1.3.1 Comienzo de la PCR

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C (ó 98°C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para DNA polimerasas que requieran activación por calor.

2.1.3.2 Desnaturalización

En primer lugar, (Figura 6) se desnaturaliza el DNA (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización [24].

2.1.3.3 Alineamiento/Unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de DNA (unión DNA-DNA) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del DNA molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde al cebador, y empieza a sintetizar DNA. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada [24].

2.1.3.4 Extensión/Elongación de la cadena

La DNA polimerasa actúa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5' → 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de DNA creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la DNA polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la DNA polimerasa usada como de la longitud del fragmento de DNA que se va a amplificar. Hay una regla básica: en su temperatura óptima, la polimerasa de DNA polimerizará mil bases en un minuto [24].

2.1.3.5 Elongación Final

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier DNA de cadena simple restante sea totalmente ampliado [24].

2.1.3.6 Conservación

Este paso se lleva a cabo a 4-15°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 0.2-0.5 ml, en pequeños tubos de 15-100 µl que se colocan en el termociclador [23].

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de DNA generados de acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar. El/los tamaño/s de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular de DNA, el cual contiene fragmentos de DNA de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR [24,26].

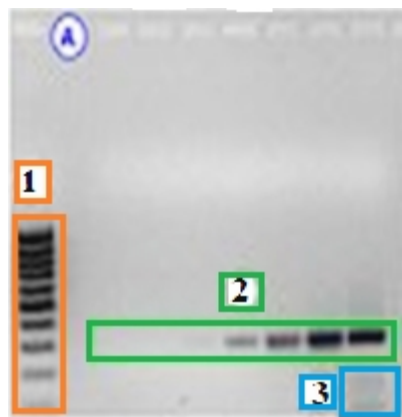


Figura 7. Grado de amplificación según el número de ciclos empleados. A: gel de agarosa (1: marcador, 2: producto específico, 3: producto inespecífico).

2.1.3.7 Optimización de la PCR

En la práctica, la PCR puede fallar por varias razones, pero normalmente es debido a su sensibilidad a la contaminación, que a veces provoca la amplificación de DNA "falso". Por esto, se han desarrollado un gran número de técnicas y procesos para optimizar la PCR:

- La contaminación con DNAs extraños puede solucionarse con protocolos y procedimientos que separen las reacciones pre-PCR de los contaminantes potenciales del DNA. Esto normalmente implica la separación espacial de las áreas de realización de la PCR de las de análisis o purificación de los productos de PCR, y la limpieza exhaustiva de la superficie de trabajo entre la realización de una PCR y la siguiente.
- Las técnicas de diseño de primers son importantes en la mejora de la obtención de productos de PCR (Figura 7) y en evitar la formación de productos falsos, y el uso de componentes alternativos para los buffers o las enzimas polimerasas pueden ayudar en la amplificación de regiones de DNA largas o, de cualquier otra forma, problemáticas [24].

2.2 La electroforesis y el revelado

Como la molécula de DNA posee carga eléctrica es susceptible de desplazarse en un campo eléctrico. La electroforesis (Figura 8) no es más que una técnica por la que se crea un campo eléctrico en una matriz que puede estar hecha de carbohidrato (agarosa o poliacrilamida) [16].

Al aplicar la muestra fragmentada por los enzimas de restricción a la matriz de carbohidrato y crear un campo eléctrico, los fragmentos avanzarán en función de su tamaño: los más pequeños migrarán más, irán más rápido.

Una vez distribuidos sobre la matriz, el paso siguiente (Figura 9) es identificar los fragmentos de cada especie con un componente que luzca al observarlo con luz ultravioleta [16].

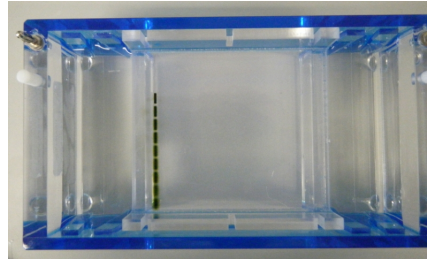


Figura 8. Cámara para Electroforesis del gel de PCR de *Aspergillus flavus* [16].

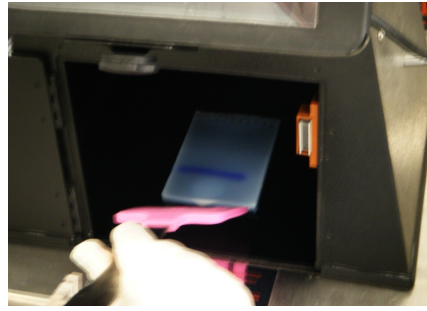


Figura 9. Camara de revelado del Producto obtenido de la PCR

2.3 Secuenciación de DNA

2.3.1 Los inicios de la secuenciación

Durante treinta años la mayor parte de la secuenciación de DNA se llevó a cabo con el método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores en 1975. Antes del desarrollo de métodos rápidos de secuenciación del DNA a principios de los 70 por Sanger en Inglaterra y Walter Gilbert y Allan Maxam en Harvard, se utilizaban varios métodos de laboratorio. Por ejemplo, en 1973 Gilbert y Maxam publicaron una secuencia de 24 pares de bases utilizando un método conocido como "de punto corrido" [32].

La secuenciación del RNA, que por razones técnicas es más sencilla de llevar a cabo que la del DNA, se desarrolló con anterioridad a la del DNA. El mayor hito en la secuenciación

del RNA, que data de la era previa al DNA recombinante, es la secuencia del primer gen completo y del genoma completo del Bacteriófago MS2, identificado y publicado por Walter Fiers y colaboradores de la Universidad de Gante [32].

2.3.2 Secuenciación de Maxam-Gilbert

En 1976-1977, Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollaron un método para secuenciar DNA basado en la modificación química del DNA y posterior escisión en bases específicas. Aunque Maxam y Gilbert publicaron su secuenciación química dos años antes del trascendental artículo de Sanger y Coulson sobre su método de secuenciación "más-

menos", la secuenciación de Maxam y Gilbert rápidamente se hizo más popular hasta que se pudo utilizar DNA directamente, mientras que el método inicial de Sanger requería que cada comienzo de lectura fuera clonado para producir un DNA de cadena simple. No obstante, con el desarrollo y mejora del método de terminación de la cadena, la secuenciación de Maxam y Gilbert ha quedado en desuso debido a su complejidad técnica, el uso extensivo de productos químicos peligrosos y dificultades para escalarla. Además, a diferencia del método de terminación de la cadena, los reactivos que se usan en el método de Maxam y Gilbert no se pueden adaptar para utilizarse en un kit biológico estándar [17, 33].

En resumen, el método requiere marcaje radiactivo en uno de los extremos y la purificación del fragmento de DNA que se desea secuenciar. El tratamiento químico genera rupturas en una pequeña proporción de uno o dos de los cuatro nucleótidos en cada una de las cuatro reacciones (G, A+G, C, C+T). De ese modo se genera una serie de fragmentos marcados a partir del final marcado radiactivamente hasta el primer lugar de "corte" en cada molécula. Los fragmentos posteriormente se separan por tamaño mediante electroforesis en gel, separando los productos de las cuatro reacciones en cuatro carreras distintas, pero una al lado de la otra. Para visualizar los fragmentos generados en cada reacción, se hace una autoradiografía del mismo, lo que proporciona una imagen de una serie de bandas oscuras

correspondientes a los fragmentos marcados con el radioisótopo, a partir de las cuales se puede inferir la secuencia [33].

Conocido en ocasiones como "secuenciación química", este método se originó en el estudio de las interacciones entre DNA y proteínas (huella genética), estructura de los ácidos nucleicos y modificaciones epigenéticas del DNA, y es en estos campos donde aún tiene aplicaciones importantes.

La Secuenciación de DNA (Figura 10) es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de DNA. La secuencia de DNA constituye la información genética

heredable del núcleo celular, los plásmidos, la mitocondria y cloroplastos (en plantas) que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. Así pues, determinar la secuencia de DNA es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados, como la investigación forense. El desarrollo de la secuenciación del DNA ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el Proyecto Genoma Humano. Otros proyectos relacionados, en ocasiones fruto de la colaboración de científicos a escala mundial, han establecido la secuencia completa de DNA de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos [33].

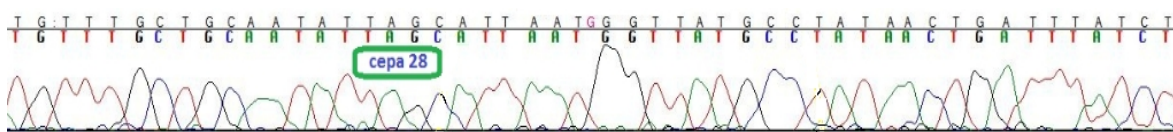


Figura 10. Electroferograma de la secuenciación de la Cepa 28 de *Aspergillus flavus*

2.3.3 Métodos de terminación de la cadena

Mientras que el método de secuenciación química de Maxam y Gilbert y el método más-menos de Sanger y Coulson eran órdenes de magnitud más rápidos que los métodos previos, el método de terminación de la cadena desarrollado por Sanger era incluso más eficiente y rápidamente se convirtió en el método de elección. La Técnica de Maxam-Gilbert requiere el uso de productos químicos altamente tóxicos y grandes cantidades de DNA marcado radiactivamente, mientras que el método de terminación de la cadena utiliza pocos reactivos tóxicos y cantidades menores de radiactividad. El principio clave del método de Sanger es el uso de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores (Figura 11) de la cadena de DNA [14, 32].

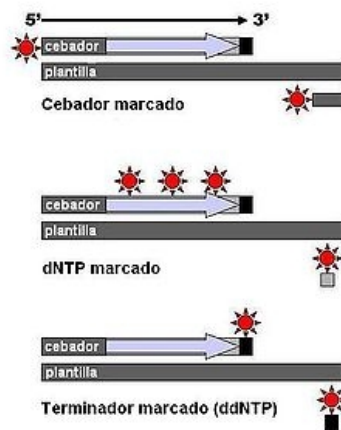


Figura 11. Posicionamiento relativo en la secuencia de DNA

El método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger necesita una hebra molde de DNA de cadena sencilla, un cebador de DNA, una DNA polimerasa con nucleótidos marcados radiactivamente o mediante fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de DNA. La muestra de DNA se divide en cuatro

reacciones de secuenciación separadas que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) y una DNA polimerasa. En cada reacción se añade solo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). Estos didesoxinucleótidos terminan la elongación de la cadena al carecer de un grupo 3'-OH que se necesita para la formación del enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de DNA. La incorporación de un didesoxinucleótido en la cadena naciente de DNA termina su extensión, lo que produce varios fragmentos de DNA de longitud variable. Los didesoxinucleótidos se añaden a concentraciones lo suficientemente bajas como para que produzcan todas las posibilidades de fragmentos y al mismo tiempo sean suficientes para realizar la secuenciación [33].

Los fragmentos de DNA sintetizados y marcados de nuevo son desnaturalizados por calor y separados por tamaño (con una resolución de un solo nucleótido) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-urea. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis se corre en carriles individuales (Carril A, T, G y C) y se visualizan las bandas de DNA mediante autoradiografía o luz ultravioleta, y la secuencia de DNA se puede leer directamente a partir de la placa de rayos X o de la imagen del gel. En la imagen de la derecha, la película de rayos-X se expuso directamente al gel de modo que las bandas oscuras corresponden a los fragmentos de DNA de diferentes longitudes. Una banda oscura en un carril indica un fragmento de DNA que es el resultado de una terminación de la cadena tras la incorporación de un didesoxinucleótido (ddATP, ddGTP, ddCTP, or ddTTP). El nucleótido terminal puede ser identificado de acuerdo al didesoxinucleótido que se añadió en la reacción que dio lugar a esa banda. Las posiciones relativas entre los cuatro carriles se utilizan entonces para leer (de abajo hacia arriba) la secuencia de DNA como se indica en la Figura 12 [33].

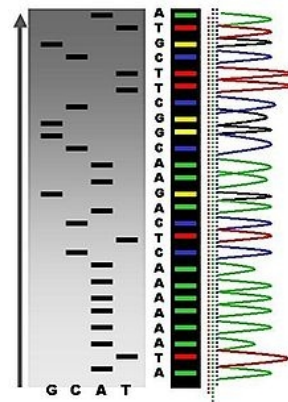


Figura 12. Cebadores con marcaje fluorescente

Los fragmentos de DNA se pueden marcar utilizando radiactividad o fluorescencia en el cebador (1), en la nueva cadena de DNA con dNTP marcado, o con un ddNTP marcado.

Existen algunas variaciones técnicas del método de secuenciación de terminación de la cadena. En un método, los fragmentos de DNA son marcados con nucleótidos marcados con fósforo radiactivo. Como alternativa se puede utilizar un cebador marcado en el extremo 5' mediante un colorante fluorescente [32].

Se siguen necesitando cuatro reacciones, pero los fragmentos de DNA marcados con colorantes se pueden leer utilizando un sistema óptico, lo que facilita un análisis más rápido y económico y su automatización. Esta variante se conoce como "secuenciación mediante colorantes acoplados al cebador" (*dye-primer sequencing*). El último avance de L Hood y colaboradores desarrollando ddNTPs y cebadores con marcaje fluorescente señala el marco para una secuenciación de DNA automatizada y de alto rendimiento.

Los diferentes métodos de terminación de la cadena han simplificado en gran medida la cantidad de trabajo y planificación necesaria para la secuenciación de ADN. Por ejemplo, el kit "Sequenase" de la casa USB Biochemicals, basado en el método de terminación de la cadena contiene la mayoría de los reactivos necesarios para la secuenciación, pre-divididos

en alícuotas y listos para usar. Se pueden dar algunos problemas de secuenciación con el método de Sanger, como uniones no específicas del cebador al DNA, que afectan a la correcta interpretación de la secuencia de DNA. Además también puede afectar a la fidelidad de la secuencia obtenida estructuras secundarias internas de la cadena de DNA molde o RNA que pueda actuar de cebador al azar. Otros contaminantes que pueden afectar a la reacción son el DNA exógeno o inhibidores de la DNA polimerasa [16].

2.3.4 Automatización y preparación de las muestras

Los instrumentos modernos automáticos de secuenciación del DNA (secuenciadores de DNA) pueden secuenciar más de 384 muestras marcadas por fluorescencia de una sola vez y llevar a cabo 24 ciclos de secuenciación al día. No obstante, los secuenciadores automáticos de DNA llevan a cabo solamente separación del DNA basada en el tamaño

(por electroforesis capilar), detección y registro de la coloración fluorescente, y los datos resultantes se dan como cromatogramas que registran los picos de fluorescencia. En el pasado los operadores tenían que arreglar los extremos terminales de baja calidad de cada secuencia manualmente para eliminar los errores de secuenciación. Sin embargo, hoy se puede realizar mediante software (Figura 13) como "Fast Chromatogram Viewer" el arreglo automático de los extremos terminales en grandes cantidades [16, 33].

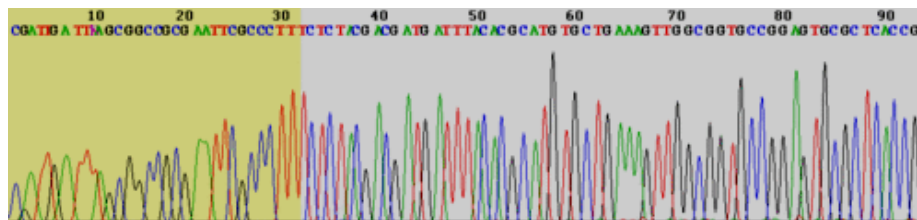


Figura 13. Vista del inicio de un ejemplo de lectura con el terminador (fondo coloreado).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer una estrategia metodológica empleando PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Análisis de Polimorfismos de Restricción), que permita la diferenciación de cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo productor de aflatoxinas, para prevenir el empleo de posibles cepas toxigénicas en alimentos.

3.1.1 Objetivo particular 1

Analizar la disponibilidad de secuencias de DNA mitocondrial (mt DNA) en la especie de interés con ayuda de programas bioinformáticos, que permita seleccionar la región a amplificar.

3.1.2 Objetivo particular 2

Analizar los “primers” o cebadores apropiados que permitieran la amplificación de la secuencia seleccionada, así como diseñar el programa de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) apropiada.

3.1.3 Objetivo particular 3

Purificar los fragmentos amplificados para enviarlos a secuenciar y buscar posibles polimorfismos que distingan a las cepas productoras de las no productoras.

3.1.4 Objetivo particular 4

Diseñar la técnica de PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Análisis de Polimorfismos de Restricción), con las diferencias localizadas de manera repetitiva entre las cepas productoras y no productoras, para poder elegir una enzima de restricción que reconozca al nucleótido diferente.



3.1.5 Cuadro Metodológico

El cuadro metodológico utilizado en esta experimentación se muestra en la figura 14.

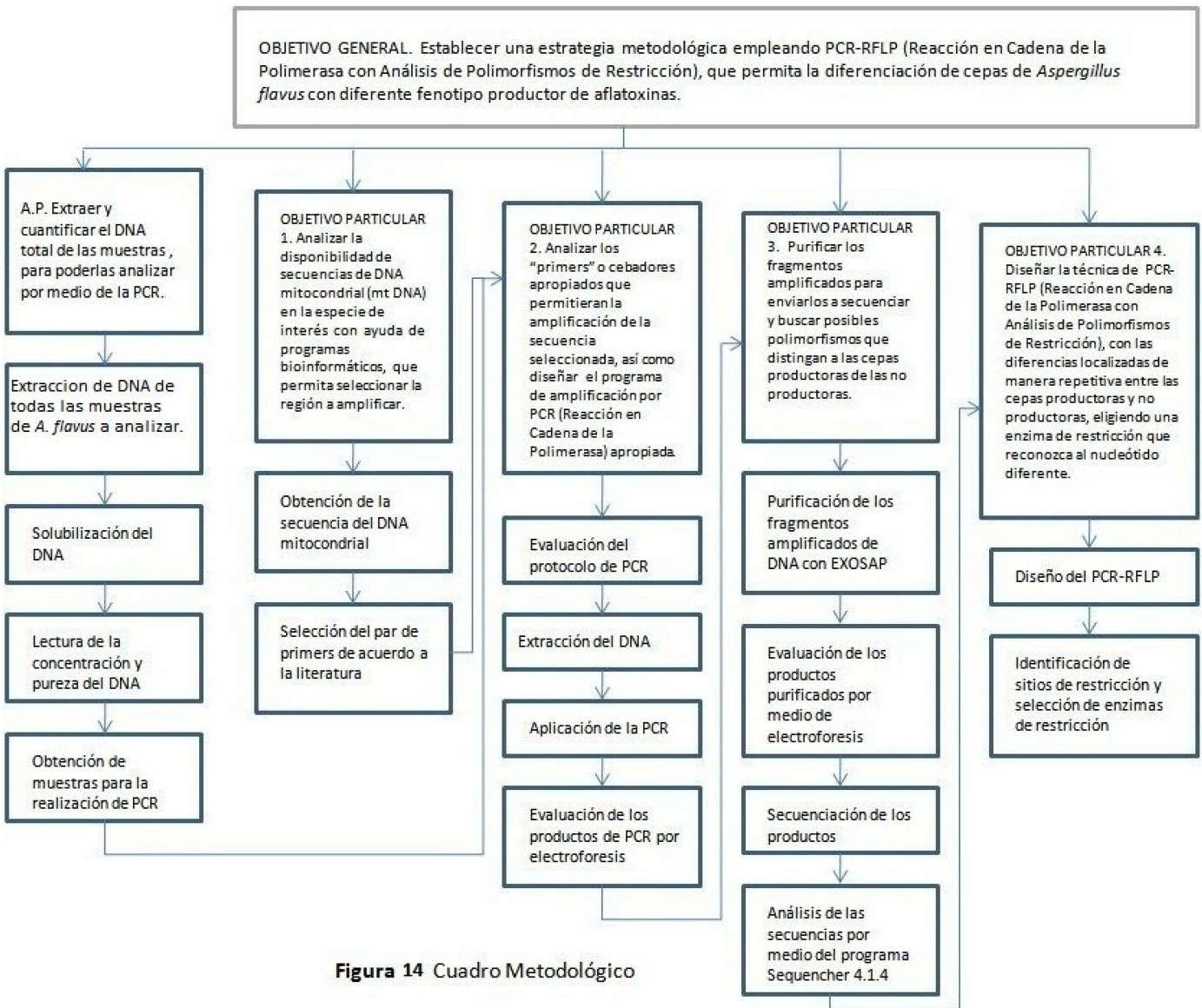


Figura 14 Cuadro Metodológico

3.1.6 Descripción del cuadro metodológico

La metodología planteada en esta experimentación se basa en 4 objetivos particulares y una actividad preliminar la cual se refiere a la extracción y cuantificación de DNA, ya que partiendo de estos datos y muestras obtenidas se procede a la realización de los objetivos planteados en esta experimentación.

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un protocolo para diferenciar cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo productor de aflatoxinas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), basado en la amplificación de regiones específicas del DNA mitocondrial.

3.1.7 Actividad Preliminar

Extraer y cuantificar el DNA de las muestras, las cuales serán analizadas por medio de la PCR.

Para realizar esta actividad se utilizó el protocolo de extracción descrito por Tapia-Tussell 2006, en el cual se utiliza proteinasa K, cloroformo e isopropanol para la obtención de DNA.

Para conocer la pureza y concentración de DNA se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop ND-1000 que permite análisis altamente precisos de muestras de ácidos nucleicos (DNA, RNA), ácidos nucleicos marcados, proteínas, proteínas marcadas y cultivos celulares.

El análisis de la pureza se hizo mediante la medición de la absorbancia para ácidos nucleicos y proteínas a 260 y 280 nm, y la concentración mediante la cantidad de ng/μl de DNA en la muestra.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material Biológico

Muestras:

- ⊖ Cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas donadas por la FES CUAUTITLLAN-UNAM-UNIGRAS

(Cepas de *Aspergillus flavus* 3, 10, 16, 17, 20, 25, 27, 28, 30, 34)

3.2.2 Reactivos

Extracción de DNA:

- ⊖ Agua libre de nucleasas
- ⊖ Solución de Lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1M, SDS 0.5%)
- ⊖ Proteinasa K
- ⊖ Cloroformo
- ⊖ Isopropanol
- ⊖ DNA Amortiguador de elución
- ⊖ Perlas de Vidrio

PCR:

- ⊖ Kit de PCR marca Promega que contiene: Agua Libre de Nucleasas y PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400 μ M de cada dNTP y 3mM de MgCl₂).
- ⊖ Pareja de Primers de la marca Invitrogen.
- ⊖ Muestra de DNA

Electroforesis:

- ⊖ Agarosa marca Ultra Pure de la empresa Invitrogen
- ⊖ TAE Buffer 1X solución pH = 8, conductividad 9.2 mS/cm
- ⊖ Bromuro de Etidio concentración de 10 mg/ml
- ⊖ Colorante cargador Blue/Orange 6X marca Promega
- ⊖ Marcador de Peso Molecular de 1 kb DNA Ladder marca Promega

Purificación de DNA

- ⊖ Mezcla de Enzimas hidrolíticas Exo SAP-IT marca USB

3.2.3 Equipo Utilizado

- ⊖ Balanza Analítica Cole-Parmer Symmetry
- ⊖ Thermomixer eppendorf
- ⊖ Agitador Vortex marca Apollo
- ⊖ Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000
- ⊖ Microcentrífuga para tubos eppendorf mini Spin plus
- ⊖ Termociclador marca Apollo ATC 401
- ⊖ Cámara de electroforesis
- ⊖ Fuente de poder BIO-RAD Power Pac 1000

- o Transiluminador Hihg Performance UVP
- o Cámara Fotográfica para luz UV marca Kodak Digital Science

3.3 MÉTODOS

Las cepas de *A. flavus* fueron resembradas en medio líquido de extracto de malta, se agitaron y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 27°C.

3.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó una modificación del protocolo de Sambrook, J. y Ruseel, D. 2001 y del protocolo clásico descrito por Tapia-Tussell (2006) el cual se describe a continuación:

Extracción de DNA:

1. Se congeló una porción de la muestra (en nitrógeno líquido o en un congelador)
2. Se les dió un choque térmico por 5 minutos a 80°C
3. Se agitó con el Vortex agregándole perlas de vidrio
4. Se colocó la cepa en tubos de 2 ml (300 µl de suspensión aprox.)
5. Se adicionó la solución de lisis 800µl
6. Se adicionó la proteinasa k 7 µl
7. Se incubó por 1 hora 30 minutos a 50°C en el Termoblok
8. Después 1 hora a 65°C para inactivar la enzima
9. Se dejó enfriar a temperatura ambiente
10. Después se agregó cloroformo 500 µl
11. Se agitó por 10 minutos con la mano, luego se destapó y tapó
12. Se centrifugó por 10 minutos a 12000 RPM a temperatura ambiente
13. Separación de la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 2 ml la cual contiene el DNA
14. Se añadió 700µl de isopropanol para la precipitación del DNA
15. Se colocó 20 minutos en el refrigerador
16. Se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM
17. Se realizó la decantación de la fase líquida (isopropanol).
18. Se agregó 50 µl de DNA Elution Buffer
19. Se dejó secar el DNA en una incubadora a 37°C colocando los tubos de forma horizontal, a lo cual el DNA debe visualizarse pegado al tubo eppendorf en forma de una mancha blanca.

20. Ya que se eliminó el isopropanol, se adicionó agua desionizada para resuspender el DNA agitando suavemente el tubo.

3.3.2 Cuantificación de DNA por medio del equipo Nanodrop

El espectrofotómetro Uv-Vis NanoDrop ND-1000 permite análisis altamente precisos de muestras de ácidos nucleicos (DNA, RNA), ácidos nucleicos marcados, proteínas, proteínas marcadas y cultivos celulares. Este sistema elimina la necesidad de utilizar cubetas y capilares, disminuyendo el tiempo de obtención de resultados de las muestras. Su alta capacidad de absorbancia, así como su alta reproducibilidad, elimina la necesidad de diluir en la mayoría de los casos.

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA. Sin embargo, esas contribuciones son más significativas cuando se trata de oligonucleótidos y deben ser consideradas si se requiere determinar correctamente la concentración [38].

Para determinar la concentración de DNA de Alto Peso Molecular, plásmidos o productos de PCR, se realizan mediciones a 260 y 280 nm.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a A_{280} (principalmente por residuos de triptófano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de la relación A_{260}/A_{280} es una manera común para expresar la pureza del DNA. Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura.

MÉTODO:

- Abrir el programa de Nanodrop y seleccionar la opción de ácidos nucleicos.
- Calibrar el equipo colocando 2 μ l de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo.
- Se da clic en el recuadro que aparece al abrir el programa.
- Colocar nuevamente 2 μ l de agua libre de nucleasas y se da clic en el recuadro marcado como blanco.
- Correr el programa
- Colocar 2 μ l de la muestra de DNA a cuantificar y dar clic en el recuadro de muestra.
- Correr el programa
- Se registra la concentración de DNA en ng/ μ l y la pureza proporcionada por la relación 260/280
- Se limpia el equipo con cuidado de no forzar el brazo del Nanodrop.

3.3.3 PCR

Para la amplificación de la muestra se realizó la estandarización de la concentración de las muestras (DNA). Los primers se solubilizaron a una concentración de 2.5 mM. Las concentraciones de DNA fueron tomadas mediante las lecturas del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Figura 15) en el cual se obtuvieron concentraciones entre 60 y 110 ng/ μ L.

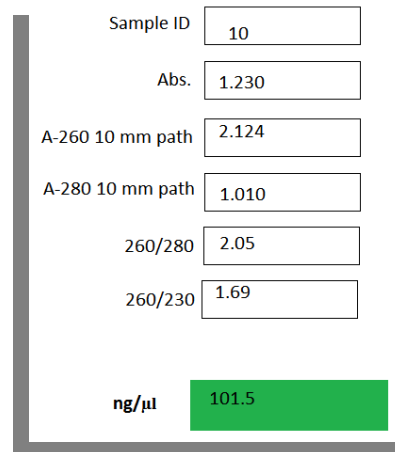


Figura 15. Lectura de la Concentración de DNA de *Aspergillus flavus* en el NanoDrop

La preparación de las muestras se basó en el protocolo del PCR Master Mix de la marca Promega, los componentes se prepararon en tubos de 25μL como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de las muestras para PCR

Componente	Volumen
Master Mix	12.5 μL
Primer F	0.5 μL
Primer R	0.5 μL
DNA	1 μL
Agua libre de nucleasas	10.5 μL
TOTAL	25 μL

3.3.4 Ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

El programa para el Termociclador se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones encontradas en la literatura en las cuales la etapa de desnaturalización se realizó a 94°C, donde se separan las dos hebras de las cuales está constituido el DNA; la etapa de hibridación del cebador se realizó a 50°C (temperatura de alineación), es decir, donde el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el DNA molde; y por último la etapa de elongación fue a 72°C, donde actúa la DNA polimerasa, tomando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo DNA. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5' 3'.

El programa para el termociclador tuvo una duración de 2 horas 52 minutos, con 30 ciclos como se muestra en la Figura 16.

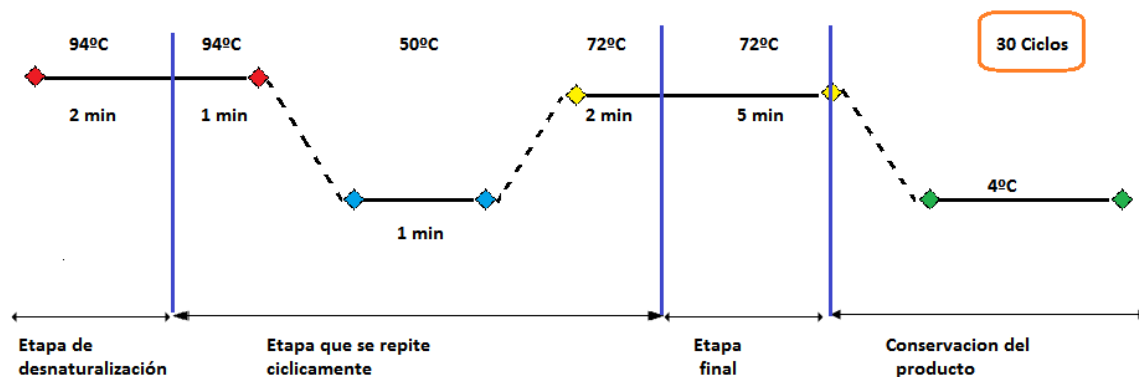


Figura 16. Programa para el Termociclador con temperaturas, ciclos y tiempos

3.3.5 Preparación del Gel de Agarosa

La electroforesis en gel (Figura 17) es un grupo de técnicas empleadas por los científicos para separar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoelectrico. La electroforesis en gel se utiliza generalmente con propósitos analíticos, pero

puede ser una técnica preparativa para purificar moléculas parcialmente antes de aplicar espectrometría de masas, PCR, clonación o secuenciación de DNA.

El gel se preparó como se muestra en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8. Preparación para gel de agarosa al 0.7%

TAE [1x]	50 ml
Bromuro de Etidio	1 gota
Agarosa	0.35 gr

El protocolo de preparación del gel es el siguiente:

- 1.- Pesar 0.35 g de agarosa y se miden en una probeta 50 ml de TAE (1x), y se vacían los dos reactivos a un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- 2.- Agitar la muestra por 10 segundos con la mano.
- 3.- Calentar la muestra en un horno de microondas a potencia baja por 30 segundos, si la muestra no se disolvió completamente calentar por otros 30 segundos.
- 4.- Esperar a que se enfrié la mezcla y al ver que ya no salen vapores de la mezcla, se le agrega 1 gota de bromuro de Etidio (BrEt) y se mezclan de nuevo los reactivos.
- 5.- Verter la mezcla en el soporte de la cámara de electroforesis teniendo la precaución de hacerlo de una forma lenta para evitar que se formen burbujas, después se coloca el peine en el gel.
- 6.- Dejar enfriar el gel por unos 25 minutos

7.- Retirar después el peine e inundar la cámara con TAE (1x) hasta que se cubra por completo el gel, posteriormente realizar la carga de las muestras de PCR.

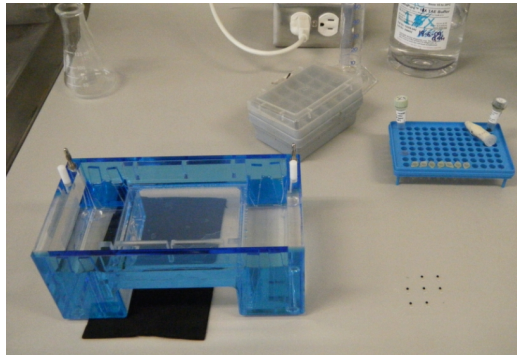


Figura 17. Preparacion del Gel de Agarosa al 0.7%

3.3.6 Electroforesis

Ya que se obtuvieron las muestras de la PCR se lleva a cabo la preparacion de las muestras para la Electroforesis en el papel Parafilm como se muestra en la Figura 18 y se procede a cargar las muestras en el gel de Agarosa, el cual se encuentra en la cámara de electroforesis.

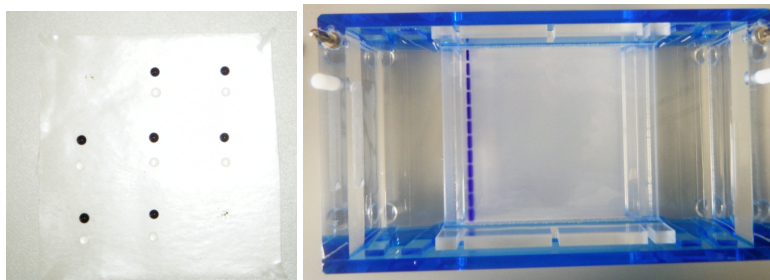


Figura 18. Muestras para Electroforesis

Las muestras se agregaron de la siguiente manera:

- 1.- En un trozo de papel Parafilm se coloca el colorante (3 μ L de Tinte cargador Blue/Orange 6X marca Promega) como número de muestras a realizar.
- 2.- Se añade el bromuro de etidio (3 μ L concentración de 10 mg/ml) para cada muestra.
- 3.- Se agrega el marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder (5 μ L) al lado del colorante y se mezcla con el bromuro de etidio y colorante y se procede a cargarlo en el gel de agarosa.
- 4.- Se agrega la muestra obtenida del PCR (5 μ L) junto a la del colorante y el bromuro de etidio y se procede a mezclarla y cargarla al gel de agarosa, este paso se repite para cada una de las muestras obtenidas del PCR.
- 5.- Finalmente se agregan (5 μ L) del tubo marcado como blanco el cual servirá como patrón negativo

La cámara de electroforesis (Figura 19) se conecta a la Fuente de poder BIO-RAD Power Pac 1000 la cual se utilizó a 90 V en la cual se corre la muestra por una 1 hora aproximadamente para asegurarnos de que todos los pares de bases de la muestra corran por todo lo largo del gel.

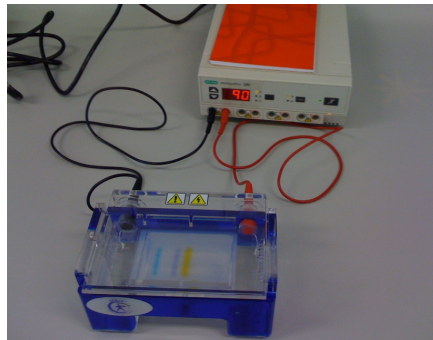


Figura 19. Cámara de Electroforesis para las cepas de *Aspergillus flavus*

3.3.7 Fotografía de los Geles

Después de llevar a cabo la electroforesis se colocó el gel en el fotodocumentador, el cual tiene una cámara en la que se sitúa el gel de manera que los pozos del gel donde se colocaron las muestras de DNA, de bromuro de etidio, de colorante y el marcador queden en la parte de arriba y hacia el fondo; después se cierra la puerta del fotodocumentador y se enciende la luz UV, también se enciende el fotodocumentador así como la cámara que tiene en la parte de arriba. Ya que se tiene encendido el equipo se puede ver la imagen del gel en la cámara del fotodocumentador, por lo que se procede a ajustar el zoom de la cámara y se toma la foto, posteriormente gracias al software del fotodocumentador la foto se puede ver en la computadora donde se puede guardar para una futura revisión y análisis del gel.

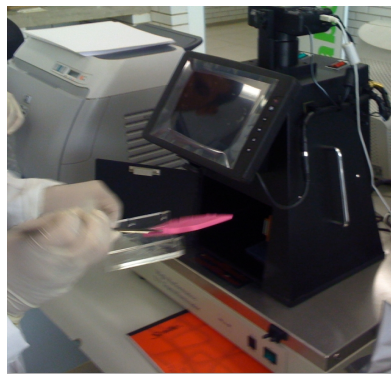


Figura 20. Fotodocumentador Modelo DI -HD

3.3.8 Purificación de DNA

Los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de oligonucleótidos que afectan negativamente a la secuenciación. Por ello, es necesario llevar a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación utilizando kits específicos como el Kit ZYMO.

Cuando se secuencian un fragmento de DNA obtenido mediante PCR es importante asegurarse que la amplificación solo produzca un fragmento de DNA. En el caso que existan varias bandas, es necesario aislar el fragmento de interés mediante electroforesis en gel de agarosa y purificación antes de remitirlo para su secuenciación.

El tratamiento con Exonucleasa I degrada los *primers* de PCR residuales mientras que, la fosfatasa alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase) desfosforila los dNTPs sobrantes. Tras la inactivación por calor de ambas enzimas puede emplearse el producto de PCR en la secuenciación automática. Este método no puede aplicarse en el caso de productos de PCR contaminados con subproductos secundarios.

Purificación

1. Agregar 240µl de Buffer de Sequencing Binding para 20µl de la reacción a secuenciar.
2. Después mezclar los reactivos anteriores y pasarlos a una columna Zymo-Spin con el tubo recolector de 2 ml.
3. Centrifugar a 10 000 rpm por 30 segundos.
4. Agregar 300 µl del Buffer de lavado Sequencing a la columna y centrifugar por 30 segundos.
5. Colocar dentro de una nueva columna Zymo-Spin de 1.5 ml. Añadir 20 µl de Buffer de Elucion Sequencing a la columna y centrifugar para obtener el DNA purificado.

3.3.9 Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR se realizó mediante la técnica de secuenciación automática. El análisis se hizo en vinculación con la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por medio de un secuenciador automático modelo 3100 Genetic Analyzer con Química de DNA ABI Prims BigDye Terminator Chemistry, en capilar de 50 cm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Objetivo Particular 1

- Analizar la disponibilidad de secuencias de DNA mitocondrial (mt DNA) en la especie de interés con ayuda de programas bioinformáticos, que permita seleccionar la región a amplificar.

Para llevar a cabo este trabajo fue necesario realizar una investigación bibliográfica de los trabajos anteriormente realizados sobre este tema; y después de dicha revisión se seleccionó el trabajo de Wang Li [28], para el programa de amplificación por PCR; en el cual se emplean primers que van dirigidos al gene mitocondrial del citocromo b, sin embargo el amplificado generó una banda de 402 pares de bases (pb), por lo que se decidió realizar un nuevo diseño de primer para lograr un amplificado mayor de 726 pb, que permitiera mayor posibilidad en el diseño del posterior RFLP.

Los primers modificados del trabajo de Wang Li [28] son:

Primer Reverso cyt b R modificado (5'-TAGTAGCTAATTCTACTAAA-3')

Primer Frontal cyt b F de Wang Li [28] (5'-TGAGGTGCTACAGTTATTAC-3')

En el cual el tamaño del amplificado es de 726 pb

El diseño del primer fue realizado de acuerdo a lo que se señala en el Anexo 1.

Extracción y cuantificación del DNA de las diferentes cepas de *Aspergillus flavus* (no productoras y productoras).

Para este trabajo se utilizaron 10 cepas de *Aspergillus flavus*, las cuales fueron catalogadas por la FES CUAUTITLÁN – UNAM – UNIGRAS (ver anexo 2).

Tabla 9. Cepas de *Aspergillus flavus*

Cepas no Productoras (N)	3, 10, 20, 30
Cepas Productoras (P)	16, 17, 25, 27, 28, 34

Para la extracción de DNA de los hongos (Tabla 9) de *Aspergillus flavus* se utilizó una modificación del protocolo de Sambrook, J. y Ruseel, D. (2001) y del protocolo clásico descrito por Tapia-Tussell (2006), puesto que es muy difícil romper la pared celular del hongo por lo cual se utilizó en la extracción una mayor agitación con el vortex y la adición de perlas de vidrio para ayudarnos a extraer de manera más segura el DNA. Posteriormente se cuantificó la concentración de DNA de *Aspergillus flavus* mediante el Nanodrop (Tabla 10), obteniendo las concentraciones siguientes:

Tabla 10. Cuantificación de DNA de *Aspergillus flavus*

Muestras de <i>A. flavus</i>	3	10	16	17	20	25	27	28	30	34
Absorbancia 260/280	1.76	1.98	1.87	2.08	2.09	2.02	2.03	2.04	2.01	1.63
Concentración (ng/μl)	106.55	76.31	107.98	88.54	79.14	103.25	79.15	102.16	87.49	95.88

Objetivo particular 2

Analizar los “primers” o cebadores apropiados que permitieran la amplificación de la secuencia seleccionada, así como diseñar el programa de amplificación por PCR apropiada.

Se procedió a realizar la PCR con las condiciones anteriormente mencionadas para el Termociclador (Figura 16), para las cepas de *Aspergillus flavus*, donde se trabajó con 1µl de DNA de *Aspergillus flavus* en cada una de las muestras.

Posteriormente se evaluó el resultado de la PCR a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % como se muestra en la figura 21.

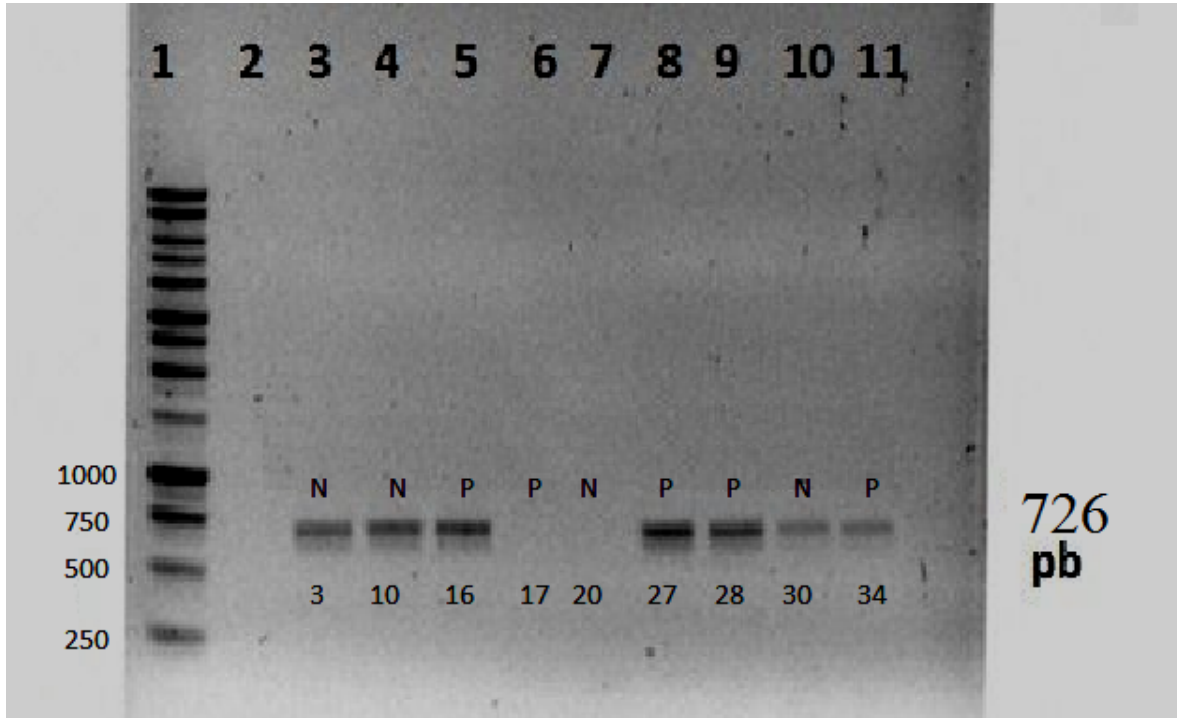


Figura 21. Fotografía de un gel de agarosa al 0.7% que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en cepas de *Aspergillus flavus*. En el carril (1) se tiene el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra la cepa 3 no productora, (4) la cepa 10 no productora, (5) cepa 16 productora, (6) y (7) no amplificaron, (8) cepa 27 productora, (9) cepa 28 productora, (10) cepa 30 no productora, (11) cepa 34 productora.

En esta figura se muestra que las cepas de *Aspergillus flavus* amplificaron con una banda de 726 pb, ya que la banda resultante está entre 500 y 750 pb, y que el gel no presenta contaminación puesto que el carril del blanco (carril 2) no tiene ninguna banda visible. También se observa que a pesar de que las bandas no tienen la misma intensidad, se obtiene claramente un amplificado en la posición de 726 pb.

Con la realización de esta prueba se pudo comprobar, que nuestros primers diseñados en este trabajo dirigidos al gene mitocondrial del citocromo b, son eficientes para la amplificación de las cepas de *Aspergillus flavus*.

Como el protocolo ya está comprobado con el gel de agarosa anterior (Figura 21), se procede a analizar las 10 muestras de *Aspergillus flavus*.

Evaluación de la técnica de PCR para la diferenciación de cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo productor de aflatoxinas.

Con los resultados obtenidos en la figura 21 se realizó una nueva PCR en la cual ya se conocía la cantidad de muestra de DNA a la cual era más conveniente trabajar cada cepa, con lo cual se obtuvo el siguiente resultado (figura 22): un amplificado de 726 pb de la cepa de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo productor de aflatoxina, ya que como se puede observar en el carril 2 donde se tiene la muestra en blanco, la cual no amplificó por lo que se puede decir que la muestra no está contaminada y por consiguiente se trata de unos amplificados óptimos para una purificación con el Kit ZYMO y su posterior secuenciación con ayuda de la FES- IZTACALA.

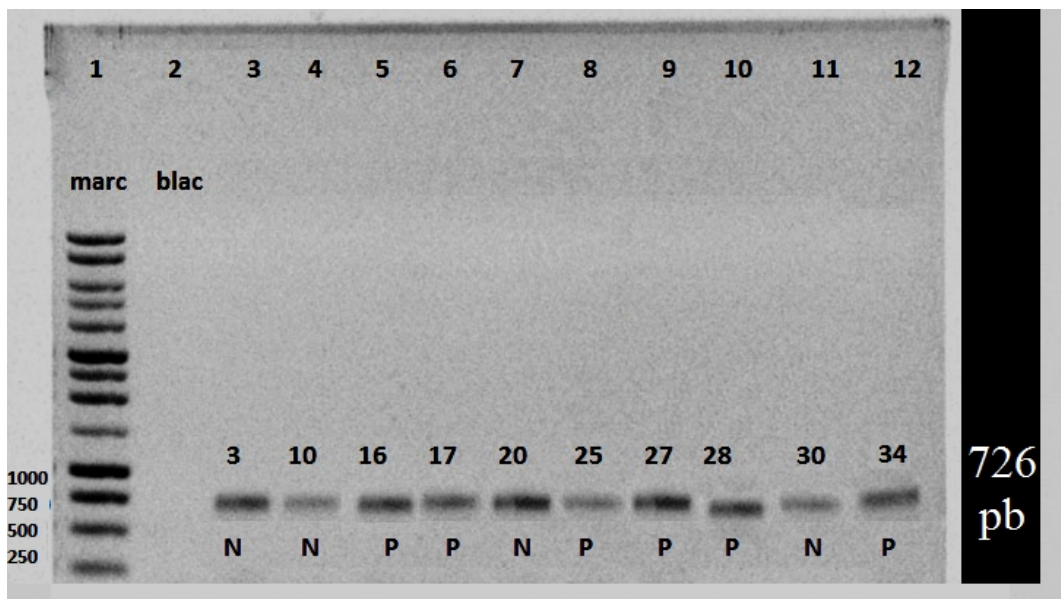


Figura 22. Fotografía de un gel de agarosa al 0.7% que muestra los amplificadores resultantes de la PCR en cepas de *Aspergillus flavus*. En el carril (1) se tiene el marcador de peso molecular, en el carril (2) se muestra el blanco, en el carril (3) se muestra la cepa 3 no productora, (4) la cepa 10 no productora, (5) cepa 16 productora, (6) cepa 17 productora, (7) cepa 20 no productora, (8) cepa 25 productora, (9) cepa 27 productora, (10) cepa 28 productora, (11) cepa 30 no productora, (12) la cepa 34 productora.

En este trabajo se utilizó además el nuevo kit de PCR directo ya que este kit ahorra la extracción del DNA por lo cual ahorra tiempo de trabajo, ya que la muestra para realizar la PCR se toma directo de la cepa del hongo y se procede a realizar la PCR de forma normal obteniendo óptimos resultados al momento de realizar la electroforesis y el revelado (Figura 22).

4.3 Objetivo particular 3

Purificar los fragmentos amplificados para enviarlos a secuenciar y buscar posibles polimorfismos que distingan a las cepas productoras de las no productoras.

Después se purifican los fragmentos amplificados para enviarlos a secuenciar y buscar posibles polimorfismos que distingan a las cepas productoras de las no productoras, lo cual se realizó con el kit de la marca ZYMO, QIA GEN, INVITROGEN, de los cuales se decidió utilizar el kit de ZYMO por tener mejor resultado.

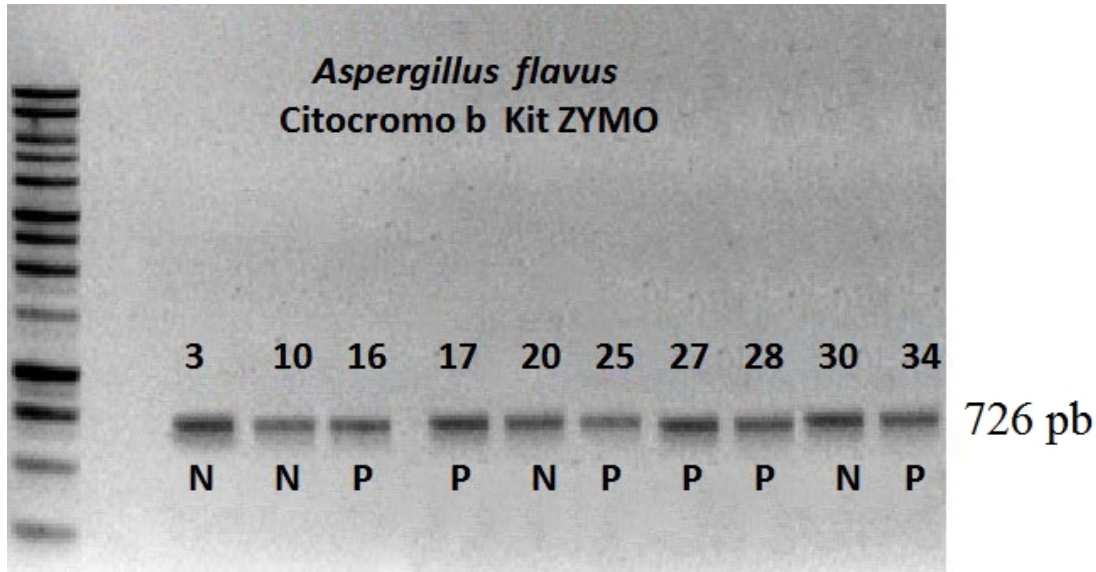


Figura 23. Fotografía de un gel de agarosa al 0.7% que muestra los amplificadores resultantes de la purificación de la PCR por medio del Kit ZYMO.

Los productos purificados se preparan con 10 μL a una concentración de 100 ng/ μL , así como los primers frontal y reverso para realizar la secuenciación.

Posteriormente la secuenciación de los productos de PCR se realizó mediante la técnica de secuenciación automática. El análisis se hizo en vinculación con la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por medio de un secuenciador automático modelo 3100 Genetic Analyzer con Química de DNA ABI Prims BigDye Terminator Chemistry, en capilar de 50 cm.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa Sequencher 4.1 el cual es un programa diseñado para funcionar con las secuencias de ADN automatizadas y es ampliamente conocido por su rápida curva de aprendizaje, las herramientas de edición sencillas. El programa Sequencher se utiliza frecuentemente para el análisis de las secuencias en el mundo genómico y farmacéutico, así como en muchos otros laboratorios académicos y del gobierno en más de 40 países alrededor del mundo [37].

Los investigadores suelen usarlo para muchos tipos de análisis de ADN, incluyendo secuenciación de genes, detección de mutaciones, identificación forense humana, sistemática[37].

Las capacidades de Sequencher incluyen detección y análisis de heterocigotos, alineación genómica de la gran brecha del ADN, secuenciación comparativa, soporte para puntuaciones de confianza, función de importación Gen Bank y restricción de la asignación de enzimas [37].

De *Aspergillus flavus* no se conoce secuencia completa del DNA mitocondrial, ni del gen del citocromo b, por lo que se utilizó la región que corresponde al *Aspergillus tubingensis* que sí está descrito el genoma mitocondrial completo.

En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos después de comparar las secuencias de las cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo, las cepas productoras así como las no productoras obtenidas mediante la experimentación, en comparación con la secuencia de referencia de *Aspergillus tubingensis*, la cual fue obtenida del programa bioinformático MITOMAP, en la figura 24 se observa que tanto las cepas no productoras así como la secuencia de referencia de *Aspergillus tubingensis* no presentan la guanina (G) en la posición 999, la cual solo se observa en las cepas productoras de aflatoxinas.

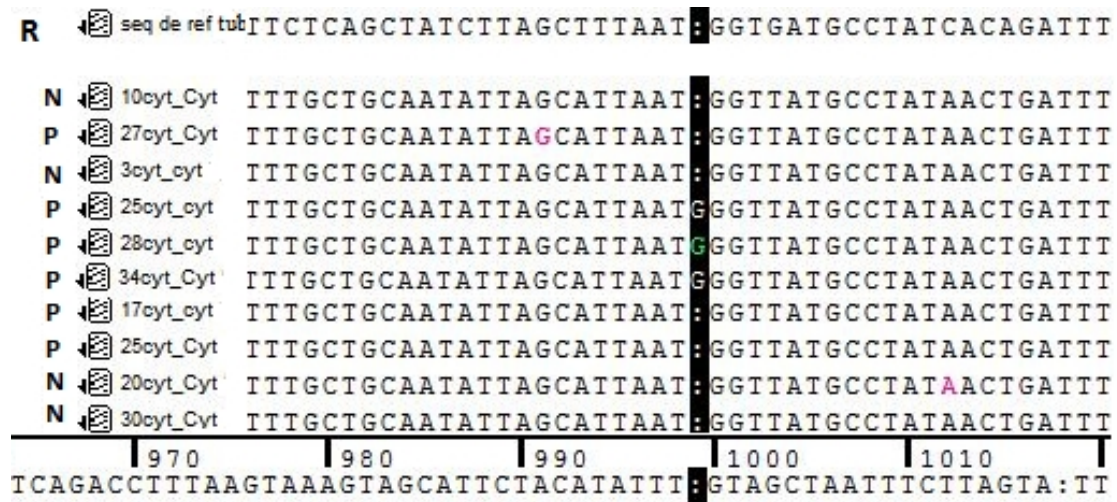


Figura 24. Utilización del programa Sequencher para realizar el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas de las cepas Productoras y No productoras y una secuencia de referencia que corresponde a la región del gene mitocondrial del citocromo b del *Aspergillus flavus*.

Al comparar las secuencias de cepas productoras con las no productoras, se encuentran cambios en la secuencia de sus nucleótidos en la posición 999, donde se observa una guanina, la cual sólo aparece en las cepas con el fenotipo productor de aflatoxinas.

En la figura 25 se observa el electroferograma de la secuenciación automática de los fragmentos amplificados por PCR de cepas con diferente fenotipo productor de aflatoxinas en la que se aprecia la inserción de G en 3 cepas productoras (cepas 25, 28 y 34) en la posición 999.

En el gen del citocromo b se encontró una diferencia en la secuencia de nucleótidos; recordando que el gen del citocromo b es un gen codificante, ya que si un gen codificante llegara a tener una delección, o inserción de algún nucleótido es muy probable que se tendría un cambio radical en la secuencia de aminoácidos de la proteína (desplazamiento de marco), por lo cual a partir de esa posición se tiene que revisar minuciosamente el electroferograma para confirmar que donde haya dicho cambio no se esté dando un caso de heteroplasmia, ya que no siempre todos los DNA mitocondriales tienen la alteración.

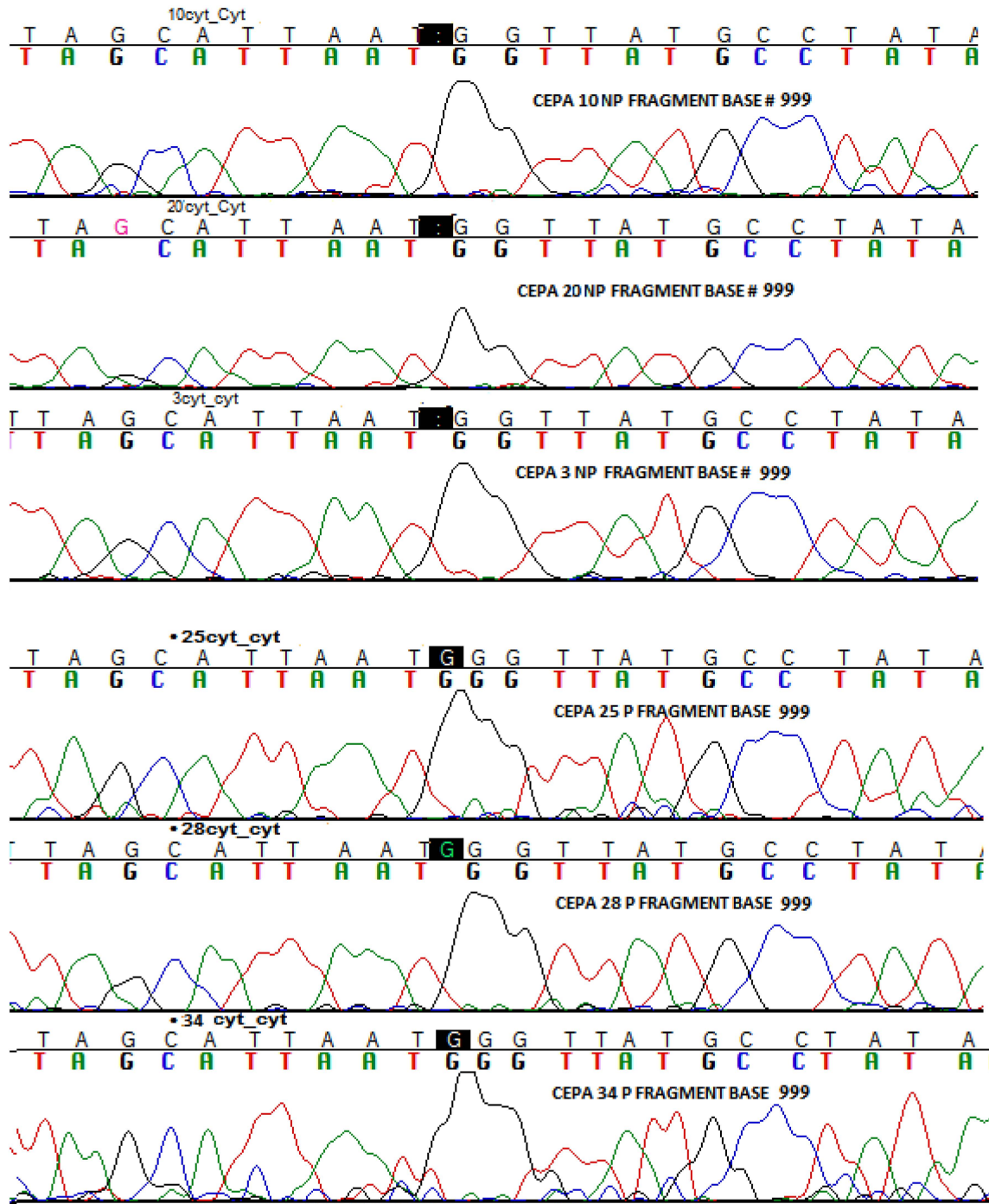


Figura 25. Electroferogramas comparativos de la región en la que se aprecia la presencia de guanina en la posición 999 en las cepas con fenotipo productor de aflatoxinas.

Ahora bien ya que se cuenta con una secuencia de referencia del citocromo b como lo es la de *Aspergillus tubingensis* la cual encontramos en los programas bioinformáticos como lo es el Mitomap o Genbank, se puede realizar una comparación más apropiada, puesto que se realizaron comparaciones entre las cepas productoras y no productoras obtenidas en la experimentación vs la secuencia de referencia de *Aspergillus tubingensis*, obteniendo como resultado en la comparación de las secuencias que en todas la cepas productoras se tiene la adición de una guanina en la posición 999.

Por otro lado ya que en las cepas productoras sí tienen una guanina en la posición 999, y las cepas no productoras presentan esa delección o eliminación por lo cual se cree que al tener ese cambio se afecta completamente el metabolismo de la cepa por lo cual ya no produce la aflatoxina, aparte de que la cepa de *Aspergillus tubingensis* no produce aflatoxinas, lo cual nos dice que posiblemente las cepas de *Aspergillus flavus* que no cuentan con la guanina en la posición 999 no son productoras de aflatoxinas.

Sería conveniente evaluar este resultado en un número mayor de muestras de la misma manera, para poder también evaluar si no se trata de un error de lectura del secuenciador automático.

4.4 Objetivo particular 4

Diseñar la técnica de PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Análisis de Polimorfismos de Restricción), con las diferencias localizadas de manera repetitiva entre las cepas productoras y no productoras, eligiendo una enzima de restricción que reconozca al nucleótido diferente.

Para el diseño del PCR-RFLP se utilizó el Programa Sequencher 4.1.4 el cual permite un análisis de las posiciones de corte por enzimas de restricción que se pudieran ocupar para la realización del RFLP en la posición deseada; en nuestro caso se busco una enzima que reconociera el sitio de corte en la posición 999, de donde tomamos 10 nucleótidos a la

derecha de esa posición y 10 nucleótidos a la izquierda de la posición 999, que fueron posteriormente analizados en el Software Sequencher 4.1.4 (Figura 26).

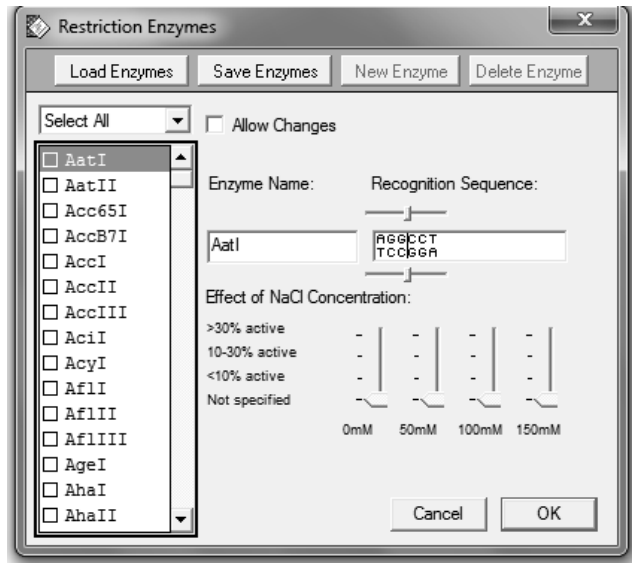


Figura 26. Cuadro del Programa Sequencher 4.1.4 donde muestra que no hay alguna enzima de corte.

Al realizar el análisis no se encontró ninguna enzima que reconociera esta secuencia y que permitiera poder proponer el PCR-RFLP.

Y aunque no se encontró con el programa de Sequencher 4.1.4 una enzima que reconociera esa posición para realizar un corte y poder diseñar un PCR-RFLP, se pueden realizar otras técnicas para poder tratar de diseñar el RFLP, por ejemplo se pueden diseñar primers con un error en la secuencia para producir un corte en la posición que deseamos, o con sondas específicas para PCR en tiempo real.

CONCLUSIONES

Para poder diseñar una estrategia metodológica que permita diferenciar cepas de *Aspergillus flavus* con diferente fenotipo productor de aflatoxinas en el gene del citocromo b, fue necesario la utilización de programas bioinformáticos, los cuales son de gran ayuda para poder diseñar las parejas de primers y poder utilizar las más apropiadas.

Para la extracción del DNA se propuso un nuevo kit de PCR el cual da un plus al ofrecer una PCR directa, sin la necesidad de llevar a cabo la extracción del DNA, pues cuenta con una enzima altamente afín al mismo, sin ser previamente purificado, además de utilizarse un mínimo de muestra (de 0.5 a 1 µg).

La técnica de amplificación de PCR, es un método sensible y reproducible, capaz de proporcionar resultados de pruebas, incluso cuando la cantidad de DNA es mínima.

La pareja de primers seleccionados fueron correctos, ya que estos nos proporcionaron unos amplificados claros en la posición de 726 pb.

Dado que la amplificación se ha dirigido a la región codificante del gene del citocromo b, se ha demostrado que tanto este DNA como la región elegida han sido objeto confiable para llevar a cabo este tipo de análisis, puesto que el DNA mitocondrial presenta importantes ventajas sobre el DNA nuclear como lo es la ausencia de regiones no codificantes (intrones).

Una aportación relevante de este trabajo al hacer la comparación de las secuencias de la región amplificada correspondiente al gen mitocondrial del citocromo b, utilizando como referencia la de *Aspergillus tubingensis* no productora de aflatoxina, en lo referente al polimorfismo localizado en la posición 999 y que corresponde a una delección de G en las



cepas de *Aspergillus flavus* poco o no productoras de aflatoxinas. Lo que permite diseñar una estrategia de RFLP que permita con una enzima de restricción específica diferenciar esta modificación entre cepas productoras y no productoras, lo que permitiría realizando el estudio en un número amplio de muestras de ambos fenotipos confirmar dicho cambio y si está asociado a la producción de la aflatoxina.

Por lo cual la importancia de este trabajo es la obtención de una estrategia metodológica la cual sea rápida, específica y eficiente al reconocer cepas de hongos de *A.flavus* con un diferente fenotipo productor de aflatoxinas desde la cosecha del cereal, almacenaje, transporte y aun tratándose de un producto terminado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chang et al., (1995). Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene aflR distinguishes species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 40–43.
2. Christensen T., (1981). A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* 72 : 1056–1084.
3. Cotty, P.J. (1997). Aflatoxin producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research.* 101: 698-704.
4. Cotty, P.J.; Cardwell, K.F. (1999). Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 2264-2266.
5. Dorney; Cole, (2002). Characterization of aflatoxin-producing fungi outside of *Aspergillus* section *Flavi*, *Mycologia*, 425–432.
6. Etienne J., (2001). Bioquímica genética, bioquímica molecular. Mansson S.A., Barcelona, España.
7. Ferris, (1981). Maternal inherited myopathy and cardiomyopathy: Association with mutation in mitochondrial DNA tRNA. 338:143-147.
8. Geisen, (2000). PCR Methods for the detection of mycotoxin producing fungi. In: P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander, Editors, *Applications of PCR in mycology*, CAB International, Wallingford, 243–266.
9. Geiser, et al., (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 388–393.
10. Klich, R., Mullaney, S., (1992). DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. oryzae*. *Exp. Mycol.* 11: 170–175.

11. Kozakiewicz, Z., (1989). *Aspergillus* toxins and taxonomy. In: K.A. Powell, Editor, *The Genus Aspergillus*, Plenum, New York. 303–311.
12. Luque, J., Herraiz, A., (2001). *Biología Celular e Ingeniería Genética*. Harcourt, Madrid, España.
13. Moreno, J. (2004). Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Moreno, M., (1987). La problemática y la investigación sobre la conservación de granos. En: *Memorias del Encuentro latinoamericano sobre almacenamiento y conservación de granos básicos*, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
15. NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
16. Nikkuni, S., et al., (1998). Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. *J. Gen. Appl. Microbiol., Tokyo*. 44: 225–230.
17. Peraica, A., Roper, J., Woloshuk, C. Zhou, R., (1999). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis, *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 329–362.
18. Perera, J. y Col., (2002). Vol. 1, *Ingeniería Genética, Preparación, Análisis, Manipulación y clonaje de DNA*. Síntesis, Madrid, España.
19. Peterson, D., (2000). The identification and phylogenetic relationship of pathogenic species of *Aspergillus* based on the mitochondrial cytochrome b gene. *J. Food Prot.* 36: 585–849.
20. Pierce B. A., (2005). *Genética un enfoque conceptual*, 2da ed., Panamericana, Madrid, España.

21. Pitt, J., (1993). Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.* 56: 265–269.
22. Ramírez, M., (1991). Caracteres adaptativos de *Prostephanus truncatus* (Horn) en su morfología, ciclo de vida, distribución y atributos taxonómicos. En: Memorias de la I Reunión Nacional sobre la investigación en México del barrenador mayor de los granos *Prostephanus truncatus* (Horn), México, Instituto de Biología de Aguascalientes.
23. Rao, B.; Husain, A. (1985). Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing «koda poisoning» in man and its production by associated fungi. *Mycopathologia.* 89: 177-180.
24. Sambrook, J., Russel, D., (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* E. U. A., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
25. Samson, A., (1994). Current systematics of the genus *Aspergillus*. In: Keith The Genus *Aspergillus*, Plenum, New York. 261–276.
26. Tamarin R. H., (1996). *Principios de Genética.* Reverte, Barcelona, España.
27. Torres Tejeda Alfredo G., Baca Beatriz Eugenia., (1995). Reaccion en Cadena de la Polimerasa. *Elementos*, 23, 16-21.
28. Wang, L., Yokoyama, K., (2001). Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene.
29. Wang, S., Yokoyama, M., (1990). Isolation and characterization of morphological variants of *Aspergillus parasiticus* deficient in secondary metabolite production. *Mycological Research.* 98: 645–652.
30. Watson D. J., (2006). *Biología Molecular del gen.* 5ta ed., Panamericana. Madrid. España.
31. Winder, F., Beffa, R., (2000). *Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular.* Acribia. España.
32. Yamatoya, K., et al., (1990). Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa: 2. *Aspergillus* section *Flavi*. In: R.A.

- Samson and J.I. Pitt, Editors, *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, Plenum, New York. 395–405.
33. Yokoyama, K., et al., (2000). Identification and phylogenetic relationship of the most common pathogenic *Candida* species inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4503–4510.
 34. Yuan, G., et al., (1995). Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2384–2387.
 35. <http://blast/docs/fasta.html>
 36. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
 37. <http://en.bio-soft.net/dna/Sequencher.html>
 38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
 39. <http://www.nanodrop.com/>
 40. <http://www.mitomap.org/>

ANEXO 1

° Se accesó a la base de datos de MITOMAP en el genoma de *Aspergillus tubingensis*, seleccionándose sólo el fragmento del citocromo B, mediante la siguiente dirección de internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/81230384>

```

gene      1..1158
          /gene="cob"
          /locus_tag="Astufp01"
          /db_xref="GeneID:3772915"
CDS       1..1158
          /gene="cob"
          /locus_tag="Astufp01"
          /codon_start=1
          /transl_table=4
          /product="cytochrome b"
          /protein_id="YP_398767.1"
          /db_xref="GI:81230395"
          /db_xref="GeneID:3772915"
          /translation="MRILKSHPLLKIVNSYMIDSPQPANISYLWNFGSLLALCLGIQI
VIGVTLAMHYTPSVLEAFNSVEHIMRDVNNGWLVRYLHANTASAFFFLVYLHIGRGLY
YGSYKSPRTLWAIQTVILIVMMATAFLGYVLPYGQMSLWGATVITNLMSAIPWIGQD
IVEFIWGGFSVNNATLNRFFALHFLLPFVLAALALMHLIAMHDTVGSNPLGISGNYD
RLFPAPYFIFKDLVTIFIFFIVLSIFVFFMPNALGDSENYVMANPMQTPPAIVPEWYL
LPFYAILRSIPNKLGVIAMFSAILALMVMPITDLSKLRGVQFRPLSKVAFYIFVANF
LVLMQIGAKHVETPFIELGQISTVLYFAHFFVIVPVVSLIENSLVELATKK"

1 atgagaatat taaaaagtca tcctttatta aagatagtta attcatatat gatagattca
61 ccacaaccag ctaatataag ttatttatga aactttggat cattattagc attatgttta
121 ggtatacaaa tagtaacagg tgttacatta gctatgcact atacacctag tgtattagaa
181 gcatttaatt ctgtagagca tattatgaga gatgtaaata atgggtgatt agtacgttat
241 ttacacgcta atacagcatc agcattcttt ttcttagtat acttacacat aggtagagga
301 ttatactatg gatcttacia atcacctaga acattaacat gagctatagg tacagttata
361 cttatagtta tgatggctac agcgttctta ggatatgtat taccatacgg tcaaatgagt
421 ttatgagggtg ctacagttat tactaacctt atgagtgcta taccatgaat aggtcaagat
481 atagttgagt tcatatgagg tggtttctct gtaaataatg caacattaa cagattcttt
541 gcattacact tcttattacc ttttgtatta gctgcattag ctttaatgca cttaatagct
601 atgcacgata cagtaggatc aggtaatcca ttaggaatat caggtaatta cgatagatta
661 ccttttgcac catattttat atttaaagat ttagtaacta tctttatfff ctttattgta
721 ttatcaatat ttgttttctt tatgcctaag gcattaggag atagtgaaaa ttatgttatg
781 gctaacccaa tgcaaactcc acctgctatt gtaccagagt gatatttatt acctttctat
841 gctatthtaa gatcaatacc taataaatta ttaggtgtta tagctatggt ctacagctatc
901 ttagctthaa tggatgatgcc tatcacagat ttatcaaaat taagaggagt acaattcaga
961 ccattaagta aagtagcctt ctatattttc gttgctaatt tcttagtatt aatgcaaata
1021 ggtgcaaac acgttgaaac tccatttatt gagttaggac aaatttctac tgtgttatat
1081 tttgcacact tttttgtaat agtacctgta gttagtctta ttgaaaatag tttagtagaa
1141 ttagctacta aaaaataata aatattatff tttaaattac tttagtagtt tgttttgta

```



Se procedió a calcular la T_m del primer frontal de Wang Li [28], para posteriormente poder compararla con la T_m del primer modificado.

$$T_m = 2 (A + T) + 4 (G + C)$$

Primers frontal cyt b F

$$5' \text{ TGAGGTGCTACAGTTATTAC } 3' \quad T_m \quad 32 + 24 = 56 \text{ } ^\circ\text{C}$$

El amplificado obtenido de los primers de Wang Li [28], daba un total de 402 pb, por lo que se busco un primer el cual nos diera un amplificado mayor (726 pb), por lo que se busco otra secuencia de 20 nucleótidos los cuales tuvieran una T_m cercana al Primer frontal de Wang Li.

Primer reverso cyt b R

$$\text{TTTAGTAGAATTAGCTACTA} \quad T_m \quad 20 + 30 = 50 \text{ } ^\circ\text{C}$$

```

1 atgagaatat taaaaagtca tcctttatta aagatagtta atccatatat gatagattca
61 ccacaaccag ctaatataag ttatttatga aactttggat cattattagc attatgttta
121 ggtatacaaa tagtaacagg tgttacatta gctatgcaact atacacctag tgtattagaa
181 gcatttaatt ctgtagagca tattatgaga gatgtaaata atggttgatt agtacgttat
241 ttacacgcta atacagcadc agcattcttt ttcttagtat acttacacat aggtagagga
301 ttataactag gatcttacaa atcacctaga acattaacat gagctatagg tacagttata
361 cttatagtta tgatggctac agcgttctta ggatatgta taccatacgg tcaaatgagt
421 ttaggaggtg ctacagttat tacfaacctt atgagtgcta taccatgaat aggcaagat
481 atagttgagt tcatatgagg tggtttctct gtaaataatg caacattaaa cagattcttt
541 gcattacct tcttattacc ttttgattta gctgcattag ctttaatgca cttaatagct
601 atgcacgata cagtaggatc aggtaatcca ttaggaatat caggtaatta cgatagatta
661 ccttttgca catattttat atttaaagat ttagtaacta tctttatctt ctttattgta
721 ttatcaatat ttgttttctt tatgccta atgcattaggag atagtgaata ttatgttatg
781 gctaaccctaa tgcaaacctc acctgctatt gtaccagat gatatttctt acctttctat
841 gctattttta gatcaatacc taataaatta ttaggtgta tagctatggt ctacagctatc
901 ttagctttta tggatgagcc taccacagat ttatcaaat taagaggagt acaattcaga
961 ccattaagta aagtagcctt ctatattttc gttgctaatt tcttagtatt aatgcaata
1021 ggtgcaaac acggtgaaac tccatttatt gagttaggac aaatttctac tgtgttatat
1081 tttgcacct tttttgtaat agtacctgta gttagtctta ttgaaaatag ttagtagaa
1141 ttagctacta aaaaataata aatatttatt ttaaatac ttagtagt tgttttgta
1201 ttttaacta ttattagtt tctcgcgtt ttaaaaatt tatgtttttt ttaataaat

```

Primer Frontal cyt b F

Primer Reverso cyt b R

```

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3e-07
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 TGAGGTGCTACAGTTATTAC 20
      |||
Sbjct 424 TGAGGTGCTACAGTTATTAC 443

```

```

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3e-07
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 TAGTAGCTAATTCTACTAAA 20
      |||
Sbjct 1150 TAGTAGCTAATTCTACTAAA 1131

```

Primer Reverso Wang Li

```

Score = 40.1 bits (20), Expect = 3e-07
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 AAAATAGCATAGAAAGGTAA 20
      |||
Sbjct 848 AAAATAGCATAGAAAGGTAA 829

```

1150 - 424 = 726 pb

Se puede corroborar el porcentaje de identidad de los primers con la especie, con la ayuda de programas bioinformáticos como lo es el BLAST.

Nucleotide BLAST: Align two or more sequences using BLAST

Aparece la siguiente ventana, en el primer recuadro se coloca uno de los primers (forward o reverse), en el segundo recuadro se coloca el GI.

NCBI/ BLAST/ blastn suite **Align Sequences Nucleotide BLAST**

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide subjects using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Query subrange

Or, upload file

Job Title Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Enter Subject Sequence

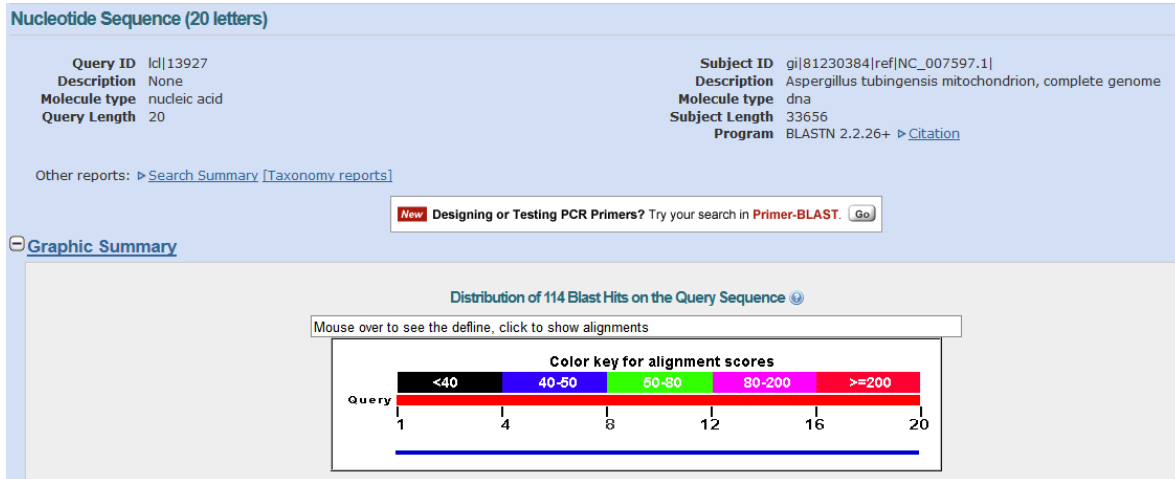
Enter accession number, gi, or FASTA sequence Subject subrange

Or, upload file

Se oprime el recuadro de BLAST, para analizar ambos recuadros

Search nucleotide sequence using Megablast (Optimize for highly similar sequences)
 Show results in a new window

A continuación aparece la siguiente información, en donde debe mostrar los datos de la especie a la cual debe corresponder los primers.



Por último debe aparecer la siguiente información, la cual nos indica el porcentaje de identidad de los primers con la especie, para este caso se tiene que corresponden al 100 % de identidad, por lo cual los primers son los adecuados, y se mandan a secuenciar en un laboratorio.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NC_007597.1	Aspergillus tubingensis mitochondrion, complete genome	40.1	1741	100%	3e-07	100%	

ANEXO 2

Producción de aflatoxinas en medio líquido arroz.

Se observa gran variabilidad en la producción de aflatoxinas entre las cepas de *Aspergillus flavus*, en medio líquido con arroz. Se presentaron 6 grupos estadísticos, incluyéndose en el último grupo las cepas que no producen aflatoxinas de ningún tipo, como las cepas 3, 10, 13, 17, 20, 30, 33, 37 de *Aspergillus*. El resto de las cepas presentaron diferentes niveles de aflatoxinas, la cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la cepa 25 de *Aspergillus flavus* con 5,033.3 ppb y la de menor producción fue la cepa 35 de *Aspergillus flavus* con 31.33 ppb.

Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en medio líquido con arroz inoculado con cepas de *A. flavus*, incubadas a 27°C durante 7 días.

CEPAS <i>Aspergillus flavus</i>	Producción de aflatoxinas en medio líquido (ppb)
<u>25</u>	<u>5033.3</u>
18	4700.0
21	4000.0
11	2580.0
12	2386.7
<u>28</u>	<u>2400.0</u>
<u>34</u>	<u>2066.7</u>
15	1630.0
2	1130.7
<u>27</u>	<u>1050.0</u>
4	886.7
5	810.0
14	643.3
6	573.3
1	363.3
8	326.7
38	312.0
31	309.3
<u>17</u>	<u>278.0</u>
<u>16</u>	<u>66.7</u>
35	31.3
<u>3</u>	<u>0.0</u>
<u>10</u>	<u>0.0</u>



13	0.0
7	0.0
<u>20</u>	<u>0.0</u>
9	0.0
<u>30</u>	<u>0.0</u>
33	0.0
37	0.0
Testigo	0.0

Producción de aflatoxinas en medio liquido (ppb)

