

## BIOLOGÍA MOLECULAR EN MICOLOGÍA MÉDICA

M. en C. Enrique Salas Téllez,\*  
Dr. Roberto Arenas\*\*

M. en C. Enrique Salas Téllez, Dr. Roberto Arenas.  
**Biología Molecular en Micología Médica.** Derm.  
Venez, 2001, 39: 07-10

### RESUMEN

Se hace una breve revisión de las técnicas usadas en biología molecular para el estudio de los hongos en micología médica.

Las técnicas genéticas utilizadas en la identificación de especies y géneros de hongos, incluyen el Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) del ADNmt, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificado por PCR (PCR-SSCP), o el análisis de polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA). En combinación con otros métodos como la electroforesis en geles de agarosa y la transferencia a membranas de ADN (Southern Blot) o la de ARN (Northern Blot).

**Palabras clave:** Biología Molecular, Hongos, Micología Médica

### Molecular Biology in Medical Mycology.

### ABSTRACT

We present a brief review of the molecular techniques used in medical mycology. The genetic techniques used for the identification of genera and species of fungi include: the (RFLP) Restriction Fragment Length Polymorphism of the DNAm, the (PCR), Polymerase Chain Reaction, The PCR-RFLP, PCR-SSCP, the (RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA. Also in combination with other methods such as electrophoresis in agarose gel and the Southern and Northern Blot Techniques.

**Key words:** Fungi, Medical Mycology, Molecular Biology.

### INTRODUCCIÓN

Por muchas décadas la Micología Médica fue área de limitada investigación, debido en parte a que sólo ocasionalmente hongos patógenos producen enfermedades serias y de amplia distribución en comparación por ejemplo con bacterias, parásitos o virus. Así como, el gran polimorfismo entre especies fúngicas y además que el manejo de patóge-

nos humanos en cultivos era frecuentemente peligroso y se carecía de las condiciones óptimas de aislamiento. Es así, que los avances tecnológicos en micología médica se han relacionado con la ultramicroscopia, así como con instrumentos que permitan precisar las características inmunológicas y bioquímicas de los hongos.<sup>2,8</sup>

En la actualidad muchos de los inconvenientes antes mencionados ya han sido superados, quedando en claro que las infecciones sistémicas fungales son comunes y no raras, y que su estudio es una necesidad imperiosa.<sup>12</sup>

El rápido incremento de las técnicas moleculares ha tenido influencia en el estudio de problemas de micología médica. Los análisis genéticos han sido de gran provecho, y su aplicación en microorganismos patógenos permite nue-

\* Académico Académico Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. Cátedra de Inmunodiagnóstico de Enfermedades Micóticas y Bacterianas.

\*\* Jefe de la Sección de Micología. Departamento de Dermatología. Hospital General Dr. Manuel Gea González. Dirección: Av. 1° de Mayo s/n, Campo 1 Colonia Atlanta, Cuautitlán Izcalli C.P. 54720.

vas ideas sobre el conocimiento biológico de los mismos. Sin embargo, la importancia de la aplicación de estas técnicas ha trascendido a otros campos del conocimiento de la Micología Médica.

Como la mayoría de los hongos patógenos son Deuteromycetes y presentan características ambientales cambiantes, el uso de técnicas moleculares permite estudiar características estables y no modificables por el ambiente, como ADN del gen y el ARN molecular. La mejor característica para discriminar individuos, cepas, especies, géneros y familias deberá ser en el futuro cercano, la secuencia de nucleótidos de moléculas de ADN que llevan la información genética, e indican la distancia genética entre las mismas. Sin embargo, aunque estas técnicas se han desarrollado en un tiempo relativamente corto y en ocasiones son fundamentales en el diagnóstico, es dudoso que puedan suplir por completo los métodos morfológicos tradicionales.<sup>4,8,13</sup>

Las técnicas genéticas utilizadas en la identificación de especies y géneros de Hongos, incluyen el Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) del ADNmt, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), el análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificado por PCR (PCR-SSCP), o el análisis de polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA). En combinación con otros métodos como la electroforesis en geles de agarosa y la transferencia a membranas de ADN (Southern Blot) o la de ARN (Northern Blot), se ha llegado a desarrollar herramientas de gran utilidad tanto para estudios genéticos, filogenéticos, epidemiológicos y diagnósticos de los hongos patógenos involucrados en las infecciones micóticas.

**Hibridación.-** Las moléculas de ADN o ARN sintético son muy empleadas como "sondas" en Ingeniería genética, para detectar, vía hibridación del ácido nucleico, las secuencias específicas de ADN o ARN. El procedimiento general es marcar el ácido nucleico sonda, generalmente con fosfato radioactivo y dejar que la sonda de cadena sencilla hibride con ác. nucleico monocatenario derivado del ADN clonado. Por apareamiento específico de bases complementarias, dos polinucleótidos de cadena sencilla solamente se hibridarán si son totalmente complementarias.<sup>4,10,11</sup>

**Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).-** Esta técnica permite diferenciar distintos microorganismos mediante el análisis de patrones de bandas, derivados de la ruptura de sus respectivos ADNs. Estos patrones, conocidos como perfiles de restricción del ADN,

se originan gracias a la actividad de las enzimas endonucleasas de restricción. Cuanto menor sea el tamaño de la secuencia nucleotídica, mayor será el número de fragmentos que se generen. Las endonucleasas de restricción se denominan con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacteria en la que se han aislado (por ejemplo, la enzima Eco procede de *Escherichia coli*) y además se le añade un número romano (Eco RI, Eco RII, Eco 47111), debido a que se pueden encontrar varias enzimas de restricción diferentes, que reconocen distintas secuencias nucleotídicas, en la misma bacteria. Los fragmentos se pueden separar mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose perfiles de restricción característicos. Los perfiles dependerán de la enzima de restricción empleada así como del ADN utilizado (ADNn o ADNmt), aunque el más empleado es el ADN mt. La comparación entre los perfiles permitirá diferenciar varias especies entre sí o incluso poblaciones dentro de una misma especie.<sup>8,11,14</sup>

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** El gran éxito obtenido a mediados de los 80 por Kary Mullis consistió en lograr in vitro un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados or la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular. La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

- 1) Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C.
- 2) Unión específica de los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (Ta, Annealing temperature) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción. La Ta depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia de nucleótidos que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR, y
- 3) Extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de la muestra. La polimerasa empleada inicialmente, procedente de *Escherichia coli*, se desnaturalizaba cuando se sometía a temperaturas superiores a 90°C durante la primera etapa de cada ciclo y por lo tanto, había que reponerla al inicio de cada fase de extensión. En la actualidad, sin embargo, se utilizan enzimas termoestables como la Taq polimerasa, procedente del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*. La cantidad de copias de la secuen-

cia de ADN delimitado por los cebadores se incrementa exponencialmente, debido a que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos.

La técnica de PCR presenta sin embargo una limitación: es necesario conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, al menos aquellas zonas en las que se van a unir los cebadores.<sup>4,11,14</sup>

**Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP).** La técnica de PCR-RFLP consiste en el uso combinado de la técnica de RFLP, explicada anteriormente y la técnica de PCR. De esta manera, se amplifican fragmentos de ADN específicos mediante PCR y posteriormente se tratan con enzimas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños. Diferencias en la secuencia nucleotídica entre las especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinarán mediante electroforesis. Los perfiles de ADN obtenidos tras la electroforesis son más sencillos de interpretar, puesto que hay un menor número de bandas y una pequeña cantidad de ADN es suficiente para llevar a cabo el análisis, ya que se obtiene un gran número de copias tras su amplificación por PCR. Esto reduce significativamente la cantidad de muestra necesaria.<sup>8,11,14</sup>

**Análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP).** Esta técnica se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de ADN monocatenario (ADNmc) y su conformación, que en definitiva es un reflejo de su secuencia nucleotídica. En esta técnica el ADN bicatenario (ADNbc) se desnaturaliza a ADNmc y posteriormente se separan dos hebras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, bajo condiciones no desnaturalizantes. Cualquier diferencia en la secuencia del ADN dará lugar a un cambio de movilidad de las moléculas de ADNmc, que se visualizará al final del proceso.<sup>4,11</sup>

**Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD).** La técnica de RAPD denominada también por otros autores AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) o DAF (DNA Amplification Fingerprinting) se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN nuclear mediante PCR, utilizando para ello un único cebador, normalmente de 915 bases, cuya secuencia se elige al azar. Las temperaturas de unión (Ta) empleadas (35-39 C) son mucho más bajas en comparación al PCR tradicional, lo cual favorece la inespecificidad de la reacción. Los fragmentos se analizan mediante electroforesis. El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN mediante RAPD, se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador y se haga el estudio en las mismas condiciones. De este modo los perfiles

obtenidos mediante RAPD pueden permitir la diferenciación de los ADNs a nivel de especie, o incluso a nivel de individuo.<sup>3,11,12</sup>

Las aplicaciones directas de las técnicas de biología molecular se pueden observar en los siguientes ejemplos:

- a) Sondas de ADN se han desarrollado para *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*,<sup>10,12</sup> *Sacharomyces*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Pneumocystis carinü*, *Aspergillus/Penicillium spp*, *Candida glabrata/Saccharomyces cerevisiae*
- b) La técnica de PCR se ha desarrollado en *Candida*<sup>12</sup> *Pneumocystis carinü*, especies de *Aspergillus*,<sup>10</sup> *Trichoderma*,<sup>6</sup> *Pseudallescheria/Scedosporium*,<sup>15</sup> *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *gattü* así como sus cuatro serotipos,<sup>1,10</sup> *Mucor*, *Sporothrix*, *Aspergillus niger* y *A. flavus*.<sup>11</sup>
- c) La de RFLP se ha establecido para el género *Fonsecae'* y para las especies de *Candida* (*C. Tropicalis*, *C. Parapsilopsis*, *C. Lusitanae*, *C. Krusei* y *C. Glabrata*).
- d) La técnica de RAPD esta descrita en el género *Candida* y *Malassezia* en sus diferentes especies y se ha descrito en varios hongos entre ellos *Aspergillus fumigatus*.<sup>10,11</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

1. Attili D, de Hoog GS and Pizzirani KA. RDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaeae*, agents of Chromoblastomycosis. *Medical Mycology* 1998, 36: 213-217.
2. Beneke ES and Rogers AL. *Medical Mycology and Human Mycosis*. California, Star Publishers. 1996: 27-45.
3. Boekhout T, Kamp M and Guéhot E. Molecular typing of *Malassezia* species with PFGE and RAPD. *Medical Mycology* 1998,36:429432.
4. Brock TI) and Madigan MT. *Microbiología*. Sexta edición, México Prentice may- Hispanoamericana 1993: 142-191; 298-326.
5. Hanana R, Fensterle J, Nussei P, et al. PCR Based quantification of *Pneumocystis carinü* in *in vitro* system. *Microbes Infect.*, 2000,2: 737-743.
6. Kuhls K, Lieckfeldt E, Bornk T et al. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviricle*. *Medical Mycology*, 1999, 37: 25-33.
7. Kwon-Chung KJ, Pfeiffer T, Chang YC, et al. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and *therapy of cryptococcosis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1994 32 Supplement 1: 407-415.
8. Maresca C and Kobayoshi GS. *Molecular Biology of Pathogenic Fungi*. 2nd. Ed. New York, Telos Press. 1994: 59, 85, 241, 293, 375, 461.
9. Martin C, Roberts D, Van Der Weide M, et al. Development of a PCRbased line probe assay for identification of fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 3735-3742.

- 
10. Mitchell TG, Sandin RI, Bowman BH, et al. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR Technology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1994, 32 Supplement 1: 351-366.
  11. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, et al. Molecular. Diagnosis and epidemiology of fungal infections. *J. Med. Mycol*, 1998, 36 Supplement 1: 249-257.
  12. Roberts GD, Pfaller MA, Gueho E, et al. Developments in the diagnostic mycology laboratory *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1992, 30 Supplement 1: 241-248.
  13. Smith J and Wood R. *Biología Molecular y Biotecnología*. México, Adison Wesley Longman. 1998: 22-38
  14. Turner PC, McLennan AG, Bates AD et al. *Instant Notes in Molecular Biology*. New York, Bios Scientific Publishers, 1998: 47-59; 99104; 150-154.
  15. Wedde M, Muller D, Tintelnot KJ, et al. PCR- based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strain. *Medical Mycology*, 1998, 36: 61-67.