



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPTO. CIENCIAS FÍSICAS Y QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL**



“ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA* PARA SU ANÁLISIS POR RAPD-PCR”.

CLAUDIO GABRIEL GUTCOVSKY WAINKRANC

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof.Dra. Blanca Urzúa Orellana

TUTORES ASOCIADOS

Prof.Dra. Irene Morales Bozo

Prof. Dr. Patricio Retamales Molina

**Santiago – Chile
2008**

*Dedicado a lo más preciado que la vida
me dio, Milton y Matías, mis hijos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente a la Prof. Dra. Blanca Urzúa Orellana, a la Prof. Dra. Irene Morales Bozo y al Prof. Dr. Patricio Retamales Molina, por la paciencia que me han tenido, la excelente disposición y colaboración.

Destaco también el apoyo desinteresado y comprometido que tuvieron para conmigo, sinceramente jamás los olvidare.

INDICE

INTRODUCCION	1
MARCO TEORICO	5
HIPOTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECIFICOS	10
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	18
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	54
RESUMEN	56
BIBLIOGRAFIA	57

INTRODUCCION

Normalmente, los únicos hongos que se encuentran en la boca y pueden producir patología oral pertenecen al género *Candida*. Este género lo constituyen levaduras del Phylum *Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales* y familia *Candidaceae* (1, 2, 3, 4, 5). Los miembros del género *Candida* comprenden alrededor de 150 a 200 especies, distribuidas ampliamente en la naturaleza con carácter saprófito.

Candida albicans es una levadura comensal, presente en la mayoría de los individuos sanos, que bajo determinadas condiciones puede causar infecciones superficiales y sistémicas en inmunocomprometidos (1, 2, 6, 7). Algunos estudios han determinado el origen clonal de cepas de *C. albicans* patógenas y comensales, sin embargo, se han reportado pequeñas variaciones genéticas entre ambas (8, 9). Tales cambios genéticos han sido definidos colectivamente como microevolución, y hoy gracias al advenimiento de las nuevas herramientas de genotipificación ó *fingerprinting*, se está comenzando a comprender cuál podría ser el significado biológico de este fenómeno para la levadura.

La microevolución constituye un proceso de cambio que puede llevarse a cabo en días o semanas, y como consecuencia puede generar nuevas variantes de una especie o subespecie de algún microorganismo (9). Este proceso de cambio se puede medir o cuantificar por varios métodos como: electroforesis de enzimas multi-locus (MLEE, del inglés Multi-Locus Enzyme Electrophoresis), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés Restriction Fragment Lenght Polymorphism), RFLP-hibridación, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) y varios otros métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polimerase Chain Reaction) (10, 11, 12). Los datos generados por estas metodologías deben ser analizados por programas computacionales que calculan los valores de similitud genética entre cepas, para luego construir dendogramas mediante algoritmos de agrupamiento ó “clustering”, como el método denominado vecino más cercano (NJ, del inglés Neighbor Joining) o la estrategia aglomerativa jerárquica de la media no ponderada (UPGMA, del inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

Mean). Posteriormente, se deben interpretar y así establecer qué tipo de relación existe entre las cepas analizadas.

En nuestro laboratorio se analizan las relaciones de cepas provenientes de la cavidad oral de sujetos sanos y enfermos, y la variabilidad genética se mide por la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Los resultados de esta técnica son altamente dependientes del grado de pureza de la muestra de ADN genómico aislado, utilizado en la reacción de PCR, lo que convierte a la elección del método de purificación en un punto de crucial relevancia. La técnica estandarizada de ADNg de levaduras en el laboratorio comienza con la ruptura de la pared celular del hongo mediante el uso de perlas de vidrio, combinada con un paso de extracción fenólica (método convencional). Si bien, con este método de purificación se obtiene una cantidad de ADNg suficiente para RAPD-PCR, su aplicación toma aproximadamente 72 horas y expone a la muestra a contaminación con fenol y otras impurezas, que posteriormente pueden inhibir las reacciones de PCR. Además, se requiere la determinación de la calidad y cantidad del ADN purificado, lo que aumenta el tiempo total del análisis.

Recientemente se ha descrito un método muy sencillo de simultánea colección, transporte, almacenaje y purificación de ADN usando la tecnología FTA® (Flinders Technology Associated) fabricada por la compañía Whatman. Este sistema consiste en depositar la muestra conteniendo levaduras, directamente sobre un filtro de papel especial; una carta FTA, la cual viene impregnada con una mezcla de reactivos químicos, de marca registrada (**figura 1 A**). La muestra puede ser material de diversas fuentes como: sangre y/o coágulos de sangre, células cultivadas, células bucales, homogeneizado de plantas, bacterias, plásmidos, tejido sólido, partículas virales, etc. Una vez depositada la muestra, las membranas celulares y organelos son lisados por los reactivos químicos presentes y los ácidos nucleicos liberados son atrapados en las fibras de la matriz del papel (**figura 1 B**). Después de secada la muestra por una hora a temperatura ambiente se pueden obtener discos de 1,2 ó 2 mm de diámetro usando un mecanismo de corte proporcionado en el paquete comercial (**figura 1 C**). Los discos así obtenidos (**figuras 1 C y D**) son sometidos a

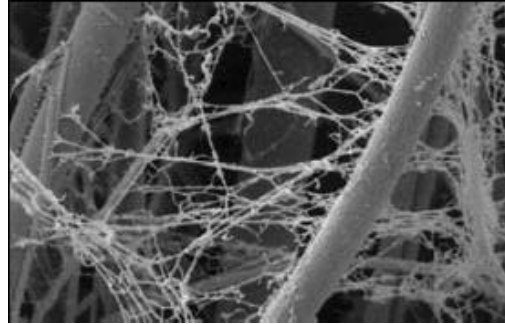
un proceso de lavado y secado que demora aproximadamente 30 minutos (dependiendo del número de muestras procesadas), quedando listos para ser usados en la aplicación requerida (figura 1 C).

La carta FTA contiene sustancias químicas que lisan células, desnaturalizan proteínas y protegen los ácidos nucleicos de nucleasas, del daño oxidativo y de la degradación por luz UV. Además, rápidamente inactivan organismos e impiden el crecimiento de bacterias y otros microorganismos. Otras ventajas señaladas por el fabricante para la purificación de ADN por este método incluyen: aislamiento de los ácidos nucleicos en un paso simple; el ADN aislado puede ser usado en otras aplicaciones en menos de 30 minutos; el ADN colectado sobre las cartas FTA es estable por años a temperatura ambiente (hasta 17 años o más); las cartas FTA se pueden almacenar a temperatura ambiente antes y después de la aplicación de la muestra, reduciendo la necesidad de usar congeladores; son adecuadas para cualquier tipo celular; tienen un amplio rango de aplicaciones y están disponibles en una variedad de configuraciones.

Dado las ventajas señaladas para este nuevo método de purificación de ácidos nucleicos y debido a que, hasta el momento, la técnica de RAPD-PCR no ha sido probada en levaduras con ADN_g purificado usando las cartas FTA, esta tesis se planteó como objetivo comparar el método de purificación de ADN_g por medio de cartas FTA y el método convencional de rompimiento celular por perlas de vidrio y extracción fenólica, respecto a su aplicabilidad en el análisis de la variabilidad genética entre levaduras del género *Candida*, mediante la técnica de RAPD-PCR.



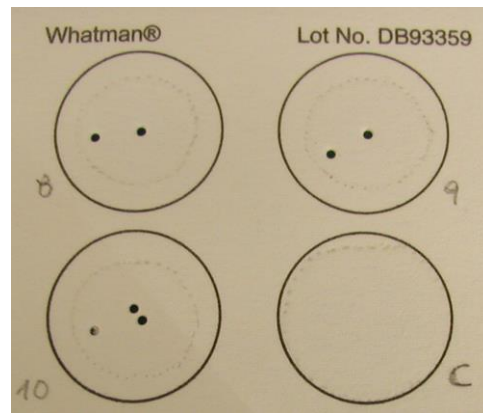
A



B



C



D

Figura 1: Principales componentes del sistema comercial de colección, almacenaje y purificación de ácidos nucleicos FTA® de Whatman®. A) Carta FTA con muestras de diversas cepas de levaduras depositadas en la región circular. B) Microfotografía electrónica que muestra ADN atrapado en la matriz FTA. C) Sacabocado para cortar discos de 1,2 mm depositado sobre la superficie plástica de corte, más tubo de PCR con discos en su interior. D) Carta FTA donde se aprecia los espacios dejados por el mecanismo de corte de los discos.

MARCO TEÓRICO

Excepto circunstancias excepcionales, tales como las micosis profundas y sistémicas, los únicos hongos que se encuentran formando parte de la microbiota bucal y pueden producir patología oral pertenecen al género *Cándida*. Los miembros del género *Candida* comprenden alrededor de 150 a 200 especies, distribuidas ampliamente en la naturaleza, con carácter saprófito (1). Este género lo constituyen levaduras del Phylum *Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales* y familia *Candidaceae* (2, 3, 4). La mayoría de ellos son organismos asexuales y exhiben características de hongos dimórficos. El género *Candida* posee la capacidad de yemación, pero algunas especies tienen la habilidad de producir filamentos del tipo pseudohifas e hifas verdaderas. Cuando estas levaduras se comportan como patógenas frecuentemente se encuentran en su forma filamentosa, mientras que en estado comensal mantiene su morfología de levadura (2, 3, 4, 5). *Candida* spp. pueden ser aisladas de la boca y del tracto gastrointestinal de hasta el 50% de la población normal, por lo que se considera residente del tracto digestivo, desde donde colonizaría otras superficies. También pueden aislarse en el tracto genital en un 30% de las mujeres sanas y excepcionalmente se aísla en piel. De todas las especies del género, *C. albicans* es la que se encuentra con mayor frecuencia, cercana al 80% de los casos (1, 3, 4).

Candidiasis oral. Es una enfermedad oral común que afecta a un porcentaje significativo de la población y que se clasifica como un tipo de micosis superficial, ya que afecta principalmente mucosas y piel (1, 2, 3, 5) *Candida* spp. pueden ser responsables de enfermedades de las mucosas, actuando como patógenos primarios o como patógenos oportunistas, dependiendo de la especie, exacerbando enfermedades de la mucosa existentes previamente. Las diferentes especies y cepas de *Candida* difieren en sus potenciales patogénicos y algunas de ellas pueden ser específicas de sitios anatómicos (5, 7). La especie más común de levadura comensal y patogénica es *C. albicans* (Prevalencia de 91% en estomatitis subprotésica, 40% en Candidiasis vulvo-vaginal, 40% en mucosa oral

de recién nacidos). Sin embargo, también pueden ser aisladas de la cavidad oral otras especies del género, ya sea como comensales o patógenos. Estas especies incluyen frecuentemente, en orden descendente de virulencia a : *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea*. (1, 4, 5, 6).

Desde el punto de vista clínico, las candidiasis orales se pueden clasificar como: 1) agudas (pseudomembranosa, eritematosa), 2) crónicas (pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica), 3) asociadas a lesiones orales (queilitis angular, estomatitis protésica, glositis romboidea) y 4) mucocutáneas crónicas (1, 6).

Factores que predisponen a candidiasis. Las especies de *Candida* viven en armonía con otros microorganismos de la microbiota oral y como agentes oportunistas necesitan que se produzcan una serie de factores facilitadores para transformarse en patógenos. Los factores de patogenicidad dependientes del microorganismo son la composición de la pared celular, moléculas de adhesión, producción de enzimas extracelulares y capacidad para filamentar, entre otros (2, 5, 7, 8, 9).

Aquellos factores facilitadores que dependen del hospedero pueden clasificarse como:

Factores locales: mucosos, por ejemplo: cambios epiteliales exógenos (trauma) y cambios epiteliales endógenos (atrofia, hiperplasia, displasia); los salivales, por ejemplo: cambios cuantitativos (hiposialia por síndrome de Sjögren, radioterapia, o por terapia citotóxica); cambios cualitativos (variación del pH, concentración de glucosa), microbiota comensal, dieta rica en hidratos de carbono (1, 2, 3, 4).

Factores sistémicos: estados fisiológicos de la vida (infancia, vejez); estados hormonales alterados (embarazo, diabetes, hipotiroidismo, hipoparatiroidismo, hipoadrenocorticismos), estados nutricionales alterados (hipovitaminosis, déficit de hierro, malnutrición); mecanismos inmunes alterados (descenso de fagocitos, defectos de inmunidad celular motivados por infecciones).

Factores iatrogénicos: ingesta de antibióticos, corticoesteroides, anticonceptivos, inmunosupresores, tabaquismo.

Identificación de levaduras. La identificación de microorganismos ha ido variando desde el reconocimiento fenotípico tradicional a métodos basados en el análisis genómico (10, 12). La taxonomía, epidemiología e identificación de hongos aislados va a depender cada vez más de modernas técnicas moleculares. En general, el estudio de los determinantes patogénicos, de genes de resistencia a antifúngicos u otras características, requieren de técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos (11) entre las que se pueden mencionar:

Análisis del Polimorfismo de la longitud de los cromosomas mediante Electroforesis de campo pulsado (cariotipificación). Mediante este método, la molécula de ADN previamente digerida con endonucleasas de restricción de corte poco frecuente, es sometida mediante electroforesis, a un campo eléctrico a velocidad constante en un gel (12, 13); la migración se realiza a una velocidad que depende del tamaño y la carga de las moléculas, de tal manera que es posible visualizar un patrón de bandas (7, 12). Este patrón es específico para cada especie, debido a fenómenos genéticos y evolutivos que han tenido lugar en los cromosomas (inserciones, deleciones y translocaciones).

Análisis de microsatélites: Esta técnica se basa en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y consiste en la amplificación de fragmentos con partidores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el ADN, denominadas microsatélites.

Análisis de ADN Polimórfico amplificado al azar mediante PCR (RAPD-PCR, del inglés Random Amplified Polimorphic DNA): RAPD-PCR se basa en la amplificación por PCR del ADN genómico en presencia de un único partidore de pocos oligonucleótidos. El uso de RAPD-PCR permite obtener perfiles de amplificación que diferirían en el número y tamaño de los fragmentos obtenidos

(amplicones), los cuales pueden ser específicos de especies e incluso de cepas (12, 18).

RAPD-PCR se empleó recientemente en el análisis de la variabilidad genética de los miembros del grupo *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*). Este estudio permitió delimitar especies estrechamente relacionadas, así como grupos intraespecíficos, como los presentes en la especie *S. bayanus* (12, 23).

El estudio de hongos va a depender cada vez más de las modernas técnicas moleculares basadas en la PCR. Muchos cultivos microbianos pueden ser sometidos directamente a amplificación por PCR, sin embargo, en levaduras, las técnicas para extracción de ADN deben ser combinadas con procedimientos complejos, laboriosos y extensos debido a las dificultades para romper la pared celular de estos microorganismos. Entre estos procedimientos se encuentran la ebullición, metodologías basadas en la disrupción física de los hongos con elementos como perlas de vidrio, calentamiento-enfriamiento, calor-álcali, digestión enzimática, ruptura de células a alta velocidad, sonicación, etc. (10, 11, 12)

Con la finalidad de extraer el ADN, estos procedimientos se combinan con el protocolo de extracción fenólica, que permite aislar el ADN de otras macromoléculas como lípidos y proteínas. Sin embargo, residuos fenólicos pueden interferir con procedimientos de análisis posteriores que usan PCR y digestiones enzimáticas, etc. Debido a ésta limitación, se ha puesto mucho esfuerzo en realizar y desarrollar una técnica económica y rápida para extracción de ADN libre de fenol (13, 14).

Recientemente se ha descrito la técnica de extracción de ADN *con cartas FTA*[®] (Elinders Technology Associated, fabricados por Whatman), mediante la cual ha sido posible una rápida colección, purificación y análisis del material genético aislado (15). Se ha aplicado satisfactoriamente en el estudio de plásmidos, virus (17), bacterias (18, 19), plantas (20), corales (21), protozoos (22), tejidos de mamíferos (23). En el ser humano ha sido utilizada en el estudio de un amplio rango de fuentes de ADN tales como: sangre completa, muestras bucales y una

diversidad de tejidos, siendo utilizada incluso en el campo de las ciencias forenses, transfusión y detección de enfermedades que afectan a los huesos (13, 16). La tarjeta matriz de FTA ha sido impregnada con una mezcla patentada de reactivos químicos, que contienen fuertes tamponantes, sustancias que atrapan los radicales libres y elementos desnaturizantes de proteínas que lisan las paredes y membranas celulares cuando se ponen en contacto con ellas (14,15).

Un estudio reciente ha demostrado el potencial de la matriz FTA para ser utilizada como un sistema de almacenamiento de ADN de larga duración, depositando material genético proveniente de una serie de bacterias que han perdido su viabilidad al ser agregadas directamente a la tarjeta (15). En este mismo estudio, se utiliza este método de extracción de ADN combinado con la técnica de PCR, para identificar variabilidad genética entre especies de levaduras, sin embargo no se utilizó la técnica de RAPD-PCR (15). Otro estudio reciente, en el que se combina este método de extracción de ADN con la técnica de RAPD-PCR, fue realizado utilizando ADN proveniente de una serie de especies bacterianas.

El presente estudio tiene como objetivo realizar un análisis comparativo de dos métodos de purificación de ADN genómico de levaduras del género *Cándida* para su análisis por RAPD-PCR. Se comparará un método convencional basado en la ruptura de las paredes de levaduras con perlas de vidrio, combinado con extracción fenólica, considerado como el “*gold standar*” y un método nuevo de purificación de ADN con la tecnología FTA[®], que hasta el momento no ha sido probado para su utilización en RAPD-PCR con ADN genómico de levaduras.

Se espera que no existan diferencias en los resultados del análisis de la variabilidad genética, medida por la técnica de RAPD-PCR, cuando se utiliza como blanco ADN_g de levaduras purificado por el método convencional y por el método de las cartas FTA.

HIPOTESIS

No existen diferencias en el análisis de la variabilidad genética de levaduras de la especie *Candida albicans*, determinada por la técnica de RAPD-PCR, utilizando ADN genómico obtenido por el método convencional y por la técnica que usa las cartas FTA.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el análisis de la variabilidad genética de levaduras de la especie *C. albicans*, mediante RAPD-PCR, usando ADN genómico aislado por el método convencional y por el método de purificación basado en la tecnología FTA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la variabilidad genética de levaduras de la especie *C. albicans* mediante RAPD-PCR, usando ADN genómico purificado por el método convencional.
- 2) Determinar la variabilidad genética de levaduras de la especie *C. albicans* mediante RAPD-PCR, usando ADN genómico purificado por el método de las cartas FTA.
- 3) Comparar el análisis de la variabilidad genética de levaduras de la especie *C. albicans*, obtenido usando ADN genómico purificado por ambos métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Cepas de Levaduras, mantención y almacenaje. En este trabajo se utilizaron como controles las cepas de *Candida albicans* 90029, 1001 y SC5314, obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Se usaron además, 7 aislados clínicos de la especie *C. albicans* recuperados desde mucosa (**M**) y sacos periodontales de diferentes profundidades (sitio **a** de 2-4 mm, sitio **b** de 4-6 mm y sitio **c** de más de 6 mm) en dos pacientes con periodontitis crónica (P17 y P2). Los aislados clínicos utilizados fueron: PM17-11, Pa17-3, Pb17-1, Pc17-6, PM2-7, Pb2-2 y Pc2-7, los que permanecen almacenados como parte de la colección de levaduras mantenida en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología.

Las levaduras clínicas fueron recuperadas desde viales mantenidos a -80° C en 20% v/v de glicerol estéril y fueron replicadas sobre medio sólido en placas de agar Sabouraud-TET (Peptona 10 g/L, glucosa 20 g/L, Agar-agar 17 g/L, Tetraciclina 50 μ g/ml) y mantenidas a 4° C hasta el momento de la purificación del ADN genómico.

2) Obtención de ADN genómico (ADNg) de levaduras. En este estudio comparativo se usaron dos métodos de purificación del ADNg: un método convencional (Extracción de ADN con perlas de vidrio), que fue considerado el “gold standard” y un método nuevo (Purificación de ADN con la tecnología FTA[®]), aplicado por primera vez para su utilización en RAPD-PCR en levaduras.

2.1) Estandarización del número de células. Para llevar a cabo el procedimiento de purificación de ADNg de levaduras, se estandarizó el número de células a usar en cada preparación. Las cepas fueron crecidas en duplicado, durante 24-48 horas a 37° C en placas de agar Sabouraud-TET. En tubos Ependorff limpios que contenían 0,5 ml de agua estéril, se depositó cuatro inóculos de células de cada cepa. Se realizó una dilución 1/100 y se contó en cámara de Neubauer el número de células en 5 cuadrados pequeños del campo microscópico, utilizando un aumento 10X. Para el conteo se usó un volumen de 10 μ l de la dilución de cada cultivo celular y el cálculo del número de células/ml se realizó utilizando siguiente

fórmula:

$$\text{Células/ml} = \text{células en 5 cuadrados pequeños} \times 5 \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

El número de células/ml fue estandarizado en los cultivos de todas las cepas analizadas y de sus respectivos duplicados, usando como referencia la menor concentración celular obtenida. Con todos los cultivos conteniendo aproximadamente $7,3 \times 10^8$ células/ml se realizó el procedimiento de extracción de ADNg convencional.

2.2) Extracción de ADNg usando perlas de vidrio. Este método corresponde a una modificación de la técnica descrita por Carvalho A. y cols., 2007 (24) realizada en nuestro laboratorio. La extracción de ADN usando este método se realizó a partir de un cultivo de células crecidas por 24 horas a 37°C en medio de cultivo Sabouraud líquido. El número de células fue estandarizado, como se indicó en el punto 2.1 y el sedimento celular obtenido fue resuspendido en 600 µl de tampón de lisis para hongos (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM), mezclados suavemente en vórtex por 30 s. Posteriormente, se adicionó 200 µl de perlas de vidrio (212-300 micrones) y se homogenizó vigorosamente esta mezcla en vórtex durante 5 minutos. Para extraer las proteínas, se agregó un volumen de 800 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente en vórtex durante 1 a 2 minutos hasta formar una emulsión. La fase acuosa se separó de la fase fenólica mediante centrifugación a 14.000 rpm por 5 minutos. El procedimiento de extracción de proteínas se repitió las veces que fue necesario. Con el objeto de extraer los restos de fenol, la fase acuosa se agitó una vez en vórtex por 1 a 2 minutos, con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Las fases acuosa y orgánica fueron separadas por centrifugación a 14.000 rpm por 5 minutos. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado, incubándolo a -20° C, con dos volúmenes (1 ml) de etanol absoluto frío. Finalmente, el ADN fue recuperado por centrifugación a 14.000 rpm por 5 minutos, y una vez seco, fue resuspendido en 30 a 50 µl de tampón TE-RNAsa, y almacenado a -20° C, hasta su cuantificación y dilución. La

purificación de ADNg de las 10 cepas estudiadas fue realizada en duplicado por un mismo operador.

2.3) Extracción de ADNg con cartas FTA[®] (Whatman). La extracción de ADN usando este método se realizó según las instrucciones del fabricante (<http://www.whatman.com>). Brevemente, una dilución adecuada de la cepa de levadura (determinada en esta tesis) fue depositada en la carta FTA y se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora. Una vez seca la membrana FTA, a partir de ella se obtuvo secciones circulares pequeñas de 1,2 mm de diámetro (discos), usando un cortador Harris Uni-core. La purificación de ADNg se realizó usando 1 disco de 1,2 mm perteneciente a cada cepa, los que fueron depositados separadamente en tubos de 0,2 ml. Estos discos fueron sumergidos durante 5 minutos en 200 μ l de reactivo de purificación FTA y agitados manualmente en forma muy suave. Se retiró el reactivo de purificación con micropipeta y este paso de lavado fue repetido dos veces más. Posteriormente, los discos fueron lavados dos veces con 200 μ l de tampón TE⁻¹ (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) de la misma forma señalada anteriormente. Los discos limpios fueron secados en incubador a 45° C por 15- 30 minutos, con lo cual quedaron listos para ser usados en la reacción de RAPD-PCR. De cada cepa analizada cuyas células fueron depositadas en una carta FTA individual, se obtuvo un disco de la periferia al cual se denominó disco Externo (E) y un disco central llamado disco Interno (I), los que fueron usados en las reacciones de RAPD-PCR como duplicados.

3) Cuantificación de ADN genómico de levaduras.

3.1) Método convencional. Para determinar la concentración y calidad de los ácidos nucleicos, obtenidos por el método convencional, se usó el método del mini gel de agarosa con asistencia de un programa computacional. Este método consistió en la corrida electroforética de las muestras en un gel de agarosa, cuya concentración varió entre 0,8 y 1,5%, de acuerdo a las necesidades. Como patrón se utilizó el ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind*III, a una concentración de 40 ng/ μ l. El gel se observó en transiluminador UV y se registró mediante fotografía

digital. Esta foto fue analizada haciendo uso del programa computacional 1D gel de Kodak, el cual permitió comparar la intensidad de fluorescencia de la banda de interés con las bandas del estándar y determinar la concentración de la muestra.

3.2) Método FTA. Este sistema de purificación no permite visualizar ni cuantificar fácilmente el ADN inmovilizado en el filtro una vez depositada la muestra, por lo tanto no se determinó la calidad del ADNg atrapado en el filtro ni se calculó el rendimiento del mismo por este método.

4) ADN polimórfico amplificado al azar, mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).

La realización de la técnica de RAPD-PCR involucra los siguientes pasos: i) purificación de ADNg por un método determinado, ii) realización de la PCR con el ADNg purificado usando partidores seleccionados, iii) Visualización y medición del tamaño de los amplicones producidos en la PCR, mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, iv) análisis y procesamiento de datos de los amplicones obtenidos en las diferentes cepas estudiadas, mediante asistencia de un programa computacional que permite la confección de un dendograma, en el cual se muestra las relaciones de similitud genética entre aislados.

Para llevar a cabo la técnica de RAPD-PCR con el ADNg de las 10 cepas estudiadas, con ambos métodos, se procedió a utilizar los siguientes componentes y condiciones de reacción:

4.1) ADN genómico. Para la determinación del perfil de bandas o genotipificación del ADN obtenido mediante el método de perlas de vidrio, se confeccionó una dilución del ADNg de cada aislado de levadura a una concentración de 10 pg/ μ l. Esta dilución se consiguió haciendo una primera dilución del ADN original a 1 ng/ μ l, seguido de una dilución 1/100 de la anterior. Posteriormente, cada reacción de RAPD-PCR fue realizada usando 100 pg totales de ADNg como molde, lo que se consideró como la condición estandarizada o de referencia de la técnica de RAPD-PCR. Adicionalmente, se usó 10 ng totales de ADNg como molde, una cantidad 100 veces mayor a la usada normalmente, con el propósito de evaluar los

resultados obtenidos con dicha modificación.

Para realizar la determinación del perfil de bandas o genotipificación del ADN obtenido mediante el método de cartas FTA[®], cada reacción de RAPD-PCR fue realizada reemplazando por agua el volumen correspondiente a ADN molde y depositando un disco FTA de 1,2 mm con ADN_g, extraído de la periferia de la carta [disco Externo (E)] o tomado del centro de la carta [disco Interno (I)].

4.2) Partidor. En este estudio se utilizaron dos partidores específicos para levaduras; un partidor de la serie operon llamado OPBA-13 y un partidor denominado CaBUO1, cuyas secuencias son: 5'AGGGCGAATG3' y 5'GGTGCGGGAA3', respectivamente.

4.3) Reacción de PCR para RAPD. Los tubos de PCR de 0,2 ml contenían los siguientes reactivos en 25 µl de reacción: tampón PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 100 pg (método convencional) ó 10 ng de ADN_g en solución o alternativamente 1 disco de 1,2 mm con ADN_g (método FTA), 100 µM de una mezcla equimolar de desoxiribonucleótidos dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Promega[™]), 2 mM de MgCl₂, 10 pMoles de partidor y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen[™]).

4.4) Programa de PCR. Una vez preparadas las muestras, los tubos de PCR fueron colocados en el termociclador y sometidos a 40 ciclos de: desnaturalización inicial a 95° C por 3 minutos, desnaturalización de ciclo a 94° C por 1 min, alineamiento a 35° C por 2 min, extensión del partidor a 72° C por 2 min y un paso de extensión final a 72° C por 5 min.

Las muestras obtenidas después de la reacción RAPD-PCR fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con Bromuro de etidio, como se describe en el punto 5. El conjunto de amplicones obtenido para cada cepa fue determinado usando una fotografía de cada gel corrido por electroforesis y estableciendo los tamaños de cada banda con ayuda del programa 1D gel de Kodak.

5) Electroforesis de ácidos nucleicos.

5.1) Electroforesis en geles de agarosa. Se realizó como lo describe Sambrook

et al. 1989 (25). La agarosa fue disuelta en tampón TAE pH 7,9 (40 mM Tris-HCl, 5 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA) o tampón TBE pH 8,0 (8,9 mM Tris-HCl pH 8,0, 8,9 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) por calentamiento hasta ebullición. Luego se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Cuando la solución alcanzó aproximadamente 50-55° C se depositó en una placa de acrílico provista de una peineta con espaciadores de 0,5 mm y se dejó gelificar a temperatura ambiente por 20 minutos. El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal que contenía tampón TAE con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se mezclaron en una proporción de 5:1 v/v con tampón de carga 6X (35% glicerol, 2% ficoll, 0,25% azul de bromofenol, tampón TBE 6X) y la electroforesis se corrió a un voltaje constante de 60 Volts, por 1-2 horas.

5.2) Visualización de ADN en geles de agarosa. Los geles de agarosa fueron observados en un transiluminador UV marca National Labnet Company, a una longitud de onda de 302 nm. Cada gel fue registrado tomando una foto con una cámara digital Olympus® modelo C-4040 200M, 7.5X, 4,1megapixel, complementada con el programa computacional Camedia®.

5.3) Determinación de tamaños moleculares. Para determinar el tamaño molecular de los fragmentos de ADN que constituían el grupo de amplicones de cada cepa de levadura estudiada y obtenido por RAPD-PCR, se usó como patrón el ADN escalera de 100 pares de bases, para lo cual se utilizó el programa computacional de análisis de imágenes 1D gel de Kodak®.

6) Análisis de la variabilidad genética obtenida mediante RAPD-PCR.

La variabilidad genética medida por la técnica de RAPD-PCR en las 10 cepas analizadas, fue evaluada utilizando el método de purificación convencional y el método FTA, y con cada uno se determinó los siguientes parámetros: conjunto de amplicones obtenidos para cada cepa con cada partidador, número de genotipos, coeficiente de similitud genética entre cepas (S_{AB}) e Índice de Error de Amplificación (IEA).

El coeficiente de Similitud (S_{AB}) determina la relación genética entre cepas

y varía entre 0 y 1, donde $S_{AB} = 1$ corresponde a cepas que son genéticamente idénticas y $S_{AB} = 0$ implica cepas que son genéticamente diferentes. Para obtener este coeficiente, los datos de número de amplicones y tamaño de los mismos, obtenidos con ambos partidores, para cada cepa, fueron transformados en matrices de ceros (0) y unos (1). Los datos así transformados fueron introducidos en el programa computacional TreeCon, con el cual se realizó el análisis de agrupamiento o *clusters*, cuyos resultados fueron representados gráficamente a través de un dendograma.

Para tener una estimación de la tasa de fracasos entre reacciones de amplificación que usan un mismo ADN blanco (reacciones que corresponden a pares muestra-duplicado), se calculó un Índice de Error de Amplificación (IEA), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Error de Amplificación (IEA)} = \frac{\text{Número de duplicados o pares diferentes obtenidos}}{\text{Número de duplicados o pares coincidentes totales esperados}}$$

Dicho índice varía entre 0 y 1, donde un IEA = 0 (cero) indica que no existe diferencias en los resultados de amplificación (número y tamaño de los amplicones obtenidos) entre una muestra y su respectivo duplicado. Por el contrario, un IEA = 1, representa la falta absoluta de coincidencia en los resultados de amplificación entre una muestra y su duplicado, en reacciones que usan un mismo ADNg como blanco.

RESULTADOS

1) Purificación de ADN genómico de levaduras usando el método convencional.

1.1) Estandarización del número de células de levaduras para la extracción de ADN genómico (ADNg).

Con el objeto de realizar el procedimiento de purificación de ADN partiendo del mismo número de células en cada preparación, se realizó un conteo del número de células por ml, utilizando una cámara de Neubauer. El conteo se realizó dos veces y se obtuvo un promedio para cada muestra. La **tabla 1** muestra los resultados de dicho procedimiento, donde se puede observar que el mayor número de células se obtuvo en la muestra de la cepa estándar Ca1001 (tabla 1) y el menor número de células lo presentó el duplicado de la cepa control Ca90029 (tabla1). El número de células de todas las muestras a purificar fue ajustado a la cantidad más baja obtenida en la cepa Ca90029, que presentó $7,3 \times 10^8$ células/ml (tabla1). Con todas las muestras ajustadas a este valor, se realizó la extracción de ADNg.

1.2) Purificación y cuantificación de ADN genómico de levaduras por el método convencional.

Se purificó ADNg de las 10 cepas de levadura usadas en este estudio, mediante el método de perlas de vidrio. La **figura 2** corresponde a un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, en el cual se muestran los resultados obtenidos después del procedimiento de purificación, el cual fue realizado en duplicado.

Como se observa en la figura 2 en todos los casos, excepto en el duplicado de la cepa Pb2-2 (carril 21), fue posible obtener ADNg de alto peso molecular y sin degradación, diferenciándose cada muestra sólo por la intensidad de cada banda, lo que representa diferencias en las concentraciones obtenidas en cada preparación.

Tabla 1: Resultados del conteo de células en cámara de Neubauer para la estandarización del número de células por muestra en el procedimiento de purificación de ADNg de levaduras.

Cepa de Levadura	Conteo1 (cél/ml x 10 ⁸)	Conteo2 (cél/ml x 10 ⁸)	Promedio (cél/ml x 10 ⁸)
SC5314	13,8	12,5	13,1
SC5314	11,3	19,2	15,2
Ca 90029	10,7	9,1	9,9
Ca 90029	4,5	10,2	7,3
Ca 1001	27,2	23,7	25,4
Ca 1001	20,4	15,3	17,8
PM17-11	11,9	12,6	12,3
PM17-11	7,3	9,3	8,3
Pa17-3	14,1	18,2	16,2
Pa17-3	4,8	11,2	8,0
Pb17-1	14,3	15,0	14,7
Pb17-1	11,4	15,6	13,5
Pc17-6	7,5	14,0	10,8
Pc17-6	7,9	11,4	9,6
PM2-7	16,8	16,2	16,5
PM2-7	20,0	22,6	21,3
Pb2-2	14,0	15,2	14,6
Pb2-2	8,0	13,8	10,9
Pc2-7	17,0	18,8	17,9
Pc2-7	18,2	26,0	22,1

En rojo se destaca el menor número de células obtenido y en negrita el mayor número de Células determinadas en cada cultivo.

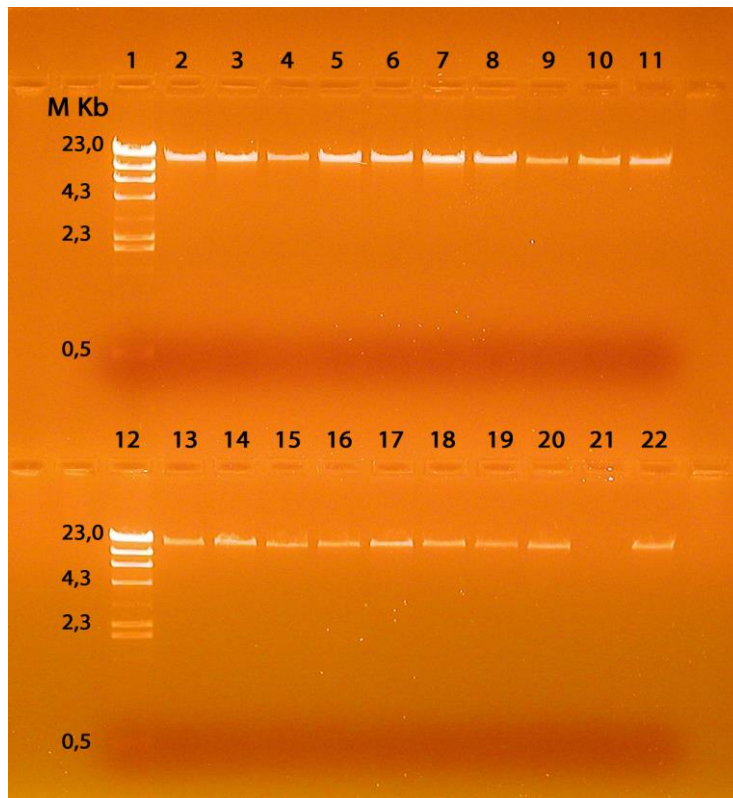


Figura 2: Gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X que muestra los resultados del procedimiento de purificación de ADNg de levaduras usando el método de extracción con perlas de vidrio. **Carriles 1 y 12:** 400 ng del marcador de tamaño molecular λ Hind III, **carriles 2 y 13:** 1 ul de ADNg de la cepa SC5314 y su duplicado, respectivamente, **Carriles 3 y 14:** 1 ul de ADNg de la cepa Ca90029, **carriles 4 y 15:** 1 ul de ADNg de la cepa Ca1001, **carriles 5 y 16:** 1 ul de ADNg de la cepa PM17-11, **carriles 6 y 17:** 1 ul de ADNg de la cepa Pa17-3, **carriles 7 y 18:** 1 ul de ADNg de la cepa Pb17-1, **carriles 8 y 19:** 1 ul de ADNg de la cepa Pc17-6, **carriles 9 y 20:** 1 ul de ADNg de la cepa PM2-7, **carriles 10 y 21:** 1 ul de ADNg de la cepa Pb2-2, **carriles 11 y 22:** 1 ul de ADNg de la cepa Pc2-7.

La concentración de ADNg de cada muestra fue calculada usando el método del mini gel de agarosa, acoplado al análisis de la imagen fotográfica del gel con el programa computacional 1D de Kodak. La **tabla 2** resume los resultados del proceso de cuantificación del ADNg de levaduras. Esta tabla muestra que existe bastante variación en la concentración de ADNg obtenido entre la preparación 1 y su respectivo duplicado para todas las cepas, obteniéndose siempre mayor concentración de ADNg en la preparación 1 que en el duplicado. La mayor concentración de ADNg y rendimiento promedio se obtuvo en la muestra de la cepa estándar Ca90029, que alcanzó a 93 ng/ul y 9,3 ug totales, respectivamente. La cepa que mostró menor concentración y rendimiento fue la cepa Pb2-2, con 34 ng/ul y 3,4 ug totales de ADN, respectivamente (tabla 2). Con todas las muestras cuantificadas se procedió a realizar diluciones a concentraciones finales de 1 ng/ul y 10 pg/ul de ADNg, las que fueron posteriormente utilizadas en RAPD-PCR.

1.3) Amplificación al azar de ADN polimórfico, mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR), usando ADNg purificado por el método convencional.

1.3.1) Obtención de amplicones usando el partidor OPBA-13 y 100 pg totales por reacción. La **figura 3** muestra un gel representativo con los resultados de RAPD-PCR para 9 de los 10 aislados de levaduras analizados con el partidor OPBA13 y 100 pg totales de ADN blanco por reacción. En el carril 2, correspondiente al control negativo sin ADNg (agua en lugar de ADNg) se observa amplificación inespecífica, con algunas bandas discretas muy tenues cuyos tamaños no coinciden con los amplicones observados en los carriles que contienen ADNg de las cepas estudiadas. En el resto de los carriles se observa un patrón de bandas similar para cada muestra y su duplicado. La **tabla 3** muestra los amplicones obtenidos con el partidor OPBA13 considerando las 10 cepas analizadas. Se obtienen bandas de 1800, 650, 530, 400 y 250 pares de bases (pb) que se observan en todas las muestras de las cepas estudiadas (M) y en sus

Tabla 2: Resultados del proceso de cuantificación del ADNg de levaduras obtenido usando el método de extracción con perlas de vidrio.

Cepa	Preparación 1 (ng/ul)	Duplicado (ng/ul)	Promedio (ng/ul)	Rendimiento promedio (ug/muestra)
SC5314	102,0	40,0	71,0	7,1
Ca 90029	113,0	73,0	93,0	9,3
Ca 1001	54,0	33,0	43,5	4,4
PM17-11	114,0	31,0	72,5	7,3
Pa17-3	102,0	54,0	78,0	7,8
Pb17-1	136,0	38,0	87,0	8,7
Pc17-6	101,0	27,0	64,0	6,4
PM2-7	44,0	45,0	44,5	4,5
Pb2-2	67,0	1,0*	34,0	3,4
Pc2-7	86,0	47,0	66,5	6,7
Promedio	91,9	43,8	--	--

* Se asumió una concentración de 1ng/ul, que corresponde al límite de detección del método. En negrita

Se destaca el mayor promedio y rendimiento y en rojo se destaca el menor promedio y rendimiento obtenido con este método de purificación.

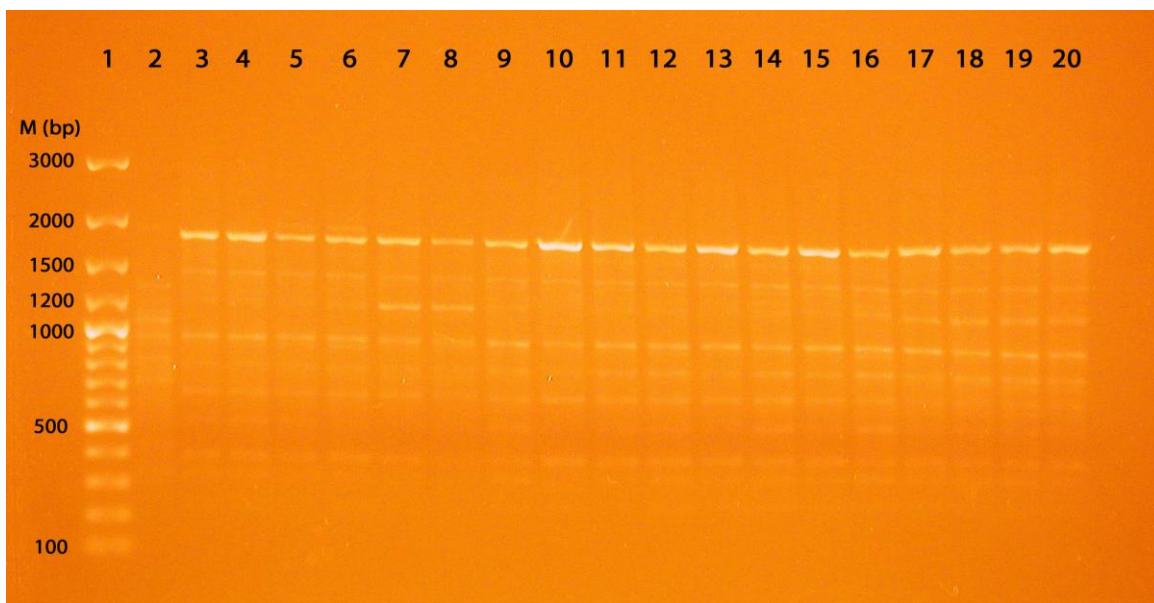


Figura 3: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra el perfil de bandas obtenido con el partidor OPBA-13 y 100 pg totales de ADN_g por reacción, purificado por el método convencional. **Carril 1:** 500 ng del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb., **carril 2:** control sin ADN_g, **carriles 3 y 4:** 10 pg totales de ADN_g de la cepa SC5314 y su respectivo duplicado, **carriles 5 y 6:** 100 pg totales de la cepa Ca90029, **carriles 7 y 8:** 100 pg totales de la cepa Ca1001, **carriles 9 y 10:** 100 pg totales de la cepa PM17-11, **carriles 11 y 12:** 100 pg totales de la cepa Pa17-3, **carriles 13 y 14:** 100 pg totales de la cepa Pb17-1, **carriles 15 y 16:** 100 pg totales de la cepa Pc17-6, **carriles 17 y 18:** 100 pg totales de la cepa PM2-7, **carriles 19 y 20:** 100 pg totales de la cepa Pb2-2.

Tabla 3: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor OPBA13 y 100 pg totales de ADNg de todas las cepas analizadas en el estudio, cuyo ADN fue purificado por el método convencional.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7	
	M	D♦	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
1800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
650	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
530	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N° Bandas ausentes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Amplicones = Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; M = muestra; D = Duplicado; ♦ = en todas las cepas el duplicado corresponde a una preparación de ADN distinta, realizada por el mismo operador en forma simultánea; + = banda presente; - = banda ausente

respectivos duplicados (D), que corresponden a ADNg obtenido por purificación en paralelo con la muestra original.

El Índice de Error de Amplificación (IEA) calculado para el RAPD-PCR realizado en las 10 cepas analizadas, utilizando el partidor OPBA13 y 100 pg totales de ADNg blanco en cada reacción, corresponde a 0 (cero), ya que de los 10 pares de reacciones de amplificación considerados (Muestra-Duplicado), ninguno mostró diferencias en los amplicones obtenidos.

1.3.2) Obtención de amplicones usando el partidor OPBA-13 y 10 ng totales por reacción. La **figura 4** muestra un gel representativo con el perfil de bandas obtenido para 9 de los 10 aislados de levadura usando el partidor OPBA-13 y 10 ng totales de ADNg como molde en la reacción de PCR. La **tabla 4** resume los resultados del gel y muestra todos los amplicones obtenidos. Se puede observar que en esta condición, 5 reacciones, que incluyen los aislados PM17-11, Pa17-3 y Pc2-7, no presentaron amplificación. Los 7 aislados restantes, con su respectivo duplicado, mostraron amplificación de bandas de 1800, 400 y 250 pb. Usando este partidor y 10 ng totales de ADN blanco en la reacción de PCR, se observa que la mayor parte de las cepas presenta 1 o 2 bandas ausentes. Al comparar con el número total de amplicones obtenido con el partidor OPBA13 y 100pg totales, usado como condición de referencia en el método convencional, el número de bandas ausentes aumenta a 3 y 4 (tabla 3).

El Índice de Error de Amplificación (IEA) calculado para el RAPD-PCR realizado en las 10 cepas analizadas utilizando el partidor OPBA13 y 10 ng totales de ADNg blanco en cada reacción, corresponde a 0,43, ya que de 7 pares de reacciones de amplificación efectivas consideradas (Muestra-Duplicado) 3 presentaron diferencias en los amplicones obtenidos.

1.3.3) Obtención de amplicones con el partidor CaBUO1 y 100 pg totales por reacción. En la **figura 5** se observa un gel representativo que muestra los amplicones obtenidos en 9 de 10 cepas, usando el partidor CaBUO1 en la condición de referencia. En el carril 9, que corresponde a la muestra de ADNg de

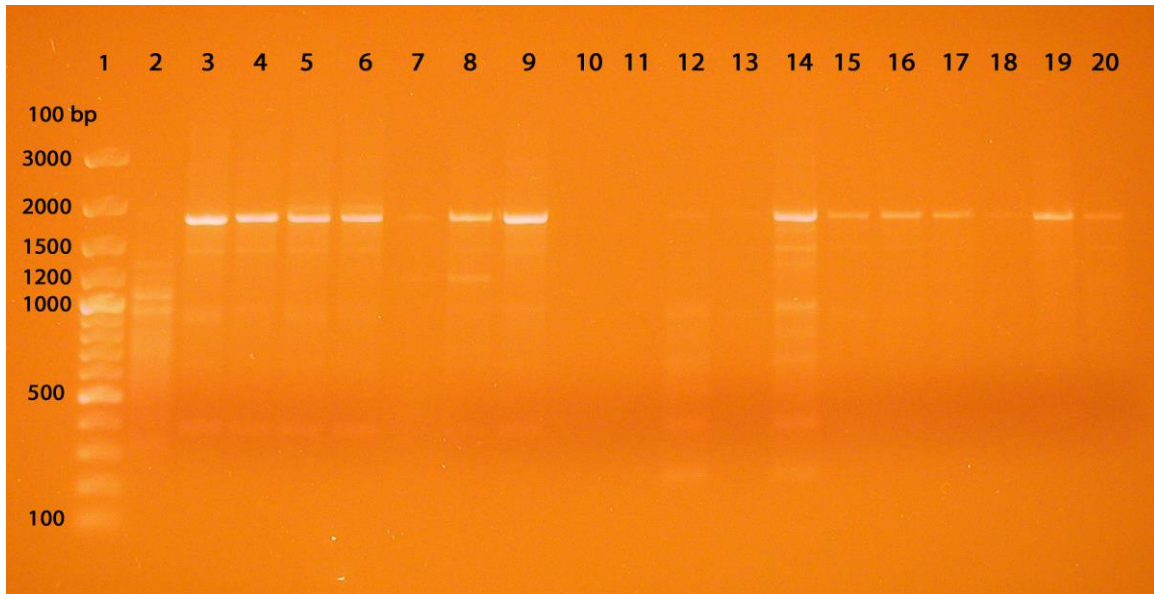


Figura 4: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra el perfil de bandas obtenido con el partidor OPBA-13 y 10 ng totales de ADNg por reacción, purificado por el método convencional. **Carril 1:** 500 ng del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb., **carril 2:** control sin ADNg, **carriles 3 y 4:** 10 ng totales de ADNg de la cepa SC5314 y su respectivo duplicado, **carriles 5 y 6:** 10 ng totales de la cepa Ca90029, **carriles 7 y 8:** 10 ng totales de la cepa Ca1001, **carriles 9 y 10:** 10 ng totales de la cepa PM17-11, **carriles 11 y 12:** 10 ng totales de la cepa Pa17-3, **carriles 13 y 14:** 10 ng totales de la cepa Pb17-1, **carriles 15 y 16:** 10 ng totales de la cepa Pc17-6, **carriles 17 y 18:** 10 ng totales de la cepa PM2-7, **carriles 19 y 20:** 10 ng totales de la cepa Pb2-2.

Tabla 4: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor OPBA13 y 10 ng totales de ADNg de todas las cepas analizadas en el estudio, cuyo ADN fue purificado por el método convencional.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7		
	M	D♦	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	
1800	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	NA
400	+	+	+	+	-	+				+	-	+	+	+	-	-	+	-			
250	-	-	-	-	-	-				+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
N° Bandas ausentes	1	1	1	1	2	1				0	2	1	1	1	2	2	1	2			

*Amplicones = Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; M = muestra; D = Duplicado; ♦ = en todas las cepas el duplicado corresponde a una preparación de ADN distinta, realizada por el mismo operador en forma simultánea con la muestra; NA = no hay reacción de amplificación; + = banda presente; - = banda ausente.

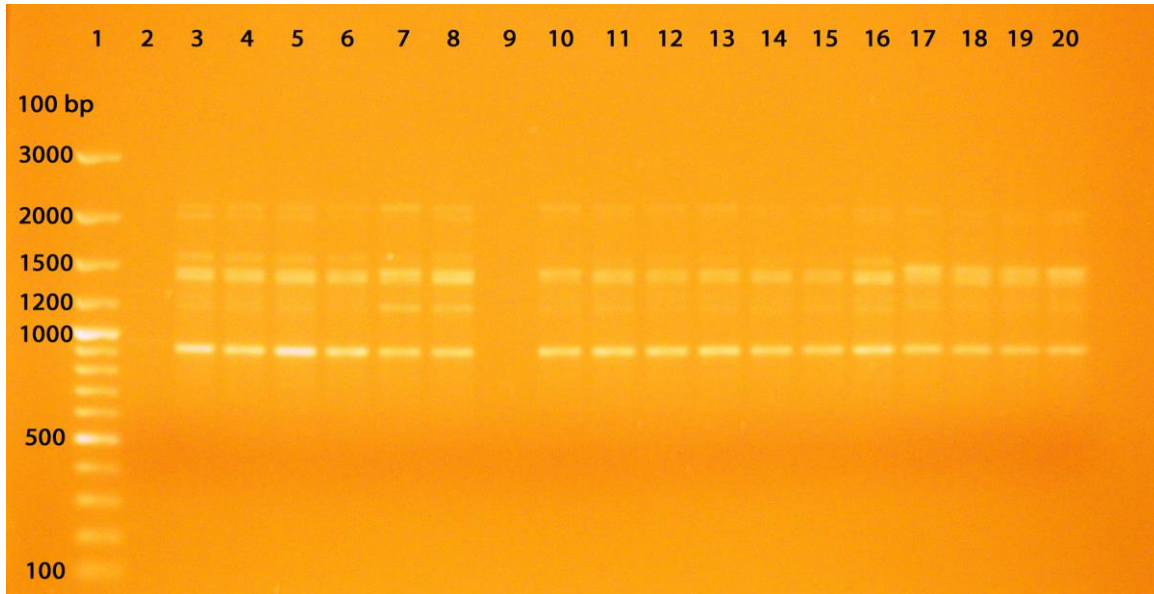


Figura 5: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra el perfil de bandas obtenido con el partidor CaBUO1 y 100 pg totales de ADN_g por reacción, purificado por el método convencional. **Carril 1:** 500 ng del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb., **carril 2:** control sin ADN_g, **carriles 3 y 4:** 100 pg totales de ADN_g de la cepa SC5314 y su respectivo duplicado, **carriles 5 y 6:** 100 pg totales de la cepa Ca90029, **carriles 7 y 8:** 100 pg totales de la cepa Ca1001, **carriles 9 y 10:** 100 pg totales de la cepa PM17-11, **carriles 11 y 12:** 100 pg totales de la cepa Pa17-3, **carriles 13 y 14:** 100 pg totales de la cepa Pb17-1, **carriles 15 y 16:** 100 pg totales de la cepa Pc17-6, **carriles 17 y 18:** 100 pg totales de la cepa PM2-7, **carriles 19 y 20:** 100 pg totales de la cepa Pb2-2.

la cepa PM17-11 no se observó amplificación. Lo mismo sucedió con las muestras de ADNg pertenecientes a la cepa Pc2-7 (no mostrado en el gel de la figura 4).

En la **tabla 5** se resume los resultados de RAPD-PCR para todas las muestras en esta condición, en la cual se obtienen amplicones de 2100, 2000, 1600, 1400, 1330, 1200 y 900 pb. Las muestras y duplicados de las cepas PM2-7 y Pb2-2 presentan ausencia de la banda de 1600 pb, lo que se consideró como una diferencia en el perfil de bandas para estas cepas. El resto de las muestras, con la excepción de la cepa estándar Ca90029, presentan el mismo número y tamaño de productos PCR (tabla 5).

El Índice de Error de Amplificación (IEA) calculado para el RAPD-PCR realizado en las 10 cepas analizadas utilizando el partidador CaBUO1 y 100 pg totales de molde en cada reacción corresponde a 0,13, ya que de 8 pares de reacciones de amplificación efectivas consideradas (Muestra-Duplicado) 1 mostró diferencias en los amplicones obtenidos.

1.3.4) Obtención de amplicones con el partidador CaBUO1 y 10 ng totales por reacción. La **figura 6** muestra un gel de agarosa con los amplicones obtenidos al usar el partidador CaBUO1 y una mayor cantidad total de ADN blanco en cada reacción PCR: 10 ng totales. En general, se observa una menor calidad en la amplificación en todas las muestras donde hubo reacción y en los carriles correspondientes a las muestras 7, 10 y 13, de las cepas Ca1001, PM17-11 y Pb17-1 respectivamente, se observó ausencia de productos PCR. En esta foto del gel no se aprecian los productos PCR de los carriles 18 al 20 (cepas PM2-7 y Pb2-2), pero en otras fotos, con más contraste, aparecen las bandas de 1330 y 900 pb (no mostrado). La **tabla 6** resume los resultados para todas las cepas analizadas. Los amplicones obtenidos en estas condiciones son tres bandas de 2000, 1330 y 900 pb. Estos resultados difieren notablemente de los obtenidos cuando se usan 100 pg totales de ADNg como blanco (comparar con la tabla 5).

El Índice de Error de Amplificación (IEA) para las 10 cepas analizadas con el partidador CaBUO1 y 10 ng totales por reacción es de 0,67, ya que de 6 pares de

Tabla 5: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y 100 pg totales de ADNg de todas las cepas analizadas en el estudio, cuyo ADN fue purificado por el método convencional.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7		
	M	D♦	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	
2100	+	+	+	+	+	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	NA
2000	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1600	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-			
1400	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1330	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1200	+	+	+	-	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
900	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
N° Bandas ausentes	0	0	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1		

*Amplicones = Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; M = muestra; D = Duplicado; ♦ = en todas las cepas el duplicado corresponde a una preparación de ADN distinta, realizada por el mismo operador en forma simultánea con la muestra; NA = no hay reacción de amplificación; + = banda presente; - = banda ausente.

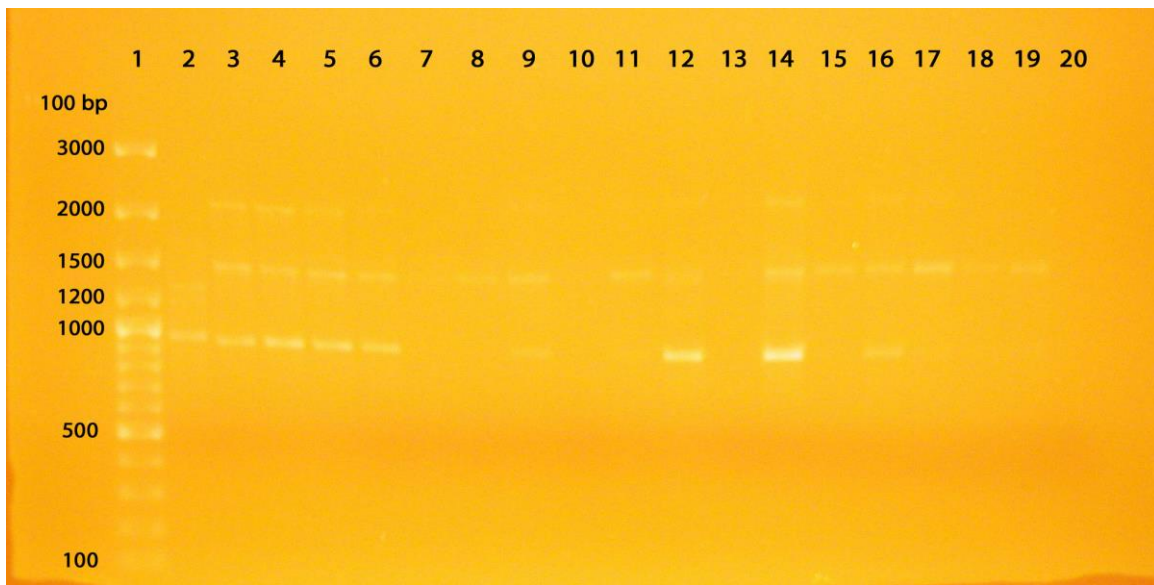


Figura 6: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra el perfil de bandas obtenido con el partidor CaBUO1 y 10 ng totales de ADN_g por reacción, purificado por el método convencional. **Carril 1:** 500 ng del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb., **carril 2:** control sin ADN_g, **carriles 3 y 4:** 10 ng totales de ADN_g de la cepa SC5314 y su respectivo duplicado, **carriles 5 y 6:** 10 ng totales de la cepa Ca90029, **carriles 7 y 8:** 10 ng totales de la cepa Ca1001, **carriles 9 y 10:** 10 ng totales de la cepa PM17-11, **carriles 11 y 12:** 10 ng totales de la cepa Pa17-3, **carriles 13 y 14:** 10 ng totales de la cepa Pb17-1, **carriles 15 y 16:** 10 ng totales de la cepa Pc17-6, **carriles 17 y 18:** 10 ng totales de la cepa PM2-7, **carriles 19 y 20:** 10 ng totales de la cepa Pb2-2.

Tabla 6: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y 10 ng totales de ADNg de todas las cepas analizadas en el estudio, cuyo ADN fue purificado por el método convencional.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7	
	M	D♦	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D
2000	+	+	+	+	NA	-	+	NA	-	+	NA	+	-	+	+	-	-	-	NA	NA
1330	+	+	+	+		+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+		
900	+	+	+	+		-	+		+	+		+	-	+	+	+	-	+		
N° Bandas ausentes	0	0	0	0		2	0		1	0		0	2	0	0	1	2	1		

*Amplicones = Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; M = muestra; D = Duplicado; ♦ = en todas las cepas el duplicado corresponde a una preparación de ADN distinta, realizada por el mismo operador en forma simultánea con la muestra; NA = no hay reacción de amplificación; + = banda presente; - = banda ausente.

reacciones de amplificación efectivas consideradas en el cálculo, 4 de ellas presentaron diferentes amplicones.

1.3.5) Análisis de agrupamiento a partir de ADNg obtenido por el método convencional con el partidor OPBA13 y 100 pg totales por reacción. Los resultados de amplificación usando el partidor OPBA13 y 100 pg totales de ADNg por reacción, revelaron que todas las cepas analizadas mostraron el mismo perfil de bandas, lo cual significa que son genéticamente similares y todas pueden ser ordenadas en un solo agrupamiento (o *cluster*), con un coeficiente de similitud igual a 1 ($S_{AB} = 1$). Para este análisis no se muestra el dendograma respectivo, ya que el programa TreeCon no construye la figura cuando las cepas no muestran diferencias.

1.3.6) Análisis de agrupamiento a partir de ADNg obtenido por el método convencional con el partidor OPBA13 y 10 ng totales por reacción. La figura 7 muestra el dendograma obtenido usando el partidor OPBA13 y 10 ng totales de ADNg por reacción PCR. Este análisis separa las cepas estudiadas en tres grupos, cada uno correspondiente a un genotipo distinto. El genotipo 1 estaría conformado por las cepas SC5314, Pb2-2, Pc17-6, Ca90029, Ca1001 y PM17-11; el genotipo 2 por las cepas Pa17-3 y Pb17-1; y el genotipo 3 por las cepas PM2-7, Pb2-2, Ca1001 y Pb17-1. Notablemente, esta condición de RAPD-PCR separa cepas que son muestra y duplicado, generándose paradojas tales como que una muestra de un mismo ADNg y su duplicado tengan dos genotipos diferentes.

1.3.7) Análisis de agrupamiento a partir de ADNg obtenido por el método convencional con el partidor CaBUO1 y 100 pg totales por reacción. En la figura 8 se observa el dendograma construido con los resultados de RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y 100 pg totales de ADNg por reacción, usado como referencia del método convencional. De acuerdo a esta figura, las cepas Pa17-3, Ca1001, PM17-11, SC5314, Ca90029, Pb17-1 y Pc17-6 presentan el genotipo 1; la muestra duplicada de la cepa Ca90029 aparece en un grupo distinto con el

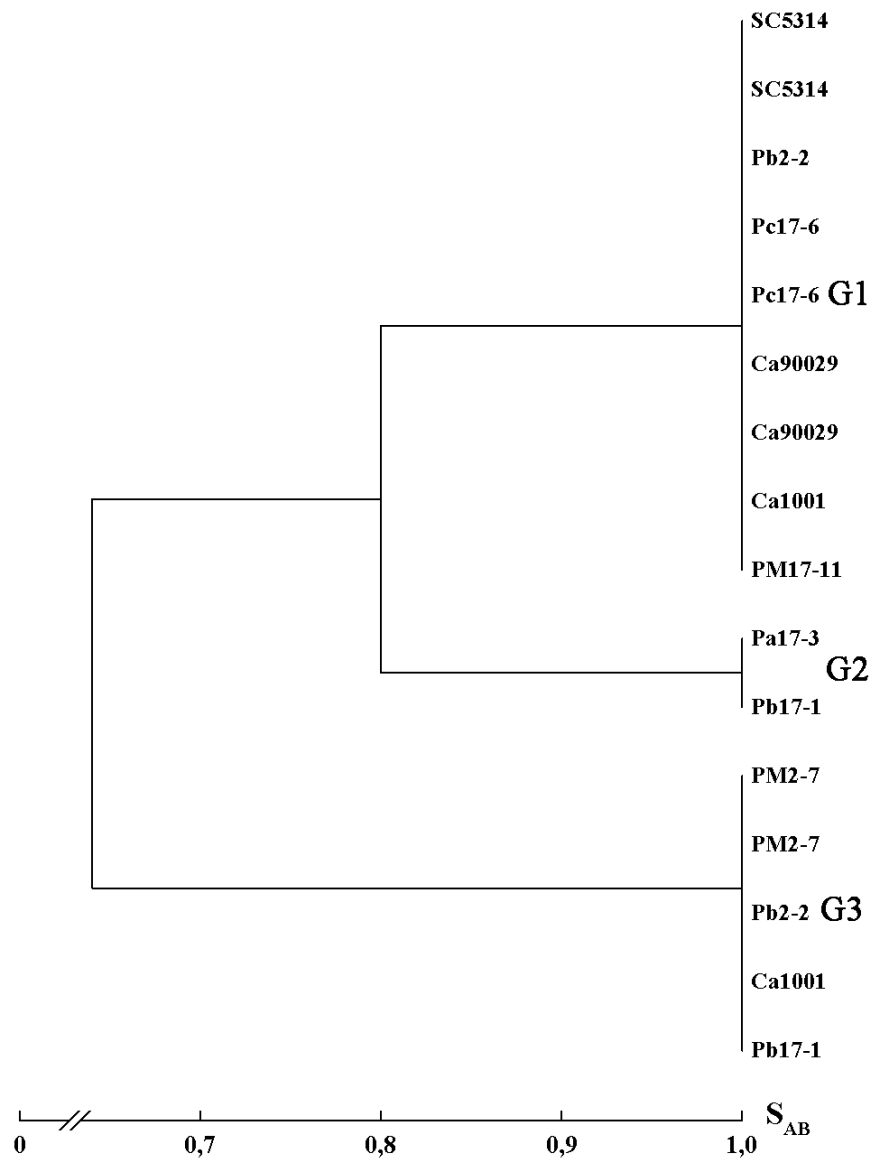


Figura 7: Dendrograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor OPBA13 y 10 ng totales de ADN_g de cada cepa analizada, purificado por el método convencional. S_{AB} = coeficiente de similitud genética entre cepas.

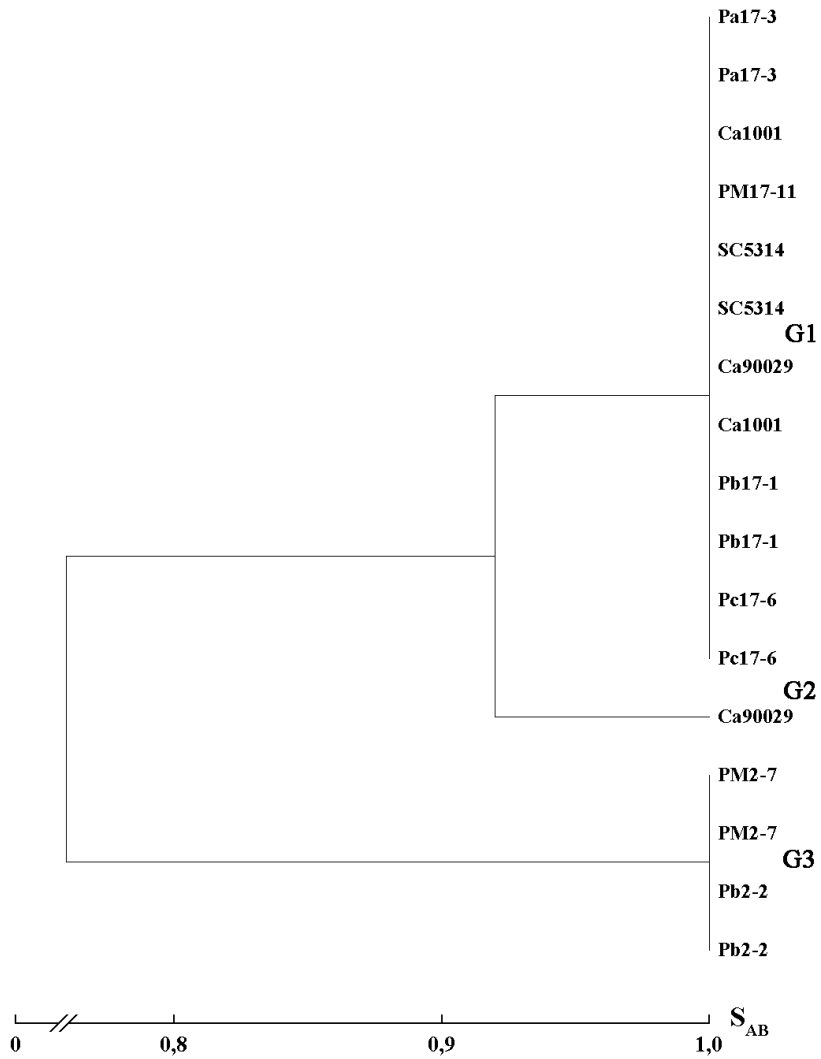


Figura 8: Dendrograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y 100 pg totales de ADNg de cada cepa analizada, purificado por el método convencional. S_{AB} = coeficiente de similitud genética entre cepas.

genotipo 2 y las cepas PM2-7 y Pb2-2 conforman el genotipo 3. La separación de las muestras de la cepa Ca90029 en dos grupos con distinto genotipo se debe a la ausencia de una banda en el perfil del duplicado (tabla 5). Sin embargo, a pesar de esta inconsistencia, se puede considerar que en estas condiciones de amplificación existirían sólo dos *clusters*, por lo cual el genotipo 2 sería consecuencia de un artefacto técnico menor. Esto se sustenta en que el IEA calculado es bajo, muy cercano a cero (0,13).

1.3.8) Análisis de agrupamiento a partir de ADNg obtenido por el método convencional con el partidor CaBUO1 y 10 ng totales por reacción. La figura 9 muestra los resultados del análisis de *cluster* para los amplicones obtenidos usando el partidor CaBUO1 y 10 ng totales de ADNg por reacción. Se distinguen tres genotipos: un genotipo 1 común a las cepas SC5314, PM2-7, Pb17-1, Pc17-6, Ca90029, PM17-11, y Pa17-3; un genotipo 2 conformado por las cepas Pb2-2, Pa17-3 y PM2-7 y un genotipo 3 constituido por las cepas Pb2-2, Ca1001 y Pc17-6. En estas condiciones también ocurre separación de muestras de ADNg que son muestra y duplicado de una misma cepa, presentando los aislados PM2-7, Pc17-6, Pa17-3, Pb2-2 y Pa17-3 dos genotipos simultáneamente, lo cual es inconsistente con este tipo de análisis. El alto valor del IEA calculado sostiene estos resultados (0,67).

2) Método FTA: purificación de ADNg de levaduras usando cartas FTA Whatman®.

2.1) Determinación del número de células de levaduras necesario para obtener un patrón de RAPD-PCR usando las cartas FTA. Estos experimentos fueron realizados usando la cepa estándar de la especie *C. albicans* Ca90029 y el partidor CaBUO1. Debido a que por el método convencional usamos cantidades de ADN blanco tan bajas como 100 pg totales por reacción, decidimos probar discos FTA provenientes de cartas impregnadas con las siguientes

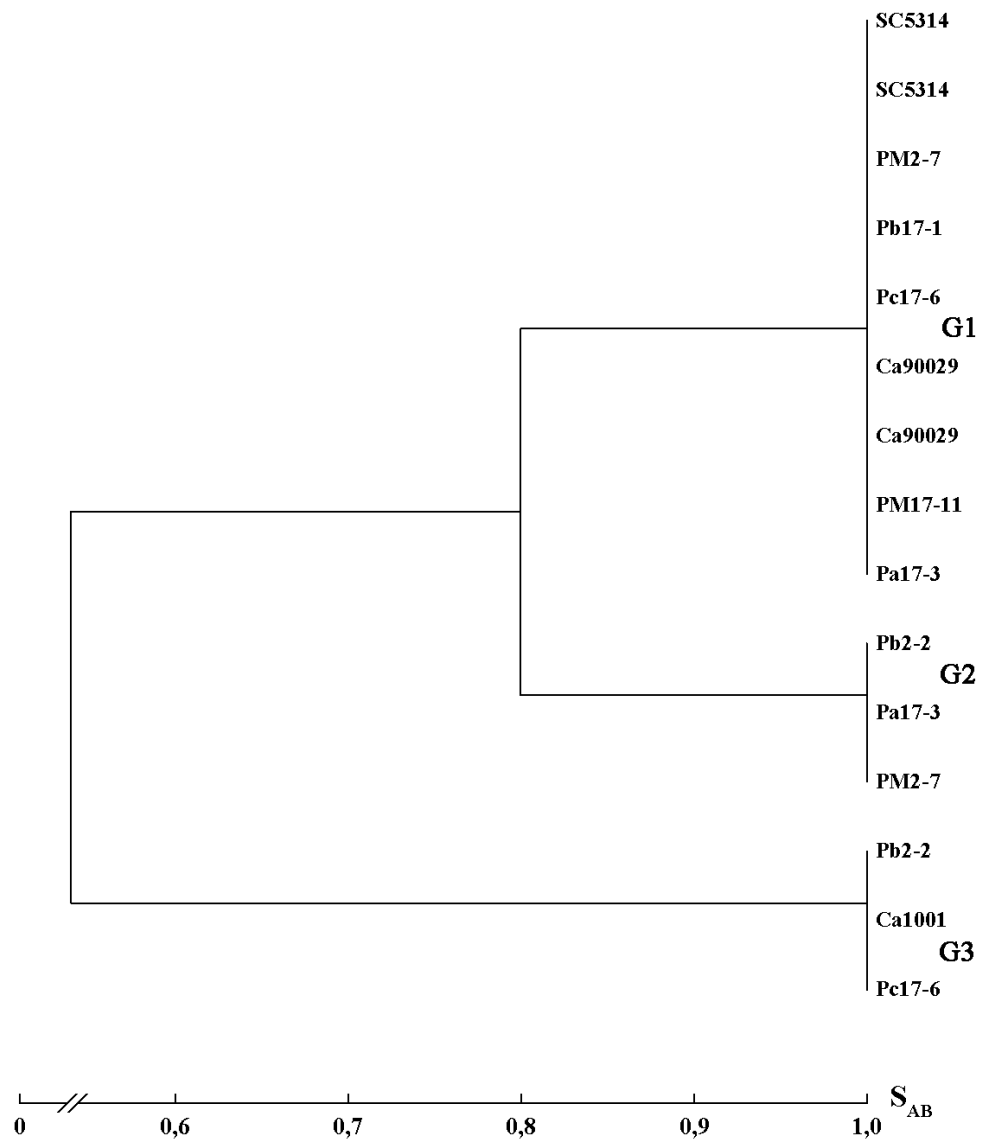


Figura 9: Dendrograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y 10 ng totales de ADNg de cada cepa analizada, purificado por el método convencional. S_{AB} = coeficiente de similitud genética entre cepas.

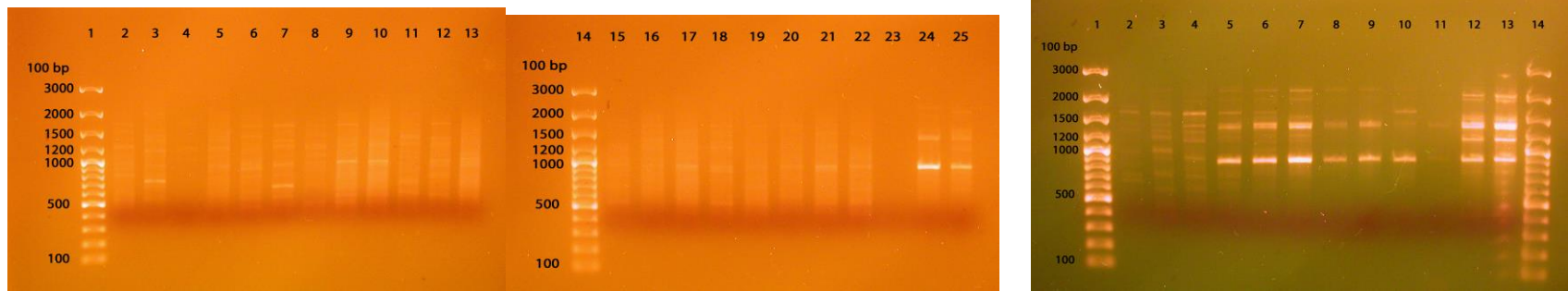
cantidades de células: 10, 50, 250, 500, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^8 células. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **figura 10A**, donde se aprecia que con un disco FTA proveniente de una carta impregnada con 1×10^8 células aparece un patrón de amplicones aproximadamente similar, pero no igual, al determinado por el método convencional con el mismo partidor (figura 9A, carril 24), el cual consta de 7 bandas (tabla 5). Las otras cantidades de células empleadas no muestran un patrón de bandas reconocibles por el método convencional y sólo se aprecia amplificación inespecífica y algunas bandas discretas muy tenues que no corresponden con el tamaño esperado de amplicones producido por el partidor CaBUO1.

Debido a que en el experimento anterior no se incluyó la cantidad correspondiente a 1×10^7 células, se realizó un nuevo experimento en el cual las cartas FTA fueron impregnadas con 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y $2,3 \times 10^8$ células. La **figura 10B** muestra que con discos provenientes de cartas impregnadas con 1×10^7 células, se obtiene el patrón de amplicones esperado (figura 9B, carriles 6 y 7). Discos provenientes de cantidades menores (carriles 4 y 5 de la figura 9B) o mayores (carriles 8 al 11 en la figura 9B) no muestran el grupo de amplicones esperado.

2.2) Amplificación al azar de ADN polimórfico, mediante reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR), a partir de ADNg aislado por el método FTA.

Se realizó RAPD-PCR con las mismas concentraciones de reactivos y condiciones de PCR que las empleadas con el método convencional, excepto que en lugar de depositar 10 μ l de ADNg a una concentración de 10 pg/ μ l (100 pg totales) se usó un disco de 1,2 mm obtenido de una carta FTA, en la cual se había depositado previamente 1×10^7 células de la cepa a analizar.

2.2.1) Obtención de amplicones con el partidor OPBA13. La **figura 11** muestra un gel representativo en el cual se observan los amplicones obtenidos con el



A

B

Figura 10: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra los perfiles de amplificación por RAPD-PCR, con el partidor CaBUO1, usando distintas cantidades de células de la cepa Ca 90029.

A) Carriles 1 y 14: 500 ng del marcador de tamaño molecular 100 pb, **carriles 2 y 3:** discos Externo (E) e Interno (I) respectivamente, proveniente de una carta FTA sin ADNg, **carriles 4 y 5:** discos E e I de una carta FTA impregnada con 1×10^1 células, **carriles 6 y 7:** discos E e I de una carta FTA con 5×10^1 células, **carriles 8 y 9:** discos E e I de una carta con $2,5 \times 10^2$ células, **carriles 10 y 11:** discos E e I de una carta con 5×10^2 células, **carriles 12 y 13:** discos E e I de una carta con 1×10^3 células, **carriles 15 y 16:** discos E e I de una carta con 5×10^3 células, **carriles 17 y 18:** discos E e I de una carta con 1×10^4 células, **carriles 19 y 20:** discos E e I de una carta con 1×10^5 células, **carriles 21 y 22:** discos E e I de una carta con 1×10^6 células, **carriles 23 y 24:** discos E e I de una carta con 1×10^8 células, **carril 25:** reacción con 100 pg totales de ADNg de la cepa Ca1001 purificado por el método convencional.

B) Carriles 1 y 14: 500 ng de ADN del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb, **carriles 2 y 3:** discos E e I de una carta FTA sin ADNg, **carriles 4 y 5:** discos E e I de una carta con 1×10^6 células, **carriles 6 y 7:** discos E e I de una carta con 1×10^7 células, **carriles 8 y 9:** discos E e I de una carta con 1×10^8 células, **carriles 10 y 11:** discos E e I de una carta con $2,3 \times 10^8$ células, **carriles 12 y 13:** reacciones con 100 pg totales de ADNg de la cepa Ca1001 purificado por el método convencional.

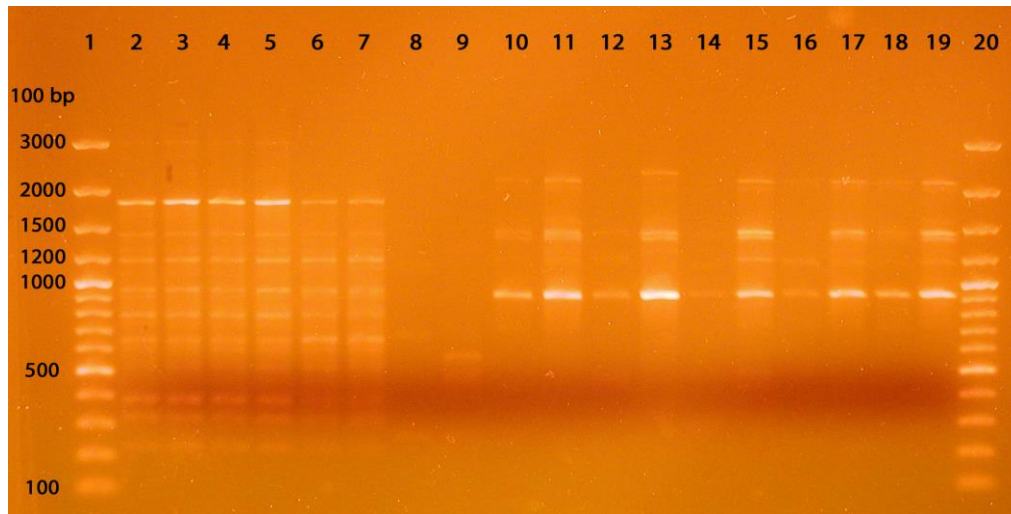


Figura 11: Gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X, que muestra los amplicones obtenidos con los partidores OPBA13 y CaBUO1, usando ADN_g purificado por el método FTA. Cada carta FTA fue previamente manchada con 1×10^7 células. **Carriles 1 y 20:** 500 ng de ADN del marcador de tamaño molecular escalera de 100 pb, **carriles 2 y 3:** discos Externo (E) e Interno (I) respectivamente, proveniente de una carta impregnada con ADN_g de la cepa Pb2-2, **carriles 4 y 5:** discos E e I con ADN_g de la cepa Pc2-7, **carriles 6 y 7:** muestra y duplicado de reacciones con ADN_g de la cepa Ca1001 purificado por el método convencional, **carriles 8 y 9:** discos E e I sin ADN_g, **carriles 10 y 11:** discos E e I con ADN_g de la cepa SC5314, **carriles 12 y 13:** discos E e I con ADN_g de la cepa Ca90029, **carriles 14 y 15:** discos E e I con ADN_g de la cepa Ca1001, **carriles 16 y 17:** discos E e I con ADN_g de la cepa PM17-11, **carriles 18 y 19:** discos E e I con ADN_g de la cepa Pa17-3.

partidor OPBA13, usando discos FTA de 1,2 mm con ADN_g de algunas de las cepas estudiadas. En los carriles 2, 3 y 4, 5 se aprecia un patrón de amplicones similar obtenido usando discos externos e internos provenientes de una carta FTA con ADN_g de las cepas Pb2-2 y Pc2-7. Sin embargo, este perfil no es idéntico al obtenido con ADN_g obtenido por el método convencional, mostrado en duplicado en los carriles 6 y 7 del mismo gel.

La **tabla 7** resume los resultados de amplificación con el partidor OPBA13 para las 10 cepas analizadas. En estas condiciones se obtienen amplicones de 1800, 980, 950, 800, 700, 530, 500 y 250 pb. De todas estas bandas, las de 980 y 500 pb son amplicones que pueden considerarse inestables ya que aparecen sólo en dos cepas y no en el duplicado respectivo de dicha cepa. Al comparar con los amplicones obtenidos con el método convencional, las bandas de 980, 950, 800 y 700 corresponden a fragmentos nuevos que sólo se amplifican con este método. Las bandas de 650 y 400 pb obtenidas con el otro método (tabla 3) no se amplificaron con los discos FTA y el partidor OPBA13.

Con esta metodología el índice de error de amplificación (IEA) calculado fue de 0,55, ya que de 9 pares de reacciones de amplificación efectivas consideradas, 5 mostraron diferencias en el perfil de bandas.

2.2.2) Obtención de amplicones con el partidor CaBUO1. En los carriles 10 al 19, del gel de la **figura 11**, se muestra en forma sucesiva los amplicones obtenidos con el partidor CaBUO1 usando discos externos e internos de una carta FTA manchada con ADN_g de las cepas SC5314, Ca90029, Ca1001, PM17-11 y Pa17-3, respectivamente. Se observa que sólo los amplicados de la cepa SC5314 (carriles 10 y 11) muestran coincidencia en el patrón de bandas entre duplicados. Para todas las cepas mostradas en este gel, el perfil de amplicones no es coincidente con el obtenido por el método convencional (tabla 5).

La **tabla 8** resume los resultados de amplificación con el partidor CaBUO1 para las 10 cepas analizadas. Se observa amplificación de fragmentos de 2150, 2100, 2000, 1600, 1470, 1400, 1330, 1220, 1200, 1000 y 900 pb. De todos estos

Tabla 7: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor OPBA13 y discos de 1,2 mm Externo (E) e Interno (I) de una carta impregnada con ADN_g de las diferentes cepas estudiadas, purificado por el método FTA.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7	
	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I
1800	-	+	NA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
980	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
950	+	-		-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
800	-	+		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
700	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
530	-	+		-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
500	-	-		-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
250	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
N° Bandas ausentes	6	2		3	6	4	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	

* Amplicones= Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; E = disco Externo de 1,2 mm obtenido de la periferia de la carta FTA; I = disco Interno de 1,2 mm obtenido del centro de la carta FTA; NA = no hay reacción de amplificación; + = banda presente; - = banda ausente.

Tabla 8: Amplicones obtenidos mediante RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y discos de 1,2 mm Externo (E) e Interno (I) de una carta impregnada con ADNg de las diferentes cepas estudiadas, purificado por el método FTA.

Amplicones* (pb)	SC5314		Ca90029		Ca1001		PM17-11		Pa17-3		Pb17-1		Pc17-6		PM2-7		Pb2-2		Pc2-7		
	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	E	I	
2150	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2100	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2000	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1600	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
1400	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1330	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1220	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1200	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
900	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N° Bandas ausentes	5	4	6	8	8	4	8	5	5	4	8	5	5	5	6	5	5	4	2	9	

* Amplicones= Productos de PCR obtenidos con un determinado partidor considerando todas las cepas analizadas; E = disco Externo de 1,2 mm obtenido de la periferia de la carta FTA; I = disco Interno de 1,2 mm obtenido del centro de la carta FTA; + = banda presente; - = banda ausente.

amplicones los de 2100, 2000, 1600, 1400, 1330, 1200 y 900 se amplifican también por el método convencional (tabla 5). Los amplicones de 2150, 1470, 1220 y 1000 pb sólo se amplifican con el método FTA. De acuerdo al análisis de las muestras duplicadas que contienen discos externo e interno obtenido de una carta impregnada con el mismo ADN_g, los fragmentos de 2150, 1220 y 1000 pb serían amplicones inestables que no deberían considerarse parte del perfil. El amplicón de 1600 pb aparece como fragmento inestable en varias cepas con el método FTA, pero fue considerado como banda que difiere entre cepas según el método convencional.

El Índice de Error de Amplificación (IEA) para las 10 cepas analizadas con el partidor CaBUO1 por este método es de 0,9, puesto que de 10 pares de reacciones de amplificación consideradas en el cálculo, 9 de ellas presentaron diferentes amplicones.

2.2.3) Análisis de agrupamiento a partir de ADN_g obtenido por el método FTA, usando el partidor OPBA13. Los datos de RAPD-PCR obtenidos con el partidor OPBA13, usando el método FTA, fueron empleados en el análisis de *cluster*, cuyos resultados se ven representados en el dendograma de la **figura 12**. Se aprecia la existencia de 7 genotipos distintos: el genotipo 1 está constituido por las cepas Pb17-1, Pc2-7, Pb2-2, Pc17-6 y PM2-7; el genotipo 2 agrupa a las cepas Pc17-6, PM17-11 y Pa17-3; el genotipo 3 está representado por la cepa Ca1001; el genotipo 4 por las cepas PM17-1 y Pa17-3; el genotipo 5 por las cepas estándar SC5314 y Ca90029, el genotipo 6 por la cepa Ca1001 y el genotipo 7 por la cepa Sc5314. Este análisis separa las muestras que son duplicados de un mismo ADN_g obtenido de sitios diferentes de una carta FTA (disco Externo y disco Interno) en grupos genéticos diferentes, creando diferencias inexistentes y permitiendo que una misma cepa presente dos genotipos distintos simultáneamente, fenómeno que se observa en la mayoría de las cepas. Sin embargo, las cepas Pb17-1, Pc2-7, Pb2-2 y PM2-7, son las únicas cuyas muestras Externa e Interna (duplicados) quedan incluidas en un grupo perteneciente a un solo genotipo, el genotipo 1. En general, este dendograma muestra que existe

poca similitud entre grupos de cepas representados por los 7 genotipos obtenidos.

2.2.4) Análisis de agrupamiento a partir de ADNg obtenido por el método FTA, usando el partidor CaBUO1. La **figura 13** muestra el dendograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 con el método FTA. Se observa que las cepas analizadas se separan en grupos correspondientes a 12 genotipos distintos, y al igual que con el partidor OPBA13, se produce la separación de muestras que son duplicados de un mismo ADNg. De los 12 genotipos, uno solo, el genotipo 3 contiene un par de muestras duplicadas correspondientes a la cepa Pc17-6. El resto de las cepas, con sus pares duplicados Externo e Interno, quedan todas distribuidas en distintos genotipos. También es posible observar que, en general, todas las cepas analizadas presentan poca similitud, existiendo grupos que muestran un coeficientes S_{AB} de 0,3 a 0,5.

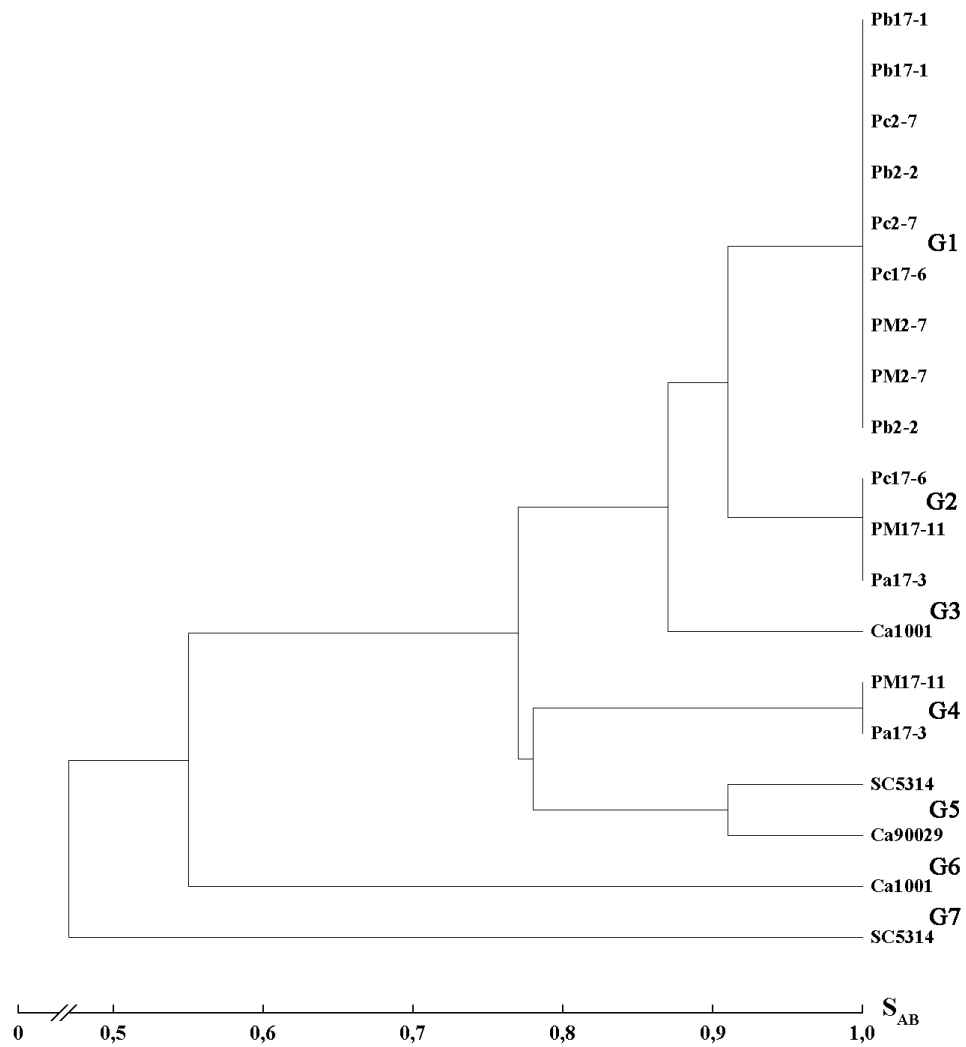


Figura 12: Dendrograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor OPBA13 y discos de 1,2 mm Externo e Interno provenientes de cartas manchadas con ADN_g de cada cepa analizada, purificado por el método FTA. S_{AB} = coeficiente de similitud genética entre cepas.

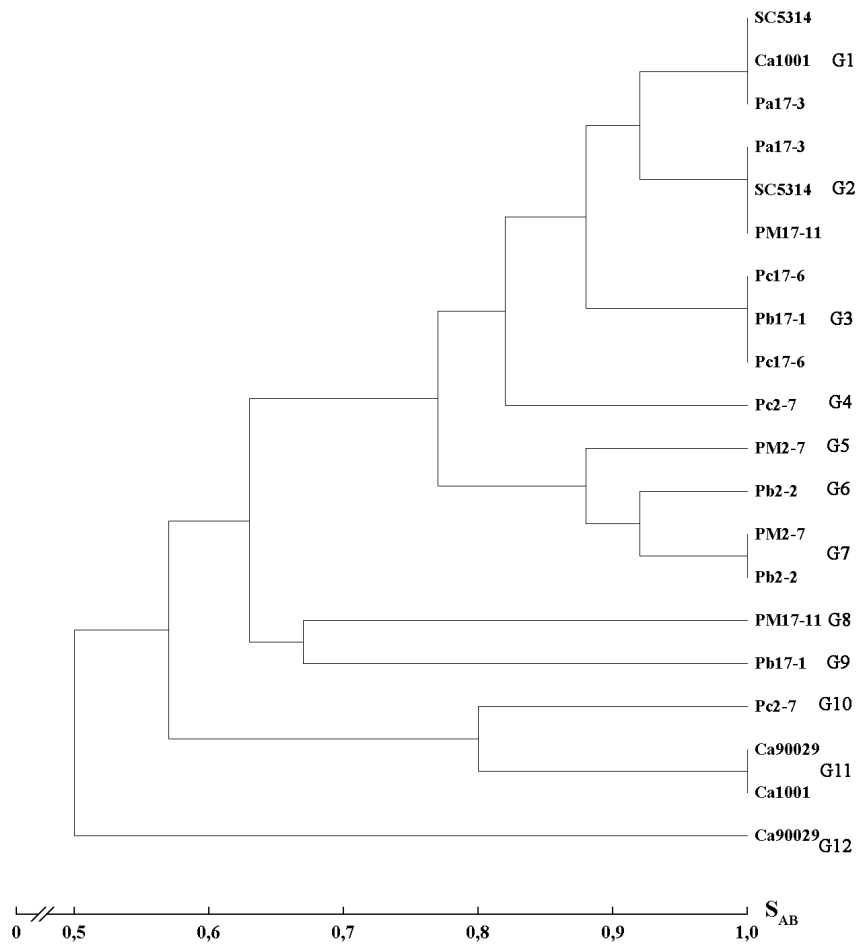


Figura 13: Dendrograma obtenido con los datos de RAPD-PCR usando el partidor CaBUO1 y discos de 1,2 mm Externo e Interno provenientes de cartas manchadas con ADN_g de cada cepa analizada, purificado por el método FTA. S_{AB} = coeficiente de similitud genética entre cepas.

DISCUSIÓN

En la presente tesis se realizó un estudio comparativo de dos técnicas de purificación de ADN diferentes y se determinó su utilidad para medir variabilidad genética en levaduras del género *Candida*, mediante la técnica de RAPD-PCR. Para ello, se utilizó como “gold standard” un método convencional que consiste en extraer el ADN de levaduras rompiendo las paredes de las células en forma mecánica usando perlas de vidrio. Posteriormente, se usa un detergente (como SDS al 1%), el cual libera el contenido celular completamente, dejando el ADN en solución. El ADN es purificado a partir de los otros componentes celulares como lípidos, proteínas e hidratos de carbono, en dos pasos sucesivos de extracción con solventes orgánicos (fenol y cloroformo) y es precipitado usando etanol absoluto frío. Este procedimiento es largo, laborioso y puede dejar la muestra contaminada con fenol y proteínas, lo que posteriormente inhibe la reacción de PCR.

El otro método que se empleó en este estudio fue un procedimiento recientemente descrito, que sirve para coleccionar, transportar, almacenar y purificar ADN en forma simultánea, ya que la muestra se deposita sobre una matriz de papel especial llamada carta FTA. Esta matriz está impregnada con una mezcla de reactivos químicos, de marca registrada, que al contacto con la muestra lisan las células y organelos dejando el ADN atrapado en las fibras del papel. Así, la carta FTA sirve de soporte al ADN que se une fuertemente al filtro permitiendo la realización de varios pasos de lavados del papel con un reactivo proporcionado por el fabricante, lo que dejaría el ADN extremadamente limpio y listo para aplicaciones posteriores. Esta tecnología es rápida y podría reemplazar el procedimiento de purificación convencional que consume tanto tiempo y no garantiza la pureza de la muestra purificada. Además, existen otras ventajas de esta técnica, como por ejemplo, que la muestra puede ser re-utilizada varias veces y el ADN se puede almacenar a temperatura y humedad ambiente por muy largos períodos de tiempo en las cartas FTA, protegido de la degradación por nucleasas, luz UV y daño oxidativo, eliminando la necesidad de utilizar congeladores para

guardar las muestras.

Esta tecnología se ha empleado exitosamente en varias aplicaciones como: análisis de muestras de ADN con enzimas de restricción, amplificación de genes y secuencias específicas mediante PCR, secuenciación de ADN, genotipificación de marcadores SNP's (Single Nucleotide Polymorphism), análisis de microsatélites, etc. (13, 14, 15, 17, 19, 22, 23) Sin embargo, no se ha demostrado fehacientemente su utilización en la técnica de RAPD-PCR en levaduras. El único trabajo que reporta este tipo de análisis fue realizado con células bacterianas de 6 especies del género *Streptococcus* y en él sólo se muestra el perfil electroforético de bandas obtenido, sin alusión a ningún parámetro que permite medir o estimar la variabilidad genética de las cepas analizadas (15). Por esto, se decidió determinar si el método de obtención de ADNg por cartas FTA es una alternativa válida y eficiente a la purificación con el método convencional, y si realmente la estimación de la variabilidad genética no se verá afectada por dicho cambio.

En este trabajo, la técnica de RAPD-PCR se realizó usando ADNg aislado de 10 cepas de levaduras; tres cepas controles ATCC y 7 aislados clínicos, todos de la especie *Candida albicans*. El ADN de cada cepa fue purificado por el método convencional y por el método FTA. La reacción de PCR se llevó a cabo usando 100 pg totales de ADNg como blanco, que son las condiciones de referencia descritas por Hermosilla G. (resultados no publicados) y las que normalmente se utilizan en el laboratorio.

Adicionalmente, como en la literatura se describe el empleo de cantidades totales variables de ADN blanco en las reacciones de PCR para RAPD: 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng y otras, durante el desarrollo de esta tesis se decidió probar, con el método convencional, una cantidad 100 veces superior a la empleada normalmente; correspondiente a 10 ng totales de ADNg por reacción de PCR. Por otra parte, con el propósito de descartar variaciones en la técnica debida al partidador empleado en la PCR, se usaron dos partidadores específicos para *Candida*: el partidador OPBA13 y CaBUO1.

La **tabla 9** resume todos los resultados obtenidos en este trabajo, considerando cada uno de los parámetros analizados en el estudio. Como se

Tabla 9: Resumen de los resultados de RAPD-PCR obtenidos en el análisis comparativo de dos métodos de purificación de ADN genómico.

Método	Partidor	Cantidad de ADNg Molde	N° de genotipos	IEA
Convencional	OPBA13	100 pg	1	0
		10 ng	3	0,43
	CaBUO1	100 pg	2	0,13
		10 ng	3	0,67
Cartas FTA	OPBA13	Disco 1,2 mm	6	0,55
	CaBUO1	Disco 1,2 mm	12	0,9

puede apreciar en dicha tabla, con el método convencional, el partidor OPBA13 y 100 pg totales de ADN blanco en la PCR, todas las cepas analizadas son genéticamente idénticas, presentando un coeficiente de similitud $S_{AB} = 1$, lo que equivale a decir que todas ellas están representadas por un único genotipo. Como no se observó diferencias de amplificación entre pares muestra-duplicado, el IEA fue de 0. Cuando, con este mismo método y partidor, se usan 10 ng totales de blanco en la PCR, los resultados que se obtienen no son los esperados; el número de genotipos aumenta de 1 a 3 y el IEA sube de 0 a 0,43. Esto podría ser explicado argumentando que el aumento en la cantidad de ADN blanco aumenta consecuentemente la concentración de inhibidores de la PCR, remanentes en la preparación. Por otro lado, como es lógico, cuando se usa el partidor CaBUO1, y 100 pg totales de ADNg con el método convencional, las cepas se separan en dos grupos con genotipos diferentes. En este caso el IEA es 0,13, con un par muestra-duplicado no coincidente. En cambio el aumento de la cantidad de ADN blanco a 10 ng totales con este partidor, aumenta en 1 unidad el número de genotipos obtenidos, con un total de 3. Notablemente, el IEA en esta condición sube de 0,13 a 0,67, por lo tanto se puede decir que la PCR con el partidor CaBUO1 es más sensible al aumento de impurezas de la muestra.

Con el método de las cartas FTA, empleando como molde ADN retenido en los discos de 1,2 mm, obtenidos de cartas impregnadas con 1×10^7 células de cada cepa, los resultados son altamente variables, comparados con el método convencional. Cuando se usa el partidor OPBA13, las cepas se separan en 6 genotipos diferentes y aproximadamente la mitad de las reacciones duplicadas (disco externo versus disco interno) presentan error de amplificación (IEA = 0,55). Con el partidor CaBUO1 prácticamente todas las cepas pasan a constituir un grupo separado, por lo cual el número de genotipos obtenidos es 12, con un IEA de 0,9, lo cual significa que solo 1 par duplicado (disco externo versus disco interno) es coincidente en el patrón de amplificación.

Si ambos métodos de purificación fueran equivalentes y no alteraran la estimación de la variabilidad genética, sería esperable que los resultados usando ambos partidores sean iguales entre sí, para número de genotipos e IEA. Los

resultados obtenidos (tabla 9) permiten rechazar la hipótesis planteada en este estudio. Con lo cual se concluye que: existen diferencias notables en el análisis de la variabilidad genética de levaduras del género *Candida*, determinada por la técnica de RAPD-PCR, utilizando ADN genómico obtenido por el método convencional y por la técnica con cartas FTA. Estos resultados hacen inviable la utilización de este método de purificación para el análisis de variabilidad genética de levaduras, al menos hasta que se determinen las condiciones óptimas de su utilización, para lo cual se requiere la realización de experimentos adicionales a los contemplados en esta tesis.

El aumento en el índice de error de amplificación en los resultados obtenidos por el método convencional y cartas FTA con 100 pg totales de ADN blanco, para ambos partidores (de 0 a 0,55 para OPBA13 y de 0,13 a 0,9 para CaBUO1) podría estar indicando que la distribución del ADN genómico en la matriz de la carta FTA no es homogénea, quedando éste concentrado principalmente en la zona central de la carta FTA (disco interno). También es posible pensar que el protocolo de lavados descrito en el manual del fabricante, que fue el empleado en esta tesis, no sea el adecuado para obtener el grado de pureza que requiere la muestra para desarrollar la técnica de RAPD-PCR. Otra explicación es que probablemente no existe una ruptura homogénea de células cuando se deposita la muestra, lo cual podría implicar que los químicos de la carta FTA no son suficientes para degradar la pared del hongo y se necesite adicionar un paso de lisis por ebullición u otro método.

CONCLUSIONES

- 1) Con el método convencional, el partidador OPBA13 y 100 pg totales de ADN_g como blanco en la reacción PCR, todas las cepas analizadas son genéticamente idénticas (SAB = 1, IEA = 0). Cuando se usan 10 ng totales de ADN_g blanco, las cepas analizadas se separan en tres genotipos diferentes, con un IEA de 0,43.

- 2) Con el método convencional, el partidador CaBUO1 y 100 pg totales de ADN_g como molde en la reacción PCR, todas las cepas analizadas se separan en dos genotipos diferentes, con un IEA de 0,13. Cuando se usan 10 ng totales de ADN_g blanco, las cepas analizadas se separan en tres genotipos diferentes, con un IEA de 0,67.

- 3) Con el método de las cartas FTA, el partidador OPBA13 y un disco de 1,2 mm con ADN_g como blanco en la reacción PCR, todas las cepas analizadas se separan en siete genotipos diferentes, con un IEA de 0,55.

- 4) Con el método de las cartas FTA, el partidador CaBUO1 y un disco de 1,2 mm con ADN_g como blanco en la reacción PCR, todas las cepas analizadas se separan en doce genotipos diferentes, con un IEA de 0,9.

- 5) Las condiciones óptimas para RAPD-PCR realizado con ADN_g purificado por cartas FTA se obtuvieron con discos de 1,2 mm provenientes de cartas impregnadas con 1×10^7 células.

- 6) Existen diferencias en los perfiles de amplificación obtenidos con discos FTA extraídos de la periferia de la carta (disco Externo) y de la zona central de ésta (disco Interno).

- 7) Finalmente, existen diferencias en los resultados del análisis de la variabilidad genética de levaduras del género *Candida*, determinada por la técnica de RAPD-PCR, utilizando ADN genómico obtenido por el método convencional y por la técnica que usa las cartas FTA.

RESUMEN

Introducción. El estudio de hongos depende cada vez más de técnicas moleculares modernas como Polimerase Chain Reaction (PCR). Muchos cultivos microbianos son sometidos directamente a PCR, sin embargo, en levaduras, las técnicas para extracción de ADN son combinadas con procedimientos laboriosos y extensos para romper la pared celular. Recientemente, se ha descrito la técnica FTA[®] (Flinders Technology Associated de Whatman), mediante la cual se colecta, transporta, almacena y purifica ADN en forma simultánea. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de dos métodos de purificación de ADN genómico de levaduras del género *Cándida*, y su aplicabilidad para el análisis por la técnica de Random Amplified Polymorphic ADN mediante PCR (RAPD-PCR).

Material y Método. Se comparó un método convencional basado en la ruptura de las paredes de levaduras con perlas de vidrio, combinado con extracción fenólica y el método de purificación con cartas FTA[®]. Se purificó ADN genómico de 10 cepas de *C. albicans*, el cual fue posteriormente sometido a la técnica de RAPD-PCR, usando dos partidores diferentes. Para evaluar los resultados se analizó el conjunto de amplicones, el índice de error de amplificación (IEA), el número total de genotipos y la variabilidad genética se representó mediante un dendograma.

Resultados. Para todas las cepas analizadas, con el método convencional y el partidor OPBA13 se obtuvo un único genotipo, un IEA = 0 y con el partidor CaBUO1 2 genotipos y un IEA = 0,13. En cambio, con el método FTA, usando el partidor OPBA13 se obtuvo 7 genotipos distintos, con un IEA = 0,55 y con el partidor CaBUO1 las cepas mostraron 12 genotipos y un IEA = 0,9.

Conclusiones. Se observó que existen diferencias en el análisis de la variabilidad genética de levaduras del género *Candida*, determinada por la técnica de RAPD-PCR, utilizando ADN genómico obtenido por el método convencional y por la técnica que usa las cartas FTA. Se requieren análisis adicionales para optimizar las condiciones de PCR con los filtros FTA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, J. M., Bagán, J. V. y Ceballos, A. Terapéutica antimicrobiana en Odontoestomatología. Eds.: J. Liébana Ureña y J. V. Bagán Sebastián. Capítulo 14 : Infecciones micóticas orales. Editorial SmithKline Beecham. 1996.
2. Calderone, R. A. *Candida* and Candidiasis. Ed. ASM press. 2002.
3. Escobar, T. y Hernández, J. Terapéutica antimicrobiana en Odontoestomatología. Eds.: J. Liébana Ureña y J. V. Bagán Sebastián. Capítulo 1: Los hongos. Editorial SmithKline Beecham. 1996.
4. Fotos, P. G. y Hellstein, J. W. *Candida* y Candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. Dental Clinics of North america 36: 857-878. 1992.
5. McCullough, M. J., Ross, B. C. y Reade, P. C. *Candida albicans* : a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 25: 136-144. 1996.
6. Samaranayake, Y. H. y Samaranayake, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. Clinical Microbiology Reviews 14: 398-429. 2001.
7. Gilfillan, G. D., Sullivan, D. J., Haynes, K., Parkinson, T., Coleman, D. C. y Gow, N. A. *Candida dubliniensis* : phylogeny and putative virulence factors. Microbiology 144: 829-838. 1998.
8. Haynes, K. Virulence in *Candida* species. Trends in Microbiol. 9: 590-596. 2001.
9. Hoyer, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends in Microbiology 9: 176-180. 2001.

10. Bosshard, P., Abels, S., Zbinden, R., E.C. Böttger and M. Altweg. Ribosomal ADN sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory *J. Clin. Microbiol.* 41: 4134–4140. 2003.
11. Hsu, C.F., T.Y. Tsai and T.M. Pan. Use of the duplex TaqMan PCR system for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157, *J. Clin. Microbiol.* 43: 2668–2673. 2005.
12. Orberá, T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 15-19. 2004.
13. L.M. Smith and L.A. Burgoyne, Collecting, archiving and processing ADN from wildlife samples using FTA databasing paper, *BMC Ecol.* 4: 4. 2004.
14. Borman, A., Christopher, I., Sarah-jane, M., Colin, C & Johnson, E. Ultra-rapid preparation of total genomic ADN from isolates of yeast and mould using whatman FTA filter paper technology- a reusable ADN archiving system. *Medical mycology.* August, 44:389-398. 2006.
15. Rajendram, D., Ayenza, R., Holder, F., Moran, B., long, T., Shah, H. Long-term storage and safe retrieval of ADN from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *Journal of Microbiological Methods.* 67:582-592. 2006.
16. Becker, S., Franco, J., Simarro, P., Stich, A., P.M. Abel and D. Steverding. Real-time PCR for detecting *Trypanosoma brucei* in human blood samples, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50:193–199. 2004.
17. Li, C., Beck, I., Seidel, K., Frenkel, L. Persistence of human immunodeficiency virus type subtype B ADN in dried Blood samples on FTA filter paper. *J. Clin Microbiol.* 42: 3847-3849. 2004.

18. Lampel, K., Orlandi, P., Kornegay, L. Improved template preparation for PCR-based assays for the detection of food-borne pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4539-4542. 2000.
19. Moscoso, H., Thayer, S., Hofacre, C., Kleven, H. Inactivation storage and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA Filter paper. *Avian Dis.* 48:841-850. 2004.
20. Tsukaya, H., Lokawa, Y., kondo, M., Ohba, H. Large-scale general collection of wild plant ADN in mustang. Nepal, *J. Plant Res.* 118: 57-60. 2005.
21. Crabbe, M. A Novel method for the transport and analysis of genetic material from polypos and *Zooxanthellae* of *Scleractinian* corals. *J. Biochem Biophys methods.* 29:171-176. 2003.
22. Hide, G., Hughes, J., McNuff, R. A rapid and simple method of detection of *Blepharisma japonicum* using PCR and immobilization on FTA paper. *BMC. Ecol.* 3:7. 2003.
23. Schulman, M., Harper, C., Bell, E., Nel, A., Guthrie, A. Microsatellite analysis of cryopreserved stallion semen stored on FTA paper. *J. S. Afr Vet. Assoc.* 73: 222-223. 2002.
24. Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P, Rodrigues F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol.* 45 (7):619-27. 2007.
25. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor. Laboratory Press. USA. 1989