

Adecuación de la técnica de extracción de ARN y obtención de cDNA para la expresión del gen *gst* de *Fasciola hepatica* mediante PCR convencional

*Adaptation of RNA extraction technique and obtaining cDNA for the expression of the *gst* gene of Fasciola hepatica by conventional PCR*

¹Carlos Rosales Loredo, ²Corpus Cerna Cabrera, ³Pedro Ortiz Oblitas, ⁴Marco Rivera Jacinto, ⁵Claudia Rodríguez
^{1,4,5} Docentes del Área de Microbiología y Parasitología. Departamento Académico de Ciencias Biológicas.
Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca.

^{2,3} Docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.
Av. Atahualpa 1050. Cajamarca. Perú

⁶Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Dpto. Cs. Biológicas, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil
(CIVETAN. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.)

Recibido: 27 - 02 - 16

Aceptado: 26 - 07 - 17

Resumen:

Se ha adaptado la técnica de extracción de ARN total de *Fasciola hepatica*, así como la obtención de cDNA mediante RT-PCR con la finalidad de posibilitar la amplificación del gen *gst* (glutathion s-transferasa) de *Fasciola hepatica* para estudios adicionales sobre la expresión del gen *gst* en relación a la resistencia de *Fasciola hepatica* frente al triclabendazol. Esto ha implicado la modificación de las técnicas convencionales para los procesos antes mencionados, lo que ha permitido contar el material genético adecuadamente preparado para amplificar el gen *gst* mediante PCR convencional. Se trabajó con 11 muestras de parásitos nativos obtenidos del Camal Municipal de la ciudad de Cajamarca. Los resultados obtenidos evidencian que las modificaciones introducidas a los procedimientos convencionales de extracción de ARN y obtención de cDNA son las adecuadas para poder evidenciar niveles de expresión del gen *gst*.

Palabras clave: extracción de ARN, obtención de cDNA, gen *gst* de *Fasciola hepatica*.

Abstract

The *Fasciola hepatica* total RNA extraction technique has been adapted, as well as the cDNA obtained by RT-PCR in order to enable the amplification of the *gst* gene (glutathione s-transferase) of *Fasciola hepatica* for additional studies on the expression of *gst* gene in relation to the resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. This has involved the modification of the conventional techniques for the aforementioned processes, which has made it possible to count the genetic material suitably prepared to amplify the *gst* gene by conventional PCR. We worked with 11 samples of native parasites obtained from the municipal slaughterhouse of the city of Cajamarca. The results showed that the modifications to the conventional procedures of the extraction of RNA and the process of obtaining cDNA are the suitable ones to be able to make the levels of expression of the *gst* gene evident.

Key words: RNA extraction, obtaining cDNA, *gst* gen of *Fasciola hepatica*

Introducción

Fasciola hepatica es un tremátodo involucrado en una parasitosis zoonótica, la fasciolosis, que viene afectando el potencial del ganado vacuno a nivel global, específicamente en América (Hillyer y Apt 1997), incluido nuestro país (Huamán 2011), causando importantes pérdidas económicas en las regiones afectadas (Espinoza et al. 2010). Esta enfermedad ha adquirido mayor importancia dado que viene produciendo, desde hace más de 15 años, efectos negativos sobre la producción lechera con grandes pérdidas económicas (Boray 1994; SENASA 2007), además de afectación importante en la salud humana (Marcos et al. 2007). Tal situación se viene agravando con el surgimiento de la resistencia de *Fasciola hepatica* a uno de los medicamentos más usados indiscriminadamente en vacunos, desde hace muchos años atrás, el triclabendazol. La resistencia en mención viene siendo demostrada mediante investigaciones recientes (Rojas 2012; Ortiz et al. 2011; Ortiz et al. 2013)

En este sentido, los estudios que vienen siendo abordado están orientados a aclarar los mecanismos moleculares relacionados con la resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol. Uno de los mecanismos relacionados con la resistencia al triclabendazol tiene que ver con la actividad de la enzima Glutathion-S-transferasa (GST) y su estudio básico radica en la identificación del nivel de expresión del gen glutathion s-transferasa (*gst*) en el ADN de *Fasciola hepatica* (Fernández et al. 2013), dicho gen codifica la producción de la enzima GST. La identificación de la expresión del gen *gst* puede conseguirse con la amplificación de dicho gen mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para tal objeto y en el caso específico de *Fasciola hepatica*, se requieren dos condiciones previas, la primera es una obtención de su ácido ribonucleico (ARN), libre de impurezas y lo

menos degradado posible y la segunda es obtener un molde de ácido desoxirribonucleico de una sola cadena (cDNA), que posibilite la amplificación eficiente del gen *gst* mediante una PCR convencional. Cabe mencionar que se conocen técnicas generales establecidas para la extracción de ARN de *Fasciola hepatica*, pero para efectos de estudios de la expresión de gen *gst* se requiere adaptar tales técnicas a fin de obtener resultados eficaces.

A través del presente estudio se ha logrado estandarizar la técnica de obtención del ARN de *Fasciola hepatica* en condiciones que aseguren su menor degradación, así como la adaptación de la técnica de obtención de cDNA a fin de posibilitar la amplificación adecuada del gen *gst* de *Fasciola hepatica* que permita el análisis adecuado de la expresión del gen en mención para efectos relacionados con estudios sobre el involucramiento de dicho gen en la resistencia de *Fasciola hepatica* al triclabendazol.

Materiales y método

Obtención de muestras

Se trabajó con 11 muestras de cepas nativas de *Fasciola hepatica* obtenidos directamente a partir de hígados de vacunos, decomisados en el camal de la ciudad de Cajamarca.

Preparación de muestras obtenidas en camal

Los parásitos obtenidos a partir de hígados decomisados fueron lavados inmediatamente en placas Petri con solución salina fisiológica estéril (NaCl 0.9%), mantenida alrededor de 37°C. El lavado se repitió hasta por 3 veces. Luego se colocó cada parásito en tubos eppendorf de 1.5 mL. a los que se agregó 200 µL. de solución RNA later® Sigma, procediéndose a su traslado al Laboratorio de Análisis Veterinarios de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, donde se conservó los especímenes a -70°C.

Preparación del material

Se procedió al lavado de morteros y pilones con detergente, seguidamente a su enjuague con agua destilada y alcohol etílico al 70%, adicionalmente se los secó para su posterior desinfección con NaOH 1M., se volvió a secar los morteros, se los colocó en bolsas plásticas de primer uso y se los enfrió a -20°C. Adicionalmente, se esterilizó puntas, tubos eppendorf de 1.5 mL. y tubos para PCR, así como gradillas para tubos eppendorf. Igualmente se esterilizó agua ultrapura (Milli Q®), para su distribución, en cabina de seguridad, en alícuotas de 1 ml. colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Antes de proceder a la extracción de ARN parasitario se procedió a limpiar la superficie de la cámara de seguridad con agua destilada, luego con alcohol etílico al 70% y finalmente con NaOH 1M. Luego se desinfectó micropipetas con alcohol etílico al 70% y NaOH 1M, para su adicional irradiación con luz UV. Así mismo, los guantes a utilizar para la extracción de ARN fueron previamente desinfectados con alcohol etílico al 70% y luego con NaOH 1M.

Procesamiento inicial de los parásitos previo a la extracción de ARN

Este procedimiento es una modificación al proceso inicial de extracción de ARN convencional indicado en Maniatis et al. (1982). Cada parásito mantenido en RNA later® (Sigma) a -70°C fue colocado con pinzas esterilizadas con alcohol etílico al 70% y NaOH 1M dentro de un mortero previamente enfriado a -20°C y mantenido en hielo picado dentro de una caja de poliestireno. Luego, con el pilón enfriado se procedió al machacado del parásito hasta obtener una pasta homogénea.

Extracción de ARN parasitario

Se realizó mediante la técnica de extracción de ARN con TRIzol® (Maniatis et al. 1982), siguiendo las instrucciones del fabricante, para

lo cual a la pasta del parásito obtenida en el mortero se agregó 1 mL de TRIzol®, la mezcla fue recolectada y colocada en un tubo eppendorf esterilizado libre de nucleasas, a la cual se incubó en baño maría por 5 minutos a 30°C. A continuación se añadió 200 µl. de cloroformo, agitándose enérgicamente, de forma manual, durante 15 segundos para nuevamente incubar la mezcla a 30°C por 3 minutos. Luego se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 15 minutos entre 2-8°C. Posteriormente se recolectó la fase acuosa superior en otro tubo eppendorf, cuidando de no extraer la interfase siguiente, añadiéndose luego 500 µL. de isopropanol e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Puede observarse el ARN precipitado. Seguidamente se volvió a centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos entre 2-8°C a fin de obtener un pellet en el fondo del tubo, eliminándose después el sobrenadante, se procedió a lavar el pellet con 1 ml. de etanol absoluto 70% previamente enfriado a -20°C, eliminándose el etanol de lavado, repitiéndose el lavado hasta un total de 3 veces. Se centrifugó nuevamente a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se secó el pellet en la estufa a 37°C hasta no dejar restos de etanol de enjuague. Finalmente se resuspendió el pellet de ARN con 50 µl de agua ultrapura (Milli Q®), incubándose a 56°C por 10 minutos en baño maría, conservándose el ARN obtenido a -20°C.

Confirmación de la calidad del ARN extraído

Se hizo a través de dos métodos, el primero mediante la visualización de dos bandas de ARN mediante electroforesis convencional (Maniatis et al. 1982), del ARN recientemente extraído y mantenido en hielo, para lo cual se preparó un gel de agarosa al 1% con Syber Safe como reactivo de tinción del ARN. El resultado de la electroforesis debe mostrar dos bandas claras o tenues indicativo de la presencia única de ARN extraído (Fig.1).

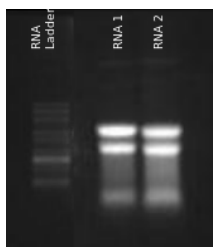


Figura 1. Bandas referenciales de la presencia de ARN de *Fasciola hepatica*, en gel de Formaldehído al 1% corrido a 100V por 1 hora en buffer MOPS 1X.

El otro método utilizado se basó en la cuantificación del ARN extraído por espectrofotometría UV, para lo cual se hicieron mediciones de absorbancia a 260 nm y 280 nm de la muestra de ARN diluida 1/240. Para determinar la pureza del ARN se cuantificó la proporción DO 260 nm / DO 280 nm. Si la proporción resultó entre 1.6 a 2.0 se asumió que la absorción era debida a ácidos nucleicos (Farrel 2010).

Adecuación de la obtención de cDNA

Se adecuó este procedimiento para obtener cDNA a partir de 2µg. de ARN total, para lo cual en base a la determinación de la relación DO 260 nm / DO 280 nm., se calculó el volumen de ART total para la medición de los demás componentes de la solución de muestra a procesar mediante RT-PCR. Se consideró las siguientes cantidades:

ARN total ----- X µL (conteniendo 2µg de ARN extraído)

Oligo-dT 50 µM (500 µg/ml) -----1,0 µL

Mix dNTPs 10mM -----1,0 µL

H₂O agua ultrapura ----- X µL

Volumen final = 10 µL

El cálculo de la Mix de síntesis fue como sigue:

Buffer RT 10X ----- 4 µL

ClMg₂ 25mM ----- 2 µL

DTT 0,1M ----- 2 µL

RNase OUT (40 U/µL) --- 1 µL

Superscript III RT (200 U/µL) ---- 1 µL

Volumen final = 10 µL

Para realizar la RT-PCR la solución de muestra de ARN total y los demás componente señalados arriba se calentaron dentro de un tubo PCR en baño maría a 65°C por 5 minutos. Luego se añadió la mix de síntesis y se procesó en el termociclador a 50°C por 50 minutos y luego a 85°C por 5 minutos. El cDNA obtenido se conservó a 4°C para la inmediata amplificación del gen *gst* mediante PCR convencional.

Amplificación gen *gst* por PCR convencional

Se llevó a cabo teniendo como primers los siguientes:

gst-F : 5'ATGCCAGCCAAACTCGG3'

gst-R : 5'TCAAGCCGGTGCAGCG3'

La mix de amplificación por cada tubo de reacción contuvo lo siguiente:

Mix dNTPs 20mM -----2,0 µL

Taq polimerasa 500 U ----- 0,25 µL

Cl₂Mg 25 mM ----- 2 µL

Buffer 10X ----- 2 µL

Primer F 100 µM ----- 1 µL

Primer R 100 µM ----- 1 µL

Agua ultrapura ----- 14.75 µL

Volumen final = 23 µL

A la mix de amplificación se añadió 2 µL de cDNA [10 ng/ µL]. El volumen de cDNA que contenía tal concentración se calculó a partir de la lectura de absorbancia del cDNA obtenido a DO 260 nm.

Las condiciones de PCR en el termociclador fueron bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos, desnaturalización subsiguiente 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, elongación a 72°C por 1,5 minutos, elongación final 72°C por 5 minutos. Total de 30 ciclos, conservación a 4°C por tiempo continuo.

Comprobación del cDNA amplificado por PCR

Se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 1%, teñido con Syber Safe 10% en buffer TBE 0,5X. Las condiciones de corrido fueron: 50V, 60 mAmp. por 20 minutos iniciales y finalmente 100V, 70 mAmp. Por 45 a 50 minutos.

Resultados y discusión

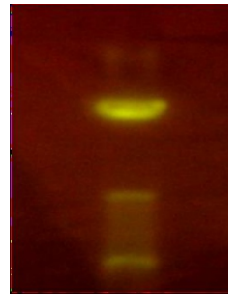
Preparación de las muestras parasitarias

Se consideró después de obtenidos los parásitos mantenerlos vivos el tiempo más posible dado que luego de la muerte de los parásitos el ARN pudiera comenzar a degradarse, lo que afectaría la posibilidad de extraer la cantidad suficiente de ARN lo más puro posible. Complementariamente la posible degradación del ARN se impidió conservando a los parásitos con RNA later que tiene efecto retardante de la degradación de ARN en general (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0901?lang=en®ion=PE>). Esto funcionó para el caso de *Fasciola hepatica* aun teniendo en cuenta que con otros organismos la extracción no considera tratamientos previos (Doleshal et al. 2008).

Extracción de ARN parasitario

Se modificó parte del protocolo de extracción convencional con TRIzol propuesto por Maniatis et al. (1982), con la finalidad de evitar lo más posible la degradación del ARN parasitario. En este sentido no se siguió los pasos preliminares en la preparación de los parásitos tal como lo tienen establecido otros protocolos con venenos (Maniatis et al. 1982; Rio et al. 2010; Farrel 2010, Johnson et al. 2012), incluso los protocolos mediante el uso de kits comerciales de extracción de ARN (Ambion® Plant RNA Isolation Aid: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/9690MC.pdf>). Esta modificación no implicó procesos de congelamiento y

descongelamiento continuos de la muestra parasitaria en nitrógeno líquido, tal como algunos de los procesos convencionales lo han establecido, sino que con la muestra congelada con RNA later a -70°C , se procedió a obtener directamente, en un mortero de porcelana enfriado, una masa homogénea, con la cual se continuó con el procedimiento convencional establecido en algunos de los protocolos clásicos (Maniatis et al. 1982; Johnson et al. 2012). Bajo estas condiciones se extrajo ARN de *Fasciola hepatica* en condiciones más favorables verificadas mediante electroforesis de comprobación donde pudo visualizarse las dos bandas referenciales de la presencia de ARN puro, aunque la separación de las bandas es mayor en el gel de agarosa al 1% (Fig. 2). Así mismo, se pudo establecer relaciones DO 260 / DO 280 con valores mayores a 1,60 e incluso hasta de 2,0.



Bandas de ARN

Figura 2. Bandas indicadoras de la presencia de ARN de *Fasciola hepatica*, obtenidas en gel de agarosa 1%, teñido con Syber Safe, corrido a 100 V por 1 hora en TBE 0.5X

Modificación de la técnica de RT-PCR

Dadas las pruebas de verificación de la extracción modificada de ARN, se tuvo que reajustar la cantidad de ARN total a considerar para posibilitar la obtención adecuada de cDNA, la cantidad considerada de ARN total fue de 2 μg . en lugar de 5 ng., establecido en el método convencional (Maniatis et al. 1982).

Verificación de la amplificación del gen *gst* de *Fasciola hepatica*

Las modificaciones hechas tanto a la extracción de ARN como a la obtención de cDNA mediante RT-PCR, permitieron una amplificación adecuada del gen *gst* de *Fasciola hepatica* tanto del grupo inicial de dos cepas nativas (Fig. 3), como de los otros especímenes nativos también obtenidos a partir de hígados en el camal municipal (Fig. 4).

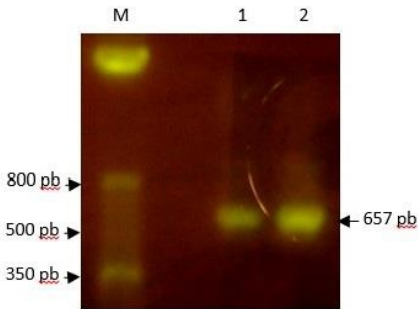


Figura 3. Bandas de amplificación por PCR del gen *gst* de *Fasciola hepatica* (prueba inicial con 2 muestras parasitarias). M: marcador molecular. 1 y 2: muestras de parásitos.

La verificación electroforética permitió la visualización de bandas de 657 pb coincidentes con el tamaño establecido de banda amplificada para el gen *gst* de *Fasciola hepatica* (Fig. 3 y 4).

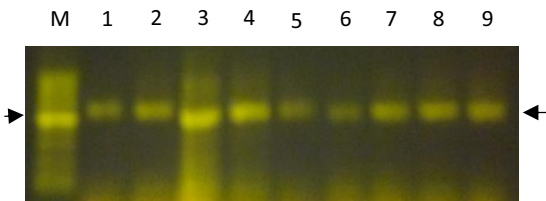


Figura 4. Bandas de amplificación por PCR del gen *gst* de *Fasciola hepatica* (prueba de comprobación con 9 muestras parasitarias). M: marcador molecular. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: muestras de parásitos. Flecha izquierda: indica una banda de 500 pb en el marcador molecular. Flecha derecha: indica bandas de 657 pb amplificadas del gen *gst* de los parásitos.

Conclusiones

Las modificaciones y ajustes hechos tanto a la técnica convencional de extracción de ARN, así como a la obtención de cDNA de *Fasciola hepatica*, han posibilitado la amplificación del gen *gst*, permitiendo una secuencia de procedimientos de trabajo con ácidos nucleicos relacionados con la expresión del gen *gst* de dicho parásito.

Agradecimientos

Los reconocimientos especiales a Pamela Lamenza de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, por las orientaciones técnicas y el aporte con el diseño y el aprovisionamiento de los primers utilizados en el presente trabajo.

Referencias bibliográficas

- Boray, J. (1994) Disease of Domestic animals Caused by Flukes. FAO, Rome.
- Doleshal, M.; Magotra, A.; Choudhury, B.; Cannon, B.; Emmanuel Labourier, E. y A. Szafranska (2008). Evaluation and Validation of Total RNA Extraction Methods for MicroRNA Expression Analyses in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 10, No. 3.
- Espinoza, J.; Terashima, A.; Herrera-Velit, P. y L. Marcos (2010) Fasciolosis humana y animal en el Perú: Impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental en Salud Pública*, 27(4), pp. 604-612.
- Farrel, R. (2010). *RNA Methodologies Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4 ed. San Diego, USA: Academic Press Elsevier.

Fernández, V.; Lamenza, P.; Ortiz, P. y H. Solana (2013) Identificación del gen glutatión S-transferasa en *Fasciola hepatica* sensible y resistente a triclabendazole. Artículo de Conferencia en la FLAP 2013. Guayaquil. Ecuador.

Hillyer, G. y W. Apt. (1997) Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitol Today*. 13(3):87-88.

Huamán, N. (2011) Frecuencia de fasciolosis y cisticercosis en animales beneficiados en el Camal Municipal de Cajamarca. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Universidad Nacional de Cajamarca. Cajamarca. Perú.

Johnson, M.; Carpenter, E.; Tian, Z.; Bruskiwich, R.; Burris, J. (2012) Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS ONE* 7(11).

Maniatis, T.; Fritsch, E.; Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3°ed. New York. Cold Spring Harbor Press.

Marcos, L.; Terashima, A.; Leguía, G.; Canales, M.; Espinoza, J y E. Gotuzzo (2007). La infección por *Fasciola hepatica* en el Perú: una enfermedad emergente. *Revista de Gastroenterología*. 27, pp. 389-396.

Ortiz, P.; Cerna C.; Rosales C.; Cabrera, M.; SOLANA, H.; Scarcella, S.; Lamenza, P. y V. Fernández. (2011) Eficacia del triclabendazol en el tratamiento de la infección natural por *Fasciola hepatica* en ganado vacuno lechero. *Biomédica*, 31(3), p, 172

Ortiz, P.; Scarcella, S.; Cerna C.; ROSALES C.; Cabrera, M.; Guzmán M.; Lamenza, P. y H.

Solana (2013). Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology* 195 (2013) 118–121.

Rio, D.; Ares, M.; Hannon, G. and T. Nilsen. (2010). *RNA: A Laboratory Manual*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Rojas, J. (2012) Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en Bovinos de la Campiña de Cajamarca – Perú. Available from: <<http://www.veterinariargentina.com/revista/2012/07/resistenciade-fasciola-hepatica-al-triclabendazol-en-bovinos-de-la-campina-de-cajamarca-%E2%80%93-peru/>>.

SENASA, (2007). Informe Anual, diciembre 2007. Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Cajamarca, Perú.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0901?lang=en®ion=PE>
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/9690MC.pdf>