

EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ARN DE *Candida albicans* (cepa de referencia IP 118079)

DIANA CAROLINA CRUZ-PÉREZ

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y TECNOLOGICAS
PROGRAMA BIOLOGIA
ARMENIA QUINDIO
2009**

EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ARN DE *Candida albicans* (cepa de referencia IP 118079)

DIANA CAROLINA CRUZ PÉREZ

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE BIÓLOGO(A)**

DIRECTOR

JORGE ENRIQUE GOMEZ MARIN MD; MSc; PhD

**UNIVERSIDAD DEL QUINDIO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLÓGICAS
PROGRAMA BIOLÓGIA
ARMENIA QUINDIO
2009**

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por llenarme de sabiduría y paciencia.
- A mi familia que siempre esta apoyándome en los momentos buenos y no tan buenos expresándome su amor, especialmente mi madre (Oliva Pérez Gonzales), quien es el motor de mi vida.
- Al doctor Jorge Enrique Gómez por dejarme ser parte del grupo GEPAMOL, por su apoyo y asesoría durante el proyecto.
- Juan Felipe Ramírez Giraldo por que hasta el ultimo momento ayudo en mi proceso investigativo.
- A Fabiana María Lora quien sin reparos me acompaño en el proceso y finalización de mi trabajo, además a quien considero no solo como una guía a seguir, si no como una amiga.
- Al grupo GECAVYME y en especial a la profesora Nelsy Loango Chamorro por la comprensión, préstamo de equipos y respuesta a dudas.
- Al grupo PATOMOL (biomédicas) en especial a Sandra Coronado por facilitarme el uso de material y equipos de su grupo.
- A Raúl Eduardo Rivera, por la ayuda que me brindo y por estar pendiente de mi proceso.
- Al los integrantes del grupo GEPAMOL por enseñarme la interdisciplinariedad y por responder a mis dudas.
- A mis amigas, principalmente a Nathalia Aguilar, (a la que considero mi mejor amiga y quien siempre ha estado a mi lado, recordándome las metas que debo de cumplir), Diana Carolina López Obando, Diana Lorena López medina y Natalia Trujillo, quienes me apoyaron, dándome palabras confortables y por que al estar con ellas fui creciendo tanto en lo intelectual como en lo personal.
- A mis compañeros y profesores de carrera quienes me enseñaron el real significado de la vida en armonía con la naturaleza.

DEDICATORIA...

A Dios por permitirme seguir con mis sueños y cumplir mis objetivos, a las personas más importantes en mi vida, mi familia, a mi madre a quien considero una heroína, a mis amigas y a aquellas personas y momentos que han marcado mi vida, dejando enseñanzas positivas.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Genero <i>Candida</i>	4
2.2. <i>Candida albicans</i>	4
2.3. Acido ribonucleico	6
2.4. Diferentes tipos de ARN	7
2.5. Características físico-químicas del ARN	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. ANTECEDENTES	13
6. OBJETIVOS	17
7. MATERIALES Y METODOS	18
7.1. Organismo y condiciones de cultivo	18
7.2. Cuantificación del número de células presentes en la muestra	18
7.3. Lisis de la pared celular	19
7.4. Extracción de ARN total	20
7.4.1. Método casero Fenol-cloroformo-isoamilico	20
7.4.2. Estuche comercial <i>SV Total RNA Isolation System promega</i>	20
7.4.3. Reactivo Trizol	21
7.5. Cuantificación del ARN total y determinación de la pureza	22
7.6. purificación del ARN total	22
7.7. Visualización del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa	22
7.8. Determinación de contaminación de ADN en las muestras de ARN total	23
8. RESULTADOS	24
8.1. Cuantificación del número de células presentes en la muestra	24
8.2. Lisis de la pared celular	24
8.3. Extracción de ARN total	24
8.4. Cuantificación del ARN total y determinación de la pureza	25
8.5. purificación del ARN total	26
8.6. Visualización del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa	27

8.7. Determinación de contaminación de ADN en las muestras de ARN total	27
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIONES	34
11. RECOMENDACIONES	35
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36



RESUMEN

El presente estudio consistió en la evaluación de tres métodos de extracción de ARN a partir de una cepa de referencia del hongo patógeno oportunista *Candida albicans*, ya que en este microorganismo el aislamiento de esta biomolécula, constituye una de las principales limitaciones debido a los componentes de su pared celular, por lo tanto los estudios a nivel genético y molecular son limitados en esta levadura. Se realizaron 12 extracciones para cada uno de los protocolos y a través de espectrofotometría y electroforesis en agarosa se determinó la concentración, presencia y pureza de la muestra de ARN. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con DNAsas, el lavado con alcoholes y la concentración de formamida y alcohol isopropílico, aumentan el rango de pureza de la muestra extraída. Por lo que el protocolo más apropiado de acuerdo a esta investigación para la extracción del ARN de esta levadura, es el uso del reactivo Trizol el cual produjo un rango aceptable dentro del rango óptimo de pureza de 1,94 y con una concentración de 2,2 µg/ml para un número aproximado de 2400 millones de microorganismos por mililitro.

PALABRAS CLAVES: *Candida albicans*, métodos de extracción, extracción de ARN.



1. INTRODUCCIÓN

Los patógenos fúngicos oportunistas son una importante causa de enfermedades invasivas fatales y una de las muchas amenazas que enfrentan los pacientes inmunocomprometidos, debido a las limitaciones de las terapias antifúngicas actualmente disponibles, tales como su toxicidad, su espectro cerrado y la emergencia de patógenos resistentes (1). Tal es el caso de la levadura *Candida albicans* la cual es frecuentemente encontrada como saprofito oportunista, que hace parte de la microflora normal y que coloniza las superficies de ciertas membranas mucosas en humanos. La infección superficial y diseminada, presenta más aislamientos en candidiasis cutánea (2).

En el afán de conocer los factores que le confieren su característica virulencia y resistencia a los antimicóticos, se ha descubierto que *Candida albicans* posee una pared celular compuesta principalmente en gran porcentaje de polisacáridos como Manoproteínas, β -Glucano-Quitina, β Glucano y una capa de fibrillas, los cuales han sido descritos como parte de las 5 capas que tiene la pared celular (desde la membrana plasmática hacia afuera) (3, 4), lo cual dificulta la tarea principal de obtener los ácidos nucleicos para posteriores análisis.

Los ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), desempeñan un papel esencial en el proceso de la síntesis de proteínas, estos son compuestos celulares fundamentales, responsables de la mayor parte de las actividades biológicas (5).

El aislamiento del ácido ribonucleico intacto y de gran pureza, es un paso crítico para posteriores aplicaciones de técnicas moleculares ya que la extracción del ARN debe poseer mínimos niveles de contaminación, suficiente cantidad y pureza para la realización de prácticas como; estudios referentes a la expresión genética; transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR); análisis de



northern blot; reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) y análisis de microarreglos (6, 7).

Los problemas asociados con el aislamiento de los ácidos nucleicos en hongos microscópicos son: romper la pared celular la cual es resistente, la presencia de gran contaminación de polisacáridos, y altos niveles de ribonucleasas intracelulares (8). Además los protocolos estándar y métodos comerciales disponibles en la actualidad para el aislamiento del ácido ribonucleico no presentan patrones de rendimiento homogéneos (9). En consecuencia, es fundamental determinar el sistema de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado para *Candida albicans* y así estos resultados pueden ser extrapolados a otras especies de este género.

En respuesta a la demanda para la obtención de ARN de gran concentración y pureza de la levadura *Candida albicans*, se propuso la evaluación de tres métodos de extracción que están a nuestro alcance y son comúnmente utilizados.



2. MARCO TEORICO

2.1 Genero *Candida*

El género *Candida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae* dentro del orden *Deuteromycota* (hongos imperfectos), compuesto por más de 200 especies diferentes y con hábitat natural generalizado. Muchas de estas especies forman parte de nuestra flora normal de la piel, tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio; aproximadamente un 10% de éstas se relaciona con enfermedades infecciosas. Las levaduras del género *Candida* pueden causar un gran número de cuadros clínicos, con manifestaciones variadas que dependen del lugar de la infección y del tipo de paciente (10). El mas importante patógeno de los clasificados dentro del genero *Candida* es la especie *Candida albicans* (11).

2.2 *Candida albicans*

Candida albicans del latín *candidus* (blanco) y *albicans*, participio presente de *albicare* (que es blanca) (12). Es una levadura comensal del tracto vaginal, gastrointestinal y bucal de los humanos, es un agente patógeno oportunista, esta levadura es el más importante agente productor de micosis en humanos, causando desde alteraciones superficiales leves hasta infección invasiva y rápidamente fatal en pacientes con inmunidad deprimida. (11)

En *Candida albicans* los términos “dimorfismo” y “hongo dimorfo”, se refieren a la capacidad de encontrarse en dos formas morfológicas, las cuales están bien establecidas y comúnmente aceptadas para esta levadura, aunque esta expresión se debe variar pues estos hongos tienen la habilidad de adoptar un espectro amplio de morfologías, por lo tanto *Candida albicans* puede ser considerada un organismo “polimórfico” (4). Las células son pequeñas (4-6 micras) se reproducen por gemación (13) es capaz de adaptarse a una temperatura de 37°C; su crecimiento esta dado en



respuesta a las condiciones ambientales. Su manipulación genética es limitada debido a su diploidia y falta de ciclo sexual, aunque para este último hay evidencia dentro del genoma que sugiere que es posible este tipo de reproducción aunque no se ha demostrado experimentalmente. Su genoma nuclear es de ~16 millones pares de bases y es 33% mas grande que el de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual tiene su genoma totalmente secuenciado (14). *Candida albicans* es el patógeno más común entre las especies de *Candida*. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un desplazamiento en el espectro de especies de este género hacia *Candida non-albicans* en aislamientos clínicos (15).

Candida albicans posee genes que codifican para varios factores de virulencia lo que refleja la adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales, en las que el hongo se encuentra durante su crecimiento *in vivo*. Por ejemplo, el pH sanguíneo es casi neutro, mientras que el de la vagina es ácido. Esta versatilidad puede sostenerse por un repertorio de genes que se expresan permitiendo su proliferación bajo diferentes condiciones (16).

Aproximadamente del 80 al 90% de la pared celular de *C. albicans* esta constituida por carbohidratos. Tres componentes representan en su mayoría los polisacáridos de la pared celular: (i) polímeros ramificados que contienen glucosa (β -glucanos), (ii) polímeros no ramificados de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) conteniendo quitina y (iii) polímeros de manosa que están asociadas covalentemente con proteínas. Además las células contienen proteínas (6 a 25%) y menor cantidad de lípidos (1 a 7%). Los polímeros microfibrilares (glucanos y quitina) representa el componente estructural de la pared, ellos forman un rígido esqueleto que provee de propiedades físicas fuertes a esta barrera natural (4) (Figura 2), dificultando la obtención del ácido nucleico, además esta capa parece tener importancia en cuanto a la virulencia por favorecer la adhesión y fagocitosis (17, 18).

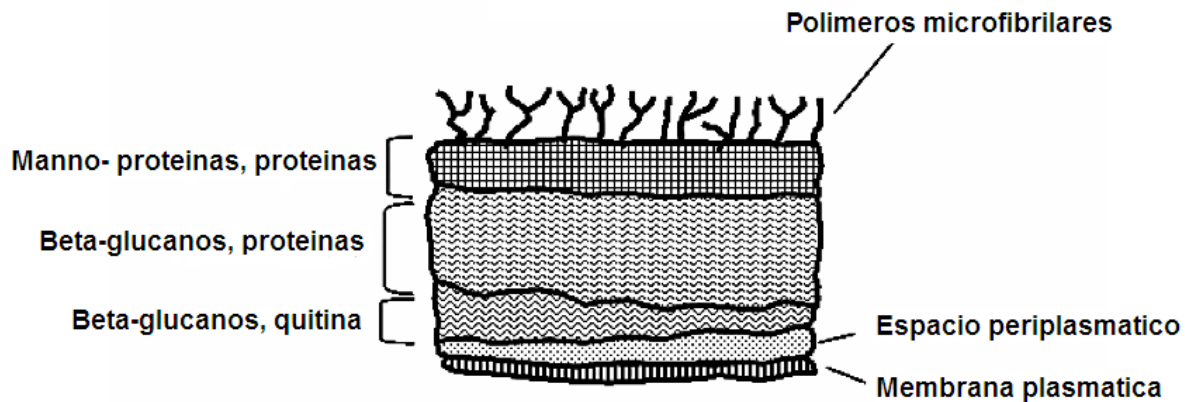


Figura 2. Estructura esquemática de la pared celular de *Candida albicans* (en 19)

Recientemente, nuevas técnicas, basadas en la biología molecular y la serología, han comenzado a utilizarse para identificar y caracterizar las especies y géneros de las levaduras. Varios procedimientos se han propuesto para la identificación de especies de *Candida* a partir de amplificaciones por PCR. Además de los genes ribosomales (20), otros han sido publicados basados en secuencias ITS (21), con resultados satisfactorios en cuanto a especificidad y sensibilidad. Muchos investigadores creen que dichas técnicas se convertirán en la base de la futura taxonomía, clasificación y diagnóstico de las levaduras (22). Esta tecnología ya se ha demostrado de gran utilidad en la epidemiología, en el análisis filogenético y en el estudio de la resistencia a fármacos aplicada a especies del género *Candida* (23). Como la mayoría de los hongos patógenos son *Deuteromicetes* y presentan características ambientales cambiantes, el uso de técnicas moleculares permite estudiar características estables y no modificables por el ambiente, como el ADN del gen y el ARN molecular en estos microorganismos (24).

2.3 Acido ribonucleico (ARN)

Debido a las dificultades de sensibilidad, especificidad y retardo de las técnicas microbiológicas tradicionales, se han desarrollado durante la última década diversas técnicas en el campo de la biología molecular con gran potencial en el área del



diagnóstico micológico, tanto para la búsqueda e identificación del agente causal como para la evaluación de clonalidad con distintos fines terapéuticos **(25)**.

La información necesaria para las actividades y funciones de los seres vivos se encuentra almacenada en los ácidos nucleicos. Su nombre deriva de su carácter ácido y el hecho de que fueron descubiertos en el núcleo de las células eucariontes. **(26)**. Estos ácidos tienen dos variantes químicas que son el ácido desoxirribonucleico y el ácido ribonucleico. Estos ácidos nucleicos son moléculas esenciales para las funciones de la célula, existiendo en todas ellas. En el ADN se localiza la información genética de la célula, mientras que diferentes moléculas de ARN forman parte del sistema que traduce esta información en las proteínas que determinan la estructura y la función celular **(27)**. El conocimiento de la estructura, metabolismo y modo de acción del ARN en la síntesis de proteínas es fundamental para entender el control de la expresión genética, división celular, crecimiento y desarrollo de los organismos **(28)**.

2.4 Diferentes tipos de ARN

En las células vivas se han encontrado varios tipos de ARN y los tres tipos principales son: el ARN de ribosomas (ARNr) el ARN soluble o de transferencia (ARNt), y el ARN mensajero o transcriptor (ARNm). La tabla 1 muestra una comparación de estos tres tipos de ARN. El ARN se encuentra en varias partes de las células junto con proteínas, de las que debe ser separado para su posterior estudio. Aunque la composición molar de las bases varía considerablemente según la fuente del ARN **(29)**.

**Tabla 1.** Comparación de los diferentes tipos de ARN (en **29**).

	Fuente	Proporción de RNA, %	Peso molecular (Daltons)	Comentarios
ARNr	Ribosomas	80	100×10^4	metabólicamente estable
ARNs ó ARNt	Citoplasma soluble	15	$2,5 \times 10^4$	Importante en el transporte de aminoácidos
ARNm	Ribosomas, citoplasma y núcleo	5	50×10^4	metabólicamente lábil: similar en composición de bases al ADN: llamado también D-ARN

Con relación al ARN transferente (ARNt) se conocen unos 60 ARNt distintos, y se encuentran en todas las células. Intervienen en la síntesis de proteínas, ya que van unidos a un aminoácido y su presentación es en forma de una hoja de trébol. El ARN ribosómico (ARNr) está presente en los ribosomas (**30**), su estructura presenta un plegamiento complejo que le permite asociarse tanto a las proteínas integrantes de los ribosomas como a otros ARNr y participan en el proceso de síntesis proteica. Por ultimo El ARN mensajero (ARNm) es quizás el más importante de los ARNs mencionados, generalmente esta presente en un porcentaje pequeño (1-5%) del ácido ribonucleico total se sintetiza sobre un molde de ADN y sirve de pauta para la síntesis de proteínas, su peso molecular es alto y contiene codificada la secuencia de una proteína, además de señales para la iniciación y terminación de la síntesis (**31**). La fracción de ARN mensajero esta compuesta de cientos de moléculas que difieren en la composición de las bases y el tamaño y no se pueden fraccionar en una sola banda de geles de agarosa o poliacrilamida (**32**). Cabe mencionar que existen otros tipos de ARN que se diferencian en función de sus pesos moleculares,



como: El ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), el ARN pequeño nuclear (ARNsn) y el ARN vírico (ARNv) (30).

2.5. Características físico-químicas del ARN

Algunas de las características físico-químicas de los ARN son:

- El peso molecular de los ARNs oscila entre 25.000 y varios millones de Daltons.
- Su constante de sedimentación esta comprendida entre 3S y 30S (33).
- Debido a que el azúcar presente en el ARN es la ribosa sugiere que en la posición 2' del anillo del azúcar hay un grupo hidroxilo (OH) libre. Por este motivo, el ARN es químicamente inestable, de forma que en una disolución acuosa se hidroliza fácilmente.
- Solubles en soluciones diluidas de NaCl, Insoluble en alcohol. Puede ser dissociado de las proteínas por tratamiento con un detergente o un fenol.
- El porcentaje de A, G, C y U de un ARN se determina en dos pasos como son la degradación hidrolítica completa del ARN para formar una mezcla de sus nucleótidos constituyentes y un análisis cromatográfico de la mezcla (por lo regular con un método de intercambio iónico en columna). La hidrólisis completa del ARN se puede lograr calentándolo con NaOH o mediante el uso de enzimas llamadas ribonucleasas (34).
- Las bases nitrogenadas tienen la propiedad de absorber la luz ultravioleta. Esta propiedad permite identificarlas y cuantificarlas, ya que cada base presenta un espectro de absorción característico con una longitud de onda máxima de aproximadamente 260 nm (Figura 1).

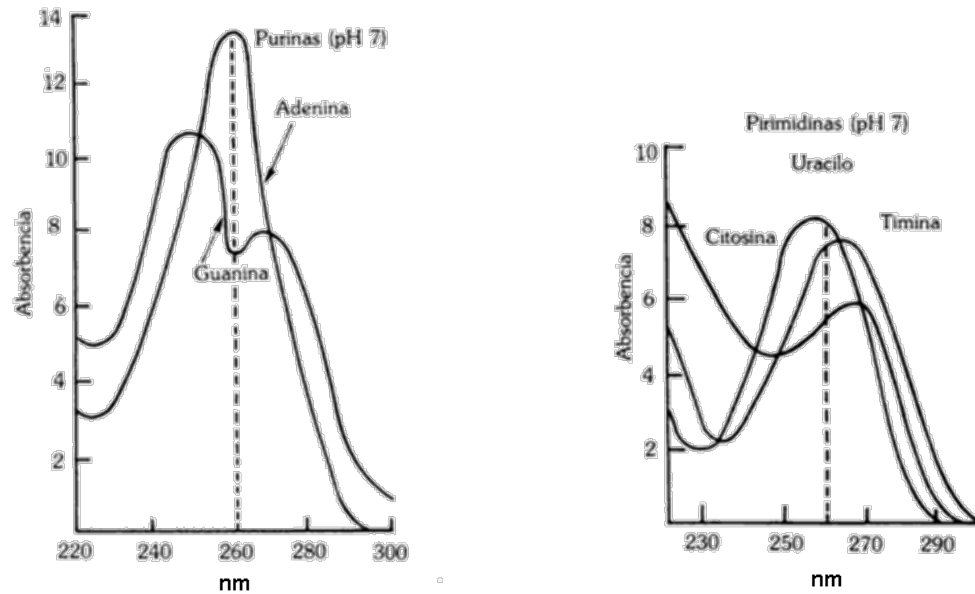


Figura 1. Espectro de absorción característico de los ácidos nucleicos (en 27).

La capacidad de las bases presentes en los ácidos nucleicos de absorber la luz ultravioleta es la causa principal del efecto mutagénico que tiene esta radiación en los organismos vivos (27).

La lectura a A260 nm permite la obtención de la concentración de ARN extraído, donde una unidad de absorbancia es igual a 40 µg de ARN/ml. La pureza que es estimada por la relación de A260/A280 donde rangos entre 1,7-2,1 están dentro del nivel óptimo de pureza, niveles menores sugieren posible contaminación con proteínas y ADN genómico. La pureza también es obtenida en la relación A260/A230 donde rangos menores a 1,8-2,2 sugieren contaminación con componentes celulares tales como polisacáridos (35).



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Candida albicans es una levadura que puede ser aislada como comensal en más del 70% de la población sana. Esta levadura se le considera un patógeno oportunista ya que en individuos inmuno deficientes como pacientes con SIDA, aceptores de órganos, cirugía invasiva y con prolongada quimioterapia, puede ser causa de enfermedad, comprometiendo órganos y tejidos, afectando así la calidad de vida de estos pacientes y en muchos casos hasta causar la muerte (**36, 37, 18**). Hasta el momento se han caracterizado algunos de los factores que le permiten a *C. albicans* infectar al humano. Una de las maneras para la identificación de estos factores es determinar los niveles de expresión de algunos genes que hayan sido caracterizados bioinformaticamente; para lo cual se hace necesario contar con un método de extracción de ARN que permita obtener este ácido nucleico en buena concentración y de buena calidad.

Los hongos levaduriformes al contener una pared celular compuesta principalmente por polisacáridos como Manoproteínas, β -Glucano-Quitina, β Glucanos y una capa de fibrillas, además de componentes como hidrato de carbono, lípidos y proteínas (**3, 4**) generan limitantes para la obtención de sus contenidos celulares.

Los protocolos estándar y métodos comerciales disponibles en la actualidad no presentan patrones de rendimiento homogéneos (**9**). En consecuencia, es fundamental determinar el sistema de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado para cada tipo de microorganismos.



4. JUSTIFICACIÓN

Obtener una muestra de ARN de *Candida albicans* en cantidad y calidad adecuada permite realizar estudios en biología molecular de este microorganismo que nos ayudara a determinar los niveles de expresión de los genes ó cambios que presentan estos con relación a las condiciones de crecimiento, que puedan favorecer los factores de virulencia de esta levadura.

Por esta razón se hace necesario evaluar diferentes métodos para la extracción del acido ribonucleico y escoger cual de estos es el mas apropiado para obtener ARN de *Candida albicans* de buena calidad, iniciando con la lisis de su pared celular hasta la degradación de su ADN y proteínas para obtener un ARN que se pueda utilizar en posteriores análisis moleculares.



5. ANTECEDENTES

Los trabajos relacionados directamente con la extracción de ARN, se han hecho en su mayoría con diferentes microorganismos.

Nuyts y *et al*, en el 2001 trabajaron en el “aislamiento eficiente de ARN total de *Clostridium* sin contaminación con ADN” con el principal objetivo de comparar tres métodos de extracción de ARN usando una modificación del protocolo de extracción de ácido fenol (Hopwood *et al*, 1985; Gerischer and Durre, 1992) y dos kits comerciales “Rneasy Mini kit” (QIAGEN, Valencia, CA, USA) y el “SV Total RNA Isolation System” (Promega, Madison, WI, USA.). La pureza y concentración de ARN extraído fueron analizadas espectrofotométricamente y la integridad de estos fue comparado por la aplicación de 1 µg de cada muestra en el gel al 1,3% agarosa-formaldehído, en buffer de corrido MOPS (20 mM MOPS, 5 mM acetato sodio, 1 mM EDTA, pH 7,0) y la separación de ácidos nucleicos por electroforesis a 90 mV por tres horas. Los resultados muestran que el protocolo que obtuvo mayor producción y mas pureza fue “Rneasy Mini kit” (A260/280 1,9 con 54 µg/ml de producción de ARN) mientras que el de menor producción y pureza se obtuvo con fenol (A260/280 1,4 con 17 µg/ml de concentración de ARN) y el estuche de Promega estuvo en el medio de los dos (A260/280 2,0 con 18 µg/ml de producción de ARN). Se concluyó que el estuche Rneasy Mini representa un método simple y rápido para la extracción de ARN en *Clostridium*.

Uppuluri, *et al*, en el 2006, trabajaron en “Análisis de las especies de RNA de varias tamaños de la fase planctónica estacionaria de las células de la levadura de *Candida albicans*”, con el objetivo principal de explorar los patrones de expresión en la fase estacionaria de *C. albicans* y como relacionar la expresión de este gen en organismos bajo diferentes condiciones de crecimiento. La extracción de ARN se realizó empleando distintos métodos como lo son el ácido fenol caliente (HAP por su abreviatura en inglés), con o sin vortex con perlas de vidrio, y el método de



aglomeración con perlas de vidrio (CGB) en nitrógeno líquido, utilizado en *Saccharomyces cerevisiae*. Entre sus resultados se encontró que el método HAP combinado con métodos para el rompimiento celular como HAP con o sin vortex con perlas de vidrio resulto adecuada para la extracción de moléculas de ARN. El método HAP no fue útil en la obtención de ARNr de la fase estacionaria tardía de estas células. Igualmente cuando esta fue combinada con la homogenización con CGB, la distribución parcial permanece en la fase estacionaria tardía en el ARN. En cuanto a la RT-PCR compararon la habilidad de dos de los métodos (HAP y CGB) con diferentes números de primers, HAP revelo pequeños ADNc de peso molecular para ciertos primers, y para CGB todas las especies de ADNc fueron eficientemente amplificadas lo que nos sugiere que el método de extracción CGB es mejor para la extracción de ARNm de los genes constitutivos en comparación del método de extracción HAP.

Noor Adila y *et al*, 2007 trabajaron en la “comparación de métodos para el aislamiento de ADN y ARN de gran calidad de un hongo oleaginous *Cunninghamella bainieri* cepa 2^a1” con el objetivo principal de demostrar la validez de protocolos de aislamiento de ADN y ARN. Específicamente en la extracción de ARN, ellos compararon 2 protocolos, el protocolo de Sokolovsky *et al.* (1990) y el protocolo comercial para el aislamiento de ARN usando TRI REAGENT del centro de investigación molecular empleando fenol y precipitación de LiCl (Sokolovsky *et al.*, 1990). Para la cuantificación y visualización del ARN se utilizo el espectrofotómetro y su integridad fue comprobada por la interpretación en gel de agarosa más formaldehído. En cuanto a los resultados la extracción con la solución TRI REAGENT es un procedimiento que puede ser completado en menos tiempo frente a otros métodos y la extracción usando fenol y precipitación de LiCl muestra una gran calidad de ARN total con alto rendimiento; el gel mostró bandas de ARN ribosomal de 28S y 18S indicando que con ambos métodos se puede aislar esta biomolécula del micelio de *C.bainieri*. El método que involucra fenol y precipitación LiCl produjo el máximo rendimiento de ARN con un promedio de $372 \pm 6,0 \mu\text{g}$



ARN/g del micelio y el ARN parece ser relativamente puro en rangos de absorbancia de A260/280 y A260/230 de 1,89 y 1,99, respectivamente. Finalmente, se demostró que este método puede producir ARN de suficiente calidad para RT-PCR que amplificó un fragmento de 600 bp del gen ácido desaturasa en *C. bainieri*.

Cury Jaime y Koo Hyun, en el año 2007, trabajaron en “extracción y purificación del ARN total de biofilms de *Streptococcus mutans*” con el objetivo principal de comparar varios métodos de extracción de ARN usando biofilms de *Streptococcus mutans* en cuanto a la extracción de ARN fueron utilizados los protocolos de acuerdo a Chen y colaboradores (1998) y Kuhnert y Quivey (2003) con algunas modificaciones. Ellos también examinaron otros procedimientos comúnmente utilizados en las extracciones de ARN, incluyendo kits comerciales que usan lisis para la matriz, enzimas (mutanolisina/lisozima) y Trizol, pero la producción de ARN fue 1,5 a 3,0 veces menor que el mecanismo de lisis celular en NAES–ácido fenol/cloroformo usado en este estudio. A los extractos se les trató con DNAsas para evitar contaminación. Se realizó la determinación de la integridad y pureza del ARN mediante espectrofotometría; además de un análisis por PCR- en tiempo real. Los resultados indicaron que la homogenización en cuanto al mecanismo de lisis celular en el buffer NAES y ácido fenol cloroformo tuvo un rendimiento de $547,2 \pm 23,4 \mu\text{g RNA}/100 \text{ mg peso seco del biofilm}$ lo que quiere decir que el ácido fenol cloroformo mejora la purificación de ARN sin afectar significativamente la producción de ARN. Se estandarizó una técnica para la extracción de ARN de *Streptococcus mutans* (mostrada en el documento); en cuanto al tratamiento con DNAsas la combinación de DNAsa I basado en columna sílica gel y DNAsa I recombinante en solución fue efectivamente removida y el ADN genómico fue determinado por PCR en tiempo real y por RT-PCR resultando en una producción de ARN de $92,0 \pm 0,6 \mu\text{g por } 100 \text{ mg del peso seco del biofilm}$; los resultados demuestran que el método que produce gran calidad de ARN de los biofilm de *S. mutans*, es suficiente para análisis de PCR- en tiempo real.



Vongsavanh Phongsisay y *et al*, en el año 2007, trabajaron en la evaluación de 8 métodos de extracción de ARN para el análisis transcripcional en *Campylobacter jejuni*. Todos los métodos que se evaluaron estaban en combinación de descontaminación con ADN (TURBO tratado con DNAsa y extracción ácido fenol) fueron comparados para la integridad concentración y pureza del extracto. Los métodos son la *Rneasy con Dnase column* (Qiagen), *RNAgent* (Promega), *RNAwiz* (Ambion), *RNAzol B* (Tel-Test), Trizol (Invitrogen), *Hot/SDS phenol ARN prep* y *Triton X-100-based mRNA-rich RNA isolation*. Además fue modificado el protocolo de *Triton X-100-based* en vez de ácido fenol (125:24:1, pH 4,5, Ambion) fue usado cloroformo. Los resultados mostraron que todos los métodos generaban ARN y sus valores de A260/A280nm fueron de 1,8, los métodos basados en Trizol y *hot/SDS ARN prep* mostraron altas cantidades de ARN (1,1 µg/µl), mientras que el rendimiento para los otros métodos fueron cercanos a 0,7 µg/µl. Un ARN de gran calidad fue obtenido por el *Rneasy con Dnase column*, *RNAwiz*, *RNAzol B*, y Trizol.



6. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar tres métodos de extracción de ARN en la cepa de referencia de *Candida albicans* IP 118079.

Objetivos específicos:

- Determinar el número aproximado de células necesarias para la obtención de ARN de esta levadura.
- Determinar bajo condiciones de laboratorio con cuál de los métodos se obtiene ARN de mejor calidad y mayor cantidad a partir del cultivo de *Candida albicans*.



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se empleo la cepa de referencia del Instituto Pasteur (IP) 118079, de *Candida albicans*, obtenida en el cepario del Centro de Investigación Biomédicas de la Universidad del Quindío se cultivo en medio agar sabouraud cloramfenicol, en el cual solo crecen levaduras. Se procedió a sembrar por estría. Se guardó el medio en una nevera de icopor a temperatura ambiente para que crecieran las colonias, después de un día, se procedió a colectar las células del medio de cultivo y se resuspendieron en 1 ml de solución salina. Este procedimiento se realizó antes de cada extracción de ARN.

7.2 CUANTIFICACION DEL NÚMERO DE CÉLULAS PRESENTES EN LA MUESTRA

Para este procedimiento cualitativo se tomó en cuenta la escala de concentraciones de Mc Farland, que tiene la utilidad de realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón cuantitativo (Fig. 3 y Tabla 2) la cual es también utilizada en levaduras; esta escala fue proporcionada por el Grupo PATOMOL del Centro de Investigaciones Biomédicas.



Figura 3. Fotografía de la escala de Mc Farland (en 41).



A los ependorf con las muestras resuspendidas en 1 ml de solución salina, se les realizó diluciones seriadas. Una primera dilución tomando de la muestra base 100 μ l y llevándolo a 1 ml con solución salina, observando la turbidez y comparándola visualmente con la turbidez de los tubos de la referencia de Mac Farland determinando así el número de células en la muestra.

Tabla 2. Escala turbidimétrica de Mc Farland se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico (42).

TUBO	BaCl ₂ 1%	H ₂ SO ₄ 1%	millones microorganismos /ml
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1200
5	0,5	9,5	1500
6	0,6	9,4	1800
7	0,7	9,3	2100
8	0,8	9,2	2400
9	0,9	9,1	2700
10	1,0	9,0	3000

7.3 LISIS DE LA PARED CELULAR

Para conocer cual es el mejor método de ruptura de la pared celular se analizaron 3 métodos de lisis los cuales son: choque térmico incubando las muestras 5 min a -80 °C, y después 10 min en baño María a 60 °C proceso que se repitió 5 veces. Sonicación de las muestras durante 1 min a 30 Hertz esto se repitió 5 veces. El último método fue el de lisis enzimática, se agregó a las muestras 293 μ l de EDTA 50mM y 7.5 μ l de la enzima liticasa, se incubó durante cuatro horas a 37°C, antes y después de tales métodos las células fueron observadas al microscopio (objetivo de 40x).



7.4 EXTRACCION DE ARN TOTAL

Después de realizar la lisis de la pared celular y determinar cual era el mejor método para romper tal barrera. Se llevó a cabo la extracción de ARN a partir de este, (12 extracciones por método) de *Candida albicans* empleando tres protocolos diferentes. Los protocolos evaluados son: un método casero con Fenol-cloroformo-isoamilico, y dos de uso comercial (estuche comercial *SV Total RNA Isolation System promega/* El reactivo Trizol Invitrogen), modificando algunos de los pasos indicados por los fabricantes, como se indica a continuación

7.4.1- Método casero Acido fenol-cloroformo-isoamilico: se tomaron las células y se centrifugaron a 6000 g durante 3 min, descartando el sobrenadante, resuspendiendo las células en 1 ml de agua dietil pirocarbonato (DEPC) y se centrifugaron a 6000 g por 3 min, descartando el sobrenadante y se resuspendió en 600 µl de buffer de extracción, inmediatamente se añadió igual volumen de Fenol: cloroformo isoamilico (PCI) se mezcló dejando 5 min a temperatura ambiente, se añadieron perlas de vidrio, vortex por 2 min a máxima velocidad, transfiriendo el sobrenadante a tubos nuevos, y se separaron fases por centrifugación a 1600 g durante 5 min, transfiriendo la fase acuosa y añadiendo 450 µl de PCI, 350 µl de cloroformo: isoamilico (SEVAG), se añadieron 40 µl de acetato de sodio, de 80 µl de etanol al 95% y se guardo una hora a -20°C. Se centrifugó a 9000 g por 3 min y descartando el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 300µl de etanol al 70%, y centrifugando a 9000 g durante 3 min y se descarto el sobrenadante y dejándolo secar el *pellet* antes de resuspenderse en 50 µl de agua DEPC, almacenándolo a -80°C. (43).

7.4.2- Estuche comercial *SV Total RNA Isolation System promega*: se le agrego a las diluciones β- mercaptoetanol al 1%, incubándolo a 30°C de 15 a 30 min, se añadió 7,5 µL de sv buffer lisis ARN, mezclando por inversión y centrifugando a



máxima velocidad por 10 min, se añadió 350 µl de buffer dilución ARN mezcló por inversión y centrifugando a máxima velocidad por 10 minutos, se añadió 200 µL de etanol al 95%, pipeteando 3-4 veces, transfiriendo al contenedor de la matriz de purificación poniéndolo dentro del tubo colector y centrifugando a 8000 x g por 1 min, retirando el líquido del tubo colector, agregando 600 µL de sv solución de lavado ARN, se centrifugó a 8000 x g por 1 min, descartando el sobrenadante del tubo colector. se preparó la mezcla de DNAsa (40µL buffer amarillo, 5µL de MNCL2 al 0.09 M y 5µl de la enzima DNAsa 1) en un tubo estéril, pipeteando suavemente, sin vortex, se mantuvo la DNAsa en hielo, se añadió 50µL de DNAsa directamente a la membrana del contenedor, incubando por 5 min de 20-25 °C, agregando 200 µL de sv solución de parada de la DNAsa al tubo, se centrifugó a 8000 x g por 1 min, añadiendo 600 µL de sv solución de lavado ARN y centrifugando a 8000 x g por 1 min, eliminando sobrenadante del tubo y se añadió 250µL de sv solución de lavado ARN, se centrifugó a la máxima velocidad por 2 min, poniendo este sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió 100 µL de agua libre de nucleasas, a la membrana del tubo, centrifugando a 8000 x g por 1 min, descarto sobrenadante y se resuspendió en 50µl de agua DEPC almacenándolo a -80°C (35).

7.4.3- Reactivo Trizol: Se usó 1 ml de Trizol para lisar las células de la levadura, pipeteando repetidamente; incubando las muestras a temperatura ambiente por 5 min y centrifugando a 12.000 x g por 6 minutos, se descartó sobrenadante, agregado 800 µl de agua DEPC, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió 200 µl de cloroformo, agitando vigorosamente por 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 3 min, centrifugando a 12.000 x g por 15 min de 2 a 8°C, separando la fase acuosa superior; y se transfirió esta fase a un tubo nuevo, añadiendo 500 µl de alcohol isopropil, se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min, centrifugando a 12.000 x g de 2 a 8°C, removiendo el sobrenadante, se lavo el pellet con 1 ml de etanol al 75%, vortex, centrifugando a 7.500 x g por 5 min de 2 a 8°C, dejando secar brevemente el pellet a temperatura



ambiente, se disolvió el ARN en agua DEPC, y incubando por 10 min de 55 a 60°C y almacenándolo a -80°C (44).

7.5 CUANTIFICACION DEL ARN TOTAL Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA

La cuantificación de ARN se realizó por espectrofotometría, para lo cual se emplearon cubetas de cuarzo, se tomaron 10 µL de la muestra y fueron resuspendidas en 490 µL de la solución de rehidratación (agua DEPC) y se determinó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm.

7.6 PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Para la obtención de muestras de ARN menos contaminadas se procedió a tratar: todos los extractos, con DNAsas, incubándolas por 10 min a 37°C, se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min, descartando sobrenadante y resuspendiendo en 500 µl de isopropanol, pipeteando tres veces, se centrifugó a 13.000 por 1 min, se descartó el sobrenadante, resuspendiendo en 50 µl de isopropanol y formamida según lo sugerido en el protocolo del reactivo Trizol y por Gurman y colaboradores (2008) (45). Se procedió a leer su absorbancia, tomando 20 µl de la muestra de ARN y resuspendiéndola en 180 µl del blanco (solución en el que se resuspendieron las muestras).

7.7 VISUALIZACIÓN DEL ARN TOTAL MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para determinar la presencia del ARN extraído se procedió a la separación electroforética de 10 µl de la muestra. Para la preparación del gel al 2 % debido a al bajo peso de este ácido nucleico, se mezclaron 0,8g de agarosa con 40ml del buffer TBE al 0,5X y teñido con 0,7 µl de bromuro de etidio; se empleó un voltaje de 50 w, y



por último para visualizar las bandas de ARN se expuso el gel a luz ultravioleta y se realizó la documentación del gel para identificar las bandas resultantes.

7.8 DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN DE ADN EN LAS MUESTRAS DE ARN TOTAL

En las muestras que contenían un número aproximado de 2400 millones de m.o/ml y en las cuales se evidenció la banda de ARN total, se procedió a realizar un tratamiento con 5 µl de la muestra más 5 µl de la enzima RNAsa y otro tratamiento de 5 µl de la muestra con el mismo volumen de DNAsa, incubándola a 37°C por 20 minutos y corriendolas nuevamente en un gel de agarosa al 2% para observar la no presencia de banda en las muestras tratadas con ribonucleasas y la presencia de dicha banda en las tratadas con DNAsas, para concluir si realmente nuestro extracto es del ácido ribonucleico.



8. RESULTADOS

8.1 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS PRESENTES EN LA MUESTRA

La cuantificación de las células resuspendidas en 1 ml de solución salina fue posible gracias a la escala Mac Farland. Los resultados muestran que según el grado de turbidez, se puede decir que cualitativamente el número aproximado de células presentes en nuestras diluciones fue de 2400; 1200 y 300 millones de microorganismos por mililitro (m.o/ ml).

8.2 LISIS DE LA PARED CELULAR

Este análisis demostró que el mejor método para la ruptura de la pared celular de la levadura *Candida albicans* fue el enzimático dado que al microscopio (objetivo de 40x) se observó un mayor número de células lisadas generando pequeños fragmentos celulares en comparación con los otros dos métodos de lisis (física). Por lo tanto se escogió el método enzimático para lisar la pared celular antes de la extracción.

8.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para cada uno de los protocolos se realizaron 12 extracciones: cuatro contenían un número de 2400 millones (m.o/ml), otras cuatro contenían un número de 1200 (m.o /ml) y las últimas cuatro contenían un número de 300 millones (m.o /ml). El tiempo empleado para cada extracción fue de aproximadamente 2 horas y 10 min.



8.4 CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL Y DETERMINACION DE LA PUREZA

La concentración y pureza de los tres métodos para extraer ARN se resume en la tabla 3, mostrando que para cada una de las diluciones en cuanto a una mayor concentración de ARN el método del ácido fenol cloroformo isoamílico fue el mejor obteniendo en promedio 228 µg/ml, aunque su desviación estándar, presenta datos más altos que este, lo que sugiere que los valores utilizados para este promedio están muy dispersos, mientras que el estuche de promega produjo una menor concentración (promedio 55,5 µg/ml) y el reactivo Trizol produjo en promedio 83,5 µg/ml de ARN por ml. en cuanto a la pureza (A260/A280) ninguno de los métodos para cada dilución, reportó un rango óptimo el cual es de 1,7-2,1 (35). Mientras que la relación de A260/A230 demostró que las muestras estaban contaminadas con polisacáridos, pues su rango óptimo es de 1,8-2,2 (35) y los valores encontrados fueron más bajos.

Tabla 3. Comparación de la producción y calidad del ARN extraído por los tres métodos para cada una de las diluciones. Por la dilución

Protocolos	Numero de células (mil m.o /ml)	Concentración de ARN (µg/ml) promedio±SD	A 260/280 Promedio±SD	A 260/230 Promedio±SD
fenol cloroformo isoamílico	2400	228±218	1,55±0,10	0,80±0,50
	1200	223±314	1,13±0,14	1,10±0,31
	300	220±248	1,14±0,12	1,13±0,44
Reactivo Trizol invitrogen	2400	95,6±19,4	1,13±0,12	0,37±0,09
	1200	81,9±20	0,77±0,03	0,26±0,08
	300	73,2±19	0,93±0,04	0,27±0,10
Estuche SV Total RNA Isolation System promega	2400	72,3±21	1,28±0,12	0,08±0,01
	1200	60,6±13	1,13±0,11	0,19±0,13
	300	33,8±7	1,09±0,06	0,4±0,11



Los valores representan los promedios de 4 diferentes extracciones de ARN para cada una de las diluciones, mostrando la producción, pureza y grado de contaminación por polisacáridos.

8.5 PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Este análisis demostró que en las muestras extraídas a partir de un número aproximado de 1200 y 300 millones de m.o/ml para cada método y resuspendidas en isopropanol, disminuye la contaminación de polisacáridos y las lecturas de absorbancia a A260/A280 tienden al rango óptimo de pureza (1,28 ácido fenol cloroformo, 1,45 reactivo Trizol, 1,4 *SV total RNA Isolation system*) mejorando el promedio de la lectura anterior. En cuanto a las muestras a partir de un número aproximado de 2400 millones de m.o/ml para cada método y resuspendidas tanto en isopropanol como en formamida reportan en promedio, rangos correspondientes a la pureza del ARN (1,7 a 2,1) (tabla N° 4); mientras que la contaminación con polisacáridos sigue estando presente en estas muestras pero no en tan alta proporción.

Tabla 4. Espectrofotometría de la precipitación de ARN de las bandas visualizadas

Muestras de los tres métodos	Concentración de ARN ($\mu\text{g/ml}$)* promedio \pm SD	A 260/280 promedio \pm SD	A 260/230 promedio \pm SD
fenol-I	16,4 \pm 0,05	0,10 \pm 0,01	1,49 \pm 0,02
Trizol-I	8 \pm 0,14	1,56 \pm 0,02	0,79 \pm 0,02
<i>SV Total RNA-I</i>	5,5 \pm 0,15	1,75 \pm 0,02*	1,21 \pm 0,02
fenol-F	28,8 \pm 0,15	1,24 \pm 0,14	1,63 \pm 0,02
Trizol-F	25, \pm 0,28	1,94 \pm 0,02*	0,68 \pm 0,14
<i>SV Total RNA-F</i>	78,4 \pm 0,05	1,58 \pm 0,02	1,07 \pm 0,02

Los datos mostrados representan el promedio de dos muestras de cada uno de los métodos leídos en el espectrofotómetro,* representa la pureza encontrada en las muestras de ARN; y las letras I y F representan la soluciones en las que están resuspendidas dichas muestras (I=isopropanol y F=formamida).



8.6 VISUALIZACIÓN DEL ARN TOTAL MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La presencia del ARN extraído se puede observar en la figura 4. Los geles representan cada uno de los tres métodos utilizados para las extracciones, estos muestran que las bandas de ARN total resultantes son de un número aproximado de 2400 millones (m.o/ml).

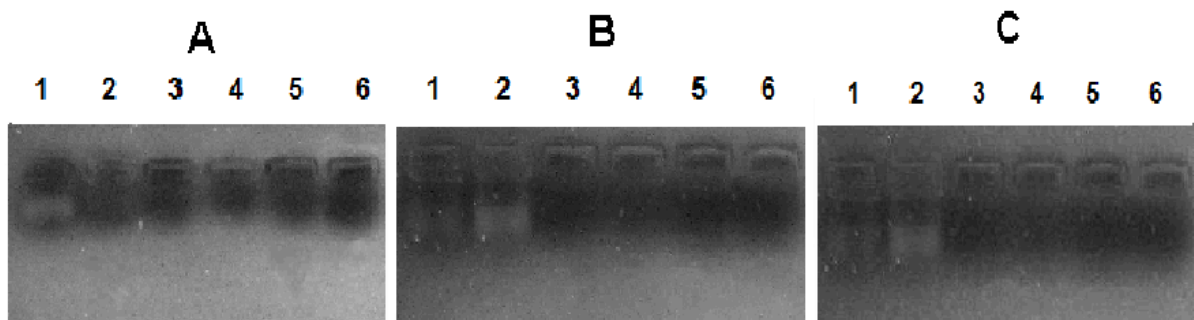


Fig. 4 Electroforesis en gel de agarosa al 2%, refleja las bandas de ARN de las muestras extraídas con el reactivo (A) ácido fenol cloroformo, (B) Trizol y con el estuche (C) *SV Total RNA Isolation System*. Los carriles 1 y 2 de los geles A, B y C, muestran las bandas de ARN obtenido de un número aproximado de 2400 millones m.o/ml. Los carriles 3 y 4 de los geles A, B y C, contienen los extractos de ARN a partir de un número aproximado de 1200 m.o/ml y los carriles 5 y 6 de los geles A, B y C contienen los extractos de ARN a partir de un número aproximado de 300 millones m.o/ml.

8.7 DETERMINACIÓN DE CONTAMINACIÓN DE ADN EN LAS MUESTRAS DE ARN TOTAL

En la digestión enzimática con RNAsas y DNAsas de las bandas visualizadas en el gel de agarosa, se comprobó que los extractos obtenidos efectivamente eran ARN, debido a que las muestras tratadas con DNAsas se observan en el gel, mientras que las tratadas con RNAsas no se ven, algunas de las bandas son muy leves en su intensidad (Fig. 5).

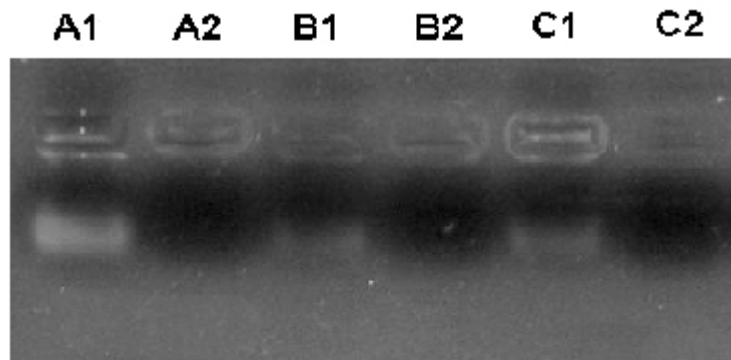


Fig. 5 Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de las muestras de ARN visualizadas a partir de un número de 2400 millones (m.o/ml). (A) Acido fenol cloroformo, (B) Trizol y (C) estuche *SV Total RNA Isolation System*; (1) muestras de ARN tratadas con DNAsas; (2) muestras de ARN tratadas con Ribonucleasas.



9. DISCUSIÓN

Las células fúngicas, incluidas las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, están rodeadas por una pared celular rígida que varía en grosor y composición dependiendo de las condiciones de crecimiento, y que pueden ser una barrera para la extracción de los contenidos celulares **(39)**. Diferentes técnicas han sido utilizadas para extraer los componentes celulares rompiendo la pared de *C. albicans*, estos incluyen métodos físicos, químicos y enzimáticos y la combinación de ellos **(4)**. El tratamiento con liticasa puede remover efectivamente la barrera que es la pared celular y generar sus contenidos intactos **(39)**. Por tal motivo se requiere una cantidad considerable de células para que esta enzima pueda generar una amplia ruptura y conseguir mayor liberación de sus componentes celulares, como lo revelado en los resultados obtenidos en esta investigación, que demostraron que la enzima liticasa es un método eficiente para la remoción de la pared celular de esta levadura, además indica que el número aproximado de células para la extracción de ARN es de 2400 millones m.o/ml de acuerdo a la escala estandarizada de Mc Farland (para los tres métodos), esto debido a que a mayor número de células, más células lisadas y por lo tanto mayor liberación de este ácido nucleico.

En los datos obtenidos en la espectrofotometría de los tres métodos para las diferentes diluciones, se comprobó que en promedio estos extractos no estuvieron en los rangos óptimos de pureza (estimado por la relación A260/A280) reportando 1,27 para el método ácido fenol, 0,94 para el reactivo Trizol y 1,16 para el estuche de Promega, mientras que la literatura sugiere que el rango óptimo de pureza estimada debe de ser de 1,7 a 2,1 **(35)**. Estos datos son diferentes a los reportados por investigadores tales como: Noor Adila y colaboradores (2007) obtuvieron un rango de pureza para el método de Trizol de 1,78 para el hongo *Cunninghamella bainieri*. Nuyts y colaboradores (2001) **(38)**, quienes trabajando con ARN de *Clostridium* obtuvieron para el estuche SV de Promega un rango de pureza de 2,0. Cury y Koo (2007) quienes trabajando con *Streptococcus mutans* utilizando el método del ácido fenol, presentó un rango de 2,10 de pureza. Vongsavanh



Phongsisay y colaboradores (2007) (40) quienes para el reactivo Trizol obtuvieron un rango de pureza de 1,8 del extracto de ARN de *Campilobacter jejuni*. Estas anteriores son bacterias que tienen componentes en la pared celular similares pero no iguales a la de las levaduras, los cuales también generan una limitante para la obtención del ácido ribonucleico.

Los resultados obtenidos en la relación A260/A280 para cada una de las diluciones indican la posibilidad de contaminación con proteínas y ADN genómico (35) esto debido a la falta de tratamientos con DNAsa los cuales no son sugeridos por dos de los métodos evaluados, como son el casero (fenol cloroformo) y uno comercial (Trizol) esto ocasiona que la lectura de la pureza no este dentro del rango aceptado. En cuanto a la concentración de ARN obtenida, difiere para cada uno de los métodos, lo que confirma lo sugerido por Greenspoon y colaboradores en el año 1998, quienes sustentan que el patrón de rendimiento para los protocolos actualmente disponibles no es homogéneo, pero además estos resultados pueden indicar, la pérdida que se genera al someter la muestra a cambios de temperatura y pueden expresar cierta degradación debido a las ribonucleasas (RNAsas) aunque se tomaron ciertas precauciones para evitar esto (tratamiento a todo el material con agua dietil pirocarbonato (DEPC), y cambio de guantes durante todo el procedimiento (45)); fue difícil debido a que las RNAsas se encuentran haciendo parte de las partículas de polvo, en el sudor, la saliva, fuera y dentro de las mismas células. Se sabe que una sola célula puede contener hasta 20 RNAsas diferentes, las cuales pueden hacer parte de complejos supramoleculares (interacciones entre moléculas) y funcionar en conjunto con otras enzimas (46), por lo que una de las principales acciones a tomar después de la ruptura de la pared celular es la inactivación de estas enzimas, con inhibidores tales como el agua DEPC.

Los rangos derivados de la relación A260/A230 que estima la contaminación con polisacáridos fueron en promedio 1,01 (método ácido fenol), 0,30 (Trizol) y 0,41 (estuche SV de promega), lo cual nos indica una contaminación con polisacáridos



luego de emplear cada uno de estos protocolos, puesto que el rango óptimo en esta relación es de 1,8-2,2 (35). Los resultados son coherentes, pues la pared celular de *Candida albicans* contiene una gran cantidad de estos componentes (3, 4) y no se les hizo un tratamiento para su eliminación, esto concuerda con el trabajo realizado por Cury y Koo, los cuales extrajeron y purificaron ARN de *Streptococcus mutans*, la cual es una bacteria con una matriz celular semejante a la de *C. albicans*, y en sus resultados, antes de los tratamientos con DNAsas y lavados con alcoholes, adquirieron este tipo de contaminación (1,8; 1,1 y 0,7 en tal relación).

En la purificación del ARN, debido al tratamiento tanto con DNAsas y el lavado con isopropanol, para todos los extractos, se eliminó una gran proporción de la posible contaminación con ADN y/o proteínas de los extractos lo cual produjo una muestra más apta pero no pura y con menos contaminación con polisacáridos, estos resultados son muy similares a los obtenidos por Cury y colaboradores (2007), quienes después del tratamiento con DNAsas y otros reactivos, lograron mejorar la calidad de la muestra.

En los resultados de la purificación del ARN total según lo sugerido en el protocolo del reactivo Trizol y por Gurman y colaboradores en el 2008 (47), se pudo comprobar que debido a el número de lavados, y por el cambio de temperatura que se da en la muestra, aumenta la pérdida del extracto de este ácido nucleico, pues se obtuvo menor concentración de ARN en cada uno de los métodos. En cuanto a la pureza mejoraron los resultados debido a que 2 de las muestras (Trizol-Isopropanol y SV Total RNA-Formamida) (Tabla 4) tienen un rango muy aproximado a 1,7 y las muestras que produjeron rangos de pureza al 1,94 fue el reactivo Trizol-F y 1,75 del estuche SV Total RNA-I. Por lo anterior se puede asegurar que tanto el alcohol isopropanol como el reactivo formamida son apropiados para purificación de la muestra de ARN. Los anteriores datos se encuentran dentro del rango óptimo de pureza (35). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Nuyts y colaboradores (2001), para el estuche SV de Promega un rango de pureza de 2,0 y



por Vongsavanh Phongsisay y colaboradores (2007) (40) quienes para el reactivo Trizol obtuvieron un rango de pureza de 1,8.

El método del fenol es el más utilizado, pero se ha disminuido y/o eliminado su uso en algunos centros de investigación, debido a que éste es un reactivo muy tóxico y complejo. Por lo anterior se han venido realizando estudios con el fin de mejorar las metodologías para extraer el ARN, sin el uso de reactivos tóxicos, como lo han propuesto en el trabajo desarrollado por Rivas y colaboradores en el 2001 (48). Según nuestros resultados el método del fenol reporta que en cuanto a la efectividad en la precipitación del ARN, la pureza mostrada por este, en la relación A260/A280 no fue la más óptima, tanto para las muestras de ARN resuspendida en isopropanol (pureza promedio 0.10), como para las resuspendida en formamida (pureza 1.24), estos resultados son similares a los presentados por Nuyts y colaboradores que encontraron que su muestra no presentaba pureza (1.4); lo anterior es diferente a lo reportado en trabajos como los presentados por autores como Cury y Koo (pureza 2,10) para tal método.

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular (49). la electroforesis horizontal fue utilizada para la visualización del ARN, pues es con la que generalmente se trabajan los ácidos nucleicos, con esta se demostró que esta biomolécula estaba presente, pero no se pudo correr esta muestra con marcador de peso molecular debido a que al hacerlo el ARN se degradaba al dejar que la muestra bajara tanto como debía de descender este marcador y en nuestra metodología solo se necesitaba la obtención de la banda para aceptar la presencia del ácido nucleico total, esto también puede deberse a que el buffer no estaba tratado con agua libre de RNAsas (DEPC) por lo que se cree que fueron estas las que lo degradaban, cabe anotar que se realizaron ensayos con agarosa y buffer que contenían formaldehído (utilizado en la mayoría de nuestros antecedentes), un reactivo que le confiere



protección al ARN contra las enzimas, pero no se pudo establecer esta metodología para este trabajo, pues los geles quedaban demasiado brillantes aun cuando se bajaba el volumen de bromuro de etidio que se le añadía por lo que la muestra no se veía.

Por lo anterior, se realizo un ensayo para eliminar una posible contaminación con ADN en los extractos y comprobar de esta manera que se trataba del acido ribonucleico, las muestras se trataron con RNAsas y las mismas muestras pero en otros tubos con DNAsas, al visualizarlas de nuevo en el gel se mostro, que las tratadas con DNAsas se encontraron presentes y las que se trataron con ribonucleasas no se visualizaron; esto coincide con los resultados del trabajo de Nuyts y colaboradores en el que ellos transfirieron por vacio las bandas presentes, a una membrana y realizaron un *slot blot*, en el cual se dio un tratamiento con RNAsas mostrando la presencia de banda en las muestras no tratadas y la no visualización en las muestras tratadas con tales enzimas, por lo cual se acepto la presencia del extracto de ARN.



10. CONCLUSIONES

Para la obtención del ARN presente en la levadura *Candida albicans* se necesita de aproximadamente 2400 millones de microorganismos por ml, lo anterior en base a la tabla referencia Mc Farland; pues en las extracciones que se llevaron a cabo se produjo banda en el gel y fueron en las que se obtuvo una rango de pureza dentro de lo óptimo con dicho numero de células levaduriformes.

El método con el cual se obtuvo mayor pureza y concentración es el reactivo Trizol pureza de 1,94, (aunque su rendimiento no fue el mas optimo), resuspendida en formamida aunque el estuche *SV Total RNA Isolation System* promega también se obtuvo una buena pureza y concentración (1.75 A260/A280) resuspendida en isopropanol.

El éxito del aislamiento de ARN intacto requiere 4 pasos esenciales: una efectiva disrupción de células y tejido, denaturación de complejos nucleoproteicos, inactivación de la actividad de las ribonucleasas (RNAsas) endógenas y remoción de contaminación por ADN y proteínas.



11. RECOMEDACIONES

Incubar con DNAsa durante la extracción de ARN para eliminar los residuos de ADN todavía presentes. Cambiar de guantes durante el procesamiento

Todo material que entre en contacto con la muestra debe de estar libre de RNAsas y completamente esterilizado, tratados con DEPC (dietil pirocarbonato). Tener en cuenta la contaminación corporal (saliva y sudor).

Aplicarle a las muestras métodos para la remoción de los polisacáridos de la pared celular, los cuales también dificultan la extracción del ácido ribonucleico de buena calidad.

Realizar varios lavados con alcoholes después de tener el extracto de ARN para precipitar aun más las contaminaciones con ADN y proteínas, aunque con esto es posible perder parte del producto.



12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Firon Arnaud and d'Enfert Christophe. Identifying essential genes in fungal pathogens of humans. *TRENDS in Microbiol* Vol.10 No.10 review. 2002. pp. 456-462.
2. Okeke Charles N., Tsuboi ryoji, and Ogawa Hideoki. Quantification of *Candida albicans* Actin mRNA by the LightCycler System as a Means of Assessing Viability in a Model of Cutaneous Candidiasis. *J. of clin. Microbiol.* Vol. 39, No. 10. 2001. pp. 3491–3494
3. Kolla´r R, Reinhold BB, Petra´kova´ E, Herman J C, Yehi, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn J C, Klis F M, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall $\beta(1\rightarrow3)$ -d-glucan, interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow6)$ -d-glucan, and chitin. *272*, 28. 1997. pp. 17762–17775.
4. Chaffin w. Lajeau, López-ribo José Luis, Casanova Manuel, Gonzalbo Daniel, and Martínez José p. Cell wall and secreted proteins of *candida albicans*: identification, function, and expression *microbiology and molecular biology reviews*. vol. 62, No 1. 1998. pp. 130–180.
5. Etienne-Decant Jacqueline, Françoise Millot, Elena (trad.) Alhaja Prez, Elena. *Bioquímica genética, biología molecular* Publicado por Elsevier España. 2001. <http://books.google.com.co/books?id=33GI dnSf56oC&pg=PA3&dq=acidos+nucleicos>
6. Noor Adila, A.K., Farah Diba, A.B., Zamri, Z., Wan Mohtar, W.Y., Aidil, A.H., Mahadi, N.M. and Murad, A.M.A. Comparison of methods for isolating high quality DNA and RNA from an oleaginous fungus *Cunninghamella bainieri* strain 2a1.



School of Biosciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600. Mal. J. Microbiol. Vol 3(1). 2007. pp. 7-13.

7. Cury Jaime A, Koo Hyun. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil. Eastman Department of Dentistry and Center for Oral Biology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14620, USA. Anal. Biochem. 365. 2007. pp. 208–214.

8. Mukhtarb Muhammad, Parveenc Zahida, Logana David A. Isolation of RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. J Microbiol Meth 33, 1998. pp. 115–118.

9. Greenspoon S. A, Scarpetta M. A, Drayton M. L, Turek S. Qiaamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. j forensic sci; 43. 1998. pp. 1024-1030.

10. Castro Méndez Carmen y Martín Mazuelos Estrella. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis* Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla. 2008. pp. 1-11.

11. Olea Barrionuevo Delfina. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ e pacientes con infección por VIH. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis Doctoral. D.L.: Gr 2178. ISBN: 84-338-4143-2. 1995.

12. Bial – Arístegui. *Candida albicans* (Robin) Berkhout Rev Iberoam Micol. 2002. pp. 25-26.

13. Edwards J.E Jr. *Candida species*. En Olea Barrionuevo Delfina. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ e pacientes con infección



por VIH. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis Doctoral. D.L.: Gr 2178. ISBN: 84-338-4143-2. 1995.

14. De Backer Marianne D., Magee Paul T., and Pla Jesus. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 54. 2000. pp. 463–98.

15. Trost A, Graf B, Eucker J. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Meth*; 56. 2004. pp. 201-211.

16. Castrillón Rivera Laura Estela, Palma Ramos Alejandro, Desgarenes Padilla Carmen. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermat. Rev Mex*; 49. 2005. pp. 12-27.

17. Poulain Daniel and Jouault Thierry. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Current Opinion in Microbiol*, 7. 2004. pp. 342–349.

18. Martínez-Esparza M., Sarazin A., Jouy N., Poulain D., Jouault T. Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry. *J. of Immunol. Meth.* 314. 2006. pp. 90–102.

19. Kriznik Alexandre, Bouillot Margareth, Coulon Joël, Gaboriaud Fabien. Microbiology: Morphological specificity of yeast and filamentous *Candida albicans* forms on surface properties. *C. R. Biologies* 328. 2005. pp. 928–935.

20. Einsele H., Hebart H, Roller G. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 35. 1997. pp. 1353-1360.



21. Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridisation. J Clin Microbiol; 40. 2002. pp. 4308-4312.
22. Rinaldi MG. Biology and pathogenicity of candida species. En Olea Barrionuevo Delfina, 1995. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ e pacientes con infección por VIH. Editorial de la Universidad de Granada. Tesis Doctoral. D.L.: Gr 2178. ISBN: 84-338-4143-2. 1993.
23. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology taxonomy of *Candida* species. J. Clin. Microbial. 25. 1987. pp. 675-9.
24. Salas Téllez Enrique., Arenas Roberto, *sin fecha*. Biología molecular en micología médica. U.N.A.M. Cátedra de Inmunodiagnóstico de Enfermedades Micóticas y Bacterianas. Departamento de Dermatología. Hospital General Dr. Manuel Gea. pp. 1-4.
25. Guzmán D, Ana maría. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras, microbiología clínica, Rev Chil Infect.; 21 (1). 2004. pp. 39-47.
26. Dorado Pérez Gabriel, Aislamiento y visualización de ácidos nucleicos Departamento de bioquímica y biología molecular, campus universitario de rabanales, edificio severo Ochoa, 14071-córdoba. pp. 11. Fecha de consulta 8 de septiembre de 2008. <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimicabi/olmol/pdfs/42%20aislamiento%20visualizaci%c3%93n%20acidos%20nucleicos.pdf>
27. Peña Díaz, Antonio. Bioquímica. Edición: 2, Capitulo VI los ácidos nucleicos, moléculas de la herencia. Publicado por Editorial Limusa, 1988. <http://books.google.com.co/books?id=EFUP472dyEMC&pg=PA170&dq=acidos+nucl eicos#PPA166,M1>



28. Pérez Meza Selene, Silva Álvarez Corina, Aislamiento de ARN totales del encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*. Primer foro de experiencias PAEA, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Secretaría General Académica, Fecha de consulta 17 de agosto de 2008. <http://www.iztacala.unam.mx/temas/foropaea/14TB071a.htm>.

29. Griffin Rodger W, Granados Jarque Ricardo, Meléndez Andreu Enrique, Química organica moderna. 1981. <http://books.google.com.co/books?id=qczDaJkEpSEC&pg=PA530&dq=acidos+nucleicos#PPA530,M1>

30. Ácidos nucleicos. Fecha de consulta 8 de septiembre de 2008. <http://www.ehu.es/biomoleculas/1b/pdf/acidosn.pdf>.

31. Bioquímica universidad nacional del nordeste (unne) facultad de odontología Material de apoyo a distancia para aspirantes a cursar la carrera de odontología departamento de educación no presencial. Fecha de consulta 8 de septiembre de 2008. pp. 1-6. <http://odn.unne.edu.ar/acinuc.pdf>.

32. Slater, R.J. Experiments in molecular biology. Humana Press. USA. pp. 109-129. 1986 <http://books.google.com.co/books?id=XK4LEqXFC54C&pg=PR3&dq=Experiments+in+molecular+biology.+Humana#PPA2,M1>

33. Teijon rivera José maría. Bioquímica estructural conceptos y test. Tebar. Fecha de consulta 15 de noviembre de 2008. <http://books.google.com.co/books?id=BPOTvYykwAC&pg=PA162&dq=acido+ribonucleico&lr=#PPA162,M1>

34. Peña aranda araceli Biología 4º eso. Ácidos nucleicos. Torre olvidada. Torre del campo. Fecha de consulta 8 de septiembre de 2008.



http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iestorreolvidada/ciencias/ESO4/1acidos_nucleicos.pdf

35. Promega Corporation, Technical Manual SV Total RNA Isolation System- 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA. Fecha de consulta Enero del 2008. www.promega.com.

36. Tzung Weei-Keh, Williams M. Roy, Scherer Stewart, Federspie Nancy, Jones Ted, Hansen Nancy, Bivolarevic Vesna, Huizar Lucas, Komp Caridad, Surzycki Ray, Tamse Raquel, Davis W. Ronald, and Agabian Nina. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans* PNAS vol. 98 no. 6. 2000. pp. 3249–3253.

37. Hoyer Lois L. The ALS gene family of *Candida albicans* TRENDS in Microbiol. Vol.9. 2001. pp. 176- 180.

38. Nuyts S., Van Mellaert L., Lambin P. Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. J. of Microbiol. Meth. 44. 2001. pp. 235–238.

39. Uppuluri Priya, Perumal Palani & Chaffin W. LaJean. Analysis of RNA species of various sizes from stationary-phase planktonic yeast cells of *Candida albicans* Department of Microbiology and Immunology, FEMS yeast res 7. 2006. pp.110–117.

40. Vongsavanh Phongsisay, Viraj N. Perera, Benjamin N. Fry. Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. J. of Microbiol. Meth. 68. 2007. pp. 427–429.

41. Tabla de McFarland fecha de consulta 20 enero 2009. <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/c.htm>,



42. Salcedo D. La microbiología clínica y laboratorio Bioquímico EN Rodríguez Limach Verónica efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (camping off) en plantas de tomate, tesis magíster en microbiología. 2002.
43. Protocolo para la extracción de ARN, ácido fenol cloroformo isoamilico Fecha de consulta Enero del 2008.
<http://labs.fhcrc.org/gottschling/Yeast%20Protocols/rprep.html>.
44. Trizol reagent Total RNA Isolation. Reagent U.S. Academic and Government TECH-LINE SM U.S. Industrial TECH-LINE. Fecha de consulta Enero del 2008.
www.invitrogen.com.
45. Guía práctica para la utilización de muestras biológicas en investigación biomédica, capítulo 2, 2006. pp. 51-76.
46. Deutscher MP, Li Z, Exoribonucleases and Their Multiple Roles in RNA Metabolism, en Úsuga Xiomara, Rugeles María Teresa 2006 Ribonucleasas: Su potencial terapéutico en infecciones virales. Grupo Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia. 2001. pp. 11.
47. Gurman S, Pall y Andrew J. Hamilton. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. Nat Protoc; 3(6). 2008. pp. 1077-84.
48. Rivas Raúl, Nieves Vizcáno, Rubén M. Buey, Pedro F. Mateos, Eustoquio Martínez-Molina, Encarna Velásquez. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. Departamento de Microbiología y Genética, Lab. 209, Spain. J. of Microbiol. Meth. 47. 2001. pp. 59–63.



49. Yabar Varas C.A. manual de procedimientos de electrophoresis para proteínas y ADN. Serie de normas técnicas N° 38. División de biología molecular, centro nacional de salud publica, instituto nacional de salud. Lima Perú. 2003. pp. 69.