

PURIFICACIÓN DE RNA PARA EVITAR LA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA INDUCIDA POR DEXTRÁN SULFATO DE SODIO



Bernardo Oldak
Pasante de servicio social, Facultad de Ciencias de la Salud
beroldak@gmail.com



Mayra Cruz Rivera
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
mayracr@yahoo.com



Ana Flisser
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
flisser@unam.mx



Fela Mendlovic
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac campus Norte
fmendo@yahoo.com

Introducción

Existen distintos modelos murinos estandarizados para la enfermedad inflamatoria intestinal, clasificados en cuatro grandes grupos: químicos, biológicos, genéticos y por transferencia de células [1], y los más utilizados son los modelos químicos, como los que usan sulfonato de trinitrotolueno (por vía rectal, causando una lesión localizada en el colon terminal) y dextrán sulfato de sodio (DSS) (en el agua para beber; causa pangastroenteritis, simulando la enfermedad de Crohn) [2, 4].

A pesar de que existen algunos estudios recientes que demuestran la inhibición de la transcriptasa reversa y la DNA polimerasa por DSS y se proponen algunos protocolos para su limpieza [5], no se utilizan en las publicaciones que utilizan este modelo de colitis. Asimismo, en nuestras manos los protocolos de doble precipitación con cloruro de litio (LiCl) propuestos causan una pérdida importante de la muestra [5,6], por lo que se planteó establecer un protocolo de purificación RNA con cloruro de litio que evite la inhibición tanto de la DNA polimerasa como de la transcriptasa inversa por DSS, con la mayor eficiencia de recuperación del RNA en el modelo murino de inflamación intestinal.

Material y Método

Se usaron 5 grupos de ratones hembra Balb/c, con distintas concentraciones y marcas de DSS (Cuadro 1) por 7 días, con la necropsia en el séptimo día. Se tomó 1 cm de colon (Figura 1), se colocó en 500 μ l de trizol[®] (protocolo del fabricante), se cuantificó por espectrofotometría y se verificó la calidad del RNA obtenido con el cociente 260nm/280nm, se realizó la precipitación con distintas molaridades de LiCl, alcoholes y sales, y se cuantificó nuevamente. Se le aplicó tratamiento con DNAsa I[®] (Invitrogen) y se realizó retrotranscripción con Superscript III[®] (ThermoFisher). Finalmente, se realizó el PCR tiempo real utilizando sondas taqman para detectar β -actina y se compararon los puntos de corte (Cp).

Grupo	Marca de DSS	Concentración (%DSS)	Número de ratones
Grupo 1	NA*	NA*	3
Grupo 2	AFFYMETRIX [®]	3	3
Grupo 3	MP BIOMEDICAL [®]	3	3
Grupo 4	AFFYMETRIX [®]	4	4
Grupo 5	AFFYMETRIX [®]	5	5

*NA no aplica el grupo 1 se utilizó como control por lo que no se agregó DSS.
Cuadro. 1 Distribución de los grupos experimentales.

Resultados

A pesar de que los valores obtenidos del cociente 260/280 por espectrofotometría eran aceptables incluso antes de la precipitación con LiCl, se observó una desviación estándar importante y un atraso de 8 ciclos en los Cp de β -actina en todos los grupos tratados con DSS con respecto al grupo control (Figura 2A). Cuando se utilizó el protocolo de doble precipitación con LiCl, se logró disminuir los Cp y la desviación estándar de los grupos tratados con DSS (Figura 2B).

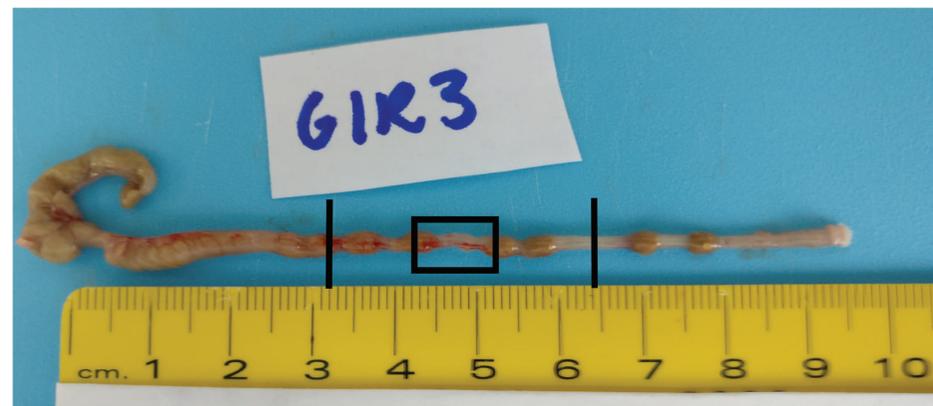


Figura 1. Toma de muestra de tejido de colon.

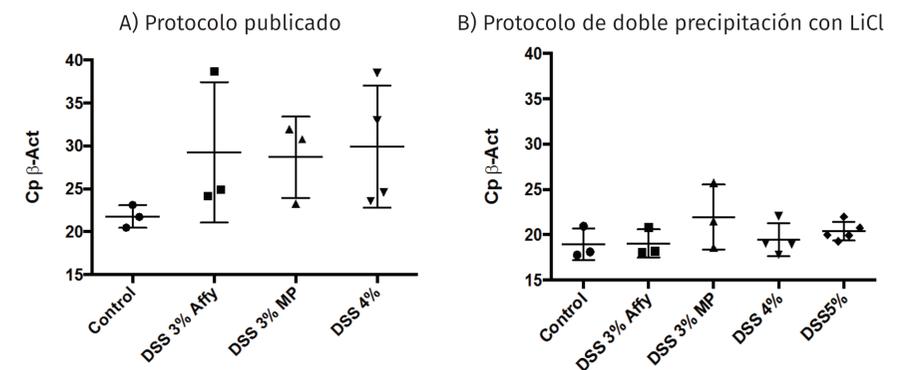


Figura 2. Distribución de los puntos de corte (Cp) obtenidos por PCR tiempo real de las muestras previo al protocolo propuesto (A) y utilizando el protocolo de doble precipitación con LiCl (B).

Discusión

Actualmente, el modelo de DSS es uno de los más utilizados para estudiar la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, en la mayoría de los artículos publicados que analizan la expresión de distintos marcadores, principalmente citocinas, mediante técnicas de biología molecular, no toman en cuenta la inhibición causada por residuos de DSS en el colon, sesgando los resultados obtenidos. En este trabajo se propuso un método de purificación práctico y de bajo costo, que permite obtener cantidades suficientes de RNA, con un grado de pureza adecuado para las reacciones de PCR en tiempo real.

Referencias

- Bramhall M, Florez-Vargas O, Stevens R, Brass A, Cruickshank S. Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2015;21(6):1248–59.
- Maxwell JR, Brown WA, Smith CL, Byrne FR, Viney JL. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. *Current Protocols in Pharmacology*. 2009:1-37.
- Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *C Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):154–70.

- Elsheikh W, Flannigan KL, McKnight W, Ferraz JGP, Wallace JL. Dextran sulfate sodium induces pan-gastroenteritis in rodents: Implications for studies of colitis. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(5):463–9.
- Viennois E, Chen F, Laroui H, Baker MT, Merlin D. Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Res Notes* [Internet]. 2013;6(1):360.
- Walker SE, Lorsch J. RNA Purification – Precipitation Methods. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. p. 337–43.