

Nota científica

Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*)

Modification of a standard protocol for DNA extraction from smaller sandflies (Phlebotominae: *Lutzomyia*)GABRIEL GOLCZER^{1,2} y JAZZMÍN ARRIVILLAGA^{1,3}

Resumen: Se evaluó el rendimiento de un protocolo de acetato de potasio con modificaciones menores para la extracción del ADN genómico. Los resultados evidencian que empleando el protocolo modificado se obtuvo un ADN de mayor rendimiento (0,61, concentración de 37,34 ng/μL) respecto al protocolo original. La amplificación del ADN vía PCR para regiones mitocondriales evidencia su calidad alta ADN para estudios poblacionales a nivel molecular, en el menor tiempo y costo, sin el uso de reactivos altamente tóxicos.

Palabras clave: PCR. Extracción de ADN. Flebotómíneos.

Abstract: We evaluated the yield of a potassium acetate protocol with minor modifications for the extraction of genomic DNA. The results showed that using the modified protocol gave a higher DNA yield (0.61, and concentration 37.34 ng/μL) was obtained with respect to the original protocol. The amplification of DNA by PCR for mitochondrial regions demonstrated the high quality of this DNA for molecular population studies, in less time and cost, without the use of highly toxic reagents.

Key words: PCR. DNA extraction. Sandflies.

Introducción

En la extracción de ADN de muestras de flebotómíneos se han utilizado métodos basados en el uso de sales como acetato de potasio, en su forma convencional combinado con el detergente SDS, sodio lauril-sulfato (Ready *et al.* 1991; Parvizi y Amirkhani 2008), o en su forma modificada combinada con proteinasa K (Hodgkinson *et al.* 2003; Torgerson *et al.* 2003), el uso de la proteínaasa K combinada con el método cloroformo-fenol (Michalsky *et al.* 2002; Kato *et al.* 2005); paquetes comerciales de extracción de ADN, DNeasy tissue kit de Qiagen (Beati *et al.* 2004), y el uso de la resina Chelex-100 (Cabrera *et al.* 2003; Jorquera *et al.* 2005).

Sin embargo, la talla corporal de los flebotómíneos, que representa la disponibilidad de tejido por muestra, *a priori* es una limitante, y en especial en estudios de variabilidad y genética poblacional espacio-temporal, en donde la cantidad de ADN aislado por muestra identificada es importante, en contraste con la cantidad extraída desde otros grupos de insectos, en especial vectores de importancia médica como mosquitos ó triatóminos (Nordase *et al.* 2004; De Armas *et al.* 2005). La extracción de ADN de flebotómíneos individuales resulta en bajo rendimiento, efectividad, y en algunas ocasiones con baja pureza cuando se hacen extracciones extensivas, lo que requiere el uso de protocolos que mejoren el rendimiento de ADN, como el empleo de paquetes comerciales.

Para los países latinoamericanos los estudios de genética molecular a nivel poblacional, implican una inversión muy alta, por los costos de importación de paquetes comerciales de extracción y purificación de ADN y reactivos (sobre todo los reactivos tóxicos que necesitan fletes de importación especial) lo que limita su uso, y obliga a considerar los protocolos tradi-

cionales. Por otro lado, los protocolos necesitan cumplir hoy en día con las normativas de seguridad laboral y ambiental por lo que apuntar al uso de reactivos no tóxicos y no contaminantes es ideal. En este sentido, el protocolo basado en precipitación con sales en su forma convencional es idóneo y ha sido empleado en estudios poblacionales, con distintas modificaciones desde los protocolos originales de Ish-Horowitz *et al.* (1982), Bender *et al.* (1983) y Collins *et al.* (1987) para la extracción de ADN de especies del Viejo Mundo, *Phlebotomus* spp. y *Sergentomyia* spp. (Ready *et al.* 1991; Essegir *et al.* 1997; Aransay *et al.* 1999; Parvizi y Amirkhani 2008), como en especies del nuevo mundo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva 1912), *L. pseudolongipalpis* Arrivillaga y Feliciangeli, 2001, *L. intermedia* (Lutz y Neiva, 1912), *L. withmani* (Antunes y Coutinho, 1939) (Essegir *et al.* 1997, Arrivillaga *et al.* 2003; Souza *et al.* 2007) con un alto rendimiento desde muestras preservadas en etanol 70% y secas.

Sin embargo, utilizando el método de sales, desde muestras de flebotómíneos con talla pequeña como, *Lutzomyia youngi* (Feliciangeli y Murillo 1987), *L. evansi* (Nuñez-Tovar, 1934), *L. nunez tovari* (Ortiz, 1954), *L. spinicrassa* Morales, Osorno de Osorno y Hoyos, 1970, *L. trinidadensis* (Newstead, 1922), *L. cayenensis* (Floch and Abonnenc, 1941), se logra la extracción de ADN (Testa *et al.* 2002; Vivero *et al.* 2007), pero la efectividad en las extracciones extensivas es del 10% (muestras preservadas en etanol) y 20% (muestras frescas), con rendimientos menores a 0,1, lo cual limita los estudios poblacionales. En la presente nota se señala una modificación del protocolo de Arrivillaga *et al.* (2003) en varios pasos con la finalidad de proporcionar un método ajustado a muestras de flebotómíneos de pequeña talla corporal para estudios poblacionales.

¹ Universidad Simón Bolívar, Departamento de Estudios Ambientales, Laboratorio de genética de poblaciones, Valle de Sartenejas, Caracas, Venezuela.

² Lic. en Biología. Postgrado en Ciencias Biológicas. goczer@usb.ve.

³ Dr. en Entomología. jarrivillaga@usb.ve.

Materiales y Métodos

Muestras biológicas. Se utilizaron en el estudio dos grupos de flebotomíneos para un total de 162 ejemplares de *Lutzomyia youngi*, recolectados en la localidad tipo, Las Calderas (09°22'N, 70°26'W), Estado de Trujillo, Venezuela. Los adultos fueron pesados individualmente (peso promedio de hembras 80,92 µg y en machos de 50,65 µg) y medida la longitud del ala derecha (promedio en hembras de 2,1 mm y en machos de 1,7 mm) para correlacionar la cantidad de tejido (peso o tamaño) en relación a la cantidad de ADN y al grado de pureza (relación de DO 260/280). Luego se realizó la disección de los ejemplares (hembras = montaje de cabezas y genitalia, machos = montaje de genitalia), las piezas fueron montadas en medio Berlese, para su fijación e identificación, utilizando la clave Young y Duncan (1994).

Extracción de ADN. Un total de 34 ejemplares fueron usados para la extracción individual de ADN siguiendo el protocolo de Arrivillaga *et al.* 2003. Mientras, el resto de los ejemplares (n = 128) fueron homogenizados siguiendo como base este mismo protocolo con tres modificaciones menores que mejoraron el rendimiento y pureza del ADN (Tabla 1). Los ejemplares fueron homogeneizados con un triturador manual marca Kontex en 50 µL de tampón de lisis (NaCl 0,1 M; sacarosa 0,2 M; EDTA 50 mM; tris-HCl 100 mM pH 8,25; SDS 0,05 %); incubando a una temperatura de 65°C por 120 min. La precipitación de proteínas se realizó con 14 µL de acetato de potasio 8 M, durante 60 min sobre hielo, seguido de una centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min. El ADN se incubó a temperatura ambiente por 10 min, con 100 µL de etanol absoluto, se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante, se agregó 100 µL de etanol al 70%, y se incubó a -20°C por 24 horas. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm durante 15 min y el precipitado se lavó dos veces con etanol (100 %) por 10 min. Después de secar a temperatura ambiente, el ADN se resuspendió en 20 µL agua grado molecular y luego se conservó a -20°C.

PCR de regiones mitocondriales y comparación. El ADN extraído por ambos protocolos se amplificó en un volumen final de 25 µL de reacción con 4 µL de muestra de ADN, utilizando los cebadores para tres regiones mitocondriales (COI, ND5 y 12S) empleados por Arrivillaga *et al.* 2003. La detección del producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1,2% en TBE 0,5X con bromuro de etidio 0,5 g/mL. Utilizando el programa Microsoft Excel 2007 se realizaron regresiones lineales con los valores de la concentración de ADN en relación a

las variables de peso del tejido muestra, grado de pureza (DO: 260/280) y longitudes del ala derecha.

Resultados y Discusión

La extracción de ADN con el protocolo de sales de potasio combinado con soluciones tapones, tales como TSE (Tris-SDS-EDTA) y etanol combina procesos químicos, físicos y mecánicos resumidos en tres pasos: lisis celular, eliminación de proteínas y precipitación y limpieza de ADN. Este método es económico, no maneja compuestos de alta toxicidad o contaminantes del ambiente y se obtienen en promedio cantidades significativas de ADN con alta pureza (Tabla 1). Las modificaciones propuestas al protocolo de Arrivillaga *et al.* (2003) aunque son menores, garantizan una mayor efectividad (79% de positividad) en relación al número de muestras para la extracción de ADN, con un rendimiento 1.000X más efectivo.

En contraste, el método de Arrivillaga *et al.* (2003) ha sido empleado en flebotomíneos de mayor talla corporal (*Lutzomyia longipalpis*) con fines de estudios poblacionales. Sin embargo, no existe reporte de valores de rendimiento y concentración de ADN para realizar comparaciones directas, a pesar que los autores señalan que el procesamiento es efectivo en aproximadamente 3.000 ejemplares, mediante la obtención de productos de PCR de buena calidad para su secuenciación.

En general, los trabajos a nivel molecular en flebotomíneos, y que emplean el método de sales para extracción de ADN, con fines taxonómicos o filogenia molecular (Ready *et al.* 1991, Essegir *et al.* 1997, Aransay *et al.* 1999, Arrivillaga *et al.* 2003), no señalan las concentraciones o el grado de pureza del ADN extraído, por lo que no es posible realizar comparaciones. Sin embargo, Vivero *et al.* (2007), señala un protocolo modificado de Collins *et al.* (1987) para la extracción de ADN genómico, desde 512 individuos pertenecientes a siete especies de flebotomíneos neotropicales. Estos autores señalan el uso del 40% v/v de la muestra de ADN resuspendida para la amplificación exitosa de regiones mitocondriales vía PCR (Fig. 1).

En comparación con el protocolo de Vivero *et al.* (2007), el protocolo propuesto en el presente trabajo tiene ciertas diferencias metodológicas de gran importancia, las cuales se resumen a continuación: mayor tiempo de incubación en buffer de lisis (30 min. vs. 120 min.), mayor tiempo de precipitación en acetato de potasio (30 min. vs. 60 min.), mayor tiempo y velocidad de centrifugación para la sedimentación final del ADN (12 rpm/20 min. vs. 14 rpm/15 min.). En nuestro caso, las modificaciones resultan en un aumento del rendimiento de extracción de ADN, y solo se usa el 20% v/v de la muestra resuspendida

Tabla 1. Valores de las medias de concentración, grado de pureza y rendimiento para los dos protocolos empleados en la extracción de ADN genómico de *Lutzomyia youngi*. Los valores en paréntesis representa la desviación estándar.

Método de extracción	Paso	Duración/ Volumen	Peso (mg)	Concentración de ADN (µg/µL)	Pureza DO 260/280	Rendimiento
Arrivillaga 2002	Incubación en Baño	30 min.	0,07084	0,0000377	1,8467	0,0005
	Incubación en AcK	30 min.				
	Centrifugación final	10 min.				
Modificación	Incubación en Baño	120 min.	0,060753	0,03734	2,1567	0,612
	Incubación en acetato de potasio	60 min.				
	Centrifugación final	15 min.				

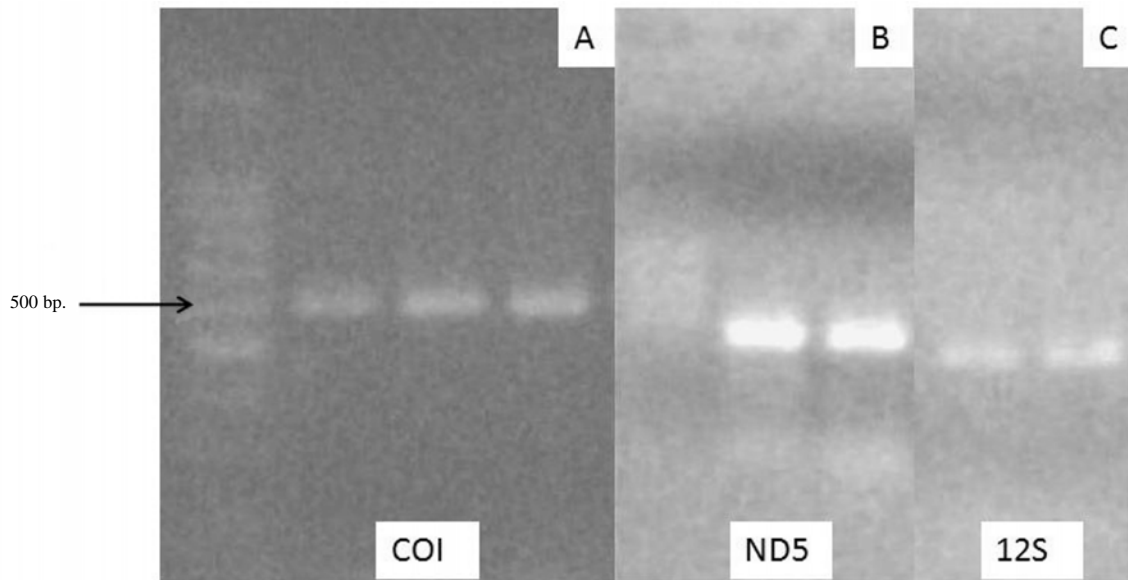


Figura 1. Corridos electroforéticos en gel de agarosa al 1,2% de productos de amplificación de PCR para tres regiones mitocondriales. **A.** Citocromo oxidasa I (COI, 530 pb). **B.** NADH-5 (ND5, 450pb). **C.** 12S ribosomal (12S, 420 pb). La banda de 500 bp es señalada para el marcador de peso molecular de 100 bp utilizado en la electroforesis.

de ADN para la amplificación de regiones mitocondriales, aumentándose la efectividad de nuestro método en un 50% en comparación al utilizado por Viveros *et al.* (2007) en flebotomíneos.

Nuestros resultados son comparables a los obtenidos por Michalsky *et al.* (2002), y Kato *et al.* (2005) quienes utilizan el protocolo de cloroformo fenol combinado con proteinasa K, en relación a que la alta calidad del ADN se demuestra con el uso de menor cantidad de volumen de ADN extraído para fines de amplificación vía PCR. En contraste, las concentraciones de ADN promedio reportadas por estos autores son menores a las señaladas por nosotros (5-10 ng/uL vs 37,34 ng/uL), pero los autores no reportan el grado de pureza.

La extracción de ADN con el presente protocolo, no evidencia una correlación lineal (valores de $R < 0,02$) entre cantidad de tejido o tamaño en relación a la cantidad o pureza de ADN extraído desde ejemplares individuales de *L. youngi*. Estos resultados son comparables a los obtenidos para otros grupos de insectos como aedinos (De Armas *et al.* 2005), por lo que estas variables de talla corporal no afectan los resultados. En general, la efectividad y ventaja en la extracción del ADN obtenido utilizando el protocolo de sales con modificaciones, son comparables a los señalados por Nodarse *et al.* (2004) y De Armas *et al.* (2005) para insectos vectores de mayor peso corporal como los triatóminos o aedinos.

La modificación del protocolo de Arrivillaga *et al.* (2003) con base en sales (efecto salting out) es una alternativa efectiva para tener suficientes muestras de ADN de flebotomíneos con alto rendimiento para estudios genéticos poblacionales con especies de pequeña talla corporal.

Agradecimientos

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fonacit por el financiamiento del Proyecto-S1 No. 20010000921 otorgado a Jazzmin Arrivillaga. Igualmente, se extiende el agradecimiento a la Coordinación de Lic. en Biología, Decanato de Estudios

Profesionales por el financiamiento otorgado a Gabriel Golczer para el desarrollo del presente trabajo.

Literatura citada

- ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; CHANIOTIS, B.; TSELENTIS, Y. 1999. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. *Insect Molecular Biology* 8: 179-184.
- DE ARMAS, Y.; RODRÍGUEZ, M. M.; María M.; BISSET, J.A. 2005. Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología* 31: 203-6.
- ARRIVILLAGA, J.; MUTEPI, J. P.; PIÑANGO, H.; NORRIS, D.; ALEXANDER, B.; FELICIANGELI, M. D.; LANZARO, G. 2003. The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme Variation. *Journal of Medical Entomology* 40: 615-627.
- BEATI, L.; CÁCERES, A. G.; LEE, J. A.; MUNSTERMANN, L. E. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Perú and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 34: 225-34.
- BENDER, W.; SPIERER, P.; HOGNESS, D. S. 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the ace and rosy loci and the Bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology* 168: 17-33.
- CABRERA, O. L.; MUNSTERMANN, L. E.; CÁRDENAS, R.; FERRO, C. 2003. PCR as a tool in confirming the experimental transmission of *Leishmania chagasi* to hamsters by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Biomedica* 23: 239-244
- COLLINS, F. H.; MÉNDEZ, M. A.; RASMUSSEN, M. O.; MEHAFFEY, P. C.; BESANSKY, N. J.; FINNERTY, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37: 37-41.
- ESSEGHIR, S.; READY, P. D.; KILLICK-KENDRICK, R.; BEN-ISMAIL, R. 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography

- of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology* 6: 211-25.
- HODGKINSON, V. H.; BIRUNGI, J.; QUINTANA, M., DIETZE, R.; MUNSTERMANN, L. E. 2003. Mitochondrial cytochrome *b* variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 386-92.
- ISH-HOROWIZ, D. 1982. Personal communication in: rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 295: 564-568.
- JORQUERA, A.; GONZÁLEZ, R.; MARCHÁN-MARCANO, E.; OVIEDO, M.; MATOS, M. 2005. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Memories Instituto Oswaldo Cruz* 100: 43-46.
- KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; CALVOPIN, M.; MARCO, J. D.; BARROSO, P. A.; GÓMEZ, E. A.; MIMORI, T.; KORENAGA, M. T.; IWATA, H.; NONAKA, S.; YOSHIIHISA, A. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within species naturally infected sandflies in the andean areas of Ecuador by polymerase chain reaction. *American Journal Tropical. Medical and Hygiene* 72: 87-93.
- MICHALSKY, E. K.; CONSUELO, L.; FORTES-DIAS, P.; PIMENTA, F. P.; NAGILA, F. C.; SECUNDINO, E. S. DIAS. 2002. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp. in experimental infected individual phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae): *Revista Instituto de Medical Tropical Sao Paulo* 44: 255-259.
- NODARSE, J. F.; RODRÍGUEZ, J.; FUENTES, O.; CASTEX, M.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos, su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56: 208-213.
- PARVISI, P.; AMIRKHAMI, A. 2008. Mitochondrial DNA characterization of *Sergentomyia sintoni* populations and fiding mammalian leishmania infections in this sandflies using ITS-rDNA. *Iranian Journal of Veterinary* 9: 10-18.
- READY, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SOUZA, A. A. 1991. DNA probe for distinguishing *Psychodopygus wellcomi* from *Psychodopygus complexus* (Diptera: Psychodidae). *Memories Instituto Oswaldo Cruz* 86: 41-49.
- SOUZA, L.; FALQUETO, A.; BIRAL DOS SANTOS, C.; GRIMALDI, G.; CUPOLILLO, E. 2007. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from to ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Vianni) brasiliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 559-565.
- TESTA, J. M.; MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D. 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica* 84: 205-18.
- TORGERSON, D. G.; LAMPO, M.; VELÁZQUEZ, Y.; WOO, P. T. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 484-93.
- VIVERO, R. J.; CONTRERAS-GUTIÉRREZ, BEJARANO, M. A. E.; ELÍAS, E. 2007. Analysis of the primary and secondary structure of the mitochondrial serine transfer RNA in seven species of *Lutzomyia*. *Biomedica* 27: 429-438.
- YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers American Entomological Institute. Gainesville, Florida. 881 p.

Recibido: 10-abr-2008 • Aceptado: 16-oct-2008