

## OBTENCION DEL RNA TOTAL DE HIPOFISIS DE RATA MEDIANTE EL METODO GUANIDINIO/CsCl MODIFICADO

Myriam de Gómez, Norma de Sambucetti, Orlando Del Real y Antonio Bermúdez.  
Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A 14490, Santafé  
de Bogotá, Colombia.

**Keywords:** RNA, hypophysis, Growth Hormone.

### RESUMEN

Se obtuvo RNA total de hipófisis de rata con alta pureza. Se discuten las modificaciones efectuadas al método de Guanidinio/CsCl comúnmente empleado y se describe un procedimiento adecuado para efectuar hipófisectomías a ratas.

### ABSTRACT

Pure total RNA was obtained from rat hypophysis. Modifications to the commonly used Guanidinium/CsCl method are discussed and an adequate procedure to perform hypophysectomy in rats is described.

### INTRODUCCION

Los métodos más empleados para aislar RNA intacto y biológicamente activo a partir de células y tejidos animales (1), se pueden clasificar en dos categorías:

1- Aquellos que utilizan precipitación selectiva basada en la solubilidad y 2- Sedimentación selectiva basada en la densidad de flotación.

Durante nuestros estudios sobre la hormona de Crecimiento (GH), requerimos de material biológicamente activo para estudiar a nivel molecular los cambios que ocurren como consecuencia de restricciones nutricionales proteicas y/o calóricas. El conocimiento de los aspectos genéticos que regulan la síntesis de la hormona, de su receptor y de IGF-1, es fundamental para comprender cómo la malnutrición incide dentro del conjunto de acciones complejas que ejerce la GH (2). La obtención de RNA total de hipófisis de rata, la efectuamos modificando una metodología diseñada con base en los estudios de Glisin (3) y Chirgwin (4).

## MATERIALES Y METODOS

### Técnicas Generales Utilizadas

La eliminación de RNAsas exógenas se realizó siguiendo las recomendaciones de Blumberg (5). Todo el material de vidrio o plástico, agua y demás reactivos, exceptuando los que contienen EDTA fueron tratados con DEPC al 0.1% durante 18 h y luego se esterilizaron o secaron en estufa a 70°C por una hora. Los espectros de ultravioleta se tomaron en un espectrofotómetro marca Hewlett-Packard Diode Array modelo 8451 A. Las fotografías se tomaron con una cámara Kodak Polaroid MP4.

### Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Fisher 344 (50 hembras y 50 machos) de 35 días de edad y peso promedio de 80 g, adquiridas en el bioterio del Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

### Hipofisectomía

Se efectuó según el siguiente protocolo:

Los animales de experimentación se sacrificaron por sangrado en blanco mediante punción directa en el ventrículo izquierdo a través del tercer espacio intercostal. A continuación, se cortó la piel a la altura de la base del cráneo, desde la región anterior hasta las orejas, y por tracción de la piel se dejó al descubierto el mismo. Se realizó disección de los músculos occipitocervicales y maseteros. Se incidió con sierra suavemente el hueso occipital y a continuación se levantaron completamente los huesos parietal y frontal dejando expuesto el encéfalo, que se levantó con sonda acanalada para dejar al descubierto la cara interna de la base del cráneo. Ubicada la silla turca, se cortó la membrana tentorial y se retiró con tracción muy suave la hipófisis, que se transfirió al vial de crioconservación.

### Extracción del RNA

Las hipófisis (256 mg) se homogenizaron durante 2 min con 3 mL de una solución de pH 7.0 conformada por: isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 5 mM, Sarcosil 0.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M. El homogenizado se centrifugó (12.000 g x 10 min) a 12°C. Tras calentar el sobrenadante a 65°C durante 2 min, se adicionó CsCl sólido en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 0.1 mg/mL. Acto seguido se transfirió a un tubo de ultracentrífuga que contenía 3 mL de una solución de pH 7.0 compuesta por CsCl 5.7 M en EDTA 0.1 M, formándose 2 fases en relación 5:3. Se centrifugó (60.000 g x 12 h) a 22°C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol del 70% (3 x 300  $\mu$ L) y se redisolvió en un buffer EDTA 5 mM, Sarcosil 0.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M (600  $\mu$ L) y se extrajo (3 x 600  $\mu$ L) con mezcla cloroformo: alcohol iso-amilico 24:1. Una vez separadas las fases, se precipitó el RNA con acetato de sodio 3 M (57  $\mu$ L) y etanol absoluto frío (1.5 mL; 2.5 Vol). El RNA separado, se lavó con Etanol del 70% (2 x 100  $\mu$ L) y se disolvió

en H<sub>2</sub>O DEPC (160 µL). Se tomó una alícuota de 10 µL y se midió su absorbancia a 260 y 280 nm. Para datos experimentales ver tabla 1.

### Electroforesis

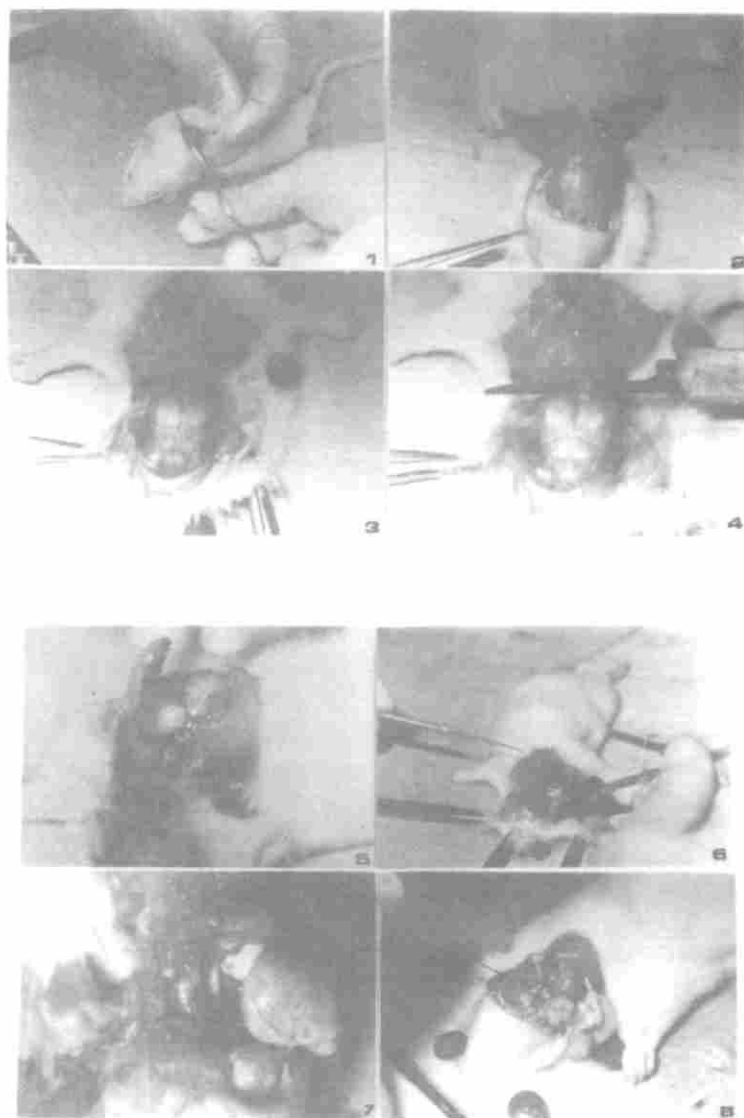
Se realizaron en cámara saturada no submarina en gel de agarosa 1% y buffer (pH 7.0) de fosfato 0.01 M y formaldehído 2.2 M. Las muestras se aplicaron luego de ser previamente desnaturizadas con formamida hasta una concentración del 50%. La tinción de los geles se realizó con bromuro de etidio (1 µg/mL), se visualizaron las bandas en un transiluminador de luz uv y se fotografiaron.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La secuencia de fotografías 1 - 8, muestra el proceso seguido para la remoción de las hipófisis. En ella se puede observar claramente cómo la punción cardíaca efectuada previamente a la craneotomía, permitió una buena limpieza de campo y obtener las hipófisis con menor grado de contaminación exógena debida a la sangre.

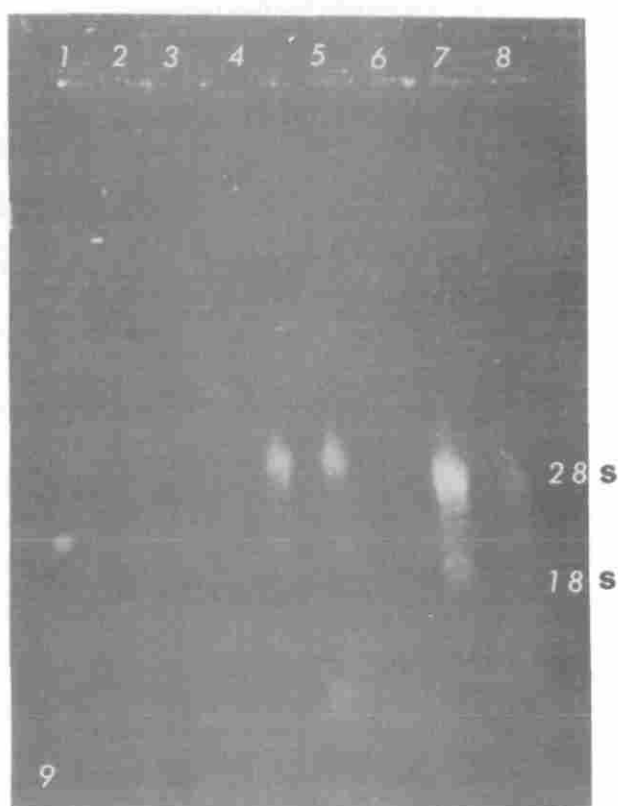
De esta manera, se obvió también el empleo de anestésicos o sedantes que por su acción sobre el sistema nervioso central pueden tener efecto sobre el contenido de RNA. El procedimiento seguido para las hipofisectomías permitió hacer la remoción rápida de las glándulas y la obtención de RNA no degradado.

La extracción del RNA se realizó con mayor eficiencia y en menor tiempo agregando Sarcosil durante la homogenización, disminuyendo concomitantemente el tiempo de exposición del RNA a las ribonucleasas y contrario a lo informado por algunos autores (1, 6) en ningún caso observamos ni formación de espuma ni perturbación del homogenizado durante el proceso. La inclusión de fenol como agente extractante, recomendada en la literatura (3), en este caso no resultó adecuada pues condujo a la obtención de un RNA de relación de absorbancias 1.56, menos puro que el obtenido sin emplear dicho compuesto, cuyo valor fue 1.71. Mediante las variaciones hechas al método, entre las cuales están la eliminación de proteínas por centrifugación previa al tratamiento de gradiente de CsCl, reprecipitación con acetato de sodio y etanol, y la realización de las extracciones empleando únicamente mezclas de cloroformo: alcohol iso-amílico, se obtuvo un RNA de alta pureza como se comprobó con el valor de la relación de absorbancias (2.08) y la existencia de las bandas 28S y 18S en relación 2:1 (ver fotografía 9, carriles 4, 5, 7 y 8) en las electroforesis (7). En la misma fotografía, no se observan manchas en los carriles 1, 2, 3 y 6 debido a concentraciones no detectables de RNA. Con el método descrito en este trabajo se alcanzó un buen equilibrio entre el rendimiento y la calidad del RNA aislado.



**Fotografías de la Secuencia de Pasos Seguidos para la Remoción de las Hipófisis de las Ratas**

Fotografía: 1. Corte de la piel; 2. Exposición del cráneo; 3. Disección de músculos; 4. Trepanación del cráneo; 5. Exposición del encéfalo; 6. Remoción del encéfalo; 7. Cara interna de la base del cráneo; 8. Extracción de la hipófisis.



Fotografía 9. Electroforesis del RNA extraído.

Tabla 1. Extracción de RNA Total

Ensayo	Extrac. inicial	Extrac. reprecipitado
Volumen ( $\mu\text{L}$ )	160	70
Alicuota ( $\mu\text{L}$ )	10	10
Volumen Final ( $\mu\text{L}$ )	400	400
Absorbancia 260 nm	0.891	0.523
Relación 260/280	1.71	2.08
Peso tejido (mg)	256	256
RNA total ( $\mu\text{g}$ )	228	133.9
RNA total ( $\mu\text{g}$ ) / (g) tejido	891	523

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa Internacional de Ciencias Químicas (IPICS) de la Universidad de Uppsala (Suecia), a COLCIENCIAS y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por la ayuda económica recibida. Al doctor Augusto Rivera por sus acertados comentarios y ayuda durante la elaboración de este artículo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.; "*Molecular Cloning*". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1 Unidad 7. 1989.
2. Norstedt, G.; Enberg, B.; Moller, C.; Mathews, L. *Acta Paediatr. Scand.* 1990, 366, 79.
3. Glisin, V.; Crkvenjakov, R.; Byus, C. *Biochem.* 1973, 13, 2633.
4. Chirgwin, J.; Przbyla, A.; McDonald, R.; Rutter, W. *Biochem.* 1979, 18, 5294.
5. Blumberg, D. *Meth. Enzymol.* 1987, 152, 20.
6. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. "*Current Protocols in Molecular Biology*". John Wiley & Sons, Inc. N.Y., 1989.
7. Lehrach, H.; Diamond, D.; Wolney, J.; Boedtker, H. *Biochem.* 1977, 16, 4743.