

ARTÍCULO ORIGINAL

Aproximación a una caracterización molecular de Fasciola hepatica por la técnica RAPDs - PCR

DANILO VARGAS, MARCIA VEGA y CARMEN GLORIA GONZÁLEZ

MOLECULAR CHARACTERIZATION APPROACH OF *Fasciola hepatica* BY TECHNIQUE RAPDs-PCR

The present study show the molecular characterization of Fasciola hepatica taken from cows, horses and sheeps, using the Random Amplified Polymorphic ADN Fragments (RAPDs-PCR) technique. The standardization of the optimal conditions of amplification and thermocyclation for F. hepatica by RAPDs-PCR were made, as the genetic markers for polymorphic identification of the parasites collected from different animals specie. The methodology used compared the genetic pattern between species and inside each specie. The results shows random genetic markers, given genetic variations of F. hepatica between species and inside each specie (polymorphism), and the amplifications fragments were between 135 and 741 pair of bases (bp).

Key words: *Fasciola hepatica*, RAPDs-PCR, Polymorphism, Genetic Variations.

INTRODUCCIÓN

La *Fasciola hepatica*, agente causal de la fasciolosis, es reconocido como el único tremátodo de importancia en Medicina Veterinaria y en Salud Pública en Chile. Afecta principalmente a rumiantes de interés económico (bovino, ovino y caprino), como también, a otras especies animales domésticas y silvestres que comparten el mismo ecosistema, entre ellas, equinos, porcinos y accidentalmente al hombre¹⁻².

El extraordinario avance de la tecnología biogenética, ha permitido crear técnicas capaces de estudiar y caracterizar a los individuos desde su unidad molecular más básica, el ADN³⁻⁵. De acuerdo a ello, en los últimos años, se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas de la Biología Molecular en la Parasitología⁶⁻⁸. Algunas de las investigaciones se han enfocado a la identificación y tipificación molecular de los agentes etiológicos, lo que ha permitido esta-

blecer perfiles genéticos característicos que permiten su mejor comprensión y relación con sus hospederos y el medio ambiente⁹⁻¹⁰. Los estudios de polimorfismos genéticos, permiten establecer la posible existencia de variantes genéticas entre individuos de una misma especie¹¹⁻¹³.

Existen diferentes métodos moleculares en la identificación de variantes polimórficas en la secuencia del ADN de un organismo, entre ellos, los más usados son, la PCR (Polymerase Chain Reaction) y RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Ambos, son altamente sensibles, específicos y reproducibles. Sin embargo, presentan el inconveniente de requerir de información previa a su realización, ya que es necesario conocer, al menos, una parte de la secuencia de ADN que se desea amplificar¹⁴⁻¹⁶.

Una alternativa la constituye la aplicación de una variante de la PCR, RAPDs (Random Amplified Polymorphic ADN), técnica basada en la utilización de una secuencia de

* Laboratorio de Diagnóstico Molecular (DIAMOLAB), Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor. Casilla 234. Correo 35. Las Condes, Santiago, Chile

oligonucleótidos arbitraria (partidor) sintetizada, *in vitro*, no específica para el templado de ADN¹⁷⁻¹⁸. Este procedimiento presenta la ventaja de no requerir información preliminar sobre la secuencia de ADN a estudiar. Sin embargo, permite establecer posibles variantes genómicas de *F. hepatica* en diferentes especies hospederas¹⁹⁻²².

A nivel biomolecular, se han realizado estudios experimentales en Estados Unidos tendientes al diagnóstico de *F. hepatica* en hospederos intermediarios invertebrados²³⁻²⁴.

Dado lo anterior y a la importancia epidemiológica y económica que involucra esta enfermedad, se hace necesario disponer de información referente a variantes génicas en *F. hepatica*, por lo que este trabajo pretende su identificación y caracterización molecular por RAPDs-PCR en ejemplares colectados desde el hígado de tres diferentes hospederos definitivos: bovinos, equino y ovino.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Obtención de los parásitos.

Se colectaron ejemplares adultos de *F. hepatica* desde los hígados de 3 bovinos y 3 equinos decomisados en el matadero Municipal La Pintana, ubicado en el sector Sur de la Región Metropolitana. Los ejemplares procedente de la especie ovina, fueron colectados en la XI Región por funcionarios del Servicio Agrícola y Ganadero de la Provincia de Aysén.

2. Extracción de ADN.

Se realizó según protocolo descrito previamente en 1996²⁵, con algunas modificaciones. Las muestras de parásitos se homogeneizaron en solución tampón de lisis (8% Triton 100X; 0,25M Sucrosa; 50 mM EDTA, pH 7,4). Los extractos se centrifugaron y la fracción sobrenadante se sometió a dos extracciones con un volumen de fenol saturado en tris, pH 8,0 y a una extracción con cloroformo. El ADN fue concentrado por precipitación etanólica.

Posteriormente, el sedimento fue resuspendido en solución tampón Tris-EDTA (T.E), cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

3. RAPDs-PCR.

Se evaluaron 7 partidores cuya identificación, secuencias y procedencia se detallan en la Tabla 1. El porcentaje G+C de los de-

caoligonucleótidos evaluados fluctuó entre el 50 al 70%. Del total de partidores, cuatro fueron seleccionados: P2, P4, P6 y P7. Su elección fue basada en términos de mayor polimorfismo, resolución y reproducibilidad experimental.

La mezcla de reacción se trabajó en un volumen final de 50 ml, utilizando solución amortiguadora de Amplificación 10X (200 µM Tris HCl, 500 µM KCl, pH 8,4) (Gibco BRL), 2,0 µM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,4 µM de cada partidor, 5 ng/mL de ADN blanco, 2 UI Taq ADN Polimerasa (Gibco BRL). La amplificación PCR se realizó en un termociclador MJ Research y el programa de termociclación utilizado fue asignado como R-8 (75 ciclos de 94°C por 5 segundos/ 36°C por 30 segundos/72°C por 5 segundos).

4. Resolución de los fragmentos amplificados.

El ADN fue resuelto por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% teñidos con brumuro de etidio (0,005%) en solución tampón de corrida T.B.E. (0,09 M Tris-borato, 0,002 M EDTA). Las muestras fueron diluidas en solución de tinción de corrida. La electroforesis se efectuó a 10 volt/cm, hasta lograr una migración del 70% de las muestras en el gel. Se utilizó como indicador de peso molecular ladder 100 pb (Gibco BRL).

Los fragmentos amplificados fueron observados a través de un transiluminador de luz U.V. (50 watts, Vilber Lourmat, France). Los resultados fueron registrados en fotos Polaroid. El tamaño de los fragmentos RAPDs-PCR, se determinó por medio de la gráfica recíproca entre el factor de retardo (*Rf*) versus el logaritmo del peso molecular del ladder.

RESULTADOS

1. Polimorfismo Interspecie.

Se compararon los perfiles genéticos de *F. hepatica* entre las especies bovina, equina y ovina, lográndose identificar fragmentos polimorfos (marcadores RAPDs) entre las especies en estudio. El tamaño de dichos fragmentos fluctuó, entre los 135 y 741 pares de bases (pb). La Figura 1 se aprecia el polimorfismo entre las especies en estudio utilizando los partidores seleccionados, así por ejemplo, al utilizar el partidor P2 aplicado a *F. hepatica* proveniente de un hospedero bovino presenta un

fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb), en cambio la muestra de procedencia equina, amplificó dos fragmentos de 500 y 375 pb, y la muestra de procedencia ovina amplificó un fragmento de 150 pb.

En el análisis interespecie y utilizando los cuatro partidores seleccionados para este estudio, se obtuvo en promedio de 10,75 marcadores RAPDs, de los cuales, el 100% resultó polimórfico, información detallada en la Tabla 2.

2. Polimorfismo Intraespecie e Intraindividuo.

Por otro lado, fueron comparados los patrones genéticos de *F. hepatica* intraespecie e intraindividuo. Para tal efecto, en el primer caso, se cotejaron los perfiles genéticos de las nueve muestras de *F. hepatica* recolectadas de los tres bovinos y equinos. En ovinos, se comparó los patrones genéticos de tres muestras del parásito procedentes de individuos diferentes. Para el estudio intraindividuo, se compararon en forma independiente, las tres muestras aisladas desde un mismo hospedero.

Los resultados revelan polimorfismo genético de *F. hepatica* en animales de la misma especie (variabilidad génica intraespecie), es decir, se observó fragmentos de ADN amplificados en algunas muestras y ausentes en otras. Igualmente, se observó polimorfismo genético entre muestras

Tabla 1. Secuencia y origen de los decaoligonucleótidos utilizados en el estudio

Partidor	Procedencia	Secuencia
P1	U. de Columbia	GCT TGT GAAC
P2	DIAMOLAB	TCG TCG CATT
P3	U. de Columbia	AGC AGC GTGG
P	DIAMOLAB	AGC AGC AGGC
P5	Chung ²⁷	GTT GCG ATCC
P6	Chung	AGC CAG CGAA
P7	Chung	GGG TAA CGCC

Tabla 2. Información resumida para cada partidor en polimorfismo en las especies bovina, equina y ovina

Partidor	RAPDs Amplificado	RAPDs Polimórficos	%
P2	11	11	100
P4	9	9	100
P6	13	13	100
P7	9	9	100
Valor Promedio	10,75	10,75	100

provenientes del mismo animal (intraindividuo). En las Figuras 2 y 3 se comparan los patrones genéticos de tres muestras de *F. hepatica* adultas recolectadas de un mismo hígado bovino y equino, respectivamente. El porcentaje de polimorfismo en la especie bovina alcanzó el

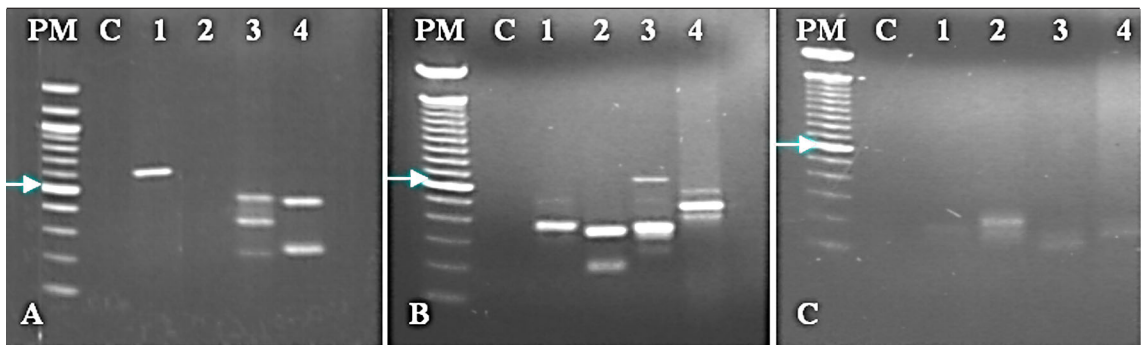


Figura 1. Estudio Interespecie: Fragmentos amplificados de ADN de *Fasciola hepatica* bovino, equino y ovino, mediante la técnica RAPDs-PCR.

A: *Fasciola hepatica* procedencia bovino.

B: *Fasciola hepatica* procedencia equino.

C: *Fasciola hepatica* procedencia ovino.

Carriles PM: Ladder de 100 pb (Gibco BRL). Carriles C: Control negativo. Carriles 1: Partidor P2. Carriles 2: Partidor P4. Carriles 3: Partidor P6. Carriles 4: Partidor P7. La flecha indica 600 pb de peso molecular. Figura 1: Los fragmentos de ADN amplificados se resolvieron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio 0,005%. Los resultados se observaron por transiluminador ultravioleta y posteriormente registrados en fotos Polaroid.

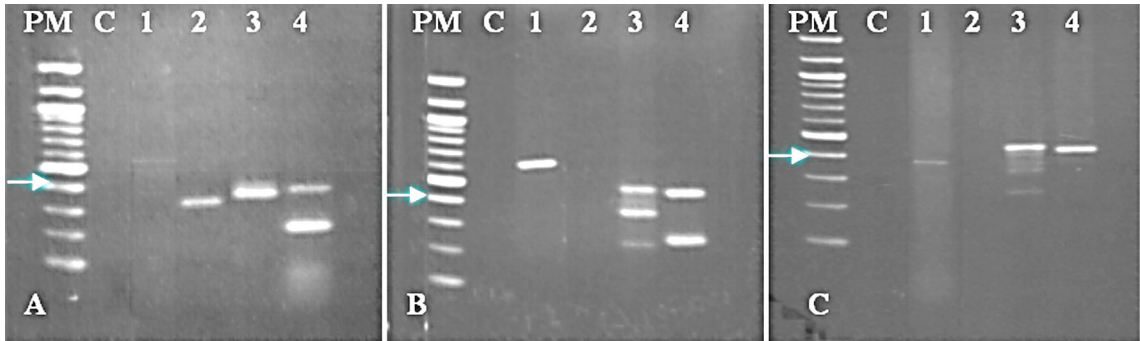


Figura 2. Estudio Intraindividuo: Patrones de Amplificación RAPDs de tres muestras de *Fasciola hepatica* provenientes de un hígado de Bovino.

A: *Fasciola hepatica* 1.

B: *Fasciola hepatica* 2.

C: *Fasciola hepatica* 3.

Carriles PM: Ladder de 100 pb (Gibco BRL). Carriles C: Control negativo. Carriles 1: Partidor P2. Carriles 2: Partidor P4. Carriles 3: Partidor P6. Carriles 4: Partidor P7. La flecha indica 500 pb de peso molecular.

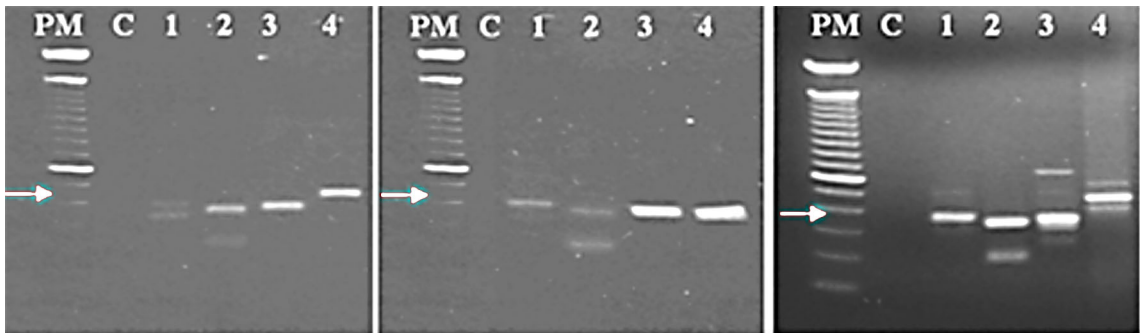


Figura 3. Estudio Intraindividuo: Patrones de Amplificación RAPDs de tres muestras de *Fasciola hepatica* provenientes de un hígado de Equino.

A: *Fasciola hepatica* 1.

B: *Fasciola hepatica* 2.

C: *Fasciola hepatica* 3.

Carriles PM: Ladder de 100 pb (Gibco BRL). Carriles C: Control negativo. Carriles 1: Partidor P2. Carriles 2: Partidor P4. Carriles 3: Partidor P6. Carriles 4: Partidor P7. La flecha indica 400 pb de peso molecular.

100%, es decir, al comparar las nueve muestras de *F. hepatica* recolectadas de hígados bovinos, no se obtuvo patrones genéticos iguales. Similar situación fue observada en la especie equina (100% polimorfismo). En la especie ovina, se logró identificar en promedio 2 fragmentos RAPDs con un 92% de polimorfismo. En la Tabla 3 se detalla el porcentaje de polimorfismo génico identificado para cada hospedero analizado.

DISCUSIÓN

Los niveles de ADN obtenidos con el protocolo aplicado en muestras de *F. hepatica*

fueron satisfactorios ya que se obtuvo en promedio una concentración estimada por espectrofotometría, de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La calidad y pureza del ADN fue evaluada mediante el análisis λ 260/280, relación espectrofotométrica del ADN y proteínas, con un valor promedio de 2,1, considerado adecuado^{5,14,26}.

Los resultados obtenidos demuestran un alto nivel de polimorfismo en el genoma de la especie *F. hepatica*, observándose variabilidad genética interespecie, intraespecie e incluso, en un mismo hospedero animal (intraindividuo).

En el análisis RAPDs-PCR, resultaron muy útiles los partidores P2 y P6, donde se obtuvo el

Tabla 3. Información detallada del polimorfismo genético de *Fasciola hepatica* por RAPDs-PCR para cada especie en estudio

Partidor	EQUINO		BOVINO		OVINO	
	RAPDs Amplificado	RAPDs Polimórficos (%)	RAPDs Amplificado	RAPDs Polimórficos (%)	RAPDs Amplificado	RAPDs Polimórficos (%)
P2	10	10 (100%)	4	4 (100%)	1	1 (100%)
P4	7	7 (100%)	4	4 (100%)	3	2 (67%)
P6	5	5 (100%)	8	8 (100%)	2	2 (100%)
P7	4	4 (100%)	7	7 (100%)	2	2 (100%)
Valor Promedio	6,5	6,5 (100%)	5,8	5,8 (100%)	2	1,8 (92%)

mayor número de marcadores RAPDs.

En las muestras de *F. hepatica* de procedencia equina, el análisis RAPDs-PCR indicó un 100% de polimorfismo. En promedio, se identificaron 6,5 marcadores utilizando los cuatro partidores seleccionados (Tabla 3). En particular, con el partidor P2 se identificaron 10 fragmentos RAPDs amplificados de *F. hepatica* el mayor número de fragmentos obtenidos en este estudio.

Con muestras de procedencia bovina, al igual que en equinos, se observó un 100% polimorfismo. Lográndose identificar en promedio a 5,8 marcadores RAPDs (menor número en comparación a los de procedencia equina), resultando el partidor P6 el más polimórfico, con 8 marcadores RAPDs.

Con las muestras de procedencia ovina, el análisis RAPDs-PCR indicó un menor grado de polimorfismo (92%) en comparación a las otras especies hospederas analizadas. En el estudio, se identificó en promedio a 2 marcadores RAPDs, resultando el partidor P4 el más polimórfico, con sólo 3 fragmentos amplificados.

Al observar el alto grado de variabilidad génica encontrado en el genoma de *F. hepatica*, resulta válido postular que, dicho polimorfismo otorgaría a esta especie, mayor capacidad de adaptabilidad frente al hospedero, como también al medio ambiente. Es decir, la existencia de diferentes poblaciones genéticamente distintas dentro de la especie *F. hepatica*, podría permitir que, frente a cualquier presión de selección, ya sea natural o artificial (por el uso de productos fasciolocidas y/o medidas de control), una o varias poblaciones de *F. hepatica* sean capaces de subsistir y de crear resistencia o adaptabilidad a dicha presión selectiva.

Si bien, la información obtenida en este estudio es básica, resulta de vital importancia en

diversos campos de la Medicina Veterinaria. Estos resultados permiten la apertura de nuevas líneas de investigación tendientes a este agente y, por lo tanto, a la misma enfermedad, permitiendo la formulación de nuevas hipótesis vinculadas, por ejemplo, al estudio de la resistencia de *F. hepatica* a los productos fasciolocidas utilizados actualmente en los distintos hospederos definitivos, como también, hipótesis referentes a mejorar las medidas de control practicadas.

Estos resultados pueden ser la base para la instauración en nuestro país de un método de Diagnóstico Molecular de la enfermedad en los distintos hospederos definitivos. Al respecto, se logró identificar algunos fragmentos monomórficos en las especies en estudio. En equinos, se obtuvo fragmentos amplificados de aproximadamente 400 pb utilizando el partidor P4, fragmentos que se presentaron en los tres hospederos analizados, sin embargo, no fue un patrón característico para toda la especie. En bovinos, se observó fragmentos de aproximadamente 500 pb con los partidores P6 y P7, que fueron comunes sólo para un hospedero, no así para toda la especie animal. En ovinos, fragmentos RAPDs de aproximadamente 150 pb utilizando el partidor P6, fueron observados en dos de las tres muestras analizadas.

Si bien, la selección de partidores en este estudio se basó principalmente en el nivel de polimorfismo, resultaría de interés ampliar la investigación, aumentando el número de muestras del parásito, el universo de animales y el conjunto de partidores al azar, de esta forma identificar marcadores monomórficos para cada especie animal en base a un partidor común e instaurar un diagnóstico mediante la técnica PCR.

El disponer de un diagnóstico oportuno y

directo de distomatosis en cada especie hospedera, resultaría una herramienta de gran valor para optimización del control de la enfermedad, y por consecuencia, una valiosa ayuda para el sector productivo.

RESUMEN

El presente estudio muestra la caracterización molecular de *Fasciola hepatica* obtenidas de bovino, equino y ovino, utilizando la técnica de Amplificación al Azar de Fragmentos de ADN Polimórficos (RAPDs-PCR). Para este fin, se lograron estandarizar las condiciones óptimas de amplificación y programa de termociclación de RAPDs-PCR para *F. hepatica*, así como marcadores genéticos de identificación polimórfica características para cada especie.

La metodología utilizada consideró comparar los patrones genéticos interespecie e intraespecie, a partir de muestras de *F. hepatica*. Los resultados obtenidos muestran marcadores genéticos al azar, que evidencian variabilidad genética de *F. hepatica* intra e interespecie (polimorfismo), y cuyos fragmentos de amplificación fluctuaron entre los 135 y 741 pares de bases (pb).

REFERENCIAS

- 1.- ALCAÍÑO H, APT W. Algunos Antecedentes sobre la Fascioliasis Animal y Humana. Monog Med Vet 1989; 11: 14-29.
- 2.- ATIAS A. Parasitología Clínica. 3ra ed. Publicaciones Técnicas. Mediterráneo. Santiago, Chile. 1991. 618p.
- 3.- KRICKA L J. Nonisotopic ADN probe Technique. Academic press inc. Philadelphia, 1992. 358 p.
- 4.- WILSON S. Application of Nucleic Acid-Based technologies to the diagnosis and detection of disease. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 609-11.
- 5.- GRIFFIN H G, GRIFFIN A M. PCR Technology Current Innovations. Boca Ratón, USA, CRC, 1994. 370 p.
- 6.- BARKER R H Jr. Use of PCR in the Field. Parasitology Today 1994; 10: 117-9.
- 7.- PRICHARD R. Application of Molecular Biology in Veterinary Parasitology. Vet Parasitol 1997; 71: 155-75.
- 8.- GASSER R. PCR- Based Technology in Veterinary Parasitology. Vet Parasitol 1999; 84: 229-58.
- 9.- TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABÉ C et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between Random-Primer ADN typing and Multilocus Enzyme electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1335-9.
- 10.- LEELAYUWAT C, ROMPHRUK A, LULITA-NOND A et al. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* Using randomly amplified poly-morphic ADN (RAPD): Indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. Acta Tróp 2000; 77: 229-37.
- 11.- GASSER R. Mutation Scanning Methods for the Analysis of Parasite Genes. Int J Parasitol 1997; 27: 1449-63.
- 12.- GOMES M L, MACEDO A M, PENA S, CHIARI E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolates from chronic chagasis patients in Southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. Acta Tróp 1998; 69: 99-109.
- 13.- GOMES M A, MELO M N, MACEDO A M et al. RAPD in analysis of isolates of *Entamoeba histolytica*. Acta Tróp 2000; 75: 71-7.
- 14.- MULLIS K, FERRÉ F, GIBBS R. The Polymerase Chain Reaction. Birkhäuser. Boston, 1994. 458 p.
- 15.- PEDROSA A. Reacción en Cadena de la Polimerasa: Revisión Bibliográfica. Archivos Médicos de Camagüey. 1999. 3 (2).
- 16.- GANA E. Relación entre polimorfismos genéticos intragénicos y Características de producción de leche y fertilidad en vacas holstein fresian. (Tesis Ing. Agrónomo) Santiago, Chile, Universidad Mayor. Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias. 1999. 52 p.
- 17.- WELSH J, McCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-8.
- 18.- WILLIAM J G K, KUBELIK A R, LIVAK K L et al. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 6531-5.
- 19.- RAFALSKI J A, TINGEY S V, WILLIAMS J G K. RAPD Markers: A new technology for genetic mapping and plant breeding. AgBiotech News and Information 1991; 3: 645-8.
- 20.- MacPHERSON J M. GAJADHAR A. Random Amplified Polymorphic ADN. Parasitology Today 1992; 8: 235.
- 21.- CLARK A, LANIGAN C. Prospects for Estimating Nucleotide Divergence with RAPDs. Molecular Biology and Evolution 1993; 10: 1096-111.
- 22.- ESPINOSA L, BOROWSKY R. Evolutionary Divergence of AP-PCR (RAPD) Patterns. Molecular Biology and Evolution 1998; 15: 408-14.
- 23.- SHUBKIN C, WHITE M, ABRAHAMSEM M et al. A Nucleic Acid-Based test for detection of *Fasciola hepatica*. J Parasitol 1992; 78: 817-21.
- 24.- ROGNLIE M, DIMKE K, KNAPP S. Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. J Parasitol 1994; 80: 748-55.
- 25.- McMANUS D, BOWLES J. Molecular Genetic Approaches to Parasite Identification: Their value in Diagnostic Parasitology and Systematics. Int J Parasitol 1996; 26: 687-704.
- 26.- SAMBROOK J, FRITSH E, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. 1989.
- 27.- CHUNG E R, KIM W T, HAN S K. Analysis of DNA Polymorphism and Genetic characteristics in Holstein Dairy Cattle using RAPD-PCR Technique. Korean J Anim Sci 1995; 37: 455-66.