

EVALUACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACCIONES DE ARN CON CALIDAD PARA ANÁLISIS DE RNA-SEQ ESPECÍFICO DE *Balamuthia mandrillaris*

Leobardo D. Gonzalez-Zuñiga¹, J. Reyes Gonzalez-Galaviz², Abraham Cruz-Mendivil³, Luis F. Lares-Jiménez¹, Fernando Lares-Villa¹, Libia Z. Rodriguez-Anaya². ¹Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, 85000. ²CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, 85000. ³CONACYT-Instituto Politécnico Nacional, Guasave, 81000. Email: daniel.gz93@hotmail.com

Palabras clave: AVL, *Balamuthia mandrillaris*, ARN.

Introducción. Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos distribuidos alrededor del mundo, encontrándose en diferentes fuentes ambientales, siendo reportadas como patógenos para humanos a *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Vermamoeba vermiformis* y *Sappinia pedata* (1). *B. mandrillaris* es responsable de causar encefalitis amebiana granulomatosa (GAE), la cual tiene una tasa de mortalidad del 98%, y actualmente no cuenta con un tratamiento 100% efectivo (2). Para estudiar la patogenia de las infecciones causadas por *B. mandrillaris* se pueden realizar análisis referentes al transcriptoma (3), sin embargo, esta información es limitada, y para ampliar este conocimiento es necesario un protocolo de extracción que proporcione un ácido ribonucleico (ARN) de alta calidad considerando como criterios: integridad, pureza y cantidad específico para el cultivo y cosecha de *B. mandrillaris* (4). Además, el número de integridad del ARN (RIN), evalúa la integridad representada a través de un rango numérico (1-10), donde un ARN con valores >7 es apto para investigaciones relacionadas a la transcriptómica (5).

El objetivo de esta investigación fue obtener ARN de *B. mandrillaris* que cumpla con los parámetros de integridad, pureza y cantidad para su uso en análisis transcriptómicos, mediante la estandarización de un protocolo de extracción.

Metodología. Se evaluaron 11 protocolos de extracción de ARN basados en tres kits comerciales (Invitrogen TRIzol Reagent, QIAGEN RNeasy Mini Kit, PROMEGA SV Total RNA Isolation System) realizando distintas modificaciones y combinaciones. La pureza y la concentración se determinaron mediante espectrofotometría, la integridad por electroforesis en gel y electroforesis en chip para determinar el RIN. La calidad de las secuencias de analizó por FastQC.

Resultados. De los protocolos evaluados, 4 presentaron un ARN íntegro. Sin embargo, al realizar los análisis de pureza, el protocolo TI obtuvo un nivel

de absorbancia 260/230 por debajo del estándar de calidad aceptable, a diferencia del resto que se mantuvieron dentro de esos parámetros. Al analizar las muestras para obtener el RIN, los protocolos QM, T+QMP y T+P presentaron un RIN de alta calidad, mientras el protocolo TI obtuvo un resultado más bajo en comparación, concordando con las análisis de pureza previamente realizados.

Tabla 1. Análisis de concentración, pureza e integridad de muestras.

Muestra	Concentración (ng/μl)	A260/280	A260/230	RIN
TI	1159	2.04	1.21	7.1
QM	1060	2.03	2.15	9.8
T+QMP	655	2.22	2.49	9.2
T+P	608	2.17	2.31	8.9

TI: Invitrogen TRIzol Reagent. **QM:** QIAGEN Rneasy Minikit modificado. **T+QMP:** TRIzol + QIAGEN Rneasy Mini kit modificado + Precipitación adicional. **T+P:** TRIzol + PROMEGA SV RNA Total

Conclusiones. Los protocolos QM, T+QMP y T+P proporcionaron un ARN que cumplió con los criterios de integridad, pureza y cantidad, donde las modificaciones implementadas elevaron la calidad final del ARN y estos se recomiendan para obtener resultados certeros y precisos al realizar análisis transcriptómicos.

Agradecimiento. Se agradece al proyecto Ciencia de Frontera #840834 financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Bibliografía.

1. Rojas Vargas, C. (2021). *RMS*, 6(9), e716.
2. Hu, J., Zhang, Y., Yu, Y., Yu, H., Guo, S., Shi, D., He, J., Hu, C., Yang, J., Fang, X., & Xiao, Y. (2022). *Front. Immunol.*, 12.
3. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). *Nat. Rev.* 10(1): 57–63.
4. Zakaria, Z., Umi, S. H., Mokhtar, S. S., Mokhtar, U., Zaiharina, M. Z., Aziz, A. T., Hoh, B. P. (2013). *GMR*, 12(1): 302–311.
5. Kvastad, L., Carlberg, K., Larsson, L., Villacampa, E. G., Stuckey, A., Stenbeck, L., Lundberg, J. (2021). *Commun. Biol.*, 4(1).