

Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR

 23 min.



La extracción de ADN -y su amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)- representa una fuente de material muy importante para hallazgos moleculares en el ámbito clínico, científico y forense. En el siguiente trabajo un equipo multidisciplinario de profesionales nos presenta un estudio donde utilizaron tres métodos diferentes de extracción de ADN

y además analizaron su utilidad en la amplificación por PCR



Javier Alonso Baena Del Valle*,
Álvaro José Ramos Moreno**,
Claudio Jaime Gómez Alegría***,
Doris Esther Gómez Camargo****

* Médico, Residente de patología. Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores "Virginia Gutiérrez de Pineda", Colciencias. Facultad de Medicina,

Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación UNIMOL, Cartagena-Colombia.

** Bachelor of Science, Canal Medical Center. Houston, Texas-Estados Unidos de América.

*** Médico, Estudiante Doctorado en Medicina Tropical, Universidad de Cartagena. Bioquímico, Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Grupo de Investigación UNIMOL, Bogotá DC, Colombia

**** Bacterióloga, Magister en Microbiología Clínica, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina, Doctorado en Medicina Tropical. Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación UNIMOL, Cartagena, Colombia.

CUANDO ELEGÍS UN LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS,
ELEGÍS MUCHO MÁS QUE ESO.



 Resultados en 24 hs.

 Análisis confiables.

 Atención y soporte personalizados.

 Acreditación
NM ISO 15.189:2010*

* Consulte alcance de acreditación en oaa.org.ar

ELEGÍ CUIDARTE.



labmedicina.com
Teléfono: 0810-888-4421

Más de 30 Años de
excelencia diagnóstica.



LABORATORIO DE MEDICINA
ANÁLISIS CLÍNICOS | Dr. Raul Gutman

Recibido: octubre 15 de 2012
 Aprobado: junio 16 de 2013
 Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XV No. 1 Julio
 2013 172-179



Autor de correspondencia: Doris Gómez Camargo. MSc. PhD. Carrera 6 No 5-161 apartamento 502. Cartagena, Colombia.
 E-mail: degomez@hotmail.com



Resumen

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina son una fuente de material para hallazgos moleculares en el ámbito clínico y científico, demostrándose que el ADN extraído de éstos, es adecuado para amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). En este estudio, se ensayaron tres métodos de extracción de ADN en tejidos incluidos en parafina, con el objetivo de comparar la eficiencia de estos para obtener ADN adecuado, además se analizó su utilidad en amplificación por RCP. Se emplearon tres muestras, correspondientes a una biopsia de pulmón, legrado endometrial y ganglio linfático, todas fijadas en formaldehído al 10% e incluidas en parafina. Utilizándose tres métodos diferentes de extracción de ADN (extracción por salting out, método modificado de Sambrook y kit comercial) El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría, además se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, para comprobar si el ADN era de buena calidad y se realizó RCP para el exón 3 del gen caveolina 1. Todos los métodos dieron como resultado una buen producto de ADN genómico, observándose mayor cantidad y pureza en los métodos de salting out y kit comercial, asimismo se obtuvo amplificación del producto esperado por estos dos métodos, no hubo buenos resultados con el ADN extraído por el método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples, según Sambrook". El ADN obtenido a partir de tejidos FFIP puede ser amplificado por varios métodos, entre estos, la extracción

por salting out es útil y con poca toxicidad, permite obtener ADN de buena calidad para amplificación por RCP.

Palabras claves: ADN, aislamiento y purificación, adhesión en parafina, formaldehído, reacción en cadena de la polimerasa.

Introducción

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (FFIP) son una gran fuente de material para hallazgos moleculares en el ámbito clínico y científico, porque representan un material biológico específico de una enfermedad, permitiendo establecer correlación entre aspectos moleculares, patogénesis, pronóstico clínico y tratamiento (Lehmann y Kreipe, 2001; Dedhia et al., 2007).

El ADN extraído de tejidos FFIP es adecuado para amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y existen muchos estudios que han demostrado la utilidad del análisis genético basado en RCP con tejidos FFIP (Akao et al., 1991; Sato et al., 2001), no solo para estudiar alteraciones del genoma humano, sino también para el diagnóstico de patógenos de importancia como virus y bacterias, en los cuales las técnicas de detección microbiológica convencionales pueden ser laboriosas y tomar varios días antes de obtener un resultado (Yang et al., 2004; Mahaisavariya et al., 2005; Dedhia et al., 2007).

El formaldehído al 10% es el fijador más utilizado en los estudios histopatológicos. Sin embargo, en algunos casos es difícil obtener grandes fragmentos de ADN a partir de tejidos FFIP debido a que el ácido fórmico generado en la solución de formaldehído al 10%, el tiempo de fijación y el periodo de almacenamiento de los tejidos en bloques de parafina afecta la calidad del ADN. Por ejemplo, durante la fijación en formaldehído al 10%, este se transforma gradualmente en ácido fórmico, el cual hidroliza el ADN, generando extensa fragmentación de los ácidos nucleicos y pobres resultados en la amplificación por

RCP (Greer et al., 1994; Pavelic et al., 1996; Sato et al., 2001).

Los métodos tradicionales para aislamiento de ADN de tejidos FFIP utilizan xilol como agente removedor de parafina, seguido de purificación con fenol/cloroformo, lo cual requiere múltiples pasos con una prolongada duración y riesgo de contaminación cruzada con otras muestras que se estén procesando al mismo tiempo (Howe et al., 1997; Yang et al., 2004).

En este estudio, se aplicaron tres métodos para extracción de ADN en una serie de tejidos FFIP, con el objetivo de comparar la eficiencia de estos para producir ADN de buena calidad y cantidad. Además de evaluar la aplicabilidad del ADN extraído al realizar amplificación por RCP.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Estudio descriptivo transversal

Diseño experimental

Estudio cuantitativo experimental

Muestras de estudio

Se analizaron tres bloques de tejidos FFIP, archivados en el Laboratorio de Patología del Hospital Universitario del Caribe (Cartagena, Colombia), que habían sido previamente utilizados para estudio histopatológico y diagnóstico. Se solicitó consentimiento informado. Las muestras correspondían a biopsia transbronquial de pulmón, una muestra de legrado endometrial y una muestra de ganglio linfático, todas fijadas en formaldehído al 10% tamponado y almacenadas a temperatura ambiente en un periodo inferior a seis meses. Para cada caso, se tomaron tres cortes de 10 µm de grosor por triplicado. Se emplearon tres métodos diferentes de extracción de ADN para cada caso, realizando limpieza a fondo y nuevos sets de instrumentos de corte después de cada muestra procesada.

Preparación inicial

Los cortes fueron depositados en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1,5 ml. El proceso de remoción de la parafina y digestión enzimática se realizó según el protocolo de Rivero y colaboradores. (Rivero et al., 2006) con algunas modificaciones, de la siguiente forma:

Se tomó el mismo número de cortes para cada muestra. Se añadió 1 ml de xilol precalentado (aproximadamente 50 °C) a cada microtubo y se mantuvo a 56 °C por 10 minutos, luego se centrifugó a 10000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado, seguido de nuevos cambios de xilol precalentado, hasta que la parafina se removiera completamente. El botón fue lavado con etanol en concentraciones descendentes (etanol absoluto, etanol al 95% y al 70%). Cada cambio fue precedido por homogenización en vórtex y centrifugación a 10000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos.

Posteriormente se añadieron 400 µl de tampón de digestión proteinasa K µg/µl (NaCl 1 M, Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8; dodecilsulfato sódico 10%). La digestión en este caso se llevó a cabo por 24 horas a 60 °C, reduciendo el periodo de digestión de 1 – 2 días, recomendando por Rivero y Cols. Al concluir este proceso la proteinasa K fue inactivada por calor a 95 °C por 10 minutos.

Del material obtenido luego de la desparafinización y digestión enzimática se realizó la extracción de ADN mediante los tres métodos señalados a continuación. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado:

Extracción de ADN por salting - out (Método A)

Se siguió el método planteado por Rivero y Cols (Rivero et al., 2006), reemplazando el agente precipitante original (acetato de amonio 2 y 4 M) por NaCl 5 M, de la siguiente manera: Una vez concluida la

digestión enzimática se añadieron 500 µl de NaCl 5 M. Los microtubos fueron agitados vigorosamente en un vórtex, se incubaron en hielo por 5 min y posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo estéril con 600 µl de isopropanol, la mezcla se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos, consecutivamente se descartó el sobrenadante y el botón de ADN fue lavado con etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el ADN fue finalmente disuelto en solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 1,4 y EDTA 1mM, pH 8) e incubado a 4 °C por 24 horas.

Extracción de ADN por método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples, según Sambrook (Método B)

Se siguió el protocolo No. 5 (Prepa-



Líder en Soluciones Preanalíticas

La utilización del sistema BD Vacutainer® garantiza la calidad de la muestra desde el momento de la extracción hasta su posterior análisis, permitiendo obtener resultados de laboratorio oportunos y confiables.



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a vacutainer@bd.com

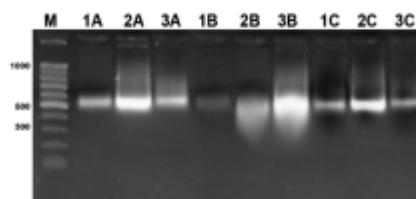


ration of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples) según Sambrook (Sambrook, J, 2001) con modificaciones a la técnica, así:

Tras inactivar la proteinasa K de la solución de digestión, se obvió la utilización de fenol y se añadió solo un volumen equivalente de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), agitando suavemente por inversión. Las fases orgánicas y acuosas se separaron por centrifugación a 10000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. El ADN fue precipitado añadiendo un volumen equivalente de isopropanol, los tubos fueron incubados a -20 °C por 10 minutos y posteriormente centrifugados a 12000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. El isopropanol fue descartado y se lavó el botón con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó a 12000 rpm, temperatura ambiente, por 5 minutos. Después de descartar el sobrenadante se secaron los botones en aire seco a temperatura ambiente, por 15 – 20 minutos. El ADN fue rehidratado en solución TE a 4 °C por 24 horas.



Figura1: muestra el patrón electroforético del ADN obtenido por los tres métodos de extracción. En general el ADN genómico osciló entre 900 pb y 300 pb, lo cual es comúnmente observado en ADN extraído de tejidos FFIP. Se observaron diferencias en las corridas electroforéticas; los patrones de ADN de los métodos A (salting out) y C (kit comercial) fueron muy similares, obteniéndose una banda homogéneamente teñida entre 500 pb y 700 pb. El ADN obtenido por el método B (método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples", según Sambrook, 2001) mostró un patrón de electroforesis diferente, El ADN no se observó uniformemente teñido, con extensión hasta el fondo del corrido, lo que sugirió la presencia de degradación.



Extracción de ADN por kit comercial (Método C)

Se utilizó el kit comercial PureLink® Genomic DNA Kits para purificación de ADN genómico (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). No hubo conflicto de intereses en la elección de este método. Siguiéndose el protocolo de manufactura en el apartado "Extracción de ADN de tejido". El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta el análisis espectrofotométrico y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Cantidad, pureza y patrón electroforético del ADN

La cantidad de ADN para cada método de extracción fue determinada por medio de espectrofotometría (8452 UV, HP®, Palo Alto, CA, USA) calculada de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo por medio de la relación A260/A280. El tamaño de cada ADN obtenido fue comparado por medio de electroforesis en geles de agarosa (1% en Tris acetato y tampón EDTA, pH 8) teñido con bromuro de etidio (Merck®, Darmstadt, Alemania), utilizando marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder 0,13 µg/µl (Promega, Madison, WI, EU). Posteriormente, el gel fue fotografiado bajo luz ultravioleta en un sistema de fotodocumentación Kodak® EDA 290 1D V 3.5.4 con transiluminador Bi – O Vision® (Spectroline, Westbury, NY, USA).

Amplificación por RCP

Para comprobar si el ADN obtenido en cada método era amplificable, se utilizó cada muestra de ADN como molde para amplificar un fragmento de 782 pares de bases (pb) en la secuencia codificante del exón 3 del gen caveolina – 1 (GenBank Gene ID: 857), utilizando los cebadores F: 5'-TCTGTGTTCCCAAGTTCCAA -3' y R: 5'-

GCCAATAAAGCGATGGTTGA -3'. La reacción fue desarrollada en tubos de RCP de 200 µL (Simport®, Beloeil Qc, Canada). Cada reacción estandarizada se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 100 ng de ADN molde, 7,5 pM de cebador, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato 100mM (dNTPs) (Invitrogen® Brasil Ltda, Sao Paulo, Brasil), 0,5 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen® Brasil Ltda, Sao Paulo, Brasil) en un amortiguador que consistió en Tris – HCl 20mM, (pH 8,4) KCl 50mM y MgCl² 3mM (Invitrogen® Brasil Ltda, Sao Paulo, Brasil). Todos los experimentos de amplificación por RCP fueron realizados por duplicado.

Todas las reacciones de RCP se realizaron en un termociclador Genius® (Techne Incorporated, Burlington NJ, USA). El programa de ciclos utilizado fue 95 °C por cinco minutos (un ciclo), 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto (27 ciclos), finalmente 72 °C por 10 minutos (un ciclo).

Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder 0,13 µg/µl (Promega, Madison, WI, EU). La separación se llevó a cabo a 80 voltios constantes por 60 minutos (temperatura ambiente), posteriormente las imágenes fueron digitalizadas.

Análisis estadístico

Las concentraciones y relaciones de absorbancia A260/A280 fueron comparadas empleando la prueba t de Student. La concordancia entre las concentraciones de ADN obtenidas con cada uno de los tres métodos fue estimada mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson y el Coeficiente de Correlación y Concordancia de Lin. Para estos procedimientos se estimaron las medias a partir del conjunto de todos los valores obtenidos con los tres tipos de muestras, con valores únicos de tendencia central para los tres métodos.

Resultados

Cantidad y pureza del ADN

La cantidad total y pureza del ADN para cada método están descritas en la tabla 1. Todos los tres métodos de extracción dieron como resultado una buena cantidad de ADN (mayor a 100 ng/μl) que se consideró adecuada para la amplificación por RCP, obteniendo mayor cantidad por el método salting out con un promedio de 439 ng/μl, seguido por el método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples", según Sambrook con un promedio de 285 ng/μl y en menor cantidad con el método de extracción con kit comercial, obteniendo un promedio de 268 ng/μl. El rango de pureza del ADN (A260/ A280) estuvo entre 1,02 y 1,88. El método con el cual se obtuvo menor contaminación del ADN de los tres métodos ensayados fue la extracción por medio de kit comercial (promedio = 1,74) y la menor pureza correspondió a las muestras extraídas por el método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse

Tails y Other Small samples, según Sambrook" (promedio = 1,25).



Tabla 1. Cantidad y pureza del ADN, de acuerdo a los diferentes métodos de extracción utilizados. A: método de extracción por salting out. B: método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples", según Sambrook, 2001. C: método por kit comercial. La muestra 1 corresponde a la biopsia transbronquial, muestra 2 al legrado endometrial y muestra 3 al ganglio linfático.

Las diferencias entre las concentraciones medias de ADN se expresan en las tablas 1 y 2. Con el método A se obtuvieron concentraciones más altas a partir de las muestra 2, mientras que el método B arrojó concentraciones de ADN más altas cuando fue aplicado a la muestra 3. Únicamente las diferencias entre las medias de los métodos A y C fueron significativas, cuando se compararon los resultados obtenidos con todos los tipos de muestra conjuntamente. El grado de concordancia entre los tres métodos se representa en las tablas 3 y 4, para los coeficientes de correlación de Pearson y coeficiente de correlación y concordancia de Lin,

respectivamente. De acuerdo con los resultados, los métodos A y C conservan correlación, pero en general la concordancia entre las concentraciones de ADN medidas es baja.

En la comparación de las razones A260/A280, las medias para los métodos A y B no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,144$), al igual que las medias de los métodos A y C ($p=0,318$); la comparación entre las medias para los métodos B y C mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,044$).

Método	Muestra	Cantidad de ADN (ng/ul)	Pureza del ADN (A260/A280)
A	1	376	1,73
	2	651	1,37
	3	310	1,67
B	1	121	1,25
	2	189	1,02
	3	545	1,18
C	1	304	1,88
	2	405	1,60
	3	196	1,74



Quimioluminiscencia



Reproductive

AFP (ONTD)
DHEA-S
Estradiol
hFSH
hLH
Inhibin A
PIGF
(preclampsia)*
sVEGF R1
(preclampsia)*
Progesterone
Prolactin
Testosterone
Total βhCG
Unconjugated Estriol
SHGB (sex hormone binding globulin)



Thyroid

Free T3
Free T4
HYPERsensitive hTSH
(3rd generation)
Thyroglobulin
Thyroglobulin Ab
Total T3
Total T4
TPO Ab



Anemia

Vitamin B12
Erythropoietin
Ferritin
Folate
Intrinsic Factor Ab
RBC Folate
Soluble Transferrin
Receptor



Tumor Markers

AFP
BPH-A*
CEA
CA 15-3 Antigen
CA 19-9 Antigen
CA 125 Antigen
Hybritech®PSA
Hybritech® free PSA
[-2]proPSA*



Skeletal

Bone Metabolism
Intact PTH (Routine / Intra-Operative)
Ostase® Bone Alkaline Phosphatase
Ultrasensitive hGH
Vitamin D*



Infectious Disease

Toxo IgM
Toxo IgG
Rubella IgM
Rubella IgG
CMV IgM*
CMV IgG*



Specialty

Diabetes
Ultrasensitive Insulin

Allergy
Total IgE

Inflammation
Interleukin-6



Cardiac

AccuTni® Troponin I
β2-Glycoprotein 1 Ab*
CK-MB
Myoglobin



Adrenal/Pituitary

Cortisol
(Serum and Urine)

Blood Virus

HAV IgM
HAV Ab
HBs Ag
HBs Ag
HBs Ag
Confirmatory
HBs Ab
HBc IgM
HBc Ab
HCV Ab
HIV 1/2 Ab*

* Consultar disponibilidad



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar



Tabla 2. Comparación de medias para todas las muestras empleando la prueba t de Student. Se expresan los valores de p correspondientes a cada apareamiento.

Método	A	B	C
A	-	0.07963	0.01249
B	*	-	0.8259
C	*	*	-



Tabla 3. Análisis de correlación lineal de Pearson, en el que se incluyeron los valores de todas las pruebas para las tres muestras en cada uno de los métodos estudiados.

Tabla 4. Análisis de concordancia entre las concentraciones de ADN obtenidas con los tres métodos en estudio. Los valores expresados corresponden al Coeficiente de Correlación y Concordancia de Lin.

Método	A	B	C
A	-	-0.54 (p=0.1347)	0.98 (p<0.001)
B	*	-	-0.4 (p=0.2918)
C	*	*	-

Patrón electroforético

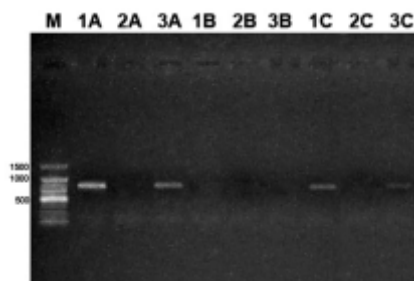


Figura 2. Fragmentos de ADN amplificados del exón 3 del gen cavolina – 1 con ADN total obtenido por cada método de extracción. (A) método de extracción por salting out. (B) método modificado “Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples”, según Sambrook. (C) método por kit comercial. (M) marcador de peso molecular 100 pb, expresado en pares de bases (pb). Las muestra 1 corresponde a la biopsia transbronquial, muestra 2 al legrado endometrial y muestra 3 al ganglio linfático.

Amplificación por RCP

La utilidad del ADN obtenido para las reacciones por RCP se muestra en la figura 2. Se amplificó el fragmento de 782 pb del exón 3 del gen caveolina – 1. Solo se obtuvo amplificación en dos muestras del método A y dos muestras del método C, las cuales

correspondían a ADN extraído de biopsia transbronquial y de ganglio linfático. La amplificación no fue exitosa con las muestras extraídas por el método B ni con el ADN obtenido de la muestra de legrado endometrial, en ninguno de los tres métodos.



Discusión

Los tejidos FFIP constituyen un archivo de especímenes humanos únicos. La correcta extracción de ADN y las técnicas basadas en RCP, permiten ahora que los patólogos y científicos empleen dicho material para una gran variedad de propósitos (Mies, 1994; Sepp et al., 1994; Díaz-Cano, 1997; Chan et al., 2001; Rivero et al., 2006). Sin embargo, es difícil obtener resultados consistentes, debido a que el ADN extraído de tejidos fijados está usualmente poco preservado o degradado. Se ha demostrado que el ADN extraído de muestras fijadas en formol por más de 24 horas muestran una marcada disminución en la amplificación por RCP (Forsthoefel et al., 1992; Stein y Raoult, 1992; Greer et al., 1994; Sato et al., 2001).

Actualmente existen múltiples métodos de extracción de ADN de tejidos FFIP publicados, diseñados con el fin de mejorar la efectividad de la amplificación por RCP. Los métodos rutinarios para extraer ADN de tejidos FFIP consisten en múltiples pasos que incluyen desparafinización en xilol, lavado en series decrecientes de etanol, digestión proteica y por último purificación del ADN. El método más frecuente utilizado es la extracción por fenol – cloroformo (Isola et al., 1994; Rivero et al., 2006; Farrugia et al., 2010; Ludyga et al., 2012). El fundamento de este sistema de separación es la solubilidad de ácidos

nucleicos, proteínas y lípidos en solventes orgánicos, pero tiene como inconvenientes la toxicidad del fenol (en este estudio fue utilizada solo la preparación cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), procedimientos laboriosos y múltiples procesos de centrifugado y pipeteo que aumentan el riesgo de contaminación.

Por otro lado, la extracción con kit comercial permite obtener un ADN de muy buena calidad y utilidad para RCP (Cao et al., 2003; Khokhar et al., 2011; Turashvili et al., 2012), pero presenta como limitante principal el elevado costo de algunos de estos sistemas de purificación.

En este trabajo se utilizó un método de extracción por salting out similar al empleado por Rivero y colaboradores. (Rivero et al., 2006), reemplazando el agente precipitante de ese método (acetato de amonio 2 y 4 M) por NaCl 5 M, obteniendo ADN de buena cantidad, calidad y patrón electroforético comparable al sistema comercial y con mejores resultados con respecto a la extracción por el método modificado “Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails y Other Small samples”, según Sambrook. Además, el método de salting out es más sencillo y menos tóxico que el sistema convencional de fenol – cloroformo o la variación cloroformo – alcohol isoamílico.

Por otro lado, al analizar la amplificación por RCP, observamos que el método de extracción por salting out es igual de eficiente que el método de aislamiento por kit comercial, con cantidad y pureza de ADN estadísticamente comparable, permitiendo obtener el producto de amplificación esperado, el cual puede ser utilizado para múltiples propósitos. Si bien, existen en la actualidad diversas pruebas comerciales específicamente diseñadas para extraer ADN de tejidos FFIP, las cuales permiten aislar ADN de buena calidad para RCP y procesos de secuenciación, en laboratorios y proyectos con presupuesto limitado la técnica de salting out modificada es una buena alternativa para llevar a cabo las extracciones de ADN de tejidos FFIP.

La ausencia de amplificación por el método modificado "Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails and Other Small samples", según Sambrook pudo deberse a la carencia de ADN molde de longitud suficiente para el producto deseado (782 pb) o contaminación excesiva que hubiera interferido con la reacción.

La utilización de tres muestras de diferentes tejidos (tejido linfoide, endometrio y tejido pulmonar) fue de gran utilidad en este estudio, debido a que cada uno presenta diversas propiedades que pueden influir en la cantidad y calidad del ADN, asimismo, en el rendimiento de la RCP. El tejido linfoide, en este caso obtenido de ganglio linfático, es muy celular y por ende aportaría una mayor cantidad de ADN. Las muestras de endometrio usualmente contienen cantidades significativas de hemáties, que pueden inhibir reacciones de amplificación por RCP. Por otro lado, el parénquima pulmonar es una muestra de celularidad estándar y de buen rendimiento.

Teniendo en cuenta que en este trabajo realizamos variaciones en los métodos de preparación y extracción de ADN para disminuir su toxicidad y mejorar el rendimiento de la RCP, la utilización de tres tejidos diferentes fue útil para observar ventajas y limitantes en el rendimiento de las técnicas. Por ejemplo, la presencia de abundantes glóbulos rojos en las muestras de endometrio pudieron ser causantes de la falta de amplificación por RCP (figura 2, muestras 2A, 2B, 2C) en cada uno de los métodos ensayados, lo anterior ha sido reportado previamente en la literatura (Sambrook, J, 2001; Al-Soud y Rådström 2001).

En otros estudios (Greer et al., 1994; Rivero et al., 2006) se ha demostrado que el agente fijador es importante para la calidad del ADN obtenido, demostrando que los tejidos fijados en etanol y en menor proporción formaldehído al 10% tampoco, tienden a tener fragmentos de ADN de mayor longitud en comparación con

fijadores como Zenker y B5, por lo tanto, los dos primeros son más útiles para el análisis por RCP. Si se obtienen fragmentos de bajo peso molecular, será difícil obtener productos mayores a 500 pb.

Conclusiones

En conclusión, aunque obtener ADN de tejidos FFIP es un desafío debido a que no siempre es posible obtener fragmentos de gran tamaño y en algunos laboratorios no tenemos a disposición kits comerciales para llevar a cabo este proceso, la técnica de extracción por salting out modificada en este estudio es una forma rápida, pues acorta el periodo de digestión en 1 a 2 días y con poca toxicidad, debido a la utilización de NaCl como agente precipitante, que permite obtener ADN de buena cantidad y de buena longitud para amplificación por RCP convencional.

ANALIZADOR PORTÁTIL PARA GASES EN SANGRE

Gases en sangre, Electrolitos y Metabolitos

Resultados en tiempo real y en sus manos

- ✓ En solo 30 segundos.
- ✓ Tecnología SMARTCARD: tarjetas de un solo uso.
- ✓ Almacenamiento a temperatura ambiente.
- ✓ Calibración y controles automáticos incorporados.
- ✓ Comunicación inalámbrica WIFI / Bluetooth a PC.

epoc



Agradecimientos

Agradecemos a Colciencias y el Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, por patrocinar al joven investigador Javier A. Baena Del Valle, a la Universidad de Cartagena y al Laboratorio de Patología del Hospital Universitario del Caribe por permitir la utilización de sus laboratorios y muestras de tejidos FFIP de paciente y al personal técnico, al Grupo UNIMOL por la financiación, al Médico, Estudiante del Doctorado en Medicina Tropical, Universidad de Cartagena, Gustavo Mora García, por realizar el análisis estadístico.



Referencias bibliográficas

- Akao I., Sato Y., Mukai K., Uhara H., Furuya S., Hoshikawa T., Shimosato Y., y Takeyama I. 1991. Detection of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction y in situ hybridization. *Laryngoscope*. 101 (3): 279–283.
- Al-Soud, W A, y P Rådström. 2001. Purification and Characterization of RCP-inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (2): 485-493.
- Cao W., Hashibe M., Rao J.Y., Morgenstern H., y Zhang Z.F. 2003. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues y buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*. 27 (5): 397–404.
- Chan P.K., Chan D.P., To K.F., Yu M.Y., Cheung J.L. y Cheng, A.F. 2001. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for RCP amplification of human y viral DNA. *Journal of Clinical Pathology*. 54 (5): 401–403.
- Dedhia P., Tarale S., Dhongde G., Khadapkar R., y Das B. 2007. Evaluation of DNA extraction methods and real time RCP optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 8 (1): 55–59.
- Díaz-Cano S.J., y Brady S.P. 1997. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagnostic Molecular Pathology*. 6 (6): 342–346.
- Farrugia A., Keyser C., y Ludes B. 2010. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International*. 194 (1-3): 25–28.
- Forsthoefel K.F., Papp A.C., Snyder P.J., y Prior T.W. 1992. Optimization of DNA extraction from formalin-fixed tissue and its clinical application in Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Clinical Pathology*. 98 (1): 98–104.
- Greer C.E., Wheeler C.M., y Manos M.M. 1994. Sample preparation and RCP amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods and Applications*. 3 (6): S113–122.
- Howe J.R., Klimstra D.S., y Cordon-Cardo C. 1997. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for RCP amplification of archival material. *Histology and Histopathology*. 12 (3): 595–601.
- Isola J., DeVries S., Chu L., Ghazvini S., y Waldman F. 1994. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *American Journal of Pathology*. 145 (6): 1301–1308.
- Khokhar S.K., Mitui M., Leos N.K., Rogers B.B., y Park J.Y. 2011. Evaluation of Maxwell[®] 16 for automated DNA extraction from whole blood and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 50 (2): 267-272.
- Lehmann U., y Kreipe H. 2001. Real-time RCP analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 25 (4): 409–418.
- Ludyga N., Grünwald B., Azimzadeh O., Englert S., Höfler H., Tapio S., y Aubele M. 2012. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch*. 460 (2): 131–140.
- Mahaisavariya P., Chaiprasert A., Manonukul J., Khemngern S., y Tingtoy N. 2005. Detection and identification of Mycobacterium species by polymerase chain reaction (RCP) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 88 (1): 108–113.
- Mies C. 1994. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Human Pathology*. 25 (6): 555–560.
- Pavelic J., Gall-Troselj K., Bosnar M.H., Kardum M.M., y Pavelic K. 1996. RCP amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. *Neoplasma*. 43 (2): 75–81.
- Rivero E.R.C., Neves A.C., Silva-Valenzuela M.G., Sousa S.O.M., y Nunes F.D. 2006. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology - Research and Practice*. 202 (7): 523–529.
- Sambrook, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York, Estados Unidos de América: Spring Harbor Laboratory Press, p 2344.
- Sato Y., Sugie R., Tsuchiya B., Kameya T., Natori M., y Mukai K. 2001. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagnostic Molecular Pathology*. 10 (4): 265–271.
- Sepp R., Szabó I., Uda H., y Sakamoto H. 1994. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in RCP. *Journal of Clinical Pathology*. 47 (4): 318–323.
- Stein A., y Raoult D. 1992. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucleic Acids Research*. 20 (19): 5237–5238.
- Turashvili G., Yang W., McKinney S., Kalloger S., Gale N., Ng Y., Chow K., Bell L., Lorette J., Carrier M. 2012. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Experimental and Molecular Pathology*. 92 (1): 33–43.
- Yang Y.-Y., Koh L.-W., Tsai J.-H., Tsai C.-H., Wong E.F.-C., Lin S.-J., y Yang C.-C. 2004. Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 34 (4): 176–183.