

Electroforesis capilar: nueva técnica para análisis de marcadores oncohematológicos en el Instituto de Hematología e Inmunología

Ruiz-Moleón V, Garrote-Santana H, Díaz-Alonso CA, Fernández-Martínez L, Amor-Vigil AM.
Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana. Cuba
Email: veraruizmoleon@gmail.com

RESUMEN

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la separación y visualización de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este procedimiento es una herramienta indispensable en la biología molecular, pues permite evaluar importantes propiedades de los genes como su organización o alteraciones mediante el análisis de los fragmentos resultantes. Se conocen tres formas fundamentales de electroforesis: la electroforesis en gel horizontal o vertical, la electroforesis capilar (EC) y los dispositivos microfabricados. La EC es una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro. Desde el inicio de los estudios de alteraciones moleculares en hemopatías malignas en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), se ha utilizado la electroforesis en gel de agarosa. La reciente adquisición de un equipo de EC en el IHI creó la necesidad de validar nuestros estudios mediante esta técnica. Se realizó un estudio comparativo de la amplificación por PCR de 20 muestras de pacientes, para determinar si mostraban o no las alteraciones moleculares presentes en los diferentes tipos de leucemia, mediante ambas electroforesis. La EC resultó ser más ventajosa pues al ser automatizada se ahorra más tiempo en su preparación y en la obtención de los resultados. Permite analizar un mayor número de pacientes con el empleo de menor cantidad de reactivos y muestras. Al no utilizarse reactivos tóxicos, no perjudica la salud del personal del laboratorio. Por su elevada sensibilidad, los resultados fueron exactos y precisos. Las ventajas que ofrece la EC validan su introducción en sustitución de la electroforesis en gel de agarosa.

Palabras clave: electroforesis capilar, electroforesis en gel de agarosa, reacción en cadena de la polimerasa

INTRODUCCIÓN

Son numerosas las técnicas que se emplean en el estudio de las neoplasias hematológicas, ejemplo de ellas son: el *southernblot*, la citogenética convencional, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).¹ La técnica de la PCR posibilita la obtención de múltiples copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN.² Para la separación y visualización de los productos del PCR, se requieren de técnicas como la electroforesis que consiste en la migración de moléculas cargadas a través de soluciones bajo la influencia de un campo eléctrico. La separación de las moléculas por electroforesis es una herramienta que destaca dentro de la biología molecular pues permite evaluar importantes propiedades de los genes como su organización o alteraciones que pueden ser obtenidas mediante el análisis de estos fragmentos. En la actualidad, se conocen tres formas fundamentales de electroforesis: la electroforesis en gel horizontal o vertical, la electroforesis capilar (EC) y los dispositivos microfabricados.³

La electroforesis en gel, que puede ser de agarosa o de poliacrilamida es una de las más utilizadas para la separación de ácidos nucleicos en los laboratorios de biología molecular. Para la visualización del ADN y del ácido ribonucleico (ARN) en luz ultravioleta, se emplea bromuro de etidio. Sin embargo, éste es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe ser manejado con extremo cuidado en el laboratorio.⁴

La EC es una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro. Las características propias de la EC han posibilitado que sea una técnica de alta sensibilidad y resolución, que puede realizarse en corto tiempo y requiere pequeñas cantidades de muestras. Además, utiliza menos reactivos y es automatizable.⁵

Desde el inicio de los estudios de alteraciones moleculares en hemopatías malignas en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), se ha utilizado la electroforesis en gel de agarosa. La reciente adquisición de un equipo de EC en el IHI creó la necesidad de validar nuestros estudios mediante esta técnica.

OBJETIVO

Validar una nueva técnica electroforética para el análisis de marcadores oncohematológicos en el IHI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio comparativo de la amplificación por PCR de 20 muestras de pacientes, para determinar si mostraban o no las alteraciones moleculares presentes en los diferentes tipos de leucemia, mediante ambas electroforesis. A partir de estas muestras de sangre medular se obtuvo el ADN por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), a partir del ARN extraído con el *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Alemania). Una vez obtenido el ADN, se realizó una PCR para amplificar los fragmentos de interés. Luego las muestras fueron corridas, tanto por electroforesis en gel de agarosa como en electroforesis capilar, para determinar si presentan o no las mutaciones correspondientes a la enfermedad.

Corrida en electroforesis en gel de agarosa. En el caso de la electroforesis en gel de agarosa, primeramente, se pesó la agarosa y se disolvió en buffer TBS y H₂O destilada por calentamiento alrededor de tres minutos. Una vez disuelta se le añadió el bromuro de etidio y se vertió en la cubeta. Antes de que el gel se solidificara se le colocaron los peines para formar los carriles donde serían colocadas las muestras. Se esperó alrededor de 20 minutos a que se enfriara el gel. Posteriormente se colocaron las muestras en los carriles y se esperó 45 minutos para visualizar los resultados, con precaución, a través de un equipo de luz ultravioleta (UV). Por esta técnica fue posible correr 27 muestras más el marcador de peso molecular (MPM) que nos permitió conocer el peso aproximado de nuestra banda de interés.

Corrida en electroforesis capilar. La electroforesis capilar es una técnica automatizada, en la que solamente tiene que instalar en el equipo el cartucho que contiene los carriles por los que pasarán las muestras, colocar las mismas e introducir los datos correspondientes de cada una. Una vez finalizada la corrida, el propio equipo muestra los resultados obtenidos con sus respectivos pesos moleculares.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tanto por electroforesis en gel de agarosa como por electroforesis capilar de los pacientes en estudio coincidieron. De los 20 pacientes que se estudiaron, 12 tenían diagnóstico de leucemia mieloide crónica (LMC), 3 con leucemia mieloide aguda (LMA) y 8 con leucemia linfocítica aguda (LLA). De los casos con LMC, 8 resultaron positivos a la traslocación t(9;22) correspondientes a esta enfermedad. Los casos de LMA resultaron positivos a las mutaciones en el gen de la nucleofosmina (NPM1). Y de los casos con LLA, uno resultó positivo a la traslocación t(9; 22) y otro a la traslocación t(12; 21) (tabla).

Tabla 1. Alteraciones moleculares en hemopatías malignas por electroforesis en gel de agarosa y por el electroforesis capilar

Hemopatías Malignas	Mutaciones	Electroforesis en gel de agarosa	Electroforesis capilar
Leucemia mieloide crónica	t(9;22)	3 pacientes negativos 9 positivos: 5 b3a2; 3 b2a2; 1 b3a3	3 pacientes negativos 9 positivos: 5 b3a2; 3 b2a2; 1 b3a3
Leucemia mieloide aguda	Inv16	negativos	negativos
	t(8;21)	negativos	negativos
	NPM1	3 pacientes positivos	3 pacientes positivos
	FLT3	negativos	negativos
Leucemia linfocítica aguda	t(9;22)	3 pacientes negativos 1 paciente positivo:b3a2	3 pacientes negativos 1 paciente positivo b3a2
	t(12;21)	1 paciente positivo	1 paciente positivo
	t(1;19)	negativos	negativos
	t(4;11)	negativos	negativos

A pesar de la semejanza en los resultados, estas dos técnicas presentaron diferencias en la preparación de las mismas y en el análisis de los resultados. En el caso de la electroforesis en gel de agarosa, los resultados están basados en la apreciación del investigador que la observa, por lo que los mismos fueron imprecisos e inexactos al ser imposible obtener un peso molecular exacto de la banda. Sin embargo, con la electroforesis capilar, los resultados fueron exactos y precisos. Incluso, dada la alta sensibilidad del equipo, se pudo detectar bandas de baja concentración, pero con el peso molecular correspondiente a la mutación que se está estudiando.

CONCLUSIONES

Al analizarse las ventajas que presenta la EC, se pudo arribar a la conclusión de que es superior en todos los aspectos, pues es una técnica automatizada que ahorra tiempo a los investigadores en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Requiere menor cantidad de reactivos y muestras. Permite el análisis de múltiples muestras al mismo tiempo. Al emplear reactivos no tóxicos, la convierten en una técnica segura a la salud del personal del laboratorio. Al ser de elevada sensibilidad, posibilita que se obtengan resultados exactos y precisos y con ello un diagnóstico más fiable y acertado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burmeisher T, Thies E. Molecular genetics in acute and chronic leukemias. *Cancer Res ClinOncol*.2001;127:80-90.
2. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*.1991; 26:301-34.
3. Brody JR Kern SE. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem*. 2004;333:1-13.
4. Viovy JL. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Rev Modern Physics*.2000; 72(3):813-72.
5. Sekhon BS. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. *J Pharm Educ Res*. 2011; 2(2): 2-36.