

Introducción de nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos en el Instituto de Hematología e Inmunología

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

RESUMEN

La extracción de ácido ribonucleico (ARN) es una práctica indispensable en los laboratorios de biología molecular, teniendo en cuenta que múltiples entidades hematológicas requieren, como parte de su diagnóstico, un estudio molecular al inicio de la enfermedad y posteriormente para evaluar su evolución y respuesta al tratamiento. Se evaluaron tres métodos de extracción de ARN: mezcla detiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo modificado (GTC), *ARN QIAamp RNA Blood Mini Kit* y el sistema de *PAX gene Blood RNA* en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología teniendo en cuenta los siguientes parámetros: pureza, rendimiento, calidad del ARN por electroforesis en gel de agarosa, calidad del ADN complementario, tiempo de extracción, volumen de muestra, posibilidades de automatización, empleo de material gastable, laboriosidad de la técnica y el uso de sustancias potencialmente nocivas. Para esto se analizaron por cada método 10 muestras de sangre medular procedentes de pacientes con diversas enfermedades oncohematológicas. Para cada uno de los métodos analizados el promedio de la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm fluctuó entre 1,80 y 2,29. El rendimiento de las concentraciones de ARN fue significativamente mayor en el método de GTC con una media de 1799 ng/μ. Sin embargo, de los tres métodos resultó el de menor pureza y mayor laboriosidad. Los sistemas de extracción de ARN empleados en el laboratorio de biología molecular son válidos para los estudios moleculares, pero existen diferencias entre ellos que deben ser tomados en consideración. Estos métodos tienen sus bondades y contrapartes negativas, por lo que su adecuación a la práctica diaria estará determinada por las condiciones y necesidades específicas del centro.

Palabras claves: ARN, métodos de extracción de ARN, pureza, concentración.

INTRODUCCIÓN

La obtención de ácido ribonucleico (ARN) resulta imprescindible en los laboratorios de biología molecular debido a que diferentes enfermedades hematológicas requieren estudios moleculares al inicio de la enfermedad y posteriormente, para evaluar su evolución y respuesta al tratamiento.^{1,2}

Debido a su estructura química, el ARN es una molécula frágil y susceptible a la degradación por enzimas como las *ARNasas*. Este es uno de los temas fundamentales durante el proceso de extracción y purificación de este ácido nucleico. El tipo de muestra y la manera en que se toma, influye en las características del ARN extraído.^{1,3}

Sin importar el método de extracción empleado, se requerirá inhibir la actividad de las *ARNasas* durante todo el proceso de obtención y durante su utilización en el estudio molecular del cual será objeto. Este es uno de los puntos cruciales a la hora de desarrollar un método con el cual pueda obtenerse ARN no degradado y en cantidad suficiente para el estudio que se llevará a cabo.^{1,3}

Diferentes métodos para la obtención del ARN están actualmente estandarizados en los laboratorios de biología molecular. Inicialmente se empleaban técnicas engorrosas con marcada manipulación de las muestras y que requerían varios días para la obtención del ARN.⁴ Actualmente se encuentran disponibles *kits* comerciales que agilizan el procedimiento de manera dinámica, con reactivos y métodos físicos novedosos que aunados, reducen los riesgos de obtener un ARN de mala calidad.^{1, 4,5} Además permiten la extracción robotizada de ARN, ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas con el uso de equipos de nueva generación que automatizan el proceso de principio a fin.

Históricamente, el método más empleado en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología ha sido el de extracción con la mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (modificado), con el que se obtiene un buen rendimiento en la concentración de ARN con reactivos convencionales.

No obstante, el procedimiento es engorroso y requiere de muchas horas, lo que a su vez retarda las exploraciones subsiguientes que dependen del ARN extraído y no permite un resultado rápido, sobre todo en aquellos casos donde se dependa de este estudio para el diagnóstico inmediato del paciente. Conjuntamente, esta técnica implica el uso de sustancias nocivas y

corrosivas que, aunque no influyen en la calidad y el rendimiento del ARN, son riesgosas para la persona que realiza el proceso.¹

OBJETIVO

Evaluar el impacto de los nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos en los resultados de trabajo del servicio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se compararon los tres métodos de extracción de ARN que se aplican en el laboratorio de biología molecular: mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo modificado (GTC), ARN QIAamp RNA Blood Mini Kit y el sistema de PAXgeneBlood RNA. Para cada uno de ellos se evaluaron cuatro aspectos fundamentales: concentración del ARN, la pureza de este ácido nucleico, calidad del ARN por electroforesis en gel de agarosa y calidad de la reacción en cadena de la polimerasa previa reverso transcripción (RT-PCR). Se tuvieron en cuenta también características inherentes a cada método que posibilitan su manejo en los laboratorios como son: el volumen de muestra, tiempo de extracción, posibilidades de automatización, empleo de material gastable, laboriosidad de la técnica así como el uso de sustancias potencialmente nocivas.

La valoración del rendimiento de las muestras de ARN se realizó mediante la cuantificación de la concentración del ARN obtenido en un espectrofotómetro EPOCH donde también se evaluó la pureza del ARN por la relación de las lecturas a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) que proporciona un cálculo de la pureza de ARN con respecto a los contaminantes que absorben la luz ultravioleta, como es el caso de las proteínas. El ARN puro muestra una relación A_{260}/A_{280} de 1,8–2,2 en TrisCl 10 mM, pH 7,5.

La calidad del ARN obtenido se valoró tomando en cuenta la presencia y limpieza de las bandas correspondientes al ARN mensajero (ARNm) en electroforesis en gel de agarosa y la evaluación de la calidad de la RT-PCR se efectuó mediante el estudio de un gen normal que debe estar presente en todas las muestras, evaluado mediante electroforesis capilar.

Para cada uno de los métodos de extracción se evaluaron 10 muestras de sangre medular, seleccionadas al azar, procedentes de pacientes con enfermedades oncohematológicas. En cada

una de las muestras se analizaron los parámetros señalados con anterioridad. Se calculó el promedio de las concentraciones en ng/μL y de la relación de las lecturas a 260 y 280 nm como índice de pureza.



RESULTADOS

Se observaron diferencias en relación al índice de pureza y concentración entre los dos métodos de reciente incorporación (ARN QIAamp RNA Blood Mini Kit y el sistema de PAXgeneBlood RNA) y la mezcla de GTC. Los dos primeros presentaron mejor índice de pureza con un promedio de 2,21 y 2,29 respectivamente, el método por GTC tiene una media de 1.8 con un valor máximo de 2,5 y un mínimo de 1.

En cambio, las concentraciones del ARN expresadas en ng/μL fueron significativamente superiores en las muestras extraídas por GTC, con una media de 1799. Sin embargo esto puede estar influenciado por la contribución de restos de ADN y por la presencia de proteínas en las muestras. Por otra parte se debe señalar que la cantidad de células mononucleadas también afectan la concentración de ARN y los casos fueron tomados al azar.

La calidad del ARN (visualizando las bandas correspondientes por electroforesis en gel de agarosa) es superior en los casos que presentan una mayor concentración de ARN. No obstante la pureza de la muestra influye positivamente en este aspecto, razón por la cual (aun con poca concentración) se aprecian bandas nítidas e intensas en especímenes con bajos rendimientos de ARN. Con los métodos más novedosos se obtiene una mayor pureza de las muestras por lo que se requiere de pocas concentraciones de ARN para obtener buenos resultados en la RT-PCR.

En los tres métodos se obtiene ADNc de buena calidad mediante la RT-PCR aunque se aprecian bandas más intensas en los métodos de reciente incorporación que en el anterior.

Los nuevos sistemas de extracción pueden ser automatizados, aunque en nuestro laboratorio solo se realiza para el ARN QIAamp RNA blood mini kit, lo que reduce la manipulación de la muestra y por tanto las posibilidades de contaminación con ribonucleasas (ARNasas) que degraden la muestra.

Con estos nuevos métodos se obtienen mayores volúmenes de material genético que con los métodos tradicionales y esto es de gran importancia si se requiere estudios posteriores sin tener que recurrir a otra nueva extracción.

Tabla 1. Características evaluadas en los métodos empleados en el Laboratorio de Biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología

Parámetros	QIAamp RNA Blood Mini Kit	PAXgeneBlood RNA	GTC- fenol cloroformo
Volumen de muestra	40-80 µL	40-80 µL	10-25 µL
Tiempo de extracción	90 min	90 min	24 a 72 h
Automatización	Si	Si	No
Material gastable	Suministrado por el fabricante	Suministrado por el fabricante	Suministrado por el usuario
Empleo de material nocivo	No	No	Si
Laboriosidad de la técnica	Mínima	Moderada	Alta

El tiempo de extracción se reduce considerablemente con estos nuevos métodos, en comparación con los anteriores, lo que favorece el diagnóstico rápido en el paciente.

Los kits comerciales suministran gran parte del material desechable que se emplea para la extracción lo que favorece el ahorro en este sentido, a diferencia del método que se venía utilizando.

La utilización de reactivos potencialmente nocivos como el fenol y el cloroformo así como la laboriosidad que se requiere para obtener el material genético hacen que la técnica del GTC-fenol-cloroformo sea más engorrosa para el personal que la realiza.

Por otra parte el sistema PAXgene tiene el valor agregado de que las muestras pueden ser transportadas a temperatura ambiente ya que el set viene provisto de tubos de conservación de las muestras que contienen estabilizadores del ARN. Esto posibilita la transportación de las muestras desde regiones apartadas del país, sin correr el riesgo de que las muestras lleguen en mal estado al laboratorio.

CONCLUSIONES

Los sistemas de extracción de ARN empleados en el Laboratorio de Biología Molecular son válidos para los estudios moleculares, pero existen diferencias entre ellos que deben ser tomados en consideración.

Innegablemente, estos métodos modernos tienen sus bondades y contrapartes negativas (costo superior a los tradicionales), por lo que su adecuación a la práctica diaria estará determinada por las condiciones y necesidades específicas del centro.

Los sistemas automatizados diseñados para medianos y grandes laboratorios han crecido en cuanto a demanda en los últimos años. Constituyen una alternativa a métodos manuales de trabajo intensivo y se destacan ventajas como la reducción del tiempo y de la mano de obra, aumento en la seguridad del trabajador e incremento en la reproducibilidad y calidad de los resultados. La comunidad científica en general apuesta por este tipo de tecnología. Nosotros, avalados por los resultados de este trabajo, también pensamos que la nuevas tecnologías constituyen un paso de avance indiscutible para nuestros laboratorios.

El conocimiento y la aplicación de esta variedad de procedimientos de extracción de ARN en la actualidad, cuando la biología molecular se hace cada vez más indispensable, permite atesorar herramientas para decidir en cada situación cuál es la técnica adecuada de acuerdo con la naturaleza de la muestra, el número de alteraciones genéticas a explorar, la urgencia del resultado y demás condiciones asociadas.

RECOMENDACIONES

Ampliar el tamaño de muestra para la evaluación de los métodos y utilizar herramientas estadísticas que ayuden a evaluar con mas fidelidad las variables analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz Alonso CA, Garrote Santana H, Amor Vigil AM, Suárez González Y, Fernández Martínez L, Ruiz Moleón V. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter

[Internet]. 2015 Dic [citado 2017 Mar 27]; 31(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892015000400015&lng=es.

2. Díaz-Alonso C, Garrote-Santana H, Amor-Vigil AM, Suárez-González Y, González-Mugica Romero R. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2013 Sep; 29(3):298-303.
3. Malentacchi F, Pazzagli M, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Günther K, et al. SPIDIA-RNA: second external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. PLoS One. 2014 Nov 10; 9(11):e112293.
4. Hernández AK, Guzmán-Barney M. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potatoyellowvein virus (PYVV) en diferentes órganos de Solanum tuberosum grupo phureja. Rev Colomb Biotecnol. 2013; 15(1):71-81.
5. Cayuela JM, Mauté C, Fabre AL, Nibourel O, Dulucq S, Delabesse E et al. A novel method for room temperature distribution and conservation of RNA and DNA reference materials for guaranteeing performance of molecular diagnostics in onco-hematology: a GBMHM study. Clin Biochem. 2015 Apr. pii: S0009-9120(15)00128-9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.04.004.

