

## **Sustitución de la electroforesis en gel de agarosa por nuevas tecnologías para evaluar la funcionalidad del arn en los estudios moleculares**

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

### **RESUMEN**

La extracción y purificación de ácido ribonucleico (ARN) es una práctica indispensable en los laboratorios de biología molecular (BM). En el campo de la hematología el ARN se utiliza en la técnica de reverso transcripción (RT) para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), necesario para la reacción en cadena de la polimerasa. La finalidad de estos procedimientos es la amplificación de genes quiméricos expresados en el momento del estudio. La introducción de nuevas tecnologías que evalúan la cantidad y calidad del ARN a utilizar, permite determinar de una manera más objetiva la funcionalidad del mismo para nuestros estudios. Se evaluaron 217 muestras de aspirado medular en el laboratorio de BM del Instituto de Hematología e Inmunología en el período comprendido entre febrero y diciembre del 2016. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Los datos se procesaron con el software Gen5™. Se realizó lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas respectivamente. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. La concentración media del ARN extraído fue de 294.9ng/μL y la pureza media de las muestras fue de 2.2. En el 94 % de los casos, el patrón electroforético (PE) de ARN se interpretó como adecuado para proceder a la RT. Sin embargo, las 10 muestras que presentaron una electroforesis no óptima, a pesar de poseer una baja concentración (media de 28.3 ng/μL), tenían una pureza media de 2.18, por lo que no fueron desechadas sino que basándonos en esta característica se logró obtener ADNc de manera

satisfactoria en 9 de ellas y así completar el estudio en el 98.2 % de los pacientes. Con este trabajo se demuestra que la evaluación cuantitativa de la concentración y pureza del ARN es más objetiva para determinar la funcionalidad del mismo.



**Palabras clave:** ARN, funcionalidad, cuantificación, integridad.

## INTRODUCCIÓN

La extracción y purificación de ácido ribonucleico (ARN) es una práctica indispensable en los laboratorios de biología molecular. En el campo de la hematología, el ARN se utiliza en la técnica de reverso transcripción (RT) para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), necesario para la reacción en cadena de la polimerasa. La finalidad de estos procedimientos es la amplificación de genes quiméricos expresados en el momento del estudio.

El ARN es un material susceptible a la degradación debido a la acción de las enzimas *RNAsas*. Por esta razón, requiere de una adecuada toma de muestra, condiciones de frío durante la manipulación, conservación y trabajo de meseta con el objetivo de inhibir la degradación enzimática.<sup>1</sup>

La introducción de nuevas tecnologías que evalúan la cantidad y calidad del ARN a utilizar, constituye un paso de avance en el desarrollo de nuestro laboratorio.

El control de calidad de muestras de ARN se lleva a cabo por diferentes técnicas que aportan información sobre la concentración de las muestras, pureza, integridad y funcionalidad, garantizando en todo momento la trazabilidad de las mismas.<sup>2-3</sup>

Mediante la espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ácidos nucleicos basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.<sup>4</sup>

En el caso del ARN la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0-2.2 se considera indicativa de un ARN de pureza óptima. Valores A260/280 > 1.7 se corresponden a una muestra de ARN con una pureza aceptable. Un ratio A260/280 < 1.7 sería indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.<sup>5</sup>

La relación A260/230 en una muestra de ARN se corresponde a un valor de 2 o ligeramente superior. Sin embargo, no existe una opinión consensuada sobre el valor mínimo en la relación A260/230 que una muestra debe tener para ser considerada funcional. En general se considera que el ARN es aceptable si A260/230 es > 1.5.<sup>5</sup>

Por otra parte, la electroforesis en gel de agarosa permite la valoración de la integridad de la muestra. La interpretación de la electroforesis se basa en determinar la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal. Cuando estas dos bandas están bien definidas e intensas se plantea que el ARN extraído se encuentra en óptimas condiciones para el siguiente paso de la RT. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición e intensidad estas bandas o el acompañamiento de una estela o *smear* a lo largo del gel, esta interpretación puede ser muy variable al estar influenciado en gran medida por la apreciación individual del investigador que realiza el estudio.<sup>1</sup>

El hecho de que una muestra de ARN en electroforesis de agarosa no se observe con las bandas definidas no significa que dicha muestra no sea funcional o presente una integridad suficiente para poder ser utilizada.

## OBJETIVO

Determinar si la interpretación cuantitativa de concentración y pureza del ARN extraído es más objetiva que el análisis de la electroforesis en gel de agarosa, para evaluar la funcionalidad del ARN en nuestros estudios moleculares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 217 muestras de aspirado medular en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología en el período comprendido entre febrero y diciembre del

2016. El volumen del aspirado varió entre 3 y 8 mL y se obtuvo por punción medular en pacientes con diferentes entidades hematológicas que requirieron de los estudios moleculares para definir el diagnóstico.

La extracción y purificación de ARN se realizó con los KITS de extracción automatizada o por el método de PAXgene.

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro de volumen múltiple. Los datos se procesaron con el software Gen5™. Se realizó lectura de densidad óptica a 260 y 280 nm, para medir ácidos nucleicos y proteínas respectivamente. El estimado de pureza que brinda el equipo da información acerca de la presencia de proteínas, lo cual es útil para conocer la eficiencia del proceso de extracción.

Por otra parte la integridad del ARN se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia.

## RESULTADOS

La concentración media del ARN extraído fue de 294.9 ng/μL y la pureza media de las muestras fue de 2.2.

De las 217 muestras analizadas el 94% de ellas (204) mostraron un patrón electroforético (PE) de ARN adecuado, en correspondencia con una adecuada concentración y pureza para proceder a la RT.

Trece muestras no cumplían con el PE establecido para la RT. Tres fueron totalmente descartadas al tener muy baja concentración y pureza del ARN extraído. Sin embargo, las otras 10 muestras que presentaron un PE de degradación del ARN, a pesar de poseer una baja concentración (media de 28.3 ng/μL), tenían una pureza media de 2.18, por lo que no fueron desechadas, sino que basándonos en esta característica se logró obtener ADNc de manera satisfactoria en 9 de ellas y así completar el estudio en el 98.2 % de los pacientes.

## CONCLUSIONES

Con este trabajo se demuestra que la evaluación cuantitativa de la concentración y pureza del ARN, con las nuevas tecnologías que se disponen en el laboratorio, es más objetiva para determinar la funcionalidad del mismo. Lo que supone un mayor aprovechamiento de la muestra biológica y una validación más objetiva del proceso de extracción de ARN.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Hernández AK, Guzmán-Barney M. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo phureja. *Rev Colomb Biotecnol*. 2013; 15(1):71-81.
3. 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 12. pii: S0009-9120(15)00128-9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.04.004
4. Li X, Nair N, Wang S, Wang L. Quality Control of RNA-Seq Experiments. *Methods in Molecular Biology*. 16 December 2014; 1269: 137- 46.
5. Programa de control de calidad de muestras. Banco Nacional de ADN Carlos III. Universidad de Salamanca. [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)