
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS FIJADAS EN FORMALINA Y EMBEBIDAS EN PARAFINA EN CONDICIONES NO ÓPTIMAS

Evaluation of Two Methods DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues on Non-Optimal Conditions

JAVIER ANDRÉS BUSTAMANTE^{1,2}, B.Sc.; MIRYAM ASTUDILLO², M.Sc.; ALVARO JAIRO PAZOS³, M.Sc.; LUIS EDUARDO BRAVO¹, M.D., M.Sc.

¹ Grupo Registro Poblacional de Cáncer de Cali, Departamento de Patología, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Grupo de Biotecnología e Infecciones Bacterianas, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. Cali, Colombia.

³ Departamento de Biología, Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.

Correspondencia: Luis Eduardo Bravo. Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Edificio 116, piso 4, oficina 4016. Cali, Colombia. Teléfono: 052 321 21 00, ext. 4126. bravo.luiseduardo@gmail.com

Presentado 26 de enero de 2011, aceptado 2 de junio de 2011, correcciones 29 de junio de 2011.

RESUMEN

Los tejidos de archivo son material de incalculable valor para estudios retrospectivos que requieran la aplicación de análisis moleculares. Existen múltiples métodos de extracción de ADN a partir de este tipo de muestras. No obstante, la mayoría de métodos toman mucho tiempo y los reactivos empleados contribuyen a la fragmentación del ADN. Con el objetivo de optimizar dos métodos de extracción de ADN a partir de tejidos embebidos en parafina en condiciones no óptimas, se seleccionaron 47 bloques en parafina que contenían biopsias de pleura, pulmón y pericardio correspondientes a 24 pacientes (66,6% hombres) mayores de 18 años, con inflamación granulomatosa crónica, remitidos al Departamento de Patología, Hospital Universitario del Valle entre 2002 y 2007. Se realizaron 10 cortes a cada muestra y se sometieron a dos métodos de extracción de ADN: 1. convencional y 2. QIAamp-DNA mini kit®. La eficiencia del ADN fue valorada por espectrofotometría y amplificación del gen GAPDH. La concentración de ADN de las muestras extraídas por el método convencional fue de 65,52 ng/μL ± 11,47 (promedio ± EE) y la relación 260/280 varió entre 0,52 y 2,30. De las muestras extraídas por el método comercial, la concentración media de ADN fue 60,89 ng/μL ± 6,02, con una absorbancia que osciló entre 0 y 2,64. El ADN obtenido fue sometido a PCR, de 47 muestras extraídas por ambos métodos, 25 y 23 respectivamente amplificaron exitosamente el gen GAPDH. Los métodos usados para la obtención de ADN presentaron un desempeño similar, revelando así su potencial utilidad en estudios retrospectivos a partir de biopsias embebidas en parafina en condiciones inadecuadas.

Palabras clave: biopsia, granuloma, ácidos nucleicos, fragmentación del ADN, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Paraffin wax embedded tissues are an invaluable material for retrospective studies requiring the application of molecular analysis. Multiple methods are available to extract DNA from these kind of samples. However, the most common methods are slow and the reagents often contribute to the fragmentation of genetic material. In order to optimize the procedure, two methods for DNA extraction from paraffin embedded tissue non-optimal conditions were used. 47 blocks containing paraffin-embedded biopsies of pleura, lung and pericardium from 24 patients (66.6% males) older than 18 years, with biopsy proven chronic granulomatous inflammation referred to the Department of Pathology at University hospital of Valle between 2002 and 2007 were selected. Each sample was subjected to 10 cuts and was to two methods of DNA extraction: 1. conventional and 2. QIAamp-DNA mini kit®. The efficiency of the extracted DNA, was assessed by spectrophotometry and PCR amplification of a fragment of the housekeeping gene GAPDH. The concentration of DNA samples extracted by the conventional method was of $65.52 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 11.47$ (mean \pm SE) and the 260/280 absorbance ratio ranged between 0.52 and 2.30 the average concentration of DNA of the samples extracted by the commercial method was $60.89 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 6.02$ (mean \pm SE), with an absorbance that fluctuated between 0 and 2.64. The DNA obtained was amplified by PCR, of 47 samples extracted by both methods, 25 and 23 respectively the GAPDH gene amplified successfully. The methods used to obtain DNA showed similar performance, highlighting the potential utility of both extraction methods for the retrospective studies from paraffin embedded tissues in unsuitable conditions.

Key words: biopsy, granuloma, nucleic acids, DNA fragmentation, polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los continuos avances en el campo de la biología molecular han jugando un papel importante en patología clínica y cuando son bien aplicados tienen alta precisión diagnóstica. El material básico para el trabajo diagnóstico en patología, continúa siendo tejido embebido en parafina (Farkas *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 2002), recurso de importancia vital e imprescindible en estudios retrospectivos, aprovechando la gran cantidad de tejidos almacenados y el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, es posible comparar el análisis morfológico con la investigación de ácidos nucleicos y la clínica (Flórez y González, 2010). El fácil procesamiento, almacenamiento y transporte son algunas de las ventajas más notorias de la inclusión en parafina. Si bien, es claro que los tejidos embebidos en parafina tienen gran valor en diagnóstico histopatológico al preservar la arquitectura y proteínas propias del tejido, es ampliamente conocido que los ácidos nucleicos extraídos de ellos tienen menor calidad que los extraídos de tejidos frescos, dificultando el análisis molecular posterior (Farkas *et al.*, 1996; Coombs *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2000). Múltiples factores, incluyendo tipo de tejido, hipoxia antes de la

excisión, agente fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tipo y tiempo de almacenamiento, y método de desparafinación y extracción de biomoléculas, afectan la calidad del ADN (Jiménez *et al.*, 2007; Flórez y González, 2010). Por lo cual, es importante definir las condiciones de manejo de los tejidos para poder utilizarlos correctamente, pero no siempre esto es posible y estos factores se pueden ver agudizados por circunstancias económicas. Una complicación adicional es el hecho de que el procesamiento de estos tejidos no está estandarizado en los laboratorios de patología, representando una fuente de variabilidad que afecta la calidad de los ácidos nucleicos y por lo tanto la confiabilidad de los ensayos (Flórez y González, 2010). La variabilidad está dada principalmente por el uso de diferentes fijadores (especialmente formaldehído), las condiciones de temperatura y el tiempo en el cual permanecen en ellos, antes de ser incluidos en parafina y el tipo de parafina utilizada. Algunos autores han reportado que tejidos almacenados en formaldehído por más de un semana sufren extenso entrecruzamiento de proteínas tisulares y modificaciones en las bases, resultando en fragmentación de ADN (Farkas *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 2002; Bonin *et al.*, 2003).

Los tejidos deben ser fijados en formaldehído tamponado, en oscuridad por 24 horas antes de ser embebidos en parafina. Pero, en la práctica esto no siempre ocurre por la falta de procedimientos estandarizados en los laboratorios de patología; en tejidos almacenados por más de 20 años es común encontrar extensa degradación del material genético porque con frecuencia utilizaban formaldehído no tamponado. Está descrito que este reactivo o formalina no tamponada se oxida a ácido fórmico generando un medio ácido, principal razón para la degradación de ADN, el cual es relativamente estable en soluciones ligeramente ácidas; sin embargo, a pH 4,0 hay hidrólisis de enlaces β -glicosídicos de las purinas. Bajo estas condiciones las purinas (N7 de guanina y N3 de adenina) son protonadas y clivadas con facilidad, quedando la cadena abierta y el ADN apurínico es susceptible de ser cortado por iones hidroxilo (Bonin *et al.*, 2003). La longitud promedio de los fragmentos de ADN que se pueden extraer a partir de biopsias de tejido embebidas en parafina tratadas bajo condiciones óptimas es de 300-400 pb, pero la longitud de estos fragmentos disminuye notablemente cuando las condiciones de tratamiento a las que se han sometido los tejidos no son las mejores. Como consecuencia de la degradación del ADN, solo se puede amplificar secuencias muy cortas en tejidos que han sido fijados en formaldehído no tamponado y posteriormente embebidos en parafina. La calidad y cantidad de ADN extraído destacan como factores limitantes para la realización de pruebas moleculares, es importante encontrar nuevos métodos de extracción de ADN o mejorar los existentes para facilitar el uso de este tipo de material en estudios retrospectivos, contribuyendo a la investigación etiológica y epidemiológica de las patologías.

El propósito de este estudio es comparar dos técnicas diferentes para optimizar el procedimiento de extracción de ADN a partir de biopsias embebidas en parafina en condiciones no óptimas, con el fin de obtener ADN adecuado para su uso posterior con fines diagnósticos e investigativos en procedimientos moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio retrospectivo realizado en el periodo 2002-2007 por los Departamentos de Patología y Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Los especí-

menes se obtuvieron de un banco de tejidos embebidos en parafina en un hospital de tercer nivel que cuenta con 495 camas, y es centro de referencia para el suroccidente colombiano. Se incluyó una colección de 47 bloques disponibles, que contenía biopsias de pleura, pulmón y pericardio, correspondientes a 24 pacientes adultos (66,66% hombres) con diagnóstico histológico de IGC necrotizante y no necrotizante. Se excluyeron los casos con insuficiencia de tejido y diagnóstico histopatológico consistente con infecciones micóticas y reacciones a cuerpo extraño. Esta investigación contó con el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIRESH), Universidad del Valle.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE BIOPSIAS

Los especímenes obtenidos, fueron manipulados por un técnico experimentado en histología del laboratorio de patología del Hospital Universitario del Valle, Evaristo García, quien se encargó de realizar los cortes pertinentes en un micrótopo (Spencer 820®). Estos bloques de tejido han sido sometidos a periodos extensos de fijación en formalina al 10% no tamponada, no obstante, se desconoce para la gran mayoría, el tiempo de fijación empleado, dado la falta de procedimientos estandarizados en el laboratorio y han sido embebidos en parafina de baja calidad. De cada bloque se tomaron 10 cortes de 10 µm de espesor (área de superficie promedio de las muestras de tejido: aproximadamente 10 x 12 mm) que se colocaron en tubos (Bibby®) de 1,5 ml; entre cada corte se limpió el micrótopo con etanol a 100% y se emplearon cuchillas nuevas, con el fin de prevenir contaminación cruzada entre las muestras.

PREPARACIÓN DE CORTES

Antes de la extracción de ADN total, los cortes fueron sometidos a un proceso de desparafinación, para cada método se emplearon procedimientos distintos, según las recomendaciones de los autores.

En la desparafinación por el protocolo convencional, se adicionaron 800 µL de xilol (Mallinckrodt®) por tubo y se mezclaron por inversión durante 5 min. Después se agregaron 400 µL de etanol absoluto (Mallinckrodt®) a temperatura ambiente, que se mezclaron 1 min y luego se llevaron a centrifugación (spectrafuge 16M Lanet®) por 2 min a 13.000 rpm a temperatura ambiente. Después de descartar el sobrenadante, se repitió el mismo proceso y este se descartó nuevamente. A continuación se adicionó 1 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente y se continuó centrifugando por 2 min a 13.000 rpm. El sobrenadante se descartó una vez más y se procedió a repetir este paso por segunda vez y se incubó en bloque seco a 55 °C durante 10 min para secar el tejido totalmente. Para la desparafinación de los tejidos según el protocolo QIAamp DNA mini kit®, fueron adicionados 1.200 µL de Xilol (Mallinckrodt®), agitando vigorosamente por 15 seg. Luego los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga (spectrafuge 16M Lanet®) a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (15-25 °C). El sobrenadante se removió por inversión con la precaución de no remover el pellet, a continuación se adicionaron 1.200 µL de etanol absoluto 100% (Mallinckrodt®) al pellet para remover residuos de xilol y se mezcló suavemente por vortex. De nuevo se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga a 14.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se descartó el etanol con micropipeta y se procedió a repetir una vez más el lavado con etanol absoluto para terminar de remover trazas de xilol que pudieron haber

quedado tras la primera lavada, se centrifugó y se descartó el etanol, luego se procedió a secar los tubos de microcentrifuga abiertos por inversión sobre papel toalla por 15 a 20 min hasta que el etanol se evaporó.

EXTRACCIÓN DE ADN POR MÉTODO CONVENCIONAL

Se siguió un protocolo para extracción de ADN total basado en un método convencional descrito por la Dra. Lida Mancilla, 2008. En cada tubo seco, se adicionaron 500 µL de buffer de digestión de proteinasa K (485,4 µL de Tris HCl 10mM, pH 7,4 (Promega®), 2,2 µL de Tween 20 (Calbiochem®) y 12,6 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Promega®), y se incubaron a 56 °C durante 12 horas con agitación continua y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Al final del procedimiento se recolectó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo que se incubó a 95 °C por 10 min con el fin de inactivar la enzima, para prevenir la presencia de inhibidores de la PCR, se adicionaron 250 µL de solución de NaCl 5M (Charlot®) que se mezcló en vortex 10 seg, luego se procedió a centrifugar a 13.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido se recolectó en un nuevo tubo al que posteriormente se le adicionó el doble de volumen de etanol absoluto, se mezcló por inversión varias veces y se dejó en reposo por 20 min. Pasado este tiempo, se centrifugó otra vez a 13.000 rpm a 4 °C por 20 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de etanol al 70% (Mallinckrodt®), se lavaron suavemente las paredes y el precipitado, y luego se descartaron los residuos de etanol por inversión del tubo sobre papel toalla. Finalmente, se adicionaron 250 µL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Promega®), EDTA 1 mM, pH 8,0 (Carlo Erba®) y se almacenó el ADN a -20 °C.

EXTRACCIÓN DE ADN CON QIAAMP DNA MINI KIT® (QUIAGEN)

Se realizó un protocolo para extracción de ADN total a partir de material parafinado con el sistema comercial DNA mini kit®, de acuerdo a las normas del fabricante y con algunas modificaciones. En cada tubo se adicionaron 180 µL de buffer ATL (buffer de lisis tisular), se procedió a macerar el tejido por acción mecánica con bolillo estéril, luego se añadieron 20 µL de proteinasa K (20 mg/ml) los cuales se mezclaron minuciosamente por vortex para homogenizar la muestra y se incubó a 56 °C por 24 horas en baño de agua para lisar completamente el tejido. Ocasionalmente, durante la incubación las muestras se agitaron para dispersarlas. Pasado este tiempo, se inactivó la proteinasa K por calentamiento 10 min a 70 °C. A continuación, se añadieron 200 µL de buffer AL a la muestra, se mezclaron minuciosamente por vortex por 15 seg y luego se añadieron 200 µL de etanol absoluto 100%, se mezcló de nuevo minuciosamente por vortex 15 seg y se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min. La mezcla del paso anterior se transfirió a la columna QIAamp DNA mini kit® y se centrifugó a 8.000 rpm por 1 min. La columna se removió y se colocó en otro tubo recolector. Se adicionaron 500 µL buffer AW1 (buffer de lavado 1) a la columna y se centrifugó por 1 min a 8.000 rpm, una vez más la columna se transfirió a un tubo nuevo. El procedimiento del lavado se repitió con 500 µL buffer AW2 (buffer de lavado 2), seguido de centrifugación por 3 mins a 14.000 rpm para secar la membrana de la columna de residuos de etanol. En un tubo nuevo, el ADN extraído de la columna se eluyó por la adición de 100 µL buffer AE. Primero se adicionaron 50 µL, por 5 min y luego se centrifugó por 1 min a 8.000

rpm. A continuación se adicionaron 50 μ L de buffer AE, aguardando otros 5 min y se centrifugó por 1 min a 8.000 rpm, finalmente el ADN extraído se distribuyó en alícuotas y las muestras se almacenaron a -20 °C.

CUANTIFICACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS PARAFINADAS

La cantidad y la pureza de ADN total de las muestras previamente purificadas se determinó por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro (Gene Quant II® Pharmacia Biotech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y amplificación por PCR del gen constitutivo humano de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, empleando los siguientes cebadores GAPDH-1 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3' y GAPDH-2 5'-CGGCCATCAGCCACAGTTT-3' (Shen y Cotton, 2003). Este gen de copias múltiples en células humanas, se utilizó como indicador de calidad para los dos procesos de extracción de ADN total. La reacción se realizó en un termociclador PTC-100® (MJ Research, Inc) adicionando los siguientes reactivos a un tubo de 0,2 mL: 1,25 U de *Go Taq DNA polimerasa* (Promega®), 10 μ L de tampón de PCR 5X (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 50 mM de KCl-Promega®), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega®), 0,125 mM de dNTP (desoxirribonucleosidos 5'-trifosfato - dATP, dCTP, dGTP y dTTP - Promega®), 0,5 μ L de la mezcla de ambos oligonucleótidos (1 μ g/ μ L) y 30,625 μ L de agua milliQ. Al final de la mezcla se adicionaron 5 μ L de ADN de cada muestra, para un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de amplificación consistieron en desnaturalización inicial a 95 °C/1 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C/45 seg, alineamiento a 58 °C/45 seg y extensión a 72 °C/1 min, seguida de una extensión final a 72 °C/7 min. Todas las PCRs fueron llevadas a cabo bajo precauciones estrictas para evitar contaminación cruzada. Posteriormente, se realizó electroforesis en agarosa (SeaKim®) al 2%, teñida con bromuro de etidio (Invitrogen®) a 0,5 μ g/mL, a un voltaje de 75V/45 min y visualización en una lámpara UV (Spectrolin Bio-O-Vision®) en un rango de 260/280 nm, el soporte fotográfico se realizó con una cámara digital (Nikon Cool-Pix 990®). El tamaño de los amplicones esperados fue de 299 pb y su presencia indicó que el material genético era adecuado para las pruebas.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Antes del análisis, se promediaron los datos de cantidad y calidad (relación 260/280) de ADN para las tres mediciones realizadas por muestra y se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, encontrándose que no se distribuían en forma normal, por lo que se recurrió a estadística no paramétrica. Durante el análisis bivariado para datos relacionados, las variables continuas se describieron como promedios y las categóricas como proporciones. Para estudiar las diferencias entre las variables continuas se empleó la prueba de rangos con signo de *Wilcoxon* y para las categóricas la prueba de McNemar, con el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). La significancia estadística fue aceptada con p-valor \leq 0,01.

RESULTADOS

Para ambos métodos de extracción, la cantidad y calidad del ADN obtenido presentaron resultados satisfactorios para la realización de PCR. La concentración de ADN total obtenido por el método convencional presentó una media de 65,52 ng/ μ L \pm 11,47

(promedio \pm EE) y la relación de absorbancia 260/280 varió entre 0,52 y 2,30. Para las muestras extraídas por el método comercial, la concentración media de ADN fue 60,89 ng/ μ l \pm 6,02 (promedio \pm EE), con una absorbancia que osciló entre 0 y 2,64 (Fig. 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad promedio de ADN extraída por ambos métodos (prueba de rangos con signo de *Wilcoxon* $P=0,6721$), las diferencias observadas son aleatorias y pueden atribuirse a diferencias en el proceso de extracción. Al comparar la pureza del material genético extraído se observaron diferencias significativas (prueba de rangos con signo de *Wilcoxon* $P=0,0001$).

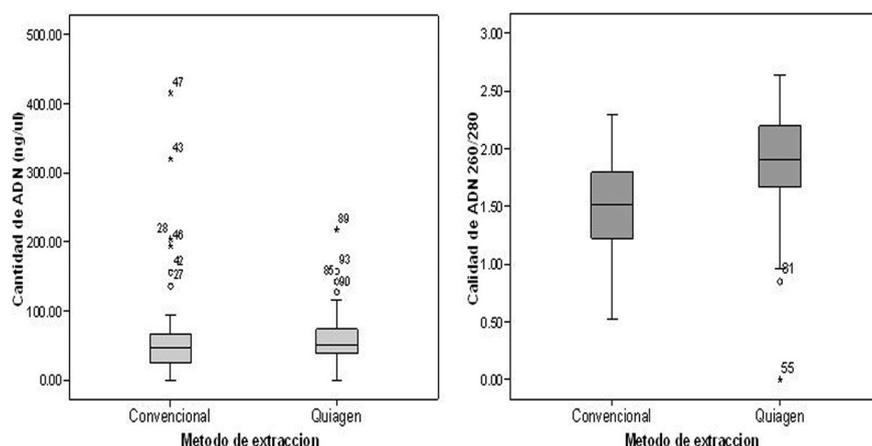


Figura 1. Diagrama de cajas para cantidad y calidad de ADN obtenido por el método de extracción convencional y QIAamp DNA mini kit®.

Con los resultados obtenidos tras la cuantificación de ADN total extraído por ambos métodos de extracción, se decidió amplificar un fragmento de 299 pb de un gen de expresión constitutiva como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa presente en células humanas, que sirvió como control de calidad del proceso de extracción, para las 47 muestras procesadas por el método de extracción convencional y el método de extracción comercial QIAamp DNA mini kit®, 25 (53,19%) y 23 (48,94%) respectivamente, amplificaron exitosamente el gen GAPDH (Figs. 2 y 3), no se encontraron diferencias significativas (prueba de McNemar $P=0,7905$) entre los porcentajes de amplificación obtenidos por los dos métodos. En los casos en los que se observaron bandas tenues y en los que no se observó amplificación con la primera PCR, se realizó reamplificación de los productos obtenidos bajo las mismas condiciones de amplificación iniciales; los resultados fueron satisfactorios (Tabla 1).

Al observar el número de biopsias amplificadas para cada año, se encontró una relación inversa entre el tiempo de almacenamiento y la proporción de muestras que amplificaron el gen de interés. En biopsias con ocho años de almacenamiento se obtuvo bajo porcentaje de amplificación tanto para el ADN obtenido por el método QIAamp DNA (35%) y el convencional (30%), en contraste, en muestras frescas menores de cuatro años de almacenamiento en parafina, la proporción de amplificaciones obtenidas fue mayor del 60% (Tabla 2).

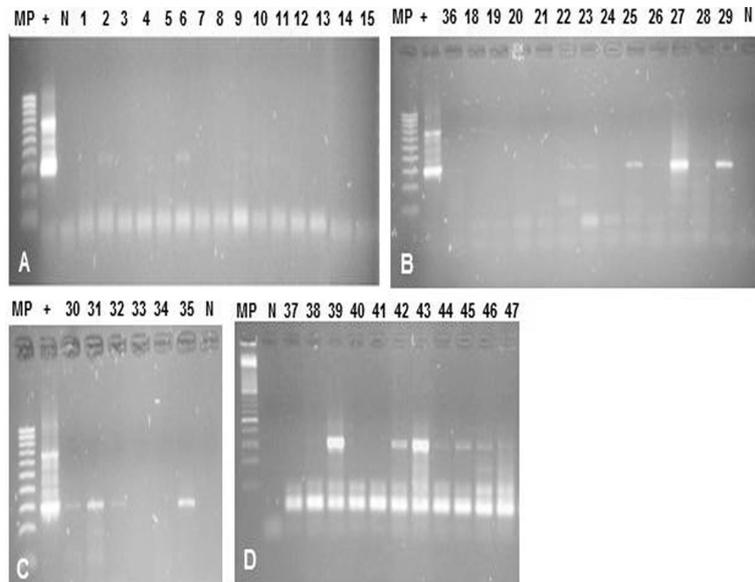


Figura 2. Electroforesis de la primera ronda de los productos amplificados para el gen GAPDH (299 pb) a partir de la extracción de ADN total de biopsias embebidas en parafina con el método convencional, gel de agarosa al 2%. MP: marcador de peso de 100 pb; Control +: ADN extraído de biopsia parafinada; N: control negativo - ADN aislado de *Leptospira* sp; (A) muestras 1-15. Carril 2, 4, 6, 9, 10 y 11 presentaron amplificación. (B) muestras 18-29. Carril 22, 23, 25, 26, 27, 28 y 29 amplificaron. (C) muestras 30-35. Carril 30, 31, 32, 35 y 36 presentaron amplificación. (D) muestras 37-47. Carril 39, 42, 43, 44, 45, 46 y 47 presentaron amplificación.

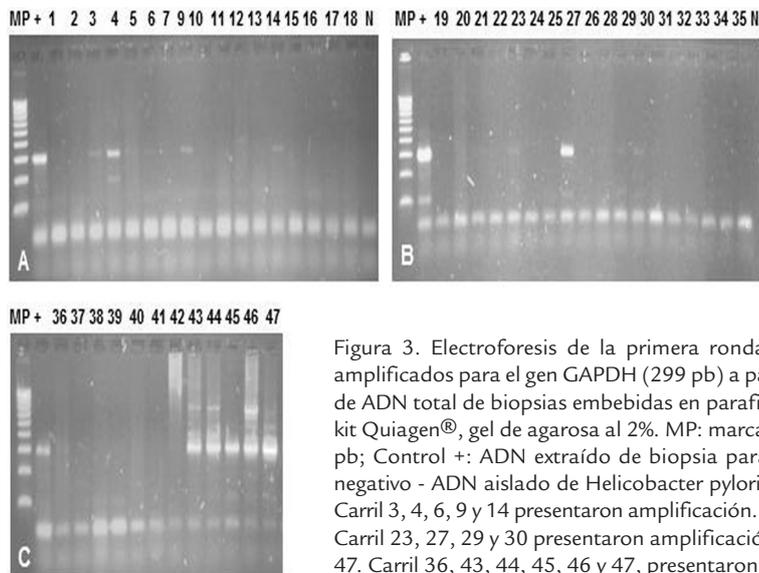


Figura 3. Electroforesis de la primera ronda de los productos amplificados para el gen GAPDH (299 pb) a partir de la extracción de ADN total de biopsias embebidas en parafina con el DNA mini kit Quiagen®, gel de agarosa al 2%. MP: marcador de peso de 100 pb; Control +: ADN extraído de biopsia parafinada; N: control negativo - ADN aislado de *Helicobacter pylori*; (A) muestras 1-18. Carril 3, 4, 6, 9 y 14 presentaron amplificación. (B) muestras 19-35. Carril 23, 27, 29 y 30 presentaron amplificación. (C) muestras 36-47. Carril 36, 43, 44, 45, 46 y 47, presentaron amplificación.

Muestra	Método convencional						Sistema comercial QIAamp DNA					
	1.ª ronda		2.ª ronda		Total		1.ª ronda		2.ª ronda		Total	
	N	%	n	%	n	%	Positivo	%	Nuevos Positivos	%	n	%
01-18	18	33,33	0	0	6	33,33	5	27,78	2	11,11	7	38,89
19-35	17	64,71	0	0	11	64,71	4	23,53	3	17,65	7	41,18
36-47	12	66,67	0	0	8	66,67	6	50,00	3	25,00	9	75,00
	47	53,19	0	0	25	53,19	15	31,91	8	17,02	23	48,94

Tabla 1. Resultados obtenidos para la amplificación del gen estructural humano GAPDH a partir de ADN total extraído de biopsias embebidas en parafina por ambos métodos de extracción. N: número total de biopsias amplificadas en cada ensayo. n: número de biopsias positivas por ensayo.

Año	Amplificación del gen GAPDH por PCR		Método convencional	
	N	%	n	%
2002	20	35,00	6	30,00
2003	2	50,00	1	50,00
2004	3	33,33	2	66,67
2005	1	0,00	1	100,00
2006	13	61,54	9	69,23
2007	8	75,00	6	75,00
Total	47	48,94	25	53,19

Tabla 2. Influencia del tiempo de almacenamiento en la amplificación del gen estructural humano GAPDH por PCR.

DISCUSIÓN

Rutinariamente las muestras de tejido son removidas de cuerpo humano, los fragmentos obtenidos son fijados en formalina, incluidos en parafina y almacenados por años. Estos especímenes constituyen un recurso invaluable para investigación (Coombs *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2001; Gillio-Tos *et al.*, 2007; Flórez y González, 2010) y diagnóstico de enfermedades con técnicas histológicas y moleculares (Flórez y González, 2010). En la actualidad, existe gran variedad de métodos disponibles para el aislamiento de

ácidos nucleicos a partir de biopsias en parafina con diferentes rendimientos (Coates *et al.*, 1991; Aplenc *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007; Simonato *et al.*, 2007; Mirmomeni *et al.*, 2010).

La selección correcta de un método de extracción depende de múltiples factores: cantidad de producto y pureza requerida, tamaño del fragmento a amplificar, tiempo y costo (Mirmomeni *et al.*, 2010) y particularmente es de gran importancia cuando se cuenta con muestras no óptimas sometidas a periodos extensos de fijación en formaldehído a 10% no tamponado; bajo estas condiciones es común encontrar alto grado de fragmentación de ADN.

Diversos autores han reportado que para la realización de estudios moleculares a partir de este tipo de especímenes, el ADN aislado de tejido debe ser de buena calidad y en cantidad suficiente para poder obtener resultados satisfactorios (Zafra *et al.*, 2004), por lo tanto se requiere un método de extracción que garantice la remoción adecuada de parafina, inhibidor de PCR, y la obtención de ADN a partir de la digestión de tejidos. El perfeccionamiento de los métodos extracción, de forma que se tornen fáciles de realizar y menos costosos, facilita enormemente el uso de estos materiales en estudios retrospectivos, aportando a la investigación de la etiología y epidemiología de las enfermedades (Simonato *et al.*, 2007). En este estudio, se evaluó el desempeño de dos métodos de extracción de ADN en 47 tejidos de archivo de tres localizaciones anatómicas diferentes. Para los dos métodos de extracción los resultados encontrados fueron satisfactorios para la realización de PCR. En primer lugar no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de ADN obtenido por ambos procedimientos, estos resultados son similares a los encontrados por Mirmomeni *et al.*, 2010, quienes evaluaron tres métodos de extracción de ADN (fenol-cloroformo, *salting-out* y QIAamp DNA mini kit) en tejidos embebidos en parafina de hígado y estómago de pacientes con hepatocarcinoma celular y adenocarcinoma de estómago respectivamente. Además, la cantidad promedio de ADN observada para el método de extracción comercial es similar a la reportada por Simonato *et al.*, 2007, (67,38 ng/ μ L) a partir de ADN obtenido de biopsias fijadas en formol tamponado a 10% y embebidas en parafina de casos de carcinoma epidermoide de acceso bucal. Vale mencionar que en nuestro caso el método convencional presentó mayor grado de dispersión en los datos obtenidos tras la cuantificación; esta variabilidad puede deberse a diferencias en el proceso de extracción, este método requiere la precipitación de ADN y lavados seriados que pueden relativamente incrementar la posibilidad de pérdida de ADN en algunas muestras. La presencia de muestras con altas concentraciones de ADN que difieren de la concentración promedio está directamente relacionada con el tamaño del tejido embebido en parafina.

Por otra parte, las diferencias encontradas al comparar la calidad del material genético obtenido por ambos métodos de extracción, evidencia que el QIAamp DNA mini kit proporciona mayor grado de pureza del ADN, esta observación concuerda con los resultados de Bielawski *et al.*, 2001, quienes evaluaron tres métodos de desparafinación y tres métodos de purificación de ADN a partir de material parafinado. Estos hallazgos indirectamente sugieren la presencia de factores intrínsecos que afectan la calidad de los ácidos nucleicos extraídos por el método convencional.

La calidad y cantidad de ADN destacan como parámetros limitantes en la realización de pruebas moleculares en muestras de archivo. Estos a su vez están influenciados por

múltiples factores: el fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tiempo de fijación, tamaño del tejido fijado y edad del bloque (Jiménez *et al.*, 2007). Ante esto, la eficiencia de los procedimientos de extracción se ha convertido en un punto crítico para el éxito de la PCR (Chan *et al.*, 2001).

El ADN obtenido por ambos métodos de extracción mostró un desempeño similar para la amplificación del gen GAPDH (53,19% método convencional y 48,19% QIAamp DNA mini kit), estos resultados son satisfactorios teniendo en cuenta los antecedentes de las muestras procesadas, revelando así su potencial para ser incluidos en estudios retrospectivos que involucren procedimientos moleculares. Es claro, que el método convencional basado en solventes orgánicos y sales es tan eficiente como el *kit* comercial, resultados similares fueron reportados por Mirmomeni *et al.*, 2010. En los dos casos, se presentaron muestras que no amplificaron pese a presentar una concentración de ADN adecuada, esto podría indicar degradación del ADN.

Por lo tanto, es pertinente mencionar las posibles dificultades de cada método que conllevaron a los resultados observados. Como regla general, todos los métodos de extracción constan de tres pasos: desparafinación, digestión y purificación (Flórez y González, 2010). Cada uno de estos pasos es crítico para el éxito posterior de la amplificación. Según Coombs *et al.*, 1999, los principales obstáculos para la obtención de ADN de material parafinado para amplificación por PCR son la remoción de parafina y la purificación de ADN.

La no amplificación de este gen multicopia, tras la extracción de ADN total por el método convencional, pudo deberse en gran parte a la presencia de múltiples factores: agentes inhibidores de ADN polimerasa, como parafina y la concentración de Tween 20 empleada (Zafra *et al.*, 2004), el corto tiempo de digestión con proteinasa K; algunos autores han reportado un incremento notable en la cantidad de ADN que lo atribuye a la digestión completa de los tejidos por 48 a 72 horas, la cual puede incrementar la cantidad de células lisadas y así garantizar una adecuada recuperación de ADN (Coombs *et al.*, 1999; Aplenc *et al.*, 2002). La incubación posterior de ADN a 95 °C por 10 min, para inactivar la proteinasa K es otro foco adicional de degradación (Jiménez *et al.*, 2007), la remoción ineficiente de proteínas y otros contaminantes que a menudo hacen necesario el tratamiento con RNasa y/o repeticiones de precipitación con alcohol antes de que el ADN pueda ser usado para PCR y finalmente la edad de la muestra procesada (Bonin *et al.*, 2003). Todos estos factores posiblemente conllevaron aumento del grado de fragmentación de los ácidos nucleicos, sumado a los múltiples pasos de purificación que condujeron a la recuperación de baja cantidad de ADN, lo que fue bastante grave en muestras en las que se contó con tejido escaso. En general, el rendimiento y la pureza de ADN son altamente variables usando este método, además es laborioso y requiere varios pasos los cuales incrementan el riesgo de contaminación de la muestra, no obstante, este método es tan eficiente como el *kit* comercial, siendo un procedimiento seguro y económico.

Por otra parte, pese al buen rendimiento y calidad del ADN extraído con el *kit* comercial que concuerda con los hallazgos reportados por Coombs *et al.*, 1999, en algunas muestras se evidenció una banda tenue y en otras no fue posible observar presencia de material genético en el gel de agarosa tras la amplificación por PCR. Estos resultados pueden deberse a la presencia de inhibidores de la PCR como restos de parafina que no fueron adecuadamente removidos y la presencia de alcohol remanente, pese a los

múltiples pasos de purificación y precipitación empleados, o a la unión incompleta de ADN al soporte de fase sólida (tecnología sílica) que puede resultar en bajas cantidades de ADN para la recuperación subsecuente en el buffer de elución dificultando la amplificación (Aplenc *et al.*, 2002). Sin embargo, este método ha demostrado ser igual de eficiente al método convencional, simple, toma menos tiempo y práctico, evitando además el uso de sustancias tóxicas y permite la obtención de ADN de adecuada calidad, útil para la aplicación de técnicas moleculares de alta exigencia, así lo demuestra Verhagen *et al.*, 1999 en especímenes de médula ósea, otros investigadores como Chan *et al.*, 2001, sugieren el uso de este kit como el método más eficiente para la extracción de ADN viral, pese a su elevado costo (Chan *et al.*, 2001; Simonato *et al.*, 2007; Mirmomeni *et al.*, 2010). Con el fin de obtener el máximo rendimiento de ADN y resultados adecuados en PCR, algunas modificaciones al procedimiento de extracción estándar fueron realizadas, al adicionar un paso de maceración mecánica que facilita y optimiza la acción de proteinasa K sobre el tejido, además se realizó dos pasos de elución de 50 µL cada uno, previniendo con la segunda elución la dilución de la primera. Uno de los resultados más preocupantes fue la debilidad de algunas de las señales de los productos del gen GAPDH, que pueden llevar a la interpretación de falsos negativos y complicar los análisis. Por ello para ambos métodos de extracción, se realizó una segunda PCR con una alícuota de la primera para prevenir resultados subjetivos. Para el método convencional la reamplificación fue innecesaria, no obstante, para el sistema DNA mini kit se observó amplificación en 25% de los casos negativos, indicando la presencia de amplicones cuya cantidad no alcanzó a ser detectada en la primera PCR, posiblemente por la sensibilidad de la electroforesis en gel de agarosa (Flórez y González, 2010). Otros factores previos e independientes al proceso de extracción y purificación deben ser también considerados, para poder explicar los resultados negativos obtenidos en la reamplificación y la baja calidad de ADN en algunas muestras, entre los que se destacan principalmente: el tipo de tejido, hipoxia antes de la excisión, forma y tiempo empleado para la fijación (Jiménez *et al.*, 2007; Simonato *et al.*, 2007), tipo y tiempo de almacenamiento (Shi *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2007; Flórez y González, 2010), temperatura de fusión de la parafina (Gillespie *et al.*, 2002) empleada para embeber los tejidos que puede afectar la estabilidad de la doble hélice de ADN y el número y micraje de los cortes, alrededor de estos dos últimos factores existe gran variabilidad en los diversos protocolos publicados. El método de rutina utilizado para el almacenamiento de estos tejidos es la fijación en formalina 10% e inclusión en parafina, por sus bajos costos, facilidad de almacenamiento y adecuada preservación de la estructura y proteínas tisulares. Desafortunadamente este método afecta tanto calidad como cantidad de ácidos nucleicos que se pueden obtener (Coombs *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2004). Esto está estrechamente relacionado con el tiempo de fijación que sufren los tejidos. La formalina penetra el tejido en proporción de 0,5 mm/h, por lo tanto, entre mayor tiempo permanezca el tejido en el fijador (días, semanas y en el peor de los casos hasta meses), mayor será el entrecruzamiento con proteínas principalmente histonas (Flórez y González, 2010), las modificaciones en ácidos nucleicos que llevan a degradación, fragmentación, metilación y alcalinización del ADN afectando su calidad y cantidad (Vago *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1999; Komiya *et al.*, 2000; Bonin *et al.*, 2003; Flórez y González, 2010) llevando a que solo se puedan amplificar fragmentos con tamaños

menores de 400 pb (Bonin *et al.*, 2003). No obstante, en nuestro caso pese a que el fragmento que se amplificó fue de 299 pb algunas muestras no amplificaron, este es un rasgo indirecto que indica modificaciones irreversibles y degradación del ADN extraído que sucede al azar causando rupturas en una de las cadenas (Bonin *et al.*, 2003), aumentando en relación con el tiempo de almacenamiento (Flórez y González, 2010). En algunos casos es posible realizar procesos de reconstrucción o restauración parcial de la longitud de ADN, como bien lo sugiere Bonin *et al.*, 2003, al restaurar las rupturas en el ADN usando la otra cadena como molde, lo que permitiría la obtención de fragmentos de mayor tamaño.

En la literatura algunos autores han reportado amplificaciones con muestras desde uno hasta treinta años de almacenamiento y no se observaron diferencias cuando se emplearon métodos distintos de desparafinación y purificación de ADN (Coombs *et al.*, 1999; Simonato *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro caso se encontró que el 60% de las muestras que amplificaron el gen GAPDH para el ADN extraído por ambos métodos, eran muestras relativamente recientes de tres a cuatro años de almacenamiento. En las muestras con ocho años de almacenamiento, el porcentaje de amplificación fue mucho menor. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos por Zafra *et al.*, 2004, en donde amplifican un fragmento de 195 pb del gen humano IL-4 a partir de ADN extraído de biopsias de archivo sometidas a condiciones similares a las de este estudio, para cuatro tiempos distintos de almacenamiento (un mes; uno, seis y diez años), conforme aumentó el tiempo de almacenamiento disminuyó el número de amplificaciones obtenidas. Observación igualmente apoyada por Coombs *et al.*, 1999, quien durante la extracción de ARN de tejidos de archivo para la realización de RT-PCR, encontró que en muestras menores de diez años 83,7% amplificaron un fragmento de β -actina mientras que solo 48,3% de las muestras mayores de diez años dieron un producto de PCR. Esto sugiere que la amplificación enzimática se ve afectada por el tiempo de almacenamiento de las muestras. Una posible explicación podría ser la extensa degradación de los ácidos nucleicos por los motivos anteriormente descritos, concordando con las observaciones de Bonin *et al.* 2003, quien reconoce que la solución de formalina no tamponada a menudo empleada en el pasado es responsable del fracaso de la PCR en tejidos de archivo mayores de 20 años.

Es claro, que la confiabilidad de los resultados depende inicialmente de la calidad y cantidad de la muestra, la cual está directamente relacionada con los métodos utilizados en el procesamiento del tejido (Bustamante *et al.*, 2010). Por ello, es importante definir las condiciones de manejo de los tejidos para poder utilizarlos en los análisis moleculares (Flórez y González, 2010). Esto no siempre es posible, particularmente cuando se realizan estudios retrospectivos en muestras de archivo de hospitales con recursos económicos bajos en donde los tejidos han sido fijados y embebidos en parafina en condiciones no adecuadas para la realización de estudios moleculares. En estos casos es sumamente importante la selección de un adecuado método de desparafinación y purificación que no continúe afectando la integridad de las biomoléculas y garantice la obtención de ADN de buena calidad y cantidad. Por ello, se recomienda el uso del método comercial cuando se requiere ADN de excelente calidad para técnicas moleculares de alto desempeño, por ser este un método eficiente y simple. No en tanto, el método convencional que también presentó buenos resultados y menor costo,

constituye una alternativa para uso de rutina y se puede emplear cuando se cuenta con tiempo y pocos recursos. A nivel de la PCR se recomienda para su éxito amplificar en lo posible fragmentos menores de 200 pb (Masuda *et al.*, 1999; Schoepp *et al.*, 2004; Zafra *et al.*, 2004) de genes multicopia y el uso de PCR anidada para aumentar sensibilidad y especificidad de los ensayos.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la unidad de histología y del laboratorio de biología molecular del Hospital Universitario del Valle: James Díaz, Argenis Godoy y Guillermo López, por la excelente asesoría en el manejo de especímenes y al biólogo Diego Villamarín por el apoyo experimental. También agradecemos al Dr. Enrique Bravo de la Universidad del Valle y a la Dra. Lida Mancilla de la Universidad Santiago de Cali, por sus oportunos aportes y al estadístico Johann Alexis Ospina por su valiosa ayuda en el análisis de los datos.

Conflictos de Interés: Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses en la elaboración y ejecución de este proyecto.

Financiación: Este trabajo se realizó con recursos propios de la sección de bacteriología del Departamento de Microbiología y del Grupo de Investigación Registro Poblacional de Cáncer de Cali (RPCC) de la Universidad del Valle.

BIBLIOGRAFÍA

APLENC R, ORUDJEV E, SWOYER J, MANKE B, REBBECK T. Differential bone marrow aspirate DNA yields from commercial extraction kits. *Leukemia*. 2002;16(9):1865-1866.

BIELAWSKI K, ZACZEK A, LISOWSKA U, DYBIKOWSKA A, KOWALSKA A, FALKIEWICZ B. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int J Mol Med*. 2001;8(5):573.

BONIN S, PETRERA F, NICCOLINI B, STANTA G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Path*. 2003;56(3):184.

BUSTAMANTE JA, ASTUDILLO M, PAZOS AJ, BRAVO LE. Detection of acid-fast bacilli in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of patients with Chronic Granulomatous Inflammation. *Acta biol Colomb*. 2010;15(2):265-272.

COATES P, D'ARDENNE A, KHAN G, KANGRO H, SLAVIN G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *Brit Med J*. 1991;44(2):115.

COOMBS N, GOUGH A, PRIMROSE J. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(16):e12.

CHAN PK, CHAN DP, TO KF, YU MY, CHEUNG JL, CHENG AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol*. 2001;54(5):401-403.

FARKAS D, KAUL K, WIEDBRAUK D, KIECHLE F. Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation. *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120(6):591.

FLÓREZ O, GONZÁLEZ C. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. Salud UIS. 2010;36(2):54-64.

GILLESPIE JW, BEST CJ, BICHSEL VE, COLE KA, GREENHUT SF, HEWITT SM, *et al.* Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. Am J Pathol. 2002;160(2):449-457.

GILLIO-TOS A, DE MARCO L, FIANO V, GARCIA-BRAGADO F, DIKSHIT R, BOFFETTA P, *et al.* Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. Pathology. 2007;39(3):345-348.

JIMÉNEZ G, VILLALOBOS M, JIMÉNEZ E, PALMA W. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 2007;1(1).

KOMIYA T, SHIBATA N, ITO M, TAKAHASHI M, ARAKAWA Y. Retrospective diagnosis of diphtheria by detection of the *Corynebacterium diphtheriae* tox gene in a formaldehyde-fixed throat swab using PCR and sequencing analysis. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2400.

MASUDA N, OHNISHI T, KAWAMOTO S, MONDEN M, OKUBO K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. Nucleic Acids Res. 1999;27(22):4436.

MIRMOMENI M, SAJJADI MAJD S, SISAKHTNEZHAD S, DORANEGARD F. Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. J Biol Sci. 2010;10(3):261-266.

REN ZP, SALLSTROM J, SUNDSTROM C, NISTER M, OLSSON Y. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. Pathobiology. 2000;68(4-5):215-217.

SCHOEPP RJ, MORIN MD, MARTINEZ MJ, KULESH DA, HENSLEY L, GEISBERT TW, *et al.* Detection and identification of *Variola virus* in fixed human tissue after prolonged archival storage. Lab Invest. 2004;84(1):41-48.

SHEN JP, COTTON CU. Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells. Am J Physiol Renal. 2003;284(1):F57-64.

SHI SR, COTE RJ, WU L, LIU C, DATAR R, SHI Y, *et al.* DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. J Histochem Cytochem. 2002;50(8):1005-1011.

SIMONATO L, GARCIA J, NUNES C, MIYAHARA G. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. J Bras Patol Med Lab. 2007;43(2):121-127.

VAGO A, MACEDO A, OLIVEIRA R, ANDRADE L, CHIARI E, GALVÃO L, *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. Am J Pathol. 1996;149(6):2153.

VERHAGEN OJ, WIJKHUIJS AJ, VAN DER SLUIJS-GELLING AJ, SZCZEPANSKI T, VAN DER LINDEN-SCHREVER BE, PONGERS-WILLEMSE MJ, *et al.* Suitable DNA isolation method for the detection of minimal residual disease by PCR techniques. Leukemia. 1999;13(8):1298-1299.

ZAFRA G, FLÓREZ Ó, GONZÁLEZ C. Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. Salud UIS. 2004;36:73-79.