

Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina

✉ Yaxsier de Armas¹, Virginia Capó¹, Ledys X López¹, Lilian Mederos², Raúl Díaz²

¹Departamento de Anatomía Patológica

²Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis y Micobacterias

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, IPK

Autopista Novia del Mediodía, Km 6½, CP 601, Marianao 13, La Habana, Cuba

E-mail: yaxsier@ipk.sld.cu

RESUMEN

La extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina (TEP) es crucial en muchos estudios moleculares. Varios han sido los protocolos utilizados para conseguir tal propósito. En esta investigación se compararon tres métodos de extracción de ADN con la finalidad de seleccionar uno para el trabajo en nuestro laboratorio. Se tomaron diez ganglios linfáticos de diez fallecidos por sida, para su estudio histológico y bacteriológico. El ADN se extrajo por calentamiento a 100 °C (método A); con el empleo de resina quelante Chelex-100 (método B) y por digestión con proteinasa K (método C). Para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* se amplificó una región de la secuencia específica de inserción IS 6110, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El ADN de los TEP se obtuvo degradado, con diferencias significativas de pureza. Solo se logró amplificación con los métodos B y C; este último fue el más laborioso. El método que requirió resina quelante Chelex-100 (método B) fue el más útil: se obtuvo ADN con calidad y cantidad suficiente en un menor tiempo. Por tanto, este método puede ser considerado como una buena opción en patología molecular.

Palabras clave: extracción de ADN, parafina, *Mycobacterium tuberculosis*, patología molecular

Biotecnología Aplicada 2011;28:40-43

ABSTRACT

Comparison of three DNA extraction methods from paraffin embedded tissues. DNA extraction from paraffin-embedded tissue (PET) is a critical step for many molecular techniques. Several protocols have been carried out for this objective according to the literature. In the present study, the performances of three DNA extraction methods from PET were compared to establish the optimal protocol for our laboratory. Ten lymph nodes from ten patients dying with of AIDS were investigated. Histological and bacteriological studies were performed in lymph nodes samples. DNA was extracted using three methods: boiling for 20 minutes in distilled water (Method A); boiling for 30 minutes in 5% Chelex-100 resin solution (Method B) and a 4-hours lasting proteinase K digestion (Method C). PCR with specific sequence (IS 6110) were evaluated for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* in PET. The DNA extract by the three methods was degraded. Statistical differences were observed when three DNA extraction methods were compared according to the purity of extracted DNA. Only with Methods B and C successful amplification was obtained. The last method (C) was the more time consuming of all. This results demonstrated that the Chelex-100 DNA extraction method (Method B), which uses a quelating resin, is useful as a routine method to achieve DNA extraction with good enough quality and quantity in a short period of time from PET. Method B is a good option in molecular pathology research.

Keywords: DNA extraction, paraffin, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular pathology

Introducción

Los tejidos embebidos en parafina (TEP) en los laboratorios de Anatomía Patológica son una valiosa fuente para estudios de patología molecular [1]. La mayoría de las muestras de tejidos para su estudio se fijan en formalina y embeben en parafina, para conservar su estructura. Sin embargo, la extracción del ADN de esas muestras, con la calidad adecuada para estudios de biología molecular, constituye un problema [2].

En la última década se han publicado varios métodos con tal fin. Algunos utilizan diferentes tiempos de incubación para el tratamiento proteolítico de las muestras [3], y otros emplean solventes orgánicos adicionales como fenol y cloroformo, antes de la precipitación con etanol [4]. A su vez, hay metodologías que utilizan la lisis celular por calentamiento en agua destilada para procesar el tejido [5]. Por otra parte, el método de Chelex-100 se ha empleado con relativo éxito [6]. Se describen otras que utilizan la sonicación

de la muestra y su incubación en una solución con varios detergentes [7]. Recientemente se han aplicado sistemas comerciales [8].

En este trabajo, se compararon tres métodos de extracción de ADN de TEP para seleccionar uno que obtenga una cantidad suficiente, con un mínimo de manipulación, y en poco tiempo. Con él se lograría complementar el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en el Departamento de Anatomía Patológica, del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK).

Materiales y métodos

Procesamiento de las muestras

Se seleccionó un ganglio linfático de cada uno de los diez pacientes fallecidos por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) en el hospital para la

1. García P, Benavente F, Melo A, Roa I, Roa JC. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Rev Esp Patol.* 2006;39:175-9.

2. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161:1961-71.

3. Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1990;43:499-504.

4. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. En: Innis MA, editor. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press; 1990. p. 153-6.

5. Lench N, Stainer P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet.* 1988; 1(8599):1356-8.

atención a pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH)/sida del IPK de La Habana.

La mitad de cada ganglio se embebió en parafina para su estudio histológico, el cual permitió detectar bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). La otra mitad se envió al Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis y Micobacterias del IPK (LNRI-TB) para el aislamiento de micobacterias.

Para la extracción del ADN, se seleccionaron tres métodos, nombrados A, B y C. A cada uno de los diez ganglios linfáticos embebidos en parafina, se les hicieron 15 cortes histológicos de 10 μm . Estos se distribuyeron en tres microtubos de 1.5 mL, de manera que se emplearon 5 cortes en cada método de extracción.

Extracción de ADN

Método A

El tejido se lavó con xilol, y luego dos veces con etanol, como reportaron Lench y cols [5]. Luego se resuspendió en 300 μL de H_2O destilada estéril y se calentó a 100 $^\circ\text{C}$ durante 20 min. Se centrifugó a 13 000 g durante 10 min y el sobrenadante se trasladó a un microtubo de 1.5 mL.

Método B

Los cortes de tejido se resuspendieron directamente en 300 μL de una solución de Chelex-100 (Sigma, EE.UU.) al 5% y se calentaron a 100 $^\circ\text{C}$ durante 30 min, como reportaron Van den Zanden y cols [9]. Luego se centrifugaron a 13 000 g durante 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL, con cuidado de no tomar la resina quelante del precipitado.

Método C

El tejido se lavó con xilol, y luego dos veces con etanol, similar al método A. Para la digestión del tejido. Los cortes se resuspendieron en 300 μL de solución amortiguadora TEN (Tris-HCl 0.04 M, pH 8.3; NaCl 0.2 M, pH 8.0; EDTA 1 mM) con 5 μL de proteinasa K (Merck, Darmstadt, Alemania, 20 mg/mL) y 5.25 μL de SDS al 20%, como reportaron Ghossein y cols [10]. La solución se incubó a 55 $^\circ\text{C}$ durante 4 horas, y se calentó a 100 $^\circ\text{C}$ durante 10 min para inactivar la proteinasa K. El sobrenadante tras la centrifugación a 13 000 g durante 10 min, se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, en presencia de NaCl (concentración final 0.2 M). La solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, se recentrifugó a 13 000 rpm durante 30 min, y el precipitado se resuspendió en 40 μL de H_2O destilada estéril.

Reacción en cadena de la polimerasa

Mediante la amplificación de un fragmento de 245 pb de la secuencia de inserción IS 6110 de *M. tuberculosis*, por reacción en cadena de la polimerasa (RCP), se evaluó la calidad del ADN extraído con los tres métodos [11]. La mezcla de reacción (50 μL) en cada uno de los métodos contenía Tris/HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 1.5 mM, deoxirribonucleótidos (dNTP) 200 μM , iniciador (INS-1 e INS-2) 0.4 mM, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (Bioline, Reino Unido), y 5 μL de ADN molde extraído con cada método. El perfil de amplificación fue de 96 $^\circ\text{C}$ durante 3 min, 30 ciclos de 1 min a 96 $^\circ\text{C}$, 1 min a 65 $^\circ\text{C}$ y 2 min

a 72 $^\circ\text{C}$, con una extensión final de 6 min a 72 $^\circ\text{C}$. Para monitorear las posibles inhibiciones en la RCP de cada método de extracción, se amplificó el gen de la β -globina como control interno, según lo descrito por Schewe y cols [12]. Los productos de la RCP se separaron en geles de agarosa al 1.2%, se visualizaron por tinción con bromuro de etidio, y se fotografiaron con una cámara digital Power Shot G6 (Canon, Japón).

En todas las RCP se empleó el ADN extraído del cultivo de una cepa de *M. tuberculosis* (H37Rv) como control positivo, entregada por el LNRI-TB. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril (en lugar del ADN molde). Se hicieron tres réplicas de RCP por cada muestra.

Análisis estadísticos

En el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows (versión 11.5). Para la comparación de las medias de las proporciones de las densidades ópticas (D.O.) a 260 y 280 nm ($\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$), se aplicó el Test de Kruskal-Wallis. Se hicieron 10 mediciones de las D.O. de cada uno de los tres métodos.

Resultados

El ADN obtenido por cada uno de los métodos se degradó (Figura 1). Con el método A hubo mayor deterioro del material genético. Por el método B hubo una degradación intermedia. Mientras que con el método C, la degradación fue en menor cuantía.

El promedio de las proporciones de las $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$ fue de 1.33 (método A), 1.63 (método B) y 1.67 (método C). Hubo diferencias estadísticas significativas entre los resultados del método A y de los métodos B y C ($p = 0.023$). Sin embargo, al comparar estos dos últimos, no hubo diferencias significativas ($p = 0.073$).

Para evaluar la calidad del ADN extraído, se amplificó la secuencia de inserción (IS 6110) solo presente en cepas del complejo *M. tuberculosis*. La amplificación solo se logró cuando se emplearon los métodos

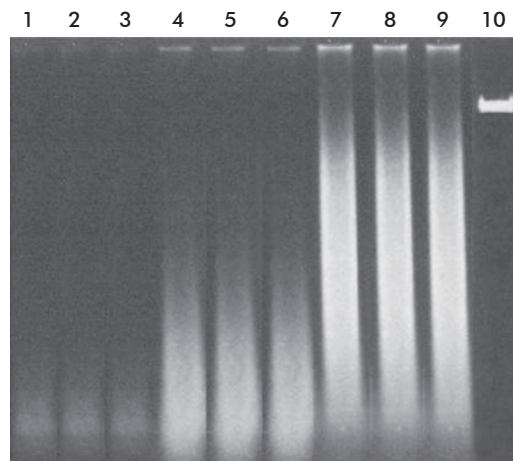


Figura 1. Patrones electroforéticos de la extracción de ADN de los tejidos embebidos en parafina por diferentes métodos: líneas 1, 2, 3 (método A); líneas 4, 5, 6 (método B); líneas 7, 8, 9 (método C); línea 10 (ADN extraído de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* [H37Rv]).

6. de Armas Y, Capó Y, González E, Mederos LM, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. *Rev Esp Patol.* 2006;39:171-4.

7. Heller MJ, Robinson RA, Burgart U, TenEyck CJ, Wilke WW. DNA extraction by sonication: a comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain reaction assays. *Mod Pathol.* 1992;5:203-6.

8. Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M. STR typing of human telogen hairs - a new approach. *Int J Legal Med.* 2001;114:269-73.

9. Van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol Pathol.* 1998;51:209-14.

10. Ghossein RA, Ross DG, Salomon RN, Rabson AR. A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:733-7.

11. van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-9.

12. Schewe C, Goldmann T, Grosser M, Zink A, Schlüns K, Pahl S, et al. Inter-laboratory validation of PCR-based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch.* 2005;447:573-85.

B y C. Con el método A no se pudo amplificar esta secuencia diana (Figura 2). Con el gen de la β -globina, no hubo inhibición de la RCP en ninguno de los métodos.

El método B fue el menos trabajoso para la obtención de ADN de TEP, pues requirió menos tiempo (8 min). El método C es bastante laborioso, pues precisó múltiples pasos y mayor tiempo (20 min) que los métodos A y B. El A es un protocolo intermedio entre B y C, ya que empleó 15 min.

Los resultados tras la amplificación de la secuencia de inserción (IS 6110) de las cepas de *M. tuberculosis* presente en los TEP coincidieron con los reportados por el LNRI-TB en el estudio bacteriológico.

Discusión

Este es el primer reporte en Cuba sobre la detección molecular de *M. tuberculosis* en TEP mediante tres métodos de extracción de ADN.

La extracción de ADN es el primer paso para la aplicación de muchas técnicas moleculares. A pesar de su aparente sencillez, a menudo hay problemas con el rendimiento de los métodos, la calidad del ADN obtenido, la presencia de posibles contaminantes, las degradaciones parciales, y el tiempo que duran los protocolos [13]. La situación es más compleja cuando se trata de obtener ADN de elevada calidad a partir de TEP. Ello se ha convertido en el paso crítico de los métodos moleculares en muestras parafinadas [8].

En este estudio, el deterioro del material genético dependió del método de obtención. El calentamiento brusco del tejido (método A) parece influir en el deterioro extremo del ADN obtenido. El Chelex-100 (método B) impide una mayor degradación del ADN, pues atrapa iones metálicos polivalentes que actúan como catalizadores de su ruptura a altas temperaturas [14]. Los métodos que utilizan la proteinasa K son más eficientes para obtener ADN de alto peso molecular. El método C se basa en el empleo de este reactivo, que rompe el entrecruzamiento entre ácidos nucleicos y proteínas en los TEP, y se libera ADN de mayor talla molecular [4].

La relación $D.O_{260}/D.O_{280}$ se calculó para obtener información sobre los niveles relativos de pureza del ADN obtenido con cada uno de los tres métodos. Los valores de esta relación indicaron que con los métodos B y C (1.63 y 1.67) se obtuvo ADN relativamente menos contaminado que con el método A (1.33). Se plantea que la variación en la cantidad y composición del tejido puede influir en la pureza del ADN extraído. Ello no fue de interés para nuestra investigación, pues se empleó igual cantidad ($5 \times 10 \mu\text{m}$ [$50 \mu\text{m}$]) y tipo de tejido en cada uno de los métodos. La preparación de los volúmenes de extracción, el empleo de reactivos como la proteinasa K, la duración de la digestión del tejido y la forma de concentrar el ADN, influyen en la pureza del material genético que se obtenga [15]. Por esa razón, se comprobó que el método C presentó la mayor relación de D.O. y las muestras contenían la menor cantidad de contaminantes.

Muchas veces el material genético obtenido no es adecuado para la amplificación por RCP, debido al fraccionamiento o a la degradación que este sufre [12]. Esto sucedió con el método A, con el cual no se logró amplificar la secuencia de inserción (IS 6110). Resulta

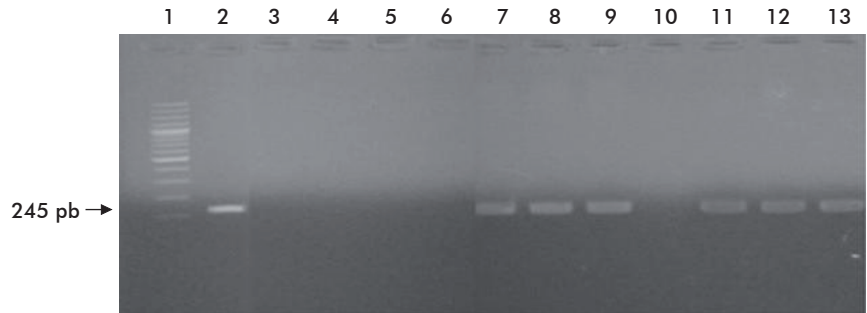


Figura 2. Productos de la amplificación de la secuencia de inserción IS 6110 de *Mycobacterium tuberculosis* de los tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. Línea 1: marcador de peso molecular (100 pb, P1473, Sigma, EE.UU.); línea 2: control positivo de la reacción; línea 3: control negativo de la reacción; líneas 4, 5 y 6: método A; líneas 7, 8 y 9: método B; líneas 11, 12 y 13: método C.

tados similares alcanzaron Stein y cols al emplear este procedimiento para detectar *Coxiella burnetii* en TEP [16]. Una posible explicación pudiera ser la ausencia de cantidad detectable de ADN diana, debido a la degradación por el calentamiento del tejido. Se pudiera pensar que al emplear este método hay inhibición en la RCP; sin embargo, se amplificó un control interno (gen de la β -globina) y los resultados fueron satisfactorios. Al emplear los otros dos protocolos (B y C), siempre se detectó *M. tuberculosis* en los tejidos. Ambas metodologías se han empleado antes para tal propósito [6, 9, 10, 17]. El método de Chelex-100 se ha reportado ampliamente para obtener ADN de los TEP [11, 18, 19]. En un estudio anterior, nuestro grupo amplificó fragmentos cortos de secuencias de ADN de *M. tuberculosis* con esta resina quelante [6]. Por su parte, varios laboratorios alemanes han empleado el método C para la validación de la RCP para detectar *M. tuberculosis* en TEP, con buenos resultados [12].

Obtener ADN de los TEP, con la calidad y cantidad suficientes, y en el menor tiempo posible, es fundamental en patología molecular. Métodos lentos, costosos y que precisen muchos pasos, pueden ser dificultosos a gran escala en la práctica clínica [20]: uno de los principales inconvenientes del método C. El método B es rápido, seguro y poco costoso, y permitió amplificar la secuencia analizada en todos los experimentos. Con él se obtuvo ADN con calidad suficiente en un único paso, lo que evita posibles contaminaciones, debido al exceso de manipulación (como sucede en el método C).

Los métodos moleculares rápidos y confiables para detectar *M. tuberculosis* en muestras parafinadas son muy necesarios en los laboratorios de patología molecular, porque: i) las muestras enviadas generalmente llegan fijadas en formol, y no es posible el cultivo del microorganismo para el diagnóstico, de modo que se limita al hallazgo de BAAR y a la histopatología; ii) las alteraciones tisulares son inespecíficas, pues hay varias enfermedades granulomatosas cuya morfología es similar a la tuberculosis; iii) las técnicas de microscopía tienen una baja sensibilidad, que se reduce aún más en tejidos parafinados, en muestras de pacientes con VIH/sida y con tuberculosis extrapulmonar; iv) en caso de que el diagnóstico histopatológico sea linfadenitis granulomatosa con presencia de BAAR, no es necesario volver a operar al paciente

13. De Armas Y, Rodríguez MM, Bisset JA, Fraga J. Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Colomb Entomol. 2005;31:203-6.

14. Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD. Use of chelex to improve the PCR signal from small number of cells. Amplifications. 1989;3:11.

15. Bonin S, Petrera F, Rosai J, Stanta G. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. J Clin Pathol. 2005;58:313-6.

16. Stein A, Raouf. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. Nucleic Acids Res. 1992;20:5237-8.

17. Popper HH, Klemen H, Hoefler G, Winter E. Presence of mycobacterial DNA in sarcoidosis. Human Pathol. 1997;28:796-800.

18. Romero RL, Juston AC, Ballantyne J, Henry BE. The applicability of formalin-fixed and formalin fixed paraffin embedded tissues in forensic DNA analysis. J Forensic Sci. 1997;42:708-14.

19. Pak F, Pyakural P, Kokhaei P, Kaaya E, Pourfathollah AA, Selivanova G, et al. HHV-8/KSHV during the development of Kaposi's sarcoma: evaluation by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. J Cutan Pathol. 2005;32:21-7.

20. García LA, Rodrigo JP, Sánchez P, Ramos S, Suárez C. Extracción de ADN con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp. 2004;55:139-44.

para obtener otra muestra para el cultivo microbiológico; v) conocer la especie de micobacteria involucrada en la infección permitiría el tratamiento con el fármaco preciso, pues hay diferente susceptibilidad por distintas de especies de micobacterias [21].

Los resultados de esta investigación demuestran la utilidad de los métodos B y C para extraer ADN de

los TEP para el diagnóstico de *M. tuberculosis*. Sin embargo, por las condiciones de trabajo y las características de los pacientes que se atienden en el IPK, se recomienda el método B como más apropiado para el laboratorio de Anatomía Patológica, por la calidad y la cantidad de ADN logradas, así como por el tiempo de purificación.

21. Krishna K, Singh M, Muralidhar M, Kumar A, Chattopadhyaya TK, Kapila K, *et al.* Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol.* 2000; 53:355-61

Recibido en julio de 2010. Aprobado en abril de 2011.