

## **Optimización de la extracción de ácido desoxirribonucleico para la tipificación molecular de antígenos leucocitarios humanos**

### **Optimization of deoxyribonucleic acid extraction for molecular typing of human leukocyte antigens**

**Dr. Arturo Chang Monteagudo, Lic. Luz M Morera Barrios, Dr. Catalino R. Ustariz García, DrC. Antonio Bencomo Hernández**

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

#### **RESUMEN**

Para la tipificación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el método de cebador específico de secuencia (SSP), se necesitan entre 3 y 6 µg de ácido desoxirribonucleico (ADN) de elevada pureza. Se realizó un estudio en el Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos del Instituto de Hematología e Inmunología, para determinar las condiciones y las muestras óptimas para la realización de esta prueba. El ADN se extrajo de muestras de sangre fresca y de sangre total y capa leucocitaria almacenadas en congelación, así como de sangre coagulada y plasma de 15 voluntarios, y de una suspensión de linfocitos. Se utilizó un extractor "QIAcube" y el sistema "QIAamp DNA Blood Mini". La concentración y pureza del ADN se determinaron mediante un espectrofotómetro de microgotas "EPOCH" con software "Gen 5". A partir de 200 µL de sangre total y de capa leucocitaria se obtuvieron como promedio 5,8 y 22,4 µg de ADN, respectivamente; sobrepasando siempre los 3 µg. El 100 % de las muestras de plasma y el 6,6 % de sangre coagulada proporcionaron menos de 3 µg. De una suspensión de  $30 \times 10^6$  linfocitos se obtuvieron 40 µg. La razón A260/A280 estuvo siempre entre 1,7 y 2. La sangre total y la capa leucocitaria, tanto frescas como congeladas, rindieron en todos los casos una cantidad óptima de ADN, no así el plasma y la sangre coagulada. La mayor cantidad de ADN se extrajo de una suspensión de linfocitos. Todos los eluatos tuvieron adecuada pureza independientemente del tipo de muestra.

**Palabras clave:** antígenos HLA, complejo principal de histocompatibilidad, trasplante de órganos, extracción de ADN.

## ABSTRACT

For typing the Human Leukocyte Antigens (HLA) by Polymerase Chain Reaction using the Specific Sequence Primer (SSP) method, between 3 and 6 µg of high pureness Deoxyribonucleic Acid (DNA) are needed. In order to establish the best conditions for DNA extraction, as well as the optimal samples, an investigation was carried out in the Center for Cellular Engineering and Organs and Tissues Transplantations in Havana, Cuba. DNA was extracted from fresh and frozen samples of blood, buffy coat, coagulated blood and plasma from 15 volunteers and also extracted from a lymphocyte suspension. A "QIAcube" extractor and Kit "QIAamp DNA Blood Mini" were used. The DNA concentration and pureness was measured by an "EPOCH" microdot spectrophotometer running "Gen 5" software. From 200 µL of blood or buffy coat means of 5.8 and 22.4 µg of DNA, respectively, were obtained and in all cases the amount of DNA was over 3 µg. One hundred percent of plasma samples and the 6.6 % of coagulated blood samples yielded less than 3 µg of DNA. Forty µg of DNA were extracted from a cell suspension containing  $30 \times 10^6$  lymphocytes. The A260/A280 ratio was between 1.7 and 2 in all eluates. The fresh or frozen blood and buffy coat yielded an optimum amount of DNA in the experiments, but not in plasma nor in coagulated blood. The highest amount of DNA was extracted from a lymphocyte suspension. All eluates were of fine pureness.

**Keywords:** HLA antigens, major histocompatibility complex, organ transplantation, DNA extraction.

---

## INTRODUCCIÓN

En la década del 50 del siglo xx se descubrió que las diferencias entre el donante y el receptor en cuanto a los productos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), las moléculas HLA (del inglés: *human leukocyte antigens*), determinaban la aceptación de los trasplantes.<sup>1,2</sup>

Veinte años después se establecieron las técnicas serológicas para la tipificación de los antígenos HLA en las membranas de las células nucleadas<sup>3,4</sup> y posteriormente, con el advenimiento de la biología molecular, fue posible la tipificación de los genes del CPH que se localizan en el brazo corto del cromosoma 6.<sup>5</sup>

La introducción de las técnicas moleculares provocaron un impacto en el mundo científico y específicamente en el estudio del CPH, porque permitieron detectar un polimorfismo mayor que el descrito por medio de la serología, creando una revolución en el campo del trasplante, en el diagnóstico de ciertas enfermedades y en otras aplicaciones básicas.<sup>6,7</sup>

Los primeros 300 trasplantes renales que se realizaron en Cuba desde 1970 se ejecutaron teniendo en cuenta solamente los grupos sanguíneos y paulatinamente se fueron introduciendo en el país las técnicas de histocompatibilidad.<sup>8,9</sup> En 2013, cuando se hizo accesible la tipificación molecular HLA para la totalidad de los receptores, se requirió procesar casi 1 000 muestras procedentes de 49 centros de diálisis de todo el país.<sup>10</sup>

Para la tipificación HLA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *polymerase chain reaction*) a través de la metodología de cebador específico de secuencia (SSP, *specific sequence primer*), se necesitan entre 3 y 6 µg de ácido desoxirribonucleico (ADN) de elevada pureza, para que los resultados sean aceptables.<sup>11,12</sup>

Se realizó una investigación con el objetivo de determinar las condiciones y las muestras óptimas para la obtención del ADN para la tipificación molecular del sistema HLA por técnicas de PCR-SSP.

## MÉTODOS

El estudio se realizó en el Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL) del Instituto de Hematología e Inmunología de La Habana, Cuba, en el periodo comprendido entre octubre y diciembre de 2012.

Se utilizaron muestras frescas y almacenadas en congelación a -20 °C, de sangre total y de capa leucocitaria, así como de sangre coagulada y plasma de 15 voluntarios; y de una suspensión única de  $30 \times 10^6$  linfocitos extraídos por perfusión de un ganglio linfático. El proceso de congelación y descongelación de las muestras se realizó una sola vez, con un tiempo promedio de almacenamiento de un mes.

Para la extracción de ADN se utilizó un extractor automático "QIAcube" con el sistema "QIAamp DNA Blood Mini" según el protocolo de trabajo especificado por el fabricante para un volumen de elusión y de muestras de 200 µL.<sup>13</sup>

La concentración y pureza del ADN se determinaron por el método espectrofotométrico con un monocromador de microgotas "EPOCH" y calculadas mediante el *software* "Gen 5". Se consideró que la concentración era adecuada cuando en 200 µL se obtuvieron entre 3 y 6 µg de ADN. La pureza se evaluó de aceptable cuando la relación A260/A280 estuvo entre 1,7 y 2.<sup>12,13</sup>

En toda la investigación se respetaron los principios éticos relacionados con las investigaciones médicas terapéuticas.<sup>14,15</sup>

## RESULTADOS

A partir de 200 µL de sangre total y de capa leucocitaria frescas se obtuvieron, como promedio, 5,8 y 22,4 µg de ADN, respectivamente. Cuando las mismas muestras se procesaron luego de haber sido almacenadas en congelación, el recobrado de ADN fue de 5,0 y 23,6 µg. Estos cuatro tipos de muestras tuvieron un rendimiento superior a los 3 µg de ADN en todos los casos (Figura).

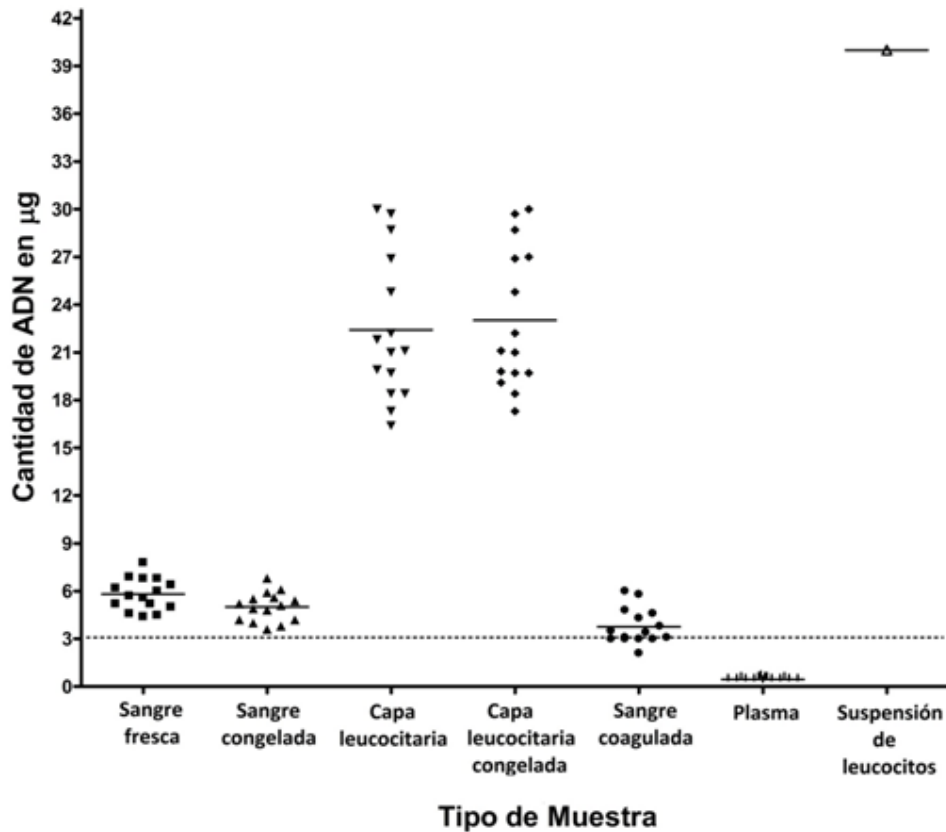


Fig. Cantidad de ADN según tipo de muestra.

De la sangre coagulada y el plasma se extrajeron, como promedio, 3,8 y 0,4 µg de ADN, respectivamente. De una de las muestras de sangre coagulada y de la totalidad de las de plasma se obtuvieron menos de 3 µg. El rendimiento de ADN de una suspensión única de  $30 \times 10^6$  linfocitos en 200 µL fue de 40 µg (Fig.).

El índice de pureza estuvo entre 1,7 y 2 en todos los eluatos, independientemente del tipo de muestra.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con las especificaciones del fabricante del sistema de extracción, el rendimiento de ADN genómico depende del tipo y del número de células presentes en la muestra. A partir de 200 µL de sangre total deberían obtenerse entre 4 y 12 µg,<sup>13</sup> lo cual se corroboró en la presente investigación con un recobrado promedio dentro del rango mencionado.

A partir de igual volumen de capa leucocitaria se esperaba recuperar entre 25 y 50 µg de ADN, aproximadamente, de 5 a 10 veces la cantidad equivalente a cuando se parte de sangre total;<sup>13</sup> sin embargo, el promedio experimental fue ligeramente inferior. Además, las cantidades de ADN obtenido oscilaron en un amplio rango a diferencia de las de sangre total. Este resultado pudo deberse a que en la obtención

de dicha capa leucocitaria influye el factor humano que introduce variabilidad en el número de células que se toman al inicio del proceso.

Al analizarse los recobrados de los ADN que se obtuvieron a partir de las muestras de capa leucocitaria, el 73 % estuvo por debajo de los 25 µg que reporta el fabricante del sistema de extracción; sin embargo, en todos los casos se sobrepasó la cantidad mínima necesaria que requiere la técnica de tipificación HLA por PCR-SSP.<sup>11,12</sup>

El almacenamiento en congelación no afectó el recobrado del ADN. Este hallazgo experimental sería de suma importancia para establecer la dinámica de trabajo en un laboratorio cuando el volumen de entrada de muestras sobrepase la capacidad de tipificación HLA.

El bajo rendimiento de las muestras de plasma coincide con los resultados de Cotton y col, que reportaron valores entre 0,3 y 0,5 µg.<sup>16</sup> Para aumentar el recobrado en estos casos, el fabricante del sistema de extracción recomienda fijar volúmenes de elusión de 100 µL y partir de volúmenes mayores de muestra,<sup>13</sup> solución ésta, que requeriría de dos o más réplicas y provocaría un incremento del gasto de los reactivos.

En la mayoría de los experimentos la sangre coagulada rindió cantidades adecuadas de ADN. Aunque es poco probable que se realice una tipificación HLA por SSP utilizando ADN extraído bajo estas condiciones, la presente investigación demuestra que no habría que desechar muestras valiosas que hayan presentado estos problemas técnicos en la fase preanalítica.

Los valores de la relación A260/A280 se evaluaron como satisfactorios en todos los eluatos, lo que demostró que el sistema y el protocolo de extracción utilizados fueron adecuados para obtener ADN genómico de una pureza adecuada en cualesquiera de los tipos de muestra objeto de estudio.

En resumen, la mayor cantidad de ADN se obtuvo de la suspensión de linfocitos de ganglios linfáticos. Las muestras de sangre total y de capa leucocitaria, tanto frescas como almacenadas a -20 °C, aportaron una cantidad óptima de ADN, no así el plasma y la sangre coagulada. En todas las muestras analizadas se obtuvo ADN de adecuada pureza.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Middleton D. History of DNA typing for the human MHC. *Rev Immunogenet.* 1999;1(2):135-56.
2. Talmage DW. Historia de la inmunología. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, ed. *Inmunología Básica y Clínica.* 9na ed. México, DF: El Manual Moderno; 1998. p. XVII-XXIV.
3. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens.* 2012 Jul;80(1):1-11.
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Major Histocompatibility Complex Molecules and Antigen Presentation to T Lymphocytes.* Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2010. p. 109-38.

5. Duquesnoy RJ, Marrari M, da M Soussa LC, de M Barrosos JR, de SU Aita KM, da Silva AS, et al. 16th IHIW: a website for antibody-defined HLA epitope Registry. *Int J Immunogenet.* 2012 Feb;40(1):54-9.
6. Mahdi BM. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Clin Transl Med.* 2013;2(1):6.
7. Chang-Monteagudo A, Bencomo-Hernández A, Morera-Barrios LM, Ustariz-García C, de la Guardia-Peña O. Evolución de la nomenclatura de los factores del sistema de antígenos leucocitarios humanos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* [Revista en Internet]. 2014 [citada 2014 Jul 01];30(1): Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892014000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892014000100003&lng=es)
8. Arce Bustabad S. Trasplante Renal y Enfermedad Renal Crónica. Sistema de leyes integradoras. 2009 ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2009.
9. Mármol Sónora A, Pérez Rodríguez A, Pérez de Prado Valdivia JC, Fernández-Vega García S, Gutiérrez García F, Arce Bustabad S. Programa de trasplante renal en Cuba. *Rev Cubana Méd.* 2009 Dic;48(4):238-43.
10. Bencomo-Hernández A. A propósito del primer año del Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos (CICEL). *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* [Revista en Internet]. 2014 [Citada 2014 Jul 01];30(3): Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/209/124>
11. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol.* 2012;882:9-25.
12. Olerup SSP®. HLA-A-B-DR-DQ SSP Combi Tray. Product Insert. Stockholm; 2013. [Citado: 01 julio 2014]. Disponible en: <http://www.olerup-ssp.com/products/downloads/hla-kits/combi-trays/>
13. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. QIAGEN. Venlo. 3rd ed.; 2012.
14. World Medical Association (AMM). Helsinki Declaration. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Assist Infirm Ric.* 2001 Apr-Jun;20(2):104-7.
15. WMA. Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2011 [updated 2011 2008 Oct; cited 2013 Jan 15]; Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf>
16. Cotton LA, AbdurRahman M, Ng C, Le AQ, Milloy MJ, Mo T, et al. HLA class I sequence-based typing using DNA recovered from frozen plasma. *J Immunol Methods.* 2012 Aug 31;382(1-2):40-7.

Recibido: 18 de julio de 2014.

Aceptado: 24 de julio de 2014.

*Dr. Arturo Chang Monteagudo.* Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268. Fax (537) 644 2334. E-mail: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)