



Artículo de revisión

Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares

Relevance of an adequate DNA extraction protocol for molecular studies

Dr. Juan Alberto Cruz-Enríquez,* Dra. Sara Elva Espinosa-Padilla,† Dr. Edgar Alejandro Medina-Torres§

* Pasante de Servicio Social, Laboratorio de Inmunodeficiencias Primarias.

† Jefa del Laboratorio de Inmunodeficiencias Primarias.

§ Adscrito al Laboratorio de Inmunodeficiencias Primarias.

Torre de Investigación, Laboratorio de Inmunodeficiencias Primarias, Instituto Nacional de Pediatría. México.

Citar como: Cruz-Enríquez JA, Espinosa-Padilla SE, Medina-Torres EA. Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. *Alergia Asma Inmunol Pediatr.* 2021; 30 (2): 50-53. <https://dx.doi.org/00.00000/00000>

RESUMEN

La extracción de DNA (ácido desoxirribonucleico, de sus siglas en inglés: *deoxyribonucleic acid*) se ha convertido en un procedimiento importante para el estudio molecular de las enfermedades genéticas, por dicho motivo es de importancia tanto para el médico investigador como para el médico clínico contar con un protocolo adecuado de extracción de DNA y la relevancia que tienen en la concentración, pureza e integridad del DNA genómico. En este artículo se revisó qué factores influyen en cada paso del protocolo de extracción de DNA para dar un producto subóptimo y que no permitirá su uso posterior en cualquier estudio molecular que se requiera, dado que el protocolo no está únicamente confinado al proceso dentro del laboratorio, se darán recomendaciones que abarcan desde la toma adecuada de muestra, la elección de los mejores anticoagulantes para mantener condiciones de preservación apropiada de la muestra, así como cuánto tiempo y en qué condiciones ambientales se pueden almacenar las muestras sin que se vea afectado el resultado del proceso. Se estudiarán los errores que pueden presentarse dentro del propio laboratorio (clínico o de investigación) durante el protocolo de extracción que puedan afectar la pureza, cantidad, integridad e incluso la pérdida de material genético, en este artículo se describirán los pasos generales del protocolo de extracción de DNA independiente del kit comercial que se utilice.

Palabras clave: Extracción de DNA, estudios moleculares, protocolo de extracción.

ABSTRACT

DNA (deoxyribonucleic acid) extraction has become an important procedure for the molecular study of genetic diseases. For this reason, it is important for both the research physician and the clinician to know the importance of having an adequate DNA extraction protocol and the relevance it has on the concentration, purity and integrity of genomic DNA. In this article we reviewed the factors that influence each step of the DNA extraction protocol to give a suboptimal product that will not allow its subsequent use in any molecular study required, since the protocol is not only confined to the process within the laboratory, recommendations will be given ranging from proper sample collection, the choice of the best anticoagulants to maintain proper preservation conditions of the sample, as well as how long and in what environmental conditions samples can be stored without affecting the outcome of the process. Errors that may occur within the laboratory itself (clinical or research) during the extraction protocol that may affect the purity, quantity, integrity and even the loss of genetic material will be studied, in this article the general steps of the protocol will be described DNA extraction independent of the commercial kit used.

Keywords: DNA extraction, molecular studies, extraction protocol.

Recibido: 13/07/2021. Aceptado: 27/08/2021.

Correspondencia: Dr. Edgar Alejandro Medina-Torres

E-mail: ilhuicamina@gmail.com



INTRODUCCIÓN

Los estudios moleculares han tomado una relevancia clínica importante para el estudio y tratamiento de enfermedades genéticas, puesto que cada año se descubren nuevos genes responsables de enfermedades cuya etiología se desconocía.

La mayoría de los laboratorios de investigación utiliza el diagnóstico molecular a través de la secuenciación de genes; sin embargo, para hacer posible dicho estudio es necesario obtener una muestra de DNA (ácido desoxirribonucleico, de sus siglas en inglés: *deoxyribonucleic acid*) de cualquier tejido del cuerpo con un número adecuado de células; para esto, es necesario establecer un protocolo de extracción de DNA adecuado al tipo de muestra que se tenga disponible, aunque en la mayoría de los laboratorios del área de la salud, la muestra más empleada para la extracción de DNA es la sangre venosa total.

La extracción de DNA es el protocolo mediante el cual se obtiene una muestra de DNA genómico de células nucleadas, preservando su integridad y obteniendo un producto lo más limpio posible de contaminantes, que permitan su uso para cualquiera de las estrategias que se utilizará para la secuenciación de genes.

Para el diagnóstico molecular a través de la extracción de DNA en pacientes con enfermedades genéticas, se utiliza la muestra de sangre total, su facilidad de obtención y procesamiento, la poca invasión y las cantidades de DNA que se pueden obtener hacen que esta técnica esté ampliamente distribuida, además se facilitan y simplifican otros aspectos como la preservación, transporte y almacenamiento hasta su llegada a laboratorio.

Uno de los primeros aislamientos de DNA fue realizado por Friedrich Miescher, médico suizo que extrajo DNA de sangre periférica, inicialmente trató de definir que las proteínas eran el principal componente del citoplasma del leucocito, pero a la adición de ácidos a la solución logró precipitar DNA; sin embargo, la cantidad era pobre, por lo cual diseñó un protocolo más refinado que permitió estudios más detallados.¹

En este artículo, se revisan y analizan los errores más comunes que se cometen en todos los procesos que forman parte de la extracción de DNA, los cuales incluyen la toma, registros, almacenamiento, envío, extracción, cuantificación y conservación del material obtenido hasta el momento de ser enviada al laboratorio, donde se hará el estudio de secuenciación. Las desviaciones a los procedimientos estandarizados pueden generar errores que afectan a la muestra hasta un punto tal en el que no permite su uso para la secuenciación de genes y finalmente se impide alcanzar un diagnóstico molecular.

OBTENCIÓN, ALMACENAMIENTO Y ENVÍO DE LA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

Para la extracción de DNA, será de vital importancia que la toma de muestra se haga en un tubo adecuado (considerando capacidad, anticoagulante y otras características del producto), pues al no hacerse de esta manera podría disminuir la viabilidad celular o facilitar la formación de coágulos y, en consecuencia, generar la pérdida de material genético, lo que impediría alcanzar la concentración requerida de DNA para realizar los estudios de secuenciación.

Algunos anticoagulantes afectan de forma negativa los resultados analíticos, el caso de la heparina es controversial en los estudios moleculares, existen estudios que demuestran que si no se elimina durante la extracción de DNA, su presencia afectaría negativamente aquellos estudios que utilicen métodos enzimáticos.²⁻⁴

Por otra parte, la extracción de DNA para secuenciación a partir de muestras colectadas en tubos que contienen ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) como anticoagulante es aceptable. Sin embargo, es importante considerar que independientemente del tubo que se utilice, es necesaria la homogenización adecuada de la muestra en el tubo con sangre total, pues la formación de coágulos provocará atrapamiento celular, reduciendo no sólo la cantidad de células nucleadas disponibles, sino también restará eficacia a los mecanismos de acción de las disoluciones de lisis tanto de eritrocitos como de leucocitos; todo esto en conjunto impactará negativamente sobre el rendimiento final del proceso de extracción de DNA.

La cantidad de DNA obtenido al final del protocolo no sólo se ve reflejado por la eficacia con que se realicen los pasos, pues existen factores no controlables que dependen del estado de salud del paciente que se obtuvo la muestra, un ejemplo son los pacientes con inmunodeficiencias, dentro del espectro clínico se encuentran casos con citopenias (celularidad disminuida), también con presencia de neutropenia cíclica, de forma que se obtendrá una menor cantidad de células nucleadas según el momento en que se decida obtener la muestra. Otro aspecto a tomar en cuenta son los pacientes en la Unidad de Terapia Intensiva; obtener muestras de sangre de casos en condiciones críticas provocaría una pérdida importante de volumen, dado que estos pacientes presentan en su mayoría anemia, además de que son sometidos a transfusiones de sangre con frecuencia y presentan trastornos en la hemostasia,⁵ todo esto afectaría el procesamiento de la muestra por la formación de coágulos o la poca obtención de volumen; así, es de vital importancia informar de estas situaciones al laboratorio, pues de esta forma se podrán hacer ajustes que permitan la mayor recuperación de células nucleadas y de material genético.

El almacenamiento de la muestra es otra consideración importante, sobre todo si la muestra es obtenida en un sitio

lejano al laboratorio, donde se realizará la extracción y el estudio molecular. Existen en el mercado algunos tubos que permiten que la muestra sanguínea destinada para la extracción de material genético se conserve en condiciones óptimas durante varios días sin necesidad de refrigeración, lo que facilita la toma de muestra y su posterior transporte desde lugares remotos hasta el laboratorio; sin embargo, estos tubos son costosos en comparación con los que se utilizan dentro del laboratorio de rutina o de investigación, lo que los vuelve en muchos casos inaccesibles o un gasto a considerar con mayor detenimiento en función de la cantidad y volumen de procesamiento.

Ante este escenario, se pueden aplicar algunas consideraciones que permiten el manejo adecuado de las muestras sin afectar la calidad del DNA que se obtiene de éstas. Previo a la extracción de DNA, la sangre completa puede almacenarse temporalmente a temperatura ambiente hasta 24 horas o en el refrigerador (2-8 °C) durante tres a cuatro días, que es el tiempo óptimo en que debería procesarse la muestra, principalmente para estudios de metilación, en caso de no contar con un refrigerador, se pueden alcanzar estas condiciones con uso de hielo simple y una hielera; sin embargo, para estudios de secuenciación es utilizable hasta 15 días a temperatura ambiente después de la toma de muestra, aunque se demostró que después de esto, la calidad del DNA no disminuye considerablemente respecto a las procesadas antes de dichos días, aunque la concentración de DNA en los resultados sí se ve disminuida de manera considerable.^{4,6-8}

Para el transporte de grandes distancias que requieran la congelación de muestras de sangre total, deben utilizarse recipientes de polipropileno en lugar de vidrio, y de preferencia dividirlos en alícuotas para evitar el congelamiento y descongelamiento de la muestra, ésta es otra opción en la obtención de la capa leucocitaria, pero requerirá de resguardo a -70° y sólo será viable por un par de días,⁹ por lo que no sería de mucha utilidad.

Se recomienda que en sangre total extraída en tubos con EDTA, citrato o heparina no se almacenen más de un día a temperatura ambiente (18-25°) o cinco días a 4 °C, y en caso de requerir una concentración máxima de DNA se recomienda una estancia de sólo tres días a 2-8 °C.¹⁰

PROCESAMIENTO DE MUESTRA

La extracción de DNA sigue protocolos con reactivos estandarizados, que se reúnen en kits comerciales cuyo fin es obtener un DNA puro, de alta calidad y concentración. A continuación se describen los pasos generales de la extracción de DNA a partir de muestras de sangre total.

Lisis de eritrocitos: éste es un paso que algunos kits comerciales no requieren, pues obtienen la separación

de la capa leucocitaria de la sangre total por centrifugado, sobre todo si requieren del uso del plasma para estudios posteriores, lo que evita hacer uso de reactivos de lisis de eritrocitos; sin embargo, los kits más utilizados enfocados sólo a la extracción de DNA hacen uso de la solución de lisis de eritrocitos. En la lisis de eritrocitos el tiempo es fundamental, pues sobreexponer la muestra de sangre a la solución podría ocasionar de forma secundaria el inicio de la lisis de leucocitos y puede perderse material genético; el tiempo de exposición dependerá de las indicaciones de cada kit comercial, aunque existen consideraciones generales a tomar en cuenta, como el tiempo que se ha preservado la muestra antes del procesamiento, pues las que lleven más de tres a cuatro días de almacenamiento tendrán una lisis de eritrocitos más rápida debido a la fragilidad celular por exposición, en caso de observar la presencia de coágulos se deberá homogenizar la muestra el mayor tiempo permitido para intentar disolver, en lo mayor posible, el coágulo y así poder obtener la mayor cantidad de células nucleadas;^{10,11} aunque en muestras que sobrepasen los 10 días sería contraproducente tratar de disolver el coágulo, pues podría provocar la lisis de leucocitos en el proceso, en estos casos se recomienda retirar el coágulo y rescatar la mayor cantidad de células nucleadas de la muestra sobrante o en caso de ser necesario solicitar nueva muestra.

Lisis de leucocitos y precipitación de proteínas: durante la lisis de eritrocitos, la homogeneización de la muestra es importante, para esto los kits comerciales recomiendan hacer uso de un agitador vórtex para permitir un mayor contacto de la solución de lisis de leucocitos con la muestra obtenida, también se puede incubar la muestra con la solución de lisis de leucocitos a 37°, esto ha tenido buenos resultados para obtener la mayor concentración de DNA, si por alguna razón se necesita interrumpir el protocolo de extracción de DNA los manuales indican que la muestra puede preservarse con la solución de lisis de leucocitos hasta por dos años en refrigeración, sin que exista alteración del resultado final.^{10,11}

Para la precipitación de proteínas, la mayoría de los kits utilizan la precipitación salina, es decir hacen uso de la interacción ion-ion y hacen descender las proteínas en la disolución. Durante este paso, se hará uso del agitador vórtex nuevamente y en caso de ser necesario se podrá incubar en hielo durante cinco minutos, al final de la precipitación, después de centrifugar la muestra es importante rescatar toda la cantidad de sobrenadante, pues el DNA se encontrará en el material sobrenadante, se deberá cerciorar que el botón formado por la precipitación de proteínas no se disuelva o desprenda, pues contaminarían el DNA y en caso de ocurrir, se repetirá el centrifugado después de incubar en hielo cinco minutos.^{10,11}

Precipitación de DNA y lavado: el sobrenadante del paso anterior deberá ser rescatado en la mayor cantidad

posible y será vertido sobre un tubo con isopropanol, cuidando no derramar ni perder líquido. Aquí la homogenización, a diferencia de los anteriores pasos, se debe realizar con inversiones gentiles, pues el DNA se podría compactar en exceso durante su precipitación y esto dificultaría el lavado adecuado y se obtendrá un DNA con baja pureza, en este paso se observará el DNA formando una red o telaraña, y después del centrifugado se verá como un botón blanquecino al fondo del tubo.

El lavado eliminará los contaminantes que pudieron quedar de los pasos anteriores, las inversiones aquí son de mayor duración, la mayoría de los kits refieren de tres a cinco minutos, y se debe repetir al menos dos veces. Tanto en la precipitación como en el lavado del DNA siempre debe cuidarse al eliminar el sobrenadante no perder el botón de DNA, pues no será recuperable y se deberá repetir todo el protocolo, esto en caso de seguir contando con muestra de sangre total.^{10,11}

CONCLUSIÓN

Existen múltiples consideraciones a tomar en cuenta dentro del protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares, que van desde la toma de la muestra, en qué tubo de sangre total se hará y qué anticoagulante se usará; cuánto tiempo se almacenará la muestra y en qué condiciones, en cuánto tiempo es adecuado llevar la muestra al laboratorio donde se realizará la extracción. Todo lo anterior tiene acciones que deben ser cuidadosamente realizadas para obtener un DNA puro y en una adecuada concentración.

Para el Laboratorio de Inmunodeficiencias Primarias del Instituto Nacional de Pediatría es muy importante que los médicos clínicos e investigadores, así como residentes que envían muestras de pacientes para estudios genéticos tomen en cuenta que el resultado no sólo está limitado al laboratorio que procesa la muestra, por lo tanto el no cuidar todos estos pasos llevará a obtener un DNA con contaminantes, en concentraciones pobres o ni siquiera obtener material genético de la muestra del paciente, lo que impedirá un adecuado diagnóstico molecular, no

pudiendo adecuar un tratamiento específico y en caso de deceso no se podrá corroborar la causa genética de la enfermedad, impidiendo un asesoramiento genético a la familia en caso de ser una enfermedad hereditaria, o que obligue a obtener DNA de otras fuentes que hace necesario el uso de recursos más avanzados y que podría no ser eficiente para la obtención de DNA.

REFERENCIAS

1. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2009; 2009: 574398. doi: 10.1155/2009/574398.
2. Holland NT, Pflieger L, Berger E, Ho A, Bastaki M. Molecular epidemiology biomarkers--sample collection and processing considerations. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206 (2): 261-268. doi: 10.1016/j.taap.2004.10.024.
3. Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC Sci Publ.* 2011; (163): 23-42.
4. Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M, Azari-Yam A, Hossieni Gharalari F, Safavi M et al. Pre-analytical practices in the molecular diagnostic tests, a concise review. *Iran J Pathol.* 2021; 16 (1): 1-19. doi: 10.30699/ijp.2020.124315.2357.
5. Shander A, Javidroozi M, Lobel G. Patient blood management in the Intensive Care Unit. *Transfus Med Rev.* 2017; 31 (4): 264-271. doi: 10.1016/j.tmr.2017.07.007.
6. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res.* 2003; 543 (3): 217-234. doi: 10.1016/s1383-5742(02)00090-x.
7. Huang LH, Lin PH, Tsai KW, Wang LJ, Huang YH, Kuo HC et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. *PLoS One.* 2017; 12 (9): e0184692. doi: 10.1371/journal.pone.0184692.
8. Rainen L, Arbique JC, Asthana D, Earley MC, Geiszler RL, Krieg-Schneider F et al. MM13-A-Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods: approved guideline. Pennsylvania, USA: CLSI; 2005. pp. 1-51.
9. Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallagher M, Caggana M et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. *Epidemiology.* 2002; 13 (3): 246-254.
10. QIAGEN. Genra Puregene Handbook. 3rd edition. 2011. Available in: <https://www.qiagen.com/us/>
11. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V et al. Nucleic acid extraction from human biological samples. *Methods Mol Biol.* 2019; 1897: 359-383. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_30.