

Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular

New methods of extraction ribonucleic acids (RNA): Basic tools in molecular biology

AL DIRECTOR:

La extracción de ácido ribonucleico (ARN) es una práctica indispensable en los laboratorios de biología molecular, teniendo en cuenta que múltiples entidades hematológicas requieren, como parte de su diagnóstico, un estudio molecular al inicio de la enfermedad y posteriormente, para evaluar su evolución y respuesta al tratamiento.¹⁻³

El ARN es uno de los componentes más relevantes del núcleo celular. En los inicios de la biología molecular se describieron tres formas de ARN: el mensajero (ARNm), que contiene la información con la que viaja al citoplasma para la traducción y síntesis de proteínas; el ribosomal (ARNr), que junto a proteínas forman un complejo citoplasmático que actúa como sitio principal para la traducción; y el de transferencia (ARNt), que facilita la incorporación de los aminoácidos al ribosoma durante la síntesis proteica.¹

En los últimos tiempos se han descrito nuevas variantes de ARN, que según se plantea: son importantes en la regulación genética de la célula eucariota, como los microARN conocidos como *miRNA* (por sus siglas en inglés), que no codifican proteínas, pero que se unen al ARNm y regulan su velocidad de producción; pequeñas moléculas de ARN denominadas también por sus siglas en inglés como *snRNA* y *snoRNA*, involucradas en procesos de empalme y modificaciones químicas de otros ácidos nucleicos, respectivamente; y otras formas de ARN no codificante, de mayor tamaño, cuya función no está totalmente esclarecida.^{1,4}

Debido a su estructura química, el ARN es una molécula frágil y susceptible a la degradación por enzimas como las *ARNasas*. Este es uno de los temas fundamentales durante el proceso de extracción y purificación de este ácido nucleico. El tipo de muestra y la manera en que se toma, ya comienza a influir en las características del ARN extraído.

De cualquier forma, se requerirá inhibir la actividad de las *ARNasas* durante todo el proceso de obtención y, de igual manera, durante su utilización en el estudio molecular del cual será objeto. Este es uno de los puntos fundamentales a la hora de desarrollar un método con el cual pueda obtenerse ARN no degradado y en cantidad suficiente para el estudio que se llevará a cabo.^{1-3,5}

Diferentes métodos para la obtención del ARN están actualmente estandarizados en los laboratorios de biología molecular: desde técnicas engorrosas con marcada manipulación de las muestras y que requieren varios días para la obtención del ARN,^{4,6,7} pasando por nuevos *kits* comerciales que agilizan el procedimiento de manera dinámica, con reactivos y métodos físicos novedosos que aunados, reducen los riesgos de obtener un ARN de mala calidad;⁸⁻¹¹ hasta la extracción robotizada de ARN, ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas, que se basa en equipos de nueva generación que automatizan el proceso de principio a fin.

Históricamente, el método más empleado en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Hematología e Inmunología ha sido el de extracción con la mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (modificado), con el que se obtiene un buen rendimiento en la cantidad de ARN con reactivos convencionales.

No obstante, el procedimiento es engorroso y requiere de muchas horas, lo que a su vez retarda las exploraciones subsiguientes que dependen del ARN extraído y no permite un resultado rápido, sobre todo en aquellos casos donde se dependa de este estudio para el diagnóstico inmediato del paciente. Por otra parte, esta técnica implica el uso de sustancias nocivas y corrosivas que, aunque no influyen en la calidad y el rendimiento del ARN, son riesgosas para la persona que realiza el proceso.¹²

La introducción de nuevas tecnologías en el centro ha permitido modernizar las técnicas moleculares y se ponen a punto métodos de extracción por columnas y de manera automatizada, ya sea manualmente mediante *kits* habilitados al respecto, o totalmente automatizado una vez que se toma la muestra al paciente, con el innovador QIAcube, de tecnología avanzada.

Innegablemente, estos métodos tienen sus bondades y contrapartes negativas, por lo que su adecuación a la práctica diaria estará determinada por las condiciones y necesidades específicas de cada centro. Los sistemas automatizados diseñados para medianos y grandes laboratorios han crecido en cuanto a demanda en los últimos años. Constituyen una alternativa a métodos manuales de trabajo intensivo y se destacan ventajas como la reducción del tiempo y de la mano de obra, aumento en la seguridad del trabajador e incremento en la reproducibilidad y calidad de los resultados. La comunidad científica en general apuesta por este tipo de tecnología.¹³⁻¹⁶

El conocimiento y la aplicación de esta variedad de procedimientos de extracción de ARN en los días actuales, cuando la biología molecular se hace cada vez más indispensable, permite tener herramientas a la mano para decidir en cada momento qué técnica es la idónea de acuerdo con la naturaleza de la muestra, el número de alteraciones genéticas a explorar, la urgencia del resultado y demás condiciones asociadas.

Un laboratorio reforzado con esta tecnología de punta y el conocimiento previo de técnicas más básicas, sin dudas elevará la calidad en el manejo de los pacientes. En estos momentos trabajamos en la puesta a punto y establecimiento de los protocolos de diagnóstico adaptados a esta nueva tecnología y en breve tiempo se podrán ofrecer las apreciaciones sobre sus ventajas y novedades basadas en la propia experiencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moss P. History and development of molecular biology. In: Provan D, Gribben J, ed. *Molecular hematology. 3rd ed.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2010.p.360-9.
2. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian. 2nd ed.* New Jersey: Human Press; 2006.
3. Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. *Ecología Molecular.* México: Semarnat; 2007.
4. Hung KH, Stumph WE. Regulation of snRNA gene expression by the *Drosophila melanogaster* small nuclear RNA activating protein complex (DmSNAPc). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2011; 46(1): 11-26.
5. Díaz-Alonso Carmen, Garrote-Santana Heidys, Amor-Vigil Ana María, Suárez-González Yandi, González-Mugica Romero Raúl. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2013 Sep; 29(3): 298-303.
6. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999; 13(12):1901-28.
7. Hernández A, Martín P, Torres A, Salido E. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Biología molecular y nefrología.* 1994; XIV (2):145-62.
8. King RL, Naghashpour M, Watt CD, Morrissette JJ, Bagg A. A comparative analysis of molecular genetic and conventional cytogenetic detection of diagnostically important translocations in more than 400 cases of acute leukemia, highlighting the frequency of false-negative conventional cytogenetics. *Am J Clin Pathol.* 2011; 135(6):921-8.
9. Dolz S, Barragan E, Fuster O, Llop M, Cervera J, Such E, et al. Novel real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of recurrent fusion genes in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2013; 15(5):678-86.
10. Laforet MP, Turlure P, Lippert E, Cornillet-Lefebvre P, Pigneux A, Pradeau R, et al. Design and feasibility of a novel, rapid, and simple fluorescence 26-plex RT-PCR assay for simultaneous detection of 24 fusion transcripts in adult acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2013; 15(2):186-95.
11. Hernández AK, Guzmán-Barney M. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo phureja. *Rev Colomb Biotecnol.* 2013; 15(1): 71-81.
12. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols.* 2006; 1(2):581-5.

13. Amaru R, Peñaloza R, Miguez H, Torres G, Cuevas H. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. Rev Cuadernos. 2008;53(1):38-43.
14. Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, Ekstrom K. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. Mol Immunol. 2012;50(4):278-86.
15. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:1-10.
16. Cayuela JM, Mauté C, Fabre AL, Nibourel O, Dulucq S, Delabesse E et al. A novel method for room temperature distribution and conservation of RNA and DNA reference materials for guaranteeing performance of molecular diagnostics in onco-hematology: a GBMHM study. Clin Biochem. 2015 Apr 12. pii: S0009-9120(15)00128-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.04.004.

Lic. Carmen Díaz Alonso, Dra. Heidys Garrote Santana, Dra C. Ana María Amor Vigil, Lic. Yandi Suárez González, Dra. Lesbia Fernández Martínez, Lic Vera Ruiz Moleón.

Instituto de Hematología e Inmunología.

Recibido: marzo 23, 2015.
Aceptado: junio 10, 2015.

Dra. Heidys Garrote Santana. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA.
E-mail: rchematologia@infomed.sld.cu