

Evaluación del método modificado de Proteinasa K para la extracción de ADN de orina

Evaluation of the modified Proteinase K method for urine DNA extraction

CORTES-ARCINIEGA, Jair Esteban†, BRACAMONTES-BENITEZ, Carlos Jonas, TORRES-ROJAS, Francisco Israel, ALARCÓN-ROMERO, Luz del Carmen e ILLADES-AGUIAR, Berenice

Universidad Autónoma de Guerrero

ID 1^{er} Autor: *Jair Esteban, Cortes-Arciniega*

ID 1^{er} Coautor: *Carlos Jonas, Bracamontes-Benitez*

ID 2^{do} Coautor: *Francisco Israel, Torres-Rojas*

ID 3^{er} Coautor: *Luz del Carmen, Alarcón-Romero*

ID 4^{to} Coautor: *Berenice, Illades-Aguiar*

DOI: 10.35429/JNT.2019.8.3.7.11

Recibido 10 de Marzo, 2019; Aceptado 30 de Junio, 2019

Resumen

Existen diversas muestras biológicas utilizadas para el diagnóstico clínico, que pueden ser desde biopsias sólidas, muestras sanguíneas y orina. Por lo cual alguna de ellas puede requerir procedimientos altamente invasivos. La orina representa la muestra clínica ideal, debido a su fácil recolección. El ADN que surge de las células descamadas del tracto genitourinario puede usarse para la detección de anomalías genéticas, neoplasias o infecciones asociadas al sistema urinario y área genital. Los métodos descritos para la obtención de ADN principalmente se agrupan en 2, la extracción mediante kits comerciales ya que tienen la ventaja de ser fácil de usar y que ahorran tiempo, sin embargo una de las desventajas principales son sus elevados costos. El otro grupo son las técnicas manuales utilizando principalmente la técnica de fenol-cloroformo, la técnica por sí sola en muestras de orina no es tan viable debido a sus componentes. Entre los métodos para realizar la extracción del ADN en otros tipos de muestras, se encuentran aquellos que se fundamentan en la hidrólisis con proteinasa K. Es por ello que la técnica modificada de proteinasa K combinada con la técnica de fenol-cloroformo podría convertirse en una alternativa viable para la extracción de ADN.

Extracción de ADN, Orina, Células epiteliales, Muestra y Diagnóstico

Abstract

There are various biological samples used for clinical diagnosis, which can range from solid biopsies, blood samples, and urine. Therefore, some of them may require highly invasive procedures. Urine represents the ideal clinical sample, due to its easy collection. DNA arising from desquamated cells of the genitourinary tract can be used for the detection of genetic abnormalities, malignancies, or infections associated with the urinary system and genital area. The methods described for obtaining DNA are mainly grouped into 2, extraction using commercial kits since they have the advantage of being easy to use and time-saving, however one of the main disadvantages is their high costs. The other group is manual techniques, mainly using the phenol-chloroform technique, the technique by itself in urine samples is not as viable due to its components. Among the methods to perform DNA extraction in other types of samples, find those that are based on hydrolysis with proteinase K. That is why the modified proteinase K technique combined with the phenol-chloroform technique could become a viable alternative for DNA extraction.

DNA extraction, Urine, Epithelial cells, Sample and Diagnosis

Citación: CORTES-ARCINIEGA, Jair Esteban, BRACAMONTES-BENITEZ, Carlos Jonas, TORRES-ROJAS, Francisco Israel, ALARCÓN-ROMERO, Luz del Carmen e ILLADES-AGUIAR, Berenice. Evaluación del método modificado de Proteinasa K para la extracción de ADN de orina. Revista de Técnicas de la Enfermería y Salud. 2019, 3-8: 7-11

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: billades@uagro.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Existen diversas muestras biológicas utilizadas para el diagnóstico clínico, que pueden ser desde biopsias sólidas, muestras sanguíneas y orina. Por lo cual alguna de ellas puede requerir procedimientos altamente invasivos. Por ello la orina representa la muestra clínica ideal, debido a su fácil método de recolección (Cannas et al., 2009). Los túbulos uriníferos de los riñones y los conductos del tracto urinario están revestidos con un epitelio, el cual las células superficiales de los revestimientos epiteliales sufren exfoliación, y se puede encontrar en el sedimento urinario normal de individuos (Casadio et al., 2018).

En el caso del sedimento de la orina, en los individuos normales, es escaso y está formado por sales (uratos, fosfatos y carbonatos) con algunas células epiteliales de la vesícula y la uretra. En la mujer pueden presentarse también algunas células vaginales (Marques et al., 2012). Hay grandes diferencias entre la cantidad de células epiteliales presentes en la orina masculina y femenina, las células vaginales posiblemente sean el principal contribuyente y por ello tal vez la cantidad de ADN encontradas en las muestras sea diferente (Ng et al., 2018). El ADN contenido en las células de exfoliación en la luz del tracto genitourinario puede usarse para la detección de anomalías genéticas y neoplasias asociadas con la vejiga, la próstata o el riñón.

Además, se pueden detectar algunas infecciones causadas por virus o bacterias localizadas en el riñón, la vejiga o sitios genitales (Cannas et al., 2009). Para analizar estas alteraciones es necesario obtener células libres en la orina, la mayoría de los estudios sobre orina, sugieren que la primera micción del día es preferible, ya que presenta una mayor concentración de las células por ello la recolección y el almacenamiento de la muestra antes de la extracción son puntos cruciales, y es por lo tanto, crítico para garantizar un obtención óptima de ADN (Huey et al., 2018).

Los ácidos nucleicos en la orina son más sensibles a la degradación con respecto a las muestras de sangre, debido a la composición de la orina (ADN nucleasas, bacterias, pH variable, etc.) (Casadio et al., 2018).

Los métodos descritos para la obtención de ADN principalmente se agrupan en 2, la extracción mediante kits comerciales, los cuales existen diversos tipos y marcas, son convenientes ya que tienen la ventaja de ser fácil de usar y que ahorran tiempo, sin embargo una de las desventajas principales que tienen son sus elevados costos haciendo que no sean de fácil acceso para la utilización de diagnósticos.

El otro grupo son las técnicas manuales utilizando principalmente la técnica de fenol-cloroformo, en esta técnica el lisado celular se mezcla con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Mahony y colaboradores en 1998 utilizando la técnica de fenol cloroformo, realizaron un estudio en mujeres embarazadas y no embarazadas con posible infección de *Chlamydia trachomatis*, donde determinaron los principales interferentes que podrían existir en el diagnóstico, en muestras de orina a través de PCR, ellos observaron que los mayores interferentes en las muestras de orina eran: la hemoglobina, los cristales, bacterias y la hormona corionica humana (Mahony et al., 1998).

Por lo anterior la técnica por si sola de fenol-cloroformo para extraer ADN de muestras de orina no es tan viable debido a sus componentes, principalmente elementos formes (como cristales) y proteínas (hemoglobina y hormonas). Entre los métodos para realizar la extracción del ADN en otros tipos de muestras, se encuentran aquellos que se fundamentan en la hidrólisis con proteinasa K, la cual digiere proteínas y remueve contaminaciones proteicas de las preparaciones de ácidos nucleicos. La adición de proteinasa K inactiva rápidamente nucleasas que degradan el ADN o el ácido ribonucleico (ARN) durante la extracción (González et al., 2011).

Es por ello que la técnica modificada de proteinasa K combinada con la técnica de fenol-cloroformo podría convertirse en una alternativa viable para obtener ADN de una manera sencilla y lograr tener una posibilidad de determinar ciertas patologías a niveles renales, vejiga o infecciones por ciertos microorganismos e incluso para algunos virus, como el virus del papiloma humano (VPH) y así no realizar métodos invasivos para su detección.

Objetivos

Evaluar la eficacia del método modificado de Proteinasa K-fenol-cloroformo para la extracción de ADN en muestras de orina.

Metodología a desarrollar

Muestras

Se analizaron 20 muestras de orina correspondientes a 10 sujetos que participaron de forma voluntaria en el análisis (5 Mujeres y 5 Hombres), quienes proporcionaron la primera micción del día, dividida en 2 fracciones, la primera corresponde a la primera porción de orina (coloquialmente llamada primer chorro), la segunda corresponde a la parte intermedia de la micción (llamada coloquialmente segundo chorro). Se les proporcionaron dos frascos de muestras estériles por sujeto y se les explico el método de recolección de manera ilustrativa (con un folleto).

Extracción de ADN utilizando la técnica modificada de proteinasa K-fenol-cloroformo

La técnica utilizada es la descrita por Mittal *et al.*, en ella utilizaron un método de proteinasa K para obtener ADN en muestras de orina, las modificaciones realizadas a la tecnica por nosotros son las siguientes, el volumen de muestra utilizada fue de 15 ml y se centrifugaron a 3500 rpm por 20 minutos, se colocaron 500 µl de PBS 1X (la técnica utilizan TDW), se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos, este paso se repitió dos veces más, colocamos 5µl de proteinasa K y se dejó incubando toda la noche a 55°C (Mittal utilizo 10 µl de proteinasa K y se incubo a 55°C por dos horas). Posterior a la técnica de proteinasa K se procedio a realizar la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo y el ADN fue precipitado por etanol absoluto.

PCR punto final

Para demostrar la integridad de las muestras obtenidas se decidio realiza una PCR punto final, de 4 muestras (2 muestras de una mujer y las otras 2 muestras de un hombre, ambas de la primera y segunda porción de la orina del mismo sujeto).

Se amplifico el gen constitutivo GAPDH (250pb), el volumen final utilizado en la reacción fue de 25 µl. Cada tubo contenía: 2.5 µl, 1.5 µl de dNTP's, 1 µl de cloruro de magnesio, 4 µl de primers (gen GAPDH), 0.2 µl de taq polimerasa y la cantidad de ADN y agua vario de acuerdo a la concentración de cada muestra.

Obteniendo un total de 6 tubos (4 muestras y 2 controles positivo uno con 500 ng de ADN y el otro con 100 ng de ADN). La visualización de los productos de PCR se realizó mediante tinción con bromuro de etidio previa electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Resultados

Los resultados expresados a continuación son representativos a las concentraciones y purezas obtenidas de la extracción del ADN (tabla 1). Las muestras con inicial M corresponden a muestras de mujeres, mientras que la inicial H corresponde a muestras de varones. Los folios fueron enumerados del 1 al 10, los que llevan el número 1 en el último dígito corresponden a muestras de la primera porción de la orina, mientras que las de la segunda porcion presentan el número 2 en el último dígito.

Determinamos que las muestras que constituyen a la primera porción de la orina tienen una mayor concentración y pureza de ADN en comparación a las de la segunda porción. Además observamos que en las muestras quien tuvo una mayor concentración fueron las muestras de mujeres en comparación a las de los hombres, esto concuerda con varios autores, debido a que se ha demostrado que en las mujeres hay mayor desprendimiento celular por diversos factores.

Muestra	ADN ng/μl	PUREZA 260/280
M1-1	71.4	1.76
M1-2	24.4	1.34
M2-1	554.5	1.83
M2-2	185	1.65
M3-1	106.6	1.84
M3-2	70.2	1.77
M4-1	221.1	2
M4-2	93.4	1.95
M5-1	62.7	1.75
M5-2	23.6	1.88
H6-1	51.4	1.90
H6-2	23.7	1.60
H7-1	18.4	1.83
H7-2	16	1.59
H8-1	22.8	1.69
H8-2	23.1	1.78
H9-1	36.8	1.54
H9-2	22.6	1.42
H10-1	34.5	1.39
H10-2	25.5	1.36

Tabla 1 Concentraciones y purezas de ADN

En la figura 1 se observa la electroforesis realizada, en el carril 1 (muestra M1-1) y el carril 2 (muestra H6-1), se observan bandas representativas de la amplificación del gen GAPDH, siendo el carril 1 la que presenta mayor intensidad de color en la banda comparado con el carril 2, esto se debe a que las mujeres tienen mayor descamación celular en la vagina por los cambios que presentan durante el ciclo reproductivo. Por otro lado, en los carriles 3 (muestra M1-2) y 4 (muestra H6-2) no hay bandas de amplificación, esto refuerza lo que se menciona en la tabla 1, ya que las muestras que no amplificaron son de la parte intermedia de la micción y presentan una menor concentración y pureza de ADN, debido a que la mayor cantidad de células es arrastrada en la primera porción durante la micción. Los carriles 5 y 6 corresponden a los controles positivos y el carril 7 al control negativo.

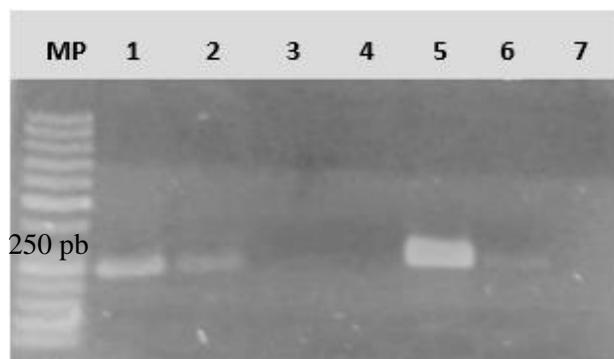


Figura 1 Gel correspondiente a la amplificación del gen GAPDH

Agradecimiento

A la QBP. Natividad Sales Linares, por la asistencia en el laboratorio en el desarrollo de las diferentes actividades.

Contribuciones

Jair Esteban Cortes Arciniega y Carlos Jonas Bracamontes Benítez quienes realizaron las extracciones de ADN.

Dr. Francisco Israel Torres Rojas quien realizó la cuantificación de las muestras y la PCR punto final.

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero encargada de la captación de las muestras utilizadas y la realización de las encuestas.

Dra. Berenice Illades Aguiar quien realizó la conceptualización del proyecto y la sensibilización de la población.

Conclusiones

Se determinó que la técnica modificada de Proteinasa K fenol-cloroformo para la extracción de ADN en muestras de orina funciona con eficacia. Además, se demostró que la muestra más viable para obtener mayor concentración de ADN es la de la primera porción.

Referencias

- Bali, L. E., Diman, A., Bernard, A., Roosens, N. H. C., & De Keersmaecker, S. C. J. (2014). Comparative Study of Seven Commercial Kits for Human DNA Extraction from Urine Samples Suitable for DNA Biomarker-Based Public Health Studies. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 25(4), 96–110.
- Cannas, A., Kalunga, G., Green, C., Calvo, L., Katemangwe, P., Reither, K., Huggett, J. F. (2009). Implications of Storing Urinary DNA from Different Populations for Molecular Analyses. *PLoS ONE*, 4(9), 1–8.
- Casadio, V., & Salvi, S. (2018). Urinary Cell-Free DNA: Isolation, Quantification, and Quality Assessment. *Cell-free DNA as Diagnostic Markers*, 19 (9), 211–221.

González N, Rodríguez N, Torres W, O'Callaghan J y De Jesús R. (2011). A Simple Protocol for Molecular Analysis with DNA Extrated from Ear Tissue of Laboratory Animals: Mouse and Rat, Using Bromelina Enzyme. *Revista Científica*, 21 (3), 233-238.

Huey, NG., Hwee, CA., See, YH., Mae-Lynn, L.,Hua, ET.,y Kiu-Choong, C., (2018). Simple DNA extraction of urine samples: Effects of storage temperature and storage time. *Forensic Science International*, 4(9), 36–39.

Johnson, D. J., Calderaro, A. C., & Roberts, K. A. (2007). Variation in Nuclear DNA Concentrations During Urination. *Journal of Forensic Sciences*, 52(1), 110–113.

Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K y Faught M. (1998). Urine specimens from pregnant and nonpregnat women inhibitory to amplification of Chlamydia trachomatis nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: Identification of urinaly substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol* 36 (11), 3122-3126.

Marqués Negredo, M., Álvarez-Maldonado Paramés, T., Villa Rodríguez, L., García Tejerina, R., Sanz Zamarro, M., & Coca Menchero, S. (2012). Perfiles genéticos en muestras de orina en identificación sanitaria militar. *Sanidad Militar*, 68(2), 79–86.

Mittlal V, Agarwal J y Verma A. (2010). Prevalence of genital Chlamydia trachomatis in women using PCR on urine specimen. *Biomedical research* 21(3), 301-309.

Silva, M. A. L., Medeiros, Z., Soares, C. R. P., Silva, E. D., Miranda-Filho, D. B., & Melo, F. L. (2014). A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), 193–197.