

**Purificación de ADN genómico humano para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico**

**Purification of human genomic DNA for the diagnosis of the systemic lupus erythematosus**

**Dr. Oscar Hernández Betancourt; Dra. Aime Debesa Padilla; Dra. Lídice Quesada Leiva**

Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba.

**RESUMEN**

**Fundamento:** la molécula de ADN constituye un antígeno necesario en el recubrimiento de un sistema inmunoenzimático destinado al diagnóstico de enfermedades autoinmunes, específicamente del lupus eritomaso sistémico. Por otra parte, esta molécula se emplea en la obtención de anticuerpos monoclonales anti ADN de doble cadena.

**Objetivo:** se evaluó la calidad del ADN humano purificado por el método del fenol:cloroformo con fines diagnósticos. La molécula fue obtenida por primera vez en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos de Camagüey.

**Método:** el ADN se extrajo a partir de tejido prostático de un paciente con hiperplasia prostática benigna. Se realizó la técnica convencional de fenol:cloroformo/alcohol isoamilico. El tejido fue previamente tratado con Pronasa a 56° C. La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa 0,8 %, y se determinó la relación 260/280nm mediante espectrofotometría, con la finalidad de evaluar la integridad de la macromolécula, así como el grado de pureza de la misma respectivamente.

**Resultados:** no se observó degradación de la molécula de ADN genómico humano, y la relación 260/280 fue de 1,6. La molécula de ADN humana fue ensayada en el recubrimiento de un ELISA destinado al diagnóstico del Lupus, y su comparación con ADN plásmidico no arrojó diferencias significativas ( $p= 0.710$ ).

**Conclusiones:** el método aquí descrito proporcionó una molécula de ácido nucleico con la calidad requerida para ser utilizada en el sistema inmunoenzimático destinado al diagnóstico del lupus eritematoso sistémico.

**DeCS:** ADN, purificación, electroforesis, geles de agarosa, ELISA, lupus eritematoso sistémico

## ABSTRACT

**Background:** the DNA molecule constitutes a necessary antigen in the capping of an immunoenzymatic system dedicated to the diagnosis of autoimmune diseases, specifically of the systemic lupus erythematosus. On the other hand, this molecule is used for obtaining the anti DNA monoclonal antibodies of double chain.

**Objective:** the quality of the purified human DNA was evaluated by the phenol method: chloroform with diagnostic purposes. The molecule for the first time was obtained in the Center of Immunology and Biological Products of Camagüey.

**Method:** the DNA was extracted from a patient's prostatic tissue with benign prostatic hyperplasia. The conventional technique of phenol: chloroform / isoamyl alcohol was performed. The tissue was previously treated with Pronasa at 56°C. The agarose gel electrophoresis was performed at 0, 8 % and the relationship 260/280nm was determined by spectrophotometry, with the purpose of evaluating the integrity of the macromolecule, as well as its grade of purity respectively.

**Results:** it was not observed degradation of the human genomic DNA molecule, and the relationship 260/280 was about 1,6. The human DNA molecule was tested in the capping of an ELISA dedicated to lupus diagnosis, and its comparison with plasmid DNA did not show significant differences ( $p = 0.710$ ).

**Conclusions:** the described method, provided a nucleic acid molecule with the quality required to be used in the immunoenzymatic system dedicated to the diagnosis of the systemic lupus erythematosus.

**DeCS:** DNA, purification, electrophoresis, agarose gels, ELISA, systemic lupus erythematosus

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento en los inicios de la década de los años 50 del siglo pasado por J. Watson y F. Crick, de la estructura molecular de una doble hélice helicoidal del ácido desoxiribonucleico conocida como ADN, constituyó uno de los descubrimientos más impresionantes de la comunidad científica. <sup>1</sup> A partir de esa fecha, varios han sido los trabajos que hacen uso de esta importante molécula, donde uno de los resultados más relevantes para el hombre fue la secuenciación del genoma humano en el año 2004. Este resultado puso al descubierto el acervo genético del hombre, su información genética guardada por millones de años en forma de una molécula compleja y susceptible a los constantes cambios quedaba al desnudo para ser utilizada en función del hombre.

En la actualidad, el ADN es utilizado en los laboratorios con diversos fines <sup>2-4</sup>. Los inicios de los años 70 abrieron paso a su manipulación, conocida como ingeniería genética, especialidad de la Biología Molecular que brinda la posibilidad de manipular la molécula en forma de bloques conformados por genes y elementos reguladores que han permitido realizar construcciones

genéticas empleadas en diferentes ramas de la biología, entre las que se encuentran fundamentalmente las ciencias agropecuarias y las investigaciones biomédicas.

Enfermedades genéticas como el cáncer de mama, la fibrosis quística y otras devenidas de mutaciones en el ADN mitocondrial, son ejemplos de su uso en el diagnóstico de pacientes adultos, así como en el diagnóstico preventivo del recién nacido.<sup>1</sup>

Otra utilidad ha sido su empleo en la identificación y confirmación de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad autoinmune caracterizada por elevados títulos de anticuerpos anti ADN de doble cadena (ADNdc)<sup>5</sup>. Por otra parte, el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en los inicios de los 80, revolucionó la biología molecular al poder amplificar la molécula de ADN a partir de cantidades ínfimas de muestras biológicas, aún en mal estado de conservación.<sup>2,6</sup>

Varios son los métodos utilizados para aislar esta macromolécula, los primeros estuvieron basados en extracciones fenólicas posterior a tratamientos con proteasas inespecíficas de la muestra, las que podían o no estar seguidas por métodos cromatográficos y ultracentrifugaciones<sup>7</sup>. Con el desarrollo vertiginoso de la ingeniería genética surgen nuevos métodos que brindan amplias ventajas en cuanto a tiempo empleado y calidad de la molécula, estos son comercializados por algunas firmas ya implantadas por su prestigiosa experiencia en el tema.<sup>6,8</sup>

El presente trabajo demuestra por primera vez la posibilidad de obtener en los laboratorios del Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) una molécula de ADN con las características necesarias, requeridas en el establecimiento y estandarización de un método inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico del LES.

## **MÉTODO**

### **Purificación del ADN**

Se trabajaron fragmentos de tejidos humano provenientes de una hiperplasia prostática benigna (HPB). Se utilizó el método convencional del fenol / cloroformo descrito por Sambrook J<sup>7</sup>.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 0,8 % con el tampón TBE 1X (Tris base 88mM, ácido bórico 88mM, EDTA 5mM, pH= 8,2) en presencia de bromuro de etidio 0,5 µgs/ml. 10 µgs del ADN cromosomal humano se depositaron en el pocillo. La electroforesis se corrió a 50 volts. Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN del fago lambda (48Kb). Terminada la corrida, el gel se observó en una lámpara emisora de luz ultravioleta para visualizar la molécula de ADN.

### **Espectrofotometría**

Se empleó el espectrofotómetro HITACHI para el cálculo de las concentraciones. Las lecturas de las muestras se efectuaron a 260 y 280nm. Se calculó la relación 260/280 para estimar el grado de pureza de las muestras.

### **Ensayo de recubrimiento en placas de ELISA**

Con la finalidad de evaluar la calidad del ADN cromosomal humano obtenido mediante la técnica convencional descrita,<sup>7</sup> en la utilización como antígeno de recubrimiento en los ensayos inmunoenzimáticos, se procedió a realizar un ELISA heterogéneo indirecto. Se empleó para la

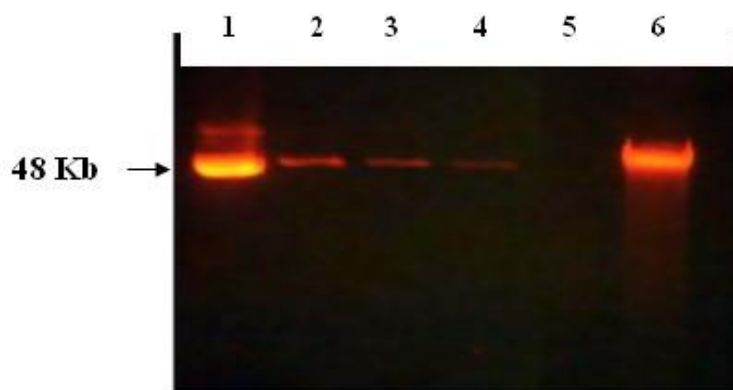
comparación el plásmido de pUC19, gentilmente donado por el CIGB de La Habana, a una concentración de 1,8 mg/ml, medida espectrofotométricamente a 260 nm y con grado de pureza de 1,76 calculada mediante la razón  $A_{260}/A_{280}$ .

Se probaron diferentes concentraciones de recubrimiento: 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 8,0 µg/ml, 16,0 µg/ml de ambos ADN. Las placas fueron previamente recubiertas con poly-L lisina a razón de 5 µg/ml durante 2 h a 37° C en cámara húmeda, para garantizar la unión covalente de las moléculas de ácido desoxirribonucleico a la placa de poliestireno. Se empleó como solución de recubrimiento el amortiguador citrato 1X (109, mM ácido cítrico, 198 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 4,5). Se utilizaron sueros controles negativos y positivos de pacientes previamente analizados por el método de *Crithidia luciliae*, con títulos en suero de anticuerpos que reconocen la doble cadena de ADN (ADNdc).

Se realizó el procesamiento estadístico con el programa SYSTAT 7 versión 7.0 Copyright 1999, SPSS Inc. Se empleó la estadística paramétrica (Análisis de Varianza, ANOVA).

## RESULTADOS

La Figura 1 muestra la corrida electroforética en gel de agarosa 0,8 %, de la molécula de ADN genómico humano obtenido en los laboratorios del CENIPBI según el método convencional del fenol: cloroformo: isoamilacohol. Los carriles del 1 al 4 muestran diferentes diluciones del ADN del fago lambda, aplicado como control de peso molecular. El carril 6 muestra el ADN genómico humano obtenido a partir de tejido prostático en los laboratorios del CENIPBI. Se puede observar en esta fotografía al gel teñido con bromuro de etidio en presencia de luz ultravioleta la integridad de la molécula de ADN obtenida. El análisis por espectrofotometría arrojó un grado de pureza 260/280 de 1,6 para el ADN humano.



**Figura. 1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa 0,8%. Las líneas 1-4 muestran la diluciones de un ADN recombinante del fago lambda. La línea 6, muestra el ADN genómico humano obtenido a partir tejido prostático hiperplásico**

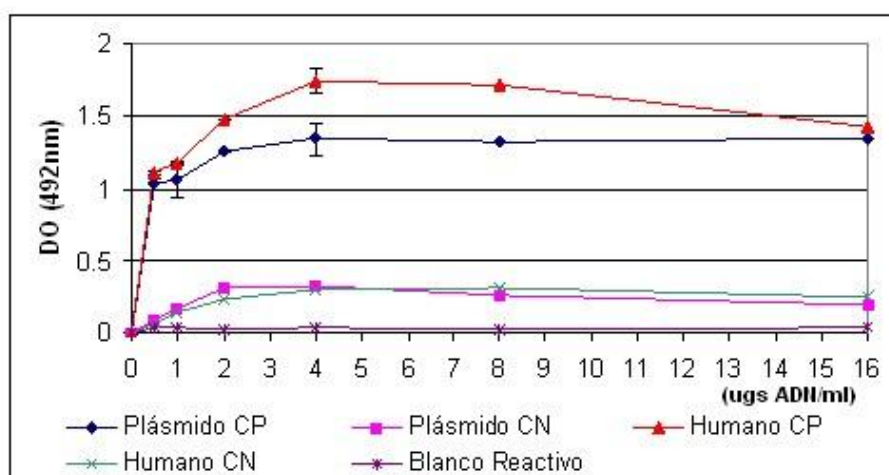
Las concentraciones de ADN se obtuvieron a partir de tejidos de varias especies animales, así como la relación 260/280 obtenida en cada caso. Tabla 1

**Tabla 1. Concentraciones y grado de pureza del ADN obtenido de diferentes especies, según la técnica convencional ensayada**

Especie	Concentración de ADN mg/ml	Relación 260/280
Pez	0,89	1,2
Reptil	0,22	1,6
Ratón	1,10	1,0
Humano	0,40	1,6

Puede observarse como la concentración del ADN expresadas en mg/ml varió entre 0,22 (especie de reptil) y 1,10 (ratones balb/c) y el grado de pureza según la relación 260/280 estuvo entre 1,0 y 1,6.

Con la finalidad de evaluar la utilidad del ADN purificado por el método descrito en el recubrimiento de los soportes sólidos empleados en los ensayos de ELISA, para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico, se compararon los ADN humano y plasmídico. La Figura 2 muestra el resultado del ELISA empleando diferentes concentraciones de ambos antígenos en el recubrimiento.



**Figura. 2. ELISA heterogéneo indirecto empleando diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 µg/ml) de ADN genómico humano y plasmídico. Se utilizaron sueros de controles negativos (CN) y positivos (CP) determinados por el método de *Crithidia luciliae* para detectar anticuerpos anti ADN dc en pacientes con LES. Los resultados se expresan como la media de las DO ± las desviaciones estándares de ensayos realizados en triplicados para  $p < 0,05$ )**

Como se observa, ambas moléculas alcanzan el punto máximo de recubrimiento en los 4 µgs/ml del antígeno específico, lo que se evidencia por los mayores valores de absorbancia obtenidos a 492 nm. Aunque se observan densidades ópticas ligeramente superiores con el ADN humano, estas no fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,710$ ).

## DISCUSIÓN

La revelación más importante de la genética molecular fue concebida en 1953, al ser descubierta la estructura de la molécula de ADN por los científicos Watson y Crick. Según Broker R<sup>9</sup> descubrimientos precedentes llevados a cabo por otros investigadores como Rosalind Franklin, Maurice Wilkins y Linus Pauling fueron sin lugar a dudas imprescindibles para lograr este importante hallazgo que revolucionó el campo de las investigaciones biológicas. Desde entonces, varios métodos de purificación utilizan perlas de cristal<sup>3</sup>, perlas magnéticas<sup>4</sup>, detergentes<sup>8</sup> o los juegos comerciales establecidos, con la finalidad de obtener una molécula cada vez más pura e íntegra, a partir de diversas fuentes como plantas<sup>2</sup>, hongos<sup>3</sup>, tejidos embebidos en parafina<sup>6</sup> y muestras de fósiles<sup>10</sup>. Los autores aíslan esta molécula con diferentes objetivos, que van desde los estudios relacionados a los procesos evolutivos de las especies<sup>10</sup>, hasta sus aplicaciones en las ciencias forenses<sup>11</sup> y en las ciencias biomédicas, fundamentalmente destinadas al diagnóstico de diversas enfermedades.<sup>5, 12</sup>

El objetivo del trabajo es evaluar la calidad de la molécula de ADN obtenida mediante el empleo de enzimas y solventes orgánicos para su uso en un método diagnóstico destinado a la pesquisa de una enfermedad autoinmune conocida como lupus eritematoso sistémico (LES), en la cual los pacientes presentan altos títulos de anticuerpos contra molécula de ADN propias del paciente. Por tal motivo, la conformación tridimensional de la molécula aislada por el método en estudio, debe brindar una molécula de ácido nucleico similar a la molécula nativa encontrada en los fluidos corporales del paciente. Los resultados obtenidos a partir de tejido prostático fueron satisfactorios y comparables a los obtenidos por un colectivo de autores que aíslan la molécula a partir de sangre periférica humana.<sup>13</sup> La comparación con una molécula de ADN plasmídico purificada por igual método, pero aplicando métodos cromatográficos posteriores al tratamiento con los solventes orgánicos, no brindó diferencias significativas en los resultados, evidenciados por los valores de absorbancia, lo cual sugiere que los mismos no realizan interferencia en la reacción de reconocimiento antígeno anticuerpo que tiene lugar sobre el soporte sólido empleado (placas de poliestireno).

Los métodos de purificación evolucionan significativamente hacia métodos más rápidos y eficaces adquiriendo nombres comerciales entre los que se encuentran Quiagen, Wizard y Promokine, los cuales son comercializados por prestigiosas compañías. No obstante, el método convencional basado en la degradación enzimática del tejido con enzimas (Pronasa o Proteinasa K), seguida del tratamiento con solventes orgánicos como el fenol:cloroformo, aunque laborioso, es utilizado con buenos resultados por otros autores.<sup>14, 15</sup>

Por otra parte, estos resultados demuestran que el método convencional empleando solventes orgánicos, brinda una molécula con un grado de pureza entre 1,0 y 1,6 según la relación

260/280, valores comparables a los obtenidos en la literatura por otros autores que emplean otros métodos para el aislamiento del ADN. <sup>6</sup> Como conclusión el método al emplear fenol:cloroformo y alcohol isoamílico es factible en la obtención de una molécula de ADN humana, utilizable como antígeno de recubrimiento en el ensayo inmunoenzimático destinado al diagnóstico del LES, método que actualmente se encuentra en etapa de estandarización en el CENIPBI.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología Celular y Molecular. 4ta Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2002.
2. Ribeiro R, Lovato M. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Gent Mol Res* 2007; 6(1):173-187.
3. Melo SC, Pungartnik C, Cascardo JC, Brendel M. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis pernicioso*. *Genet mol res* 2006; 5(4):851-855.
4. Ki JS, Chang KB, Roh HJ, Lee BY, Yoon JY, Jang GY. Direct DNA isolation from solid biological sources without pretreatments with proteinase-K and/or homogenization through automated DNA extraction. *J Biosci Bioeng* 2007; 103(3): 242-6.
5. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA, Silis G, Gharavi AE, Moutsopoulos HM. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5(3):247-9.
6. Simonato LE, García JF, Nuñez S, Cárís MM, Glauco I. Evaluation of two methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for PCR amplification. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43(2):121-7.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2da Ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
8. Kumar O, Sharma M, Singh D. DNA isolation from goat blood using different brands of household detergents and its downstream application. *Indian J Exp Biol* 2006; 44(10): 852-4.
9. Brooker RJ. Genetics, Analysis and Principles 2da Ed. New York: McGraw Hill Publishers; 2005.
10. Mulligan CJ. Isolation and analysis of DNA from archaeological, clinical, and natural history specimens. *Methods Enzymol* 2005; 395: 87-103.
11. Remualdo VR, Oliveira RN. Potencial de análise forense do DNA de diferentes amostras biológicas / The forensic analysis potencial do DNA from different biologicals samples. *Rev Assc Paul Cir Dent* 2005; 59(6):421-4.
12. Martínez G. Nuevos métodos diagnósticos para virus herpes simplex (HSV): importancia de la serología. *Rev. Chil. Dermatol.* 2001; 17(4):278-80.
13. Suárez Román G, González Griego AM, Fernández Romero T, González Ramírez VE. Determinación de anticuerpos IgG contra el ADN de doble cadena mediante ELISA utilizando como recubrimiento ADN xenógeno y alógeno. *Rev Cub Invest Bioméd* 2007; 26(4): 22-34.

14. Molina NB, Polverino D, Minvielle MC, Apezteguía M, Aguilar M, Basualdo JA. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Parasitol Latinoam 2006; 61(3/4):133-7.

15. Hernández O. Effect of temperature on the posttranscriptional processing of VP1 intrón from SV40 used in expression vectors transfected in fish cells. Biotecnología Aplicada 2004; 21(4):121-4.

Recibido: 3 de octubre de 2008.

Aceptado: 21 de noviembre de 2008.

*Dr. Oscar Hernández Betancourt*. Dr. C. Biológicas. Titular. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey. Cuba.