

Comunicación corta

Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH

Zoraya De Guglielmo*, Maira Ávila, Andreína Fernandes, Dayahíndara Veitía, María Correnti

Instituto de Oncología y Hematología-Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela.

Recibido 5 de junio de 2012; aceptado 12 de diciembre de 2012

Resumen: En el presente trabajo se llevó a cabo la extracción de ADN de biopsias cervicales con informe citológico de lesión intraepitelial cervical, incluidas en bloques de parafina, utilizando el “QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN, Alemania) y la detección del Virus de Papiloma Humano (VPH). En el procedimiento original se eliminó la incubación en xilol, reduciendo los lavados del material biológico; la calidad de los ADNs extraídos fue probada mediante PCR para la detección del gen de la β -globina y del VPH, obteniéndose 84,3% y 28,1% de positividad, respectivamente. Estos resultados fueron comparables a los de otros trabajos similares y evidencian la obtención de ADN celular amplificable por PCR a partir de muestras parafinadas, que pudo ser utilizado eficientemente en procedimientos moleculares, eliminando la toxicidad del xilol y disminuyendo la manipulación del material biológico al reducir los lavados.

Palabras clave: bloques de parafina, extracción de ADN, PCR, VPH.

DNA extraction from paraffin embedded samples without using xylene for HPV detection and typing

Abstract: In the present study, DNA from cervical biopsies with a cytological report of intraepithelial cervical lesion and embedded in paraffin blocks was extracted using the “QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN, Germany), and the Human Papyloma Virus (HPV) was detected. In the original procedure, the xylene incubation was eliminated, therefore reducing the washes of the biological material; the quality of the DNA extracted was tested by PCR for detecting the β -globine gene and HPV, with 84.3% and 28.1% positivity, respectively. These results were comparable to those of other similar studies, and they demonstrate that it is possible to obtain PCR amplifiable cellular DNA from paraffin embedded samples which can be used efficiently for molecular procedures, eliminating xylene toxicity, and decreasing the manipulation of the biological material by reducing washes.

Keywords: paraffin blocks, DNA extraction, PCR, HPV.

* Correspondencia:
E-mail: zdegugli@gmail.com

Introducción

La fijación de tejidos en formalina y su inclusión en bloques de parafina (FFPE) es un método estándar para la preservación a largo plazo de especímenes de distintas patologías, lo que ha permitido establecer bancos de tejido en todo el mundo. Estos bancos son fuente invaluable de material para la realización de estudios genéticos y moleculares traslacionales de cáncer y otras enfermedades que aquejan a la humanidad [1]. Así, la obtención de ADN a partir de tejidos humanos preservados puede ser la base de numerosos procedimientos experimentales que incluyen estudios epidemiológicos y pruebas moleculares como

reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), análisis de restricción, polimorfismo, microarreglos y secuenciación para la evaluación de cambios genéticos relacionados a procesos oncogénicos raros o al éxito de quimioterapias [2]. Sin embargo, este material preservado presenta algunas desventajas; la parafina es una barrera física y el formaldehído (componente activo de la formalina) promueve la generación de entrecruzamiento (“cross-linking” en inglés) entre ácidos nucleicos y proteínas, lo que ocasiona inconvenientes durante la extracción de ADN e inhibe la PCR. Además, las condiciones en el proceso de fijación, especialmente el pH extremadamente bajo, y la excesiva manipulación durante la extracción limitan la

amplificación de ADN de alto peso molecular [2]. Dada la importancia de la extracción de ADN amplificable por PCR a partir de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina, se han realizado esfuerzos considerables para optimizar métodos que permitan dicho procedimiento. En este contexto, en el presente estudio se planteó realizar la extracción de ADN de muestras cervicales, con diagnóstico de lesión intraepitelial cervical, preservadas en bloques de parafina, utilizando un estuche comercial, incorporando modificaciones realizadas en el laboratorio para optimizar la obtención de material amplificable por PCR a partir de este tipo de muestras biológicas, reduciendo las desventajas que presentan.

Materiales y métodos

Este trabajo forma parte de las pruebas realizadas en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología-MPPS para simplificar procedimientos y mejorar la calidad del material genético extraído usado en estudios a corto y largo plazo sobre VPH y procesos oncogénicos.

Material biológico: se estudiaron 32 muestras en bloques de parafina de pacientes que asistieron al Servicio de Ginecología de la Maternidad Concepción Palacios de Caracas, entre octubre de 2008 y enero de 2009, con informe citológico de lesión intraepitelial cervical de bajo (LIEBg) y alto grado (LIEAg), de las cuales 58,8% correspondió a LIEBg y 41,2% a LIEAg. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado avalado por el Comité de Bioética del centro hospitalario.

Extracción de ADN: De cada bloque se utilizaron 3 cortes o secciones de 5µm de grosor, los cuales fueron colocados en una placa de Petri. Luego, se retiró la mayor cantidad posible de parafina con la ayuda de un bisturí y se colocó el material dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La extracción de ADN se realizó con el "QIAamp DNA mini kit" (QIAGEN, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante, con las siguientes modificaciones:

- Se eliminó la incubación en xilol.
- Los cortes colocados en un tubo Eppendorf de 1,5 mL fueron incubados directamente en el buffer ATL del estuche más proteínaasa K.
- Esta incubación se mantuvo toda la noche a 65 °C con agitación a 1400 rpm, en lugar de los 56 °C, sin agitación, durante 3 horas, recomendados por el fabricante.

Evaluación de la calidad del ADN extraído: se realizó la técnica de PCR para amplificar el gen de la β-globina como control interno de la reacción con los iniciadores PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') y GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'), y un fragmento del gen L1 de VPH con los iniciadores genéricos MY09 (5'-CGTCCAAGAGGATACTGATC-3') y MY11

(5'-GCACAGGGACATAATAATGG), según un protocolo descrito previamente, donde se generan productos de amplificación de 268 pb y 450 pb, respectivamente [3]. El control positivo consistió en ADN de VPH. Se incluyeron, además, dos controles negativos; uno consistió en mezcla de reacción más ADN de individuo sano donde solo se observaría la banda correspondiente al control interno (gen de β-globina) y otro donde el ADN fue sustituido por agua destilada estéril en el que no debía observarse producto de amplificación. Aproximadamente 1 µg del ADN extraído fue añadido a la mezcla de reacción [0,4 µL dntp's (100 mM); 0,2 µL de cada primer (100 mM); 6 µL de buffer Taq 10X; 4 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL (2,5 U) de Taq DNA polimerasa (Invitrogen); H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 40 µL] y amplificado en un termociclador "Mini cyclor" MJ Research mediante el uso del siguiente programa: 94 °C durante 4 min, 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 45 seg a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C.

La tipificación viral se realizó mediante PCR múltiple con el estuche comercial "MPCR Kits for Human Papillomaviruses" de Maxim Biotch, Inc., siguiendo las indicaciones del fabricante, que permite tipificar los tipos 6 y 11 de bajo riesgo, con bandas de 263 pb y 144 pb, y los tipos 16, 18 y 33 de alto riesgo oncogénico, con bandas de 601 pb, 360 pb y 413 pb respectivamente.

Los resultados de ambas amplificaciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, buffer TBE 1X, tinción con bromuro de etidio (0,2 µL de solución al 1%) y exposición a luz UV (transiluminador) para registro fotográfico.

Resultados y discusión

Como se observa en la tabla 1, 27/32 muestras (84,4%) presentaron la banda de 268 pb correspondiente al control interno (gen de β-globina), la cual no se observó en las 5 muestras restantes (15%). Dentro del 84,4% de muestras que amplificó el control interno, 56,3% (18/32 muestras)

Tabla 1. Amplificación del gen de β-globina y detección y tipificación de VPH.

| | VPH | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Nº muestras positivas | Nº muestras negativas |
| β-globina | Nº muestras positivas | 9/32 (28,1%) |
| | Nº muestras negativas | 18/32 (56,3%) |
| Tipificación viral | Tipo 6 | 3/9 (33,3%) |
| | Tipo 11 | 1/9 (11,1%) |
| | Tipos 6 y 11 | 3/9 (33,3%) |
| | Tipos 6 y 16 | 1/9 (11,1%) |
| | Tipos 11 y 16 | 1/9 (11,1%) |

fue negativo en la detección de VPH, mientras que 28,1% (9/32) fue positivo en dicha detección (Figura.1). Todas las muestras positivas presentaron ADN viral de bajo riesgo oncogénico (VPH tipos 6 y/u 11) y en dos muestras hubo infección mixta con ADN viral de bajo y alto riesgo oncogénico (tipos 11 y 16 ó 6 y 16) (Figura 2).

Los métodos utilizados rutinariamente para extracción de material genético a partir de muestras parafinadas consisten principalmente de tres pasos: la desparafinación (que generalmente se hace con xilol), digestión y purificación. Estos métodos incluyen la extracción fenol-cloroformo,

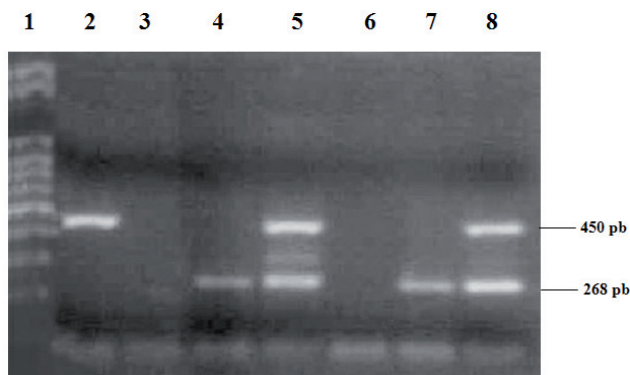


Figura 1. Detección del Virus de Papiloma Humano mediante PCR. 1: marcador de peso molecular (100 pb); 2: control positivo con la banda de 450 pb correspondiente al fragmento amplificado del genoma viral; 3: control negativo (agua destilada); 4: control negativo (ADN de individuo sano); 5-8: muestras en estudio. Los carriles 5 y 8 corresponden a muestras positivas donde se observan las bandas esperadas para el control interno (268 pb) y el genoma viral (450 pb). El carril 7 corresponde a una muestra negativa, por lo que solo se observa la banda del control interno. En la muestra del carril 6 no hubo amplificación, lo que sugiere que el ADN obtenido no era adecuado para amplificación por PCR.

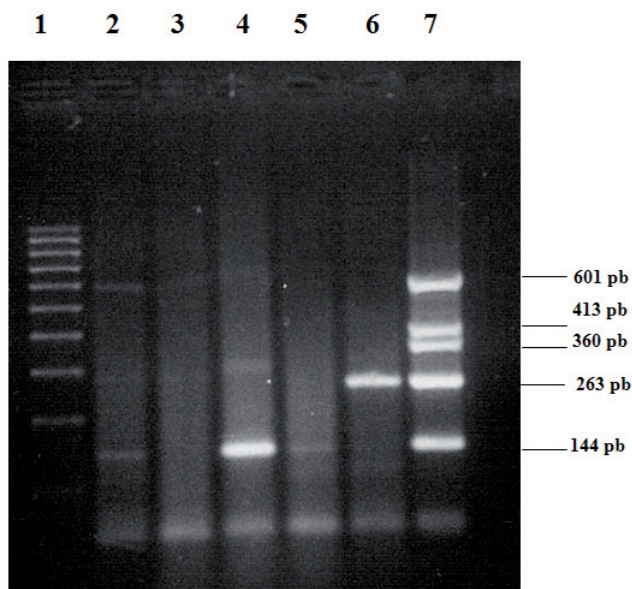


Figura 2. Tipificación del Virus de Papiloma Humano mediante PCR múltiple. 1: marcador de peso molecular (100 pb); 2-6: muestras en estudio positivas en la detección de VPH; 7: control positivo donde se observan las bandas de 144, 263, 360, 413 y 601 pb correspondientes a los tipos 11, 6, 18, 33 y 16 respectivamente. Los carriles 5 y 6 corresponden a infecciones sencillas con VPH de bajo riesgo, mientras que los carriles 2,3 y 4 corresponden a infecciones mixtas.

que usa compuestos tóxicos y es relativamente laboriosa, el método de salting-out, en el cual la remoción de proteínas y otros contaminantes puede ser ineficiente, y los kits o estuches comerciales, que varían en costos y en el principio de purificación de los ácidos nucleicos [4,5]. Algunos estudios no reportan diferencias en cuanto a la eficiencia de estos procedimientos [6]; sin embargo, resaltan la toxicidad de los compuestos utilizados (por ejemplo, xilol, cloroformo y fenol), el tiempo que consumen y, en algunos casos, una limitante para la utilización de estos métodos es el precio elevado.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los de otros trabajos, se observa que el porcentaje de amplificación del control interno (84,4%) fue mayor o similar que con el uso del protocolo estándar de xilol/fenol-cloroformo (69%-85%) y del estuche comercial con la incubación en xilol (52,9%-75%) [7-8]. Este porcentaje es ligeramente inferior al reportado por Fernandes y col, quienes obtuvieron un 98% al extraer ADN de tejidos parafinados utilizando un estuche comercial que excluye el xilol, basado en perlas magnéticas que, además, es muy costoso y requiere de equipo especial [9]. Por otra parte, Steinar *et al*, reportaron que el tratamiento de desparafinación por calor excluyendo la purificación con xilol, no solo resulta en mayor rendimiento de ADN, sino que además incrementa la sensibilidad en la detección de VPH, debido a que favorece la obtención de ADN celular amplificable por PCR [10].

De esta manera, en el presente trabajo se llevó a cabo la desparafinación de tejidos y la extracción de ADN amplificable por PCR a partir del material desparafinado, que pudo ser utilizado eficientemente en procedimientos moleculares, combinando un estuche comercial con la remoción de parafina mediante incubación de la muestra parafinada a alta temperatura sin el uso de xilol, compuesto químico altamente tóxico y nocivo para la salud. Además, su uso requiere pasos sucesivos de centrifugación que pueden resultar en la pérdida de piezas de tejido junto con la parafina. En consecuencia, al eliminar la incubación con xilol, se reducen los riesgos para la salud, se reduce la manipulación del ADN y se incrementa el rendimiento de la extracción del material genético. Al hacer la purificación mediante columnas con resinas iónicas se elimina, además, el uso de fenol-cloroformo, que también son sustancias tóxicas; el empleo de estas columnas no requiere sistemas o soportes especializados y es menos costoso que otros métodos comerciales, como los que involucran perlas magnéticas. Cabe destacar que si bien en el presente estudio se realizó la extracción de ADN para detección y tipificación de VPH, dicho procedimiento puede ser utilizado con otros propósitos.

En conclusión, el estudio realizado logró la extracción de ADN amplificable por PCR a partir de muestras incluidas en parafina, simplificando el protocolo original y reduciendo la manipulación del material genético, así como los riesgos para la salud del investigador al eliminar el uso de xilol, lo cual es de interés desde el punto de vista de la

bioseguridad.

Referencias

1. Shi S, Cote R, Wu L, Cheng L, Datar R, Shi Y *et al.* DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: Heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:1005-11.
2. Lin J, Kennedy S, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz J, Xu A *et al.* High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem.* 2009; 395:265-7.
3. Correnti M, Uribe M, Cavazza M, Bajares M, Bedlo J, Cerruti R y col. Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. *Rev Ven Oncol.* 1997; 9:76-83.
4. Cao W, Hashibe M, Rao J, Morgenstern H, Zhang Z. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev.* 2003; 27:397-404.
5. Noguera N, Tallano I, Bragos A, Milani A. Modified salting-out method for DNA isolation from newborn cord blood nucleated cells. *J Clin Lab Anal.* 2001; 14:280-3.
6. Mirmomeni M, Majd S, Sisakhtnezhad S, Doranegard F. Comparison of the three methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *J Biol Sci.* 2010; 10:261-6.
7. Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, García F, Dikshit R, Boffetta P *et al.* Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology.* 2007; 39:345-8.
8. Hegi N, Diserens A, Gorila T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Eng J Med.* 2005; 352:997-1003.
9. Fernandes A, De Guglielmo Z, Veitia D, Ávila M, Correnti M. Estandarización de un protocolo para la evaluación de la calidad del ADN extraído de muestras embebidas en parafina. Libro de resúmenes de las Jornadas de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias-UCV. 2010; Salud-104:441.
10. Steinar M, Patel S, Unger E. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn.* 2011; 13:377-81.