

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Desarrollo de Métodos de Extracción de ADN en Saliva,
Frotis Bucal y Sangre Fijada en Papel Filtro Utilizando
Detergente Comercial**



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

CIENCIAS NUTRICIONALES

Presenta:

Dulce Carolina Lugo Gil

Ciudad Obregon, Sonora

Abril de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas por ser el principal pilar en mi vida y darme su apoyo para la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis Dra. Luz Angelica Ávila Villa por todo el esfuerzo y tiempo de trabajo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Joel Arias Martínez por sus comentarios acertados y el conocimiento brindado.

Al M. C. Ramón Gertrudis Valdez Melchor por una gran retroalimentación.

A la M. C. S. Brianda Ioanna Armenta Guirado por sus apropiados consejos.

A la Universidad de Sonora por darme una buena formación como Licenciada en Ciencias Nutricionales.

A Mario Oximea por auxiliar durante su servicio social.

Al Dr. Roberto Rodríguez Ramírez, M. C. Gabriel Amilcar Barco Mendoza y M. C. Juan Bautista Flores Quezada por darme el espacio para realizar parte de esta tesis en el Laboratorio de Biotecnología y Trazabilidad Molecular de los Alimentos.

A mi mejor amigo Rogelio por apoyarme siempre.

DEDICATORIAS

Por todo el apoyo y amor incondicional que siempre me han dado, dedico esta tesis a mis dos hermanas Crisel y Rocio, y a mis padres Arnulfo y Patricia.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
HIPÓTESIS	4
ANTECEDENTES	5
Procedimientos de Extracción de ADNg	7
Utilización de Detergentes Comerciales para la Extracción de ADNg	10
Fuentes de ADN	11
Folículo Capilar	11
Uñas	11
Sangre	12
Sangre periférica	12
Sangre fijada en papel filtro	12
Saliva	13
Saliva fresca	13
Frotis bucal	14
Enjuague bucal	14
Almacenamiento de Muestras Biológicas	15
Almacenamiento de Sangre	15
Almacenamiento de Saliva	15
METODOLOGÍA	17
Obtención de Muestras	17
Sangre Fijada en Papel Filtro	17
Saliva	18
Frotis Bucal	18
Extracción de ADNg Total	19

Extracción en Muestras de Sangre Fijada en Papel Filtro	19
Extracción en Muestras de Saliva y Frotis Bucal	20
Determinación de la Concentración y Calidad de ADNg Total Extraído	20
Análisis Estadístico	21
Amplificación de un Gen Constitutivo por PCR a	
Partir del ADNg Total Extraído de Saliva	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Obtención de Muestras	23
Determinación de la Concentración y Calidad de ADNg Total Extraído	23
Amplificación de un Gen Constitutivo por PCR a	
Partir del ADNg Total Extraído de Saliva	27
CONCLUSIÓN.....	36
RECOMENDACIONES	37
REFERENCIAS	38
ANEXOS	42
Anexo 1. Buffer de Lisis Inicial para Saliva	42
Anexo 2. Buffer TE 10 mM	44
Anexo 3. Solución de Buffer de Lisis ACK	45
Anexo 4. Componentes de la Reacción de Amplificación del Gen IRF6 por	
PCR	46
Anexo 5. Electroforesis	49
Anexo 6. Buffer TAE	52

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Concentración y calidad de ADNg total extraído	24
2 Componentes para preparar buffer de lisis inicial para saliva	42
3 Componentes para preparar buffer TE 10 mM	44
4 Componentes para preparar buffer de lisis ACK	45
5 Componentes para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
6 Componentes para preparar buffer TAE 50X	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura de ADN	6
2 Procedimiento de extracción de ADN	8
3 Formación una burbuja de detergente y lípidos	10
4 Punción dactilar para recolección de muestras de sangre fijada en papel filtro	17
5 Recolección de muestras de saliva	18
6 Recolección de muestras de por frotis bucal	19
7 Visualización de la integridad de ADNg total a partir de muestras de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro	25
8 Concentración de ADNg extraído de diferentes muestras	28
9 Pureza de ADNg extraído de diferentes muestras	29
10 Productos de amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADNg total extraído de saliva	31
11 Productos de amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADNg total extraído de frotis bucal	32
12 Productos de la amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADNg total extraído de saliva y frotis bucal tratadas con proteinasa K	33
13 Productos de amplificación del gen IRF6 por PCR en muestras de ADNg de sangre fijada en papel filtro	34
14 Etapas del proceso de amplificación por PCR	48
15 Preparación de gel de agarosa 1% y electroforesis	51

RESUMEN

El ADN utilizado para análisis genéticos individuales y poblacionales provienen comúnmente de muestras de sangre periférica, que además de resultar una técnica costosa suele incomodar a los sujetos de estudio por su carácter invasivo y/o doloroso, derivado de ello se tiene la necesidad de generar una técnica de extracción de muestras, que no solo sea económica y rápida, sino que sea poco invasiva e indolora para los sujetos de estudio y útil para posteriores estudios, por lo cual en esta investigación se pretendió desarrollar métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) mediante el uso de una solución con detergente comercial 40 mg/mL posterior al paso de lisis, para la obtención de ADN de buena calidad y pureza, a partir de muestras de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro. Se desarrollaron protocolos de extracción de ADNg basándose en el método de Choi y col. (2014) para muestras de sangre fijada en papel filtro y el método de Quinque y col. (2006) para muestras de saliva y frotis bucal, siendo modificados al utilizar una solución de detergente comercial (40 mg/mL) a diferencia de proteinasa K posterior a la etapa de lisis en cada uno de los protocolos. El ADN obtenido fue analizado utilizando espectrofotometría, electroforesis y PCR. La saliva y frotis bucal como métodos no invasivos resultaron idóneos, debido a que hubo 65% más de participación por parte de los sujetos de estudio en comparación con la sangre fijada en papel filtro. La pureza del ADNg total extraído por medio del método de sangre fijada (43.4 ± 12.2 ng/ μ L) fue menor comparado a los obtenidos por el extraído de saliva (98.79 ± 72.03 ng/ μ L) y frotis bucal (53.76 ± 29.99 ng/ μ L). Los resultados mostraron la utilidad del empleo del método de extracción de ADNg total, indicando que el desarrollo del protocolo para muestras de sangre fijada en papel filtro, saliva y frotis bucal, resultó ser exitoso; logrando obtener una buena concentración de ADNg total en condiciones de pureza apropiadas como para permitir la reacción de amplificación del gen constitutivo IRF6 por PCR.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el ADN utilizado para análisis genéticos individuales ha sido derivado comúnmente de muestras de sangre periférica (Lum y Marchand, 1998; Bahlo y col., 2010), siendo ésta una excelente fuente de grandes cantidades de ADN (García-Closas y col. 2001). Para su obtención se requiere de personal capacitado y certificado para realizar el procedimiento de venepuntura, técnica invasiva y dolorosa, que generalmente no es de agrado para los individuos en estudio (Garbrieri y col., 2017).

Métodos menos invasivos son claramente preferibles para estudios epidemiológicos genéticos modernos que se hacen a gran escala, especialmente cuando se trata de niños, esto es con el fin de fomentar altas tasas de participación (Streckfus y Bigler, 2002; Milne y col., 2006).

La disponibilidad de técnicas moleculares sensibles tal como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), así como la demanda actual de pruebas de alto volumen requieren de un método no invasivo, sencillo y económico para la obtención de ADN (Lum y Marchand, 1998). Además las técnicas de recolección de muestras para la extracción de ADN genómico más utilizadas pueden llegar a incomodar a los sujetos de estudio por su carácter invasivo y/o doloroso.

Por lo tanto, se tiene la necesidad de generar una técnica de extracción de muestras, que no solo sea económica y rápida, sino que sea poco invasiva e indolora para los sujetos de estudio y útil para posteriores estudios. Una fuente alternativa para obtener ADN humano es la sangre fijada en papel filtro, ya que posee un menor costo que la sangre periférica y es menos invasiva (Choi y col., 2014). Otras alternativas son la saliva y el frotis bucal, los cuales en los últimos años han sido estudiados derivado de su potencial como muestras de diagnóstico, mostrándose como un método sencillo y menos invasivo en comparación con métodos tradicionales (Quinque y col., 2006; Streckfus y Bigler, 2002; Milne y col., 2006).

Posterior a elegir la fuente de obtención de ADN se debe seleccionar el método de extracción más apropiado con base a las necesidades del análisis genético, manteniendo así las características de un ADN purificado de alta calidad y concentración. Es de conocimiento general que el ADN se encuentra en el interior del núcleo celular, disperso, muy replegado y unido a proteínas formando la cromatina; para poder extraerlo es necesario romper las células y la membrana del núcleo con el fin de liberar el ADN y posteriormente separarlo de las proteínas mediante la precipitación de estas últimas. Esto se puede lograr a través de métodos estandarizados que utilizan mezclas de solventes

como fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y acetato de potasio, o bien a través de diversos kits comerciales disponibles en el mercado, que a pesar de tener un rendimiento positivo, posibilidad de amplificación y secuenciación del ADN extraído, resultan una alternativa costosa a pequeña y gran escala, además del riesgo que conlleva la utilización de reactivos tóxicos (Gardes y Bruns, 1993; Fraga y col., 2004).

Atendiendo a la problemática anterior, se han buscado alternativas que reduzcan los costos y que faciliten los métodos de extracción de ADN. Una de estas opciones es el uso de detergentes comerciales, ya que aparte de su función de remover materia orgánica, contiene enzimas como proteasas que sirven como reemplazo de la proteinasa K (agente que elimina proteínas contaminantes y que es comúnmente utilizado en protocolos de aislamiento de ácidos nucleicos). Existen estudios donde se sustituyó la proteinasa K con soluciones seriadas de detergente comercial en métodos de extracción de ADN a partir de sangre, mostrando resultados óptimos de concentración, pureza e integridad del ADN extraído al emplear soluciones con una concentración de detergente comercial entre 30-40 mg/mL, lo cual permitió la realización de estudios genético-epidemiológicos (Nasiri y col., 2005; García-Sepúlveda y col., 2010).

Dentro de este contexto, el presente trabajo pretende desarrollar métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) basándose en los protocolos de Choi y col. (2014) para muestras de sangre fijada en papel filtro y de Quinque y col. (2006) para muestras de saliva y frotis bucal, empleando a una solución de detergente comercial con concentración de 40 mg/mL (sustituyendo a la proteinasa K), posterior a la etapa de lisis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar métodos de extracción de ADNg a partir de muestras de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro mediante el uso de una solución de detergente comercial.

Objetivos Específicos

- Recolectar muestras de saliva y frotis bucal de personas con base al protocolo descrito por Quinque y col., 2006.
- Recolectar muestras de sangre fijadas en papel filtro con base al protocolo descrito por Choi y col., 2014.
- Estandarizar las condiciones de los protocolos de extracción de ADN de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro empleando una solución preparada con detergente comercial a una concentración de 40 mg/mL.
- Determinar la concentración y calidad del ADN extraído por espectrofotometría UV-Vis.
- Comprobar que el ADNg total extraído con los protocolos propuestos sea eficaz para la amplificación de al menos un gen constitutivo por la técnica de PCR.

HIPÓTESIS

Con base a métodos de extracción de ADN y el uso de una solución con detergente comercial a 40 mg/mL posterior al paso de lisis, se obtendrá suficiente concentración de ADNg de calidad a partir de muestras de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro.

ANTECEDENTES

La genética ha sido revolucionada en los últimos años por las técnicas de biología molecular, haciendo posible dilucidar complejas funciones fisiológicas a nivel del gen (Aranguren y col., 2005). Siendo el aislamiento del ADN el primer y más importante requisito para llevar a cabo un análisis genético. Este paso es tan importante en el diagnóstico molecular que el éxito del análisis subsiguiente depende del aislamiento de fragmentos de ADN puro, íntegro y concentrado, resultando fundamental para los estudios epidemiológicos que tienen como objetivo evaluar el papel de los factores genéticos en la susceptibilidad de las enfermedades humanas, tales como el sobrepeso/obesidad, síndrome metabólico, padecimientos relacionados con la resistencia a la insulina, dislipidemias, cardiopatías, osteoporosis, fibrosis quística, talasemia, entre otras (García-Closas y col. 2001; Hansen y col., 2007; Sanchez y col., 2012; Mark y McCarthy, 2010 ; Choi y col., 2014; Islam y Awan, 2014). Estos fragmentos también pueden utilizarse en estudios que exploran la interacción entre genes, nutrición y salud, donde por medio de un análisis genético es posible personalizar los requerimientos nutricionales de cada individuo (Ruemmele, 2012).

En particular el ADN está conformado estructuralmente por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice (Figura 1). Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Dundass y col., 2008).

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. También, los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. En cambio, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato, propiedad aplicada en los métodos de extracción para lavar el ADN de impurezas. Además, bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. (Sambrook y col., 1989). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse (o ser atraída) a moléculas

y matrices inorgánicas cargadas positivamente, particularidad utilizada en los métodos de extracción generales y comerciales, o bien para realizar análisis por electroforesis.

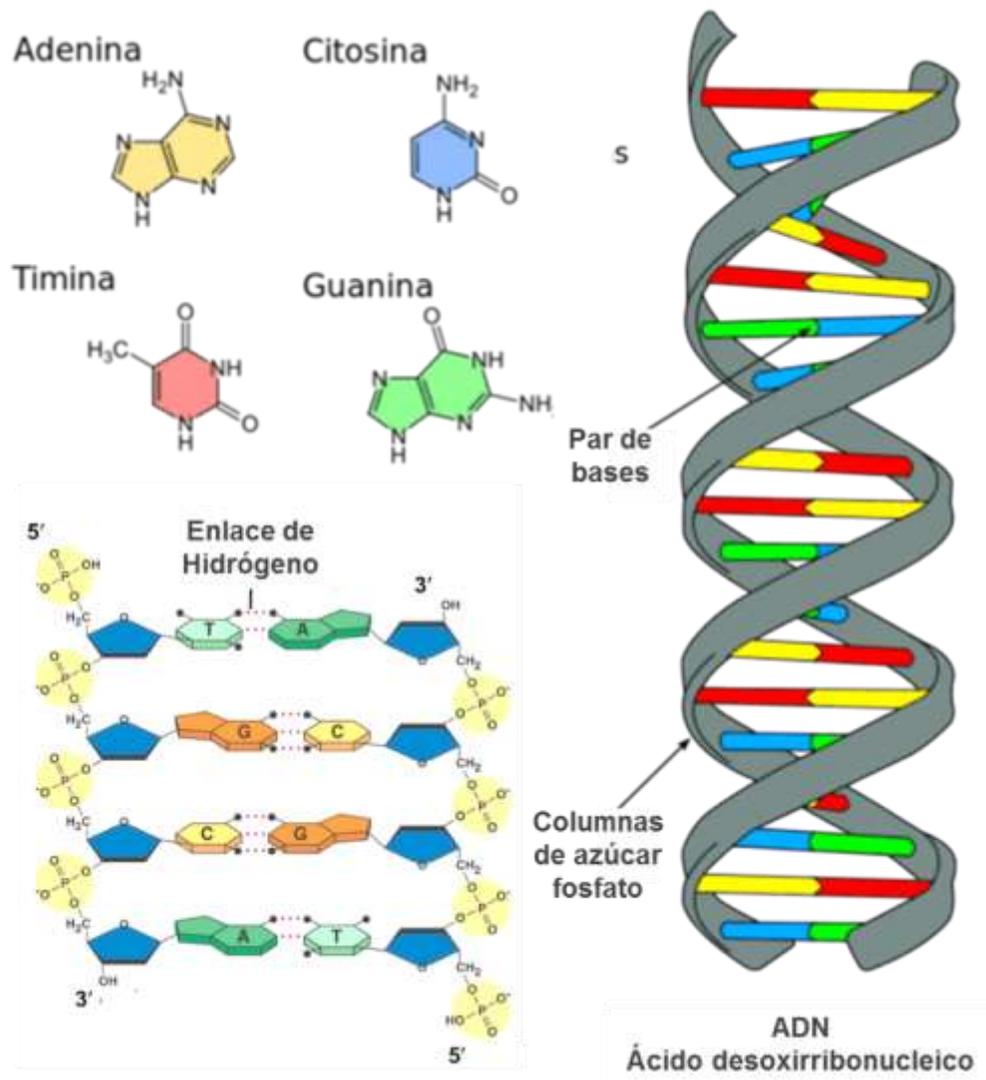


Figura 1. Estructura de ADN.

Procedimientos de Extracción de ADNg

El procedimiento de extracción de ADNg consiste en su aislamiento y purificación del resto de los componentes celulares y se fundamenta en las características fisicoquímicas de este ácido nucleico.

Partiendo de muestras de origen microbiano, tejidos de origen vegetal o animal, se han desarrollado a través de los años distintos procedimientos o protocolos con la finalidad de obtener una concentración y calidad de ADNg apropiada, además de asegurar la eliminación de inhibidores potenciales que impidan o dificulten el tratamiento posterior de esta molécula (Sambrook y col., 1989).

En la década de los años 50, los primeros métodos diseñados utilizaban solventes orgánicos como el fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para separar a las proteínas del ADN y una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y el proceso de la extracción puede tomar desde horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. A inicios de 1990, la limitante del tiempo de estos métodos se vio solucionada al introducir al mercado combos o kits de extracción que utilizan el mismo principio de matrices orgánicas a pequeña escala o matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente con capacidad de retener ADN (varios microgramos) y separarlo del resto de las biomoléculas, obteniendo un extracto libre de inhibidores (Alejos y col., 2014). Por mencionar algunos de los kits más comunes de purificación de ADN son: extracción orgánica (Easy-DNA® Kit Invitrogen), tecnología basada en sílica (Purelink Genomic DNA extraction kit Invitrogen, DNeasy Blood and Tissue Kit Qiagen), separación magnética (Agencourt DNAdvance Beckman Coulter, Magnetic Beads Genomic DNA Extraction Kit Geneaid), tecnología de intercambio aniónico (PureLink® HiPure Plasmid DNA Purification Kits Invitrogen, Qiagen plasmid mini/midi kits y Genomic-tip), precipitación por sales (salting out), entre otros.

Sin embargo, tanto los métodos de extracción de ADN tradicionales y comerciales (combos o kits) consisten de tres etapas principales: lisis celular, eliminación de proteínas y/o lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Figura 2).

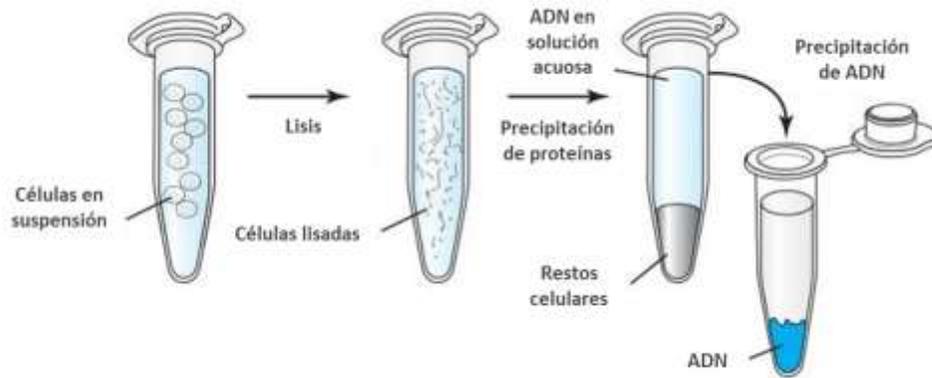


Figura 2. Procedimiento general de extracción de ADN.

Por ejemplo durante la extracción, el ADN cargado negativamente se adsorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible (unión no covalente) y se mantiene unido a ésta durante la remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, posteriormente la molécula se libera de la matriz. Los kits de extracción también incluyen soluciones de lisis, unión y lavado y alguno de éstos no contienen fenol y/o cloroformo para extraer proteínas y no requieren etanol para precipitar al ADN (Qiagen 2005, Invitrogen 2005). Los kits comerciales disminuyen el tiempo de la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las especificaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza del ADN (Qiagen 2005, Invitrogen 2005). Aunque estos combos o kits comerciales de extracción garantizan aislar ADN con alta pureza, integridad y concentración; varios trabajos han comparado estos kits, obteniendo ADN fuera de los rangos de pureza, integridad y concentración esperados a lo que documenta el proveedor (Garbrieri y col., 2017). Sin embargo, el factor decisivo para la utilización de estos kits *versus* los protocolos tradicionales dependerá de las necesidades en cuanto a sus fortalezas y los costos del protocolo para su empleo.

Independientemente que el método de extracción de ADN sea tradicional o comercial, el paso de lisis celular depende en gran medida del tipo de muestra que se va a procesar, mientras que en muestras como sangre, células, ciertos tipos de tejidos o saliva puede alcanzarse una eficiente lisis celular en tiempos relativamente cortos, en otros tipos de muestras como tejidos incluidos en parafina la lisis celular requiere de un tratamiento previo mucho más laborioso. Durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas permitiendo la liberación de los ácidos

nucleicos del núcleo celular, por lo que debe ser lo suficientemente riguroso para fragmentar el material de partida complejo (por ejemplo, sangre y tejido), pero lo suficientemente suave como para preservar el ácido nucleico. Los procedimientos comunes incluyen interrupción mecánica (molienda y lisis hipotónica), tratamiento químico (lisis por detergente y reducción de tiol) y digestión enzimática (lisis por proteasas). La lisis se lleva a cabo mediante una solución salina que suele contener detergentes que desnaturalizan las proteínas y/o proteasas. Una vez separados los ácidos nucleicos de las proteínas y lípidos se lleva a cabo su purificación donde los restos celulares pueden eliminarse fácilmente mediante filtración o precipitación.

En el proceso de purificación, después de llevar a cabo una correcta lisis, se lleva a cabo un proceso de centrifugación que permita obtener sólo la fase acuosa del ADN y separar las membranas. Las proteínas tienen que ser separadas con la finalidad de obtener solamente los ácidos nucleicos, esto se lleva a cabo tratando la muestra con fenol o con proteasas. A su vez, necesario separar el ARN del ADN mediante un tratamiento con ribonucleasas. Para comprobar la purificación del ADN extraído se llevan a cabo técnicas de electroforesis, y una vez que se alcanza el nivel de purificación adecuado, el ADN puede ser analizado y utilizado sin problemas de contaminación.

La calidad de las muestras de ADN obtenidas está determinada por la pureza, integridad y funcionalidad de las mismas. La pureza de la muestra está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm. La relación de las absorbancias A_{260}/A_{280} permite conocer si el ADN obtenido está contaminado por la presencia de compuestos aromáticos derivado de que éstos absorben a una longitud de onda de 280 nm; esta relación es muy estable y en general se considera que el ADN es de calidad óptima cuando la relación $260/280$ es mayor de 1.8. Una relación $A_{260}/280 > 2.1$ es indicativa de una presencia considerable de ARN en la muestra. Por el contrario, si esta relación es baja ($A_{260}/280 < 1.6$) la muestra está contaminada por proteínas, fenoles o alcoholes (Sambrook y col., 1989; Alejos y col., 2014).

La integridad del ADN extraído puede ser valorado por medio de la técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa (0.7 – 3% p/v). Si el ADN es integro mostrará una banda única perfectamente definida en la parte superior del gel de agarosa, mientras que una muestra degradada presentará un barrido o estela a lo largo del gel, la cual será más pronunciada cuanto mayor sea la degradación de la muestra.

La funcionalidad del ADN purificado es cerciorada por medio de la amplificación de un gen, ya que el hecho que la enzima ADN polimerasa pueda actuar sobre una muestra

de ADN como molde de la reacción de PCR es indicativo de que la pureza de la muestra es óptima. Por otro lado, dependiendo del tamaño del fragmento amplificado también se puede evaluar el grado de integridad de la muestra de ADN.

Utilización de Detergentes Comerciales para la Extracción de ADNg

Con la finalidad de reducir los costos, evitar el uso de solventes tóxicos y simplificar los métodos de extracción de ADN, se han buscado alternativas para reemplazar la enzima proteinasa K, ya que se ha utilizado desde 1970 como uno de los mejores agentes para la purificación de los ácidos nucleicos, cuya función radica en degradar a las proteínas contaminantes y nucleasas que pudiesen dañar la integridad del ADN (Nasiri y col., 2005; García-Sepúlveda y col., 2010).

Una molécula de detergente tiene la capacidad de romper la bicapa de fosfolípidos de las membranas plasmáticas y la envoltura nuclear, ya que descompone los lípidos de la membrana al deshacer las uniones que mantienen la membrana junta. Cuando el detergente entra en contacto con los lípidos, éstos se separan de la membrana rompiéndola; derivado de que la estructura de los lípidos es similar a la del detergente, permitiendo que se combinen y formen una burbuja de detergente y lípidos (Figura 3). Además, algunos detergentes en el mercado contienen enzimas como proteasas y/o celulasas que sirven como sustituto de proteinasa K, enzima que rompe las membranas y degrada proteínas.

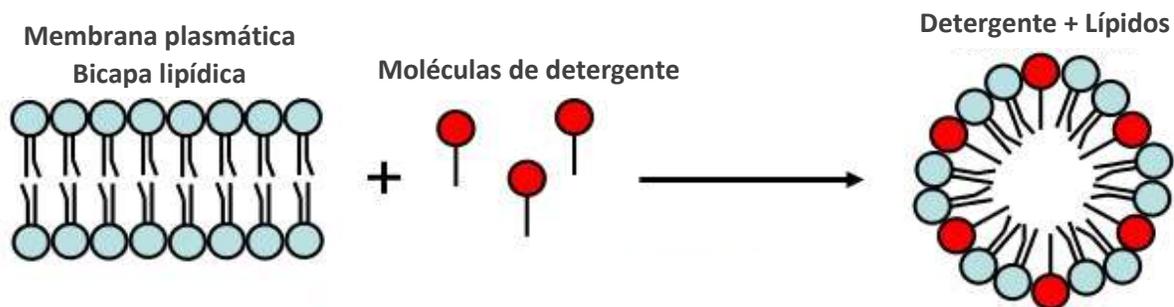


Figura 3. Formación una burbuja de detergente y lípidos.

Nasiri y col. (2005), partiendo de muestras de sangre periférica obtuvieron ADNg con características óptimas de pureza, integridad y concentración mediante el uso de soluciones con una concentración de detergente comercial entre 30-40 mg/mL con base a su protocolo de extracción. Cabe mencionar, que el emplear una solución de detergente comercial reemplazando la función de proteinasa K no ha sido probado en muestras de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro.

Fuentes de ADNg

La extracción de ácidos nucleicos, en particular de ADN, puede ser a partir de microorganismos como bacterias, hongos, virus, parásitos, entre otros; así como del núcleo de organismos superiores (plantas, animales y humanos). Entre éstos últimos, se ha extraído ADNg a partir de algún tejido o células, en específico para llevar a cabo una amplia variedad de investigaciones sobre análisis genéticos, diagnóstico de enfermedades, estudios epidemiológicos, etc. Para llevar a cabo estos estudios en humanos, a continuación se hace mención de las fuentes más comunes para extraer ADNg.

Folículo Capilar

El cabello humano es uno de los materiales biológicos más comunes asociados con las investigaciones legales y se ha utilizado para el trabajo de población basado en estadísticas y análisis del ADN en criminología. Esto es posible cuando la porción de raíz (folículo capilar) del pelo y/o tejido adherente está presente (Ghatak y col., 2013). Mientras que el núcleo se degrada a medida que el cabello endurece durante la queratinización, tanto las mitocondrias como su ADN permanecen relativamente intactos, haciendo posible el análisis (Graffy y Foran, 2005). Por desgracia, la naturaleza rica en proteínas de las muestras de pelo requiere pasos adicionales para romper el eje y liberar el ADN, exponiendo así la muestra a un riesgo incrementado a contaminación (Ghatak y col., 2013).

Uñas

El ADNg puede extraerse exitosamente a partir de uñas recortadas, este material puede ser de elección debido a su relativa resistencia a la putrefacción, así como la comodidad que podría existir por parte del donante en comparación con el muestreo de sangre, debido

a que es un método simple y no invasivo. Sin embargo, las uñas en sí mismas no sirven para extraer ADN, sino las células de la piel que se quedan adheridas a ellas, por lo que si estas no encuentran presentes no es posible la extracción (Cervantes, 2003; Yoshida y col., 2010).

Sangre

Esta fuente presenta diversidad de opciones:

Sangre periférica. La sangre es el espécimen de elección para la obtención de ADN genómico en la mayoría de los estudios epidemiológicos a gran escala debido a que proporciona grandes cantidades de células que contienen no sólo ADN, sino también una gama de agentes fisiológicos (Hansen y col., 2007; Van-Wieren-de-Wijer y col., 2009). Sin embargo, la venepunción puede ser una experiencia dolorosa e invasiva, además de requerir personal capacitado para su recolección, aunado a que tiene la posibilidad de transmitir enfermedades y pueden existir barreras culturales para extraer la sangre, resultando difícil el ejercer la acción, reduciendo así la tasa de participación por parte de los sujetos en estudio (Hansen y col., 2007; Ghatak y col., 2013; Garbrieri y col., 2017).

Además, la sangre resulta ser un método económicamente menos factible ya que se requiere personal calificado para su recolección y un cuidado excepcional al enviar muestras de sangre de diferentes lugares (Van-Wieren-de-Wijer y col., 2009). Al mismo tiempo, el ADN en la sangre extraída se degrada rápidamente por efecto de la temperatura, y generalmente debe procesarse aproximadamente siete días después del almacenamiento (Garbrieri y col., 2017).

Sangre fijada en papel filtro. Las muestras de sangre fijada en papel filtro se pueden obtener de manera muy sencilla, sin la necesidad de venepuntura, tan solo con una punzada en el dedo o en talón. El uso de papel filtro comenzó en el campo del diagnóstico para el cuidado del cribado neonatal en 1960 por la tarjeta Guthrie para tamiz neonatal, utilizando pruebas genéticas y metabólicas, evolucionando hasta su utilización en todo tipo de población para análisis genéticos, esto debido a sus múltiples ventajas con respecto a los costos, siendo más económica que la venepunción además de ser un método más práctico, ético y mayormente aceptado en entornos clínicos y no clínicos (Chacon y col., 2012; Osorio y Col., 2013; Choi y col., 2014).

Es un método adecuado para estudios epidemiológicos en áreas tropicales y áreas que carecen de infraestructura adecuada y una cadena de frío para el transporte y almacenamiento de muestras. Además de que las muestras pueden ser transportadas de manera muy sencilla y con poco riesgo biológico (Hollegaard y col., 2011; Hailemariam y col., 2017).

Por otro lado, comparado con la venepunción se requiere un volumen de sangre mucho más pequeño, obteniendo rendimientos desde los 40 μL (Mas y col., 2007). A su vez, se ha comprobado su viabilidad por PCR presentando un valioso y completo repertorio de genes (Choi y col., 2014).

Sin embargo, a pesar de ser un método simple con altos rendimientos se requiere de personal calificado durante la recolección para minimizar la fuente de error, ya que se precisa una colocación adecuada de sangre en papel filtro, se pueden introducir errores si se borra la sangre o si solo se unta una pequeña cantidad (Corran y col., 2008).

También se conoce que en la sangre, existen un gran número de predictores que afectan el rendimiento de ADN, tal como la edad, consumo diario de tabaco, colesterol de lipoproteínas de alta densidad, presión arterial sistólica, triglicéridos, historia de infarto agudo de miocardio y posiblemente diabetes mellitus (Van-Wieren-de-Wijer y col., 2009).

Otro factor importante a considerar es la presencia de iones ferrosos (Fe^{2+}) que compiten con los iones Mg^{2+} , que pueden inhibir las técnicas de PCR utilizadas en estudios moleculares (Garbrieri y col., 2017).

Saliva

Esta fuente también presenta varias opciones:

Saliva fresca. Estudios demuestran que las células epiteliales bucales extraídas por medio de la saliva son una fuente alternativa muy prometedora de ADN, por ser un método de bajo costo, además de ser no invasivo y rápido, resultando así más cómodo para el sujeto de estudio (García-Closas y col. 2001; Mulot y col., 2005; Hansen y col., 2007).

Cabe mencionar que la recolección de saliva se puede hacer por el propio individuo sin la ayuda de un profesional, pudiendo ser recolectada desde casa, ya que gracias a su viabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente se ha comprobado que se puede recolectar la muestra por correo, además de no tener posibilidad de transmitir enfermedades (Etter y col., 2005; Bahlo y col., 2010).

A su vez, estudios con saliva para la extracción de ADN tienen mayor tasa de participación, tal como muestra un estudio realizado con enfermeras danesas, el cual mostró una tasa de respuesta notablemente mayor en el reclutamiento de muestras de ADN de saliva *versus* sangre (el 72% frente al 31% de los participantes invitados devolvieron las muestras de saliva y sangre, respectivamente). Estas diferencias en la respuesta provienen de una variedad de cuestiones, incluyendo el compromiso requerido para proporcionar sangre al asistir a una clínica y la incomodidad o incapacidad para someterse a una flebotomía (Bahlo y col., 2010).

Adicionalmente, se conoce que el movimiento de las células epiteliales en la boca es bastante grande, sustituyéndose la capa superficial de las células epiteliales en promedio cada 2.7 horas (Garbrieri y col., 2017), lo que sugiere que es más que probable obtener una muestra de saliva con ADN en perfectas condiciones. Incluso se encontró que al menos el 58% de las células epiteliales presentes en muestras de saliva resultan ser viables con ADN intacto (Garbrieri y col., 2017).

Frotis bucal. El aislamiento del ADN utilizando hisopos bucales proporciona muchas ventajas, tales como procesamiento rentable, menor requerimiento de volumen de muestra, almacenado a largo plazo y la idoneidad de auto-recolección. También, es más cómodo para el paciente y los hisopos bucales proporcionan suficiente ADN para hacer PCR, debido a que exige sólo unos pocos nanogramos de ADN (Ghatak y col., 2013). Aparte de la saliva, los frotis bucales constituyen otra alternativa no invasiva de mayor rendimiento a la sangre entera, ya que dos frotis bucales pueden proporcionar alrededor de 5-15 μg de ADN metagenómico, aportando así la cantidad suficiente para estudios genéticos poblacionales estándar. Sin embargo, este rango de concentración no bastaría para genotipar miles o incluso millones de marcadores moleculares (Hinds y col., 2005). También se sabe que estudios donde se utilizan diferentes tipos de frotis bucales, es decir, hisopos de algodón o cito cepillos, han obtenido rendimientos similares de ADN y tasas de éxito de PCR (García-Closas y col., 2001).

Enjuague bucal. El método de enjuague bucal para la recolección de ADN es un método simple, barato, no invasivo y puede utilizarse en una variedad de entornos; además, se encontró que llega a proporcionar un mayor rendimiento y calidad que el frotis bucal y se cree que la cantidad de ADN recuperado mediante este método es más que suficiente para estudios genéticos (Van-Wieren-de-Wijer y col., 2009).

Se conoce que el ADN en enjuague bucal es estable durante periodos prolongados a temperatura ambiente (Etter y col., 2005). La desventaja de estas muestras reside en que los donantes necesitan agitar y escupir una solución de enjuague bucal que en su mayoría contiene alcohol, lo que puede llegar a resultar desagradable y causar una sensación de ardor en la boca (Hansen y col., 2007).

Además, en un estudio donde se evaluó la estabilidad de las muestras del enjuague bucal con solución salina almacenadas durante 7 días a temperaturas a las que es probable que estén expuestas las muestras si se recogen por correo, indicó que las muestras almacenadas a 25°C y 37°C tendían a tener mayores cantidades de ADN de alto peso molecular que las muestras almacenadas a temperaturas más bajas (20°C y 4°C), lo que sugiere la presencia de ADN de origen bacteriano (García-Closas y col., 2001).

Almacenamiento de Muestras Biológicas

Almacenamiento de Muestras de Sangre

La recomendación general de almacenamiento para muestras de sangre fijada en papel filtro es de 20°C para evitar la degradación de ADN (Sjoholm y col., 2007). Sin embargo, se demostró que el almacenamiento de muestras a -80°C genera mayores rendimientos de ADN que las almacenadas a temperatura ambiente (Choi y col., 2014).

Por otro lado, muestras de sangre fijada en papel filtro almacenadas por hasta 26 años a temperatura ambiente mostraron que con un diámetro de 3mm, proporcionaron rendimientos de ADN de aproximadamente 30µg por mancha y a pesar de parecer un bajo rendimiento, la pequeña cantidad de ADN obtenido sigue siendo un excelente sustrato para para la amplificación del genoma completo y para el análisis de polimorfismos (Sjoholm y col., 2007).

Almacenamiento de Muestras de Saliva

Se ha comprobado que el almacenamiento de las muestras de saliva (sin procesar) a temperatura ambiente o a 37°C durante 1 semana, o bien a -20°C durante al menos 6 meses no afecta el rendimiento de ADN o la capacidad de PCR para amplificar las muestras (Ng y col., 2006). Incluso en muestras en enjuague bucal el ADN es estable durante periodos prolongados a temperatura ambiente (Etter y col., 2005).

Aun en estudios donde se manejan condiciones de almacenamiento menos que óptimas, la saliva sigue siendo una fuente útil de ADN. Incluso, el ADN extraído de alto peso molecular puede almacenarse hasta 5 años a temperatura ambiente de acuerdo con DNA Genotek (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canadá). Con esto se demuestra que la saliva es una fuente alternativa viable de obtener ADN genómico humano para estudios epidemiológicos genéticos.

METODOLOGÍA

Obtención de Muestras

Sangre Fijada en Papel Filtro

Las muestras de sangre fueron de origen capilar, las cuales se extrajeron por punción dactilar del dedo anular o medio (Figura 4), obteniéndose un consentimiento informado por parte de los donantes. La toma de esta muestra se inició con un ligero masaje en el sitio de la puntura para concentrar la sangre y posterior limpieza con alcohol etílico al 70%. Después, se sostuvo el área de puntura y se realizó la punción con una lanceta mediante un movimiento rápido y firme. Se presionó ligeramente el dedo para obtener la sangre y fijarla en papel filtro Whatman®, en la cual se depositó una porción de aproximadamente un centímetro de diámetro. Una vez obtenida la muestra, se colocó un algodón con alcohol sobre el área puncionada.



Figura 4. Punción dactilar para recolección de muestras de sangre fijada en papel filtro.

Posteriormente, la sangre absorbida en el papel filtro se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente, para después ser guardadas en bolsas plásticas con cierre hermético a -20°C , para su futuro tratado.

Saliva

Para la recolección de esta muestra, los donantes previamente tuvieron que realizar aseo bucal cotidiano sin posterior ingestión de alimentos. Se recolectó 1 mL de saliva de cada sujeto (Figura 5), la muestra se dividió en 2 alícuotas de 500 μ L en tubos de 1.5 mL. Cada alícuota se mezcló con un volumen igual de buffer de lisis inicial (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%; véase preparación en anexo 1) (Quinque y col., 2006). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.



Figura 5. Recolección de muestras de saliva.

Frotis Bucal

Se recolectaron muestras de células de la mejilla de los mismos donadores de las muestras de saliva. El frotis bucal se realizó con dos hisopos estériles (Whatman® estéril Omniswab, Fisher ScientiWc) por sujeto. Cada donante cepilló el interior de cada mejilla alrededor de 30 veces con cada hisopo estéril (Figura 6), después la cabeza de cada hisopo se sumergió en 1 mL de buffer de lisis mencionado en el apartado anterior.

Las muestras de saliva y frotis bucal fueron recolectadas el mismo día, obteniéndose un consentimiento informado por parte de los donantes.



Figura 6. Recolección de muestras de por frotis bucal.

Extracción de ADNg Total

Extracción en Muestras de Sangre Fijada en Papel Filtro

Cada muestra fijada en papel filtro se introdujo en un tubo estéril de 1.5 mL y se adicionó 500 μ L de agua MilliQ estéril para hidratar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el agua y se repitió este paso dos veces más. Después se adicionaron 500 μ L de buffer TE 10 mM (Tris-HCl 1 M, EDTA 0.5 M), más 100 μ L de buffer de lisis de eritrocitos ACK (NH_4Cl 15.5 mM, KHCO_3 1 mM, EDTA 10 mM) y 10 μ L de solución de detergente comercial a una concentración de 40 mg/mL (Nasiri y col., 2005) se incubó toda la noche a 37°C. Después, sumergir hasta el fondo el papel filtro en repetidas ocasiones con una pipeta limpia, se procedió a incubarlo por 15 minutos a 95°C para mejorar el mecanismo de lisis, centrifugando la muestra durante 10 minutos a 13,000 rpm con el fin de retirar el papel filtro. Finalmente se separó el sobrenadante, extracto donde se encuentra contenido el ADN y se almacenó a -20°C. Los pasos de preparación del buffer TE y ACK se encuentran en los anexos 2 y 3, respectivamente.

La solución de detergente comercial se preparó a una concentración de 40 mg/mL (p/v) con la marca Vide, la elección de ésta fue debido a que indica en su empaque una concentración de enzimas proteasas y celulasas del 25%. Esta misma solución de detergente fue utilizada para las purificaciones de ADN de saliva y frotis bucal, como se muestra en los siguientes apartados.

Extracción en Muestras de Saliva y Frotis Bucal

Para llevar a cabo la extracción, al mililitro de la mezcla de buffer de lisis-saliva o buffer de lisis-frotis bucal, se añadió 30 μL a la solución de detergente (40 mg/mL). Posteriormente se vertieron a la mezcla antes mencionada 150 μL de 10% SDS para después ser incubados toda una noche a 53°C en baño de agua con agitación constante. Una vez pasado el tiempo de incubación se adicionaron 400 μL de NaCl 5 M y se incubó de nuevo en hielo por 10 minutos; la mezcla fue distribuida equitativamente en tubos de 1.5 mL, los cuales fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se adicionaron 800 μL de isopropanol con posterior incubación por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose a 13,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pelletizado (ADNg) fue lavado por duplicado con 500 μL de etanol al 70% (v/v) y secado para finalmente ser disuelto en 30 μL H₂O MilliQ (Quinque y col., 2006).

Determinación de la Concentración y Calidad de ADNg Total Extraído

Para determinar la calidad del ADNg extraído se realizaron lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (UVIVIS Multiskan GO, Thermo Scientific®). Para ello se depositó 2 μL de la muestra en cada celda, realizándose por duplicado. Los valores de la calidad del ADN fueron inferidos mediante el cálculo A260/A280 (Wilfinger y col., 1997).

Mientras la cantidad o concentración de ADNg total de la muestra fue calculado automáticamente en el espectrofotómetro tomando de referencia que una unidad de absorbancia a 260 nm (1 Abs) o una unidad de densidad óptica (1DO) corresponde a una concentración de 50ng/ μL de ADN de cadena doble (Sambrook y col., 1989). Con base en esto, se aplicó la Ley de Lambert-Beer, la cual relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción. Las muestras de ADNg total se almacenaron en microtubos a -20°C hasta su uso para realizar la amplificación del gen constitutivo por PCR.

Para visualizar la concentración e integridad de ADNg total extraído en las muestras se realizó una corrida de muestras con diferentes concentraciones en geles de agarosa al 1%, protocolo que se describe en el siguiente apartado.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de concentración y pureza de los ADNg extraídos de saliva, frotis bucal y sangre fijada en papel filtro fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar la diferencia entre las extracciones de ADN utilizando proteinasa K y las extracciones empleando la solución de detergente comercial, posteriormente se aplicó la prueba de Duncan cuando se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Para llevar a cabo este análisis estadístico se utilizó el software STATGRAPHICS PLUS (2008).

Amplificación de un Gen Constitutivo por PCR a Partir del ADNg Total Extraído

Para corroborar la funcionalidad y calidad de los ADNg extraídos, se amplificó por la técnica de PCR el exón 3 del gen constitutivo del factor regulador de interferón 6 (IRF6) con 100% de especificidad en humanos, empleando los cebadores diseñados IRF6/Fw 5'-AGC TCT AGT AGA TGG GAA AGG TG-3' e IRF6/Rv 5'-CCA GAA AGG TCT GAT GGT AGA AG-3', el tamaño del amplicón o producto de amplificación esperado es de 302 pares de bases (pb) y su presencia indica que el material genético fue adecuado en cuanto a concentración y calidad.

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador PTC-100® (BIORAD, Inc.) adicionando los siguientes reactivos a un microtubo de 100 μ L: 6.3 μ L de JumpStrat™ Taq ReadyMix™ (P2893, Sigma-Aldrich), 0.2 μ L de cada cebador (IRF6/Fw e IRF6/Rv), a una concentración de 10mM, 4.3 μ L de agua MilliQ. Al final de la mezcla se adicionaron 1.5 μ L de ADNg de cada muestra, para un volumen final de 12.5 μ L (véase anexo 4).

Las condiciones de amplificación consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos conformados por los pasos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, precedido por una extensión final a 72°C por 5 minutos. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo bajo precauciones estrictas para evitar contaminación cruzada.

Posteriormente, los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en agarosa al 1% teñida con SYBR™safe™ 0.2 μ g/mL (No. catalogo S33102, Invitrogen™) a 90V y 250 mA por aproximadamente 35 minutos en una cámara de electroforesis horizontal modelo Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad). Finalmente se realizó la visualización de los productos de PCR en un fotodocumentador con una lámpara UV 260/280 nm

(Spectroline Bio-O-Vision®), donde el soporte fotográfico posee una cámara digital marca Nikon, modelo Cool-Pix 990® con la cual se capturaron las imágenes de los geles de agarosa (véase anexo 5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Muestras

En estudios epidemiológicos aplicados en poblaciones, tanto la alta respuesta como la tasa de participación son de suma importancia para la validez de los datos. En el presente trabajo, la saliva y frotis bucal fueron los métodos de obtención de muestras más idóneos, ya que no se encontró sujeto que se negara a proporcionar muestras por ser ambos no invasivos. Mientras que hubo un 35% menos de participación siguiendo el método de la sangre fijada en papel filtro, menor a lo mencionado por Bahlo y col. (2010) donde se reportó 56.9 % menos aceptación a proporcionar sangre *versus* saliva, derivado de que los posibles participantes se sintieron intimidados por la naturaleza del método. Tomando así un total de muestras de 20 estudiantes para saliva/frotis bucal y 13 estudiantes para sangre fijada en papel filtro de entre 18 y 23 años del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora (Tabla 1).

Las muestras recolectadas se trataron dentro de la primera semana a partir de la recolección asegurando así su frescura, manteniéndose antes de la extracción de ADNg total a una temperatura de refrigeración (3°C) para las muestras de saliva y frotis bucal y a temperatura ambiente (20°C) para las muestras de sangre fijada en papel filtro. Una vez extraído el ADNg total, se almacenaron a -20°C (Tabla 1).

Determinación de la Concentración y Calidad de ADNg Total Extraído

Por medio del método de extracción de ADNg desarrollado se obtuvieron muestras de ADN fragmentado con residuos (Figura 7), pudiendo constituir una dificultad al momento de llevar a cabo la amplificación del gen constitutivo, debido a que ya se sabe que con presencia de ADN fragmentado hay una mayor dificultad al llevar a cabo la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular, afectando así la reproducibilidad de la técnica de PCR.

En esta investigación se obtuvo mayor concentración de ADNg total partiendo de saliva y frotis bucal comparados a los rendimientos reportados por Quinque y col. (2006) de 22.80 ng/μL en saliva y 8.46 ng/μL en frotis bucal (estudio de tomado como referencia para desarrollar el método modificado en esta investigación), por lo cual se obtuvo un incremento en el rendimiento en base al ADNg total extraído comparado a los estudios de referencia.

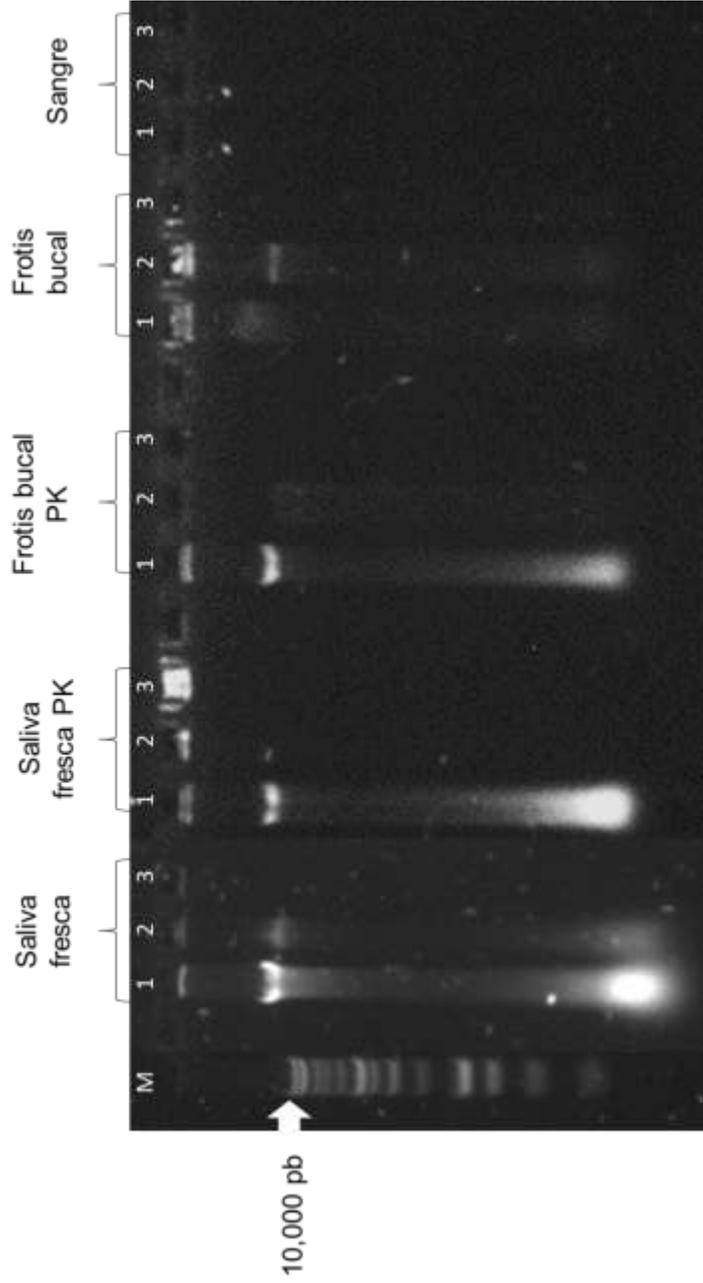


Figura 7. Visualización de la integridad de ADN total extraídos a partir de saliva, frotis bucal y sangre. Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de muestras de saliva y frotis utilizando detergente comercial; muestras de saliva y frotis usando proteinasa K (PK); muestras de sangre fijada en papel filtro. Los números 1, 2, 3 representan concentraciones altas, media y baja, respectivamente. M: Marcador de peso molecular 1kb Ladder (Promega™).

Tabla 1. Concentración y calidad de ADNg total extraído. Muestras de saliva y frotis bucal tratadas con solución de detergente Vide (40 mg/mL); muestras de saliva y frotis bucal tratadas con Proteinasa K (20 mg/mL); y muestras de sangre fijada en papel filtro tratadas con solución de detergente Vide (40 mg/mL).

Muestra n=20	Detergente Vide		Proteinasa K		Detergente Vide
	Saliva	Frotis bucal	Saliva	Frotis bucal	
Concentración de ADN (ng/ μ L) [\bar{x} (\pm s)]	79.77 (\pm 68.76) _{a**}	41.84 (\pm 32.00) _a	51.20 (\pm 15.65) _a	65.69 (\pm 13.44) _a	43.48 (\pm 12.28) _a
Calidad de ADN (A260nm/A280nm) [\bar{x} (\pm s)]	1.49 (\pm 0.42) _a	1.74 (\pm 0.39) _a	1.38 (\pm 0.41) _a	1.56 (\pm 0.25) _a	1.01 (\pm 0.01) _b

* n=13 Para muestras de sangre fijada en papel filtro.

** medias con la misma letra dentro de la misma fila no muestran diferencias significativas según la prueba de Duncan (p \leq 0.05).

Por otra parte, se han realizado extracciones de ADNg total en saliva donde se obtuvieron rendimientos de 17.75 ng/ μ L (4.25 - 42.60 ng/ μ L) (Ng y col., 2006); 24.85 ng/ μ L (0.20-134.00 ng/ μ L) por cada mililitro de saliva (Lum y Marchand, 1998), siendo estos valores de concentración de ADNg menores a los encontrados en el presente trabajo. No obstante, los valores observados en este estudio presentan un rango mayor para saliva (8.20 - 192.30 ng/ μ L) y equiparable para frotis bucal (4.30 - 130.90 ng/ μ L), presentando una mayor distribución de los datos.

Así mismo se obtuvieron purezas de los ADNg por debajo del rango óptimo (1.6 - 2.0) según la relación A260/A280 (Wilfinger y col., 1997; Garbrieri y col., 2017), por parte de la extracción a partir de saliva con 1.49 (\pm 0.42) valor que sugiere presencia de contaminación de proteínas, subestimando la concentración de ADNg. Mientras que la extracción por medio de frotis bucal señaló resultados con 1.74 (\pm 0.39), valor encontrado dentro del rango óptimo de pureza del ADNg extraído en estas muestras (Tabla 1).

Por otro lado, se extrajo ADNg total de muestras de saliva y frotis bucal utilizando proteinasa K (20 mg/mL) como control de verificación de la extracción de ADNg total (Tabla 1), donde en base al análisis estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas en las variables de concentración y pureza por medio del protocolo utilizando la solución de detergente comercial *versus* el protocolo utilizando proteinasa K (Figura 8 y 9).

No obstante, el ADNg total derivado de saliva viene acompañado con ADNg bacteriano y es notoriamente difícil determinar la proporción relativa de ADNg humano (Bahlo y col., 2010). En otro estudio se descubrió que de las 430,000 células epiteliales por mililitro que contenía la saliva de sus voluntarios, en promedio cada célula epitelial tenía aproximadamente entre 80 y 100 bacterias adheridas, conteniendo por mililitro de saliva humana 4.3×10^5 de células epiteliales y 1.36×10^5 de leucocitos contra los 1.7×10^7 de bacterias junto con ADNg de otros microorganismos encontrados en la cavidad oral (Garbrieri y col., 2017). Las bacterias, a pesar de su alta concentración en saliva, no es una limitante para purificar ADNg en esta secreción líquida, sin embargo es conveniente para otros estudios sobre microbiota bucal.

En cuanto a la concentración de ADNg obtenido a partir de las muestras de sangre fijada en papel filtro con el método utilizando detergente comercial (43.48 ± 12.28 ng/ μ L) fue mayor (Tabla 1) a diferencia de lo reportado por Choi y col. (2014) empleando el método base con proteinasa K (23.00 ± 1.70 ng/ μ L). Drábek y Petřek (2002) obtuvieron concentraciones de ADNg (40.90 ± 4.30 ng/ μ L) de sangre periférica con un método similar

usando detergente en polvo. Además, se conoce que el número medio de células nucleadas en un mililitro de sangre es de $4.5-11 \times 10^5$ en comparación con el número medio de células epiteliales en saliva de 4.3×10^5 (Dawes, 2003; Dacie y Lewis, 2011), lo que puede colocar a la sangre como espécimen idóneo para la extracción de ADNg.

Así mismo la calidad de los ADNg extraídos en sangre fijada en papel filtro señalaron una relación absorbancia A260/A280 de 1.01 ± 0.01 (Tabla 1), valor que no alcanzó el rango óptimo de calidad (1.6-2.0) (Wilfinger y col., 1997; Garbrieri y col., 2017), lo cual indica contaminación por proteínas, desestimando así la pureza del ADNg extraído, a pesar de haber obtenido mayor concentración a lo reportado por Choi y col., (2014) o una concentración comparable contra el método en sangre periférica documentado por Drábek y Petřek (2002). En cuanto a pureza obtenida, el análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas entre el protocolo de sangre fijada en papel filtro al utilizar detergente comercial *versus* las muestras de saliva y frotis bucal tratadas con los protocolos con detergente comercial y con proteinasa K (Tabla 1, Figura 9).

Amplificación de un Gen Constitutivo Humano por PCR a Partir del ADNg Extraído

Por otra parte, pese a que no se obtuvo diferencia significativa en cuanto a concentración de ADNg extraído en muestras de saliva *versus* frotis bucal (Tabla 1, Figura 8), al visualizar los productos de PCR de ambas muestras, el ADNg de frotis bucal mostró productos más notorios que los de ADNg extraídos de saliva en los geles de agarosa. En muestras de ADNg a partir de frotis bucal el 95% revelaron presencia de una banda de 302 pb, amplificación correspondiente al fragmento del gen IRF6, mientras que en las muestras de saliva solo un 55% amplificó este gen al ser visualizada la banda de 302 pb en el gel de agarosa (Figuras 10 y 11). Se conoce que un inconveniente de la saliva es la presencia de un gran número de células bacterianas (aproximadamente $1.7 \times 10^7/\text{mL}$ saliva), por lo que el utilizar saliva como materia prima se corre el riesgo de extraer mayor proporción de ADNg microbiano *versus* humano (Dawes, 2003; Walker y col., 2005). Lo cual indica que el ADNg total extraído de saliva, a pesar de tener una concentración mayor al encontrado en frotis bucal, contiene una proporción de ADNg bacteriano.

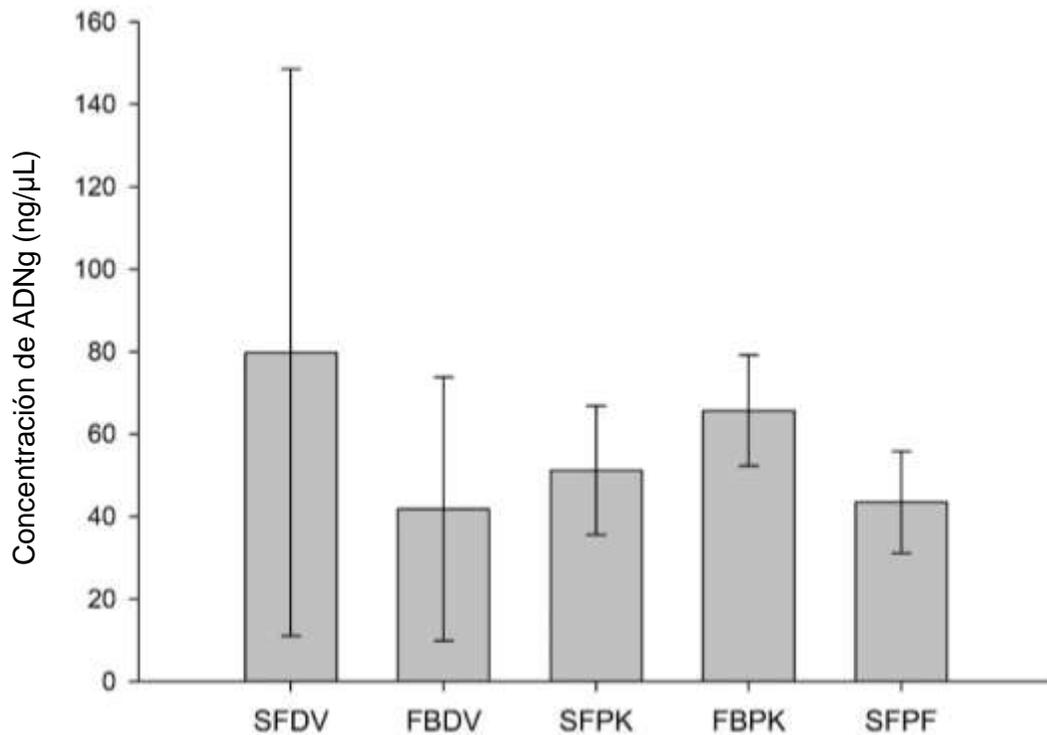


Figura 8. Concentración de ADNg extraído de diferentes muestras. SFDV: muestras de saliva tratadas con solución de detergente Vide; FBDV: muestras de frotis bucal tratadas con solución de detergente Vide; SFPK: muestras de saliva tratadas con proteinasa K; FBPK: muestras de frotis bucal tratadas con proteinasa K; SFPF: muestras de sangre fijada en papel filtro tratadas con solución de detergente Vide. Líneas en columnas corresponde a desviaciones estándar.

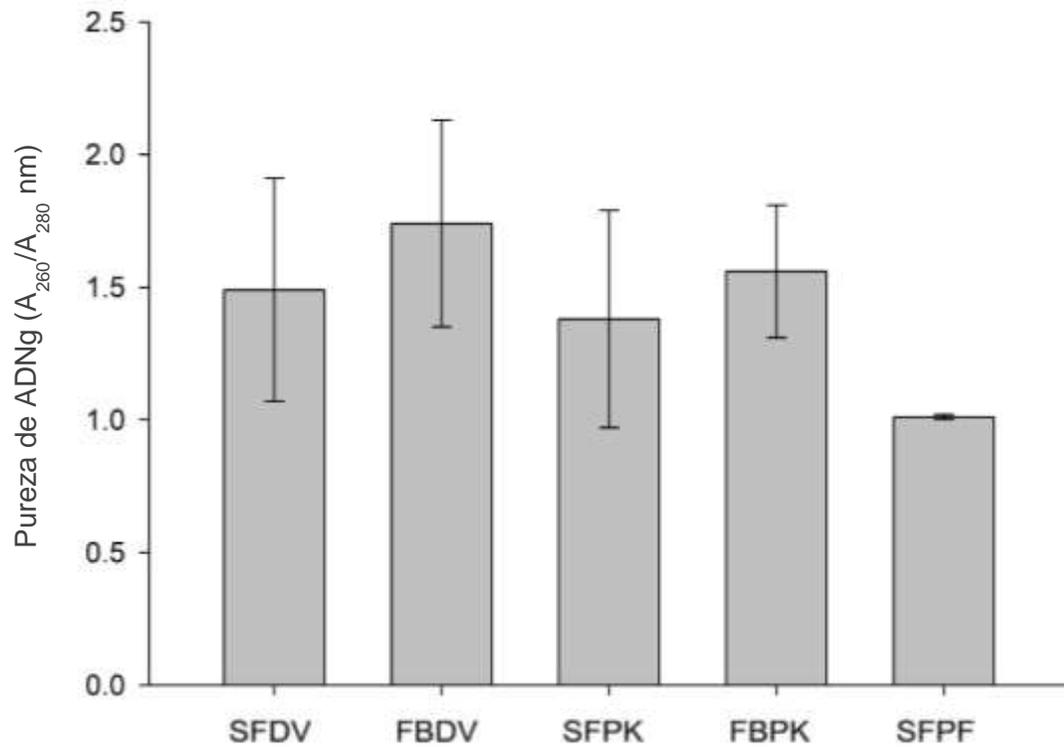


Figura 9. Pureza de ADNg extraído de diferentes muestras. SFDV: muestras de saliva tratadas con solución de detergente Vide; FBDV: muestras de frotis bucal tratadas con solución de detergente Vide; SFPK: muestras de saliva tratadas con proteinasa K; FBPK: muestras de frotis bucal tratadas con proteinasa K; SFPF: muestras de sangre fijada en papel filtro tratadas con solución de detergente Vide. Líneas en columnas corresponde a desviaciones estándar.

Si bien las muestras de saliva empleando el protocolo con proteinasa K no tuvieron diferencia significativa en cuanto a concentración de ADNg total que las tratadas con la solución de detergente comercial (Tabla 1 y Figura 8), la mayoría obtuvieron productos de amplificación de 302 pb correspondientes al gen IRF6 (Figura 12). Por otra parte, en muestras de frotis bucal se obtuvo una menor amplificación del gen IRF6 por parte de las muestras utilizando el protocolo con proteinasa K en lugar del protocolo con la solución de detergente comercial (Figura 12).

A pesar de que la calidad del ADNg total extraído de muestras de sangre fijada en papel filtro generó resultados de pureza inferior (Tabla 1, Figura 9) por presencia de proteínas, las cuales pueden interferir con la reacción de PCR, el total de estas muestras amplificó el gen IRF6 ya que se obtuvieron amplicones de 302 pb (Figura 13) según lo reportado por Garbrieri y col. (2017), lo cual ubica el protocolo utilizando detergente en muestras de sangre fijadas en papel filtro útil para posteriores estudios genéticos.

Cabe destacar que la elección del gen constitutivo IRF6 fue fundamentada en el trabajo de Garbrieri y Col. (2017). Este grupo de investigadores utilizaron la amplificación del gen IRF6 para verificar la purificación de ADNg de saliva humana mediante tres kits de extracción de ADN comerciales Oragene™ de DNA Genotek®, QIAamp® de Qiagene® e InstaGene™ Matrix de Biorad®, así como el protocolo de acetato de amonio y el protocolo modificado de Instagene™ diluido 1:1 usando proteinasa K y SDS al 1%. El gen constitutivo IRF6 proporciona instrucciones para traducir una proteína que desempeña una función importante en el desarrollo temprano, ya que este gen se traduce hasta una proteína con función de factor de transcripción, el cual se une a regiones específicas del ADN y está activo en células que dan lugar a los tejidos en la cabeza y cara y participa en el desarrollo de la piel y los genitales.

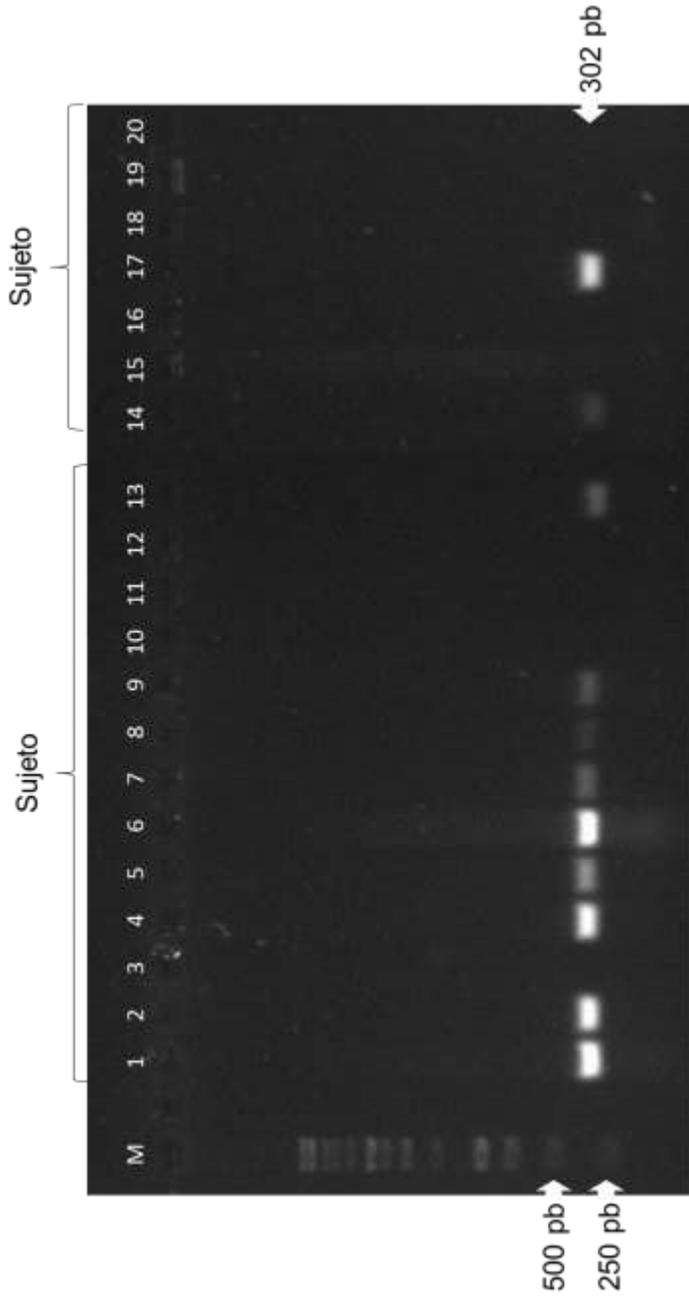


Figura 10. Productos de la amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADN total extraído de saliva. Visualización de los productos de PCR geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR™ safe™. Carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14 y 17: Productos de amplificación de 302 pb del gen constitutivo IRF6. Carriles 3, 10, 11, 12, 15, 16, 19 y 20: Muestras de ADN total extraído de saliva que no presentaron amplificación del gen constitutivo IRF6. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega™).

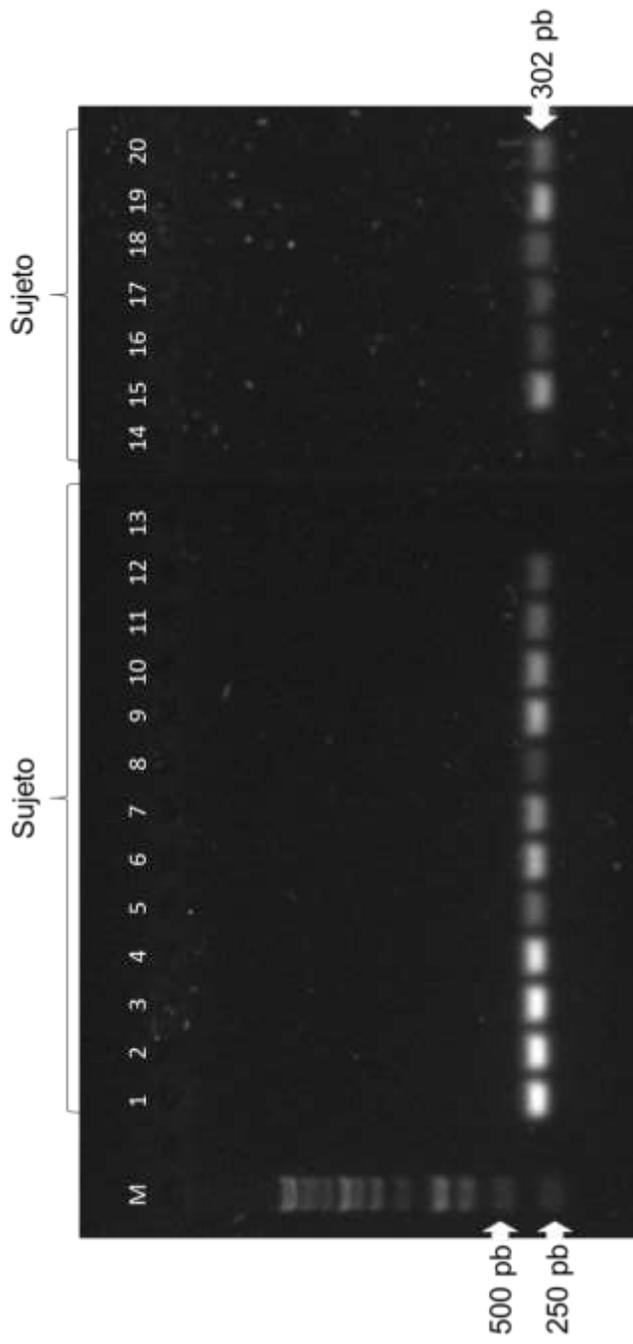


Figura 11. Productos de la amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADNg total extraído de frotis bucal. Visualización de los productos de PCR geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR™ safe™. Carriles 1 - 12, 15 - 20: Productos de amplificación de 302 pb del gen constitutivo IRF6. Carriles 13 y 14: Muestras de ADNg total extraído de frotis bucal que no presentaron amplificación del gen constitutivo IRF6. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega™).

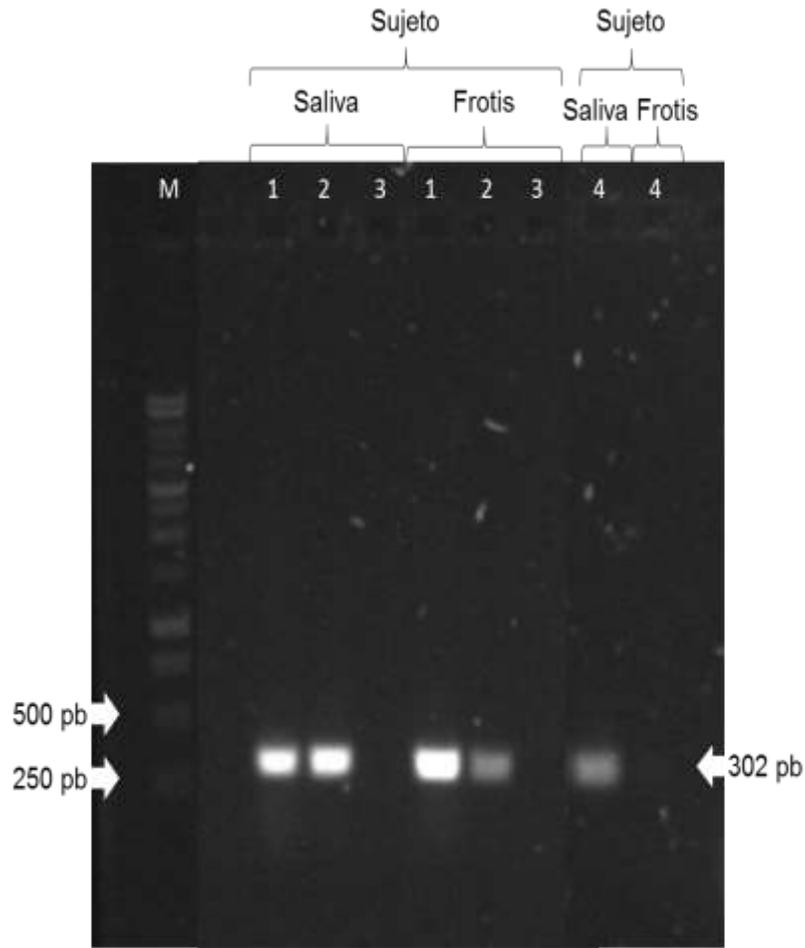


Figura 12. Productos de la amplificación del gen IRF6 por PCR de muestras de ADN total extraído de saliva y frotis bucal tratadas con proteinasa K. Visualización de los productos de PCR geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR™safe™. Carriles 1, 2 y 4 de muestras de ADN extraído de saliva: Productos de amplificación de 302 pb del gen constitutivo IRF6. Carril 3 de muestras de ADN extraído de saliva: no presentaron amplificación del gen constitutivo IRF6. Carriles 1 y 2 de muestras de ADN extraído de frotis bucal: Productos de amplificación de 302 pb del gen constitutivo IRF6. Carriles 3 y 4 de muestras de ADN extraído de frotis bucal: no presentaron amplificación del gen constitutivo IRF6. M: Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega™).

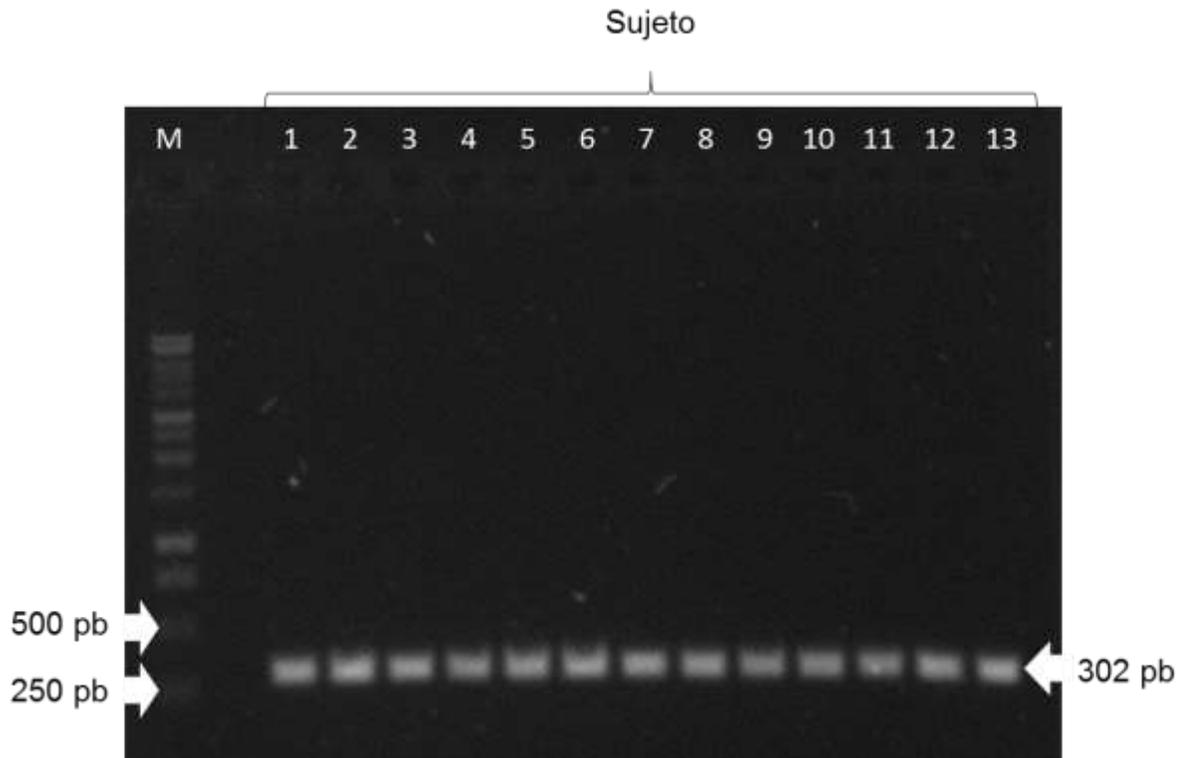


Figura 13. Productos de amplificación del gen IRF6 por PCR en muestras de ADNg de sangre fijada en papel filtro. Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa al 1% teñidos con SYBR™safe™. Carriles 1-13: productos de PCR del gen IRF6 (302 pb) de muestras de ADNg extraída de sangre fijada en papel filtro. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Promega™).

Por otra parte, debido que se utilizaron diferentes protocolos para la purificación de ADN total derivado de saliva y sangre, y por la naturaleza de las mismas, el ADN derivado de éstas puede mostrar diferencias en la eficiencia y la precisión de amplificación del gen (Bahlo y col., 2010). Lo cual explica la diferencia encontrada al contrastar los resultados de concentración con los resultados al amplificar el gen IRF6 en este estudio.

CONCLUSIÓN

Los resultados anteriores muestran la efectividad de los métodos de extracción de ADNg total por medio de una solución detergente comercial (40 mg/mL), indicando que el desarrollo de los protocolos para muestras de sangre fijada en papel filtro, saliva y frotis bucal, resultaron ser exitosos; logrando obtener ADNg con concentración y pureza mayores a los protocolos reportados por Quinque y col. (2006) y Choi y col. (2014). Adicionalmente, se comprobó la calidad de los ADNg extraídos de sangre fijada en papel filtro, saliva y frotis bucal al permitir la reacción de amplificación por PCR del gen constitutivo IRF6. Por lo tanto, los protocolos desarrollados fueron simples y de bajo costo, además de mostrar resultados superiores en comparación con métodos estándar y kits comerciales de extracción de ADNg. Así mismo confiere un riesgo reducido de contaminación, logrando ser almacenadas a temperatura ambiente antes de llevar a cabo los protocolos de extracción.

De los métodos de extracción desarrollados, el protocolo con detergente comercial en muestras de frotis bucal resultó el más adecuado, en relación concentración-pureza como en amplificación del gen constitutivo por PCR. Además, por su carácter no invasivo, tuvo mayor aceptación por los sujetos de estudio, proponiéndose como fuente para utilizar en estudios epidemiológicos a gran escala.

RECOMENDACIONES

A pesar que con los métodos de extracción desarrollados se obtuvieron resultados favorables en cuanto a concentración y pureza de los ADNg extraídos en las diferentes muestras, se sugiere que en el protocolo de extracción de muestras de sangre fijadas en papel filtro se adicione una etapa de lavado con etanol con el fin de aumentar la pureza del ADNg.

Aunado al resultado exitoso por parte de los protocolos de extracción, se recomienda emplear la solución de detergente comercial con proteinasas/celulasas en muestras de origen vegetal para extracciones de ADNg.

Además, debido a que muestras de saliva contienen ADNg metagenómico, éstos pueden ser emplados en estudios sobre microbiota bucal.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y con el fin de realizar a futuro análisis de marcadores moleculares de enfermedades crónico-degenerativas, se recomienda utilizar una población ≥ 30 sujetos.

REFERENCIAS

- Alejos L, Aragón M, Cornejo A. 2014. Extracción y purificación del ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1ra Ed. México, D.F.: Ed. INCC-SEMARNAT. 1-17.
- Aranguren J, Román R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 13(1): 30-42.
- Bahlo M, Stankovich J, Danoy P, Hickey P, Taylor B, Browning S. 2010. Saliva-Derived DNA Performs Well in Large-Scale, High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Microarray Studies. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention. 19(3):794-8.
- Cervantes J. 2003. Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. Revista Médica Herediana.14(4): 230-233.
- Chan P, Chan D, To K, Yu M, Cheun J, Cheun A. 2001. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. Journal of Clinical Pathology. 54:401-403.
- Chacon D, Haupt L, Lea R, Griffiths L. 2012. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. Molecular Biology Reports. 39(5):5961-5966.
- Choi E, Lee S, Ihm C, Sohn Y. 2014. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. Osong Public Health Res Perspect. 5(6): 351-357.
- Corran P, Cook J, Lynch C, Leendertse H, Manjurano M, Griffin J, Cox J, Abeku T, Bousema T, Ghani A, Drakeley C, Riley E. 2008. Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. Malaria Journal. 7:195.
- Dacie J, Lewis S. 2011. Practical Haematology. 7th edition. London: Churchill Livingstone. 14 p.
- Dundass N, Leos N, Mitui M, Revell P, Rogers B. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. The Journal of Molecular Diagnostics. 10(4): 311-316.
- Drábek J, Petřek M. 2002. A sugar, laundry detergent, and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. Biomed. Papers 146(2): 37-39.

Etter F, Neidhart E, Bertrand S, Malafosse A, Bertrand D. 2005. Collecting Saliva by Mail for Genetic and Cotinine Analyses in Participants Recruited through the Internet. *European Journal of Epidemiology*. 20(10): 833–838.

Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández A. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 56(3): 1561-3054

Garbrieri T, Brozoski D, Dionisio T, Santos C, Neves L. 2017. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3 protocols. *Journal of Applied Oral Science*. 25(2):147-58.

García-Closas M, Egan K, Abruzzo J, Newcomb P, Titus-Ernstoff L, Franklin T, Bender P, Beck J, Marchand L, Lum A, Alavanja M, Hayes R, Rutter J, Buetow K, Brinton L, Rothman N. 2001. Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*. 10:687-696.

Gardes M y Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2: 113-118.

Ghatak S, Muthukumaran R, Nachimuthu S. 2013. A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *Journal Biomolecular Techniques* 24(4): 224-231.

Graffy E, Foran D. 2005. A Simplified Method for Mitochondrial DNA Extraction from Head Hair Shafts. *Journal of Forensic Science* 50(5): 119-122.

Hailemariam Z, Ahmed J, Clausen P, Nijhof A. 2017. A comparison of DNA extraction protocols from blood spotted on FTA cards for the detection of tick-borne pathogens by Reverse Line Blot hybridization. *Ticks Tick Borne Dis*. 8(1):185-189.

Hansen T, Simonsen M, Nielsen F, Hundrup Y. 2007. Collection of Blood, Saliva, and Buccal Cell Samples in a Pilot Study on the Danish Nurse Cohort: Comparison of the Response Rate and Quality of Genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(10): 2072-2076.

Hinds D, Stuve L, Nelsen G, Halperin L, Eskin E, Ballinger B, Frazer K, Cox D. 2005. Common DNA variation in three human populations. *Science* 307: 1072–1079.

Hollegaard M, Grove J, Grauholm J, Kreiner E, Bønnelykke K, Nørgaard M, Benfield T, Nørgaard B, Mortensen B, Mors O, Sørensen H, Harboe Z, Børghlum A, Demontis D, Ørntoft T, Bisgaard H, Hougaard D. 2011. Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spot samples as a DNA source. *BMC Genetics* 2011. 12:58.

Islam M, Awan F. 2014. Development of ARMS-PCR assay for genotyping of Pro12Ala SNP of PPARG gene: a cost effective way for case-control studies of type 2 diabetes in developing countries. *Springer* 41: 5585-5591.

Lahir D, Schnabe B. 1993. DNA Isolation by a Rapid Method from Human Blood Samples: Effects of MgCl₂, EDTA, Storage Time, and Temperature on DNA Yield and Quality. *Biochemical Genetics*. 31(7-8): 321-328.

López P, López A, Marulanda M. 2011. Standardizing Genomic DNA Extraction in *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. AND *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén. *Universidad Tecnológica de Pereira*. 28-41.

Lum A, Marchand L. 1998. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 7:719-724.

Mark I, McCarthy M. 2010. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *The New England Journal Medicine*. 363(24): 2339-2350.

Mas S, Crescenti A, Gassó P, Vidal-Taboada J, Lafuente A. 2007. DNA Cards: Determinants of DNA Yield and Quality in Collecting Genetic Samples for Pharmacogenetic Studies. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101(2): 132-137.

Milne E, Bockxmeer F, Robertson L, Brisbane J, Lesley J. Ashton, Scott R, Armstrong B. 2006. Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 15(4):816-9.

Mulot C, Stücker I, Clavel J, Beaune P, Lorient M. 2005. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. *Journal Biomedicine and Biotechnology* 2005(3): 291-296.

Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee M, Rahbarizadeh F. 2005. Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction From Whole Blood Using Laundry Detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 19:229-232.

Nelson D, Cox M. (2001). *Principios de Bioquímica* 3a ed. Barcelona, España. Editorial Omega. 1119-11128.

Ng D, Koh D, Choo S, Chia KS. 2006. Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. *Clinica Chimica Acta* 367: 81 – 85.

Osorio J, Pachajoa H, Hurtado P. 2013. Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista estomatología y salud*. 21(1):35-38.

Quinque D, Kittler R, Kayser M, Stoneking M, Nasidze I. 2006. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. *Analytical Biochemistry* 353: 272–277.

Ruemmele F. 2012. ¿Por qué la genética es importante para la nutrición? Lecciones de investigación epigenética. *Annales Nutr Metab.* 60(3):38–43.

Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.

Sanchez J, Priego T, Pico C, Ahrens W, Henauw, Fraterman A, Mårild S, Molnar D, Moreno L, Peplies J, Russo P, Siani A, Tornaritis M, Veidebaum T, Palou A. 2012. Blood Cells as a Source of Transcriptional Biomarkers of Childhood Obesity and Its Related Metabolic Alterations: Results of the IDEFICS Study. *Endocrine Research* 97(4): 648 –652.

Shen J, Cotton C. 2003. Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal.* 284(1):F57-64.

Sjoholm M, Dillner J, Carlson J. 2007. Assessing Quality and Functionality of DNA from Fresh and Archival Dried Blood Spots and Recommendations for Quality Control Guidelines. *Clinical Chemistry.* 53(8): 1401–1407.

Streckfus C, Bigler L. 2002. Salivary glands and saliva: Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases.* 3(8): 69–76.

Stryler L, Berg J, Tymoczko J. 2003. *Bioquímica 5a ed.* Barcelona, España. Editorial Reverté. 152-154.

Van-Wieren-de-Wijer D, Maitland-van-der-Zee A, de Boer A, Belitser S, Kroon A, Leeuw P, Schiffers P, Janssen R, Duijn C, Stricker B, Klungel H. 2009. Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples. *Eur J Epidemiol* 24(11): 677-682.

Welsh S, Peakman T, Sheard S, Almond R. 2017. Comparison of DNA quantification methodology used in the DNA extraction protocol for the UK Biobank cohort. *BMC Genomics.* 18:26.

Wilfinger W, Mackey F, Chomczynski P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* 22(3):474-6, 478-81.

Yoshida S, Nishimura S, Okuno T, Rakuman M, Takii Y. 2010. Efficient DNA Extraction from Nail Clippings Using the Protease Solution from *Cucumis melo*. *Molecular Biotechnology.* 46(1): 41–48.

ANEXO 1

Buffer de Lisis Inicial para Saliva

El buffer de lisis inicial permite que las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, membrana celular y nuclear se modifiquen o destruyan permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Los componentes no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación. Tanto la homogenización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. En la homogenización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos (Sambrook, y col., 1989; Alejos y col., 2014)

Formulación

Tabla 2. Componentes para preparar buffer de lisis inicial para saliva.

Reactivos	Concentración	Peso (mg)
Tris base pH 8.0	50 mM	302.8
EDTA	50 mM	730.6
Sacarosa	50 mM	855.7
NaCl	100 mM	292.2
SDS	1%	500

Volumen de solución

50 mL

Protocolo

En un tubo Falcon de 50 mL se adicionan 25 mL de H₂O MilliQ y el Tris base 50 mM para después ser llevado a pH 8.0 con ayuda de un potenciómetro Conductronic®. Posteriormente se adicionan el EDTA 50 mM, Sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM y SDS 1% para finalmente ser aforado a 50 mL con H₂O MiliQ.

ANEXO 2

Buffer TE 10mM

Formulación

Tabla 3. Componentes para preparar buffer TE 10 mM.

Reactivos	Concentración	Volumen (μ L)
Tris-HCl	1 M	500
EDTA	0.5 M	100

Volumen de solución

50 mL

Protocolo

En un tubo Falcon de 50 mL se adicionan Tris-HCl 1 M y EDTA 0.5 M para finalmente ser aforado a 50 mL con H₂O MiliQ.

ANEXO 3

Solución de Buffer de Lisis ACK

Formulación

Tabla 4. Componentes para preparar buffer de lisis ACK.

Reactivos	Concentración	Peso (mg)
NH_4Cl	150 mM	8.024
KHCO_3	10 mM	1.001
$\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 mM	3.722

Volumen de solución

1000 mL

Protocolo

En un recipiente de 1000 mL se adicionan 500 mL de H_2O MilliQ y los reactivos previamente pesados NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 10mM y $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM para después ser llevado a pH 10.0 con ayuda de un potenciómetro Conductronic®. Finalmente se afora a 1000 mL con H_2O MilliQ, almacenándose a temperaturas de 15-30 °C.

ANEXO 4

Componentes de la Reacción de Amplificación del Gen IRF6 por PCR

Para llevar a cabo la PCR se utilizó un termociclador PTC-100® (BIORAD, Inc), equipo que permite llevar a cabo de forma automática y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura necesarios para esta. Los componentes de reacción utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Componentes para llevar a cabo la amplificación del gen IRF6 por PCR.

Reactivos	Volumen (μ L)
JumpStrat™ Taq ReadyMix™	6.3
IRF6/Fw	0.2
IRF6/Rv	0.2
H ₂ O milliQ	4.3
Muestra de ADN	1.5

El reactivo JumpStart™TaqReadyMix™ (No. catálogo P2893, Sigma-Aldrich) contiene Tris-HCl 10 mM pH3, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y Taq ADN polimerasa 0.1 U/ μ L la enzima ADN polimerasa y gelatina 0.002%. Para los componentes de la reacción de amplificación del gen constitutivo IRF6 se el reactivo JumpStart™TaqReadyMix™ se adicionaron componentes presentados en la Tabla 4 en un microtubo ependorff de 100 μ L, alcanzando un volumen final de 12.5 μ L.

El protocolo de reacción consiste en una desnaturalización inicial a 95°C por cuatro minutos, extensión final a 72°C por cinco minutos y 40 ciclos con desnaturalización, alineamiento y extensión detallados a continuación:

Desnaturalización

La primera reacción consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Utilizando condiciones de desnaturalización a 95°C por 30 segundos.

Alineamiento

La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. Utilizando condiciones de alineamiento a 60°C por 30 segundos.

Extensión

En la tercera reacción la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. Utilizando condiciones de extensión a 72°C por un minuto.

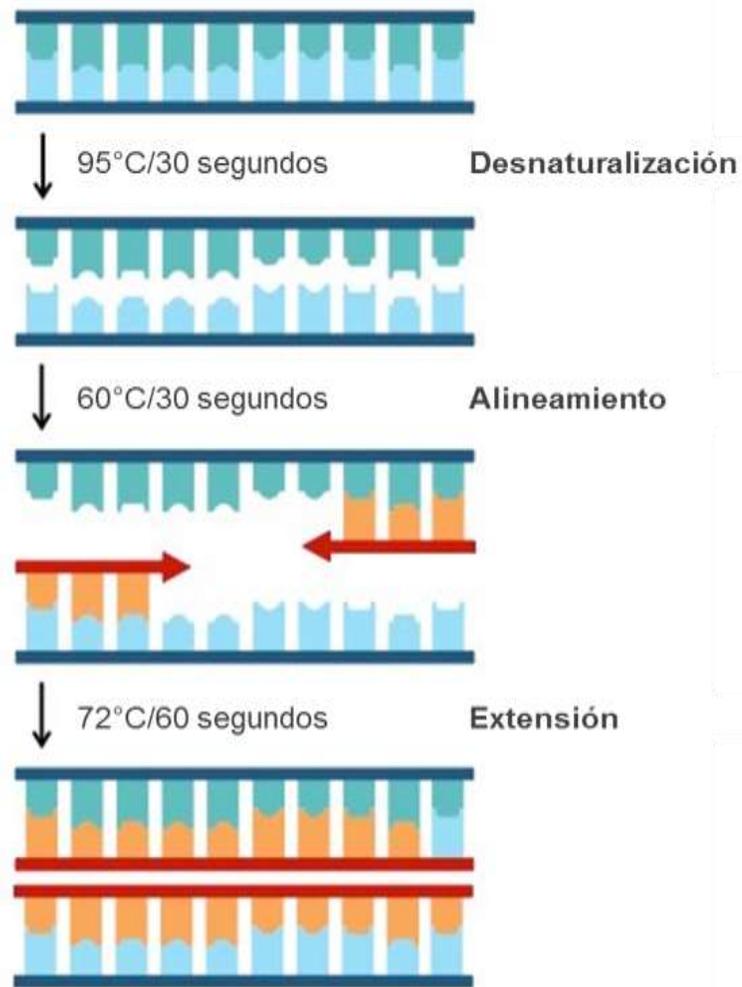


Figura 14. Etapas del proceso de amplificación por PCR (Stryler y col., 2003).

ANEXO 5

Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. De los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos se encuentran polímeros como la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8.0. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema (Nelson y Cox, 2001; Alejos y col., 2014).

Protocolo

Preparación de gel de agarosa 1%

- Se vierten en un matraz 30 ml del tampón de electroforesis 1X (TAE, véase anexo 6) y 0.36 g de agarosa 1%, posteriormente se funde en un microondas por aproximadamente 30 segundos o hasta que la agarosa quede completamente disuelta.
- Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente.
- Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
- Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50°C, se le añaden 2 µL Sybrsafe (Invitrogen®) y se mezcla bien.
- Se vierte la solución de agarosa en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

Electroforesis

- Se retira la cinta adhesiva con la que se ha sellado el soporte del gel y se coloca en la cubeta de electroforesis (BIORAD®), colocando los pocillos cerca del cátodo (polo negativo, color negro).
- Se añade el buffer de electroforesis TAE, de forma que cubra bien el gel de agarosa.
- Se aplican 10 μL de muestra y 5 μL de buffer de corrida en cada pocillo (Blue/Orange 6X), dejando el primer pocillo donde se colocan 5 μL de marcador (1kb DNA Ladder).
- Se tapa la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de poder, programando corrida a 90 V y 250 mA por 35 minutos.
- Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de ADN mediante luz UV en una lámpara Spectroline Bio-O-Vision® y se realiza una fotografía de la imagen con una cámara digital marca Nikon, modelo Cool-Pix 990®.

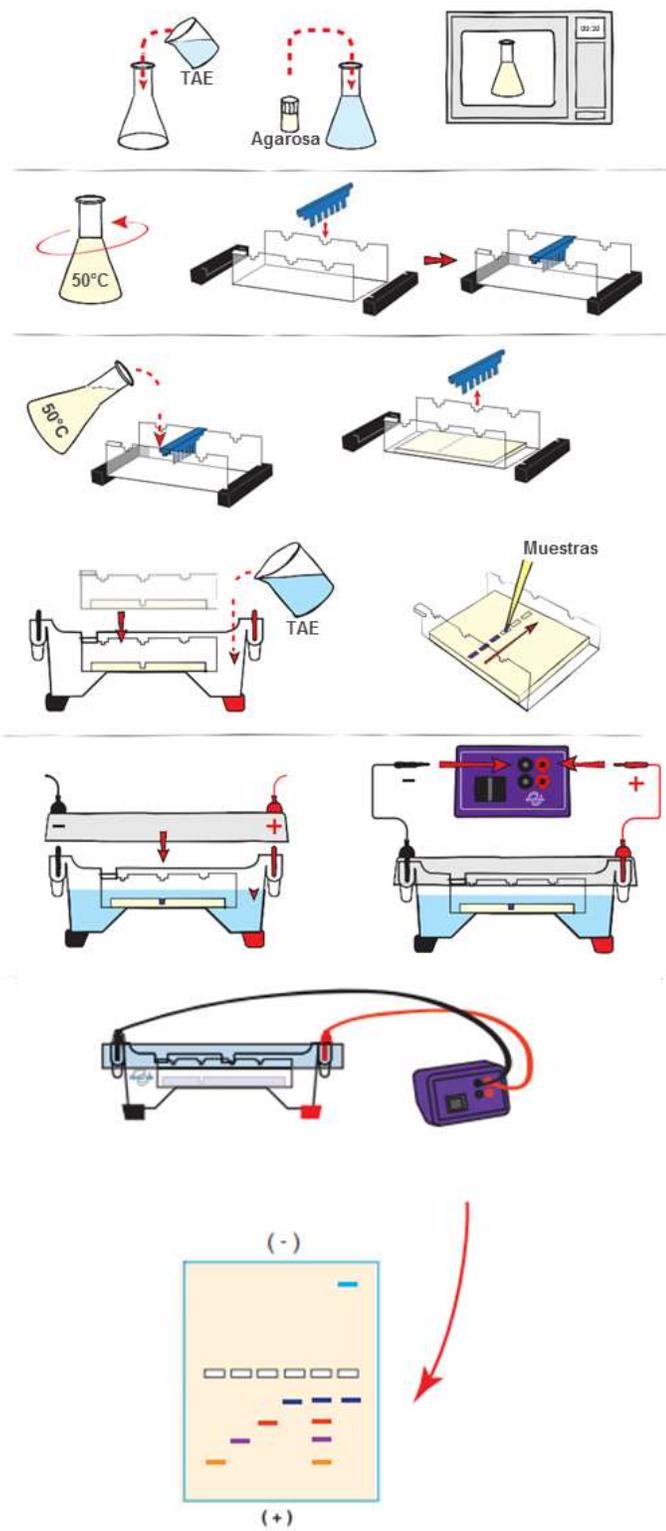


Figura 15. Preparación de gel de agarosa 1% y electroforesis (Nelson y Cox, 2001).

ANEXO 6

Buffer TAE

El buffer o amortiguador TAE (Tris, Ácido acético, EDTA) es el medio usado para preparar el gel y desarrollar la electroforesis. Su pH es alcalino, para que todos los grupos fosfato del DNA estén ionizados por completo y éste se mantenga cargado negativamente. Durante la electroforesis, permite mantener las moléculas de DNA con una carga negativa uniforme y constante (Alejos y col., 2014).

Se prepara una solución de buffer TAE 50X concentrada, procedimiento mostrado a continuación, para después ser diluida a una concentración 1X.

Formulación

Tabla 6. Componentes para preparar buffer TAE 50X.

Reactivos	Concentración	Cantidad
Tris base	1.9 M	242 g
Ácido acético glacial	57.10%	571 mL
EDTA	0.05 M	100 mL

Volumen de solución

1000 mL

Protocolo

En un recipiente de 1000 mL se adicionan el Tris base 1.9 M, Ácido acético glacial 57.1% y EDTA 0.05 M, aforándose a 1000 mL con H₂O MilliQ.

Para preparar el buffer TAE 1X, en un recipiente de 1000 mL se colocan 20 mL de la solución anterior y se aforan a 1000 mL con H₂O MilliQ.