

Artículo original

Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años*

DNA concentration and purity of blood samples stored in whatman FTA paper between 1 to 3 years

Julio OSORIO¹, Harry PACHAJOA², Paula HURTADO³

1. Biólogo, Magíster en Ciencias Biomédicas, Profesor Posgrado de Ortodoncia y Ortopedia de la Institución Universitaria Colegios de Colombia UNICOC (Cali, Colombia). 2. Médico, Doctor en Ciencias Biomédicas, Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad ICESI (Cali, Colombia). 3. Médico, Especialista en Genética, Especialista en Bioética, Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Pontificia Universidad Javeriana (Cali, Colombia).

* Proyecto de investigación financiado por la Universidad del Valle (todos los autores tenían vinculación con dicha universidad al momento de la ejecución).

RESUMEN

Introducción: El papel Whatman FTA es una alternativa para transportar y almacenar diferentes tipos de muestras y optimizar el tiempo, espacio de almacenamiento y costos. Desde hace varios años se utiliza este método de forma rutinaria y muchos centros médicos almacenan muestras por periodos de tiempo prolongados.

Objetivo: Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de muestras de sangre en papel Whatman sobre la concentración del ADN.

Materiales y métodos: Se utilizaron 110 muestras de sangre periférica que fueron guardadas en papel filtro durante un periodo de tiempo de uno a tres años. Estas muestras fueron guardadas como parte de programa ECLAMC. La extracción del ADN se realizó por medio de resinas de intercambio iónico (Chelex-100®). Se verificó la amplificación por medio de PCR. Se utilizó el gen GAPDH. Por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop, se cuantificó cada

una de las muestras evaluadas.

Resultados: El tiempo de almacenamiento fue diferencial con un rango de 520 a 1135 días. La concentración de ADN presentó variabilidad desde 0.81ng/uL a 5.54ng/uL. La relación 260/280 osciló desde -5.22 hasta 14.17nm. La relación 260/230 se presentó en un rango de 0.27 a 1.39nm.

Conclusión: La disminución en la concentración en la muestra de ADN (ug/uL) representa un cambio negativo en el valor esperado en el tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: Detección de ADN en sangre, degradación de ADN, reacción en cadena de la polimerasa.

SUMMARY

Introduction: Whatman FTA is an alternative to transport and store different types of samples and optimizes the time, storage space and costs. For many years this method was used routinely and many medical samples were stored for long periods of time.

Objective: To determine the effect of storage time of blood samples on Whatman paper on the DNA concentration.

Materials and methods: One hundred and ten peripheral blood samples on filter paper were kept for a period of one to three years. These samples were kept as part of

ECLAMC program. DNA extraction was performed by means of ion exchange resins (Chelex-100®). And verified by PCR amplification of GAPDH gene. NanoDrop quantified DNA on each samples.

Results: The storage time was differential with a range of 520-1135 days. DNA concentration varies from 0.81ng/uL to 5.54ng/uL. The 260/280 ratio ranged from -5.22 to 14.17nm. The ratio 260/230 is provided in a range from 0.27 to 1.39nm.

Conclusion: A decrease in concentration in the sample of DNA (ug / uL) represents a negative change in the expected value in the storage time.

Key words: Dried blood spot testing, DNA degradation, PCR technique, gene amplification.

INTRODUCCIÓN

El papel Whatman se utiliza para transportar y almacenar el ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en las células en volúmenes bajos y a temperatura ambiente. Estas características permiten optimizar el tiempo, el espacio de almacenamiento y reducen los costos (1). Además, se ha utilizado en el transporte de parásitos (2), bacterias (3-5) y sangre animal (6-9). En el contexto médico, esta técnica se ha utilizado en la recolección de muestras de

Recibido para publicación: Diciembre 06 de 2012

Aceptado para publicación: Marzo 25 de 2013

Correspondencia:

J. Osorio, UNICOC

cejulio704@gmail.com

sangre entera desde la década de 1960, lo que permitió el inicio del cribado neonatal para los trastornos metabólicos (10). El uso ordinario de la sangre neonatal consiste en colocar unas gotas de sangre en el papel, generalmente desde 3mm a 6mm de diámetro, los que posteriormente son sometidos a análisis físicos o bioquímicos para identificación de los metabolitos liberados por inmersión en alcohol o agua (11). Más recientemente, manchas de sangre seca se han utilizado para la detección de rasgos heredables a nivel de la información contenida en el ADN, usualmente aquellos relacionados con la fibrosis quística y las talasemias (12), entre otros rasgos que se ensayan fácilmente por pruebas de PCR (13). Por la amplia utilización del papel Whatman como procedimiento de rutina en muchos hospitales es posible contar con una extensa cantidad de muestras almacenadas con un diferencial de tiempo desde su obtención y recolección. En este estudio se determinó el efecto que tiene almacenar muestras de sangre en papel Whatman, por un periodo de tiempo de uno a tres años, sobre la concentración del ADN (ng/uL).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

Se utilizaron 110 muestras de sangre periférica en papel filtro que fueron almacenadas durante un periodo de tiempo de uno a tres años. Estas muestras fueron recolectadas como parte del proyecto “genes involucrados en la ocurrencia de defectos por disrupción vascular en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Santiago de Cali (Valle), 2006-2010”. Las muestras incluidas en este estudio provienen de los niños nacidos en el Hospital Universitario del Valle en el periodo de tiempo del 2007 al 2010. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad del Valle y se consideró sin ningún riesgo.

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó por medio de resinas de intercambio iónico

(Chelex-100). Las muestras en papel filtro fueron perforadas y se obtuvo un disco de 6mm de diámetro que fueron introducidos en un tubo Eppendorf estéril con 500uL de agua destilada estéril. Posteriormente, se adicionó 200uL de Chelex-100 al 5% y se realizó una primera incubación del tubo por 90 minutos a 56° C. Finalmente, se volvió a incubar a 99° C por 10 minutos.

Verificación del ADN por el gen GAPDH

Después de realizar la extracción del ADN se verificó la amplificación por medio de PCR. Se utilizó el gen GAPDH, un gen constitutivo que permite verificar las cualidades del ADN y determinan si la muestra es óptima para realizar el análisis por PCR. Se utilizaron los siguientes pares de cebadores: forward 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' y reverse 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' que generan una banda de 300pb4. El termociclado se realizó con las siguientes características: denaturación por 1 minuto a 95° C, 35 ciclos con 45 segundos de denaturación a 94°C, 45 segundos de annealing a 58°C y 60 segundos de extensión a 72°C.

Cuantificación del ADN

El proceso de cuantificación se realizó por medio de espectrofotometría. Con el NanoDrop (espectrofotómetro ND-1000) se cuantificó cada una de las 110 muestras evaluadas por triplicado y se determinó el valor promedio de la concentración de ADN de cada una de las muestras.

Análisis estadístico

El análisis de la información se realizó a través del programa estadístico R (A Language and Environment for Statistical Computing). Las variables de estudio se resumieron con las medidas de tendencia central y de dispersión. Se realizaron gráficos de dispersión entre pares de variables para observar el comportamiento de las dos variables en conjunto. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la asociación entre las variables estadia-

das. Finalmente, se realizó un modelo de regresión lineal múltiple con el método de selección de variables forward, donde la variable tiempo de almacenamiento fue la dependiente y la concentración (ng/uL), la relación 260/280 y relación 260/230 como independientes. El nivel de significación utilizado fue del 0.05.

RESULTADOS

La distribución del tiempo de almacenamiento presentó un rango entre 520 a 1135 días. La concentración de ADN mostró una variabilidad representada en un rango entre 0.81ng/uL a 5.54ng/uL. La relación 260/280, que permite cualificar que tantas proteínas tiene el ADN, exhibió un rango de -5.22 hasta 14.17nm. Para la relación 260/230, que nos permite cualificar la pureza del ADN, se calculó un rango de variación entre 0.27 a 1.39nm (Tabla 1). El coeficiente de correlación de Pearson muestra que las variables tiempo de almacenamiento en días y concentración de ADN en ng/uL tienen correlación baja y negativa ($r=-0,211$). Al evaluar las variables concentración de ADN (ng/uL) con la relación 260/280 también presentan correlación baja y negativa ($r=-0.125$). Las últimas variables analizadas fueron las relaciones 260/280 y 260/230 con una correlación casi nula y negativa ($r=-0,043$) (Tabla 2). El modelo de regresión lineal múltiple se construyó con las variables tiempo de almacenamiento como variable dependiente y la concentración ng/uL, relación 260/280 y relación 260/230 como independientes, sin embargo, de acuerdo al método de selección de variables stepwise, lograron entrar al modelo las variables concentración ng/uL y relación 260/230. Estas variables que ingresaron al modelo resultaron significativas al nivel de 0.05. El coeficiente de determinación del modelo fue de $R^2=0.325$, es decir, que las dos variables independientes permiten explicar el 32.5% de la variación del tiempo de almacenamiento (Tabla 3). El nivel de significación para la entrada y salida de las variables en el método de selección fue de 0.1 y 0.05, respectivamente.

De la tabla 3, se evidencia que por cada unidad de cambio de la concentración ng/ul, ésta representa un cambio negativo en el valor esperado en el tiempo de almacenamiento de -28.545 (unidades en días). Así mismo, por cada unidad de cambio en la relación 260/230 representa un cambio de 196.031 (unidades en días) en el tiempo de almacenamiento. Por último se realizó la amplificación de las muestras por PCR al utilizar cebadores específicos para el gen GAPDH. El 83,5 por ciento de las muestras amplificaron para el gen GAPDH utilizando una PCR normal. Las muestras amplificaron independiente del tiempo de almacenamiento de la muestra. En este caso sí tuvieron un gran peso las relaciones 260/280 y 260/230 que cualifican la calidad del ADN en relación con el proceso técnico en sí mismo (Figura 1).

DISCUSIÓN

Las muestras guardadas en los hospitales y que hacen parte de bancos de muestras tienen gran variabilidad. Esa variabilidad es producto de diferentes tiempos de almacenamiento, fluctuación en la temperatura, técnica en la toma de muestras, procesamiento, almacenamiento y transporte (10). Pese a ello, en este estudio no se evalúan el efecto de todos los factores, y solo evaluó como el tiempo de almacenamiento afecta la concentración del ADN (ng/uL) en muestras almacenadas entre 1 a 3 años. La disminución en la concentración en la muestra de ADN (ug/uL) representa un cambio negativo en el valor esperado en el tiempo de almacenamiento. Esto es explicable, dado que el ADN aunque es una molécula estable presenta una tasa de degradación (referencias). Se han reportado que muestras sanguíneas almacenadas a temperaturas de -70° C durante al menos 2 meses produce ADN de menor peso molecular. Este mismo fenómeno se apreció en muestras almacenadas a 23°C durante al menos una semana (14). Para el ADN aislado y almacenado seco hasta por 30 años se ha referenciado dificultad en el proceso de disolución y una alta probabilidad de degradación y fragmentación (14).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las variables estudiadas

	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Tiempo de almacenamiento	520	1135	930.27	153.288
Concentración de ADN (ng/ul)	0.81	5.54	3.3298	0.96024
R260/280	-5.22	14.17	2.0068	1.76074
R260/230	0.27	1.39	0.7606	0.19455

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de estudio (p-valor)

	Tiempo de Almacenamiento	Concentración de ADN (ng/ul)	R260/280	R260/230
Tiempo de almacenamiento	1	-0.211 (0.04)*	-0.047 (0.65)*	0.272 (0.01)**
Concentración de ADN (ng/ul)	-	1	-0.125 (0.22)	-0.129 (0.21)
R260/280	-	-	1	-0.043 (0.67)
R260/230	-	-	-	1

*Significativo al 0.05, ** significativo al 0.01

Tabla 3. Estimación del modelo de regresión lineal múltiple

	Coeficientes		T	p-valor
	B	Error típ.		
Constante	876.209	84.576	10.360	0.000
ng/ul	-28.545	14.475	-1.972	0.041
R260/230	196.031	77.107	2.542	0.013

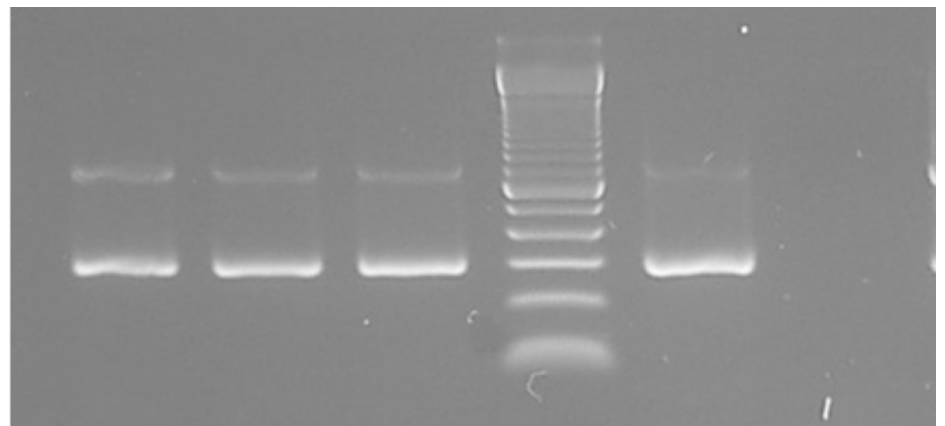


Figura 1. Gel de agarosa al 1% donde se amplifican 3 muestras, un control positivo y un control negativo. La tinción se realizó con Bromuro de Etidio. La banda principal amplifica a 300pb.

Uno de los factores que afecta y contribuye a la disminución de las propiedades del ADN es la molécula de hemoglobina (Hb). En el estado seco la Hb se somete a cambios oxidativos relacionados a los cationes reactivos de hierro (Fe). Estos cambios, sin embargo, no parecen aumentar la capacidad de la Hb para actuar como un reactivo más agresivo con el tiempo. Sin embargo, la presencia de la Hb en la vecindad del ADN en manchas de sangre secas crea la oportunidad para daño oxidativo en el azúcar desoxirribosa y las bases nitrogenadas del ADN (15). Por otra parte, los datos del presente estudio muestran una relación colineal entre la concentración del ADN y la relación 260/280, en donde cambios en el tiempo de almacenamiento generaron cambios en la concentración del ADN. En promedio las muestras analizadas independientes del tiempo transcurrido tienen una media para la relación 260/280 de $2,00\text{nm} \pm 1,76\text{nm}$. El ADN tiene una absorción máxima a 260nm, mientras la mayoría de las proteínas presentan una fuerte absorción a 280nm. Sin embargo, los ácidos nucleicos tienen una absorción significativa a 280nm lo que dificulta tener una medida precisa. Sin embargo, cuando se estudia la proporción A260/A280 para el ADN y esta se acerca a 1,8 nos indica que las muestras son puras (16).

Las muestras analizadas están en promedio por fuera de este rango y además presentan alta variación, lo que refleja gran cantidad de impurezas. Estas impurezas pueden ser hidratos de carbono, péptidos, fenoles, sales tampón, y otros compuestos aromáticos (17). Las impurezas encontradas no indican que el método de almacenar muestras de sangre en papel Whatman FTA incorpore contaminación, pero hay que reseñar que tampoco está diseñado para evitarla. El protocolo de extracción de ADN que se use debe contemplar una manera eficaz de eliminar las impurezas.

CONCLUSIONES

La disminución en la concentración en la muestra de ADN (ug/uL) representa un

cambio negativo en el valor esperado en el tiempo de almacenamiento. Las impurezas encontradas no indican que el papel Whatman FTA incorpore contaminación, pero tampoco está diseñado para evitarla.

REFERENCIAS

1. Fowler K, Reitter C, Walling G, Griffin D. Novel approach for deriving genome wide SNP analysis data from archived blood spots. *BMC Research Notes*. 2012;5(1):503.
2. Huw Vaughan S, Rosely Angela Bergamin N. Preparation of Parasitic Specimens for Direct Molecular Applications. *Handbook of Nucleic Acid Purification*: CRC Press; 2009.
3. Rajendram D. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *J Microbiol Methods*. 2006;67(3):582 - 92.
4. Bereczky S. Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72(3):249 - 51.
5. Higgins JA, Jenkins MC, Shelton DR, Fayer R, Karns JS. Rapid Extraction of DNA From *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for Use in PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001 November 1, 2001;67(11):5321-4.
6. Kraus R. Avian influenza surveillance with FTA Cards: Field Methods, Biosafety and Transportation Issues Solved. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;54:2832.
7. Inoue R. Simple and rapid detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus from pig whole blood using filter paper. *J Virol Methods*. 2007;141(1):102 - 6.
8. Gutierrez Corchero F. Using FTA(R) cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. *Mol Ecol Notes*. 2002;2(1):75 - 7.
9. Fujita Y, Kubo S-I. Application of FTA(R) technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. *Leg Med*. 2006;8(1):43 - 7.
10. Li W, Tse FLS. Dried blood spot

sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography*. 2010;24(1):49-65.

11. McCabe E, Huang S, Seltzer, Law M. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential application for newborn screen. *Hum Genet*. 1987;75:213 - 6.
12. Kammesheidt A, Kharrazi M, Graham S, Young S, Pearl M, Dunlop C, et al. Comprehensive genetic analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from dried blood specimens - implications for newborn screening. *Genet Med*. 2006;8:557 - 62.
13. Hardin J, Finnell R, Wong D, Hogan M, Horovitz J, Shu J, et al. Whole genome microarray analysis, from neonatal blood cards. *BMC Genetics*. 2009;10(1):38.
14. Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME, Reynolds JF. The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *American Journal of Medical Genetics*. 1987;27(2):379-90.
15. Marrone A, Ballantyne J. Changes in Dry State Hemoglobin over Time Do Not Increase the Potential for Oxidative DNA Damage in Dried Blood. *PLoS ONE*. 2009;4(4).
16. Ranta R. Treatment of unilateral posterior crossbite: comparison of the quad-helix and removable plate. *ASDC journal of dentistry for children*. 1988 Mar-Apr;55(2):102-4. PubMed PMID: 3280631.
17. Hansen TvO, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. 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 Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2007;16(10):2072-6.

Citar este artículo de la siguiente forma de acuerdo a las Normas Vancouver:

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