

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



INFORME DE PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN

TEC

Instituto Tecnológico de Costa Rica

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN
DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS HUMANAS Y
DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD PARA PCR**

María José Villalobos Quesada

*Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines
Servicio de Patología, Hospital San Juan de Dios*



Servicio de Patología
Hospital San Juan de Dios

Cartago, 2006

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN
DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS HUMANAS Y
DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD PARA PCR**

María José Villalobos Quesada

*Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines
Servicio de Patología, Hospital San Juan de Dios*

Cartago, 2006

RESUMEN

María José Villalobos Quesada*

A partir del desarrollo de la anatomía patológica se ha llegado a sustraer información a nivel molecular de los tejidos, conformando una nueva rama: la patología molecular. Las muestras fijadas en formalina y parafinadas, ampliamente utilizadas, son una invaluable fuente de información que puede ser aprovechada mediante técnicas moleculares y especialmente la PCR. Respondiendo a nuevas necesidades de diagnóstico anatomopatológico, este proyecto evaluó diferentes protocolos de extracción de ADN a partir de bloques parafinados pertenecientes a la CCSS y la calidad y viabilidad del ADN para la PCR. Se encontró que el protocolo más efectivo es el basado en extracción fenólica y que la calidad del ADN se ve profundamente afectada por el proceso de preservación al que se ven sometidos los tejidos, en los diferentes servicios de esta institución.

Palabras Clave: anatomía patológica, patología molecular, PCR, ADN, bloques parafinados, CCSS.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS HUMANAS Y DETERMINACIÓN DE SU CALIDAD PARA PCR

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Bach. Erick Hernández
Profesor Asesor: ITCR**

**Lic. Gerardo Jiménez
Asesor Externo: CIHATA**

**Dr. Adrián Suárez
Lector: Hospital Calderón Guardia**

DEDICATORIA

*A todos aquellos por quienes debemos de cambiar el mundo y quienes,
sin saberlo, caminan también conmigo.*

Para aquellos a quienes este proyecto pudiese llegar a ayudar.

AGRADECIMIENTOS

Gracias inmensas a todo el grupo de trabajo interinstitucional que estuvo a mi lado desde la formulación y planteamiento del proyecto:

Jiménez: por haberme introducido en el área de la biología que me hace soñar y darme la oportunidad de aprender ilimitadamente a su lado.

Bach. Hernández: por todas sus enseñanzas dentro y fuera de clases y por su incesante apoyo y criticidad.

Dr. Porras: por toda su energía y buena disposición. Porque sin importar los malos vientos, encontraba siempre una solución.

Dr. Suárez: su visión científico-humanista tan rara de encontrar y por sus sueños.

Dr. Meneses: por su visión de patólogo, que me era tan ajena. Por sus consejos y observaciones invaluable.

Dra. Salazar: por darme la oportunidad de trabajar en el Centro a su cargo y desarrollarme finalmente como profesional.

Dr. Jiménez y Dra. San Román: gracias por su deseo de concertación, iniciativa y apertura a las nuevas tendencias y opciones científicas.

Victoria, Lisa, Fio, Andrea, Nancy y todo el equipo del CIHATA: por ayudarme a aprender, cooperar en lo posible y volverse mis compañeras(os).

A todos los jefes servicio de Anatomía Patológica y patólogos que me tendieron la mano: Dr. Caro, Dr. Serra, Dr. Carranza, Dr. González, Dr. Alvarado, Dra. Mungía, Dr. Ramírez, Dr. Mena, Dr. Portugués, Dr. Guillén, Dr. Sánchez, Dr. Simpson, Dr. Báez y todos aquellos que ayudaron desinteresadamente en el proyecto, también es de ustedes.

Alberto y Adonai: por estar siempre allí, sin ustedes no hubiera sido posible.

A mis seres queridos:

Infinitas gracias a Zully y Youss: por estar siempre allí, en los buenos y malos ratos, con un abrazo esperándome, son un gran regalo.

Adri, mi madre y mi padre: por su interés, apoyo y amor constante, los amo montones. Gracias por las oportunidades y esfuerzos, que me han hecho feliz. Muy especialmente a mi madre, que no me ha abandonado ni en sus momentos más difíciles, cuando ha tenido que luchar y levantarse hermosa, que me acompaña siempre en mi corazón.

A mis amigos y compañeros de carrera: lo que vivimos se quedará conmigo, gracias por compartir sus vidas conmigo.

Mis más eternas gracias.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	4
<i>Objetivo General.....</i>	<i>4</i>
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>4</i>
REVISIÓN DE LITERATURA	5
METODOLOGÍA	15
<i>Tejidos.....</i>	<i>15</i>
<i>I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN</i>	<i>16</i>
<i>II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica CCSS.....</i>	<i>22</i>
<i>III. Conceptualización de la patología molecular en Costa Rica</i>	<i>22</i>
RESULTADOS.....	24
<i>I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN</i>	<i>24</i>
<i>II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica de la CCSS</i>	<i>28</i>

<i>III. Conceptualización de la patología molecular en Costa Rica</i>	<i>29</i>
DISCUSIÓN	31
<i>I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN</i>	<i>31</i>
<i>II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica de la CCSS</i>	<i>42</i>
<i>III. Conceptualización de la patología molecular en nuestro país.....</i>	<i>44</i>
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS	62

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido

<i>Cuadro 1.</i> Información básica sobre los iniciadores PC04 y GH20, los cuales amplifican una sección del gen de la β -globina.....	21
<i>Cuadro 2.</i> Cantidad de muestras evaluadas por protocolo, los correspondientes valores promedio de la concentración de ADN y la relación ADN/proteínas ($DO_{ADN/prot}$), obtenidas mediante espectrometría de luz UV, a partir de las muestras del HSJD.	26
<i>Cuadro 3.</i> Total de muestras del HSJD sometidas a cada protocolo de extracción y la proporción de amplificación según el método utilizado. ...	26
<i>Cuadro 4.</i> Tiempo empleado para el procesamiento de 10 muestras según el método utilizado.	28
<i>Cuadro 5.</i> Precio correspondiente al procesamiento de 10 muestras (extracción y PCR), según el protocolo utilizado.....	28
<i>Cuadro 6.</i> Cantidad de muestras procesadas mediante el Método Shi, procedentes de los diferentes servicios de anatomía patológica y proporción de amplificación del gen de la β -globina.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido

<i>Figura 1.</i> Electroforesis en gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio, del ADN extraído a partir de una misma muestra con los cinco protocolos evaluados..	25
<i>Figura 2.</i> Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa 2% con los productos de amplificación para el gen de la β -globina de 4 muestras distintas del HSJD extraídas mediante el método Shi.....	27
<i>Figura 3.</i> Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se puede observar claramente la contaminación del ADN extraído por tres diferentes protocolos a partir de una misma muestra procedente del HSJD.....	32
<i>Figura 4.</i> Genotipo del gen de la β -globina realizado mediante el secuenciador automático ABI-Prism 310.	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Contenido

ANEXO 1. Boletín Técnico, Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, SIGMA..	63
ANEXO 2. Método Miller <i>et al.</i> 1988, para extracción de ADN humano...	66
ANEXO 3. Encuesta: Conceptualización de las nuevas técnicas involucradas en la patología molecular en Costa Rica.....	67
ANEXO 4. Cotizaciones de Reactivos.....	69
ANEXO 5. Esquema del procesamiento de muestras para el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios	73

INTRODUCCIÓN

“La información que se está obteniendo en el estudio de las enfermedades al aplicar las técnicas de la biología molecular, está revolucionando la práctica de la medicina de forma que los anatomopatólogos, sino somos capaces de incorporarnos a este nuevo mundo del diagnóstico molecular, perderemos nuestro papel fundamental como diagnosticadores y alteraremos de forma irrevocable nuestra relación con los clínicos. Esta nueva interpretación de la enfermedad en términos de la patología molecular, no implica una renuncia y olvido de todos los conocimientos y técnicas que hasta ahora hemos adquirido con la patología celular; por el contrario, al actualizarse a un nuevo nivel de organización biológica, se comprende mejor la integración de todos, de forma que el panorama de la enfermedad se actualiza desde un nivel molecular hasta el conjunto de signos y síntomas que el médico aprecia en la cabecera del enfermo.”

Sanz (2002).

En torno a la anatomía patológica se ha generado una nueva subespecialidad: la patología molecular, en respuesta a las necesidades de las recientes corrientes de conocimientos, especificidad y complejidad de los diagnósticos. Esto ha permitido aplicar técnicas pertenecientes a la biología molecular, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR* por sus siglas en inglés), para ayudar a la aclaración de diagnósticos complejos.

En lesiones tumorales e infecciosas complejas, se han descrito y validado múltiples aplicaciones de la PCR para el diagnóstico clínico de alto rendimiento, alta especificidad, costo accesible y que disminuye el tiempo de análisis (Wistuba, 2001).

Ejemplos específicos de la aplicación de la PCR incluyen la detección de agentes infecciosos como bacterias (*Bartonella henselae*, enfermedad del arañazo de gato) y virus (como el Papilomavirus Humano, VIH, Epstein-Barr y virus Herpes en huéspedes inmunosuprimidos) (Basualdo *et al.*, 2004; Gravitt *et al.*, 2000; Margolis *et al.*, 2003; Zeaiter *et al.*, 2002). Asimismo, en la patología oncológica se han abierto las puertas al diagnóstico de la monoclonalidad en linfomas (rearreglo de receptores de

antígenos) y detección de translocaciones que definen ciertas enfermedades neoplásicas (linfomas, sarcomas y leucemias) (Hodges *et al.*, 2003; Rockman, 1999).

En algunos diagnósticos, se ha logrado establecer ventajas con el uso de las técnicas moleculares y muy especialmente con la PCR, comparados con otro tipo de técnicas tradicionalmente utilizadas. Por ejemplo, en los últimos años, esta técnica ha demostrado ser diez veces más sensible en la detección de reordenamientos clonales que la técnica de *Southern Blot*, por lo que se ha convertido en el método más usado para los estudios de linaje y clonalidad en las enfermedades linfoproliferativas (García *et al.*, 2002).

Sin embargo para lograr realizar estudios de este tipo, la recuperación de ácidos nucleicos en buen estado y libre de inhibidores, es imprescindible. Factores presentes durante el proceso de fijación y parafinación afectan directamente la calidad del ADN de los bloques de parafina (Cao *et al.*, 2003; Libório *et al.*, 2005).

En Costa Rica, se han realizado pruebas preliminares que han arrojado resultados valiosos respecto del estado del ácido nucleico de los tejidos parafinados. Éstos han sugerido limitantes de calidad y cantidad de ADN óptimo para PCR, lo que podría afectar el tipo de análisis o restringir la antigüedad de los bloques parafinados utilizados en este tipo de análisis (Jiménez, 2005).

Un estudio que incluya de manera conjunta muestras de diferentes servicios de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), puede determinar vías de investigación, cambios en protocolos de procesamiento o políticas institucionales referentes a este tipo de tejidos.

La necesidad de hacerle frente a nuevos retos médicos utilizando como herramienta la implementación de técnicas y tecnologías novedosas que permitan el mejor desempeño de la medicina, específicamente del área de anatomía patológica, es una realidad actual a la que se enfrenta la CCSS.

Conociendo las actuales herramientas de apoyo diagnóstico que brinda la patología molecular, el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA), en conjunto con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios, coordinaron esfuerzos interinstitucionales para desarrollar una investigación que permita justificar la implementación de técnicas de patología molecular, a partir de tejido parafinado, por medio de un laboratorio especializado. Esto podría llegar a desencadenar estudios que cubrirían factores epidemiológicos y clínicos propios de la sociedad costarricense.

Como herramienta iniciadora, el presente proyecto evaluó cinco protocolos distintos de extracción de ADN, a partir de muestras parafinadas originadas en los laboratorios de anatomía patológica de la CCSS. Posteriormente se determinó el estado del ADN y su viabilidad para la PCR diagnóstica (amplificación de fragmentos de una longitud suficiente para llevar a cabo pruebas diagnósticas) de tejido parafinado del Hospital San Juan de Dios y de ocho servicios más.

OBJETIVOS

Objetivo General

Implementar un protocolo eficaz de extracción de ADN a partir de biopsias parafinadas y determinar su calidad y viabilidad para la PCR, con el propósito de implementar en el futuro técnicas de patología molecular, como herramienta alternativa de diagnóstico médico en la CCSS.

Objetivos Específicos

1. Ensayar 5 protocolos de extracción de ADN.
2. Determinar cuál(es) protocolo(s) produce(n) ADN de calidad apto para la PCR diagnóstica, al amplificar un fragmento de un tamaño usualmente utilizado en el diagnóstico de diferentes patologías (mayor que 250pb).
3. Probar la viabilidad del ADN obtenido para la PCR, utilizando iniciadores específicos para el gen de la β -globina.
4. Determinar el porcentaje de amplificación del ADN, del material parafinado de los diferentes servicios, obtenido según el protocolo seleccionado.
5. Determinar la necesidad del sector anatomopatológico de implementar métodos de diagnóstico molecular y las condiciones actuales de la patología molecular en la CCSS.

REVISIÓN DE LITERATURA

La **anatomía patológica** es la rama de la medicina que diagnostica las lesiones por medio de cambios morfológicos a nivel macro y microscópico. Esta especialidad requiere de un conocimiento extenso de las ciencias básicas y medicina clínica, a la que se han incorporado nuevos conocimientos basados en las ciencias biológicas fundamentales (biofísica, biología molecular y genética molecular, entre otras) para la solución de los problemas que plantean las enfermedades (Bernal val y Garito, 2003).

La patología tradicional se ha visto enriquecida con técnicas de diferente índole: microscopía electrónica, difracción a rayos X, inmunohistoquímica, citometría estática y de flujo, microarrays, proteómica, genómica, microscopía láser confocal, informática y otras (Bernal val y Garito, 2003).

El progreso reciente de técnicas pertenecientes a la biología molecular y la expansión acelerada del conocimiento de las bases genéticas y moleculares de las enfermedades humanas, han tenido un impacto significativo en la anatomía patológica; especialmente en el conocimiento de la patogenia de enfermedades, mejor comprensión de fenómenos clínicos y desarrollo de herramientas diagnósticas. El análisis de alteraciones genéticas ha aumentado su importancia, inclusive para el diagnóstico patológico práctico (Dumler y Valsamakis, 1999; Noguchi *et al.*, 1997).

Bajo las nuevas técnicas y conocimientos que ha arrojado la biología molecular a la anatomía patológica, se ha conformado la patología molecular. Ésta se define por las técnicas que aplica y los elementos que analiza; ácidos ribonucleico (*ARN*) y desoxirribonucleico (*ADN*), a partir de muestras de tejidos (especímenes de biopsias o autopsias) o células (exámenes citológicos) (Wistuba, 2001).

Entre las técnicas más utilizadas en la patología molecular se pueden mencionar: Southern Blot, Slot, Dot o Spot Blot, PCR y PCR de transcripción inversa (TR-PCR), electroforesis en gel, hibridación *in situ*,

secuenciación, Western Blot y análisis de proteína truncada (Wistuba, 2001).

Aunque podría considerarse que esta reciente subespecialidad posee actualmente una aplicación práctica limitada, e incluso incipiente en Costa Rica, presenta no sólo un gran potencial científico, sino también médico-práctico.

Inicialmente las pruebas de diagnóstico molecular disponibles en la patología molecular, fueron desarrolladas privilegiando la sensibilidad y la especificidad, con el objetivo de mejorar los métodos tradicionales de diagnóstico microbiológico y médico; a la espera de la incorporación de técnicas automatizadas, que permitan disminuir el costo y tiempo de ejecución (Morén, 1999).

El número de exámenes de diagnóstico que emplean técnicas y principios de biología molecular ha ido aumentando en los últimos años y están referidos principalmente a la detección de microorganismos y virus, diagnóstico de enfermedades hereditarias y diagnóstico auxiliar de neoplasias. Se ha aplicado especialmente en estudios de predisposición genética, población de riesgo, determinación de cánceres, micrometástasis, progresión tumoral, selección de terapias y evaluación del pronóstico de la enfermedad (Wistuba, 2001).

Actualmente, la mayor parte de los diagnósticos anatomopatológicos tradicionales se llevan a cabo en tejidos, que han sido fijados en formalina e incluidos en bloques de parafina que son posteriormente cortados y teñidos en láminas de vidrio. Sin embargo, la conservación óptima de los tejidos para análisis moleculares es su congelación inmediata a -70°C . Criopreservar los tejidos pertenecientes a los laboratorios de anatomía patológica es la mejor manera de conservar los ácidos nucleicos de este tipo de muestras (Arnal *et al.*, 2002; Díaz y Brady, 1997; Hill *et al.*, 2002; Wistuba, 2001).

Debido a las características de espacio, equipo, presupuesto y necesidades inmediatas, muchas instituciones no han creado este tipo de bancos de conservación criogénica, como es el caso de la CCSS.

La PCR en la patología molecular

Entre la gama de técnicas de la biología molecular aplicadas a la patología molecular, la PCR ha sido especialmente atractiva para las pruebas clínico-moleculares. El gran descubrimiento, proclamado por la revista *Science* como el mayor hallazgo científico en 1989, ha revolucionado la aplicación de la genética molecular al diagnóstico médico (López *et al.* 1998).

El análisis del ADN a partir de las muestras parafinadas ha sido una de las primeras aplicaciones de la PCR. Las primeras extracciones reportadas datan de los años 1985-86, por Goelz *et al.* y Dubeau *et al.* respectivamente. Ambas probaron que ADN genómico puede ser extraído y sometido a amplificación y a análisis de rearrreglos eficientemente (Noguchi *et al.*, 1997).

Entre los beneficios reconocidos que brinda esta técnica, está la posibilidad de usar muestras pequeñas, versatilidad de tejidos analizables (tejido fresco, congelado o fijado y parafinado) y la capacidad de detección de un espectro importante de anomalías genéticas, que van, desde las alteraciones en la estructura cromosomal (como translocaciones y deleciones), hasta mutaciones puntuales en genes individuales (National Institutes of Health, 2005).

Se han presentado dos factores limitantes en la extracción de ADN a partir de muestras parafinadas: la calidad y cantidad del material genético. Ante esto, la eficiencia de los procedimientos de extracción se ha convertido en un punto crítico para el éxito de la aplicación de la PCR en este tipo de tejidos preservados, por lo que se han desarrollado múltiples y muy diversos protocolos de extracción de ADN (Chan *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2001).

Múltiples factores parecen incidir en la calidad molecular de las muestras parafinadas, se ha encontrado inclusive que variaciones en el fijador (naturaleza, concentración, temperatura, pH), tiempo de fijación, tamaño del tejido/órgano fijado, edad del bloque y procedimiento de extracción, entre otras, pueden interferir de manera importante en la calidad y

cantidad de ADN extraíble (Chan *et al.* 2001, Forsthoefel *et al.* 1991, Frank *et al.* 1996, Jiménez 2005, Libório *et al.* 2005, Sato *et al.* 2001, Shi *et al.* 2002).

Debido a que el ADN extraído de muestras parafinadas se encuentra a menudo muy degradado, se hace difícil analizarlo por medio de técnicas que requieran ADN de alta integridad, como la Southern Blot (Morén, 1999; Noguchi *et al.*, 1997).

Indudablemente la apropiada fijación de los tejidos se ha convertido en el paso más importante para obtener material para un diagnóstico molecular posterior y su calidad afecta directamente cualquier paso subsiguiente.

La fijación de los tejidos

Básicamente la fijación estabiliza las proteínas del espécimen y evita los cambios post-mortem típicos, ataques microbianos y procesos metabólico-enzimáticos como la autólisis celular (StatLab, 2005).

Más allá, los fijadores también producen un contraste entre los diferentes constituyentes del tejido mediante diferencias en los índices de refracción y protegen al espécimen de los efectos desnaturizantes de los agentes deshidratantes y otras sustancias, que son utilizadas en el procesamiento posterior de este tipo de muestras (StatLab, 2005).

Los fijadores alteran la estructura química original del tejido fijado y causan cambios físicos importantes en los constituyentes celulares y extracelulares.

Los fijadores desnaturizan las proteínas por coagulación, lo que causa cambios conformacionales en las estructuras proteicas, inactivando las enzimas. Como es de esperarse, los complejos resultantes difieren de las proteínas no desnaturizadas que les dieron origen (Farmilo y Stead, 2001).

Cambios físicos como la alteración de la membrana celular, que permite el paso de moléculas grandes hacia o fuera de la célula, son causados por la exposición celular a los agentes fijadores. El citoplasma sufre una transformación de su estado convirtiéndose en una red proteica porosa.

Diferentes fijadores tienen como resultado diferentes grados de porosidad. Aquellos fijadores con acción coagulante, como el B5, generan poros más grandes que aquellos que no poseen este efecto, como la formalina (Farmilo y Otead, 2001).

El método de fijación en los laboratorios de histopatología se basa por lo general en agentes químicos. Éstos rompen o se combinan con las proteínas, de manera que afectan su estructura. Se han diseñado además otros para preservar carbohidratos o lípidos, pero no son utilizados con frecuencia debido a que los anatomopatólogos requieren la preservación de la microanatomía del tejido (Farmilo y Stead, 2001; StatLab, 2005).

Inicialmente se buscaba que los fijadores y técnicas de fijación preservaran los caracteres morfológicos, pero a lo largo del tiempo, los nuevos avances en histoquímica, inmunohistoquímica y biología molecular, han hecho que los criterios para determinar un buen estado de fijación hayan cambiado (Farmilo y Stead, 2001).

Se ha encontrado, que en ocasiones, los fijadores interfieren con el desempeño de los teñidos histoquímicos, con las interacciones antígeno/anticuerpo (modifican o enmascaran los sitios activos) o afectan la estructura de los ácidos nucleicos (StatLab, 2005).

La formalina es el fijador de rutina más utilizado. Este agente crea enlaces entrecruzados sobre el 40-60% de los residuos de lisina presentes en el exterior de las moléculas proteicas. Además convierte las proteínas solubles en estructurales (insolubilizándolas), lo que le da una estructura de mayor fuerza mecánica al tejido fijado (Díaz y Brady, 1997).

En la patología, la formalina ha sido utilizada por muchos años. Es así como los criterios utilizados por los anatomopatólogos para el diagnóstico de muchas enfermedades, se han establecido en secciones de tejido fijados en formalina, cubiertos con parafina y posteriormente cortados y teñidos con hematoxilina y eosina. Durante más de un centurio, se han establecido bancos de tejidos parafinados alrededor de todo el mundo, los cuales son fuente invaluable para estudios de cáncer y otras enfermedades (Shi *et al.*, 2002).

En Costa Rica, el registro más amplio de biopsias parafinadas se encuentra en manos de la CCSS, la cual data de la década de los cuarentas.

Aislamiento de ADN de tejidos parafinados

El ADN humano se encuentra dentro de las células, atrapado en una red de proteínas y en conjunto conforma veintitrés cromosomas. Éste debe ser liberado para ser utilizado como blanco de las enzimas utilizadas en los análisis de biología molecular. Usualmente esto se logra mediante una secuencia de pasos de lisis celular, degradación de proteínas utilizando una proteinasa y remoción de péptidos del lisado mediante extracción orgánica. Como último paso, se recobran los ácidos nucleicos por precipitación con etanol y cloruro de sodio (Mies, 1996).

El anterior proceso y otras variaciones, usualmente utilizados en tejidos frescos, han sido adaptados a las muestras parafinadas.

Por lo general las técnicas de extracción de ADN, a partir de bloques parafinados, se realizan en tres pasos: desparafinación, digestión y purificación, a cabo a partir de cortes de tejido entre los 5µm y los 10µm. Después de desparafinar el tejido con xilol, se revierte la deshidratación con diferentes concentraciones de etanol, se deja secar y se incuba en un amortiguador que contiene un detergente (usualmente duodecil sulfato) y proteinasa K. Subsecuentemente se inactiva la enzima a alta temperatura y se centrifuga para obtener un sobrenadante que contiene el ADN. La extracción orgánica con fenol y cloroformo, para limpiar el sobrenadante de proteínas, es usual pero en algunos casos resulta prescindible. Luego se precipita el ADN en isopropanol y se resuspende (Coombs *et al.*, 1999; Mies, 1996).

De manera alternativa se han desarrollado otros métodos, uno de ellos es el que utiliza agentes quelantes como el Chelex-100 (agente polivalente) para proteger las cadenas simples de ADN durante su aislamiento y extracción. Otros métodos incluyen la fundición de la parafina con microondas o digestión directa del tejido. Además se han diseñado kits

comerciales específicos para la extracción de ADN de estos tejidos, los cuales utilizan columnas, resinas u otros métodos (Coombs *et al.*, 1999; QIAGEN, 2003a; Mies, 1996; Sigma-Aldrich, 2005).

Algunos investigadores han simplificado el proceso hasta utilizar lisados crudos obtenidos mediante calor de las muestras desparafinadas. Como es de esperarse, los resultados indiscutiblemente dependen del estado inicial de los ácidos nucleicos de las muestras parafinadas utilizadas. Este método ha sido reportado en algunos casos como ineficiente (Frank *et al.*, 1996).

De manera general, se ha reportado ampliamente la extracción satisfactoria de ácidos nucleicos adecuados para análisis moleculares utilizando diversas metodologías. Entre las técnicas aplicadas a estos tejidos se encuentra: el clonaje, hibridación, digestión por endonucleasas y secuenciación directa (Bernstein *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002; Mies, 1996; Nadji *et al.*, 1996; Rockman, 1999; Wong *et al.*, 1998).

Uso de las muestras parafinadas para la PCR

Los especímenes fijados en formalina y parafinados representan una importante fuente de material biológico para la investigación retrospectiva. Éstos brindan la posibilidad de estudiar un gran número de individuos con patologías diversas, que de otro modo habrían sido muy difíciles de obtener, prescindiendo del manejo de los pacientes (Bernstein *et al.*, 2002; Mies, 1996).

Permite además estudiar el papel de agentes virales en linfomas y enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple, enfermedad celíaca y miocarditis infantil (Bernstein *et al.*, 2002; Mies, 1996; Veríssimo *et al.*, 2004).

Otra ventaja de utilizar muestras parafinadas es que se pueden localizar puntos específicos de tejido, mediante guías teñidas con hematoxilina y eosina. Investigadores han diseñado técnicas que van, desde seleccionar manualmente el tejido, hasta utilizar ondas ultravioletas cortas para

degradar los ácidos nucleicos de aquellas células que no son de interés y proteger las células blanco con tinta negra (Mies, 1996).

Pero quizás el beneficio más importante es que obvian la necesidad de tejido fresco para el diagnóstico molecular. Lo cual resulta muy ventajoso en casos *post-mortem* y estudios retrospectivos (Bernstein *et al.*, 2002; Mies, 1996).

Otros factores a favor que se pueden mencionar son: la buena conservación del tejido para análisis histológicos, fácil manejo y práctico almacenamiento, con pocas necesidades de espacio físico (Mies, 1996).

Pero las desventajas resultan también de peso y por lo general se relacionan con aspectos técnicos. A pesar de que la arquitectura de los tejidos se preserva, la extracción de los ácidos nucleicos generalmente se reduce a recuperar ADN degradado. El aislamiento de ácidos nucleicos a partir de bloques de parafina es usualmente, pero no siempre, exitosa (Coombs *et al.*, 1999).

Se ha encontrado que la formalina induce al ADN a formar enlaces entrecruzados con proteínas, lo que lo vuelve rígido y susceptible, incluso a daños mecánicos (StatLab, 2005).

Mientras que el ADN fragmentado limita de manera significativa los análisis de estructura genética y número de copias al utilizar los análisis convencionales de Southern Blot, es un sustrato viable para amplificaciones utilizando la PCR. Esta técnica se ha convertido en la más usada para realizar análisis sobre muestras parafinadas. En realidad, las técnicas para extraer y amplificar ADN de bloques parafinados utilizando la PCR, han sido ya aplicadas aproximadamente por dos décadas (Bernstein *et al.*, 2002; Mies, 1996).

La degradación del ADN durante la fijación en formalina se puede deber según Noguchi y colaboradores (1997) no a un efecto directo de la fijación, sino causada por ADNasa endógena activa que se encuentra en el tejido, cuyo efecto se puede reducir utilizando EDTA para bloquearlas.

La fijación, utilizando este método, produce degradación y fragmentación del ADN y ARN, por lo que no se recomienda amplificar fragmentos de

más de 400pb por algunos autores, mientras que otros recomiendan utilizar fragmentos blanco no mayores a las 200pb. Otros investigadores, como Díaz y Brady (1997), reportan que en general, sólo es posible amplificar mediante PCR fragmentos menores que 250pb (Arnal *et al.*, 2002; Coombs *et al.*, 1999).

Pero han sido reportados fragmentos de mayor tamaño, como lo muestra el estudio de Jiménez (2005), realizado en muestras del año 2004 y primer semestre del 2005, pertenecientes a casos de linfomas no Hodgkin en muestras provenientes de la CCSS. En este último estudio fue posible obtener productos de amplificación de hasta 600pb (en el caso de parafinadas de una semana o menos), contrario a tejidos parafinados de más de una semana de procesados, en donde la posibilidad de extraer ADN amplificable es menor que 50% (Jiménez, 2005).

Además han sido reportados inhibidores de la *Taq polimerasa*, en las extracciones a partir de tejido parafinado, las cuales generan falsos negativos. La extracción orgánica con fenol y cloroformo, columnas cromatográficas o la simple dilución de los ácidos nucleicos aislados, pueden eliminar los inhibidores (Mies, 1996).

Una de las desventajas más notables es la contaminación cruzada de los tejidos en los laboratorios de histología durante su procesamiento debido a su manejo rutinario, lo cual es difícil de controlar y manejar. Es necesario aclarar que eliminar la contaminación que ocurre en el laboratorio de histología durante las fases iniciales de la inclusión en parafina resulta imposible, en el sentido práctico de los laboratorios hospitalarios (Mies, 1996).

También se puede producir contaminación, a la hora de realizar los cortes de parafina con el microtomo para someterlos a la extracción. Para lo cual es imprescindible utilizar hojas nuevas para cada muestra, o al menos asegurarse que una sección limpia de la hoja sea utilizada para cada una. El microtomo debe mantenerse limpio, el exceso de parafina y fragmentos de tejido deben ser eliminados (Mies, 1996).

Aunque la aplicación de la información genética (tanto ADN como ARN) de las muestras parafinadas ha sido aprovechada a nivel mundial, la determinación del estado propio de las muestras de los servicios costarricenses no ha sido realizada sistemáticamente. Realizar un diagnóstico del estado de los procesos de preservación de tejidos, se vuelve imprescindible ante las corrientes científicas y médicas actuales.

METODOLOGÍA

El estudio evaluó cinco distintos protocolos de extracción de ADN a partir de material fijado en formalina y parafinado:

- § **Protocolo 1:** Método propuesto por Shi y colaboradores (2002), está basado en desparafinación utilizando xilol, rehidratación con alcoholes, digestión con Proteinasa K, extracción fenólica y precipitación del ADN.
- § **Protocolo 2:** Método reportado por Frank y colaboradores (1996) en el que se desparafina con xilol, se hidrata con etanol y se somete el tejido a digestión enzimática. Se obtiene ADN no purificado.
- § **Protocolo 3:** Método utilizado por el CIHATA y el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid, método corto en el que se funde la parafina de los tejidos con calor, se digieren y se utiliza un agente quelante: Chelex-100.
- § **Protocolo 4:** Método corto, en el cual la desparafinación se realiza con xilol, se rehidrata con etanol y se extrae el ADN mediante radiación de microondas.
- § **Protocolo 5:** Kit comercial marca SIGMA Extract-N-Amp.

Se determinó a partir de cuál protocolo se obtiene ADN de mejor calidad para la PCR diagnóstica. Se procedió a realizar las pruebas de viabilidad del ADN para la PCR, utilizando los iniciadores para el gen de la β -globina.

Complementariamente se desarrolló una encuesta con el fin de establecer la percepción y necesidades hospitalarias de la CCSS ante las técnicas de la patología molecular.

Tejidos

Las muestras corresponden a cervix uterinos producto de conizaciones y LEEPs fijados en formalina buferizada al 10%, con excepción del Hospital Nacional de Niños, e incluidas en parafina. Las mismas fueron donadas por los servicios de anatomía patológica de los hospitales centrales de la CCSS: San Juan de Dios (HSJD), Nacional de Niños (HNN), México (HM),

Calderón Guardia (HCG) y Hospital de la Mujer Carit (HMC) y periféricos: Max Peralta de Cartago (HMP), Toni Facio de Limón (HTF), San Carlos (HSC) y Escalante Pradilla de Pérez Zeledón (HEP). Cada hospital envió diez muestras de su banco de biopsias.

Las muestras del HNN, por tratarse de un hospital que atiende población infantil, corresponderán a: linfoma Hodgkin (3 casos), tumor congénito pulmón (1 caso), teratoma (1 caso), tumor de base hígado (1 caso), ependimoma (2 casos), osetosarcoma (1 caso), tiroides (1 caso). Este servicio fija los tejidos en formalina buferizada al 15%.

En el caso del hospital: Escalante Pradilla cinco muestras procederán del archivo y otras cinco fueron procesadas en formalina buferizada al 10% dada por el HSJD, para determinar si existe alguna variación entre la formalina utilizada en ese servicio y a la que anteriormente se le verificó su calidad.

Los periodos de almacenamiento de los bloques no excedieron los dos años en ninguno de los servicios.

Cada muestra se archivó y detalló la información respectiva a su procedencia, procedimiento de fijación y número de archivo.

Los cortes de los bloques de parafina se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de cada protocolo y se colocaron en un microtubo (vial) de plástico de 1,5ml. Por cada bloque se prepararon dos microtubos para cada protocolo de extracción.

I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN

Se realizaron extracciones por duplicado de diez bloques siguiendo cinco protocolos distintos, únicamente a partir de material fijado en formalina y parafinado del HSJD, con periodos de almacenamiento, desde los 7 meses y medio, hasta los 15 días.

Protocolos de extracción:

- a. *Método Shi:* En un microtubo de 1,5ml se colocaron dos cortes de 10 μ m de tejido parafinado. Para desparafinarlos se agregó en dos ocasiones 1ml de xilol 100% por 30 minutos, se invirtieron los

microtubos varias veces, se centrifugaron a 12 000g por 10 minutos en una Centrifuge 5415C eppendorf y se descartaron los sobrenadantes. Para rehidratar gradualmente el tejido y retirar los excesos de xilol, se agregó 1ml de etanol al 100%, se invirtieron varias veces, se agitaron manualmente los microtubos y se dejaron reposar por 30 minutos. Luego, se centrifugaron a 12 000g por 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Se llevó a cabo el mismo paso con 1ml de etanol al 70%. Acto seguido se lavaron las muestras dos veces con 1ml de PBS, se agitaron de la misma manera y luego de 15 minutos se centrifugaron. Después de descartar el PBS, se agregaron 500µl de amortiguador de lisis (50µl de Proteinasa K 20mg/ml; 10µl de Tris-HCl 1M; 2µl de EDTA 0,5M; 100µl de SDS 10% y 838µl de agua destilada) y se incubaron las muestras toda la noche a 52°C bajo agitación continua en un Thermomixer compact eppendorf. Para obtener el ADN se fenolizó el tejido digerido con 500µl de fenol:cloroformo:isomilalcohol (25:24:1), se invirtieron varias veces los microtubos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12 000g por 5 minutos. El sobrenadante acuoso se removió a otro microtubo de 1,5ml; se le agregó 0,1 volumen de acetato de sodio 3M y se agitaron manualmente los microtubos. Posteriormente se adicionó un volumen de isopropanol y se dejó toda la noche a -20°C. Luego el ADN precipitado se centrifugó a 12 000g a 4°C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó una vez con 1ml de etanol 70%. Después de centrifugar a 12 000g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. El ADN seco se disolvió en 50µl de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C.

- b. *Método Frank:* Se colocaron 2 cortes de 5µm en un microtubo donde luego se agregó 100µl de xilol y 100µl de etanol 100%, se mezcló suavemente y centrifugó 10 minutos a 12 000rpm en una Centrifuge 5415C eppendorf. Se decantó la mezcla xilol:etanol y se

dejó secar el tejido a 55°C. Posteriormente se resuspendió el botón en 250µl de Tris pH 8,3 (200ng/µl Proteinasa K) y se incubó en este amortiguador de lisis toda la noche a 37°C en agitación continua, en un Thermomixer compact eppendorf. Después de la incubación se colocaron los tubos por 8 minutos a 100°C, para inactivar la enzima y se colocó el ADN extraído 5 minutos en hielo. Se utilizó para PCR sin purificar. Se almacenó el extracto a -20°C.

c. *Método Chelex*: Se colocaron tres cortes del tejido parafinado de 10µm de grosor en un microtubo de 1,5ml; se agregaron 100µl de amortiguador Tris 50mM pH 8.0 y se fundieron los cortes a 100°C durante 10 minutos y se dejaron enfriar. Posteriormente se agregó 5% de Proteinasa K (20mg/ml) y se dejó incubando toda la noche a 55°C en agitación continua en un Thermomixer compact eppendorf. Al día siguiente se añadió 5% de Chelex al 5%, se incubó por 30 minutos a 55°C en agitación continua; luego a 100°C durante 5 minutos para inactivar la enzima y se centrifugó a 12 000g durante 15 minutos a temperatura ambiente en una Centrifuge 5415C eppendorf. Finalmente se trasvasó el sobrenadante que contiene el ADN a un microtubo de 500µl limpio y se almacenó a -20°C.

d. *Método microondas*: Cinco cortes de 4µm de tejido parafinado se colocaron en un microtubo de 1,5ml; se desparafinaron dos veces: se agregó 1ml de xilol, se agitaron manualmente, se centrifugaron a 12 000rpm durante 3 minutos en una Centrifuge 5415C eppendorf y se retiró el sobrenadante. Luego se agregó 1ml etanol absoluto, volviéndose a centrifugar a 12 000rpm por 3 minutos; se repitió este paso con 1ml etanol 70%. Se retiró el etanol y se dejó secar durante 15-30 minutos. Una vez seco, se procedió a lavar con un amortiguador de parafinas (Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 500mM, MgCl₂ 15mM), se centrifugó a 12 000rpm por 3 minutos y se decantó el amortiguador. Para resuspender el botón obtenido,

se agregó el amortiguador de parafinas hasta cubrirlo. Se sometió a radiación en el microondas MCoven (600W) durante 6 minutos a potencia media, deteniéndolo cada 15 segundos para evitar el sobrecalentamiento, se centrifugó 4 minutos a 12 000rpm y se pasó el sobrenadante a un microtubo limpio para su almacenamiento a -20°C.

- e. *SIGMA Kit*: Se utilizó el kit comercial Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma- Aldrich). Antes de utilizar el kit, se desparafinaron las secciones de tejido, siguiendo el protocolo proporcionado por esta misma casa comercial. Para esto se disolvieron cuatro cortes de 10µm en 400µl de xilol en un microtubo y se mezclaron con vórtex (Vortex Mixer Model VM-1000 Digisystem Lab. Instruments). Posteriormente la muestra se incubó por 30 minutos a 37°C en un Thermomixer compact eppendorf y se le dio vórtex dos veces durante este tiempo. Después se centrifugó en una Centrifuge 5415C eppendorf por 5 minutos a 13 000g y se descartó el xilol. A continuación se agregaron 100µl de etanol:xilol (80:20) y la muestra se incubó 30 minutos a 37°C, se centrifugó 5 minutos a 13 000g y se descartó el sobrenadante. Por último se añadió 400µl de etanol al 100%, se incubó por media hora a 37°C, se centrifugó 5 minutos a 13 000g y se descartó el etanol. Una vez desparafinadas se utilizó el kit Extract-N-Amp, según el protocolo del fabricante. Se agregaron 100µl de la “solución de extracción” y 25µl de “solución de preparación del tejido” en un microtubo y se pipetearon suavemente para mezclarlas. Luego se colocó el tejido desparafinado en la solución y se mezcló bien con vórtex. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y a 95°C por 3 minutos. Finalmente se agregó 100µl de la “solución de neutralización B” a la muestra y se mezcló con vórtex (el boletín técnico se puede encontrar en el *Anexo 1*).

Los cinco métodos se evaluaron según varios parámetros: integridad, pureza, concentración y calidad del ADN y precio/tiempo de procesamiento por muestra. El protocolo considerado como el más eficiente, se usó para el procesamiento de las muestras de los otros servicios de anatomía patológica de los demás hospitales.

I.a. Prueba de integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa:

Se valoró el ADN total obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio y se determinó su peso contra un marcador de peso molecular. Se analizaron las fotografías mediante el software Kodak Digital Science 1D.

I.b. Evaluación de la pureza y concentración del ADN por espectrofotometría de luz U.V.:

Una vez extraído y purificado el ADN de una muestra biológica, una parte importante de las técnicas que se emplean para su posterior caracterización, clonaje o secuenciación; requieren conocer la concentración de la solución de partida, por lo que se procedió a cuantificar el ADN por espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 y 280nm (utilizando un Nicolet Evolution 300, Termo Electron Corporation) (Martínez y Morcillo, 2004).

Se determinó la concentración de ADN utilizando el valor de la absorbancia a 260nm (densidad óptica del ADN = DO_{ADN}). Debido a que los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN corresponden a una absorbancia máxima de 260nm, es posible determinar su concentración mediante este método (UPR, 2004).

Se considera que los datos de la DO_{ADN} son confiables cuando se encuentran entre 0,1 y 1,0 (QIAGEN, 2003b).

Además se obtuvieron los datos de la relación ADN/proteínas ($DO_{ADN/prot}$), equivalentes a la proporción de las absorbancias obtenidas a 260nm/280nm. La absorbancia proteica a 280nm se debe principalmente al grupo fenólico de la tirosina y al indólico del triptófano. Se considera

como ADN con un buen nivel de pureza cuando el valor de la $DO_{ADN/prot}$ se encuentra entre 1,5 y 2,0 (BMG LabtechApplication, 2002; Marquart, 2005; University of Toledo, 2004; UPR, 2004).

I.c. Determinación de la viabilidad de amplificación del ADN para la PCR:

Se determinó la viabilidad del ADN extraído para la PCR utilizando los iniciadores PC04 y GH20, los cuales amplifican una sección de un gen humano constitutivo: el gen de la β -globina (Cuadro 1). Este par de iniciadores son usualmente utilizados para monitorear el estado de la muestra y la PCR (Cohen *et al.*, 2005; Dongen van *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Información básica sobre los iniciadores PC04 y GH20, los cuales amplifican una sección del gen de la β -globina.

Iniciadores	Secuencia	Temperatura apareamiento	Fragmento esperado	Cita
PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	55°C	267pb	Dongen van <i>et al.</i> , 2003.
GH20	5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'			

Para llevar a cabo la amplificación se utilizó para la mezcla de PCR: amortiguador de PCR 1X; dNTP's 0,2mM; $MgCl_2$ 2mM; 0,5pmol de PC04 y GH20 respectivamente; 2 μ l ADN y 1U Taq-polimerasa, para un volumen final de 25 μ l. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems.

En el caso de las muestras extraídas mediante el kit comercial, la mezcla de reactivos, según las indicaciones del fabricante, para llevar a cabo la PCR fue la siguiente: 10 μ l de "mezcla de reacción", iniciadores PC04 y GH20 0,5pmol cada uno y 4 μ l de muestra, para un total de 20 μ l.

Se utilizó un perfil de amplificación, validado previamente por el CIHATA: pretratamiento de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, sucedido por 10 minutos de extensión final a 72°C.

La valoración de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3% que se reveló con bromuro de etidio. Se corrieron 8 μ l de

muestra contra un marcador de peso molecular de 100pb, un control positivo de amplificación y un control negativo o blanco de reactivos. El control positivo de amplificación se preparó a partir de ADN de sangre periférica de hígado fresco extraído con el Método reportado por Miller *et al.* (1988) (Anexo 2).

I.d. Cálculo del tiempo de procesamiento de muestras por protocolo y precio por muestra:

Se determinaron otros parámetros de comparación entre los protocolos que resultan importantes en la implementación y aplicabilidad:

- Precio en colones para procesar 10 muestras: incluye únicamente los reactivos y mano de obra calificada (se asignó el precio por hora de un bachiller universitario).
- Tiempo de procesamiento de 10 muestras, según el método utilizado.

II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica CCSS

Se realizaron las extracciones de los materiales de los servicios de los hospitales HSJD, HNN, HM, HCG, HMC, HMP, HTF, HSC y HEP, utilizando el método considerado más efectivo. Se evaluó la extracción mediante un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio.

Posteriormente se realizó la PCR, para el gen de la β -globina, bajo las condiciones de amplificación descritas y se determinó el porcentaje de amplificación de las muestras por hospital, al evaluar los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2%, revelado con bromuro de etidio.

III. Conceptualización de la patología molecular en Costa Rica

Se realizó una encuesta escrita: “Conceptualización de las nuevas técnicas involucradas en la patología molecular en Costa Rica” (Anexo 3), para establecer la percepción y necesidades hospitalarias de la CCSS ante las aplicaciones de la patología molecular. La entrevista se realizó a

once anatomopatólogos de cinco diferentes servicios de la CCSS involucrados con el proyecto y un biólogo con amplia experiencia en el diagnóstico molecular de enfermedades humanas.

RESULTADOS

I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN

I.a. Prueba de integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa:

Cada protocolo de extracción de ADN mostró un patrón de corrida constante. La *Figura 1* muestra un resumen de los resultados.

El Método Chelex se caracterizó por un barrido intenso y largo. Según señala el marcador de peso molecular, se observa una nubosidad prominente en el área cercana a la banda de 10 000pb. Este método logró recobrar ADN visible en 9/10 de las muestras, en donde además se pudo observar una fluorescencia clara en los pozos.

Se observaron barridos largos medianamente intensos resultantes del Método Shi. En este caso el barrido se intensifica, cerca del final del carril, entre las 600pb-300pb (según el marcador de peso molecular). También se puede observar fluorescencia en los pozos. En este caso, fue posible visualizar ADN en el gel en 9/10 muestras.

El protocolo diseñado por Sigma mostró bandas entre las 1 000-600pb, sin barrido y también presentó fluorescencia en los pozos. De las diez muestras analizadas, sólo una de las extracciones fue imposible de visualizarse en el gel de agarosa.

A partir del Método Frank, se recobró ADN cerca de las 80-100pb en todas las extracciones. Utilizando este método se obtuvo ADN visible en 6/10 muestras analizadas en forma de un barrido tenue, que se incrementa alrededor de las 300bp.

El Método Microondas mostró un barrido tenue por debajo de las 80-100pb, corto y poco intenso en todas las muestras extraídas. No se logró recobrar ADN de mayor peso en ninguna de las extracciones realizadas.

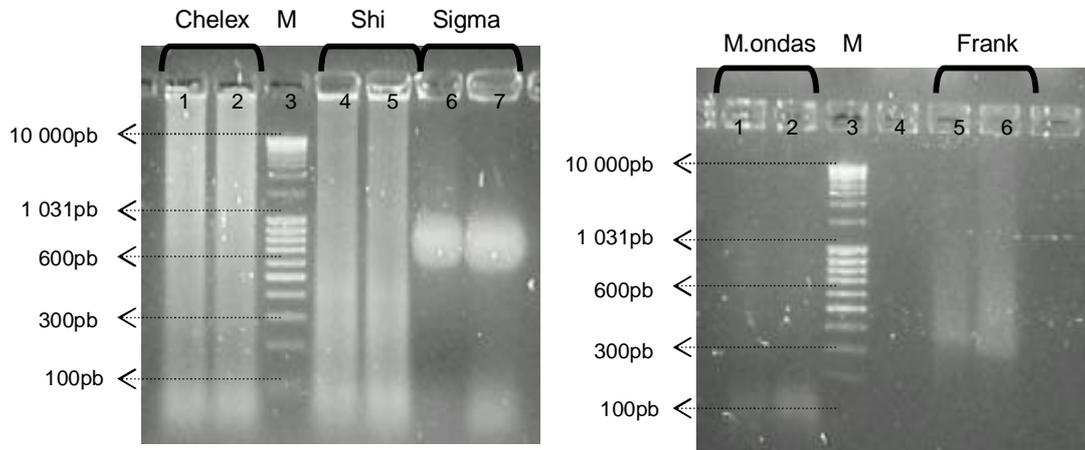


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio, del ADN extraído a partir de una misma muestra con los cinco protocolos evaluados. Izquierda: carriles 1 y 2 extracción Método Chelex, 3 marcador de peso molecular (M), 4 y 5 extracción Método Shi, 6 y 7 Método Sigma. Derecha: 1 y 2 Método Microondas, 3 marcador de peso molecular (M), 5 y 6 Método Frank.

l.b. Evaluación de la pureza y concentración del ADN por espectrofotometría de luz U.V.:

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de espectrofotometría mostraron que la DO_{ADN} promedio de cada método fue: Chelex 0,33; Shi 0,10; Sigma 0,11; Microondas 0,03 y Frank 0,07. La concentración de ADN recuperada a partir de los diferentes métodos se encuentra en un rango de 0,072 a 0,915 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ver Cuadro 2).

El Método Chelex mostró el promedio de concentración de ADN más alto: 0,915 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, seguido por el Método Sigma y Shi (0,279 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0,236 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente). Los métodos Microondas y Frank dieron las evaluaciones más bajas: 0,164 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0,072 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente.

La $DO_{ADN/prot}$ promedio por protocolo estuvo entre los 1,709 (Frank como protocolo con el valor promedio máximo) y 0,750 (Sigma con el valor mínimo) (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidad de muestras evaluadas por protocolo, los correspondientes valores promedio de la concentración de ADN y la relación ADN/proteínas ($DO_{ADN/prot}$), obtenidas mediante espectrometría de luz UV, a partir de las muestras del HSJD.

Método	Cantidad de muestras	ADN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$DO_{ADN/prot}$
Chelex	10	0,915	1,174
Shi	10	0,236	1,505
Sigma	10	0,279	0,750
Microondas	10	0,072	1,338
Frank	10	0,164	1,709

I.c. Determinación de la viabilidad de amplificación del ADN para la PCR:

El porcentaje total de amplificación para el gen de la β -globina (tomando en cuenta los 5 métodos) fue de 18% (9/50 muestras). Se obtuvieron porcentajes de amplificación variables según el protocolo, desde el 0% hasta el 50%, los mismos se resumen en el *Cuadro 3*.

Cuadro 3. Total de muestras del HSJD sometidas a cada protocolo de extracción y la proporción de amplificación según el método utilizado.

Método	Total de muestras	Amplificación positiva
Chelex	10	0,10
Shi	10	0,50
Sigma	10	0,30
Microondas	10	0,00
Frank	10	0,00
Promedio		0,18

Es necesario apuntar que en algunos casos la amplificación se reveló en el gel de agarosa como bandas muy tenues, como se puede observar en la *Figura 2*, carriles 2 y 3, mientras que en otras ocasiones el producto de amplificación es claramente identificable en el gel (*Figura 2*, carril 4).

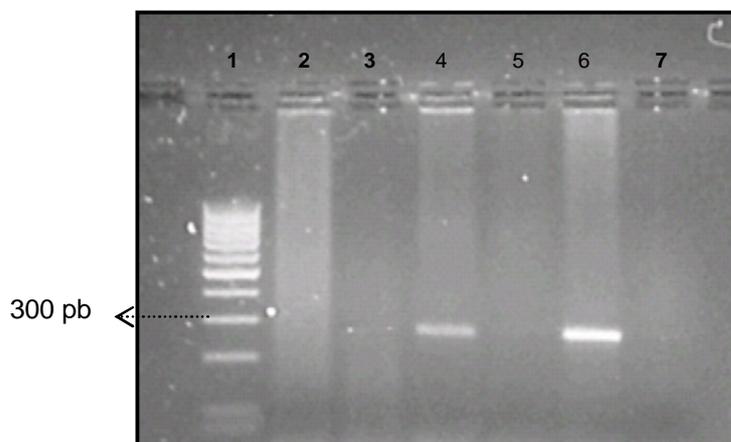


Figura 2. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa 2% con los productos de amplificación para el gen de la β -globina de 4 muestras distintas del HSJD extraídas mediante el método Shi. Carriles 1: marcador de peso molecular, 2: muestra sin producto de amplificación, 3 y 4: muestras con amplificación positiva, 5: muestra sin producto de amplificación, 6: control positivo, 7: control negativo.

I.d. Cálculo del tiempo de procesamiento de muestras por protocolo y precio por muestra:

Los cálculos se realizaron para determinar el tiempo de procesamiento y el precio de 10 muestras (*Cuadros 4 y 5*).

Para procesar 10 muestras utilizando el Método Chelex se requieren dos días, ya que necesita una noche de digestión enzimática; las horas requeridas son 2, 25.

En el caso del Método Shi se necesitan tres días, durante los cuales se consumen aproximadamente 5,17 horas de trabajo. La primera noche se realiza la digestión enzimática y la segunda la precipitación del ADN.

El tiempo requerido en la realización del Método Sigma es de 1,6 horas y es posible realizarlo en un solo día, el proceso de extracción estrictamente hablando, excluyendo la desparafinación del tejido, tarda alrededor de 20 minutos.

El Método Microondas también se puede realizar en un día, donde se ocupan aproximadamente 3,55 horas.

El método que necesita menos horas es Frank: 1,05 horas en dos días, puesto que también necesita una noche para digestión enzimática.

Cuadro 4. Tiempo empleado para el procesamiento de 10 muestras según el método utilizado.

Método	Tiempo extracción		
	Días	Horas	Evaluación
Chelex	2	2,25	1 hora
Shi	3	5,17	
Sigma	1	1,6	
Microondas	1	3,55	
Frank	2	1,05	

El precio se calculó para 10 muestras e incluye únicamente los reactivos requeridos y el precio por hora de mano de obra calificada (bachiller universitario). El precio de cada muestra según el protocolo utilizado se puede observar en el *Cuadro 5* y el detalle de los precios de los reactivos se puede encontrar en el *Anexo 4*.

Cuadro 5. Precio correspondiente al procesamiento de 10 muestras (extracción y PCR), según el protocolo utilizado.

Método	¢/10 muestras		
	Reactivos	Mano de obra*	Total
Chelex	18 526	20 557	45 409
Shi	23 155	39 028	68 508
Sigma**	14 085	29 097	43 182
Microondas	5 807	28 781	34 587
Frank	17 596	12 967	36 890
Promedio	15 834	26 086	45 715

* Según el precio/hora Bach. Universitario (Ministerio de Trabajo de la República de Costa Rica, 2006).

**El kit Extract-N-Amp de Sigma incluye los reactivos para extracción y amplificación.

II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica de la CCSS

Siguiendo el Método Shi para extraer ADN de las muestras de los diferentes servicios, se encontró que el promedio de amplificación para todos los servicios estuvo por debajo del 50%. El rango de amplificación por servicio va, desde el 0%, hasta el 70% (*Cuadro 6*).

Cuadro 6. Cantidad de muestras procesadas mediante el Método Shi, procedentes de los diferentes servicios de anatomía patológica y proporción de amplificación del gen de la β -globina.

Hospital	Cantidad de muestras	Amplificación
San Juan de Dios	10	0,5
Nacional de Niños	10	0,6
México	10	0,6
Calderón Guardia	10	0,5
Mujer Carit	10	0,5
Max Peralta	10	0,7
Toni Facio	10	0,4
San Carlos	10	0,5
Escalante Pradilla	10	0,0
Promedio		0,48

III. Conceptualización de la patología molecular en Costa Rica

De las once personas entrevistadas, el 55% no ha tenido ninguna experiencia en el área de patología molecular. Aún así todos consideraron que las técnicas de esta nueva especialidad son necesarias en el trabajo anatomopatológico.

Según los encuestados, estas técnicas ayudan en la clasificación de patologías complejas, facilitan el diagnóstico en entidades que presentan características morfológicas casi indistinguibles unas de otras, correlacionan los cambios histológicos mínimos en apariencia reactivos contra los premalignos, arrojan resultados con aplicación clínica e investigativa, mejoran la capacidad diagnóstica e investigativa de la especialidad y permitirán instaurar los tratamientos apropiados. Son además muy sensibles y específicas.

De los participantes sólo el 9% consideran que el uso de estas técnicas en el país es nulo, el 82% incipiente y el restante 9% no sabe.

Según las personas consultadas, las causas de este limitado desarrollo son, en orden de importancia: el divorcio entre la CCSS y los programas de investigación, limitación de recursos para la investigación, falta de interés científico y ausencia de personal científico calificado.

El 36% de los entrevistados no conoce algún antecedente en Costa Rica de las técnicas moleculares utilizadas en la anatomía patológica. A pesar de ello, el 91% considera que la aplicación de dichas técnicas traerían ventajas al diagnóstico e investigación de patologías en el país (un 9% no respondió). Apuntan que la patología molecular debería de desarrollarse por medio de un laboratorio: estatal centralizado (64%), estatal hospitalario/universitario (27%) o estatal hospitalario (9%).

Los casos que se apuntaron como prioritarios para iniciar la investigación en el área son: sarcomas, lesiones linfoproliferativas (como las leucemias y linfomas), cáncer de mama y ovario, tumores sólidos en niños y enfermedades infecciosas.

DISCUSIÓN

I. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN

I.a. Prueba de integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa:

Al realizar las electroforesis de las muestras extraídas, se pudo observar que cada método produjo un patrón de corrida característico para cada uno; lo que implica que los procedimientos fueron consistentes. Para los extractos de algunos protocolos fue posible observar ADN de buen peso, mientras que para otros se limita a fragmentos pequeños que inevitablemente indican una degradación casi completa del mismo. Analizando las observaciones de cada protocolo usado, se obtuvieron las siguientes pesquisas.

El patrón de corrida de las muestras extraídas mediante el Método de Chelex indica que el protocolo es capaz de extraer ADN de muy distinto peso molecular, ya que se observó fluorescencia a lo largo de todo el carril. Fue posible extraer ADN observable a través de la electroforesis en gel de agarosa en un 90% de las muestras procesadas. Al comparar la corrida con el marcador de peso molecular (*Figura 1*), se observó una nubosidad más espesa entre los 10 000 a 1 000pb aproximadamente, fragmentos de ADN de buen peso molecular. Aunque este método aumenta la temperatura hasta los 100°C en 2 ocasiones distintas, el amortiguador y el Chelex-100 parecen proteger eficientemente el ADN, evitando una degradación extrema del ADN. La ausencia de desparafinación no parece afectar el proceso de extracción, lo que evita la utilización de reactivos volátiles y tóxicos como el xilol.

El Método correspondiente a Shi y colaboradores (2002) también muestra que se extrae ADN de muy distintos pesos moleculares, lo que se pudo observar en el 90% de las muestras corridas. A diferencia del obtenido con el Método Chelex, el barrido se intensifica al final del carril, entre las 600-300pb aproximadamente (*Figura 1*), lo que indica que este protocolo es capaz de extraer menor cantidad de ADN de alto peso (alrededor de las 10 000-1 000pb) que el Método Chelex.

El Método Sigma muestra que se recuperó ADN como bandas gruesas entre las 1 000 a 600pb, considerado como ADN de buen peso, el cual se obtuvo en el 90% de los casos. Aún así el tamaño de los fragmentos de ADN extraído es mucho más pequeño que algunos de los recobrados mediante los dos protocolos anteriores, tal como se puede observar en la *Figura 1*.

En las corridas del ADN pertenecientes a los tres métodos anteriores, la fluorescencia en los pozos de la electroforesis indica que en las muestras quedan aún contaminantes, posiblemente proteicos, que no logran migrar en el gel (*Figura 3*). Como podría esperarse, debido a la utilización de pasos de extracción fenólica, precipitación y purificación del ADN, el Método Shi es el que presenta menor cantidad de impurezas en la muestra.

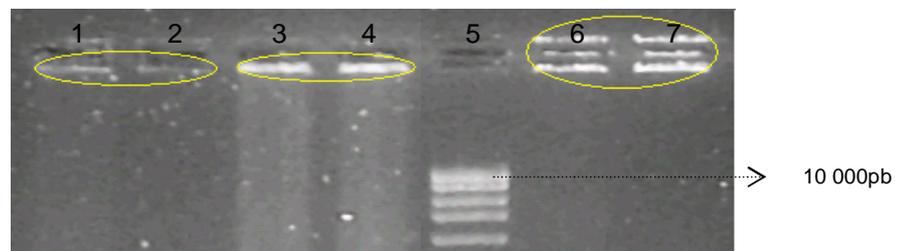


Figura 3. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se puede observar claramente la contaminación del ADN extraído por tres diferentes protocolos a partir de una misma muestra procedente del HSJD. Carriles 1 y 2: Método Chelex, 3 y 4: Método Shi, 5: Marcador de Peso Molecular, 6 y 7: Método Sigma.

La electroforesis del extracto del Método Microondas mostró que el protocolo causa la fragmentación y degradación prácticamente total del ADN, posiblemente debido a que se somete la muestra a alta temperatura durante un tiempo considerable (6 minutos) sin ningún aditivo que proteja de manera eficiente al ADN desnudo en la muestra (*Figura 1*).

El último método evaluado fue Frank, con el que tampoco fue posible observar ADN de buen peso. El barrido tenue que presenta se encuentra básicamente cerca de las 300pb (*Figura 1*). Se sospecha que la ebullición durante ocho minutos es la fuente de degradación del ADN.

Por lo tanto, los Métodos Chelex, Shi y Sigma logran recobrar ADN de suficiente peso, posiblemente apto para estudios por PCR. La efectividad de extracción de estos tres protocolos es alta (90%). El estado de degradación en el que se encuentra el ADN, a causa del proceso de fijación con formalina y parafinación de las muestras, es la posible razón de no alcanzar el 100% de efectividad con ninguno de los protocolos aplicados.

I.b. Evaluación de la pureza y concentración del ADN por espectrofotometría de luz U.V.:

Los valores de la DO_{ADN} de los métodos Shi, Chelex y Sigma resultaron confiables, al considerarlos entre 0,1 y 1,0. En el caso de los métodos cuyos valores de DO_{ADN} son menores que 0,1 (Microondas y Frank), la cantidad de ADN en la muestra es tan baja (inferior a $0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que el espectrofotómetro de luz UV no es lo suficientemente sensible para determinar de manera fiable su concentración. Por lo tanto, la relación DO_{ADN}/prot tampoco se puede considerar fiable (QIAGEN, 2003b).

La muy baja concentración de ADN en las muestras de los métodos Microondas y Frank concuerda perfectamente con lo analizado en la electroforesis en gel de agarosa, en donde se observó una degradación casi total del ADN (*Figura 1*). Si se siguen estos dos criterios, los métodos Frank y Microondas no parecen recuperar eficientemente el ADN de los bloques de parafina.

El método Chelex recupera la mayor concentración de ADN ($0,778\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y posee un valor de DO_{ADN}/prot muy cercano a 1,5 (específicamente 1,2). Este método es capaz de extraer una considerable cantidad de ADN de pureza media (ADN de alta pureza corresponde a un valor por encima de 1,5). Aunque el procedimiento de extracción no cuenta con pasos específicos para la purificación del ADN, aparentemente no se encuentran niveles alarmantes de contaminantes, potenciales inhibidores de la PCR. El Método Shi extrae una concentración mediana de ADN, al igual que el Método Sigma ($0,236\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0,279$ respectivamente). Los datos obtenidos

para la relación $DO_{ADN/prot}$ para el Método Shi (1,5) corresponden a ADN de alta pureza. Este resultado es de esperarse, puesto que es un complejo protocolo de extracción orgánica, con pasos de aislamiento y purificación del ADN, en donde además se ha obtenido una considerable concentración de ADN ($0,236\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Aunque en la electroforesis en gel de las muestras extraídas con el Método Shi, se distingue la contaminación en los pozos (*Figura 3*, carriles 1 y 2), se sospecha que no es de origen proteico. Esta contaminación puede ser tratarse, en mayor medida, de solventes o detergentes utilizados durante la extracción del ADN (BMG LabtechApplication, 2002; Marquart, 2005; University of Toledo, 2004; UPR, 2004).

Antagónicamente, el Método Sigma dio resultados bajos en la $DO_{ADN/prot}$. Para este método no se realizan pasos de purificación ni precipitación, por lo que resulta lógico obtener un alto contenido de contaminantes (proteínas, solventes y detergentes) en la muestra, que provocan una alta absorbancia a 280nm (DO_{prot}) y por lo tanto disminuyen considerablemente la relación $DO_{ADN/prot}$. Esta contaminación también puede apreciarse en la electroforesis en gel (*Figura 3*). La alta concentración de contaminantes en la muestra podría eventualmente inhibir la PCR, aunque por tratarse de un kit de extracción, su estandarización debería de evitar estos desaciertos (Marquart, 2005).

Aunque tradicionalmente se ha determinado la concentración de ADN midiendo la DO_{ADN} de la muestra, este es un método de baja sensibilidad, debido a que los valores obtenidos mediante espectrofotometría poseen múltiples factores influyentes. Especialmente el ADN cromosómico, ARN y otras sustancias tanto orgánicas como inorgánicas que tienen su absorbancia máxima a 260nm o cerca de este punto, que contribuyen a aumentar la absorbancia. Éstos pudieron sobreestimar la DO_{ADN} y haber afectado directamente los resultados de la concentración del ADN y de la $DO_{ADN/prot}$ (Berthold Technologies, 2005; BMG LabtechApplication, 2002).

Otra de las desventajas del método es que la relación $A_{260}/280\text{nm}$ no es lineal, por lo que puede llevar a consideraciones erróneas. Por esto se

recomienda el uso de esta relación obtenida mediante espectrofotometría, solo como método complementario de evaluación (Camarena, 2001).

Se recomienda, al trabajar con bajas concentraciones de ADN, la cuantificación mediante gel de agarosa, ya que resulta más confiable (QIAGEN, 2003b).

I.c. Determinación de la viabilidad de amplificación del ADN para la PCR:

Al utilizar los iniciadores PC04 y GH20, del gen constitutivo de la β -globina, mostraron una gran eficacia. Con el protocolo de amplificación usado se obtiene un único producto de aproximadamente 270pb (el esperado es de 267pb). El tamaño de la banda se corroboró mediante genotipo utilizando un secuenciador automático ABI Prism 310, constatando que se trata de la banda deseada de 267pb (Figura 4).

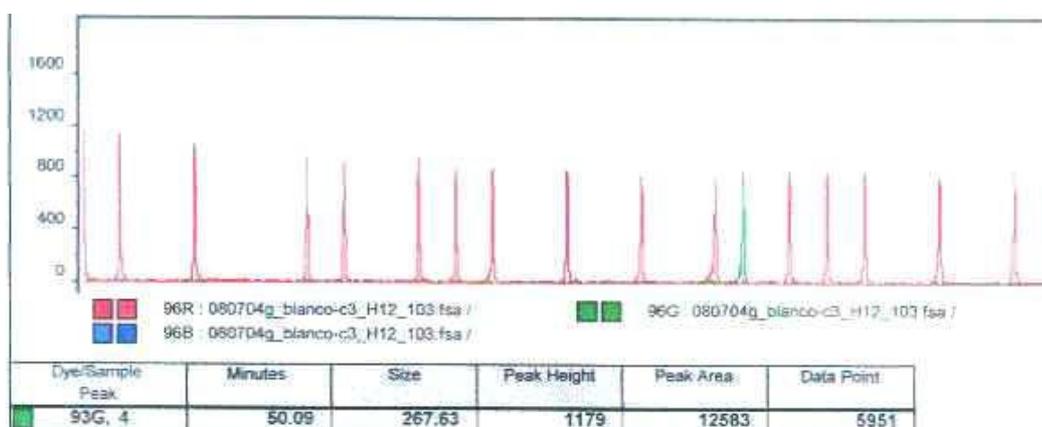


Figura 4. Genotipo del gen de la β -globina realizado mediante el secuenciador automático ABI-Prism 310.

Cuando se amplificó ADN de buena calidad utilizado como control positivo, extraído de tejido fresco, la banda en los geles de agarosa presentó gran nitidez y brillo en todos los casos.

En algunas oportunidades se observaron dímeros de los iniciadores (*primer-dimers*), posiblemente por la poca cantidad de ADN blanco en la muestra: aunque no hay razón para pensar que interfieren significativamente con el desempeño de la reacción.

Muestras correspondientes a tres métodos distintos dieron amplificaciones exitosas: Shi, Sigma y Chelex, a su vez éstos fueron los tres que mostraron patrones de corrida en la electroforesis que indican ADN de alto peso y que presentaron valores fiables en la cuantificación de ADN por espectrofotometría de luz UV. El porcentaje de amplificación no fue mayor al 50% para ninguno de los métodos (Shi 50%, Sigma 30%, Chelex 10%, Microondas y Frank 0%).

Se encontró que sólo una misma muestra amplificó para dos métodos distintos (Sigma y Shi). Esto se podría deber a la mala conservación del ADN en estas muestras, que determina un bajo número de fragmentos diana para la PCR.

No se logró encontrar ninguna relación directa entre los datos obtenidos en la cuantificación del ADN (concentración y pureza) con las muestras que amplificaron. Sin embargo, sí es posible observar que aquellos métodos con valores de concentración y pureza de ADN más altos (métodos Shi, Sigma y Chelex), amplificaron al menos una muestra.

El Método Shi, cuyo grado de pureza es alto, fue el protocolo de extracción más exitoso cuando de amplificación se trata. La rehidratación paulatina de los tejidos en las fases iniciales de la extracción, posiblemente omite el daño mecánico que se puede producir al manipular el ADN de las muestras fijadas en formalina. Los pasos de purificación y precipitación parecieran eliminar eficientemente los inhibidores de la PCR, puesto que aún cuando en ocasiones se evidencia abundante ADN en la electroforesis de la PCR, la reacción no se inhibe.

Estudios como los de Cao *et al.* (2003), Coombs *et al.* (1999), y Shi *et al.* (2002), donde se probaron protocolos de diferente naturaleza, para la extracción de ADN a partir de tejido parafinado, concuerdan al comprobar que a partir de protocolos que utilizan purificaciones fenólicas se puede obtener ADN apto para la PCR. Esto también concuerda con trabajos como el de Libório *et al.* (2005). Aunque Coombs *et al.* (1999) apuntan a que una variación del Método Chelex es el método que da mejores resultados, inclusive contra la extracción fenólica.

Por otro lado no fue posible encontrar anteriores experiencias con el Kit Extract-N-Amp de Sigma-Aldrich (Método Sigma) en muestras parafinadas, por lo que es imposible determinar su rendimiento comparativo con otras investigaciones. La baja calidad del ADN de la muestra pudo ser la causa del escaso porcentaje de amplificación alcanzado con el kit (30%). Originalmente este kit se implementó para tejido fresco, a partir del cual se pueden amplificar productos mayores a 1kb, pero no para tejidos parafinados. Según esta experiencia el kit no alcanza el desempeño esperado (Sigma-Aldrich 2005).

Un kit diseñado para extraer ADN degradado, como lo son las muestras parafinadas, posiblemente lograría un mayor desempeño. Según la literatura ha sido posible utilizar de manera satisfactoria kits como el "GenomePlex® WGA Reamplification Kit" de Sigma-Aldrich, el "Nucleon HT Kit" de Amersham Biosciences y EX-WAX™ DNA Extraction Kit de Chemicon Internacional para extraer ADN de parafinadas (Walter *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 1998; Chemicon, 2003). Ninguno de los cuales estuvo disponible para este estudio.

Los métodos que aplican únicamente calor para obtener el ADN, incluyendo métodos de microondas como el probado en esta ocasión, poseen resultados contradictorios según los estudios encontrados. Por ejemplo, Coombs *et al.* (1999) y Cao *et al.* (2003) aseveran haber obtenido ADN amplificable con los métodos en donde se aplica principalmente calor; mientras Shi *et al.* (2002) señalan que no se pudieron obtener resultados positivos de este tipo de extracciones, como se observó en el presente estudio. Posiblemente, en los casos en los que se procesen muestras de muy alta calidad (estado conservado de los ácidos nucleicos), este tipo de procedimientos sean aplicables satisfactoriamente.

El Método Frank fue reportado por el mismo Frank y coautores (1996) como el más efectivo. Contradictoriamente, en esta investigación el ADN total visualizado mediante electroforesis en gel, revela una gran degradación del material genético, la concentración de ADN cuantificada

por espectrofotometría fue muy baja y además no fue posible obtener en ninguna oportunidad ADN amplificable a partir de las muestras sometidas a extracción con este método. Tal como se propuso con anterioridad, después de la digestión enzimática con Proteinasa K, la ebullición del ADN durante ocho minutos, es posiblemente el foco primario de degradación.

La amplificación de las muestras parafinadas analizadas se puede ver afectada por múltiples factores, uno de ellos puede ser el tiempo de fijación al que han sido sometidos los tejidos. Ha sido reportado que el tiempo de fijación, pueden originar bajas importantes en la eficiencia de amplificación después de 1 semana e inclusive 24 horas según los autores (Frank *et al.*, 1996).

Aunque se asume que el proceso de fijación requiere por lo menos una hora por milímetro de tejido, rutinariamente los tejidos se fijan de 24 a 48 horas. Aunque esta práctica no tiene efectos sobre la histopatología, para estudios de patología molecular, entre mayor sea el tiempo fijación del tejido, mayores son los efectos adversos sobre la calidad del ADN del tejido (Srinivasan *et al.*, 2002).

Ha sido demostrado por algunos autores, que en promedio el tamaño del ADN extraído de tejido fijado en formalina buferizada aumenta inversamente con el tiempo de fijación. A partir de tejidos fijados de tres a seis horas es posible aumentar las cantidades de ADN de alto peso molecular extraído (Srinivasan *et al.*, 2002).

Otros ejemplos de condiciones limitantes para la amplificación de tejidos incluidos en parafina son el tiempo de almacenamiento y el pH inicial del fijador utilizado. Controlar el pH no era una práctica tan común en décadas pasadas como lo es actualmente, por lo que puede que afecte en mayor medida a aquellas muestras de mayor edad (Frank *et al.*, 1996). Uno de los resultados más preocupantes fue la debilidad de las señales de los productos de la β -globina. Este tipo de señales pueden llevar a la fácil interpretación de falsos negativos y complicar enormemente la interpretación de posibles diagnósticos, cuando la PCR es evaluada

utilizando geles de agarosa. En cuyo caso, la disponibilidad de un secuenciador de ADN se hace indispensable, pero encarece significativamente los costos por muestra. La implementación y dependencia de este tipo de equipo hace que se deba evaluar cuidadosamente la opción.

Al valorar el periodo de almacenamiento de las muestras parafinadas, fue posible amplificar muestras con periodos desde los 15 días hasta los 7,5 meses. Las muestras que presentaron una señal clara fueron aquellas entre los 0,5 y 4 meses. Estos resultados son incongruentes con los resultados obtenidos por Jiménez (2005) en un estudio realizado en muestras parafinadas provenientes del Hospital Calderón Guardia en donde solo a partir de muestras con menos de un mes de almacenamiento, fue posible extraer ADN amplificable.

En otros casos reportados, la amplificación de productos de PCR de no más de 200pb en geles de agarosa se realiza como procedimiento de rutina en muchos otros laboratorios, usando inclusive muestras con periodos de almacenamiento de hasta 10 años. Numerosos estudios han revelado que es posible extraer ADN exitosamente de bloques archivados por largo tiempo (hasta cuarenta años) (Frank *et al.*, 1996, Giorgi de *et al.*, 1994, Libório *et al.*, 2005, Pavelic *et al.*, 1996 y Shibata *et al.*, 1988).

Pareciera que la recuperación de ADN viable para la PCR depende particularmente de las condiciones propias en la que se ha procesado (fijado y parafinado) y almacenado el tejido (temperatura controlada).

Otros investigadores han encontrado un efecto negativo del tiempo en el ADN de los bloques de parafina. La magnitud del daño hace evidente que en aquellas muestras archivadas por más tiempo, solo es posible amplificar fragmentos de menor tamaño que en aquellas muestras más jóvenes. Entre el reporte de los autores el tiempo óptimo para realizar la extracción del ADN y correspondiente análisis varía considerablemente desde un mes, cinco años, dieciocho y hasta treinta y seis años (Bernstein *et al.*, 2002; Jiménez, 2004; Wong *et al.*, 1998; Nadji *et al.*, 1996).

En nuestra experiencia es imposible determinar si realmente existe un punto de descenso en la efectividad de la PCR según la edad de los bloques parafinados.

Entre otras posibles causas que explican la degradación del ADN en las muestras parafinadas se encuentra la insuficiente neutralización de la formalina, causando la depurinización del ADN, lo que inhibe la amplificación. La degradación que causa la formalina en el ADN es alta y aumenta durante la inclusión, cuando se utilizan altas temperaturas. Se cree que inclusive durante su almacenamiento, esta degradación posiblemente continúa, aunque en menor grado (Libório *et al.*, 2005).

Pareciera que otro tipo de fijadores, como el metanol, etanol, histochoice (compuesta de una mezcla de pequeñas moléculas no tóxicas que se unen a las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos sin entrecruzarlos con su ambiente) el método AMeX (acetona, metilbenzoato, xilol), e inclusive variaciones del uso de la formalina (a 4°C o adicionada con EDTA) han dado mejores resultados en análisis moleculares (Noguchi *et al.*, 1997).

Las razones por las que la PCR a partir de ADN aislado de parafinadas resulta inconsistente, se pueden resumir a *grosso modo* en (Cao *et al.*, 2003; Libório *et al.*, 2005):

- Baja cantidad o ausencia de ADN blanco detectable.
- Presencia de inhibidores (como la hemoglobina, metales pesados, alta concentración de pequeños fragmentos de ADN que compiten con el ADN diana y proteínas desnaturalizadas imposibles de eliminar totalmente).
- Degradación del ADN total blanco, que puede ocurrir durante el largo lapso entre la toma del tejido y la fijación y puede ser afectada por el tipo de fijador utilizado y la duración de la fijación.
- Fragmentación de los ácidos nucleicos debido a la fijación en formalina.

I.d. Cálculo del tiempo de procesamiento de muestras por protocolo y precio por muestra:

Debido a la diferente naturaleza de cada uno de los protocolos aplicados en esta investigación, el tiempo y los días necesarios para procesar una muestra varían considerablemente, de 1 a 3 días y de 1,05 a 5,17 horas. El factor tiempo no solo es importante en si mismo, sino que determina las horas-costo de personal calificado (*Cuadro 5*).

Los dos métodos que necesitan menor trabajo son Frank y Microondas, poco más de una hora; sin embargo los resultados en la extracción fueron bajos comparados con los otros tres y con resultados nulos para la PCR. Aunque los protocolos resultan cómodos y ágiles no dan los resultados esperados.

Por lo general, la gran ventaja que ofrecen los kits de extracción de ADN es la reducción sustancial del tiempo y la laboriosidad de los procedimientos. Puesto que el kit utilizado en esta investigación no es específicamente diseñado para tejidos parafinados, los pasos previos de desparafinación del tejido consumen aproximadamente tres horas para procesar 10 muestras, lo cual encarece considerablemente el costo. En este caso, el kit no resulta tan satisfactorio, como lo es para extraer ADN de tejido fresco, en donde el procedimiento puede tardar unos 20 minutos. Puesto que el kit incluye los reactivos de extracción y amplificación, el precio de la extracción es imposible de calcular certeramente (*Cuadro 5*), pero es posible suponer que ronda los ¢23 000, muy similar al Método Chelex (¢22 354); sin embargo, el primero posee un porcentaje mayor de amplificación que el segundo.

El Método Shi es el más costoso y laborioso de todos, no obstante fue con el que se obtuvo un mayor porcentaje de amplificación. Este método presenta algunos otros inconvenientes, como la utilización de reactivos altamente tóxicos, volátiles y contaminantes que generan problemas de manejo y desecho, y la necesidad de múltiples lavados y centrifugaciones que aumentan el riesgo de contaminación (*Veríssimo et al. 2004*).

Finalmente al apreciar en conjunto los cuatro parámetros de evaluación de los protocolos de extracción, sin dejar lugar a dudas el método propuesto por Shi y colaboradores (2002) es el que resulta más eficiente

para la extracción de ADN a partir de las muestras parafinadas utilizadas para este estudio, a pesar de sus defectos. Debido a la baja calidad de los ácidos nucleicos de las muestras, el método de extracción parece incidir directamente en el éxito de la PCR.

Para la siguiente etapa del estudio, el protocolo propuesto por Shi *et al.* (2002), Método Shi, se utilizó para la extracción de ADN a partir del tejido de los diferentes servicios de anatomía patológica de la CCSS.

II. Evaluación del material de los diferentes servicios de Anatomía Patológica de la CCSS

Los diferentes porcentajes de amplificación obtenidos indican que el protocolo de extracción elegido, Método Shi, aunque laborioso, resulta eficiente (*Cuadro 6*). Fue posible obtener porcentajes de amplificación altos (mayores que 50%) en tres servicios: HMP, HNN, HM. Sí es posible extraer de manera eficaz, fragmentos de ADN amplificables de hasta 270pb utilizando la PCR, a partir de tejido fijado con formalina buferizada al 10%; siempre y cuando el proceso de preservación de los tejidos se realiza bajo condiciones adecuadas. Sería de gran interés evaluar las condiciones y vías de estos servicios y compararlas con el resto de servicios valorados.

Antagónicamente el proceso de preservación de los tejidos de los servicios con bajos porcentajes de amplificación (50% o menos) debe ser minuciosamente evaluado: HSJD, HCG, HMC, HTF, HEP y HSC. De esta manera, eliminar los focos y puntos críticos durante el proceso que provocan la degradación del ADN. Así, sería posible corregir el proceso de preservación de los tejidos, de manera que también se conserve histológicamente sin dañar el ADN de las muestras.

No fue posible determinar si existe una correlación entre la concentración de la formalina: al 15% utilizada en el HNN versus al 10% utilizada en el resto de los servicios participantes de la investigación. Lo cual prueba que posiblemente el factor más influyente en la preservación de los ácidos

nucleicos en este servicio, no es la concentración de la formalina, sino las prácticas hospitalarias referentes al procesamiento de las muestras.

En el caso del HEP, único servicio del cual no se logró extraer ADN amplificable, no se encontró diferencia entre el origen de la formalina (HEP o HSJD) y la amplificación de las muestras. Aunque sin duda alguna la calidad del fijador es importante, nuevamente se apunta que otros factores de manejo durante el fijado y parafinación de los tejidos son los que realmente causan la degradación del ADN de las muestras.

En esta investigación no se determinó el efecto negativo del tiempo de almacenamiento, en la conservación del ADN de las muestras parafinadas. Sin embargo, fue posible extraer ADN amplificable de hasta poco más de un año (HTF y HCG); y dos años (HTF). Para determinar el punto de descenso en la eficiencia de la prueba es necesario realizar un estudio que incluya sistemáticamente muestras con diferentes periodos de almacenamiento.

Las diferencias claras entre la calidad del ADN de los diferentes servicios de anatomía patológica evidencian que las prácticas hospitalarias afectan de manera directa la calidad de la muestra. Estas prácticas, que incluyen: la duración de la fijación, tamaño del tejido, tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y la fijación, periodo de uso del mismo fijador y calidad del fijador, entre otras, estuvieron fuera del control de esta investigación.

Para poder corregir en un futuro estas prácticas, se debe tener en cuenta que el proceso de preservación de los tejidos parafinados involucra a diferentes áreas hospitalarias (Cirugía, Ginecología, Medicina Interna, Gastroenterología y Dermatología), el Servicio y el Anexo de Anatomía Patológica. A su vez, esto conlleva la manipulación de la muestra por diferentes personas: Médicos, Enfermeros, Técnicos y personal no especializado. Este proceso se evidencia en el *Anexo 3*, que describe las vías necesarias para incluir una muestra en parafina en el HSJD.

Idealmente, este complejo proceso que deben recorrer las muestras hasta incluirse en parafina, se debería optimizar en todos los servicios de

Anatomía Patológica de todos los Hospitales. Para ello, se deben considerar los siguientes puntos (Srinivasan *et al.*, 2002):

- Coordinación logística para determinar el momento exacto en que el cirujano o médico remueve el tejido y disponibilidad de personal para trasladarlo y fijarlo.
- Controlar el tiempo de prefijación (tiempo entre la extracción del tejido y su procesamiento), para reducirlo al máximo.
- Cuando especímenes diferentes son removidos en momentos diferentes durante una misma sesión quirúrgica, el intervalo de tiempo entre la extracción y el procesamiento debe ser consistente y corto.
- Otros factores como el cambio de pH y el estrés ambiental pueden causar que nuevos genes sean transcritos en cualquier punto del procedimiento. Lo cual es de especial interés en estudios de expresión génica, cuando es necesaria la recuperación de ARN.

Idealmente, los tejidos deberían ser fijados inmediata y completamente cuando son extraídos, eliminando o reduciendo al máximo el tiempo de prefijación, para lo que resulta indispensable concienciar al personal. Aunque es necesario reconocer que en ocasiones, el periodo de prefijación, es determinado en parte por la naturaleza de la cirugía (en los casos en que este procedimiento es necesario) y por lo tanto, es imposible de alterar. Durante este tiempo, se da una degradación de ARN y proteínas, lo cual ocurre muy especialmente en tejidos como el pancreático y piel.

III. Conceptualización de la patología molecular en nuestro país

Las primeras declaraciones de derechos humanos no hacían mención a bienes específicos, concentrándose en la protección básica de la persona y libertades laborales, de desplazamiento y expresión. En los derechos fundamentales de segunda generación se le concede a todo ciudadano el

acceso a ciertos bienes esenciales para subsistir, como los programas que promueven la salud y otorgan atención médica (Kottow, 2005).

El concepto de atención médica, conceptualizado como derecho fundamental del ser humano, ha ido evolucionando paralelamente con las opciones diagnóstico-preventivas y diagnóstico-terapéuticas. Diagnósticos cada vez más específicos y complejos han dado paso a opciones de tratamiento cada vez más concretas y eficaces. Esto ha logrado un uso más eficiente de los recursos sanitarios (humanos y tangibles) y elevar la calidad de vida de los pacientes. La aparición de subespecialidades, como la patología molecular, son prueba directa de este impetuoso desarrollo en el área médica.

El Sector Salud de Costa Rica está integrado por múltiples instituciones, sin duda alguna sobre la CCSS recae un gran papel: el aseguramiento público de salud, el cual incluye atención médica integral, prestaciones sociales y de dinero (García, 2004; OPS *et al.*, 2004).

Existen tres niveles de atención (García, 2004):

1. *Primer nivel:* los servicios básicos de salud que realizan acciones de promoción de la salud, prevención de la enfermedad, curación y rehabilitación de menor complejidad.
2. *Segundo nivel:* brinda apoyo al primer nivel de atención y ofrece intervenciones ambulatorias y hospitalarias por especialidades básicas y algunas subespecialidades.
3. *Tercer nivel:* provee servicios ambulatorios y de hospitalización más complejos en las especialidades y subespecialidades del segundo nivel de atención y en todas las demás subespecialidades. Adicionalmente, en este nivel se brindan servicios de apoyo, diagnóstico y terapéutico que requieren de alta tecnología y especialización.

En específico, los servicios de apoyo diagnóstico que brinda la patología molecular se encuentran en este último nivel de atención, según la actual clasificación. El servicio altamente especializado que brinda esta subespecialidad se ha vuelto imprescindible como apoyo al área de

anatomía patológica, ante el desarrollo de la patogenia, la etiología y la especificidad terapéutica.

Las técnicas aplicadas en la patología molecular se catalogarían dentro del sistema de salud como “desarrollo tecnológico”, puesto que la mayoría de ellas no ha sido implementada como parte rutinaria dentro del ambiente hospitalario, como lo mostró la encuesta realizada.

El desempeño de la investigación y desarrollo tecnológico, en el contexto de la rectoría en salud, tiene avances modestos. Se pueden mencionar el Reglamento de Investigación en Seres Humanos y la constitución de la Comisión Nacional de Investigación en Salud, a través de la cual se han implementado los procesos de autorización y registro de las investigaciones en seres humanos, con el apoyo de los consejos ético científicos correspondientes (OPS *et al.*, 2004).

En el área de la formación en bioética, con apoyo de Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (OPS-OMS), se ha capacitado a profesionales. Además la Universidad de Costa Rica y la Universidad Nacional han creado la maestría en bioética (OPS *et al.*, 2004).

A pesar de estos logros, en la evaluación del 2001 de las Funciones Esenciales de Salud Pública, se reveló que las funciones con menor desempeño fueron las de investigación esencial para el desarrollo e implementación de soluciones innovadoras en salud pública. Bajo la anterior perceptiva, situaciones como la falta de interés científico de algunos sectores sanitarios, la limitación de recursos y el divorcio entre la CCSS y los programas de investigación, se vuelven cada vez más claros (OPS *et al.*, 2004).

Es evidente, que el área de la patología molecular y en general, la inversión y participación en investigación científica en salud, precisan enfocarse desde un punto de vista diferente. Es necesario que se desarrollen de la mano con el sistema nacional de salud, como parte indispensable y generadora de recursos, ya sea en manos institucionales y/o universitarias.

La posibilidad de un laboratorio centralizado pareciera más factible, como lo demuestra la encuesta (un 91% de los encuestados concordaron con este criterio) puesto que el número de casos por servicio, que necesita apoyo de la patología molecular, no justifica más de un laboratorio. Es inevitable tener en cuenta que las necesidades de diagnóstico molecular variarán según hospital, por lo que se debe de prever de antemano las principales necesidades a nivel nacional.

Aunque los encuestados incluyen la ausencia de personal científico calificado, como razón por la cual no se ha desarrollado la patología molecular en el país, podría considerarse a la inversa. Profesionales como biólogos y biotecnólogos (actualmente excluidos como profesionales de la salud por la Ley General de Salud en su artículo 40) o patólogos y microbiólogos especializados, podrían desempeñarse en estas áreas.

Sí es evidente la paulatina inserción de la biología molecular y la biotecnología en el sistema de salud costarricense, más específicamente, en la CCSS. Proyectos como el de tamizaje en el HNN, células madre en el HSJD, cáncer de mama en el HCG, son indicios de la evolución real que sufre el sistema de salud y de la apuesta segura por las nuevas tecnologías para asegurar un mejor y más completo servicio, en donde la salud del paciente figura indudablemente como prioridad.

Otro ambicioso proyecto es el que figura en manos del HCG y el Instituto Costarricense contra el Cáncer, para finales del 2007: la creación de un laboratorio de oncología molecular. Éste proyecta brindar un servicio de apoyo a la red oncológica nacional a través de un centro altamente especializado en técnicas avanzadas de biología molecular y celular. Los análisis ofrecerán la posibilidad de una atención “individualizada” en la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes. Se llevarán a cabo estudios a nivel transcriptomal, de expresión proteica y genético (amplificaciones, deleciones y traslocaciones de genes supresores y oncogenes).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Sobre la calidad del ADN de las muestras parafinadas de la CCSS

1. La obtención de ADN adecuado para llevar a cabo estudios con la PCR a partir de muestras parafinadas, depende de múltiples variables que actúan sobre los tejidos antes, durante y después de la fijación, que se encuentran fuera del control del investigador.
2. El daño causado al ADN en los especímenes fijados en formalina y parafinados son, en última estancia, determinados por las condiciones propias de fijación-parafinación-almacenamiento a las que son sometidas.
3. En definitiva el éxito de la PCR, como método *in vitro* de amplificación depende del adecuado procesamiento y almacenamiento de las muestras y del protocolo de extracción de ADN utilizado.
4. El protocolo basado en la extracción fenólica (Shi *et al.* 2002) probó ser el más eficiente para extraer ADN de calidad para ser utilizado en la PCR, a partir de material parafinado de la CCSS. Sin embargo, desventajas importantes como tiempo de procesamiento, toxicidad de reactivos y costo de los mismos deben ser sopesados.
5. En caso de que se manejen muestras de mayor calidad (preservación más efectiva de los ácidos nucleicos), se recomienda utilizar otro protocolo de extracción más rápido y de menor costo (Sigma o Chelex).

B. Sobre los procesos de preservación y procesamiento de las muestras parafinadas:

1. El fijador y el proceso de conservación de los tejidos utilizados por la CCSS puede ser efectivo para la preservación de los ácidos nucleicos, puesto que se ha reportado en experiencias en el extranjero, la recuperación de material de hasta 40 años de edad y

en esta investigación se obtuvieron porcentajes de amplificación de hasta un 70% para un servicio de la CCSS.

2. Las condiciones propias y manejo de las muestras de los servicios y anexos de Anatomía Patológica y otros servicios relacionados con la extracción de tejido para crear los bloques de parafina (Cirugía, Ginecología, Medicina Interna, Gastroenterología y Dermatología) hacen que el proceso de fijación y parafinación de los tejidos no conserve adecuadamente el ADN de las muestras en algunos de sus servicios.
3. La metodología de fijación y parafinación de los especímenes en anatomía patológica es muy difícil de controlar y estandarizar completamente, puesto que se necesita una capacitación real, coordinación y concientización de gran número de diferentes profesionales: médicos (patólogos, cirujanos, entre otros), técnicos y personal no especializado.
4. Evaluar el estado de los reactivos en cuanto a lotes, las fechas de vencimiento, formulación adecuada y calidad utilizada para el procesamiento de las muestras de anatomía patológica es imprescindible.
5. Cuando se utiliza formalina al 10% buferizada, como agente conservador de tejidos y ácido nucleico se recomienda: minimizar al máximo el tiempo de prefijación, reducir el periodo de fijación a un rango de 3 a 6 horas y fijar únicamente porciones de tejidos de 0,5 a 1cm.
6. En los casos en donde las muestras sean de alto interés diagnóstico-científico, se puede controlar minuciosamente y optimizar el proceso de fijación y parafinación.
7. La CCSS puede invertir en capacitar y concienciar a su personal o invertir en nuevos sistemas de fijación que hayan probado ser menos perjudiciales para la conservación de ácidos nucleicos, en las muestras de anatomía patológica.

8. Contratar personal o profesionales calificados o capacitados en estas nuevas tecnologías apoyados por infraestructura y recursos, es la manera de abrir paso decisivo a la patología molecular en Costa Rica.

C. Conceptualización de la patología molecular en Costa Rica

1. Determinar un diagnóstico anatomopatológico concluyente apoyado por la patología molecular, es una condición generalizada en la anatomopatología mundial.
2. La necesidad de determinar un diagnóstico clínico concluyente por medio de la patología molecular va aumentando con el tiempo; por lo que es importante para los clínicos y los investigadores hacer conciencia de los factores que afectan negativamente la calidad molecular de los especímenes y de las medidas que son necesarias para superarlos.
3. El desarrollo de la patología molecular en Costa Rica es incipiente, pero nuevos esfuerzos y proyectos señalan una inevitable inversión y desarrollo de esta área.
4. La concertación de esfuerzos nacionales (hospitalarios-universitarios) son necesarios para desarrollar esta línea de atención médica e investigación.
5. Resulta necesario llevar a cabo un sondeo institucional para estimar la cantidad de casos anuales y establecer la verdadera capacidad de un laboratorio especializado de patología molecular en el país.
6. Este estudio es parte del primer esfuerzo de un largo camino para desarrollar nuevas investigaciones autóctonas en el área de la patología molecular en Costa Rica.

D. Se recomienda además:

1. Ensayar la capacidad de amplificación de fragmentos de un mayor tamaño (>270pb) en muestras de la CCSS, para determinar la posibilidad aplicar otras técnicas que requieren ADN de mayor peso (como la PCR anidada).
2. Optimizar el protocolo de extracción basado en el Método Shi *et al.* 2002 (es posible que reducción de pasos o de tiempo por paso sea viable sin alterar el desempeño del mismo).
3. Aumentar el número de muestras por hospital, para obtener datos estadísticamente válidos, homogenizar el área de tejido por muestra y tomar en cuenta tejidos parafinados de diferente naturaleza.
4. Utilizar muestras de diferentes edades, para determinar si verdaderamente existe un efecto negativo en la conservación del ADN de los tejidos parafinados de la CCSS.

LITERATURA CITADA

ARNAL, F.; LORENZO, M.; VEIGA, A. 2002. Métodos de Diagnóstico. Estudios Anatomopatológicos. [online] p. 417-443. [citado 1 mayo 2006]. Disponible: <http://www.sepd.es/noticias/27.pdf>.

BASUALDO MC, MORAN K, ALCÁNTARA P, GONZÁLEZ E, PUENTES E, SOLER C. 2004. Detección de anticuerpos IgA y PCR como primeras opciones en el diagnóstico de infección perinatal por el VIH-1. [online] Salud Pública Mexicana. 46:49-55. [citado 2 julio 2006] Disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

BERNAL VAL, F.; GARITO, F. 2003. Hipócrates y su vigencia en la anatomía patológica actual. [online] Revista Española de Patología. 36 (1): 95-100. [citado 05 Febrero 2006] Disponible en: <http://www.pgmacline.es/revpatologia/volumen36/vol36-num1/36-1n14.htm>

BERNSTEIN, J.; THOMPSON, W.; CASEY, G.; DICIOCCIO, R.; WHITTEMORE, A.; DIEP, A.; THAKORE, S.; VAZIRI, S.; XUE, S.; HAILE, R. 2002. Comparison of Techniques for the Successful Detection of *BRCA1* Mutations in Fixed Paraffin-Embedded Tissue. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Septiembre. 11: 809–814.

BERTHOLD TECHNOLOGIES. 2005. DNA Quantitation. [online] [citado 1 mayo 2006]. Disponible en: <http://www.bertholdtech.com/ww/en/pub/bioanalytik/applikation/dnaquant.cfm>

BMG LABTECHAPPLICATION. 2002. DNA Quantification (Absorbance Mode). [online] [citado 1 mayo 2006]. Disponible en: http://www.bmglabtech.com/db_assets/applications/downloads/applications/AN%20Absorbance%206002.pdf

CAMARENA, F. 2001. Técnicas en Biología Molecular. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias. [online] [citado 1 mayo 2006]. Disponible en:

<http://alpha.rec.uabc.mx/dgaa/matdidac2/biologia/molecular/practicas/cuantificacion.htm>

CAO, W.; HASHIBE, M.; RAO, J.; MORGENSTERN, H.; ZHANG, Z. 2003. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detection and Prevention*. 27: 397–404

CHAN, P.; CHAN, D.; TO, K.; YU, M.; CHEUNG, J.; CHENG, A. 2001. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of Human and viral DNA. *Journal of Clinical Pathology*. 54(5): 401-403.

CHEMICON. 2003. EX-WAX™ DNA Extraction Kit (for Paraffin-Embedded Tissue). [online] Chemicon International a division of Serologicals® Corporation. [citado 5 enero 2006] Disponible en: www.chemicon.com

COHEN, M.; FENG, Q.; FLOREY, F.; FORD, C.; HARRIS, K.; HEWITT, J.; HOBBS, M.; HOLMES, K.; KIVIAT, N. 2005. Biomarkers. In Wave III of the Add Health Study. [online] The Add Health Biomarker Team. [citado 19 agosto 2006] Disponible en:

<http://www.cpc.unc.edu/addhealth/files/biomark.pdf#search=%22PC04%20GH20%20beta%20globin%22>

COOMBS, N.; GOUGH, A.; PRIMROSE, J. 1999. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*. 27(16):12-14

DÍAZ, S.; BRADY, S. 1997. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagnostic Molecular Pathology*. 6: 342-346.

DONGEN VAN, J.; LANGERAK, A.; BRÜGGEMANN, M.; EVANS, P.; HUMMEL, M.; LAVENDER, F.; DELABESSE, E.; DAVI, F.; SCHUURING, E.; GARCÍA, R.; KRIEKEN VAN, J.; DROESE, J.; GONZÁLEZ, D.; BASTARD, C.; WHITE, H.; SPAARGAREN, M.; GONZÁLEZ, M.; PARREIRA, A.; SMITH, J.; MORGAN, J.; KNEBA M.; MACINTYRE, E. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, Nature Publishing Group 17: 2257–2317.

DUBEAU, L.; CHANDLER, L.; GRALOW, J.; NICHOLS, P.; JONES P. 1986. Southern blot analysis of DNA extracted from *formalin*-fixed pathology specimens. *Cancer Res*. 46: 2964-2969.

DUMLER J.; VALSAMAKIS A. 1999. Molecular diagnostics for existing and emerging infections. Complementary tools for a new era of clinical microbiology. [online] *Clinical Pathology*. Julio. Suplemento 1. 112: 33-39. [citado 20 febrero 2006] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10396299&dopt=Abstract>.

FARMILO, A.; STEAD, R. 2001. Handbook of Inmunochemical Staining Methods. Fixation. [online] 3ra edición. p. 18-22. [citado 10 febrero 2006] Disponible en: http://www.ecse.rpi.edu/~roysam/CTIA/Dako_Handbook.pdf

FORSTHOEFEL, K.; PAPP, A.; SNYDER, P.; PRIOR, T. 1991. Optimization of DNA Extraction from Formalin-Fixed Tissue and Its Clinical Application in Duchenne Muscular Dystrophy. *Anatomic Pathology*. 98 (1): 98-104.

FRANK, T.; SVOBODA, S.; HSI, E. 1996. Comparison of Methods for Extracting DNA from Formalin-Fixed Paraffin Sections for Nonisotopic PCR. *Diagnostic Molecular Pathology*. Septiembre. 5(3): 220-224.

GARCÍA, R. 2004; El Sistema Nacional de Salud en Costa Rica: Generalidades. Curso de Gestión Local de Salud para Técnicos del Primer Nivel de Atención Primera Unidad Modular. CCSS, CENDEISSS, Proyecto Fortalecimiento y Modernización del Sector Salud, UCR. p. 8, 11, 24, 26, 28.

GARCÍA, M.; SANTÓN, A.; CAMARASA, N.; MARTÍN, P.; BELLAS, C. 2002. Análisis de clonalidad en el linfoma cerebral primario mediante PCR. [online] *Diario Médico*. [citado 22 Mayo 2005] Disponible en: <http://www.diariomedico.com/dermatologia/n140999.html>

GIORGI DE, C.; SIALER, M. F.; LAMBERTI, F. 1994. Formalin-induced infidelity in PCR-amplified DNA fragments. *Molecular Cell Probes*. 8(6): 459-462.

GOELZ, S.; HAMILTON, S.; VOGELSTEIN, B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded human tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 139:118-126.

GRAVITT, P.; PEYTON, C.; ALESSI, T.; WHEELER, C.; COUTLÉE, F.; HILDESHEIM A.; SCHIFFMAN, M.; SCOTT, D.; APPLE R. 2000. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. Enero. 38(1): 357–361.

HILL, A.; O'SULLIVAN, M.; ZHU, X.; VOLLMER, R.; HUMPHREY, P.; DEHNER, L.; PFEIFER, J. 2002. Practical Application of Molecular Genetic Testing as an Aid to the Surgical Pathologic Diagnosis of Sarcomas. A Prospective Study. The American Journal of Surgical Pathology. 26(8): 965-977.

HODGES, E.; KRISHNA, M.; PICKARD, C.; SMITH, J. 2003. Diagnostic Role of tests for T cell receptor (TCR) genes. Journal of Clinical Pathology. 56: 1-11.

JIMÉNEZ, G. 2005. Diagnóstico Molecular de los Linfomas No Hodgkin. Reporte Proyecto No.807-A4-321. Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines. Universidad de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación. Unidad de Genética y Biología Molecular.

KOTTOW, M. 2005. Introducción a la Bioética. Segunda Edición. Santiago de Chile. Mediterráneo. p. 38-45.

LIBÓRIO, T.; ETGES, A.; DA COSTA NEVES, A.; ALVES MESQUITA, R.; DAUMAS NUNES, F. 2005. Avaliação do DNA genômico obtido de biópsias de boca embebidas em parafina e arquivadas por até 40 anos. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Diciembre. 41(6): 405-410.

LÓPEZ, A.; VALIENTE, A.; EZPELETA, I.; GARCÍA, F. 1998. Valor de la reacción en cadena de la polimerasa en el estudio de los síndromes linfoproliferativos. Anales. Departamento de Salud del Gobierno de Navarra. Suplemento 3. 22: 18-22.

MARQUART, J. 2005. Protein determination. [online] HowTo. SPR Pages. [citado 20 Agosto 2006]. Disponible en: <http://home.hccnet.nl/ja.marquart/>

MARGOLIS, B.; KUZU, I.; HERRMANN, M.; RAIBLE, M.; HIS, E.; ALKAN, S. 2003. Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Confirmation of Cat Scratch Disease and *Bartonella henselae* Infection. Pathology and Laboratory Medicine. 127(6): 706-710.

MARTÍNEZ, J.; MORCILLO, G. 2004. Prácticas de Laboratorio. Práctica 1: Extracción ADN. Biología. Ciencias Ambientales. UNED. s.p.

MIES, C. 1996. Molecular Biological Analysis of Paraffin-Embedded Tissues. Human Pathology. 25(6): 6.

MILLER, S.; DIKER, D.; POLESKY, H. 1988. A Simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. [on line] Nucleic Acid Research. 6(3): 1215. [citado 15 julio 2006] Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=334765&blobtype=pdf>

MINISTERIO DE TRABAJO DE LA REPÚBLICA DE COSTA RICA. 2006. Lista de Ocupaciones y el Salario Mínimo. [on line] [citado 13 junio 2006]. Disponible en: <http://www.ministrabajo.go.cr/Macros/Salario/Salarios%20Minimos.htm>

MORÉN, P. 1999. Linfomas ganglionares y cutáneos presentan la misma Traslocación. [online] Diario médico, Dermatología. Barcelona, España. 14 setiembre. [citado 18 Mayo 2005]. Disponible en: <http://www.diariomedico.com/dermatologia/n140999.html>

NADJI, M.; MENG, L.; LIN, L.; NASSIRI, M.; MORALES, A. 1996. Detection of p53 gene abnormality by sequence analysis of archival paraffin tissue: a comparison with fresh-frozen specimens. Diagnostic Molecular Pathology. Diciembre. 5(4): 279–283.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 2005. Gene Tests. [online]. Funding Support National Library of Medicine, National Human Genome Research Institute, University of Washington, USA. [citado 22 Mayo 2005]. Disponible en: [http://www.genetests.org/servlet/access?id=8888891&key=R2RJ2fE9K83-w&gry=INSERTGRY&fcn=y&fw=EdK1&filename=/>](http://www.genetests.org/servlet/access?id=8888891&key=R2RJ2fE9K83-w&gry=INSERTGRY&fcn=y&fw=EdK1&filename=/)

NOGUCHI, M.; SHUICHIROH, F.; TAKEUCHI, T.; HIROHASHI, S. 1997. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathology International*. 47: 685-691.

OPS, 1998. La salud en las Américas. Publicación Científica No. 569. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. Estados Unidos. Volumen 2. p. 274-275, 928-331.

OPS; OMS; CCSS. Ministerio de Salud. 2004. Perfil del sistema de servicios de salud de Costa Rica. Serie Análisis de Situación de Salud No.15. San José, C.R. p. 9,16.

PAVELIC, J.; GALL TROSELJ, K.; BOSNAR, M.; KARDUM, M.; PAVELIC, K. 1996. PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. *Neoplasma*. 43: 75-81.

QIAGEN. 2003a. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, swabs, dried blood spots.

QIAGEN. 2003b. Reliability of DNA Quantification by Spectrophotometry. [online] [citado 1 mayo 2006] Disponible en: <http://www1.qiagen.com/Plasmid/Spectrophotometry.aspx?>

ROCKMAN, S. 1997. Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leucemia*. Junio. 11(6): 852-862.

SANZ, J. 2002. "De la patología celular a la molecular. El desafío de la anatomía patológica en el siglo XXI" [online]. En: Sesión Inaugural del Curso 2002, Real Academia Nacional de Medicina (15 de enero, 2002. Madrid, España). [citado 20 Mayo 2005]. Disponible en: <http://ranm.insde.es/inicio.htm>

SATO, Y.; SUGRE, R.; TSUCHIYA, B.; KAMEYA, T.; NATORI, M.; MUKAI, K. 2001. Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Diagn Mole Pathol*. 10(4): 265-271.

SETH, R.; RAMESHKUMAR, K.; CLARK, D.; RIPPIN, J.; SCHOLEFIELD, J.; JENKINS, D. 1998. Efficient extraction of DNA from paraffin-embedded tissue using Nucleon HT Kit for clinical molecular pathology research. *Life Science News Online*. Amersham Biosciences. Octubre.

SHI, S.; COTE, R.; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, R.; LIU, D.; LIM, H.; TAYLOR, C. 2002. DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen Retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH. [online]. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 50(8): 1005-1011. [citado 10 Mayo 2005]. Disponible en: www.jhc.org/cgi/content/short/50/8/1005

SHIBATA, D.; MARTIN, W.; ARNHEIM, N. 1988. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Research*. 48(16): 4564-4566.

SIGMA-ALDRICH. 2005. Extract DNA for Genotyping in 15 minutes. Extract-N-Amp Tissue & Extract-N-Amp Blood. Manual.

STATLAB. 2005. Fixation. [online]. Medical Products. [citado 5 julio 2006]
Disponibile en: <http://www.statlab.com/Protocol/HistologyFixation.htm>

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D.; JEWELL, S. 2002. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. American Journal of Pathology. Diciembre. 161(6): 1961-1971.

UNIVERSITY OF TOLEDO. 2004. DNA quantification (spectrophotometry). [online]. Laboratory for Microbial Ecology of Earth, Ecological and Environmental Sciences. p. 3. [citado 1 mayo 2006].
Disponibile en:
<http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/RESEARCH/Protocols/DNA%20quantification/DNA%20quantification.pdf>

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO (UPR). 2004. Biomasa: Extracción & Cuantificación de Ácidos Deoxyribonucleicos (ADN) Totales. [online]. Manual De Ecología Microbiana Departamento Biología. Recinto Universitario de Mayagüez. p. 1-4. [citado 1 mayo 2006]. Disponibile en: www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p4-dna.pdf.

VERÍSSIMO, J.; VASCONCELLOS, R.; MEDEIROS, T.; MENEZES, L.; CURIE, M.; LINA, L. 2004. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. Journal Bras Patol Med Lab. Junio. 40(3): 141-146.

WALTER, R.; ELIASON, J.; SUN, Y.; CORTESE, J.; EVERSON, R. Whole Gene Amplification form Archived Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues. LifeScience. A technical application Newsletter. Sigma-Aldrich. 6(1): 10-11.

WISTUBA, O. 2001. Patología molecular: Aplicaciones de la biología molecular en anatomía patológica. Revista médica de Chile. [online]. Julio. 129(7): 791-804. [citado 20 Mayo 2005] Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000700014&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-9887.

WONG, C.; DICIOCCIO, R.; ALLEN, H.; WERNESS, B.; PIVER, M. 1998. Mutations in BRCA1 from fixed, paraffin-embedded tissue can be artifacts of preservation. Cancer Genetic Cytogenetic. Noviembre. 107(1): 21–27.

ZEAITER, Z .; FOURNIER, P. ; RAOULT, D. 2002. Genomic Variation of *Bartonella henselae* Strains Detected in Lymph Nodes of Patients with Cat Scratch Disease. Journal of clinical Microbiology. Marzo. 40(3): 1023-1030.

ANEXOS

ANEXO 1. Boletín Técnico, Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, SIGMA.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit

Product Codes XNAT2 and XNAT2R

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

The Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit contains all the reagents needed to rapidly extract and amplify genomic DNA from mouse tails and other animal tissues, buccal swabs, hair shafts, and saliva. Briefly, the DNA is released from the starting material by incubating the sample with a mixture of the Extraction Solution and the Tissue Preparation Solution at room temperature for 10 minutes. There is no need for mechanical disruption, organic extraction, column purification, or precipitation of the DNA.

After adding Neutralization Solution B, the extract is ready for PCR. An aliquot of the neutralized extract is then combined with the Extract-N-Amp PCR Reaction Mix and user-provided PCR primers to amplify target DNA. The Extract-N-Amp PCR Reaction Mix is a 2x ready mix containing buffer, salts, dNTPs, and Taq polymerase. It is optimized specifically for use with the extraction reagents. It also contains the JumpStart™ Taq antibody for hot start PCR to enhance specificity, but does not contain the inert red dye found in the REExtract-N-Amp™ PCR Reaction Mix.

Reagents Provided	Product Code	XNAT2 100 Preps, 100 PCRs	XNAT2R 1000 Preps, 1000 PCRs
Extraction Solution	E 7526	24 ml	240 ml
Tissue Preparation Solution	T 3073	3 ml	30 ml
Neutralization Solution B	N 3910	24 ml	240 ml
Extract-N-Amp PCR Reaction Mix, This is a 2x PCR reaction mix containing buffer, salts, dNTPs, Taq polymerase, and JumpStart Taq antibody.	E 3004	1.2 ml	12 ml

Reagents and Equipment Required But Not Provided

- Microcentrifuge tubes (1.5 or 2 ml) or multiwell plate for extractions (200 µl minimal well volume)
- Small dissecting scissors
- Forceps (small to medium in size)
- Buccal swab (Sterile foam tipped applicator, Product Code A 9601)
- Sample collection card (Bloodstain card, Product Code C 2613)
- Tubes or plate for PCR
- Heat block or thermal cycler at 95 °C
- PCR Primers
- Thermal cycler
- Water, PCR grade, W 1754

Precautions and Disclaimer

The Extract-N-Amp Tissue PCR Kits are for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Wear gloves, safety glasses, and suitable protective clothing when handling any reagent provided with the kit. Consult the MSDS for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage

The Extract-N-Amp Tissue PCR Kit can be stored at 2 to 8 °C for up to 3 weeks. For long-term storage, greater than 3 weeks, -20 °C is recommended. Do not store in a "frost-free" freezer.

Procedure

All steps are carried out at room temperature unless otherwise noted.

A. DNA extraction from Mouse Tails, Animal Tissues, Hair, or Saliva

1. Pipette 100 μ l of Extraction Solution into a microcentrifuge tube or well of a multiwell plate. Add 25 μ l of Tissue Preparation Solution to the tube or well and pipette up and down to mix.
Note: If several extractions will be performed, sufficient volumes of Extraction and Tissue Preparation Solutions may be pre-mixed in a ratio of 4:1 up to 2 hours before use.
- 2a. **For Fresh or Frozen Mouse Tails:** Rinse the scissors and forceps in 70% ethanol prior to use and between different samples. Place a 0.5 - 1 cm piece of mouse tail tip (cut end down) into the solution. Mix thoroughly by vortexing or pipetting. Ensure that the mouse tail is in solution.
Note: For fresh mouse tails, perform extractions within 30 minutes of snipping the tail.
- 2b. **For Animal tissues:** Rinse the scissors or scalpel and forceps in 70% ethanol prior to use and between different samples. Place a 2 – 10 mg piece of tissue into the solution. Mix thoroughly by vortexing or pipetting. Ensure that the tissue is in the solution.
- 2c. **For Hair Shafts:** Rinse the scissors and forceps in 70% ethanol prior to use and between different samples. Trim excess off of the hair shaft leaving the root and place sample (root end down) into solution. Only one hair shaft, with root, is required per extraction.
- 2d. **For Saliva:** Pipette 10 μ l of saliva into the solution. Mix thoroughly by vortexing or pipetting.
- 2e. **For Saliva Dried on Card:** Pipette 50 μ l of saliva onto collection card and allow the card to dry. Rinse the punch in 70% ethanol prior to use and between different samples. Punch a disk (preferably 1/8 inch or 3 mm) out of the card from the area with the dried saliva sample. Place disk into the solution. Tap tube or plate on hard surface to ensure disk is in solution for incubation period.

3. Incubate sample at room temperature for 10 minutes.
4. Incubate sample at 95 °C for 3 minutes.
Note: Tissues will not be completely digested at the end of the incubations. This is normal and will not affect performance.
5. Add 100 μ l of Neutralization Solution B to sample and mix by vortexing.
6. Store the neutralized tissue extract at 4 °C or use immediately in PCR. Continue with Section C, step 1.
Note: For long term storage, remove the undigested tissue or transfer the extracts to new tubes or wells. Extracts may now be stored at 4 °C for at least 6 months without notable loss in most cases.

B. DNA extraction for Buccal Swabs

1. Collect buccal cells on swab and allow the swab to dry. Drying time is approximately 10 to 15 minutes.
Note: Due to the low volume of solution used for DNA extraction, a foam tipped swab should be used. Swabs with fibrous tips, such as cotton or dacron, should be avoided because the solution can not be recovered efficiently.
2. Pipette 200 μ l of Extraction Solution into a microcentrifuge tube. Add 25 μ l of Tissue Preparation Solution to the tube and pipette up and down to mix.
Note: If several extractions will be performed, sufficient volumes of Extraction and Tissue Preparation Solutions may be pre-mixed in a ratio of 8:1 up to 2 hours before use.
3. Place dried buccal swab into solution and incubate at room temperature for 1 minute.
4. Twirl swab in solution 10 times and then remove excess solution from the swab into the tube by twirling swab firmly against the side of the tube. Discard the swab. Close the tube and vortex briefly.
5. Incubate sample at room temperature for 10 minutes.
6. Incubate sample at 95 °C for 3 minutes.

7. Add 200 μ l of Neutralization Solution B to sample and mix by vortexing.
8. Store the neutralized extract at 4 $^{\circ}$ C or use immediately in PCR. Continue with Section C, step 1.
Note: Extracts may be stored at 4 $^{\circ}$ C for at least 6 months without notable loss in most cases.

C. PCR amplification

The Extract-N-Amp PCR Reaction Mix contains JumpStart *Taq* antibody for specific hot start amplification. Therefore, PCR reactions can be assembled at room temperature without premature *Taq* DNA polymerase activity.

Typical final primer concentrations are approximately 0.4 μ M each. The optimal primer concentration and cycling parameters will depend on the system being used.

1. Add the following reagents to a thin-walled PCR microcentrifuge tube or plate:

Reagent	Volume
Water, PCR grade	x μ l
Extract-N-Amp PCR reaction mix	10 μ l
Forward primer	y μ l
Reverse primer	y μ l
Tissue extract	4 μ l*
Total volume	20 μ l

*Note: The Extract-N-Amp PCR Reaction Mix is formulated to compensate for components in the Extraction, Tissue Preparation, and Neutralization Solutions. If less than 4 μ l of tissue extract is added to the PCR reaction volume, use a 50:50 mixture of Extraction:Neutralization B Solutions to bring the volume of tissue extract up to 4 μ l.

2. Mix gently.
3. For thermal cyclers without a heated lid, add 20 μ l of mineral oil on top of the mixture in each tube to prevent evaporation.
4. Perform thermal cycling. The amplification parameters should be optimized for individual primers, template, and thermal cycler.

Common cycling parameters:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	94 $^{\circ}$ C	3 minutes	1
Denaturation	94 $^{\circ}$ C	0.5-1 minutes	30-35
Annealing	45 to 68 $^{\circ}$ C	0.5-1 minutes	
Extension	72 $^{\circ}$ C	1-2 minutes (~ 1 kb/min)	
Final Extension	72 $^{\circ}$ C	10 minutes	1
Hold	4 $^{\circ}$ C	Indefinitely	

5. The amplified DNA can be loaded onto an agarose gel after the PCR is completed with the addition of a separate loading buffer/tracking dye such as Gel Loading Solution (G2526)
Note: PCR products can be purified, if desired, for downstream applications such as sequencing with the GenElute™ PCR Clean-Up Kit.

References

1. Dieffenbach, C.W., and Dveksler, G.S. (Eds.), PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1995). (Product Code Z36,411-8)
2. Don, R.H. et al., 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4008 (1991).
3. Erlich, H.A. (Ed.), PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York (1989). (Product Code P 3551)
4. Griffin, H.G., and Griffin, A.M. (Eds.), PCR Technology: Current Innovations, CRC Press, Boca Raton, FL (1994). (Product Code Z35,749-9)
5. Innis, M.A., et al., (Eds.), PCR Strategies, Academic Press, New York (1995). (Product Code Z36,445-2)

ANEXO 2. Método Miller *et al.* 1988, para extracción de ADN humano.

Volume 16 Number 3 1988

Nucleic Acids Research

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells

S.A.Miller, D.D.Dykes and H.F.Polesky

Memorial Blood Center of Minneapolis, 2304 Park Avenue South, Minneapolis, MN 55404, USA
Submitted November 18, 1987

One of the obstacles encountered when extracting DNA from a large number of samples is the cumbersome method of deproteinizing cell digests with the hazardous organic solvents phenol and isochochloroform. Several other non-toxic extraction procedures have been published, but require either extensive dialysis (1) or the use of filters (2). A rapid, safe and inexpensive method was developed to simplify the deproteinization procedure. This method involves salting out of the cellular proteins by dehydration and precipitation with a saturated NaCl solution.

Buffy coats of nucleated cells obtained from anticoagulated blood (ACD or EDTA) were resuspended in 15 ml polypropylene centrifugation tubes with 3 ml of nuclei lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl and 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2). The cell lysates were digested overnight at 37°C with 0.2 ml of 10% SDS and 0.5 ml of a protease K solution (1 mg protease K in 1% SDS and 2 mM Na₂EDTA). After digestion was complete, 1 ml of saturated NaCl (approximately 6M) was added to each tube and shaken vigorously for 15 seconds, followed by centrifugation at 2500 rpm for 15 minutes. The precipitated protein pellet was left at the bottom of the tube and the supernatant containing the DNA was transferred to another 15 ml polypropylene tube. Exactly 2 volumes of room temperature absolute ethanol was added and the tubes inverted several times until the DNA precipitated. The precipitated DNA strands were removed with a plastic spatula or pipette and transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 100-200 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 7.5). The DNA was allowed to dissolve 2 hours at 37°C before quantitating.

The DNA obtained from this simple technique yielded quantities comparable to those obtained from phenol-chloroform extractions. The 260/280 ratios were consistently 1.8-2.0, demonstrating good deproteinization. Restrictions were performed using a number of different enzymes requiring high, medium or low salt concentrations, all resulting in complete restriction. This procedure has been used in our laboratory on several thousand blood samples for parentage, population and forensic studies. This technique is used with our non-isotopic hybridization procedures (3) rendering the entire process of RFLP analysis free of toxic materials.

REFERENCES:

1. Longmire, J., Albright, K., Lewis, A., Meincke, L. and Hildebrand, C. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 859.
2. Leadon, S. and Cerutti, P. (1982) *Anal. Biochem.* 120, 282-288.
3. Dykes, D., Fondell, J., Watkins, P. and Polesky, H. (1986) *Electrophoresis* 7, 278-282.

ANEXO 3. Encuesta: Conceptualización de las nuevas técnicas involucradas en la patología molecular en Costa Rica

Datos personales:

Nombre:

Puesto:

1. ¿Ha tenido usted experiencia en el área de patología molecular?

1.1 Sí.....Durante cuánto tiempo:_____

1.2 No

2. ¿Según su experiencia, considera usted que las nuevas técnicas moleculares que se han desarrollado a nivel mundial, para reforzar el área de Patología son realmente necesarias?

2.1 Sí

2.2 No

¿Porqué?_____

3. ¿En Costa Rica cómo describiría usted el uso de estas nuevas alternativas?

3.1 Nulas (*pase a la pregunta 4*)

3.2 Incipientes (*pase a la pregunta 4*)

3.3 Desarrolladas (*pase a la pregunta 5*)

3.4 No sabe

4. ¿Qué cree usted que ha determinado este incipiente/nulo desarrollo de las técnicas moleculares para el diagnóstico e investigación en el área patológica?

4.1 Limitación recursos para la investigación

4.2 Divorcio CCSS/investigación

4.3 Falta de interés científico

4.4 Ausencia de personal científico calificado

4.5 Carencia de verdadera necesidad en el desarrollo de esta área

4.6 Otras, especifique:_____

5. ¿Conoce usted en Costa Rica, antecedentes de las técnicas moleculares utilizadas en la patología?

5.1 Sí.....Cuáles:_____

5.2 No

6. ¿Cree usted que en Costa Rica la aplicación de estas técnicas traerán ventajas al diagnóstico e investigación de las patologías y especialmente para una institución estatal como la CCSS?

6.1 Sí

6.2 No..... ¿Porqué? _____

7. ¿Qué casos clínicos considera usted prioritarios, para iniciar la implementación de tales técnicas?

8. ¿En qué forma considera usted que se debe iniciar la implementación de este tipo de técnicas en el país?

6.1 Laboratorios privados

6.2 Laboratorio estatal hospitalario

6.1 Laboratorio estatal centralizado

6.2 Otro.....Especifique:_____

Muchísimas Gracias.

ANEXO 4. Cotizaciones de Reactivos.

Facilitadas por la empresa Biocientífica Internacional S. de R.L. y Analytical Biosystems.

Cotización: HNN-Fer-Amer-VIII-05

Fecha: 24 de agosto, 2005

Vence: 24 de octubre, 2005

ITEM	CANT.	No. PART	DESCRIPCION	Precio Unit \$	Total \$
1	1	EP0402 Fermentas	Taq polimerasa 500 unidades, incluye buffer 10X y solución de MgCl ₂ Entrega inmediata	90.00	90.00
2	1	R0192 Fermentas	DNTPs, mix, 1 ml 10 mM Entrega inmediata	65.00	65.00
3	1	R0491 Fermentas	Agarosa Top Vision para productos de PCR, 100 gr Entrega inmediata	130.00	130.00
4	2	Olig0.05Kmol Fermentas	Síntesis de oligos B-Globina, 20-25 nmoles. Entrega 2 semanas	23.00	46.00
5	1	EO0491 Fermentas	Proteinase K, 20 mg/ml, 1 ml Entrega inmediata	25.00	25.00
6	1	B49 Fermentas	50X TAE Electrophoresis Buffer, 1L Entrega 2 semanas	70.00	70.00
7	1	R0611 Fermentas	6X Loading Dye Solution, 5x1ml Entrega inmediata	30.00	30.00
8	1	SM0321 Fermentas	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, 50 ug, rango 100 a 3000 bp Entrega inmediata	70.00	70.00
9	1	US75831 Amersham	Phenol:Cloroformo:Isopropanol 25:24:1, 400 ml. Entrega 5 semanas	235.00	235.00
10	1	17-1328-01 Amersham	Bromuro de etidio, 10 mg/ml, 10 ml. Entrega inmediata	95.00	95.00
11	1	US21608 Amersham	Acetato de sodio 99.9 %, 1 Kg Entrega 5 semanas	115.00	115.00
12	1	US15701 Amersham	EDTA sal disódica, 99%, 500 gr Entrega 5 semanas	105.00	105.00
13	1	US75819 Amersham	SDS, 98%, 100 gr. Entrega 5 semanas	50.00	50.00

Su referencia: **Reactivos biología molecular** Fecha cotización: 31 de Mayo de 2006

Nuestra referencia: **MDC-05-06-181** Fecha expiración: 30 DÍAS NATURALES

ITEM	CAN	NO. PART	DESCRIPCION	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1a	1	T5941-100G	Tris HCl marca Sigma, envase de 100 gramos Trizma® hydrochloride for molecular biology, Biotechnology Performance Certified, cell culture tested, ≥99% (titration)	\$52.00	\$52.00
1b	1	T5941-500G	Tris HCl marca Sigma, envase de 500 gramos Trizma® hydrochloride for molecular biology, Biotechnology Performance Certified, cell culture tested, ≥99% (titration) Entrega inmediata	\$127.00	\$127.00
2a	1	T6066-100G	Tris base marca Sigma, envase de 100 gramos Trizma® base cell culture tested, meets EP & USP testing specifications, Biotechnology Performance Certified	\$29.00	\$29.00
2b	1	T6066-500G	Tris base marca Sigma, envase de 500 gramos Tris base grado cultivo celular, marca Sigma, envase de 500 gramos Trizma® base cell culture tested, meets EP & USP testing specifications, Biotechnology Performance Certified Entrega inmediata	\$86.00	\$86.00
3a	1	214736-1L	Xilol grado reactivo, marca Aldrich, envase de 1 litro Xylenes reagent grade Reactivo catalogado como peligroso	\$29.00	\$29.00

ITEM	CAN	NO. PART	DESCRIPCION	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
3b	1	295884-1L	Orto Xilol grado HPLC, marca Aldrich, envase de 1 litro o-Xylene CHROMASOLV® Plus, for HPLC, 98% Entrega inmediata Reactivo catalogado como peligroso	\$78.00	\$78.00
4	1	E7148-500ML	Etanol absoluto grado biología molecular, marca Aldrich, frascos de 500 mililitros Ethanol for molecular biology, 190 proof Reactivo catalogado como peligroso	\$40.00	\$40.00
5	1	P5368-10PAK	PBS marca Sigma, cada tableta para disolver en 1 litro de agua destilada, paquete de 10 tabletas Phosphate buffered saline pH 7.4, Biotechnology Performance Certified	\$46.00	\$46.00
6	1	E5134-250G	EDTA sal disódica marca Sigma, envase de 250 gramos Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate for molecular biology, ≥99% Entrega inmediata	\$91.00	\$91.00
7	1	L4390-100G	SDS grado biología molecular, marca Sigma, envase de 100 gramos Sodium dodecyl sulfate for molecular biology, ≥98.5% (GC) Reactivo catalogado como peligroso	\$55.00	\$55.00
8	1	320242-1L	Cloroformo grado reactivo, envase de 1 litro Chloroform reagent grade, contains 0.5-1.0% ethanol as stabilizer Reactivo catalogado como peligroso	\$51.00	\$51.00
9	1	I9516-500ML	Isopropanol (2-propanol) grado biología molecular 99% puro, marca Sigma, envases de 500 mililitros Reactivo catalogado como peligroso	\$47.00	\$47.00
10	1	S3272-250G	Acetate de sodio grado electroforesis, marca Sigma, envase de 250 gramos Sodium acetate for electrophoresis, ≥99%, crystalline Entrega inmediata	\$35.00	\$35.00
11	1	C7901-50G	Chelex 100 sodium form particle size 50-100 mesh (dry). Marca Sigma, 50 gramos	\$101.00	\$101.00

ITEM	CAN	NO. PART	DESCRIPCION	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
12	1	P4850-1ML	Proteinasa K frasco de 1 mililitro actividad de 800 unidades Proteinase K from <i>Tritirachium album</i> for molecular biology, >800 units/mL, buffered aqueous glycerol solution, DNase, Nickase and RNase, none detected Requiere transporte especial en frío	\$64.00	\$64.00
13	1	XNAT2-1KT	Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit sufficient for 100 extractions, sufficient for 100 amplifications Marca Sigma	\$224.00	\$224.00
14a	1	WGA1-50RXN	GenomePlex® Whole Genome Amplification (WGA) Kit Marca Sigma Requiere transporte especial en frío	\$394.00	\$394.00
14b	1	WGA3-50RXN	GenomePlex® WGA Reamplification Kit Marca Sigma Requiere transporte especial en frío	\$197.00	\$197.00
15a	1	P3653-25G	Phenol ~99% , marca Sigma, envase de 25 gramos Reactivo catalogado como peligroso	\$18.00	\$18.00
15b		P3653-500G	Phenol ~99% , marca Sigma, envase de 500 gramos Reactivo catalogado como peligroso	\$82.00	\$82.00

ANEXO 5. Esquema del procesamiento de muestras para el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios

