

Implementación de una técnica de extracción de ADN a partir de saliva, como alternativa viable para estudios genéticos relacionados a salud bucal. (Implementation of a DNA extraction technique from saliva, as a viable alternative for genetic studies related to oral health)

García-Robles Mayra Judith³ *, Chávez-Guajardo Elsa Gabriela², Cervantes-Collazo Néstor Eduardo¹, Díaz-Arroyo Andrea¹ Isabel, Lara-Ontiveros Alma Marisol¹, Serrano-Páez Ana Isabel¹, Valenzuela-Gurrola Manuel de Jesús³.

¹ Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Zacatecas, ² Unidad Académica de Odontología, Área de biológicas, UAZ. ³ Universidad Politécnica de Zacatecas, Departamento de Ingeniería en Biotecnología.

Correo electrónico: * jgarcia@upz.edu.mx

Resumen

Introducción. La extracción de ADN es una técnica de rutina, básica y fundamental para el desarrollo de otros procedimientos, que dependen de esta importante molécula de una forma íntegra. La toma de muestra sanguínea por venopunción se utiliza rutinariamente para extraer ADN, sin embargo, presenta algunos inconvenientes. Por lo anterior, resulta de interés disponer de fuentes biológicas alternativas. Todas las células nucleadas pueden ser fuente para extraer ADN. En este contexto, se propone obtener ADN a partir de una muestra de saliva. **Objetivo.** Implementar una técnica de extracción de ADN a partir de saliva, como alternativa viable para estudios genéticos. **Metodología.** Se recolectaron muestras de saliva y se procesaron bajo las siguientes condiciones: enjuague bucal con solución salina o solución de sacarosa, incubaciones a 1, 2 y 8 hrs a 55 o 60°C. La integridad de la muestra de ADN obtenida se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Resultados.** Se mostró que protocolo descrito en el presente estudio, es eficiente para obtener un ADN íntegro y podría ser una técnica de fácil implementación para la mayoría de los laboratorios.

Palabras clave: ADN genómico salival, técnica de extracción, estudios genéticos.

Abstract

Introduction. DNA extraction is a standard technique, basic and fundamental for the development of other procedures, which depend on this important molecule in an integral form. Blood sampling by venipuncture is routinely used to extract DNA, however, it has some inconveniences. Therefore, alternative biological sources are of interest. All nucleated cells can be a source for DNA extraction. In this context, we propose to obtain DNA from a saliva sample. **Objective.** To implement a DNA extraction technique from saliva as a viable alternative for genetic studies. **Methodology.** Saliva samples were collected and processed under the following conditions: mouthwash with saline solution or sucrose solution, incubations at 1, 2 and 8 hrs at 55 or 60°C. The integrity of the DNA sample obtained was evaluated by 1% agarose gel electrophoresis. **Results.** It was shown that the protocol described in the present study is efficient to obtain an intact DNA and could be an easily implemented technique for most laboratories.

Keywords: salivary genomic DNA, extraction technique, genetic studies.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula de gran relevancia para la vida, ya que almacena la información genética necesaria para la sobrevivencia, mantenimiento y funcionamiento de los organismos. En células eucariotas, el ADN es resguardado en el núcleo celular, sitio donde se llevan a cabo procesos moleculares como la replicación, transcripción y el flujo hacia la decodificación del mRNA en ribosomas. En organismos diploides como los humanos, el ADN se encuentra organizado en 23 pares de cromosomas, que en su conjunto representan el genoma del organismo. Los nucleótidos representan la unidad básica de los ácidos nucleicos; se componen de una base nitrogenada (purina o pirimidina), una pentosa (desoxirribosa para el ADN) y un grupo fosfato. La unión de nucleótidos mediante enlaces fosfodiéster, forma cadenas de polinucleótidos, dispuestas de forma antiparalela, estructura conocida como la doble hélice (Minchin & Lodge, 2019).

Con el desarrollo de técnicas moleculares en las últimas décadas, se ha considerado al ADN como una molécula de gran utilidad en las áreas de la salud, ya sea para el estudio de genes, funciones o mutaciones, así como para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades y estudios genéticos. Por lo anterior, la extracción de ADN es una técnica de rutina, básica y fundamental para el desarrollo de otros procedimientos, que dependen de esta importante molécula de una forma íntegra. Actualmente existen diferentes técnicas, que varían de acuerdo al tipo de muestra y reactivos utilizados. De manera general, comparten las siguientes etapas: 1) disrupción celular, 2) remoción de membranas lipídicas, proteínas y otros ácidos nucleicos, y 3) purificación/concentración del ADN (Ali, Rampazzo, Costa, & Krieger, 2017).

Una muestra sanguínea, representa la fuente biológica más utilizada para extraer ADN. Sin embargo, la toma de muestra por venopunción, presenta algunos inconvenientes, como molestias y dolor en el sitio de la punción, así como un proceso de extracción de sangre difícil, particularmente en niños y ancianos. Por lo

anterior, resulta factible disponer de fuentes biológicas alternativas, con resultados óptimos y de calidad.

La saliva es un líquido segregado por glándulas salivales, en su conjunto representa una mezcla de componentes inorgánicos, componentes orgánicos no proteicos, proteínas, polipéptidos, células epiteliales, células inmunes, hormonas y lípidos (Angulo & Sánchez, 2016). Todas las células nucleadas pueden ser fuente para extraer ADN. En este contexto, es importante mencionar que el número de células epiteliales por mL de saliva es aproximadamente 4.3×10^5 , lo cual es similar al número de células nucleadas en 1 mL de sangre (4.5×10^5) (Quinque, Kittler, Kayser, Stoneking, & Nasidze, 2006).

Recientemente, se ha mostrado interés por los estudios genéticos para el diagnóstico de enfermedades o susceptibilidad en la población general. Entre ellos, destaca la identificación de polimorfismos genéticos de nucleótido simple (SNPs) y su relación con algunas enfermedades, como cáncer, aquellas relacionadas a obesidad, e incluso con la salud bucal. Por lo anterior, la extracción de ADN representa una técnica básica para el desarrollo de otros métodos que requieren ADN como materia prima, por ejemplo, la reacción de la cadena de polimerasa (PCR). Actualmente, existen kits comerciales que permiten extraer el ADN a partir de muestras biológicas como muestra sanguínea o saliva; sin embargo, el inconveniente radica en que tienen un alto costo y no todos los laboratorios cuentan con recurso económico para su compra. Por lo anterior, se propone estandarizar una técnica de extracción de ADN a partir de saliva, para implementarla como alternativa viable para estudios genéticos relacionados en el contexto de la salud bucal.

Materiales y métodos

Para obtener las muestras de saliva, se solicitó la participación de 15 voluntarios (rango de edad de 18 a 50 años). La aprobación Ética del estudio fue otorgada por la UAO/UAZ con el número de registro UAZ-2020-38075.

Tomando en cuenta la declaración de Helsinki, a cada participante se le explicó con detalle el propósito y procedimiento del protocolo y se obtuvo la carta de consentimiento informado.

Toma de muestra de saliva

A cada voluntario se le solicitó que lavara su boca una hora previa a la recolección de la saliva. Las muestras de saliva se obtuvieron bajo las siguientes condiciones: Para el protocolo 1, cada participante se enjuagó la boca vigorosamente durante un minuto con alguna de las siguientes soluciones: solución salina (0.14 M) o solución de sacarosa al 3%. Las muestras obtenidas se transfirieron a un tubo de polipropileno de 15 ml que contenía 3 mL de solución TNE [EDTA 0.5M, NaCl 0.5M, Tris-HC 1M (pH 7.5)] diluido en etanol al 70%.

Se seleccionó el protocolo con base a la disposición de reactivos/equipos y se realizó con algunas modificaciones.

Protocolo de extracción de ADN

Los tubos de polipropileno con las muestras obtenidas con solución salina o sacarosa se centrifugaron 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se mantuvo el botón celular. Se le agregó 1 mL de solución TNE para resuspender el botón celular. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos y se decantó nuevamente el sobrenadante. Cada tubo se homogenizó en vortex a velocidad media durante 5 segundos y se agregaron 1.3 mL de solución de lisis [Tris-HCl 1M, (pH 7.5) EDTA 0.5M, SDS 0.5%], y 10 µl de proteinasa K (20 mg/mL). Nuevamente se homogenizó mediante vortex a velocidad media durante 5 segundos. A continuación, los tubos se incubaron a baño María bajo los siguientes protocolos: A. Solución de sacarosa e incubación de 1 hrs a 55°C. B. Solución de sacarosa e incubación de 1 hrs a 60°C. C. Solución de sacarosa e incubación de 2 hrs a 55°C. D. Solución de sacarosa e incubación de 2 hrs a 60°C. E. Solución de sacarosa e incubación de 8 hrs a 55°C. F. Solución salina e

incubación de 1 hrs a 55°C y G. Solución salina e incubación de 1 hrs a 60°C. Después de la incubación, se transfirió 1 mL de la mezcla incubada a tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL. La eliminación de proteínas y otros contaminantes se realizó con la adición de 400 µl de solución de acetato de amonio 8M y EDTA 1M, los tubos se homogenizaron en vortex a alta velocidad por 5 segundos y se centrifugaron en una mini centrifuga a 17000 g durante 10 minutos. Para la precipitación del ADN, se vació el contenido del tubo anterior a un tubo de polipropileno de 15 mL que contenía previamente 1 mL de isopropanol frío. Se invirtió suavemente al menos 20 veces, hasta observar un “coagulo blanco”, el cual corresponde al ADN obtenido. Para la etapa de purificación, se “pescó el ADN” de cada tubo y se transfirió a otro tubo Eppendorf estéril con 1 mL de etanol al 70%. Después de homogenizar por inversión, se centrifugaron los tubos a 17000 g durante 10 minutos. Finalmente se decantó el etanol y se invirtieron los tubos Eppendorf sobre papel absorbente para permitir la evaporación del etanol. Finalmente, el ADN se resuspendió con 100µl de buffer TE [Tris 1M (pH 7.8) y EDTA 1M] y se almacenó a -20°C hasta su uso. (Aidar & Line, 2007; Barboza et al., 2016)

Resultados

Durante el desarrollo de los protocolos, se observó que cuando la muestra de saliva correspondía a los protocolos F y G, no fue evidente el “coagulo blanco” obtenido durante la etapa de precipitación del ADN, el cual fue muy perceptible con los protocolos que provenían de muestra de saliva con enjuague de sacarosa. Por lo cual, se decidió completar los protocolos, solo con las muestras obtenidas bajo presencia de sacarosa. Para evaluar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 1 se observa que el carril que corresponde al control positivo, muestra una banda de gADN definida y en la parte superior del gel, la cual muestra una integridad alta. Asimismo, los carriles 2, 3, 4 y 6, mostraron bandas definidas, pero con una menor intensidad. El carril

5, mostró una banda integra y con una integridad similar al control positivo. Finalmente, en los carriles 7 y 8, no se observa banda definida, y al contrario de los otros carriles, se aprecia un smear a lo largo del gel, lo cual sugiere que la muestra esta degradada. De acuerdo a los resultados, se sugiere que el protocolo E, es óptimo para utilizarse como una técnica de extracción de ADN viable a partir de saliva.

Discusión

La saliva representa una fuente biológica de ADN de fácil recolección y sin las complicaciones típicas de la obtención de muestra sanguínea por punción venosa. Actualmente es de interés la realización de estudios genéticos para identificar factores de riesgo asociados a diversas enfermedades, entre ellas la salud bucal. De hecho, hay condiciones como la obesidad o condiciones relacionadas a ella, que también están presentes en patologías típicas de la salud oral, (Girano Castaños & Robello Malatto, 2020). Por lo anterior, los pacientes que asisten a consulta odontológica, pueden considerarse excelentes candidatos para participar en estudios genéticos, por lo que la posibilidad de extraer ADN a partir de una muestra de saliva, resulta favorable en este contexto. Existen varias técnicas de extracción de ADN a partir de saliva; para el propósito del presente estudio, se eligió una técnica que fuera fácil de implementar y se utilizarán reactivos comunes en los laboratorios de investigación. Se realizaron algunas modificaciones, como la obtención de la saliva mediante un enjuague bucal con solución salina o solución de sacarosa. En otros estudios, se mostró la eficiencia del uso de solución salina como enjuague bucal. (Barboza et al., 2016)

De acuerdo a nuestros resultados, resultó mejor el uso de solución de sacarosa, ya que probablemente aumente la salivación y por ende un incremento en las células obtenidas en la muestra de saliva. Lo anterior se observó en la fase de precipitación del ADN. Por su parte, la solución de TNE disminuye la viscosidad del enjuague bucal y facilita la obtención del botón celular. Asimismo, la adición de EDTA a las soluciones de trabajo, ayuda a preservar la inte-

gridad del ADN, (Aidar & Line, 2007). La proteinasa K es una enzima es una proteasa de serina de amplio espectro, frecuentemente utilizada en los protocolos de extracción de ADN para digerir proteínas y remover impurezas. La temperatura optima de la enzima ocurre de los 50 a 65 oC. En el presente estudio, se realizó la incubación a 55 y 60 oC durante 1, 2 y 8 hrs, observando resultados similares respecto a temperatura y tiempo corto. En contraste, la incubación durante 8 hrs permitió obtener una banda de ADN integra y con apariencia similar a la banda proveniente de una muestra de ADN obtenida por muestra sanguínea (Figura 1). Lo cual sugiere que la actividad optima de la enzima, también involucra un mayor tiempo de incubación. (Dairawan & Shetty, 2020)

Con los resultados obtenidos, se sugiere que el protocolo de extracción de ADN a partir de saliva, es un método viable y de fácil implementación en los laboratorios de investigación que requieran obtener muestras de ADN utilizado saliva como fuente biológica. Sin embargo, para validar los resultados obtenidos, sería necesario complementar el estudio con la evaluación de la calidad del ADN, mediante la lectura en el espectrofotómetro, así como validar su aplicación en estudios genéticos, empleando el ADN salival como materia prima para la realización de otras técnicas de biología molecular como PCR y RFLP.

Conclusiones

El ADN obtenido a partir de saliva, representa una alternativa viable para estudios genéticos relacionados con la salud bucal. Los resultados obtenidos mostraron que el protocolo descrito en el presente estudio, es eficiente para obtener un ADN integro y es una técnica de fácil implementación para la mayoría de los laboratorios.

Referencias bibliográficas

Aidar, M., & Line, S. R. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*, 18(2), 148-152.

doi:10.1590/s0103-64402007000200012

Ali, N., Rampazzo, R. d. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 9306564-9306564.

doi:10.1155/2017/9306564

Angulo, G. B., & Sánchez, E. A. H. (2016). Utilidad de las muestras de saliva en el diagnóstico por el laboratorio. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, 63, 13-18.

Barboza, H., Aprígio, J., Carvalho, C., Ribeiro, M., Lima, M., Quirico-Santos, T., & Amorim, M. (2016). Efficient DNA Extraction Protocol for Single Nucleotide Polymorphisms Genotyping in Down Syndrome. *Journal of Down Syndrome & Chromosome Abnormalities*, 2, 1.

doi:10.4172/2472-1115.1000114

Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *AJBSR*, 8(1).

Girano Castaños, J., & Robello Malatto, J. (2020). Relación entre obesidad y enfermedad periodontal: revisión de la literatura %J *Horizonte Médico (Lima)*. 20.

Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in biochemistry*, 63(4), 433-456. doi:10.1042/EBC20180038

Quinque, D., Kittler, R., Kayser, M., Stoneking, M., & Nasidze, I. (2006). Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. *Analytical Biochemistry*, 353(2), 272-277. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.

