



Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilagosos

JOSE SERGIO HLEAP^{1,2}, HEIBER CÁRDENAS² & FELIPE GARCÍA-VALLEJO³

¹ *Fundación Colombiana para la investigación y conservación de tiburones y rayas SQUALUS, Carrera 79 No. 6-37, Cali, Colombia. jshleap@squalus.org.*

² *Grupo de estudios en genética, ecología molecular y fisiología animal, Sección de genética, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia. Calle 13# 100-00, Edificio 320.*

³ *Laboratorio de biología molecular y patogénesis. Universidad del Valle, Cali-Colombia. Calle 4B No 36-00, Edificio 116 "Luis María Borrero".*

Resumen. Conservar las muestras de tejido y la calidad del ADN, es esencial para que las técnicas moleculares funcionen apropiadamente. Por este motivo, la estandarización de los métodos de preservación de tejido y extracción de ADN, son importantes, considerando la disponibilidad de recursos y su replicabilidad. Se evaluaron cinco métodos de preservación de tejido, dos fuentes tisulares y cinco protocolos de extracción, tanto cualitativamente, cuantitativamente y estadísticamente. No se encontraron diferencias significativas entre tejidos, mientras que si las hubo entre protocolos de extracción y métodos de preservación. Si consideramos la relación costo/beneficio y la cantidad de ADN, los protocolos más eficientes fueron el seis y el nueve, con muestras preservadas en etanol a -20 °C o con un buffer de extracción sin proteasa en una condición no criogénica. Por lo tanto, se recomienda mantener de 5-20mg de tejido (o más si se requiere hacer más de una extracción) en etanol frío, seguido de una extracción usando el protocolo 9. Sin embargo, si se está trabajando con recursos más limitados, la mejor opción es mantener de 5-20mg de tejido en Etanol-EDTA (para conservación a corto plazo) o en tampón de Longmire (para preservación por más tiempo), extrayendo con protocolo 6.

Palabras-Clave: Chondrichthyes, tampón de preservación de tejido, preservación de ADN, calidad de ADN.

Abstract. Non-cryogenic tissue preservation and DNA extraction: an application for cartilaginous fishes. Conservation of tissue samples and quality of the DNA are crucial for the molecular techniques to work properly. For this reason, the standardization of the methods for tissue preservation and DNA extraction is basic, considering the availability of resources and its replicability. Five tissue preservation methods, two tissue types and five extraction protocols were evaluated qualitatively, quantitatively and statistically. No significant differences among tissues were observed, while there were differences in the preservation methods and extraction protocols. Considering the cost/benefit relation and quantity of DNA, the most efficient protocols were six and nine, which used samples preserved in ethanol at -20 °C or with an extraction buffer without protease in non-cryogenic condition. For that matter, in optimal conditions (enough time, economic resources and complete infrastructure) is recommended to maintain 5-20mg of tissue in cold ethanol (with a posterior cryogenic maintenance), coming with a DNA extraction made with P9 or an appropriate kit. However if the condition is of scarce resources, the best choice is to maintain 5-20mg in Ethanol-EDTA (For short term preservation or Longmire's buffer (for longer terms) and extract the DNA with protocol 6 or 9 depending on purity needs.

Keywords: Chondrichthyes, Tissue preservation buffer, DNA preservation, DNA quality.

Introducción

En las últimas décadas, el trabajo en genética se ha dedicado al estudio de las poblaciones por medio de la aplicación de técnicas moleculares que han sido desarrolladas, aplicadas y/o estandarizadas principalmente en microorganismos (Apfalter *et al.* 2001), plantas (Milligan 1998), teleosteos (Hua Yue & Orban 2001), aves (Seutin *et al.* 1991) y mamíferos (Kilpatrick 2002).

La viabilidad de estudios moleculares recae en gran medida en la habilidad del investigador para aislar el ADN en una buena calidad y cantidad con la mínima cuantía de tejido (Hua Yue & Orban 2001), pues la fidelidad y reproducibilidad de la prueba dependen de la suficiente calidad y cantidad del ADN aislado de una mínima cantidad de tejido (Sunnucks & Hales 1996), lo que enfatiza la importancia de la investigación básica para mejorar las técnicas moleculares.

Sin embargo, la investigación básica que lleve a mejorar las técnicas de preservación de tejidos y, por ende, del ADN muchas especies o grupos de seres vivos ha sido relegada a un segundo plano, casi desconociendo que con un ADN de alta calidad, es más fácil construir genotecas de ADN y por ende aprovechar al máximo los muestreos realizados y la colaboración entre científicos que no pueden acceder fácilmente a las muestras, así como una comparación más exacta de datos entre laboratorios (Apfalter *et al.* 2001).

La información sobre las técnicas de extracción de ADN y preservación del tejido en elasmobranchios son importantes pues permiten que trabajos sobre caracterización del grupo, genética de poblaciones, filogenia, estudios de diversidad genética, entre otros, se lleven a cabo con ADN de calidad y con una mayor eficiencia en su consecución, máxime en muestreos largos en zonas cálidas y húmedas, lo que requiere de técnicas para la preservación de tejidos por amplios periodos de tiempo (Dawson *et al.* 1998). Dessauer *et al.* (1996) concluyeron que la congelación es el método de preservación más efectivo, sin embargo, la criopreservación no siempre es posible en muchas situaciones de campo, tales como el transporte de nitrógeno, faenas de más de tres días, problemas de transporte en aviones y barcos, entre otros (Kilpatrick 2002). Por estos motivos, la construcción de bancos de tejidos se ha dificultado, sobre todo en organismos acuáticos, donde su recolección es costosa y la congelación no es una opción viable. Por ejemplo, en elasmobranchios, no existen colecciones de tejidos ni genotecas específicas organizadas por regiones naturales, sitios de muestreo, entre otros. Esta situación ha dificultado la

generación de conocimiento taxonómico, sistemático, genético y evolutivo de este grupo, capturado en muchos países como fauna acompañante de diversas pesquerías y en otros, tienen pesca dirigida al grupo, requiriéndose un mayor conocimiento genético en diferentes áreas, con el propósito de conservar, conocer y explotar el recurso de manera sostenible.

Este estudio tuvo como objetivos 1) Contribuir al desarrollo de métodos de preservación de tejidos que eviten la criogenia, 2) Apoyar el mejoramiento de protocolos de extracción de ADN de alta calidad en elasmobranchios y 3) asesorar a los investigadores en este grupo de animales en la apropiada selección de tejidos, métodos de preservación y protocolos de extracción de ácidos nucleicos, de acuerdo con la logística y los recursos disponibles en estas investigaciones

Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

En agosto de 2003 y noviembre de 2004, se realizaron dos salidas a bordo de una embarcación camaronera, en aguas del pacífico central colombiano. 13 especímenes de las especies *Rhinobatos leucorhynchus*, *Sphyrna tiburo*, *Aetobatus narinari*, *Gymnura marmorata*, *Dasyatis longa*, *Sphyrna tiburo*, *Urotrygon aspidura*, *Urotrygon rogersi* y *Mustelus lunulatus* fueron capturados mediante malla de arrastre con ojo de 2 pulgadas y $\frac{3}{4}$ e identificados a bordo, a nivel de especie con la ayuda de claves taxonómicas (Compagno *et al.* 1995, McEachran & di Sciara 1995), obteniendo 13 muestras de hígado y 13 de músculo.

Preservación de los tejidos

13 biopsias de 0.5cm³ de hígado y 13 de músculo, fueron sometidas a 1.5ml de cinco medios (tampones o buffers) de preservación (Etanol a -20°C, Etanol-EDTA, Tampón de Longmire, DMSO-NaCl y CTAB-NaCl; Tabla I), es decir, 13 muestras de cada tejido por buffer, guardados en tubos Eppendorf® de 2 ml. Cada una de las 26 muestras sometidas a preservación, fueron divididas en seis submuestras de cinco, 10, 20, 40, 80 y 160 miligramos de tejido para realizar la extracción de ADN, para un total de 780 submuestras (13 individuos por dos tejidos por cinco métodos de preservación por seis concentraciones de tejido) a extraerles el ADN.

Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo con cinco protocolos de extracción (Tabla II), obteniendo así 3900 unidades experimentales (780 submuestras por cinco protocolos de extracción).

Tabla I. Métodos de preservación (Tampones) usados en el estudio, indicando su composición y referencia respectiva.

Método	Composición	Referencia
1. Etanol a -20°C	96% Etanol absoluto (96,8%; Merck 108543) mantenido a -20°C.	Milligan 1998
2. Etanol - EDTA (E-E)	96% Etanol (96,8%; Merck 108543) + 0.1mM EDTA ($\geq 99\%$; Sigma E5134-250G).	Wasko <i>et al.</i> 2003
3. Tampón de Longmire	0.1 M Tris (Trizma® base $\geq 99\%$; Sigma 77861-250G) + 0.1 M EDTA ($\geq 99\%$; Sigma E5134-250G) + 0.01 M NaCl ($\geq 98\%$; Sigma S3014-500G) + 0.5% peso/volumen de SDS ($\geq 98,5\%$; Sigma 151213).*	Longmire <i>et al.</i> 1997
4. DMSO-NaCl	20% DMSO ($\geq 99.9\%$; Sigma 67685-100G) + Sobresaturación con NaCl ($\geq 98\%$; Sigma S3014-500G)	Shiogama <i>et al.</i> 1987; Shah 1983
5. CTAB – NaCl	Solución CTAB ($\geq 99\%$; Sigma 57090-100G) + Sobresaturación con NaCl ($\geq 98\%$; Sigma S3014-500G)	Milligan 1998

*<http://research.amnh.org/amcc/labfacilities6.html>, última consulta: Septiembre 2009

Tabla II. Protocolos de extracción usados en el estudio, indicando su composición principal, el primer y segundo paso de purificación y su referencia respectiva. En todos los casos el método de disrupción del tejido fue por maceración. Los números corresponden a la notación usada por Milligan (1998).

Protocolo	Solubilización del tejido	Purificación inicial	Segunda purificación	Referencias
5. Chelex-100 (Bio-Rad 1421253)	Agua	Ninguna	Ninguna	Walsh <i>et al.</i> 1991; Ellegren 1994; Sensabaugh 1994
6. SDS	SDS ($\geq 98,5\%$; Sigma 151213)	Precipitación con isopropanol	Ninguna	Edwards <i>et al.</i> 1991
7. CTAB	CTAB ($\geq 99\%$; Sigma 57090-100G)	Cloroformo	Precipitación con isopropanol	Doyle & Dickson 1987; Doyle & Doyle 1987; Lodhi <i>et al.</i> 1994
9. Digestión de proteínas	SDS ($\geq 98,5\%$; Sigma 151213)	Fenol : Cloroformo (2X), Cloroformo	Precipitación con etanol	Koebner <i>et al.</i> 1986; Kawasaki 1990; Hillis <i>et al.</i> 1990; Pääbo S. 1990; Cooper 1994;
10. Precipitación de proteínas	SDS ($\geq 98,5\%$; Sigma 151213)	Precipitación de proteínas	Precipitación con isopropanol (2X)	Dellaporta <i>et al.</i> 1983; Fang <i>et al.</i> 1992; del Castillo-Agudo <i>et al.</i> 1995

Los volúmenes de cada protocolo fueron idénticos en cada concentración de tejido, realizando estandarizaciones del tiempo y del número de centrifugaciones (Figura 1). Estas estandarizaciones

se compararon con el kit de extracción de ADN DNeasy® de QIAGEN®, siguiendo las especificaciones del fabricante. En esta investigación, los protocolos extracción basados en

Chelex y CTAB no se incluyeron en los análisis posteriores, pues no mostraron bandas en gel de agarosa (1%; Sigma 9012366) indicadora de la existencia de ADN en cantidad apropiada para realizar diversas técnicas moleculares (PCR, clonación, RAPDS, RFLPs, VNTRs, FISH, entre otras). Todos los procedimientos de extracción fueron realizados en el laboratorio de biología molecular del Instituto Alexander Von Humboldt en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Palmira-Colombia).

Cualificación y cuantificación del ADN

El ADN se cualificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sigma

9012366), corrido en tampón TBE y revelado con 2 µl de solución de bromuro de etidio al 0,01%, observando el grado de degradación que hubiera en cada muestra así como también la prueba con diluciones, para detectar sobresaturación del ADN y por ende un falso negativo. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta Uvitec®. La cuantificación como tal, fue realizada por fluorometría utilizando el fluorocromo HOECHST® 33258 y revelada en un fluorómetro digital DyNAquant 200 (Hoefler, Pharmacia Biotech®), siguiendo las especificaciones del laboratorio de biología molecular del Instituto Von Humboldt en el CIAT.

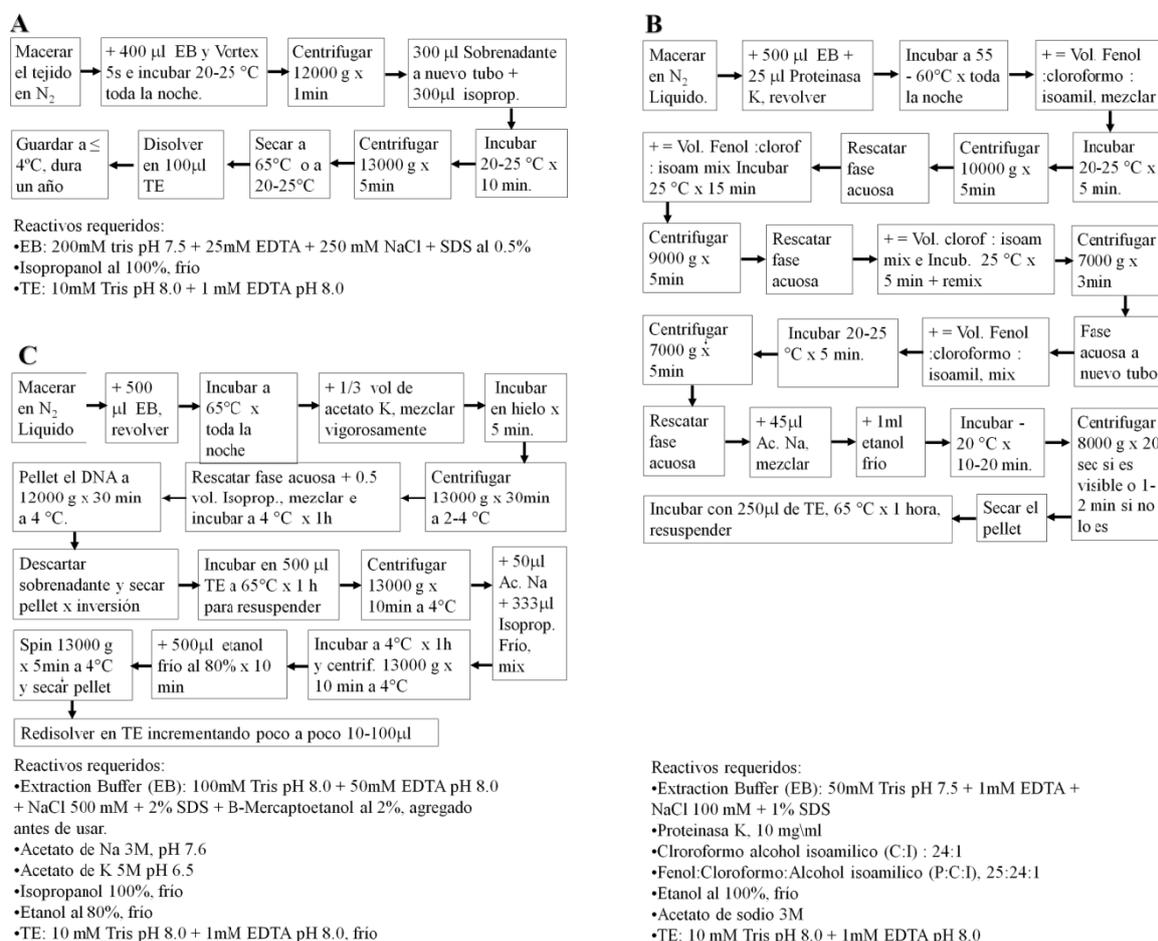


Figura 1. Diagramas de flujo de los protocolos que fueron positivos para ADN en agarosa al 1%. A. Protocolo SDS (6; Milligan 1998), B. Protocolo de digestión proteica (9; Milligan 1998). C. Protocolo de precipitación proteica (10; Milligan 1998).

Análisis de datos

Análisis cuantitativos

Con el ADN extraído y cuantificado, se realizaron matrices de datos por tejido, por protocolo de preservación y por protocolo de extracción para comparar la efectividad de cada uno. Dichas matrices fueron visualizadas en gráficas

de líneas simples y planos de 3 dimensiones (3D), realizadas en el programa "STATISTICA 7.0", usando como ejes: El tiempo que toma cada extracción de ADN y mantenimiento del tejido, el costo de cada extracción (medido como la cantidad de dólares gastados en el procesamiento de una muestra) y la cantidad de ADN en nanogramos. Esta

metodología, es una adaptación a la usada por Cortés (1997). De acuerdo con estas gráficas se determinó qué protocolos y tipo tisulares son más eficientes, considerando el tiempo empleado en cada método, la facilidad en su implementación y costo. También se consideró como criterio, el tipo de tejido y la cantidad y calidad de ADN extraído. Por último, se correlacionó el tipo y la cantidad de tejido con la cantidad de ADN extraído por protocolo y medio de preservación.

Análisis estadísticos

Para saber si los datos se distribuían normalmente se llevó a cabo una prueba de Kolmogorov-Smirnov usando el programa STATISTICA 7.0 2007. Debido a que los datos no se ajustaron a la distribución normal se realizaron análisis no paramétricos usando el mismo programa, para evaluar las diferencias en la cantidad de ADN entre los métodos de preservación y protocolos de extracción usados (prueba de Kruskal-Wallis) y entre tipos tisulares (Prueba de Mann-Whitney).

Análisis de la relación costo/beneficio

Para cada protocolo se calculó el tiempo de extracción de ADN, el costo por muestra, la cantidad promedio de ADN obtenida, el valor por nanogramo de ADN, el valor de un nanogramo de ADN por hora de trabajo y la cantidad de ADN por hora por dólar. Para cada protocolo, el tiempo de duración se calculó sumando la cantidad de horas usadas en cada paso, incluyendo las incubaciones y el procesamiento. El costo por muestra se calculó utilizando el costo por unidad utilizada de reactivos en la extracción en cada muestra. Con la información anterior, se calculó el valor de extracción de un nanogramo de ADN dividiendo del costo por la cantidad promedio de ADN extraída y posteriormente, se calculó el valor de cada nanogramo extraído en una hora de trabajo, dividiendo el costo por muestra, sobre la multiplicación del tiempo que toma la extracción y la cantidad promedio obtenida. Estas estimaciones no incluyen el tiempo y costo del investigador. Finalmente, se estimó la cantidad de ADN obtenida en una hora con un dólar, dividiendo la cantidad promedio de ADN extraído por la multiplicación del costo y el tiempo que toma la extracción.

Resultados

No hubo diferencias significativas entre tejidos para la cantidad promedio de ADN extraído (M-W U: 3464.500; $p > 0.05$), pero el hígado mostró mayor variabilidad (Desviación estándar [DE] = 271.39) que el músculo (DE = 186.54). Con respecto a la cantidad de tejido utilizado, hubo diferencias significativas entre los categorías usadas [K-W: H

(5, N= 180) = 48.83; $p < 0.0001$], mostrando que 5mg tiene diferencias con 40, 80 y 160mg, pero no con 10 ni 20mg; la categoría de 10mg tuvo diferencias con las de 80 y 160mg, pero no con el resto de ellos; la de 20mg mostró diferencias significativas únicamente con la categoría de 160mg. En todos los casos se cumplió la expectativa de que a mayor cantidad de tejido, mayor cantidad de ADN extraído. Se observaron diferencias significativas en la cantidad de ADN promedio obtenido entre los tampones de preservación [K-W H: (4, N= 180) = 24.26819; $p = 0.0001$]. La postANOVA no paramétrica mostró que la cantidad de ADN obtenida de los tejidos preservados en la solución de CTAB buffer fue significativamente menor que todos los demás tampones, exceptuando el tampón de Longmire, mientras que este último no mostró diferencias significativas con ninguno de las soluciones perseverantes evaluadas. La preservación en etanol frío produjo el mejor resultado en cuanto a obtención de ADN, seguido por DMSO, E-E y el tampón de Longmire buffer y el que obtuvo la menor cantidad de ADN fue la solución de CTAB-NaCl.

Los protocolos de extracción cinco (Chelex 100) y siete (CTAB) no mostraron banda en la cualificación en gel de agarosa, mientras que los protocolos seis (SDS), nueve (digestión de proteínas) y diez (precipitación de proteínas), dieron positivos en la visualización y cuantificación del ADN, obteniendo geles como las mostradas en la figura 2 (en esta figura no nos interesa cuantificar la cantidad de ADN, sino visualizar la integridad de la banda, por tal motivo, las imágenes de 2A a 2H no muestran como referente el marcador de peso molecular). Un análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los protocolos de extracción en la cantidad de ADN promedio obtenido [K-W: H (2, N= 180) = 11.19939; $p = 0.0037$], donde los protocolos basados en SDS, y Digestión proteica, tuvieron un mejor rendimiento que el basado en precipitación de proteínas y no hubo diferencias significativas entre los dos primeros. La extracción de ADN con el kit de extracción de Qiagen[®], no fue tan efectivo como se esperaba según la casa fabricante (Fig. 2I), a pesar de trabajar con los diferentes cantidades de tejido mencionadas, dando un mejor resultado con el tejido preservado con el método Longmire (línea 6) pero fue la única banda definida en el gel.

El protocolo de extracción basado en SDS fue un método corto y fácil para la extracción de ácidos nucleicos, consistiendo en ocho pasos obteniendo, en general, buenos resultados (Figs. 2A y 2B). Para la extracción de ácidos nucleicos totales fue

uno de los más deseables en términos de la relación costo-beneficio (Figs. 2 y 3) siendo el protocolo que requiere la menor infraestructura. Sin embargo, el botón de ADN (Pellet) no fue completamente blanco, sugiriendo la presencia de fibras, proteínas y lípidos, dejando muchas impurezas que puede causar problemas en futuros ensayos moleculares. Para este protocolo, el mejor método de preservación para músculo y para hígado

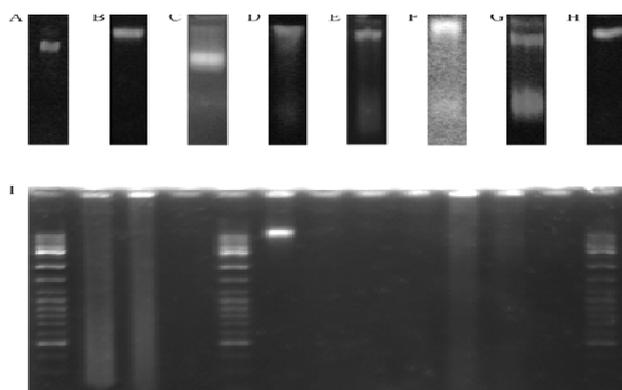


Figura 2. Resultado de electroforesis en geles de agarosa al 1%, corridas con TBE A) Protocolo de SDS con tejido preservado en DMSO; B) Protocolo de SDS con tejido preservado en solución de Longmire; C) Protocolo de digestión proteica con tejido preservado en CTAB; D) Protocolo de digestión proteica con tejido preservado en DMSO; E) Protocolo de digestión proteica con tejido preservado en Etanol frío; F) Protocolo de digestión proteica con tejido preservado en tampón de Longmire; G) Protocolo de precipitación de proteínas con tejido preservado en DMSO; H) Protocolo de precipitación de proteínas con tejido preservado en solución de Longmire e I) Kit de extracción de ADN DNeasy® de QUIAGEN® DNA extracción con preservantes diferentes, la única banda observada fue obtenida con hígado preservado en tampón de Longmire.

El protocolo más ampliamente usado en casi todos los laboratorios es el de digestión proteica con Proteinasa K seguido de varias purificaciones con Fenol – Cloroformo (protocolo de digestión proteica; protocolo 9 de Milligan 1998) y tiene un sinnúmero de variantes. De los protocolos evaluados, es el que más TE (250µl) usa para re suspender, proveyendo más material de trabajo. Sin embargo, es el único que requiere una purificación relativamente compleja y altamente

fue el etanol frío, seguido del tampón DMSO-NaCl (DMSO; Fig. 4A). El método menos efectivo fue el de la solución CTAB- NaCl mientras que el tampón de Longmire mostró un desempeño intermedio, pero sirve para rescatar ADN en casi todos los métodos de preservación (Fig. 4A). Es importante recordar que la preservación con etanol frío fue el control criogénico.

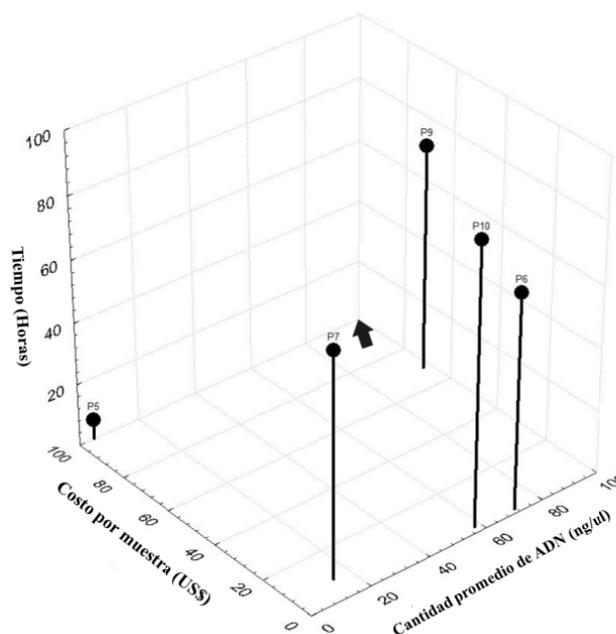


Figura 3. Relación costo-beneficio entre los cinco protocolos evaluados. Todos los ejes se encuentran en porcentaje. Las barras más cercanas al vértice señalado por la flecha, son los más eficientes. P5 (Protocolo Chelex 100), P6 (Protocolo SDS), P7 (Protocolo CTAB), P9 (Protocolo de digestión proteica) y P10 (Protocolo de precipitación proteica) según notación de Milligan (1998).

tóxica, lo que lo hace más largo y peligroso. La fluctuación de la cantidad de ADN en cada cantidad de tejido (Fig. 4B) es mayor que en el protocolo de SDS (Fig. 4A), teniendo una variación más amplia (Tabla III) en la obtención de ADN, siendo el protocolo SDS superior solo en el caso del hígado preservado en etanol frío. (Figs. 4A, 4B y 4D), y teniendo (el protocolo de digestión proteica) “ruido” por sobresaturación en casi todos los casos.

Tabla III. Desviaciones estándar de la cantidad de ADN (ng/μl) respecto a la cantidad de tejido en los mejores protocolos de extracción.

Protocolo	5mg	10mg	20mg	40mg	80mg	160mg
SDS	48.099	104.38	110.668	164.165	181.717	340.910
Digestión proteica	49.424	34.751	60.6711	119.848	196.302	348.536
Precipitación de proteínas	19.668	65.262	49.7562	91.496	209.679	110.769

Por otro lado, el protocolo de extracción por precipitación de proteínas es el que posee un mayor número de pasos (16) y requiere más incubación, pero los reactivos usados son más baratos que los usados en el protocolo de digestión de proteínas. A pesar de esto, es un protocolo simple que requiere una infraestructura intermedia (la misma usada en el protocolo de digestión proteica) y da una buena calidad de ADN (Fig. 2G y 2H), pero el botón de ADN es un poco menos claro que en el obtenido

en el protocolo de digestión proteica 9. En este protocolo la cantidad de ADN en hígado preservado en etanol frío tiene el mejor comportamiento, dando más de 50 ng/μl de ADN con tan solo 5mg de tejido, suficiente ADN para hacer casi cualquier prueba molecular¹. Sin embargo, este protocolo no fue muy eficiente en las muestras musculares (Fig. 2C). Los mejores resultados en cada protocolo fueron graficados con sus regresiones en la figura 2D.

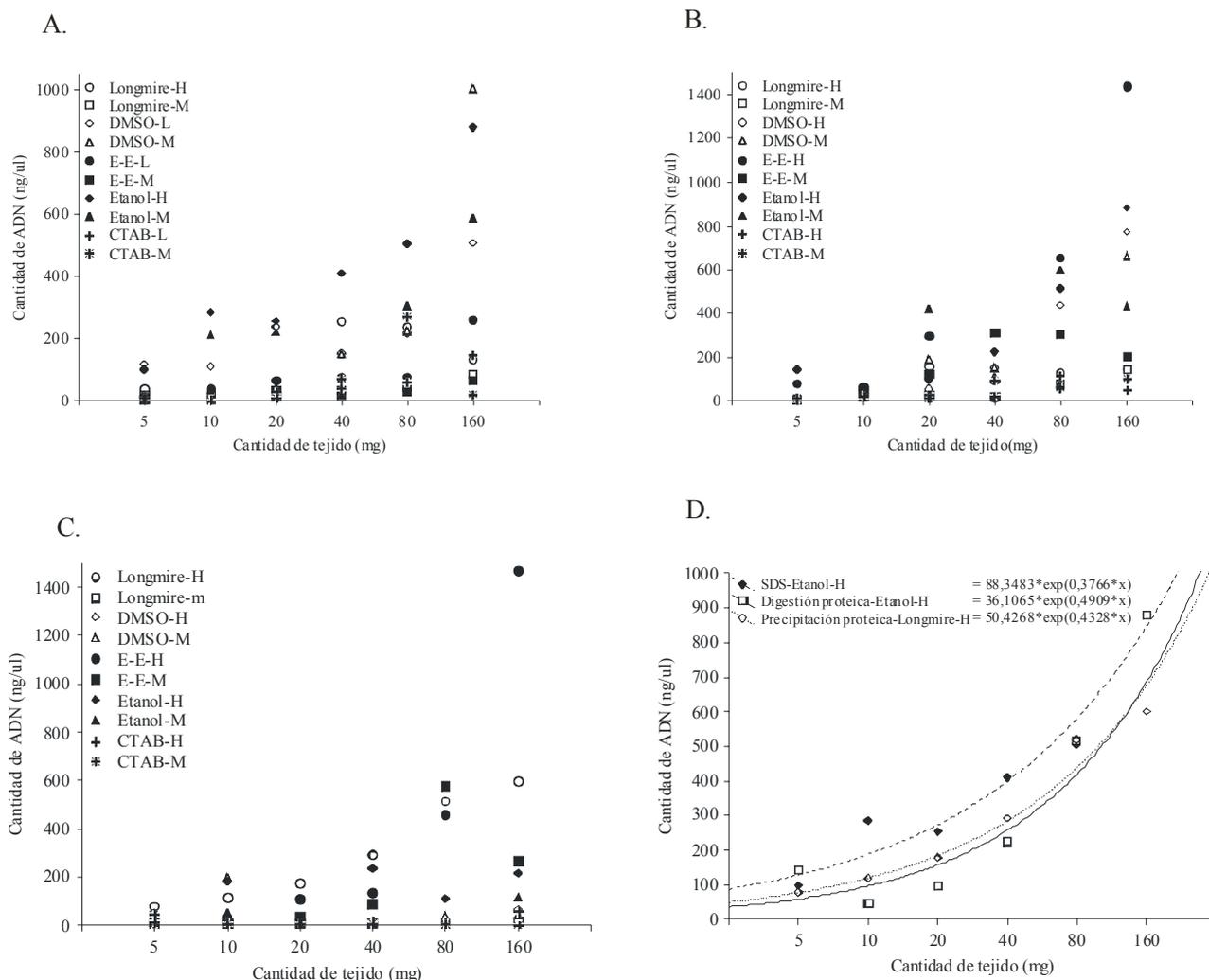


Figura 4. Cantidad de ADN extraída en cada rango de cantidad de tejido en A. Protocolo de SDS, B. Protocolo de digestión proteica, C. Protocolo de precipitación proteica, y D. Comparaciones de los mejores resultados para cada protocolo con su regresión.

¹ Juan Diego Palacio. 2003. Comunicación personal en el marco de la fase de laboratorio del presente estudio.

Discusión

Las diferencias en la variabilidad respecto a la cantidad de ADN extraído entre los tipos tisulares, puede deberse a que la baja densidad del hígado en los peces cartilaginosos (son peces magros que almacenan la energía en forma de aceites en el hígado en vez de producir tejido adiposo) hace que este tienda a flotar sobre el tampón de preservación, afectando los resultados y/o haciéndolos más variables. De acuerdo con este estudio, la mejor combinación es hígado preservado en a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, extrayendo el ADN con el protocolo SDS de Milligan (1998). Sin embargo, la figura 4 muestra al protocolo de digestión de proteínas como el más efectivo en la recuperación de ADN para Chondrichthyes, con mejor calidad pero con un costo más elevado.

Las diferencias significativas entre los métodos de preservación encontrados en el presente estudio, exhortan a conocer el tipo de tejido y la naturaleza de la unidad experimental (o muestral) antes de realizar una extracción de ADN para garantizar una alta calidad y cantidad. Al parecer, no existe un mejor método de preservación *per se*, pero sí mejores combinaciones. A pesar de ello, el tampón de lisis de Longmire parece funcionar bien con todos los protocolos, pero es recomendable tener un conocimiento previo del tipo de tejido a ser preservado y cuál será el protocolo de extracción a usar.

Actualmente se sabe que los mejores métodos para la preservación de ADN son criogénicos (sea en nitrógeno líquido o en etanol a temperaturas inferiores a -20°C) para jornadas de muestreo inferiores a tres días (Zhang & Hewitt 1998). Sin embargo, si la fase de muestreo en campo es mayor, la criopreservación no es posible ni operativa y requiere métodos no criogénicos. Los tampones de preservación E-E y Longmire son formas baratas, efectivas y no-criogénicas para la preservación del tejido, manteniendo el ADN con buena calidad y baja toxicidad (para la manipulación en campo por ejemplo) que otros preservantes como el DMSO que es altamente tóxico en contacto con la piel y la mucosa (Creus *et al.* 2002; Shah 1983; Sperling & Larsen 1979; Vogin *et al.* 1970), por esta razón, su manipulación en campo es difícil y peligrosa. El tampón E-E es la mejor opción si la preservación se hace en un lapso inferior a 3 meses, pues el medio

de preservación se acidifica y afecta la preservación del ADN, por esto, para lapsos de preservación más largos, la solución de Longmire es una mejor opción.

Con el kit de extracción, solo se obtuvo una banda nítida de 10 muestras analizadas en el gel de agarosa (Fig. 2). Esto pudo ocurrir por errores experimentales, por este motivo dichos resultados fueron excluidos de los análisis. Sin embargo, el hecho de que a pesar de los costos sigue existiendo altas probabilidades de errores que llevan a una pérdida de tiempo y dinero.

La decisión de qué combinación usar debe hacerse de acuerdo a las necesidades; si la técnica molecular que va a ser aplicada requiere un ADN muy limpio (P.ej. AFLPs), el protocolo de SDS (el más barato y corto) no es la mejor opción, en dicho caso los protocolos de digestión de proteínas o de precipitación de proteínas son una mejor opción. Sin embargo, el protocolo de digestión de proteínas tiene la limitante de la toxicidad y volatilidad de los químicos de la purificación, por ende la manipulación debe hacerse con cuidado, o en su defecto cambiar los reactivos de purificación por otros menos tóxicos y volátiles (P.ej. NaCl) pero en general también son menos efectivos en la purificación. Además de la seguridad, todos los químicos usados durante la purificación (Fenol, cloroformo, alcohol isoamílico) son inhibidores de la PCR, siendo posible obtener falsos negativos en la amplificación si la técnica de purificación no se hace correctamente.

La otra opción para obtener un ADN muy limpio es el protocolo de precipitación de proteínas, pero éste obtiene menos ADN que el anterior y toma mucho más tiempo por muestra (Tabla IV) y a pesar de la menor toxicidad de los químicos usados, el β -Mercaptoethanol es altamente tóxico y volátil haciéndolo difícil de manejar. Otro problema asociado con este protocolo es la naturaleza altamente fibrosa del músculo (resultando negativo en el revelado en agarosa en varias oportunidades), pues con la precipitación de las proteínas, alguna cantidad de ADN puede ser arrastrada y debido a que el hígado tiene una mayor densidad de núcleos y menos fibras, se obtiene un mayor número de resultados positivos tanto en calidad como en cantidad de ADN.

Tabla IV. Comparaciones entre tiempo y costo invertido en obtener ADN. En el costo económico no se incluye el pago del investigador.

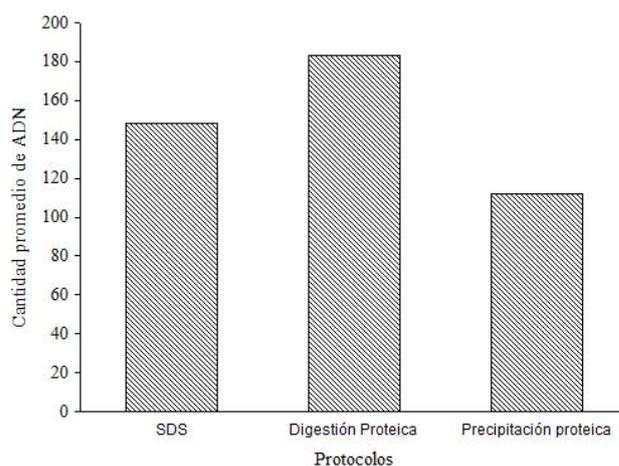
Protocolos	Tiempo (horas)	Costo por muestra (US\$)	Cantidad promedio de ADN (ng/ μ l)	Valor por nanogramo de ADN (US\$/ng)	Valor por nanogramo de ADN hora de trabajo [US\$/ng*h]	Cantidad de ADN obtenida con un dólar en una hora [ADN/(US1*1h)]
Chelex 100	1,27	10000	10	1000,00	787,40	0,00079
SDS	13,6	160,61	142,86	1,12	0,08	0,06540
CTAB	15,28	855,66	29,05	29,45	1,93	0,00222
Digestión proteica	16,03	6898,03	195,32	35,32	2,20	0,00177
Precipitación de proteínas	17,25	242,88	115,66	2,10	0,12	0,02761

Hasta ahora nos hemos referido a los tejidos, métodos de preservación y protocolos de extracción en relación con la cantidad de ADN extraído, sin embargo, la relación costo/beneficio fue evaluada para cada protocolo (Figura 3 y Tabla IV), correlacionando el tiempo empleado, recursos necesarios para la extracción del ADN y la cantidad promedio de ADN extraído. La Tabla IV muestra que el protocolo de digestión proteica es el que obtiene más ADN (Fig. 5) pero es el segundo en términos de costo y tiempo empleado por muestra (Fig. 3). El protocolo de precipitación de proteínas tiene un excelente costo por muestra (el segundo después del protocolo de SDS; Tabla IV) y mostró una buena obtención de ADN (la tercera) pero es el que más tiempo toma por muestra procesada (Fig. 3). Por otra parte, el protocolo de SDS es el más barato, el segundo en obtención de ADN y duración del procesamiento por muestra (Tabla IV), lo que lo convierte en una buena opción como método de extracción de ADN (Fig. 3) cuando los recursos económicos y de infraestructura son limitados y si los futuros usos del ADN no demandan extrema pureza.

En el caso de los métodos de preservación, la solución que mejor preservó no criogénicamente el ADN entre todos los protocolos, fue el tampón E-E, sobre los tampones CTAB-NaCl (Milligan 1998), DMSO-NaCl y el de Longmire, pero este último mostró un desempeño más regular entre los protocolos de extracción, cantidad de tejido y tipos tisulares.

A pesar que la relación costo/beneficio del protocolo de SDS es evidente, las impurezas dejadas, lo hace depender de las condiciones que exijan las técnicas moleculares a usar posteriormente. El protocolo de digestión de proteínas mostró una buena relación costo/beneficio,

usado en conjunto con el mencionado tampón de Longmire (o con el de E-E) y tomando hígado como muestra de tejido, se obtiene muy buenos resultados en términos de la calidad y cantidad de ADN obtenido. Cuando los recursos son muy limitados y no existe una necesidad imperativa de un ADN extremadamente puro, el protocolo de SDS con tejido preservado en E-E o en tampón de Longmire es la mejor opción. Sin embargo, si se requiere ADN con alta pureza y no existen limitaciones de recursos, el protocolo de digestión de proteínas usando tejidos preservados tanto en E-E como en solución de Longmire es la opción más adecuada

**Figura 5.** Cantidad promedio de ADN obtenidas con los protocolos SDS, digestión proteica y por precipitación de proteínas. Las unidades del eje y están dadas en μ g/ μ l.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Enfermedades Metabólicas de la Universidad del Valle y de la sección de Bioquímica en Ciencias Básicas de la Salud por su apoyo en la

primera fase de laboratorio. Al Instituto Alexander Von Humboldt y en su nombre a J. D. Palacio, por el apoyo brindado. Agradecemos a M. A. Hernández y a F. Cerón, por toda la ayuda prestada

Finalmente a la Fundación SQUALUS por su colaboración con la obtención de las muestras así como a A. Martínez, dueño del barco “el Arraiján” y a su hijo, F. Martínez por brindarnos su motonave para el muestreo.

Referencias

- Apfalter, P., Blasi, F., Boman, J., Gaydos, C. A., M. Kundi, M. Maass, A. Makristathis, A. Meijer, Nadrchal, R., Persson, K., Rotter, M. L., Tong, C. Y. W., Stanek, G. & Hirschl, A. M. 2001. Multicenter Comparison Trial of ADN Extraction Methods and PCR Assays for Detection of *Chlamydia pneumoniae* in Endarterectomy Specimens. **Journal of Clinical Microbiology** 39(2): 519-524.
- Compagno, L., Krupp, F. & Schneider, W. 1995. Tiburones. *En*: Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. **Guía FAO para la Identificación de Especies para Fines de la Pesca para el Pacífico Centro-Oriental. Volumen II, Parte 1pp.** 647 - 743. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO Roma
- Cooper A. 1994. DNA from museum specimens. *En*: Herrmann, B & Hummel, S. (Eds). **Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens.** P. 211. Springer-Verlag, New York, NY.
- Cortés, E. 1997. A critical review of methods of studying fish feeding based on analysis of stomach content: Application to elasmobranchs fishes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54: 726-738.
- Creus, N., Mateu, J., Masso, J., Codina, C. & Ribas, J. 2002. Toxicity to topical dimethyl sulfoxide (DMSO) when used as an extravasation antidote. **Pharmaceutic World Science** 24(5): 175-6.
- Dawson, M., Raskoff, K. A. & Jacobs, D. K. 1998. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. **Molecular Marine Biology Biotechnology** 7(2): 145-152.
- del Castillo-Agudo L., Gavidia I., Pérez-Bermúdez, P & Segura, J. 1995. PEG precipitation, a required step for PCR amplification of DNA from wild plants of *Digitalis obscura* L. **Biotechniques** 18(5):766-768
- Dellaporta, S. L., Wood, J & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter** 1(4): 19-21
- Dessauer, H. C., Cole, C. J., & M.S. Hafner. 1996. Collection and storage of tissues. *In*: Hillis, D.M., Moritz, C., and Mable B. K. (eds.), **Molecular Systematics**, 2nd edn., Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 29-47.
- Doyle, J. J. & Dickson, E. E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. **Taxon** 36:715-722.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**. 19: 11-15.
- Edwards, K., Johnstone, C. & Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**. 19(6): 1349
- Ellegren, H. 1994. Genomic DNA from museum bird feathers. *En*: Herrmann, B & Hummel, S. (Eds). **Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens.** P. 211. Springer-Verlag, New York, NY.
- Fang, G., Hammar, S. & Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **BioTechniques** 13(1): 52-56.
- Hillis D. M., Larson, A., Davis, S. K. & Zimmer, E. A. 1990. Nucleic acids III: sequencing. *En*: Hillis, D. M. & Moritz, C. (eds). **Molecular systematics.** P. 318. Sinauer, Sunderland, M.A.
- Hua-Yue, G. & Orban, L. 2001. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. **Marine Biotechnology** 3: 199-204.
- Kawasaki, E. 1990. **Sample preparation from blood, cells and other fluids.** *En*: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** 146-152. Academic Press Inc., New York.
- Kilpatrick, C.W. 2002. Noncryogenic preservation of mammalian tissues for ADN extraction: an assessment of storage methods. **Biochemistry Genetics** 40(1-2): 53-62.
- Lodhi M A, Ye, G-N., Weeden, N. F. & Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**. 12: 6-13.
- Longmire, J. L., Maltbie, M. & Baker, R. J. 1997.

- Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implications for museum collections. **Occasional Papers, The Museum of Texas Tech University**, 163: 1–3.
- McEachran, J.D. & di Sciara, G. N. 1995. Peces batoideos. *In*: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. & Niem, V. H. **Guía FAO para la Identificación de Especies para Fines de la Pesca para el Pacífico Centro-Oriental. Volumen II, Parte 1** pp. 745 – 791. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO Roma.
- Milligan, B.G. 1998. Total DNA isolation. *En*: Hoelzel, A. R. (Ed.). **Molecular genetic analysis of populations, a practical approach**, 29 pp. Oxford University Press, Oxford.
- Pääbo S. 1990. Amplifying ancient DNA. *En*: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, pp. 159–166. Academic Press, San Diego, CA.
- Sensabaugh, G. F. 1994. DNA typing of biological evidence material. *En*: Herrmann, B. & Hummel, S. (Eds). **Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens**. P. 211. Springer-Verlag, New York, NY.
- Seutin, G., White, B. N. & Boag, P. T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for ADN analyses. **Canadian Journal of Zoology** 69: 82-90.
- Shah, S.A. 1983. Comparison of DMSO and glycerol as cryoprotectants for ascites tumor cells. **Experientia** 39(3): 327-328.
- Shiogama, T., Mullen, Y. Klandorf, H., Terada, M. & Clark, W. R. 1987. An improved cryopreservation procedure for human fetal pancreas tissues. **Transplantation** 44(5): 602-607.
- Sperling, S. & Larsen, I. G. 1979. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium in vitro. **Acta Ophthalmologica (Copenhagen)** 57(5): 891-898.
- Sunnucks, P. & Hales, D. P. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: aphididae). **Molecular Biology and Evolution** 13: 510-524.
- Vogin, E. E., Carson, S., Cannon, G., Linegar, C. R. & Rubin, L. F. 1970. Chronic toxicity of DMSO in primates. **Toxicology and Applied Pharmacology** 16(3): 606-612.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques** 10(4):506-513.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C. & Fausto Foresti. 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. **Hereditas** 138: 161–165
- Zhang, D-X & G.M. Hewitt. 1998. Field collection: animals. *En*: Karp, A., Isaac P.G & D.S. Ingram (Eds). **Molecular tools for screening biodiversity**. Chapman & Hall, London.

Received May 2009

Accepted September 2009

Published online March 2010