

Trabajo Científico

Estandarización del método de extracción de ARNm de vasos de cordón umbilical

Standardization of the mRNA extraction method from umbilical cord vessel

Jesús Alejandro Escalona V,¹ Cristian Fabián Layton T,² Hugo Mendieta Z^{2,3}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias, México

²Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina, México

³Asociación Científica Latina A.C. (ASCILA), México

Resumen

La cuantificación génica en cordón umbilical se ha utilizado para estudiar diversas patologías, no obstante está latente la problemática de homogenizar correctamente el tejido vascular. El objetivo de este estudio fue proponer una secuencia que lleva al éxito en la obtención de ARNm de los vasos de cordón umbilical. Se procesaron 20 muestras de cordón umbilical, de los cuales se disecaron los vasos para ser homogenizados en el Bullet Blender Standard BBX24 (Next Advance, Inc., Burden Lake Road, NY, USA). La extracción de ARNm se realizó en el equipo MagNa Pure LC 2.0 (Roche, Alemania), usando el kit MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) (Roche, Alemania) y se cuantificó su concentración por espectrofotometría a 260 nm en un NanoPhotometer (Implen GmbH, Alemania). En el 100 % de las muestras se obtuvo ARNm.

Abstract

Gene quantification in umbilical cord has been used to study several diseases, however the correct homogenization of the vascular tissue is a latent problem. The main objective of this study was to propose a sequence of steps leading to the successful mRNA extraction from umbilical cord vessels. 20 samples of umbilical cord, from which the vessels were dissected to be homogenized in the Bullet Blender Standard BBX24 (Next Advance, Inc., Burden Lake Road, NY, USA) were processed. mRNA extraction was performed on the MagNA Pure LC 2.0 (Roche, Germany), using the MagNA Pure LC kit RNA Isolation Kit III (Tissue) (Roche, Germany) and its concentration was quantified by spectrophotometry at 260 nm in a NanoPhotometer (Implen GmbH, Germany quantified). mRNA was obtained in 100% of the samples.

Palabras clave: cordón umbilical, GAPDH, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, NF-KB.

Key words: umbilical cord, GAPDH, real time quantitative polymerase chain reaction, NF-KB.

Correspondencia:

Dr. Hugo Mendieta Zerón
Asociación Científica Latina A.C. (ASCILA)
Felipe Villanueva sur No. 1209. Col. Rancho Dolores
C.P. 50170. Toluca, México
Tel/Fax: 722-2194122
E-mail: mez_h_74@yahoo.com

Fecha de recepción: 20 de mayo de 2015

Fecha de recepción de modificaciones: 20 de julio de 2015

Fecha de aceptación: 19 de agosto de 2015

Introducción

En el cordón umbilical humano se pueden identificar tres vasos sanguíneos, dos arterias en espiral alrededor de una vena: estos vasos están rodeados de gelatina de Wharton, un tejido mucoso compuesto de unas pocas células estromales mesenquimales y una abundante matriz extracelular rica en agua, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y fibras de colágeno.^{1,2}

Aunque la cuantificación génica en cordón umbilical se ha utilizado para estudiar diversas patologías, la mayoría de los estudios ha sido en cultivos de células endoteliales de vena o arteria umbilical,^{3,4} en segundo lugar se sitúan los estudios de inmunohistoquímica.⁵ Para llevar a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), un factor crucial lo es la cantidad y calidad de ARNm, y cuando se trata de cordón umbilical, la homogenización correcta de la parte vascular es un punto vital para el éxito de las cuantificaciones. Nuestro grupo ha hecho experimentos previos en cordón umbilical y nos hemos encontrado con la dificultad de lograr una adecuada homogenización con el Tissue Tearor (BioSpec, USA), por lo que decidimos explorar otra secuencia de pasos que ahora proponemos para obtener resultados óptimos.

Material y métodos

Muestras

Muestras de cordón umbilical de mujeres atendidas en el Servicio de Gineco-Obstetricia del Hospital Materno Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMPS), Instituto de Salud del Estado de México (ISEM), Toluca, Estado de México, México; se recolectaron en hielo seco, las cuales se almacenaron a -70 °C hasta ser procesadas en el Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Extracción de ARNm

Las muestras se descongelaron mediante el método de escalera de frío con la siguiente secuencia: 15 min a -20 °C, 15 min a -8 °C, 15 min a 4 °C y por último 30 min a temperatura ambiente. Una vez descongeladas las muestras, se realizó un corte longitudinal para exponer los vasos sanguíneos y una vez extraídos, se colocaron en un mortero para macerarlos entre 5-10 minutos dependiendo de la extensión de la muestra. Una vez maceradas las muestras, se colocó entre 0.100–0.110 g de muestra por tubo, con 0.100 g de perlas y 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) en un tubo eppendorf de 1.5 ml, agitándose para precipitar el tejido. Se colocaron los tubos en el equipo Bullet Blender Standard BBX24 (Next Advance, Inc., Burden Lake Road, NY, USA), donde fueron homogenizados durante 15 min.

La extracción de ARNm se realizó en el equipo MagNa Pure LC 2.0 (Roche, Alemania), usando el kit MagNA Pure LC RNA Isolation Kit III (Tissue) (Roche, Alemania). De cada muestra homogenizada se colocaron 150 µl en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 350 µl de buffer de lisis de tejido y se incluyó un paso de lisis centrifugándolas 50 min a 300 rpm a 23 °C. Una vez extraído el ARN, de las muestras de los cordones umbilicales, se cuantificó su concentración por espectrofotometría a 260 nm en un NanoPhotometer (Implen GmbH, Alemania).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)
 La reverso transcripción y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizaron con el 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Applera UK, Cheshire, UK), utilizando SYBR Green Taq Ready Mix for Quantitative RT-PCR, a partir de 200 a 400 ng de ARNm. Los oligos utilizados fueron diseñados utilizando la herramienta Primer Quest (Integrated DNA Technologies, Inc., CA, EE.UU.) y sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Biotecnología (Cuernavaca, Morelos, México). Además se hizo una búsqueda en BLAST para asegurar la hibridización específica. La concentración y secuencia de los genes usados fueron: el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (NCBI: NM_22011438) sentido: 5'-CTTTGGTATCGTGGAGGACTC-3, antisentido: 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3, factor nuclear kappa-B (NF-κB) (NCBI: NM_003998.3), sentido: 5-TGGGAATCCAGTGTGAAG-3, antisentido: 3-CACAGCATTCAAGTCGTAGT-5. La concentración final de cada oligo (0.4 µM), se optimizó según los resultados finales calculados con el método de Taguchi.⁶ Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: 10 min a 95 °C, 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y annealing/extensión a 60 °C durante 1 min.

Resultados y discusión

En las 20 muestras de cordón umbilical se logró obtener ARNm (Tabla 1). Para verificar su viabilidad, en 8 de estas se evaluó la expresión de GAPDH y en 4 la de NF-KB, encontrándose expresión en ambos casos. Un aspecto a tomar en cuenta para estudios de expresión génica en vasos de cordón umbilical es que se recomiendan como genes constitutivos al Ywhaz y al Rpl13a sobre GAPDH.⁷ No obstante, este último presenta una escasa variación intra-tejido.⁸ En cuanto a NF-KB, su cuantificación no se esperaba que tuviera expresión homogénea, ya que es un factor de transcripción que se sobre-expresa en casos de patologías inflamatorias, crónicas, etc.^{9,10} y al estar presente significa que seguramente las pacientes de las que se obtuvieron los cordones estaban en un proceso de estrés molecular.

Tabla 1. Concentración de ARNm.

Muestra	Concentración de ARNm ($\mu\text{g/ml}$)
1	8
2	13.2
3	11.6
4	7
5	7.2
6	9.6
7	7.6
8	6
9	4.8
10	27.2
11	7.2
12	6
13	6.4
14	6.8
15	6.4
16	6.8
17	8
18	6.4
19	7.6
20	6

Un inconveniente de los pasos que proponemos es la no fácil accesibilidad al equipo Bullet Blender Standard BBX24 (Next Advance, Inc., Burden Lake Road, NY, USA), sin embargo, pudieran evaluarse otras alternativas de homogenización igualmente eficientes y que sean automatizadas. En este sentido algunos de los equipos con prestaciones semejantes son el Bead Ruptor (Omni International, USA) y el Multi-Prep Rapid Homogenizer (Pro Scientific Inc., USA).

Por otra parte, para la extracción de ARNm existe gran diversidad de métodos, de entre los cuales el uso de TRIzol (Invitrogen) es el más difundido por ser el de menor costo, sin embargo el uso de métodos con columnas está ampliamente generalizado.^{11,12} De manera más difundida están el RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA), y otros de comercialización más reciente como el NucleoSpin® RNA XS (Cultek) o el GeneJET RNA Purification Kit (Life Technologies). En esta ocasión nosotros hemos manejado un equipo automatizado, con el inconveniente del incremento de los costos por prueba debido a los insumos requeridos, si bien, la ventaja más apreciada es la posibilidad de procesar mayor cantidad de muestras en menor tiempo. En la tabla 2 se muestra que aunque el Bullet Blender Standard BBX24 es 4.1 veces más caro que el Tissue tearor, al procesar, para el caso de cordón umbilical, 4.8 más muestras en el mismo tiempo (15 min), el costo por prueba por minuto de uso da 155.55 pesos MX para la primera opción y 177.06 pesos MX para la segunda. Más aún, para completar las 24 muestras con la segunda opción hay que invertir casi una hora más y multiplicar el costo por prueba.

Entonces, la elección del método de homogenización de cordón umbilical será de acuerdo a las capacidades instaladas, experiencia y demanda de cada laboratorio.

Tabla 2. Costo de equipo y tiempo de procesamiento de 24 muestras.

Equipo	Precio del equipo*	Capacidad de muestras	Tiempo (min) para procesar capacidad máxima	Precio por prueba en 15 min
Bullet Blender Standard BBX24	56000	24	15	155.55
Tissue tearor	13280	1	3	177.06

* Verificado al 18 de julio de 2015.

No podemos dejar de mencionar que, si bien con esta técnica que comunicamos, obtuvimos ARNm en el 100% de los casos, cabe mencionar que este porcentaje se verá reducido si las muestras no se conservan en hielo seco o nitrógeno líquido al momento de su obtención, o bien, si no se almacenan inmediatamente a -70 °C.

Conclusiones

Los pasos descritos en esta comunicación para el manejo de las muestras de vasos sanguíneos de cordón umbilical, ofrecen la posibilidad de obtener ARNm adecuado para la cuantificación génica.

Agradecimientos

A las autoridades del Hospital Materno-Perinatal “Mónica Pretelini Sáenz” (HMPMP), por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este proyecto.

Referencias

1. Meyer FA, Laver-Rudich Z, Tanenbaum R. Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly. *Biochim Biophys Acta* 1983; 755(3):376-87.
2. Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta* 2005; 26(10):747-52.
3. Leiva A, de Medina CD, Salsoso R, Sáez T, San Martín S, Abarzúa F, Farías M, Guzmán-Gutiérrez E, Pardo F, Sobrevia L. Maternal hypercholesterolemia in pregnancy associates with umbilical vein endothelial dysfunction: role of endothelial nitric oxide synthase

- and arginase II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(10):2444-53.
4. Li Y, Xu Y, Li X, Qin Y, Hu R. Effects of PPAR- α agonist and IGF-1 on estrogen sulfotransferase in human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Mol Med Rep* 2013; 8(1):133-9.
 5. Bhavina K, Radhika J, Pandian SS. VEGF and eNOS expression in umbilical cord from pregnancy complicated by hypertensive disorder with different severity. *Biomed Res Int* 2014; 2014:982159.
 6. Taguchi G. Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes (trans: Organization AP). The Organization AP, Tokyo: Productivity Press Inc: 1986.
 7. Wang Y, Han Z, Yan S, Mao A, Wang B, Ren H, Chi Y. Evaluation of suitable reference gene for real-time PCR in human umbilical cord mesenchymal stem cells with long-term in vitro expansion. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46(7):595-9.
 8. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 2005; 21(3):389-95.
 9. Simsek Y, Gul M, Celik O, Aydin NE, Arda Düz S, Celik E, Ozerol E, Özerol IH, Tanbek K. Nuclear transcription factor-kappa beta-dependent ultrastructural alterations within the placenta and systemic inflammatory activation in pregnant patients with hemolysis, elevated liver functions and low thrombocyte count (HELLP) syndrome: a case-control study. *Hypertens Pregnancy* 2013; 32(3):281-91.
 10. Hua T, Qinsheng W, Xuxia W, Shuguang Z, Ming Q, Zhenxiong L, Jingjie W. Nuclear factor-kappa B1 is associated with gastric cancer in a Chinese population. *Medicine (Baltimore)* 2014; 93(28):e279.
 11. Thakali KM, Saben J, Faske JB, Lindsey F, Gómez-Acevedo H, Lowery CL, Badger TM, Andres A, Shankar K. Maternal pregravid obesity changes gene expression profiles toward greater inflammation and reduced insulin sensitivity in umbilical cord. *Pediatr Res* 2014; 76(2):202-10.
 12. Mauro A, Buscemi M, Provenzano S, Gerbino A. Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49(2):211-8.