

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE ADN CIRCULANTE EN SUERO HUMANO UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

Rubiel Vargas¹, Luis F Rangel¹, Eduardo A Cañola¹, Edith Lucero Rodríguez Jimenez³, Julio Cesar Klinger², Alvaro Efrain Bastidas Gustin¹

¹Grupo de Investigación en Óptica Aplicada y Didáctica, GIOPAD Departamento de Física, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca

²Grupo de Inmunología Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca

³GOA Universidad de Valladolid España

(Recibido 22 de Sep.2005; Aceptado 09 de Mar. 2006; Publicado 16 de Jun. 2006)

RESUMEN

El ADN extracelular es una novedad biológica, de la cual se desconoce su significado clínico y fisiopatológico. Se reportan aquí, los primeros resultados cuantitativos de los niveles de ADN presentes en muestras de patronamiento, detectados a través de la técnica de espectrofotometría UV-Visible, condicionando particularmente la respuesta espectral a 260 nm de una fuente de radiación ultravioleta, y utilizando fotomultiplicador como detector. Estos primeros resultados espectrales, permiten la cuantificación de los niveles de ADN libre en suero y orina humanos de personas sanas y enfermas, los cuales contribuirán a realizar las comparaciones para entender la biología del ADN libre en la salud y la enfermedad con miras a obtener ayudas diagnósticas pronósticas y terapéuticas en enfermedades tan complejas como el cáncer, infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes etc.

Palabras clave: Espectrofotometría UV, ADN, Suero Sanguíneo

ABSTRACT

Extracellular DNA is a biological novelty from which his clinical and fisiopatologic meaning are unknown. The first quantitative results of the DNA levels present in pattern samples are reported here. These were detected through the UV-Vis spectrum-photometry technique, particularly conditioning the spectral answer to 260 nm from a source of UV light, and using a photo-multiplier as detector. These first spectral results, allow for the quantification of free DNA levels in human serum and urine samples from sick and healthy people, which will contribute to carry out the comparisons to understand the free DNA biology in health and illness aiming at obtaining help in therapeutical diagnosis and prognosis with complex illnesses such as cancer, cronical infections, immune diseases, etc.

Keywords: spectra-photometry, UV, DNA, Sanguineous Serum

1. Introducción

En los años 60 y 70 se descubrió ADN libre circulante en pacientes con lupus eritematoso y cáncer, [1]. Pero la tecnología de entonces era limitada para mayores análisis, este tema resurgió con más poder en los años 90 al demostrarse alteraciones genéticas típicas de células tumorales en el ADN circulante, después se identificó el cromosoma Y (masculino) en el ADN circu-

lante de mujeres embarazadas y en trasplantadas con órganos de donantes masculinos, [2]. Se conoce que las uniones en las cadenas de ADN entre las diferentes bases nitrogenadas se da a través de puentes de hidrogeno así: entre Adenina y Timina dos enlaces, entre Guanina y Citosina tres enlaces, esto sumado a que dichas bases son compuestos heterocíclicos hace que el ADN absorba la radiación ultravioleta, [3].

En este trabajo se presentan los resultados de detección de bajos niveles de ADN presentes en suero humano, usando la técnica de espectrofotometría, con un sistema dotado de una fuente de radiación ultravioleta centrada en 260 nm, y un fotomultiplicador de alta sensibilidad en el UV. El espectrofotómetro utilizado en este trabajo, es un equipo antiguo de características convencionales, susceptible de modificaciones, tanto en el tipo de fuentes de radiación, como en los sistemas ópticos y de detección.

La medida del espectro de absorbancia A , que registra el espectrofotómetro obedece a la ley de Lambert-Beer[2]

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C = \frac{1}{T} \tag{1}$$

Siendo I_0 e I las intensidad de la luz incidente y transmitida respectivamente a través de una cubeta de longitud de paso óptico (l) que contiene una disolución de concentración C (molar), la constante de proporcionalidad ϵ se le llama coeficiente de extinción molar, [4].

3. Resultados

Los resultados que aquí se reportan, fueron obtenidos usando ADN comercial diluido en un buffer de TE, [5], y el espectro fue registrado para tres concentraciones “conocidas” y una “problema”. Se utilizó un rango de longitudes de onda, desde 210 nm hasta 350 nm. En la Figura 1, se muestra el espectro de ADN que corresponde a las primeras pruebas de detección de diferentes concentraciones de ADN en disolución, para pacientes sanos. En la Figura 2 se presentan los picos espectrales de ADN obtenidos a una longitud de onda de 260 nm. Las concentraciones se indican en la Tabla No.1.

Tabla No.1. Medidas de Densidad Óptica para las concentraciones de ADN

	Muestra No.1	Muestra No 2	Muestra No.3	Muestra No.4 (Problema)
Valor absorcion ($\lambda=260$ nm)	0,01418	0,01084	0,00826	0,01445
Concentración (molar)	7E-4	5,4E-5	4,1E-6	7,19E-4

En la Figura 3, se presenta la curva de los valores de absorbancia en función de las concentraciones de ADN, acorde con los espectros presentados en la Figura 2. Esta curva es un indicativo de la respuesta del equipo según el grado de concentración de ADN. Con una muestra problema

de concentración conocida, se midió su espectro de absorción y se observó una correspondencia con la curva mostrada en la Figura 3, validando así la eficiencia de la técnica.

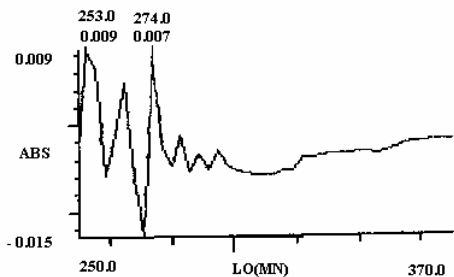


Figura No.1. Espectro característico para una concentración de ADN de 50 ng / ml.

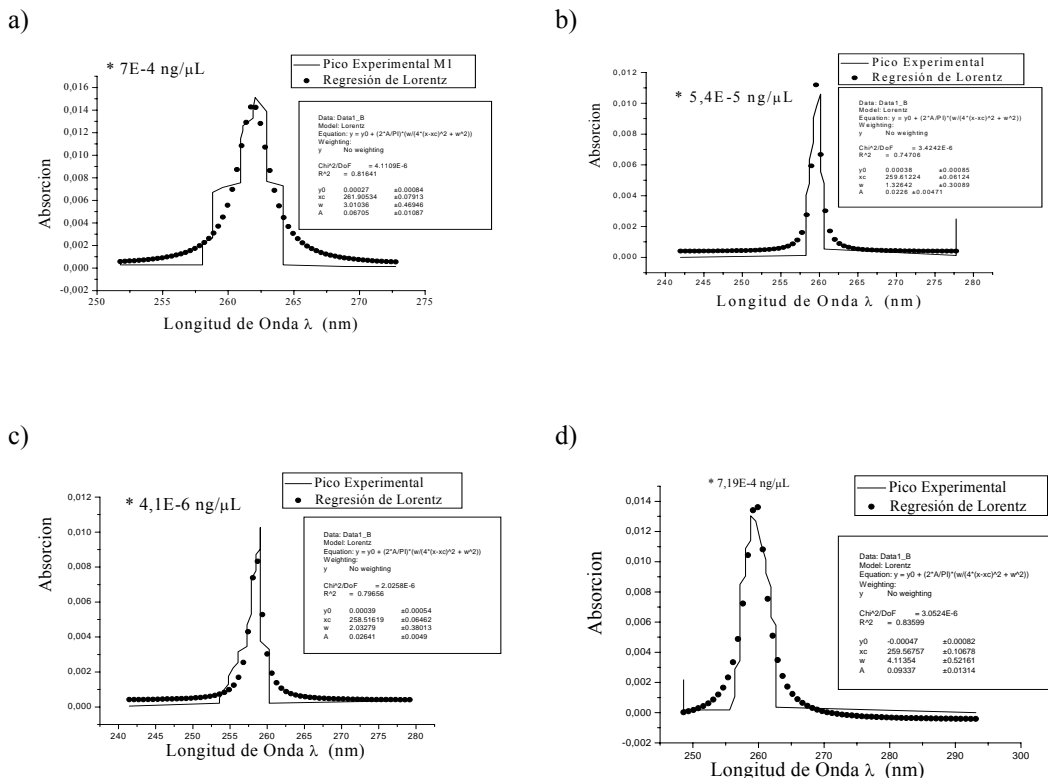


Figura No.2. Espectro de absorción de muestras de ADN en 260 nm a diferentes concentraciones (a) 7E-4 molar, b) 5.4E-5 molar, c) 4.1E-6 molar, d) 7.19E-4 molar).

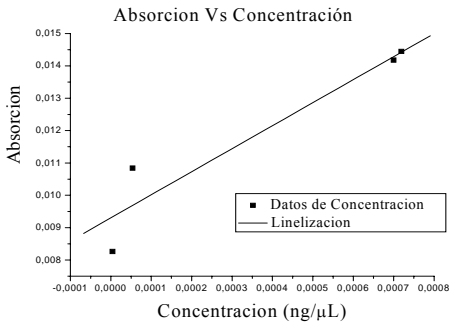


Figura No.3. Curva de calibración obtenida con los espectros de ADN.

4. Conclusiones

Actualmente la detección de niveles de ADN circulante es utilizada para el diagnóstico de tumores, diferentes tipos de cáncer, y enfermedades virales como hepatitis, para lo cual se utilizan normalmente kits comerciales de un costo elevado, lo que limita el uso de la técnica a laboratorios de altos recursos en muy pocos países del mundo. Por lo tanto, se hace evidente, la necesidad de desarrollar nuevas técnicas para la detección de materiales subcelulares, tales como ADN y proteínas.

El análisis con radiación ultravioleta presentó muy buena sensibilidad en la medida de ADN comercial, detectando muy bajas concentraciones de ADN en disolución. Esto evidencia la efectividad de la absorción de radiación UV debido a los enlaces que se encuentran en las bases nitrogenadas, que son el componente del ADN humano.

El instrumento de medida utilizado presenta una buena resolución y sensibilidad en un amplio rango de longitudes de onda. Esto posibilita la implementación de un equipo flexible, que permita usar una fuente de luz con un reducido ancho de banda y un detector CCD especializado. De esta forma, el análisis de las variaciones de niveles de concentración ADN, relacionado con patologías complejas del ser humano, será automático y de mayor eficiencia.

Referencias

- [1] María del Pilar Crespo. El diagnóstico viral por el laboratorio. Colombia Médica 2000; 31: 135-150: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/VOL31NO3/contenido.html>
- [2] Ángel Valea Pérez, Alonso Girón. Radiación Infrarroja y ultravioleta. Mc Graw Hill. Santa fé de Bogota. 1998.
- [3] Curtis, Helena. Biología. 6 ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 2000.
- [4] Luis J Herrera, Siva Raja, William E Gooding, Talal El-Hefnawy, et al “Análisis cuantitativo del DNA del plasma que circula como marcador del tumor en malignancias torácicos”. *Clinical Chemistry*. Washington. Tomo 51, N° 1; página. 113, 119 Enero de 2005
- [5] Allen KC Chan; Rossa WK Chiu; YM Dennis Lo. Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: A new tool in molecular diagnostic. Mar 2003; 40, ProQuest Medical Library pg. 122