

Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma materno

Paola Andrea Ayala-Ramírez^{1✉}, Liz Ariane Gonzalez-Ropero¹, Reggie García-Robles²

Temperature of storage and amount of RNA extracted from maternal plasma

Abstract

The discovery of nucleic acids in maternal plasma unlocked new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis. However, the factors affecting the concentration of fetal RNA in maternal plasma samples are unspecified. Here we studied the effect of storage time (15 to 30 days) and temperature (4°C, -20°C and ambient) and of the presence of Trizol on the concentration of RNA in plasma samples taken from pregnant women before their 20th week. Thirty-three RNA samples were extracted from plasma and analyzed by spectrophotometry. The amount of RNA was statistically lower in samples stored at -20°C whereas storage time and the presence or absence of Trizol did not affect RNA level. Temperature affected the concentration of RNA, rather than time and the addition of Trizol. In conclusion, temperature is a key factor in the extraction of RNA, and the freeze-thaw process most likely affects RNA concentrations negatively.

Keywords: Ribonucleic acid; plasma; pregnancy complications.

Introducción

Actualmente, el diagnóstico prenatal requiere de muestras de células fetales obtenidas por vías invasivas, como amniocentesis y toma de muestras de vello cordón. Estos procedimientos invasivos representan un riesgo para la madre y el feto. Para evitar este riesgo potencial, se han evaluado nuevas estrategias moleculares para el diagnóstico prenatal no invasivo (Ayala-Ramírez et al. 2012). En los últimos años se han logrado grandes avances en este campo. Los estudios se han encaminado en detectar ADN y ARN del feto en el plasma materno utilizando la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR) la cual ha permitido

Edited by Alberto Acosta

1. Instituto de Genética Humana. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

2. Instituto de Investigación en Nutrición, Genética y Metabolismo. Facultad de Medicina. Universidad El Bosque. Bogotá. Colombia.

Received: 10-04-2013 **Accepted:** 24-07-2013

Published on line: 15-08-2013

Citation: Paola Andrea Ayala-Ramírez, Liz Ariane Gonzalez-Ropero, Reggie García-Robles (2013) Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma materno. *Universitas Scientiarum* 18(2): 181-187 doi: 10.11144/Javeriana.SC18-2.taca.

Funding: Universidad El Bosque

Electronic supplementary material: N/A

SICI: 2027-1352(201305/08)18:2<181:TDAYCDAEDPM>2.0.TS;2-S



detectar niveles muy bajos de estas moléculas (Chiu et al. 2005, Hahn et al. 2011, Heung et al. 2009a, Nancy et al. 2009, Ng et al. 2003, Okazaki et al. 2006). Ng et al. (2003) lograron aislar ARN de origen feto-placentario en el plasma y analizaron la expresión de genes específicos de la placenta (Ng et al. 2003). Este descubrimiento fue sorprendente debido a que se cree que generalmente el ARN es más inestable que el ADN y se espera que el ARN libre se degrade rápidamente (Lo & Chiu 2012). Sin embargo, se ha demostrado que el ARN podría estar asociado a lípidos o proteínas, unido al ADN en nucleosomas, cuerpos apoptóticos u otras estructuras vesiculares, por lo que estaría siendo protegido de la degradación por nucleasas (Lo & Chiu 2012). El ARN libre circulante en plasma materno es una molécula inestable con una vida media más corta que el ADN, la cual es altamente degradada y fragmentada (Cerkovnik et al. 2007). Se ha demostrado que el ARN libre circulante proveniente de la placenta asociado con micropartículas de membrana presenta una alta frecuencia de fragmentos del extremo 5', comparado con fragmentos del extremo 3' (Wong & Lo 2006, Wong et al. 2005). La fuente de estas moléculas de ARN provendría, al igual que el ADN, del sincitiotrofoblasto, hipótesis que se apoya en el hecho de la rápida remoción posparto (Ng et al. 2003, Sesarini et al. 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que la placenta es la principal fuente de ARN presente en el plasma materno (Lo & Chiu 2012, Ng et al. 2003). La ventaja de analizar el ARN con respecto al ADN radica en que muchas veces no es posible determinar el origen del ADN encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el ADN materno, lo que se puede evitar utilizando transcritos específicos de placenta (Ayala-Ramírez et al. 2012). Los beneficios del diagnóstico prenatal no invasivo son claros; elimina el riesgo asociado a técnicas invasivas, permite realizar un diagnóstico temprano en el embarazo, reduce la ansiedad en la mujer embarazada, y disminuye los costos (Sesarini et al. 2010). Estos ácidos nucleicos fetales pueden ser objeto de estudio y contribuir a un diagnóstico temprano de muchas complicaciones características de placenta y embarazo, como por ejemplo la preeclampsia (Antonio et al. 2006,

Arcelli et al. 2010, Hanako et al. 2009, Purwosunu et al. 2009, Shimizu et al. 2009). Debido a que la preeclampsia debuta clínicamente después de la semana 20, es importante estudiar la estabilidad de este ARN presente en plasma materno y optimizar las condiciones para maximizar el rendimiento de ácidos nucleicos fetal libres en plasma materno que son cruciales para análisis y aplicación de diferentes pruebas que pudieran servir como marcadores tempranos de esta patología. La hipótesis de este estudio fue que las condiciones de almacenamiento de las muestras sanguíneas, afectan significativamente los niveles de ARN de plasma materno, cuantificado por espectrofotometría. El objetivo de esta investigación fue determinar factores que afectan la cantidad del ARN en muestras de plasma de mujeres embarazadas antes de la semana 20 de gestación.

Materiales y métodos

Población de estudio y muestra: Se recolectaron muestras de gestantes antes de la semana 20 de embarazo que acudieron a sus controles prenatales en las instituciones: 1. Hospital Universitario San Ignacio, 2. Hospital de Usaquén y 3. Javesalud. El médico tratante les brindó la información necesaria para participar en el estudio (previo consentimiento informado). El estudio fue aprobado por los comités de bioética e investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana y de la Universidad El Bosque. Los criterios de inclusión fueron: mujeres embarazadas con edad gestacional menor a las 20 semanas (firmaron consentimiento informado). Los criterios de exclusión fueron: mujeres con un tiempo de gestación mayor a 20 semanas, (no firmaron el consentimiento informado) y menores de edad que no contaban con la aprobación de un mayor de edad responsable para su participación en el estudio.

Distribución de las muestras: Se tomaron 33 muestras de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 17 mujeres gestantes, a cada gestante se le tomaron dos tubos de sangre, se descartó un tubo aleatoriamente para que los grupos tuvieran el mismo tamaño

de muestra. Se centrifugaron inmediatamente 24 tubos y se separó el plasma. No se centrifugaron inmediatamente 9 tubos. Al plasma se le aplicaron diferentes protocolos: 12 de estas muestras se almacenaron a 4°C y las otras 12 a -20°C. Cada uno de estos grupos se dividieron en 2 subgrupos con tiempos diferentes para la extracción de ARN, 6 muestras se almacenaron por 15 días y las otras por 30 días antes de la extracción. De estas 6 muestras, 3 se almacenaron con 2 ml de Trizol LS (Invitrogen) y 3 muestras sin ningún aditivo. De las 9 muestras que no se centrifugaron, 3 tubos de sangre total se procesaron inmediatamente después de tomada la muestra, 6 tubos de sangre total se almacenaron a temperatura ambiente, 3 de los cuales se les realizó la extracción de ARN a las 4 horas y 3 tubos a las 24 horas.

Extracción y cuantificación de ARN: Se realizó la extracción del ARN con el kit QIAamp viral RNA Mini (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante pero realizando modificaciones según lo reportado por Ng (Ng et al. 2003). Finalmente, se adicionaron 5U de DNase I (Epicentre) y se incubó a 37°C por 15 minutos; luego se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro NanoDrop 100 (ThermoScientific Inc.) midiendo la concentración de ARN a 260 nm y pureza mediante la relación de absorbancia 260/280.

Análisis estadístico: La significancia de las diferencias entre los grupos en los niveles de ARN total extraído se determinó mediante la prueba Kruskal Wallis mediante el comando “*kwallis2*” en Stata 9.1 con un nivel de confianza del 99%. La prueba de Shapiro-Wilk mostró una $p=0,0169$ y la prueba de Barlett’s arrojó una $p=0,077$, por lo que se utilizó estadística no paramétrica, probablemente estos resultados sean debido al tamaño de la muestra en cada grupo. Adicionalmente se llevó a cabo un análisis de regresión logística binaria para determinar la contribución de las variables temperatura, tiempo y adición de Trizol LS sobre la concentración de ARN en plasma materno. La variable concentración de ARN se transformó de cuantitativa a cualitativa en base a los artículos publicados por Bernardo et al. (2013) y por nuestro grupo (Ayala-Ramírez et al. 2012b), donde Bernardo et al. sugieren que la cantidad óptima de

ARN para realizar la retrotranscripción debe ser mayor a 80 ng, debido a que cantidades menores están asociadas con la presencia de fracaso en la amplificación. Por otro lado nuestro grupo logró amplificar el gen *hPL* en plasma de pacientes con restricción de crecimiento intrauterino por medio de PCR en tiempo real utilizando 7 µl de ARN. En base a estos estudios se realizó la multiplicación de los valores obtenidos de ARN por 7 µl y los resultados se agruparon en dos desenlaces: mayor o menor de 80 ng. Para el análisis de regresión logística se utilizó el programa Stata 9.1 con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y discusión

Se logró extraer ARN de todas las muestras. Se tomaron en cuenta datos como niveles de ARN y la razón ARN/proteínas mediante el método de espectrofotometría. Los valores del ARN cuantificado se presentan en tablas y figuras (**Tabla 1** y **Figura 1**). El grupo que presentó mayores niveles de ARN fue el grupo 1B (4°C, 15 días sin Trizol LS) y el grupo que presentó menor concentración de ARN fue el grupo 3B (-20°C, 15 días con Trizol LS). Con respecto a la relación 260/280 (ARN/proteínas), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados ($p=0,0583$).

Los resultados del análisis de Kruskal wallis mostraron diferencias significativas entre todos los grupos ($p=0,0054$). Específicamente se observó mayor concentración de ARN en muestras almacenadas a 4°C (grupos 1A y 1B) comparados con las almacenadas a -20°C (3B, 4A y 4B) con diferencias significativas, excepto con el grupo que se almacenó a -20°C por 15 días con Trizol (Grupo 3A). Adicionalmente se observaron diferencias significativas entre los grupos que se procesaron inmediatamente (grupo 6) y que se incubaron a temperatura ambiente 24 horas (grupo 5B) con respecto al grupo almacenado a -20°C por 15 días sin Trizol (grupo 3B). Por otro lado, los resultados del análisis de regresión logística mostraron que la temperatura afecta los niveles de ARN significativamente (OR: 5,72, $p=0,043$, IC95%:1,05-31,11), sin embargo el

Tabla 1. Resultados de la cuantificación del ARN y de las comparaciones entre los grupos. **a:** Estadística descriptiva de la concentración de ARN en los diferentes grupos. **b:** Matriz del resultado de las comparaciones por Kluskal Wallis2, valor de $p=0,0054$ entre todos los grupos. Grupo 1A: plasma almacenado a 4°C por 15 días con Trizol LS; Grupo 1B: plasma almacenado a 4°C por 15 días sin Trizol LS; Grupo 2A: plasma almacenado a 4°C por 30 días con Trizol LS; Grupo 2B: plasma almacenado a 4°C por 30 días sin Trizol LS; Grupo 3A: plasma almacenado a -20°C por 15 días con Trizol LS; Grupo 3B: plasma almacenado a -20°C por 15 días sin Trizol LS; Grupo 4A: plasma almacenado a -20°C por 30 días con Trizol LS; Grupo 4B: plasma almacenado a -20°C por 30 días sin Trizol LS; Grupo 5A: sangre total almacenada a temperatura ambiente por 4 horas; Grupo 5B: sangre total almacenada a temperatura ambiente por 24 horas; Grupo 6: muestras procesadas inmediatamente. M=muestra.

a					b										
Grupos	Concentración de ARN (ng/μl)				Grupos	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
	M 1 n=3	M 2 n=3	M 3 n=3	Media ± DS (Rango; mediana)											
1A	60,6	37,9	40,1	46,2 ± 12,5 (37,9 - 60,6; 40,1)	1A										
1B	58,5	39,8	44	47,4 ± 9,8 (39,8 - 58,5; 44)	1B	0,4329									
2A	39,9	10,3	12,4	20,8 ± 16,5 (10,3 - 39,9; 12,4)	2A	0,0591	0,0417								
2B	23,4	25,9	19,7	23 ± 3,1 (19,7 - 25,9; 23,4)	2B	0,0755	0,0543	0,4496							
3A	9,2	21,7	17,8	16,2 ± 6,4 (9,2 - 21,7; 17,8)	3A	0,0236	0,0156	0,3364	0,2915						
3B	7,6	8,6	8,6	8,2 ± 0,5 (7,6 - 8,6; 8,6)	3B	0,0008	0,0004	0,0591	0,0456	0,1271					
4A	8,8	8,6	12	9,8 ± 1,9 (8,6 - 12; 8,8)	4A	0,0041	0,0024	0,1408	0,1144	0,2564	0,3136				
4B	4,4	8,8	27,3	13,5 ± 12,1 (4,4 - 27,3; 8,8)	4B	0,0075	0,0047	0,1933	0,1605	0,2430	0,4164				
5A	11,1	33,7	18,2	21 ± 11,5 (11,1 - 33,7; 18,2)	5A	0,0591	0,0417	0,5000	0,4496	0,3364	0,0591	0,1408	0,1933		
5B	27,5	40,5	41,5	36,5 ± 7,8 (27,5 - 41,5; 40,5)	5B	0,3837	0,3211	0,1026	0,1271	0,0456	0,0023	0,0095	0,0164	0,1026	
6	42,1	29,5	29,7	33,7 ± 7,2 (29,5 - 42,1; 29,7)	6	0,3211	0,2632	0,1361	0,1657	0,0642	0,0039	0,0148	0,0248	0,1361	0,0432

tiempo y el Trizol LS, no mostraron un efecto significativo sobre las concentraciones de ARN (Tiempo: OR: 0,44, $p=0,314$, IC95%:0,09-0,12; Trizol: OR: 1,02, $p=0,976$, IC95%:0,16-6,30). Estos resultados sugieren que la temperatura es un factor que afecta las concentraciones de ARN en plasma materno. En un estudio previo por Kopreski et al. (1999) demostraron que la congelación y descongelación de suero fueron factores que provocaron la degradación de ARN, un único ciclo de congelación-descongelación condujo a una reducción de 10 - a 100-veces la reducción de ARNm c-abl y tirosinasa en el suero, los niveles de ARNm fueron indetectables después de que el suero fue descongelado durante

30 minutos (Kopreski et al. 1999). Esto demuestra que hay factores que afectan el ARN en el proceso de congelación-descongelación. Una explicación es que al descongelarse la muestra el ARN esta expuesto a la degradación por las nucleasas. Por otro lado es posible que durante el proceso de congelamiento-descongelamiento, las vesículas o cuerpos apoptóticos en las cuales esta envuelto el ARN, son destruidos o la interacción proteína-ARN se afecta generando un ARN susceptible a la acción de las nucleasas (Kopreski et al. 1999). Sin embargo cabe resaltar que el grupo 3A no presento diferencias significativas con los almacenados a 4°C. Este resultado sugiere que en los casos en los que la muestra se almacena a -20°C se debería

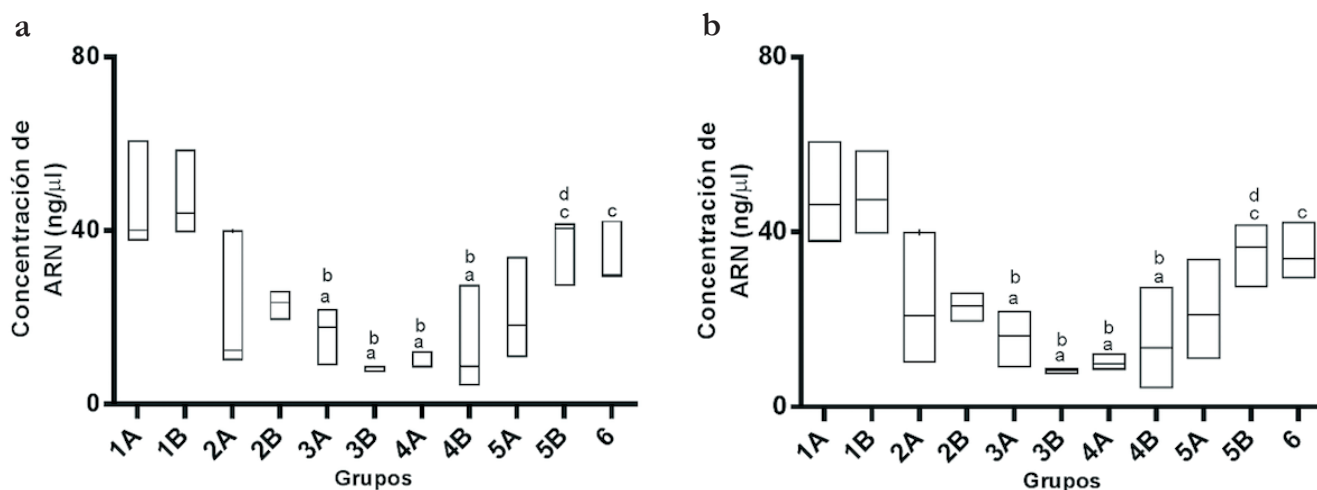


Fig. 1. Representación grafica de la cuantificación de ARN. **a.** Diagrama de cajas y bigotes de los intervalos de confianza (99% de confianza) y la línea horizontal representa la mediana. **b.** Representación de la media y de la desviación estándar, a: $p < 0,01$ con respecto al grupo 1A; b: $p < 0,01$ con respecto a el grupo 1B; c: $p < 0,01$ con respecto al grupo 3B; d: $p < 0,01$ con respecto al grupo 4A. Grupo 1A: plasma almacenado a 4°C por 15 días con Trizol LS; Grupo 1B: plasma almacenado a 4°C por 15 días sin Trizol LS; Grupo 2A: plasma almacenado a 4°C por 30 días con Trizol LS; Grupo 2B: plasma almacenado a 4°C por 30 días sin Trizol LS; Grupo 3A: plasma almacenado a -20°C por 15 días con Trizol LS; Grupo 3B: plasma almacenado a -20°C por 15 días sin Trizol LS; Grupo 4A: plasma almacenado a -20°C por 30 días con Trizol LS; Grupo 4B: plasma almacenado a -20°C por 30 días sin Trizol LS; Grupo 5A: sangre total almacenada a temperatura ambiente por 4 horas; Grupo 5B: sangre total almacenada a temperatura ambiente por 24 horas; Grupo 6: muestras procesadas inmediatamente.

adicionar Trizol y no se debe exceder los 15 días de almacenamiento. Sin embargo es aconsejable realizar un descongelamiento lento para evitar la degradación de la molécula (Kemmer & Neubauer 2006).

No se observaron diferencias significativas entre las muestras de plasma almacenadas a 4°C (grupos 1A y 1B), las muestras de sangre total que se incubaron a temperatura ambiente (grupos 5A y 5B) y las que se procesaron inmediatamente (grupo 6). Estos resultados sugieren que en el plasma almacenado a 4°C, el ARN es estable hasta 30 días y es equiparable con el ARN de muestras procesadas inmediatamente y que aunque se incuba la muestra a temperatura ambiente por 24 horas, los niveles de ARN no difieren de los de las muestras procesadas inmediatamente, lo que va de acuerdo con la evidencia de que el ARN esta envuelto en micropartículas que lo protegen de la degradación de nucleasas (Ng et al. 2003, Tsui et al. 2002). Vale la pena resaltar que Heung et al. (2009b) demostraron que es mejor utilizar plasma que sangre para la extracción de ARN de origen fetoplacentario (Heung et al. 2009b).

Con respecto a la utilización de Trizol LS, este aditivo protegió el ARN de la degradación en las muestras almacenadas a -20°C por 15 días (grupo 3A). Zhong et al. (2008) y Ng et al. (2003) reportaron que la utilización de Trizol LS junto con el kit de RNeasy mini kit (Qiagen) es un metodo optimo para la extracción de altas cantidades de ARN de alta calidad (Ng et al. 2003, Zhong et al. 2008). Adicionalmente otros estudios reportan que en términos de calidad y cantidad de ARN, el método en el que se utiliza Trizol-LS y cloroformo es el más convincente (Remakova et al. 2013).

A pesar que la metodología de este estudio se basa en analizar los niveles de ARN totales en plasma materno y no específicos de placenta, ya se demostró en estudios previos, que la placenta es la principal fuente de esta molécula en el plasma materno (Ng et al. 2003) y que este ARN podría estar asociado a algun tipo de envoltura que lo protege de la degradación por nucleasas (Sesarini et al. 2010, Ng et al. 2003, Tsui et al. 2002), por lo que podría concluirse que los niveles de ARN que se determinaron son provenientes y específicos de la unidad fetoplacentaria.

La importancia de este estudio radica en la poca información que se encuentra en la literatura acerca de protocolos de almacenamiento y procesamiento de muestras de plasma en las que se realizara extracción de ARN. Es importante resaltar que de acuerdo a la búsqueda en la literatura este sería el primer estudio que realiza cuantificación de ARN de plasma materno por espectrofotometría en las primeras 20 semanas de gestación. Sin embargo sería de gran utilidad ampliar este estudio realizando mediciones a nivel de ARNm de transcritos exclusivos de placenta como lactógeno placentario humano o gonadotrofina coriónica, para correlacionar los niveles encontrados de ARN total y específico.

Conclusión

Se logró extraer ARN de todas las muestras de plasma de las gestantes en las primeras 20 semanas de gestación y cuantificar por espectrofotometría. Se pudo evidenciar que la temperatura afecta las concentraciones de ARN en plasma materno mostrando niveles altos los grupos almacenados a 4°C y temperatura ambiente y niveles bajos los grupos almacenados a -20°C. Se identificó que el factor que afecta el ARN en plasma materno es la temperatura, probablemente debido al proceso de congelamiento-descongelamiento y las variables tiempo y Trizol LS no afectan significativamente los valores de ARN extraído de plasma materno. Los resultados de este estudio sugieren que las mejores condiciones para almacenar muestras de plasma materno para realizar extracción de ARN son a temperatura ambiente hasta por 24 horas o a 4°C hasta por un periodo de 30 días.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las pacientes por participar en el estudio y al Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario San Ignacio, a Javesalud y al Hospital de Usaquen por la colaboración en el reclutamiento de las pacientes. A la Universidad El Bosque por la financiación del proyecto con el código PCI 2011-199 y a los comités de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Javeriana y de la Universidad El Bosque.

Conflicto de interés

Declaramos que no existen conflictos de intereses.

Referencias

- Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C, Bresin A, De Sanctis P et al. (2010) Identification of circulating placental mRNA in maternal blood of pregnancies affected with fetal congenital heart diseases at the second trimester of pregnancy: implications for early molecular screening. *Prenatal Diagnosis* 30(3):229-234
- Ayala-Ramírez P, García-Robles R, Bernal J, Bermúdez M (2012) Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia* 39(4):164-170
- Ayala-Ramírez P, García-Robles R, Rojas JD, Bernal J, Bermúdez M (2012b) Identification of messenger RNA of fetoplacental source in maternal plasma of women with normal pregnancies and pregnancies with intrauterine growth restriction. *Colombia Médica* 43(3): 119-123
- Bernardo V, Ribeiro LF, Mattos R (2013) Gene expression analysis by real-time PCR: Experimental demonstration of PCR detection limits. *Analytical Biochemistry* 432: 131-133
- Cerkovnik P, Perhavec A, Zgajnar J, Novakovic S (2007) Optimization of an RNA isolation procedure from plasma samples. *International journal of molecular medicine* 20(3): 293-300
- Chiu R, Lui W, El-Sheikhah A, Chan A, Lau T, et al. (2005) Comparison of protocols for extracting circulating DNA and RNA from maternal plasma. *Clinical Chemistry* 51(11): 2209-2210
- Farina A, Sekizawa A, Purwosunu Y, Rizzo N, Banzola I, Concu M, et al. (2006) Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenatal Diagnosis* 26(12): 1115-1120
- Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O (2011) Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta* 32 Suppl: S17-20
- Heung M, Tsui NB, Leung TY, Lau TK, Lo YM, et al (2009a) Development of extraction protocols to improve the yield for fetal RNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 29(3): 277-279
- Heung M, Jin S, Tsui N, Ding C, Leung T, et al (2009b) Placenta-derived fetal specific mRNA is more readily detectable in maternal plasma than in whole blood. *PLoS One* 4(6): e5858

- Kemmer C, Neubauer P (2006) Antisense RNA based down-regulation of RNaseE in E.coli. *Microbial Cell Factories* 5(38) doi:10.1186/1475-2859-5-38
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD (1999) Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research* 5(8): 1961-1965
- Lo YM, Chiu RW (2012) Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13: 285-306
- Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW et al. (2003) mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8):4748-4753
- Okazaki S, Sekizawa A, Purwosunu Y, Iwasaki M, Farina A, et al. (2006) Measurement of mRNA of trophoblast-specific genes in cellular and plasma components of maternal blood. *Journal of medical genetics* 43(9): e47
- Purwosunu Y, Sekizawa A, Okazaki S, Farina A, Wibowo N et al. (2009) Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200(4):386e1-7
- Remáková M, Škoda S, Faustová M, Vencovský J, Novota P (2013) Validation of RNA Extraction Procedures Focused on MicroRNA Expression Analysis. *Folia Biologica* 59: 47-50
- Sesarini C, Argibay P, Otaño L (2010) Non invasive prenatal diagnosis. *Fetal nucleic acid analysis in maternal blood Medicina* 70(6): 537-542
- Shimizu H, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nakamura M, Farina A (2009) PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenatal Diagnosis* 29(13): 1231-1236
- Tsui NB, Ng EK, Lo YM (2002) Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clinical Chemistry* 48(10):1647-1653
- Wong BC, Chiu RW, Tsui NB, Chan KC, Chan LW et al. (2005) Circulating Placental RNA in Maternal Plasma Is Associated with a Preponderance of 5' mRNA Fragments: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis and Monitoring. *Clinical Chemistry* 51(10):1786-1795
- Wong BC, Lo YM (2006) Plasma RNA integrity analysis: methodology and validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1075:174-178
- Zhong XY, Holzgreve W, Huang DJ (2008) Isolation of cell-free RNA from maternal plasma. *Methods in Molecular Biology* 444:269-273

Temperatura de almacenamiento y cantidad de ARN extraído de plasma materno

Resumen. El descubrimiento de los ácidos nucleicos circulantes en plasma materno abrió nuevas posibilidades para el diagnóstico prenatal no invasivo. No obstante, se desconocen los factores que afectan la concentración del ARN de origen feto-placentario en muestras de plasma materno. Fue investigado el efecto del tiempo de almacenamiento (inmediatamente, 4 y 24 horas, 15 y 30 días), temperatura de almacenamiento (4°C, -20°C y ambiente) y Trizol (con o sin) sobre la cantidad del ARN en muestras de plasma de gestantes, antes de la semana 20 de embarazo. Se analizaron por espectrofotometría 33 muestras de ARN extraídas de plasma. La temperatura afecta la concentración de ARN, más que el tiempo de almacenamiento y la adición de Trizol. De igual forma, la cantidad de ARN fue estadísticamente menor en muestras almacenadas a -20°C. El tiempo de almacenamiento y la presencia o ausencia de Trizol no incidió en la concentración de ARN. En conclusión la temperatura es factor clave en la extracción de ARN, donde probablemente el proceso de congelamiento-descongelamiento incide negativamente en la concentración de ARN.

Palabras clave: Ácido ribonucleico; plasma; complicaciones del embarazo.

Temperatura de armazenamento e quantidade de RNA extraído de plasma materno

Resumo. A descoberta dos ácidos nucleicos no plasma materno abriu novas possibilidades para o diagnóstico pré-natal não-invasivo. Desconhecem-se no entanto os fatores que afetam a concentração do RNA de origem materno-fetal nas amostras do plasma materno. Investigou-se o efeito do tempo de armazenamento (15 a 30 dias), da temperatura de armazenamento (4°C, -20°C e ambiente), e de Trizol (com ou sem) sobre a quantidade de RNA nas amostras de plasma de gestantes, antes da vigésima semana de gravidez. 33 amostras de RNA extraídas do plasma foram analisadas por espectrofotometria. A temperatura afecta a concentração de RNA, mais que o tempo de armazenamento e de adição de Trizol. Da mesma forma, a quantidade de RNA foi significativamente menor nas amostras armazenadas a -20°C. O tempo de armazenamento e a presença ou ausência de Trizol não afetou os níveis de RNA. Em conclusão, a temperatura é um fator chave para a extração de RNA, onde provavelmente, o processo de congelamento e descongelamento afeta negativamente a concentração de RNA.

Palavras-chave: Ácido ribonucleico; plasma; complicações na gravidez.