

## Concentración e índice de integridad de ADN libre circulante en población general de Jalisco, México

Jessica Fabiola Rodríguez-Ortiz<sup>1-2</sup>; Anilú Margarita Saucedo-Sariñana<sup>1-2</sup>; Mónica Alejandra Rosales-Reynoso<sup>1</sup>; Patricio Barros-Núñez<sup>2-3\*</sup>

<sup>1</sup>División de Medicina Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México. <sup>2</sup>Doctorado en Genética Humana, Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. <sup>3</sup>Unidad de Investigación Médica. UMAE de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco. México.

### ABSTRACT

#### Concentration and integrity index of circulating free DNA in the general Mexican population of Jalisco, Mexico

**Introduction.** The concentration and integrity of cell free DNA (cf-DNA) are diagnostic and prognostic biomarkers in multiple diseases.

**Objective.** To determine the concentration and integrity index of cf-DNA in peripheral blood of individuals from Jalisco, Mexico.

**Method.** Peripheral blood from 117 individuals was analyzed. cf-DNA was quantified by Qubit 2.0 fluorometry and by ALU115 q-PCR. Integrity index was determined by the ALU247/ALU115 ratio by q-PCR.

**Results.** The mean concentration of cf-DNA was 294 ng/ml by fluorometry and 108.08 ng/ml by q-PCR. Integrity index, by the ALU247/ALU115 ratio was 0.45. The concentration of cf-DNA showed a significant difference by age group, but not by sex. The integrity index did not show significant differences by sex or age groups.

**Conclusions.** There are wide differences in cf-DNA between the two procedures used here, as well as compared to other populations.

#### RESUMEN

**Introducción.** La concentración e integridad del ADN libre circulante (ADN-lc) son biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en múltiples padecimientos.

**Objetivo.** Determinar la concentración e índice de integridad del ADN-lc en una muestra de población general de Jalisco, México.

#### Historial del artículo

Recibido: 13 jul 2021

Aceptado: 24 ago 2021

Disponible en línea: 1 sep 2021

#### Palabras clave

ADN libre circulante, índice de integridad, población general.

#### Keywords

Circulating free DNA, integrity index, general population.

Copyright © 2021 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

Patricio Barros-Núñez, Jefe de Unidad de Investigación Médica. UMAE de Pediatría, IMSS. Guadalajara, México. Tel. +52(33)3668 3000. Ext. 32630.

E-mail: [jaime.barros@imss.gob.mx](mailto:jaime.barros@imss.gob.mx)

<https://revistabiomedica.mx>.

**Método.** Se analizaron muestras de sangre periférica de 117 personas procedentes de Jalisco. El ADN-*lc* se cuantificó mediante fluorimetría Qubit 2.0 y amplificación por q-PCR de ALU115. El índice de integridad se determinó por la relación de los amplificados ALU247/ALU115.

**Resultados.** La concentración media de ADN-*lc* mostró 294 ng/ml por fluorimetría Qubit 2.0 y 108.08 ng/ml por q-PCR. El índice de integridad calculado por la relación ALU247/ALU115 fue 0.45. La concentración mostró diferencia significativa por edad pero no por sexo. El índice de integridad no mostró diferencias significativas por edad ni sexo.

**Conclusiones.** Existen amplias diferencias en ADN-*lc* entre los dos procedimientos aquí utilizados, así como comparado con otras poblaciones.

## INTRODUCCIÓN

El ADN libre circulante (ADN-*lc*) se define como un conjunto de moléculas de ADN (150 a 20,000 pares de bases) las cuales se encuentran circulando fuera de las células en diversos líquidos corporales. Desde su descubrimiento (1), múltiples estudios han descrito variaciones en la concentración y en el índice de integridad del ADN-*lc*, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas que incrementan los procesos de apoptosis o necrosis. Los cambios en el ADN-*lc* se han propuesto como marcadores de diagnóstico o pronóstico en diversas patologías (2, 3).

Hasta la fecha, varios estudios han informado un aumento de las concentraciones de ADN-*lc* en individuos con algunas afecciones, a diferencia de individuos sanos o de grupos control. De acuerdo con la mayoría de las publicaciones, la concentración de ADN-*lc* en población general es menor que en pacientes con procesos inflamatorios o neoplásicos (4).

Por su parte, el índice de integridad del ADN-*lc* nos muestra la intensidad relativa de la muerte celular no apoptótica y el mecanismo de liberación del ADN-*lc*. Los fragmentos más grandes, que pueden alcanzar hasta 20,000 pb se liberan por necrosis (como ocurre en los procesos tumorales); mientras tanto, en procesos naturales como la apoptosis, el

tamaño de los fragmentos suele ser uniforme y más corto, entre 70 y 200 pb (5, 6). La concentración de ADN-*lc* en individuos sanos varía en rangos de 0 a 100 ng/ml (4).

Para determinar el índice de integridad, múltiples autores utilizan secuencias de nucleótidos repetidos no codificantes, intercalados en el ADN genómico, como son las secuencias ALU. Para ello se diseñan dos pares de iniciadores, uno que se encarga de amplificar tanto secuencias cortas como secuencias largas (ALU115) y un segundo par de iniciadores que amplifican únicamente secuencias largas (ALU 247) (5).

Debido a que los sitios de alineación de los iniciadores de las secuencias ALU115 están ubicados dentro de los sitios de alineación de ALU247, se logra la cuantificación relativa de fragmentos grandes (liberados por necrosis tumoral) así como de los fragmentos totales. El valor del índice de integridad varía entre cero y uno, los valores más cercanos a cero se esperan en individuos sanos (6); sin embargo, se han observado importantes variaciones. Hasta el día de hoy, sólo dos estudios han analizado la concentración de ADN-*lc* en la población general; el primero, realizado en población china, encontró niveles plasmáticos de 1,121 copias/ml mediante q-PCR; el segundo, llevado a cabo en población colombiana, reportó una concentración media de 0.72 ng/ $\mu$ l mediante la misma metodología (7, 8).

Nuestro estudio tiene como objetivo determinar, por primera vez, la concentración e índice de integridad del ADN-*lc* en población general mexicana, para establecer un rango de referencia que pueda ser utilizado en estudios posteriores en nuestra población.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron un total de 117 muestras de sangre de voluntarios sanos del occidente de México. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética y de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (R-2018-785-001). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes y tutores, incluyendo el asentimiento informado por parte de los menores de edad. Todos los participantes

contestaron un cuestionario epidemiológico que nos permitió recolectar datos sociodemográficos. Para fines del estudio los criterios de inclusión aplicados fueron: mexicanos de sexo y edad indistinta, que no presenten procesos infecciosos, inflamatorios ni malignos; al momento de la toma de muestra. Para calcular el tamaño de muestra utilizamos los resultados obtenidos en un estudio de población colombiana (8) en donde la desviación estándar ( $S^+$ ) de la concentración de individuos sanos fue de 1.2829, con lo que obtuvimos una  $n$  de 101 personas.

### Cuantificación e índice de integridad del ADN-lc.

Se recolectaron cinco ml de sangre periférica en tubos con EDTA-K2 y se procesaron dentro de la primera hora. La separación del plasma se logró mediante doble centrifugación (1900 xg durante 15 min y 1500 xg durante 10 min) y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El aislamiento de ADN-lc se logró a partir de un ml de plasma mediante el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (QIAGEN Science, Inc., EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración total de ADN-lc se estimó mediante 1) fluorometría Qubit® utilizando el kit de ensayo de dsDNA HS (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 2) amplificación de los fragmentos de ALU115, que incluye tanto los fragmentos de ADN cortos (apoptóticos) como largos (no apoptóticos).

Por otro lado, el índice de integridad del ADN se calculó mediante la proporción de fragmentos de ALU247/ALU115, donde los valores de ALU247 representan el ADN liberado por células no apoptóticas. La amplificación por qPCR de los fragmentos ALU115/ALU247 se realizó usando los iniciadores descritos por Umetani *et al* (5) y el FastStart SYBR Green Master Kit (Roche, Mannheim, Alemania), según las instrucciones del fabricante, con temperatura de precalentamiento y activación de la ADN polimerasa a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 30s, hibridación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 30s y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 30s. La concentración absoluta equivalente de ADN-lc en cada muestra

se determinó mediante una curva estándar con diluciones en serie (1000 ng - 1 ng) de ADN genómico (5).

### Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central (media y desviación estándar). Para realizar las comparaciones por sexo de las concentraciones y el índice de integridad del ADN-lc se utilizó la prueba  $t$  de Student, mientras que para comparar los grupos de edad se utilizó la prueba de ANOVA. Se utilizó la prueba post hoc de mínima diferencia significativa para determinar diferencia significativa entre los grupos. Los análisis estadísticos se realizaron en *statgraphics*.

### RESULTADOS

Se analizaron muestras de ADN-lc de 117 personas (60 mujeres y 57 hombres) de población general de Jalisco. La edad media de los sujetos estudiados fue de 31.8 años (rango: 3 a 70) (Tabla 1). La concentración media de ADN-lc obtenida por q-PCR fue 108.08 ng/ml, mientras que la concentración media obtenida por Qubit fue 294 ng/ml mostrando ser significativamente diferentes ( $p=0.001$ ). En el análisis por sexo, la concentración media de ADN-lc, obtenida mediante q-PCR en varones fue de 162.4 ng/ml, y en mujeres fue de 143.9 ng/ml; en tanto que por Qubit las medias fueron de 327.9 y 330.8 ng/ml, respectivamente. Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni mediante q-PCR ( $p=0.312$ ) ni por Qubit ( $p=0.735$ ).

Por su parte, la prueba de ANOVA demostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ADN-lc por grupos de edad ( $p=0.024$ ), tanto por q-PCR como por Qubit (Tabla 1). El índice de integridad del ADN-lc (ALU247/115) fue de  $\bar{x}=0.45$  con una  $DE=0.215$  y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por sexo ( $p=0.09$ ) ni por grupos de edad ( $p=0.248$ ).

**Tabla 1.** Concentración media de ADN libre circulante mediante q-PCR y Qubit por grupos de edad.

Grupos de edad (años)	n (%)	q-PCR (ng/ml)	*DE	Qubit (ng/ml)	*DE
< 19	15 (12.8)	181	2.09	248	0.120
20 - 39	80 (68.3)	88	1.09	290	0.171
40 - 59	10 (8.5)	113	0.929	414	0.169
>60	12 (10.2)	166	0.984	310	0.297
Media		108.08		294	
		**p=0.024		**p=0.024	

\* DE: Desviación estándar \*\* ANOVA

## DISCUSIÓN

Actualmente existe un interés creciente en el estudio de ADN-lc como biomarcador para el diagnóstico, seguimiento y prevención de múltiples enfermedades. Diversos estudios han mostrado que la concentración de ADN-lc en pacientes con procesos inflamatorios o neoplásicos es mayor que en individuos sanos (6); sin embargo, muy pocos trabajos han estudiado la concentración y el índice de integridad del ADN-lc en población general (7, 8). El índice de integridad de ADN-lc, calculado por la proporción de fragmentos de ADN grandes versus el conjunto de fragmentos totales (grandes y pequeños) de ADN-lc, representa la cantidad relativa de muerte celular no apoptótica.

En nuestro estudio se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de

ADN-lc obtenido por la q-PCR (108 ng/ml) y la cantidad obtenida por fluorimetría Qubit (294 ng/ml) ( $p=0.001$ ). Varios factores podrían explicar tal diferencia; al respecto Sedlackova *et al* (9) sugieren que la concentración de ADN-lc puede ser subestimada cuando usamos q-PCR debido a la presencia de moléculas de ADN-lc altamente fragmentadas que no logran amplificarse. En apoyo, Bronkhorst *et al* (10) propusieron que la cuantificación de q-PCR podría mejorarse utilizando en paralelo dos o más genes constitutivos con diferentes longitudes del amplicón.

No se observaron diferencias significativas en la concentración y el índice de integridad de ADN-lc entre masculinos y femeninos, lo cual es consistente con estudios previos (7, 8). Por otro lado, la concentración del ADN-lc (Qubit) fue significativamente incrementada en los mayores de 40 años, lo cual podría estar relacionado con la presencia de patologías que ocurren con mayor frecuencia a esta edad, como es la diabetes mellitus, hipertensión y enfermedades neurodegenerativas (11).

Sólo otros dos estudios han analizado ADN-lc en población general (Tabla 2). Un primer estudio en población china (7) reportó 1,121 copias/ml de ADN-lc, en tanto que un estudio en Colombia (8) encontró 720 ng/ml de ADN-lc. En los tres estudios (incluyendo el nuestro) se utilizó PCR para la amplificación del ADN-lc, por lo que las diferencias en los resultados parecen no estar relacionados con la técnica utilizada.

**Tabla 2.** Concentración e índice de integridad de ADN libre circulante en grupos control y en población general

	Metodología	Concentración media (ng/ml)	Índice de integridad	Referencias
*EUA	q-PCR	340	0.13	12
*China	q-PCR	3.42	0.18	13
*Alemania	q-PCR	57	--	14
*Francia	q-PCR	5.3	--	15
*Francia	q-PCR	5.12	0.56	16
*Italia	Qubit 2.0	2,640	--	17
**China	q-PCR	1,121 copias/ml	--	7
**Colombia	q-PCR	720	--	8
**Jalisco, México	q-PCR	108.08	0.45	Este estudio
**Jalisco, México	Qubit 2.0	294	--	Este estudio

\*Grupos control. \*\*Población general.

Debido al reducido número de estudios en población general, comparamos nuestros resultados con los obtenidos en grupos control de otros estudios. Como se puede observar en la tabla 2, las diferentes metodologías usadas podrían explicar la variación de resultados.

Ahora bien, algunos de los aspectos más relevantes que podrían explicar estas diferencias pueden ser debidos a:

**Tipo y manejo de la muestra.** Del suero se obtienen dos a 24 veces más cantidad de ADN-lc que del plasma, probablemente debido a lisis celular. Para la extracción de sangre se utilizan desde tubos convencionales con EDTA hasta aquellos con factores de protección a largo plazo. El tiempo y condiciones de almacenamiento de muestras también podrían influir en los resultados (18-20).

Las técnicas de fluorescencia como Pico Green, espectrometría ultravioleta y Qubit han sido bien aceptadas por la consistencia en sus resultados (18); sin embargo, en los estudios en los que se usó la fluorimetría Qubit 2.0 para la cuantificación del ADN-lc, se reportaron 2,640 vs. 294 ng/ml (población italiana vs. población mexicana) (Tabla 2).

Seguramente, estudios que incluyan una mayor muestra poblacional, con grupos de edad más equilibrados, podrían dar resultados más consistentes y comparables.

## CONCLUSIONES

Hasta la fecha, sólo se han reportado dos estudios de ADN-lc en población general. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son completamente disímiles a los obtenidos en otras poblaciones. Las razones de estas diferencias podrían ser múltiples, aunque los procesos metodológicos usados probablemente son los más importantes.

## AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a las Dras. Rocío Ortiz López de la Facultad de Medicina del Instituto Tecnológico de Monterrey y Blanca Torres Mendoza del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS por su asesoramiento en diferentes aspectos técnicos de este trabajo.

## Fuente de Financiamiento:

Este estudio fue apoyado por el Fondo de Investigación y Salud del IMSS, con el número FIS/IMSS/PROT/PRI0/18/072.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'Homme. *C R Seances Biol Fil.* 1948; 142(3-4): 241-243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18875018/>
- Jylhävä J, Nevalainen T, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme, M, et al. Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell.* 2013.; 12(3): 388-397. doi: 10.1111/ace1.12058.
- Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of circulating cell-free DNA in cancers. *Mol Diagn Ther.* 2015; 19(6): 339-350. doi: 10.1007/s40291-015-0167-y.
- Stroun, M., Anker, P, Maurice, P, Lyautey, J, Lederrey, C, Beljanski, M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989; 46(5): 318-322.
- Umetani, N, Hiramatsu, S, Hoon, DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann. New York Acad. Sci.* 2006; 1075: 299-307. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.040>
- Cheng J, Tang Q, Cao X, Burwinkel B. Cell-free circulating DNA integrity based on peripheral blood as a biomarker for diagnosis of cancer: a systematic review. *Cancer Epide Biomar.* 2017; 26(11), 1595-1602. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0502
- Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with sex, age, and frequency of blood donations? *Ann Hematol.* 2007; 86(2), 139-143. doi: 10.1007/s00277-006-0182-5
- Amaya-Guio J, Aristizabal-Gutiérrez FA, Briceño-Balcázar I, Castillo-Zamora M, García-Robayo DA, Salazar-Jordan HD. Cuantificación de ADN libre en plasma sanguíneo de voluntarios sanos en una población bogotana. *Nova.* 2009; 7(12), 136-142. <https://doi.org/10.22490/24629448.427>
- Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proceeds online.* 2013; 15(1), 5. DOI: 10.1186/1480-9222-15-5

10. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant. *Tumor Biol.* 2019; 41(8). <https://doi.org/10.1177/1010428319866369>
11. Teo YV, Capri M, Morsiani C, Pizza G, Caetano-Faria AM, Franceschi C, et al. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell.* 2019; 18(1). doi: 10.1111/accel.12890
12. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006; 24: 4270–4276. doi: 10.1200/JCO.2006.05.9493
13. Yu-Jie G, Yu-Juan H, Zai-Lin Y, Hui-Yuan S, Yan Z, Yao B, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clinical Chemistry.* 2010; Vol. 48(11): 1651-1656. DOI: 10.1515/CCLM.2010.311
14. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, Flohr T, Sutton R, Mörcke A, et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology.* 2009; Vol 88(9): 897-905. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00535029/document>
15. Meddeb R, Dache ZAA, Thezenas S, Otandault A, Tanos R, Pastor B, et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Sci Rep.* 2019; 9: 5220 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41593-4>
16. Salvianti F, Giuliani C, Petrona L, Mancini I, Vezzosi V, Pupilli C, et al. Integrity and Quantity of total Cell-Free DNA in the Diagnosis of Thyroid Cancer: Correlation with cytological classification. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): 1350. doi: 10.3390/ijms18071350
17. Ponti, G, Maccaferri M, Manfredini M, Kaleci S, Mandrioli M, Pellacani, G, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clin Chim Acta.* 2018; 479: 14-19. doi: 10.1016/j.cca.2018.01.007.
18. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Klotten V, Herdean A, Voss T, et al. Multicenter evaluation of circulating cell-free DNA extraction and downstream analyses for the development of standardized (pre) analytical workflows. *Clin Chem.* 2019; 66(1): 149-160. doi: 10.1373/clinchem.2019.306837.
19. Gahlawat AW, Lenhardt J, Witte T, Keitel D, Kaufhold A, Mass KK, et al. Evaluation of Storage Tubes for Combined Analysis of Circulating Nucleic Acids in Liquid Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(3): 704. <https://doi.org/10.3390/ijms20030704>.
20. Diefenbach RJ, Lee JH, Kefford RF, Rizos H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genet-NY.* 2018; 228: 21-27. doi: 10.1016/j.cancergen.2018.08.005.