



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

“DIAGNÓSTICO CLÍNICO MEDIANTE  
LA GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR”

**TRABAJO PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
**P R E S E N T A**  
**EDUARDO STALIN GARCÍA LÓPEZ**

ASESORA:

DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Carpermor S.A. de C.V., Laboratorio de Referencia Internacional.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por darme la oportunidad y el apoyo para cumplir mis anhelos profesionales.

Agradezco a mis hijas Luisa y Sara por ser parte de la motivación que me impulso a desarrollarme profesionalmente, y que me permitirá ofrecerles una mejor calidad de vida.

Agradezco a Ricardo, Victor, Karen y especialmente a Marta por ser parte fundamental de mi vida y contar con su comprensión y apoyo para seguirme desarrollando profesionalmente.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Biología Molecular de Carpermor que gracias al esfuerzo y trabajo en equipo que se ha realizado en estos ocho años, hemos logrado implementar una variedad de pruebas moleculares que sin duda contribuyen a la Salud de la sociedad mexicana, y que conllevan a la satisfacción como profesionales de contribuir con nuestro trabajo a nuestro país.

Agradezco a la Dra. Esther Herrera por el apoyo incondicional que me ha brindado para mi desarrollo profesional y calidad de vida.

Agradezco a mis compañeros y amigos de las distintas áreas de Carpermor por su amistad y apoyo en el trabajo diario.

Agradezco a Rocio Piedras por apoyarnos en las actividades administrativas del quehacer diario y por brindarme su amistad.

Agradezco al Lic. José Carlos Pérez y Pérez y al Doctor Carlos Pérez Moreno por permitirme cumplir mis metas como profesional Químico en el área de Biología Molecular en su empresa y de esta manera redituarme a la sociedad mexicana, la preparación obtenida como universitario.

Agradezco a Dios porque me ha permitido estar en el contexto en el que me encuentro actualmente.

## DEDICATORIAS

Esta Tesis está dedicada a toda mi familia, amigos y la gente que me ha apoyado a lo largo de toda mi vida.

*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”*

---

---

## ÍNDICE

Índice .....	1
Abreviaturas .....	7
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas .....	11
Glosario .....	13
Resumen.....	18
Introducción	
Tema 1. Metodologías moleculares en el diagnóstico clínico	
1.1 Introducción .....	21
1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
1.3 La PCR anidada .....	27
1.4 La PCR en tiempo real .....	28
1.5 Captura de Híbridos (CH).....	31
1.6 DNA ramificado (bDNA).....	33
1.7 Fragmentos Polimórficos de Restricción (RFLPs) .....	36
1.8 Southern blot, Northern blot y Western blot .....	37
1.9 DNA recombinante .....	39
Tema 2. Los métodos moleculares en el laboratorio clínico	
2.1 Desarrollo de las metodologías moleculares .....	42
2.2 Ventajas del diagnóstico molecular en el laboratorio clínico...	48
2.3 Kits comerciales para diagnóstico molecular .....	49

---

---

2.4 Características de un laboratorio de Biología Molecular .....	54
Descripción del Desempeño Profesional	
Introducción .....	57
I    Virus del Papiloma Humano (HPV)	
I.1 Introducción .....	60
Capítulo 1. Detección del Virus del Papiloma Humano por la PCR	
1.1 Secuencias de estudio.....	67
1.2 Muestras.....	67
1.3 Extracción de DNA.....	67
1.4 Amplificación por la PCR .....	67
1.5 Detección.....	68
1.6 Control de extracción .....	68
1.7 Control de amplificación .....	68
1.8 Resultados .....	69
1.9 Discusión.....	70
1.10 Comentarios .....	71
β-actina como control interno	
1.11 Justificación.....	71
1.12 Muestras.....	72
1.13 Control interno.....	72
1.14 Extracción DNA.....	72
1.15 Amplificación por la PCR .....	72
1.16 Detección por electroforesis .....	73

---

---

1.17 Resultados del control interno.....	73
1.18 Resultados en las muestras .....	73
1.19 Discusión.....	74
1.20 Comentarios .....	74
Capítulo 2. Genotipo de HPV por la PCR multiplex	
2.1 Secuencias de estudio .....	76
2.2 Diseño de los iniciadores.....	76
2.3 Muestras.....	76
2.4 Amplificación de regiones del HPV E6 y E7 .....	77
2.5 Amplificación mediante la PCR multiplex .....	77
2.6 Condiciones de la PCR multiplex .....	78
2.7 Amplificación con iniciadores específicos .....	79
2.8 Condiciones de la PCR con iniciadores específicos.....	79
2.9 Resultados en la detección del genotipo del HPV .....	80
2.10 Discusión.....	81
2.11 Comentarios .....	81
Capítulo 3. Genotipo del HPV en tejido cervical	
3.1 Resumen.....	83
3.2 Tipificación en tejidos embebidos en bloques de parafina.....	83
3.3 Proceso de análisis de las diferentes categorías de muestras ..	86
3.4 Resultados en la frecuencia en los tipos virales del HPV .....	86
3.5 Resultados de la frecuencia del HPV por tipo de Neoplasia ...	87
3.6 Discusión.....	89

---

---

3.7 Comentarios .....	92
II Virus de la Hepatitis C (HCV)	
II.1. Introducción.....	96
Capítulo 4. Detección de la Hepatitis C	
4.1 Secuencias de estudio.....	99
4.2 Alineamiento de secuencias de los genotipos de la HCV.....	99
4.3 Muestras .....	102
4.4 Sistema de amplificación por la PCR .....	103
4.5 Resultados de las pruebas de reproducibilidad.....	103
4.6 Resultados de las pruebas de sensibilidad analítica.....	105
4.7 Discusión.....	107
4.8 Comentarios .....	107
Capítulo 5. Carga viral del virus de la Hepatitis C	
5.1 Resumen.....	109
5.2 Muestras.....	109
5.3 Extracción de RNA viral.....	110
5.4 Ensayo inicial de los oligonucleótidos y sonda para el HCV... ..	110
5.5 Amplificación .....	110
5.6 Resultados en Especificidad analítica.....	113
5.7 Determinación del vol. de plasma para extracción de RNA ..	114
5.8 Determinación de concentración de oligonucleótidos.....	115
5.9 Resultados en la linealidad .....	116
5.10 Resultados en Detección de los genotipos del HCV .....	117

---

---

5.11 Resultados en el límite de detección .....	117
5.12 Correlación de la PCR en tiempo real Vs Cobas Amplicor. ..	117
5.13 Resultados en la variación intraensayo .....	120
5.14 Resultados en la variación interensayo .....	120
5.15 Discusión.....	121
5.16 Comentarios .....	121
III Enfermedad de Alzheimer	
III.1. Introducción .....	124
Capítulo 6. Genotipo de la Apolipoproteína E (ApoE)	
6.1 Resumen.....	131
6.2 Muestras individuos normales y dislipidémicos .....	131
6.3 Extracción de DNA genómico .....	132
6.4 PCR de la ApoE .....	132
6.5 Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLPs).....	133
6.6 Detección de los polimorfismos .....	133
6.7 Resultados en población mexicana normal .....	134
6.8 Población con dislipidemía y alteración en la glucosa.....	135
6.9 Discusión.....	136
6.10 Comentarios .....	138
Análisis y discusión.....	140
La biología molecular y el laboratorio clínico .....	141
Perspectivas de la biología molecular en el laboratorio clínico .....	142
Recomendaciones .....	147

Comentarios finales.....	149
La biología molecular en el laboratorio clínico .....	150
La biología molecular y la licenciatura de Q.F.B.....	151
Literatura citada.....	152

## ABREVIATURAS

A	Adenina
bDNA	DNA ramificado
C	Citosina
CaCu	Cáncer cervicouterino
CH	Captura de Híbridos
CI	Cáncer Invasor
Cols.	Colaboradores
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad de Alzheimer
E.D.T.A.	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Guanina
HB	Hemoglobina
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCV	Virus de la Hepatitis C
HDL	Lípidos de Alta Densidad
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPV	Virus del Papiloma Humano
LDL	Lípidos de Baja Densidad
LIEB	Lesión Intraepitelial Escamoso de Bajo Grado
LIEA	Lesión Intraepitelial Escamoso de Alto Grado
ml	Mililitros
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NICI	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grado I
NICII	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grado II
NICIII	Neoplasia Intraepitelial Cervical Grado III
ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Q.F.B.	Químico Farmacéutico Biólogo
RFLP	Fragmento Polimórfico de Restricción
RNA ó ARN	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptasa Reversa
T	Timina
µl	Microlitro
U	Uracilo
UI	Unidades internacionales
UTR	Secuencia nucleotídica de un gen que no se traduce
U.V.	Ultravioleta



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Replicación del DNA celular.....	13
FIGURA 2.	Enlaces de puentes de hidrógeno entre las bases .....	13
FIGURA 3.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) .....	14
FIGURA 4.	Genotipo del Virus de Papilomavirus Humano .....	17
FIGURA 5.	Equipos e instrumentos para la PCR.....	20
FIGURA 6.	<b>PCR anidado</b> .....	22
FIGURA 7.	Gráfica de la amplificación de la PCR en tiempo real .....	22
FIGURA 8.	PCR usando la sonda TaqMan .....	23
FIGURA 9.	Captura de Híbridos (CH).....	23
FIGURA 10.	DNA ramificado (bdNA) .....	24
FIGURA 11.	Fragmentos Polimórficos de Restricción .....	25
FIGURA 12.	Método de Southern blot.....	27
FIGURA 13.	Western blot.....	32
FIGURA 14.	Cobas Amplicor .....	39
FIGURA 15.	Microscopia electrónica del Papilomavirus Humano .....	47
FIGURA 16.	Mapa genético del Papilomavirus tipo 16.....	48
FIGURA 17.	Amplificación de la región L1 del HPV y B-actina con iniciadores específicos .....	49
FIGURA 18.	Amplificación por PCR multiplex en grupos del control del tipo viral 16, línea celular Caski.....	50
FIGURA 19.	Amplificación específica del Control Positivo para el tipo viral 16 con los cebadores del tipo viral correspondiente .....	51

FIGURA 20. Esquema del proceso de análisis de las tejidos cervicales en bloque de parafina .....	51
FIGURA 21. Frecuencia de los tipos virales encontrados en las 44 tejidos de bloque parafinados estudiados.....	51
FIGURA 22. Categorías vs. frecuencia .....	51
FIGURA 23. Genoma del Virus de la Hepatitis C.....	51
FIGURA 24. Alineamiento de los diferente genotipos del HCV 1a, 1b, 3a, 2a/c, estándar Armored Virus de Hepatitis C, Secuencias de Hepatitis C obtenidas del Genbank .....	51
FIGURA 25. Secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los diferentes genotipos del Virus de la hepatitis C.....	51
FIGURA 26. Amplificado de RNA de 110 pb de la región conservada del virus de la hepatitis C .....	51
FIGURA 27. Gráfica que muestra la señal de fluorescencia consecuencia de la presencia del HCV.....	51
FIGURA 28. Gráfica y tabla de las señales de florescencia para diferentes tipos de RNA o DNA virales.....	51
FIGURA 29. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real de extracciones virales.....	51
FIGURA 30. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real variando la concentración de oligonucleótidos .....	51
FIGURA 31. Gráfica de linealidad de la carga viral de HCV.....	51
FIGURA 32. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real de muestras a diferente concentración de carga viral expresada en UI/ml.....	51
FIGURA 33. Gráfica que muestra la correlación de la carga viral obtenida por PCR tiempo real Vs Cobas Amplicor.....	51

FIGURA 34. Amplificación del polimorfismo de la ApoE..... 51

FIGURA 35. Polimorfismo de la ApoE ..... 51

FIGURA 36. RFLP de PCR de la región polimórfica de Apo E ..... 51

FIGURA 37. Método de microarreglo para expresión génica..... 51

FIGURA 38. Uso de pirosecuenciación para descubrimiento de patógenos ..... 51

---



---

**INDICE DE TABLAS**

TABLA 1.	Metodologías moleculares empleadas para el diagnóstico clínico. ..	16
TABLA 2.	Sondas y fluoró cromos empleados para la realización de la PCR en tiempo real.....	18
TABLA 3.	Descubrimientos importante para el desarrollo del diagnóstico molecular .....	28
TABLA 4.	Ventajas de métodos moleculares .....	43
TABLA 5.	Características de diferentes kits comerciales para la prueba de Carga viral de HIV .....	44
TABLA 6.	Kits comerciales diferentes a la carga viral de HIV .....	44
TABLA 7.	Empresas no farmacéuticas que venden kits para diagnóstico de enfermedades infecciosas o hereditarias por la PCR .....	44
TABLA 8.	Factores asociados para riesgo de Cáncer Cervicouterino.....	44
TABLA 9.	Sensibilidad y especificidad clínica de la Detección del HPV en muestras de raspado endocervical, orina y ambos. ....	44
TABLA 10.	Se presentan 4 grupos para la PCR multiplex. ....	44
TABLA 11.	Grupo de los HPV que se detectan y los tamaños de cada amplicón para cada tipo de HPV. ....	44
TABLA 12.	Mezcla de la PCR multiplex y programa del termociclador .....	44
TABLA 13.	Programa del termociclador PalmCycler para el proceso de amplificación .....	44
TABLA 14.	Resultados obtenidos de la tipificación del Virus del Papiloma Humano en las 51 muestras procesadas.....	44
TABLA 15.	Frecuencia de tipos virales en las muestras procesadas y ordenados por diagnostico histológico. ....	44

---

---

TABLA 16.	Resultados de ensayos de reproducibilidad. Muestras de pacientes empleadas como controles. ....	44
TABLA 17.	Resultados de ensayos de reproducibilidad. ....	44
TABLA 18.	Resultados de ensayos de sensibilidad. ....	44
TABLA 19.	Resultados de ensayos de sensibilidad. Serie de resultados obtenidos a partir de diluciones de material de control comercial..	44
TABLA 20.	Resultados de ensayos de sensibilidad. Límite de detección.....	44
TABLA 21.	Mezcla de reacción de la PCR en tiempo real. ....	44
TABLA 22.	Correlación entre el Cobas Amplicor y la PCR en tiempo real.....	44
TABLA 23.	Variación intraensayo por triplicado de 19 muestras. ....	44
TABLA 24.	Variación interensayo por triplicado de 5 muestras.. ....	44
TABLA 25.	Fragmentos Polimórficos de Restricción del Amplicón.....	44
TABLA 26.	Frecuencia de Genotipos de la ApoE.. ....	44
TABLA 27.	Frecuencia de los alelos de la ApoE.. ....	44
TABLA 28.	Características de la población diabética con altos niveles de lípidos.. ....	44
TABLA 29.	Análisis estadísticos de los resultados obtenidos.. ....	44
TABLA 30.	Prevalencia de los genotipos 2/3,3/4,3/3 en la población.....	44
TABLA 31.	Frecuencia alélica en la población.. ....	44

## GLOSARIO

**Ácido nucleico blanco.** Secuencia de DNA ó RNA que se tiene interés en identificar.

**Alelo.** Una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma.

**Amplicón.** Producto de DNA obtenido por algún método de amplificación de secuencia.

**bDNA.** Método de amplificación de señal, que consiste en detectar una secuencia de ácido nucleico blanco mediante el uso de diferentes sondas, que se unen en cascada una con otra hasta que la última tiene una molécula de dioxetano que desprende fotones mediante una reacción química.

**Captura de Híbridos.** Método de amplificación de señal que consiste en identificar una secuencia de DNA ó RNA blanco por la formación de híbridos de DNA:RNA mediante el uso de una sonda complementaria a la secuencia blanco y que se unen a anticuerpos anti híbridos de DNA:RNA en fase sólida y después en forma soluble, donde estos últimos anticuerpos tienen en su extremo una molécula de dioxetano, que mediante una reacción química desprende luz que se cuantifica en un luminómetro.

**Carga viral.** Se refiere a la cantidad de DNA o RNA de un virus que esta presente en un ml de plasma, suero o sangre total.

**cDNA.** DNA complementario. Se refiere al DNA que se obtiene a través del RNA que sirve de molde para producir esta cadena de DNA mediante la enzima

transcriptasa reversa. Proceso común en algunos virus de la familia de los retrovirus como es el caso del HIV y HCV.

**Cebador.** Iniciador o primer. Oligonucleótido que se utiliza para el proceso de la PCR y que es complementario a una de las cadenas de DNA que se quiere detectar o cuantificar.

**Clonación.** Proceso mediante el cual se obtienen copias idénticas de algún objeto. En biología molecular se refiere al proceso por el que se obtiene copias de DNA/RNA idénticos, o bien, organismos vivos idénticos.

**Diagnóstico.** Determinación de la naturaleza de una enfermedad. El diagnóstico debe combinar una adecuada historia clínica (antecedentes personales, familiares, y enfermedad actual), un examen físico completo y exploraciones complementarias (pruebas de laboratorio y de diagnóstico por imagen).

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico. Material genético de todos los organismos celulares y casi todos los virus. Esta compuesta de una doble cadena que forma una doble hélice y está formada de la azúcar desoxirribosa, grupo fosfato y las bases nitrogenadas púricas: adenina, guanina y pirimídicas: citocina y timina.

**Electroforesis.** Método que se utiliza para separar moléculas como fragmentos de DNA o proteínas por sus características eléctricas y se basa en utilizar una matriz que permita el paso de estas moléculas al aplicarles corriente a través de un amortiguador electrolítico. La cámara de electroforesis tiene un cátodo (negativo)

y un ánodo (positivo) que es por donde migran los electrones al paso de la corriente. El DNA o RNA tienen carga negativa por lo que su migración es hacia el ánodo, migrando más rápido los fragmentos pequeños con respecto a los grandes.

**Enzima de restricción.** Proteína que tiene la función de reconocer secuencias específicas de DNA y realizar un corte. Existen dos tipos, las palindrómicas que cortan el DNA dejando extremos cohesivos en cada uno de las cadenas, y los romos que cortan el DNA sin dejar extremos cohesivos.

**Enlaces de puentes de hidrógeno.** Es el enlace que presentan dos moléculas a través de sus átomos de hidrógeno. En el DNA los enlaces entre las bases se dan por los hidrógenos expuestos entre estas y ocurren entre la adenina con timina o uracilo y guanina con citosina.

**Exón.** Secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica para una proteína.

**Fenotipo.** Son las características que se producen a consecuencia de la expresión genética, y de los cuales pueden ser medibles ó visuales como el color de ojos, piel, cabello, gestos, personalidad, etc.

**Gen.** Es la secuencia de ácido nucleico que contiene la información para codificar una proteína y es la unidad del genoma. Esta compuesto de exones e intrones. Estas unidades solos o en conjunto aportan características fenotípicas al individuo.

**Genoma.** Es la totalidad del material de ácido nucleico (DNA o RNA) que tiene un ser vivo y que contiene tanto el material codificante (genético) y el material no codificante (regulador).

**Genoteca.** Librería génica que corresponde a la totalidad de ácido nucleico contenido en un organismo.

**Genotipo.** Son las características genéticas que tiene un ser vivo.

**Herencia.** Es la carga genética que recibe un individuo de sus progenitores. Todos los individuos con reproducción sexual heredan un alelo por vía materna y otro por vía paterna. Es en esta carga genética donde se tiene la información de las características de un individuo y que algunos de ellos pueden ser influenciados por el medio ambiente.

**Intrón.** Secuencia de ácido nucleico de un gen que no codifica para una proteína.

**Nucleótidos.** También conocido como bases es un compuesto químico formado por la unión de una a tres moléculas de ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono (desoxirribosa, ribosa) y una base nitrogenada derivada de la purina (adenina y guanina) o la pirimidina (citosina, timina y uracilo). Los nucleótidos son las unidades constituyentes de los ácidos nucleicos (DNA y RNA). También se encuentran libres en las células y forman parte de algunas coenzimas.

**NS.** Secuencias de genes virales que codifican para genes no estructurales.

**Oligonucleótido.** Fragmento de DNA de 10 a 60 pares de bases que se usa como sonda ó iniciador. Este puede estar marcado en su(s) extremo(s) por una molécula fluorescente, quencher, biotina o radioactividad.

**ORF.** Marco de Lectura Abierta. Se refiere a la secuencia de bases de un gen que da lugar al inicio de traducción a una proteína.

**PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa. Método que consiste en la amplificación exponencial *in vitro* de una secuencia de DNA de interés a través de dos o tres etapas de temperatura que se repiten cíclicamente dando lugar a un amplicón.

**Promotor.** Es la secuencia de DNA que participa en la regulación de la expresión de un gen, y por lo tanto de una proteína

**RFLP.** Fragmentos Polimórficos de Restricción. Es un método que consiste en la identificación de diferentes alelos o genotipos por la diferencia que presentan en su secuencia nucleotídica y que se hace evidente mediante el corte con una enzima de restricción (que es el sitio de diferencia) y corrimiento mediante electroforesis de estos fragmentos, siendo visibles mediante luz U.V.

**RNA.** Ácido ribonucleico. Material genético de todos los organismos celulares y algunos virus. Esta compuesta de una sola cadena que esta formada de la azúcar la ribosa, grupo fosfato y las bases nitrogenadas púricas: adenina, guanina y pirimídicas: citosina y uracilo.

**Sonda.** Secuencia de DNA o RNA de 10 o más pares de bases que se utiliza para detectar una secuencia de DNA o RNA de interés. La sonda se encuentra marcada en su(s) extremo(s) por una molécula fluorescente, quencher, biotina o radioactividad con la finalidad de evidenciar la presencia de la secuencia de ácido nucleico de interés.

**UTR.** Secuencia nucleotídica de un gen que no se traduce a una proteína. Estas regiones se encuentran tanto en el extremo 5' y/o 3' de un gen.



## RESUMEN

La genética es una ciencia que surgió en los inicios del siglo XX con el descubrimiento de Hugo de Vries, Carl Correns y Erich Von Tschermak de las olvidadas leyes de Gregorio Mendel. A partir de ese momento, se iniciaron los estudios de los factores hereditarios dando frutos con científicos como Thomas Hunt Morgan quien en 1910 con experimentos en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) determinó que los factores hereditarios denominados genes se encuentran en los cromosomas y que estos son la base mecánica de la herencia, dando origen a la Teoría génica y al principio de ligamiento; posteriormente, Oswald Avery y cols. en 1944 mediante el estudio de la transformación de una cepa sensible (R) de *Diplococcus* a una resistente (S) usando únicamente DNA, establecieron que es en esta molécula donde se encuentran localizados los genes y finalmente con los estudios de Erwin Chargaff en 1950 se determinó que el arreglo de las bases nitrogenadas en el DNA varía ampliamente entre las especies, pero que la cantidad de las bases: A:T y G:C siempre están en una relación 1 a 1. Con estos conocimientos queda confirmado que el DNA está formado por bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T), y que estas bases varían a lo largo de la molécula, pero que siempre están asociados A con T y G con C, siendo el DNA la molécula que contiene los genes que se transmiten hereditariamente y que estos genes pueden tener ligamiento uno con otros, esto es, que se segregan en forma dependiente y que están contenidos en los cromosomas (Bersch C, 2006). Otro hecho importante fue el descubrimiento de la estructura del DNA en 1952 por Watson y Crick, naciendo de esta manera la Biología Molecular como ciencia (Bersch C, 2006). Por esta razón hablar de genética y de biología molecular como disciplinas separadas, es difícil, puesto que las dos están íntimamente asociadas. El conocimiento de que los ácidos nucleicos en sus formas de DNA y/o RNA están presentes en todos los seres vivos

(vertebrados, invertebrados, plantas, parásitos, bacterias, virus, etc.) y que es el DNA donde se encuentra la información hereditaria que da lugar al fenotipo de cada ser vivo, ha permitido entender mediante el análisis de su DNA ó RNA los diferentes fenómenos biológicos como la transcripción, replicación, regulación genética y traducción. Estos conocimientos y el empleo de diferentes metodologías de la biología molecular han sido usados para su aplicación en: la ingeniería genética de plantas y animales, terapia génica, vacunas, investigación y evidentemente en el diagnóstico clínico de infecciones y enfermedades hereditarias (Lewin B, 2006). En el caso del diagnóstico de infecciones esta se puede dividir en: cualitativos (positivo/negativo, detectado/no detectado), cuantitativos (copias RNA/DNA por mL de plasma, suero, sangre total), y genotipos (tipos de virus, resistencia a los medicamentos). En el diagnóstico de enfermedades hereditarias estas pueden ser mediante la detección de mutaciones o genotipos (detección de alelos).

## **TEMA 1**

# **METODOLOGÍAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

## 1.1 Introducción.

Uno de los problemas del diagnóstico clínico principalmente en el tipo microbiológico-infeccioso, es la cantidad frecuentemente escasa de ácido nucleico del agente causal contenida en una muestra biológica, por lo tanto, la señal generada por la hibridación de sondas nucleotídicas específicas a menudo es no detectable. De tal manera que se han desarrollado métodos que permiten en teoría detectar una sola copia de cualquier secuencia específica de ácidos nucleicos de interés médico, a partir de una muestra biológica, mediante la amplificación de esta secuencia en millones de veces con la finalidad de hacerlo visible o medirlo en un instrumento. Existen dos tipos de metodologías de amplificación: por secuencia o por señales. La amplificación por secuencia consiste en aumentar el número de copias de una secuencia de DNA a una cantidad suficiente para su detección. La amplificación por señal, es través de la detección de una secuencia de DNA por el uso de sondas que reconocen estas secuencias y que tienen asociado una o varias moléculas que mediante una reacción quimioluminiscente, colorimétrica o fluorescente permiten detectar una secuencia de DNA a través de una cantidad suficiente de señal luminosa, colorimétrica o fluorescente para su detección (Tabla 1). El método más empleado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, en sus siglas en inglés) y es ampliamente usada en el diagnóstico clínico molecular, a partir de su invención por Muller en 1985 permitiendo grandes avances científicos por su característica de amplificar una secuencia de DNA de interés en millones de veces.

Tabla 1. Metodologías moleculares empleadas para el diagnóstico clínico.

TIPO DE AMPLIFICACIÓN	MÉTODO
De señales	Captura de Híbrido (CH)
	DNA ramificado (bDNA)
De amplificación	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
	Amplificación por Desplazamiento en Cadena (SDA)
	Reacción en Cadena de la ligasa (LCR)
	Amplificación Mediada por Temperatura (TMA)
	Amplificación Específica Basada en Ácidos Nucleicos (NASBA)

## 1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este método experimental se basa en la amplificación de secuencias nucleotídicas y es parecido en ciertos aspectos a la replicación, donde un pequeño fragmento de DNA monocatenario (iniciador o primer) se alinea por complementariedad en sus bases (adenina con timina y citosina con guanina) a secuencias específicas del genoma en la posición 3' a 5' de una de las cadenas de DNA. La DNA polimerasa empieza a crear la cadena complementaria en la dirección 5' a 3' por la adición de bases desde el extremo 3' del iniciador (Figura 1). En la replicación, este proceso de crear dos copias de DNA bicatenario se realiza mediante el apoyo de moléculas llamadas helicasas que desenrollan ambas cadenas, mientras que las topoisomerasas van desplazando el asa de replicación para permitir el alineamiento y la polimerización (Cann IKO, 1999).

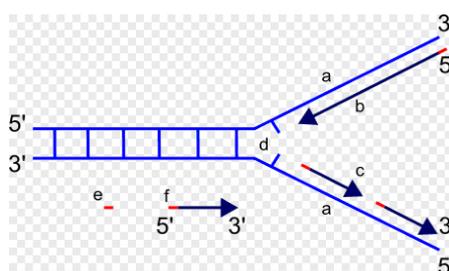


Figura 1. Replicación del DNA celular. La maquinaria de replicación consiste en: a= Cadenas blanco, b= cadena continua, c= cadena discontinua, d= asa de replicación, e= oligonucleótido, f= fragmento de Okasaki (figura tomada de Wikipedia, [http://en.wikipedia.org/wiki/Replication\\_fork](http://en.wikipedia.org/wiki/Replication_fork), el 12 de junio de 2008).

En el proceso de la PCR se emplean los siguientes reactivos: un par de iniciadores, nucleótidos, magnesio, amortiguador a pH de 7.3, y la TaqDNA polimerasa

---

---

(enzima que tiene la característica de polimerizar a 72°C). Este proceso es a través del uso de diferentes temperaturas, y consiste de tres etapas (Henry's, 2007):

A) Desnaturalización (94°C, 10-60 seg)

Consiste en separar la doble cadena de DNA y esta se realiza a una temperatura que asegure que el 100% de las moléculas de ácidos nucleicos estén separados una de la otra (Henry's, 2007).

B) Alineamiento (55°C a 68°C, 10-60 seg)

Es la temperatura que permite que el iniciador se mantenga alineado a su secuencia complementaria (Henry's, 2007). La secuencia del iniciador es muy importante porque es la molécula que nos permite detectar un gen o secuencia de interés, por lo tanto es la que da la especificidad de la prueba. El número de bases del iniciador puede ser variable, pero se recomienda que no sea menor de 20 bases, ya que la probabilidad de encontrar otra secuencia igual en cualquier genoma es mayor si el número de bases disminuye (Ej. Sí el número de bases es 4: ACGT, es muy probable encontrar esta secuencia en todo el genoma, y por lo tanto no es específico). La temperatura de alineamiento se calcula en base a la secuencia de cada uno de los iniciadores y se fundamenta en la cantidad de energía calorífica que se requiere para romper los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases (Figura 2):

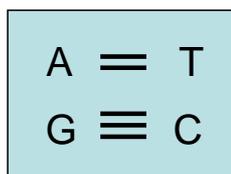


Figura 2. Enlaces de puentes de hidrógeno entre las bases.

De lo anterior se utiliza la siguiente fórmula:  $T_m = 81.5 + 16.6 \times (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 \times (\%G+C) - 675/n$ , donde  $[\text{Na}^+]$  es la concentración molar de la sal empleada en el amortiguador y  $[\text{K}^+] = [\text{Na}^+]$ , siendo  $n$  = numero de bases del iniciador y  $\%G+C$  el porcentaje de estas bases presente en el mismo. La temperatura de alineación ( $T_m$ ) estará dado en grados centígrados y el valor entre ambos iniciadores no deberá ser muy diferente entre ellos. Al valor calculado, se le debe de bajar no más de 5°C con la finalidad de evitar disminuir la especificidad de los iniciadores al alinearse a secuencias que no sean 100% complementarias y viceversa no debe aumentarse la temperatura de la  $T_m$  calculada para no perderla (Promega Corporation, 1996 ).

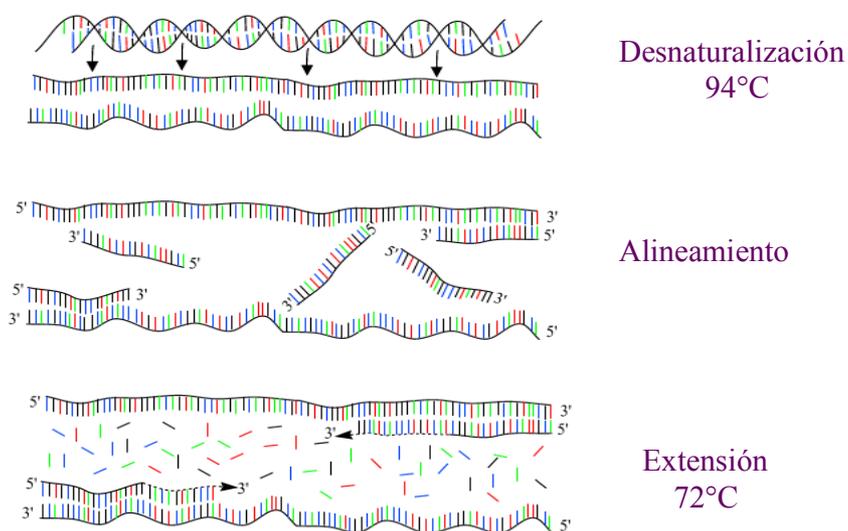
### C) Polimerización (72°C, 10-60 seg)

Es la temperatura en la que la TaqDNA polimerasa tiene la mayor actividad para adicionar los nucleótidos en la dirección 5' a 3' a partir del extremo 3' del iniciador y crear de esta manera la cadena complementaria a la del DNA blanco (Henry's, 2007). La TaqDNA polimerasa inicialmente fue obtenida de la bacteria acuática *Thermus aquaticus* que vive a temperaturas altas en el océano, en la actualidad, esta enzima se obtiene por ingeniería genética.

La realización de estas tres etapas en el orden mencionado se le conoce como un ciclo, y de éste se obtiene dos copias de la doble cadena de DNA que contiene en una de las cadenas complementarias la secuencia que flanquea a cada uno de los iniciadores a partir de su extremo 3'. Normalmente este ciclo se repite cuando menos 30 veces para obtener de una sola copia de DNA una amplificación

exponencial de la secuencia de interés de millones de veces ( $2^n$ , donde  $n$ = número de ciclos) donde el tamaño del amplicón es donde inicia cada uno de los iniciadores en su extremo 5' (Figura 3). Este proceso de cambios de temperaturas en un tiempo programado se realiza en un termociclador.

A)



B)

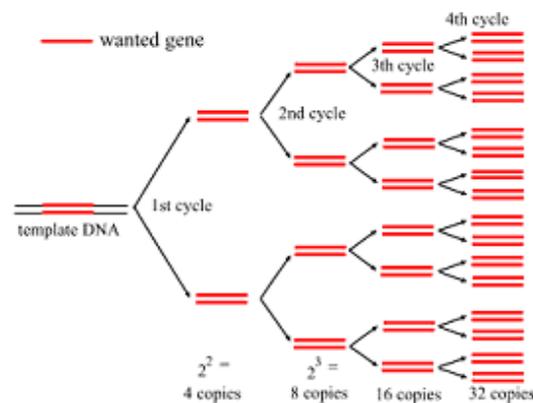


Figura 3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). A) Etapas del proceso de la PCR; B) Amplificación exponencial obtenida a través de los ciclos del proceso de la PCR. Figuras obtenidos por Gallegos Jazbet, 2007.

La detección del fragmento amplificado (amplicón) es mediante un instrumento o visualmente por corrimiento electroforético en un gel de agarosa con bromuro de etidio y expuesto posteriormente a luz ultravioleta (U.V.), ver figura 4 y 5. Los fragmentos pequeños migran más rápido que los grandes, por lo tanto, estos se encontrarán en la parte inferior del gel (Figura 4).

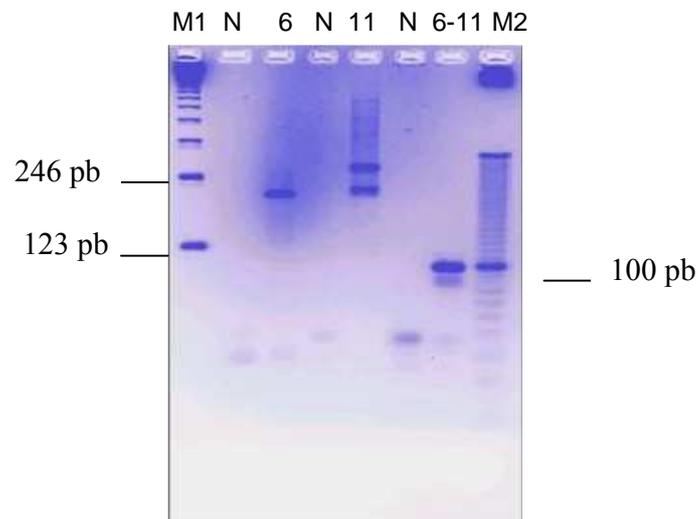


Figura 4. Genotipo del Virus de Papilomavirus Humano. Los amplicones (bandas) se observan mediante luz U.V. en un transiluminador por corrimiento electroforético de un gel de agarosa con bromuro de etidio. M1 = Marcador de peso ladder de 123 pb; M2 = Marcador de peso ladder de 100 pb. El DNA tiene carga negativa por lo que migra hacia el polo positivo (anodo). N = Control negativo; 6 = Amplicón de VPH tipo 6; 11 = Amplicón de VPH tipo 11; 6-11 = Amplicón de VPH 6 y 11. Figura obtenida del Dpto. de Biología Molecular, Carpermor.

A)

B)



C)



Figura 5. Equipos e instrumentos para la PCR. A) Cámara de electroforesis con gel de agarosa; B) Transiluminador de luz U.V.; C) Termociclador. Fotografías obtenidas del Dpto. de Biología Molecular, Carpermor.

El proceso de la RT PCR se emplea para amplificar RNA y consiste en crear cDNA mediante la transcriptasa reversa (RT), posteriormente se realiza el PCR convencional con la TaqDNApolimerasa. Sin embargo, actualmente existe una enzima que tiene ambas funciones, la que actúa como RT y DNA polimerasa lo que permite realizar el proceso en un solo paso. La RT es una enzima que se encuentra en forma natural en los retrovirus.

### 1.3 La PCR anidada

Esta metodología consiste en reamplificar una secuencia de DNA, esto es, que una vez que se amplifica una secuencia de interés por la PCR se vuelve a amplificar por segunda ocasión (, 2006). La finalidad de reamplificar es para aumentar la sensibilidad de la PCR principalmente sí el número de secuencias de interés presentes en una muestra es muy bajo. La segunda amplificación no se realiza con los mismos oligonucleótidos empleados para la primera PCR si no que se utilizan otros diferentes que se alinean dentro de la secuencia del amplicón obtenido en la primera PCR, por lo tanto, el fragmento obtenido en la segunda PCR será de menor tamaño. La ventaja es que se obtiene una mayor cantidad del amplicón al tener una cantidad suficiente de DNA blanco (primer amplicón), ver figura 6.

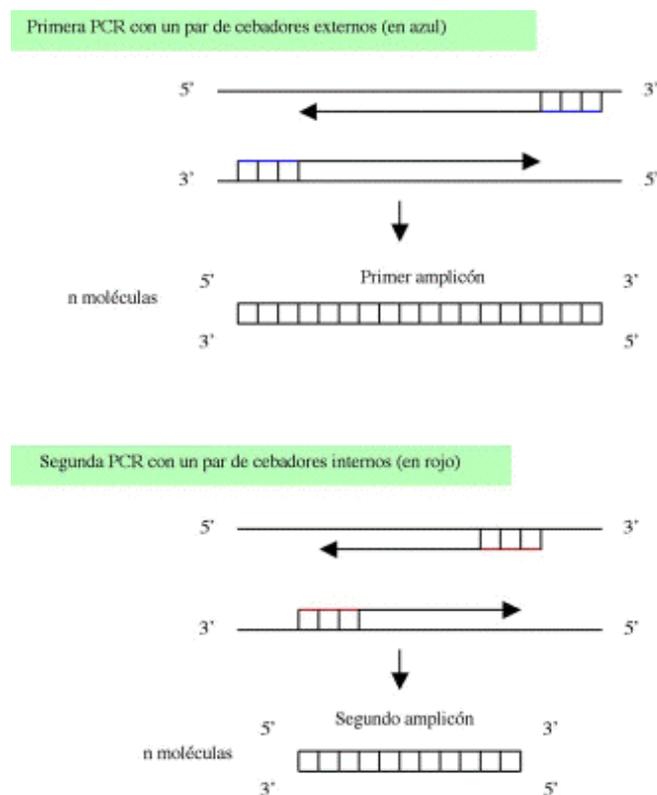


Figura 6. PCR anidado. En la segunda amplificación se usan oligonucleótidos o cebadores que

se alinean a la parte interna del primer amplicón.

## 1.4 La PCR en tiempo real

Esta metodología permite observar gráficamente en el momento que esta ocurriendo la amplificación exponencial de la PCR (Figura 7). Esto es posible por la medición de la fluorescencia que se forma en proporción directa con la formación de amplicones durante el proceso de la PCR

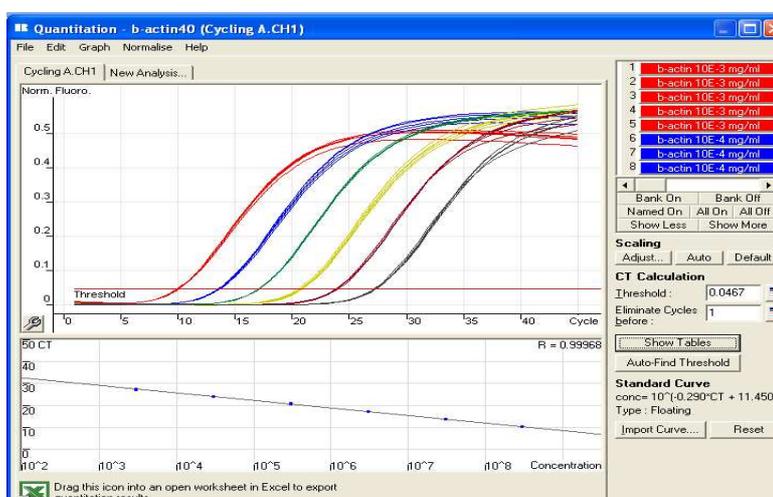


Figura 7. Gráfica de la amplificación de la PCR en tiempo real. Se muestra la curva de calibración y la correlación lineal de la amplificación mediante el uso de una muestra con ácidos nucleicos de cantidad conocida y sus respectivas diluciones 1:10 (gráfico obtenido del Manual Corbett Research, 2002).

Existen diferentes técnicas que se usan para obtener una señal fluorescente durante la amplificación, la más frecuente es el uso de sondas marcadas con

fluorescencia, estas pueden ser dobles o simples, o bien, uno del par de oligonucleótidos marcado con fluorescencia (Dorak MT, 2006 ). Estos últimos, forman una estructura secundaria que impide se genere la señal fluorescente y únicamente se presentará cuando inicie la etapa de alineamiento y polimerización en la PCR. Existen diferentes tipos de sondas (Tabla 2 ), siendo la más frecuente la TaqMan (Figura 8 ).

Tabla 2. Sondas y fluoró cromos empleados para la realización de la PCR en tiempo real.

SONDAS		MARCADORES FLUORESCENTES	
Sybr Green		Fam	
TaqMan		Joe	
Molecular Beacons		Sybr Green	
Escorpión		Vic	
Amplifluor		Rojo Texas	
LUX		Cy5	
Eclipse MGB		Rox	
Light-Up			
Hibridación			
FRET			

La lectura se realiza en el valor Ct que representa la fracción de ciclo donde el instrumento puede confiablemente detectar fluorescencia derivada de la reacción de amplificación y corresponde al umbral (threshold) de la medición representado por una línea que cruza con el gráfico exponencial de cada una de las muestras y del cual debajo de está corresponde a la señal de fondo (ver figura 7). Mediante el uso de la amplificación de un calibrador con número de copias de alrededor de  $10^7$  y sus diluciones 1:10 hasta tener un número de copias de  $10^1$  permite tener una curva de calibración, siempre y cuando, la correlación sea mayor a 0.95 (Dorak TM, 2006). De esta manera es posible medir la carga de algún microorganismo o gen presente en una muestra. Es importante que en la correlación se tenga una pendiente de -3.6 a 3.1, ya que esto asegura que la eficiencia de amplificación sea del 90-110%, y por lo tanto, el resultado obtenido sea correcto, esto esta en función a la siguiente fórmula:  $Eff=10^{(-1/m)} -1$ , donde Eff es igual a la eficiencia y la m corresponde al valor de la pendiente.

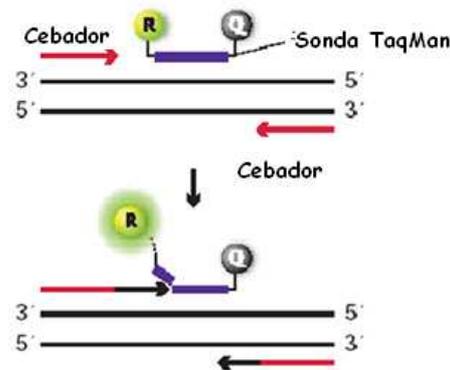


Figura 8. PCR usando la sonda TaqMan. Durante la amplificación la sonda TaqMan se degrada en la etapa de polimerización liberando el inhibidor de la fluorescencia (Quencher - Q -) del marcador fluorescente. La fluorescencia por lo tanto es proporcional al amplicón formado. Esquema obtenido de Invitrogen, Inc.

En las cuantificaciones de cualquier ácido nucleico de interés es necesario asegurarse que los valores obtenidos son reales y no se deben a diferencias en la cantidad de DNA/RNA por variaciones en el proceso, por ejemplo, en la eficiencia de extracción de ácido nucleico, a la presencia de inhibidores de la PCR o a degradación del mismo, por este motivo se utiliza un control interno, que consiste en un gen o secuencia de DNA o RNA diferente al que se requiere analizar y que se amplifica a partir de la extracción obtenida de la misma muestra al que se le realiza el análisis del gen de interés, y que puede estar marcado su sonda con otro fluoróforo diferente para su amplificación. El control interno debe estar presente constitutivamente en la muestra, o bien, puede añadirse en la misma, antes de realizar el proceso de extracción. Todas las muestras a analizar, en caso de añadirse el control interno deben de procesarse en un mismo volumen y con la misma cantidad del control.

## 1.5 Captura de Híbridos (CH)

Este método consiste en la amplificación por señal y es una mezcla de estrategias experimentales inmunológicas y moleculares. Se realiza en cuatro etapas (Figura 9):

A) Desnaturalización.

Se extrae el DNA de una muestra biológica lisando las células y separando la doble cadena de DNA mediante una solución de hidróxido de sodio y calor a 65°C, manteniendo separada ambas cadenas de ácidos nucleicos.

B) Hibridación.

Una parte de la mezcla anterior se le añade una sonda o grupo de sondas de RNA (Fragmentos de una secuencia de RNA) que reconocen una ó varias secuencias de DNA de interés. De esta manera sí hay complementariedad de bases entre la sonda(s) y el DNA desnaturalizado de la muestra biológica se formará un híbrido de DNA:RNA.

C) Captura de híbridos.

La mezcla que se obtiene de la hibridación se coloca en un micropozo cubierto con anticuerpos que reconocen a híbridos de DNA:RNA. Posterior a esto se realiza un lavado al micropozo eliminando el sobrenadante que contiene moléculas que no tuvieron la reacción con los anticuerpos.

D) Detección.

Al micropozo que puede contener los híbridos de DNA:RNA se le añaden anticuerpos que contienen en su extremo moléculas de dioxetano y mediante una

reacción quimioluminiscente con fosfatasa alcalina desprende luz que se detecta en un luminómetro. Dependiendo de las unidades relativas de luz (URL) que emite la reacción de una muestra determinada siguiendo las etapas mencionadas y comparado con un calibrador negativo y positivo se determina el valor de corte a uno y si la muestra es positiva se tendrá valores igual o arriba de uno y si es negativa sus valores serán  $<1$  (Digene Corporation, 2005).

A)

B)



Figura 9. Captura de Híbridos (CH). Pasos del proceso de la CH donde se muestra una mezcla de técnicas moleculares y de tipo inmunológico. Esta metodología es por amplificación de señales. Figuras obtenidas de Gallegos Jazbet, 2007.

## 1.6 DNA ramificado (bDNA)

Este método es por amplificación de señal y consiste en un ensayo de hibridación en sándwich incorporando múltiples grupos de sondas sintéticas (oligonucleótidos) realizado en una fase sólida (Nolte FS, 1998). La clave de esta tecnología es la sonda preamplificadora, una molécula de DNA con 14 ramificaciones idénticas, cada una de las cuales une 14 moléculas amplificadoras. Esta metodología se realiza en las siguientes etapas (Henry's, 2007) :

### A) Sonda de captura

La extracción de DNA/RNA de una muestra biológica en mezcla con **sondas de captura** se coloca en un micropozo que contiene **sondas de captura en fase sólida**. Estas **sondas de captura** reconocen una parte de la secuencia de DNA/RNA blanco y las **sondas de captura en fase sólida** reconocen a las otras sondas. Se realizan lavados para eliminar las moléculas que no se unieron a la fase sólida quitando el sobrenadante.

### B) Sondas blanco

Se añade **sondas blanco** que reconocen una parte de la secuencia de DNA/RNA blanco y el otro extremo de estas sondas reconoce a la secuencia de las sondas denominadas **preamplificadores**. Se realizan lavados y se quita el sobrenadante.

### C) Preamplificadores

Se añade sondas **preamplificadoras** que reconocen a la secuencia de las **sondas blanco**, pero que en su otro extremo tienen 14 secuencias repetidas.

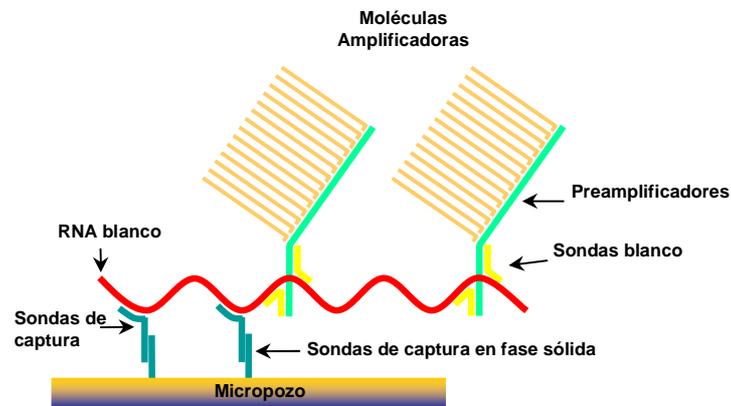
D) Moléculas amplificadoras

Se añade las **moléculas amplificadoras** que reconocen a la secuencia repetida de los **preamplificadores**. Estas moléculas amplificadoras están marcadas con moléculas de dioxetano.

E) Detección

Se realiza una reacción con la adición de fosfatasa alcalina mediante hidrólisis de las moléculas de dioxetano la cual desprenden luz, que es proporcional a la concentración inicial del blanco (figura 10).

A)



B)

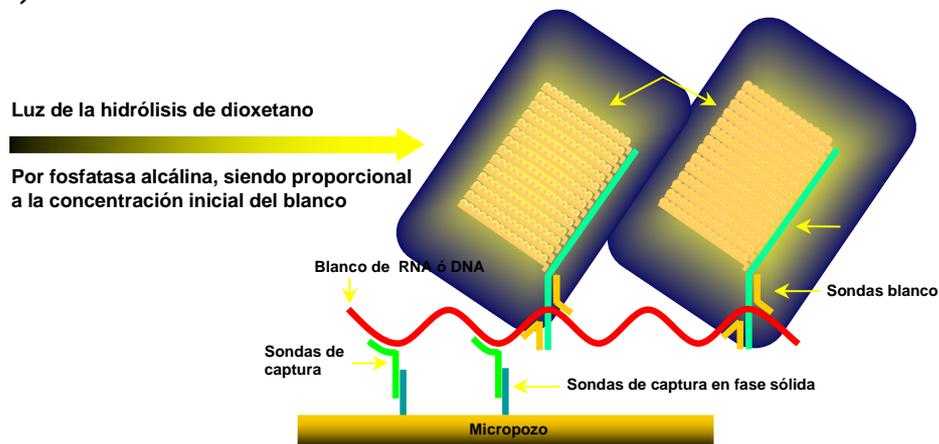


Figura 10. DNA ramificado (bDNA). A) Se muestra el sitio de los distintos elementos del proceso de este tipo de ensayo. En el texto se describe el orden de adición de cada uno de ellos. B) Se muestra la amplificación de señal luminiscente ocasionado por la reacción química con el dioxetano de una sola copia de DNA/RNA blanco.

Nota: Cada grupo de sondas reconoce a secuencias diferentes del mismo gen de interés.

De esta manera de una sola secuencia de RNA blanco de HIV se obtiene la siguiente amplificación de señal:

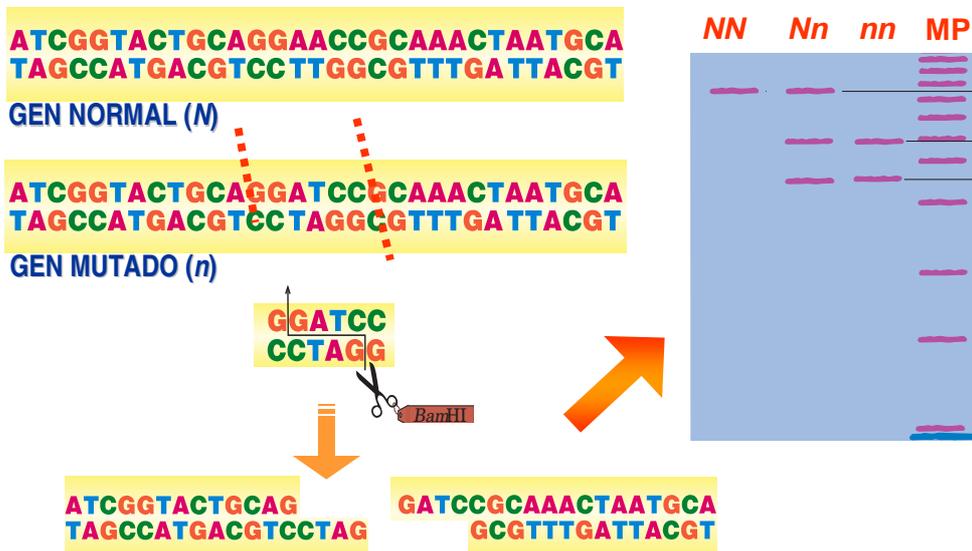
59 preamplificadores X 14 sitios repetidos X 14 sitios amplificadores = 11,564 sondas marcadas con dioxetano = 11,564 URL en una sola secuencia de RNA del HIV, siendo detectado en un luminómetro.

## 1.7 Fragmentos polimórficos de restricción (RFLPs).

Esta metodología consiste en la identificación de diferentes polimorfismos o alelos cuya diferencia consiste únicamente en la variación de una o más bases de una secuencia de DNA y que puede ser distinguible por la presencia o ausencia de corte con una enzima de restricción (Coleman W, 1997 ). Para este proceso se requiere de la amplificación de secuencia por la PCR y posteriormente cortar el amplicón con una enzima de restricción, finalmente los distintos fragmentos

restringidos por la enzima se separan de acuerdo a su tamaño por electroforesis en un gel de agarosa y se visualizan por el uso del transiluminador de luz U.V. (Figura 11 ).

A)



B)

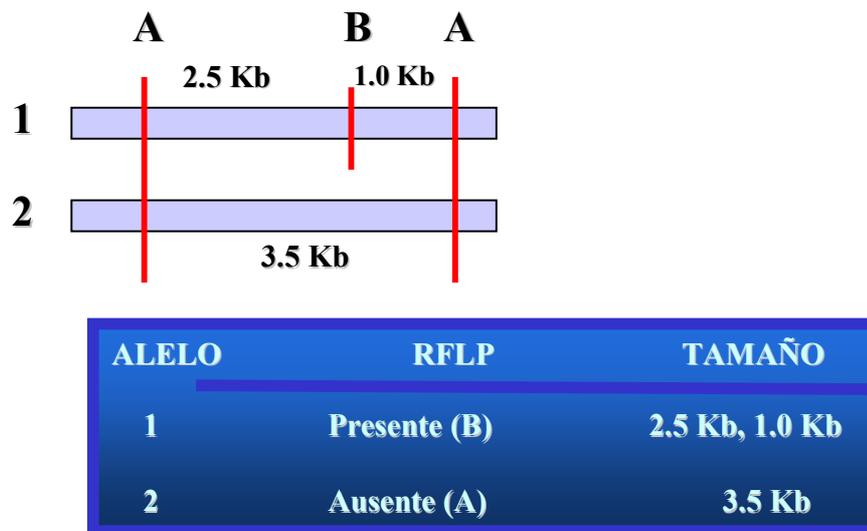


Figura 11. Fragmentos Polimórficos de Restricción. A) Esquema gráfico del proceso del método RFLP. B) Determinación de alelos a través de los fragmentos esperados de acuerdo al corte con la enzima de restricción.

## 1.8 Southern blot, northern blot y western blot.

Las metodologías más utilizadas en la Biología Molecular son el Southern blot, Northern blot y el Western blot. El Southern blot lleva el nombre del científico Edwin Southern que fue el que la inventó y consiste en restringir cualquier genoma mediante una enzima de restricción; posteriormente esta mezcla de fragmentos de DNA de diferentes tamaños se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa, el cual permite separarlos de acuerdo a su tamaño. Una vez realizado el corrimiento, se separa la doble cadena de DNA de los fragmentos en el gel con una solución de hidróxido de sodio, y se realiza la transferencia a una membrana de nylon o nitrocelulosa por capilaridad, finalmente la membrana con el DNA transferido se fija con luz ultravioleta o con calor a 65°C y la detección de la secuencia de interés se realiza mediante el uso de una sonda marcada radioactivamente o con dioxetano que permite su visualización por exposición en una placa autorradiográfica (Coleman W, 1997; Killeen A, 2001 ), ver Figura 12. O

bien, una sonda marcada con biotina que mediante una reacción con avidina y fosfatasa de rábano nos da un color azul en la membrana.

En el Northern blot el proceso es semejante, pero los fragmentos separados corresponden a RNA, en este caso lo que se requiere evitar es que la misma molécula forme hibridaciones por complementariedad de bases entre sí misma (horquillas) o entre otras moléculas de RNA, estas estructuras se evitan empleando formaldehído.

A)

B)

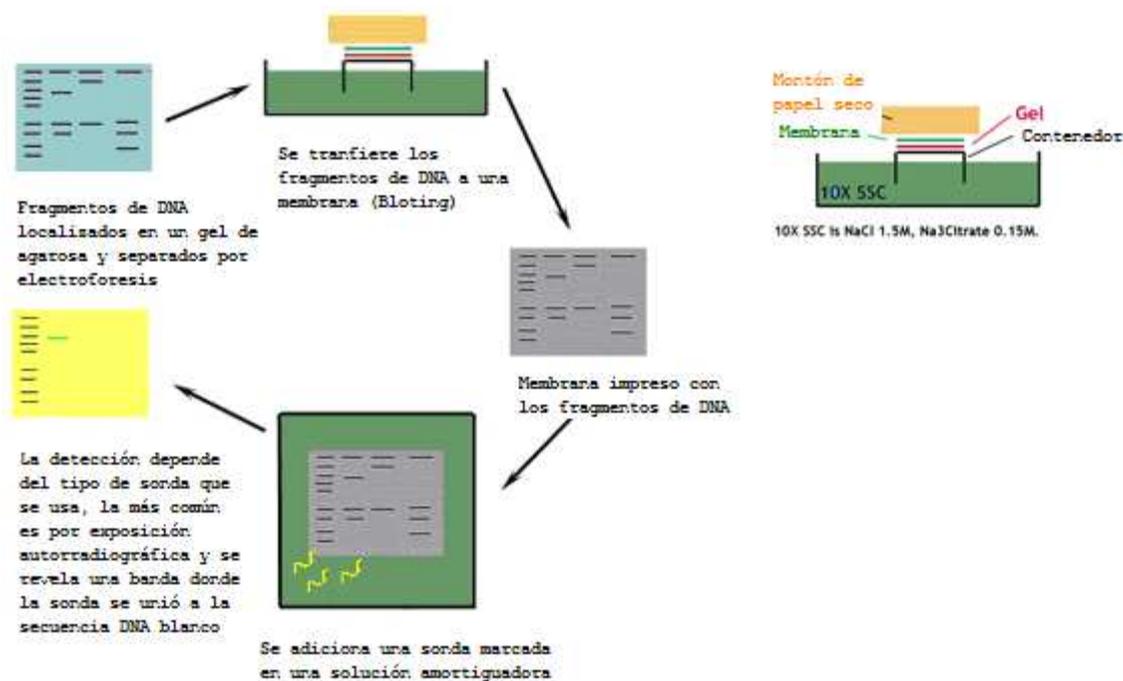


Figura 12. Método de Southern blot. A) Se describe los distintos pasos del proceso; B) Se muestra el orden y los elementos involucrados en la transferencia del DNA a la membrana denominado en inglés "Blotting".

En el caso del Western blot el corrimiento es de proteínas o péptidos y se realiza en un gel desnaturizante de acrilamida y una vez realizada la electrotransferencia a una membrana, la detección se realiza mediante anticuerpos específicos (Hernández Carolina, 2005), ver Figura 13.

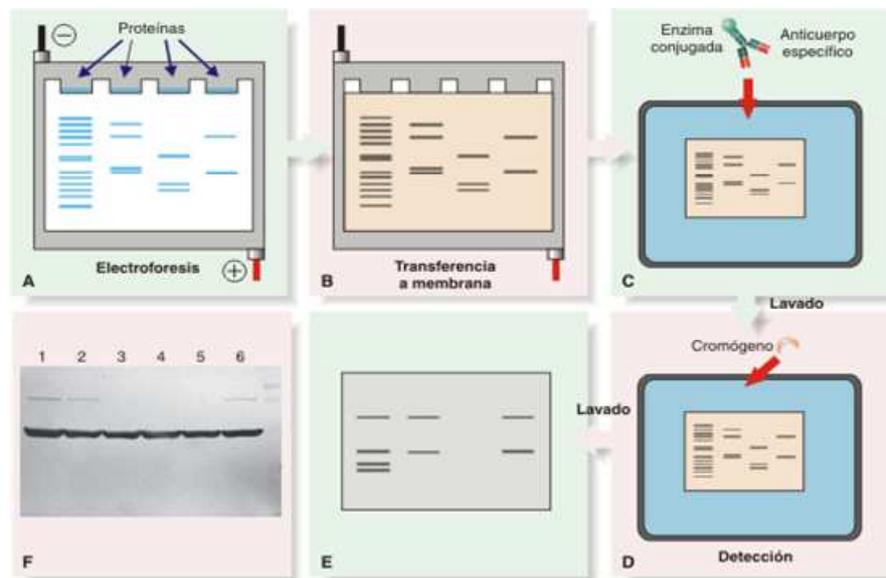


Figura 13. Western blot. Se describe los distintos pasos del proceso que difiere de los anteriores por ser de proteínas o péptidos y que se usa gel de poliacrilamida y en vez de sondas, anticuerpos marcados (radioactividad, quimioluminiscencia, colorimetría). Figura obtenida de Hernández Carolina, 2005.

## 1.9 DNA recombinante.

En este tipo de metodologías se requiere de cuando menos 20  $\mu\text{g}$  de DNA/RNA para realizar el análisis. Otra forma en la que se obtiene una cantidad adecuada para realizar este tipo de estudios es mediante el empleo de plásmidos, esto es, de secuencias de DNA circular que contiene: genes que confieren resistencia a antibióticos, secuencias promotoras e iniciadoras de la transcripción, secuencias para corte con una enzima de restricción para la inserción de fragmentos de DNA de interés que puedan usar la región promotora y secuencias que permitan su replicación. Estos plásmidos se integran a bacterias con la finalidad de que puedan usar el sistema biológico de éstas para su replicación. La selección de las colonias

con el plásmido se realiza mediante el uso de antibióticos , de los cuales las bacterias originalmente son sensibles, pero que aquellas que contienen el plásmido son resistentes.

Estas metodologías son laboriosas y requieren más tiempo comparadas con las de la PCR, CH, bDNA. Sin embargo, en aquellos casos en que aún no se conoce el gen involucrado en alguna patología estas metodologías son útiles para el descubrimiento y análisis de estos genes.

**TEMA 2:**

**LOS MÉTODOS MOLECULARES EN  
EL LABORATORIO CLÍNICO**

## 2.1 Desarrollo de las metodologías moleculares.

Previo al descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick, el científico Linus Pauling y cols. en 1949 descubrieron que un solo cambio de aminoácido en la cadena beta de la globina es la causante de la anemia falciforme, introduciendo el termino de enfermedad molecular y el concepto de una mutación una enfermedad lo que dio lugar al inicio de la investigación y diagnóstico de las enfermedades hereditarias. Todos estos conocimientos científicos han contribuido también al desarrollo de metodologías moleculares para la investigación y por ende al diagnóstico. Mediante el conocimiento de la complementariedad de las bases, se desarrolló la técnica de hibridación de ácido nucleico en 1961 por sondas marcadas radioactivamente (Hall BD, 1961) que pretendía investigar si había expresión del bacteriofago T2 inmediatamente a la infección de la bacteria *E. coli*, este análisis se realizaba en medio líquido, posteriormente, se realizó en medio sólido como la agarosa (Bolton ET, 1962) y después la membrana de nitrocelulosa (Gillespie D, 1965). Su detección fue mediante autorradiografía. Las aplicaciones de esta técnica estuvo limitado a la detección de una gran cantidad de blanco de ácido nucleico, siendo la obtención de una cantidad suficiente de sonda muy laboriosa. A su vez, también se aplicó esta técnica en células y tejidos denominándosele hibridación *in situ* y en forma semejante se realizaba por detección autorradiográfica y se requería de una gran cantidad de ácidos nucleicos (Gall JG, 1969). Un avance al respecto en hibridación *in situ* fue el uso de técnicas no radioactivas en el que se utilizaban anticuerpos para reconocer híbridos de RNA-DNA marcados con avidina y mediante una reacción con biotina y peroxidasa se desarrollaba color, permitiendo su observación directa al microscopio (Broker TR, 1978). Uno de los descubrimientos importantes para el

desarrollo de estas metodologías fue el de las enzimas de restricción en 1970, proteínas que están contenidas principalmente en las bacterias y cuya función es la degradación de secuencias de DNA extrañas a su genoma. A su vez, el descubrimiento de los plásmidos en las bacterias siendo una de sus características que confieren resistencia a los antibióticos, sirvió de base para la clonación de genes. La clonación molecular se puede dividir en varios pasos (Cohen SN, 1973). En primer lugar, debe aislarse el DNA de interés. Si se trata de DNA genómico debe digerirse previamente con enzimas de restricción para obtener una mezcla de fragmentos de tamaño adecuado para la clonación. El segundo paso consiste en unir los fragmentos de DNA a un vector de clonación con la enzima DNA ligasa. Los vectores de clonación que se utilizan son plásmidos o bacteriófagos (virus capaces de infectar bacterias). Los cósmidos son otros vectores de clonación contruidos artificialmente que presentan características de ambos. Posteriormente, estas construcciones de DNA deben introducirse y mantenerse en una bacteria. Una vez realizados todos estos pasos se obtiene una batería de bacterias que contiene todos los genes presentes en un organismo. Cuando se parte de DNA genómico digerido o fragmentado con enzimas de restricción, cada bacteria contiene un fragmento del genoma original. Esta batería de bacterias recibe el nombre de genoteca genómica.

Antes de proceder al estudio de los genes es necesario identificar las bacterias que contienen el gen o genes de interés. En primer lugar, deben identificarse aquellas bacterias que han recibido los vectores de clonación de aquellas que no recibieron las construcciones. Cuando el vector de clonación es un plásmido, normalmente se utiliza un marcador del vector (generalmente la resistencia a un antibiótico), de tal manera que sólo las bacterias que contengan el plásmido podrán crecer en el medio que contenga dicho antibiótico. En el caso, contrario, las células que contengan un fago, basta con buscar la presencia de placas de lisis. En segundo

lugar, deben identificarse las bacterias que presenten los genes de interés para separarlas del resto. Para ello, se recurre a diversas estrategias que van desde la hibridación con sondas de ácidos nucleicos (tanto en genotecas genómicas como en genotecas de expresión), hasta el empleo de técnicas de inmunodetección para genotecas de expresión, que permiten detectar la proteína producida por el gen deseado mediante anticuerpos específicos. Entonces, se toma esta bacteria y se hace crecer para producir un clon de bacterias idénticas. Como el vector que contiene el DNA insertado se replica siempre que la célula bacteriana se divide, se produce la cantidad suficiente de DNA insertado clonado necesaria para caracterizar el gen.

Mediante el uso de la hibridación de secuencias complementarias de ácidos nucleicos y las enzimas de restricción en los genomas en estudio, se desarrollaron los métodos como el southern blot para el análisis del DNA (Southern EM, 1975), northern blot para RNA, básicamente expresión (Alwine JC, 1979) y western blot para proteínas (presencia y expresión), lo que permitió la investigación genética para el entendimiento de los diversos fenómenos biológicos o su asociación con una patología específica, ya sea de tipo hereditario o infeccioso mediante el análisis monogénico. La secuenciación desarrollada en 1977 (Sanger F, 1977), fue la otra parte metodológica importante para estudiar los genes que codifican proteínas y que tienen un interés especial, o aquellos cuya inactivación, consecuencia de una mutación, origina una enfermedad específica. Por ejemplo, se puede determinar su secuencia y la naturaleza de la mutación que da lugar a una enfermedad. De esta manera se conoce la secuencia de una gran variedad de genes que traducen a proteínas con una infinidad de funciones en la organización de la vida (desde virus hasta el ser vivo más complejo). Una vez conocida la mutación causante de una enfermedad o la secuencia de un microorganismo, no fue necesario realizar el proceso completo del Southern blot/Northern blot, en su lugar se realiza un dot

blot, que consiste en fijar el DNA/RNA a una membrana de nylon o nitrocelulosa mediante vacío a través de un pozo y posteriormente realizar la hibridación con una sonda que contenga la mutación a buscar o la secuencia del microorganismo a detectar marcado con biotina, de esta manera si esta presente en el genoma en

estudio entonces se observará una banda en la membrana de color azul. Las ventajas de las metodologías moleculares se puede observar en dos distintas perspectivas:

Estudios de tipo infeccioso y de tipo hereditario.

Para los análisis de tipo infeccioso, las ventajas son que no se requiere la viabilidad de los microorganismos en estudio, por lo tanto, no es necesario el cultivo de estos, lo que conlleva a un menor tiempo de análisis, y otro hecho importante es la cantidad de microorganismo requerido para el análisis, por ejemplo, para una detección bacteriana mediante microscopia se requiere de cuando menos 1,000 bacterias por laminilla, en un cultivo 100 bacilos y por métodos moleculares de 30 bacilos. Sin embargo, las desventajas de este tipo de metodologías era el uso de radioactividad en el marcaje de la sonda, que ahora se ha substituido por otro tipo de marca no radioactiva (frías) con detección por color o luz (observación en placas autorradiográficas); actualmente la contaminación por manejo inadecuado, es otra desventaja importante. Con respecto a la herencia, no existen otros métodos diferentes a las técnicas de biología molecular que permitan el análisis genético, por lo tanto, su aplicación en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades hereditarias es del 98%. Siguiendo el desarrollo de las metodologías moleculares, en 1985 surgió el método de la PCR que permite el análisis de un gen de interés a partir de una sola copia de DNA, lo que implica una mayor sensibilidad con respecto a las metodologías anteriormente mencionadas, la cual requieren de

cuando menos 20 µg de DNA/RNA. Por esta característica y considerando que es menos laboriosa, ha sido el método principal de uso en el diagnóstico clínico. A partir de la invención de la PCR, está empezando a ser utilizada en la detección de secuencias de DNA de diferentes microorganismos y en diversos tipos de muestras biológicas para estudios a nivel de investigación y de aplicación diagnóstica. La

PCR fue posible debido a los descubrimientos de la síntesis de oligonucleótidos y al aislamiento de las DNA polimerasas, entre ellas la TaqDNA polimerasa que permite la polimerización a temperaturas de 72°C. Posteriormente, se realizaría la síntesis de esta enzima por clonación molecular. Mediante el análisis de una genoteca genómica humana mediante los métodos mencionados fue posible identificar más de 950 genes y sus mutaciones causantes de una enfermedad hereditaria de tipo monogénico (CDC, 2006; Jimenez-Sanchez G, 2001). Con respecto a la hibridación *in situ*, se desarrollaron métodos para la modificación química de nucleótidos y su identificación por moléculas fluorescentes, partículas de oro o moléculas enzimáticas, incrementando su sensibilidad (Bauman JG, 1980). La ventaja del uso de fluoró cromos es que permite analizar varios blancos de DNA mediante el uso de sondas marcadas con diferentes moléculas fluorescentes. Estas técnicas dieron origen a la hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), lo que ha permitido el diagnóstico de enfermedades hereditarias de tipo numérico o estructural y a nivel cromosómico, con un análisis mayor de metafases en un tiempo menor y sin necesidad de realizar cultivo celular como en los cariotipos. Ya desde entonces, se tenía la inquietud de descifrar el código genético del ser humano, por lo que Jeffrey descubrió que existen polimorfismos de número variable de repetidos en tándem de n bases que se heredan en forma mendeliana y que no ocasionan necesariamente alguna patología, denominándolos VNTRs. Sin embargo, además de los mencionados se han observado también otros tipos de polimorfismos en aproximadamente cada 1,000 pb del genoma humano y que

consisten de inserciones, deleciones o mutaciones puntuales de bases denominados SNPs (Hunt JL, 2008). Este último tipo de mutación es observable mediante secuenciación, por el uso de sondas específicas, o por enzimas de restricción que presenten corte o ausencia del mismo en la secuencia de DNA que presenta la mutación, a este tipo de metodología se le denomina RFLP. Y es posible observarlo en un gel mediante la obtención de cantidad de DNA suficiente por la

clonación genómica mencionada anteriormente o por la amplificación por la PCR (Bersch C, 2006), ver Tabla 3.

Tabla 3. Descubrimientos importantes para el desarrollo del diagnóstico molecular.

Diagnóstico Molecular			
1949	Caracterización de la anemia falciforme como una enfermedad molecular	1985	Invencción de la PCR
1953	Descubrimiento de la doble hélice del DNA	1986	Desarrollo de la hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)
1958	Aislamiento de las DNA polimerasas	1988	Descubrimiento de la DNA polimerasa termoestable: Optimización de la PCR
1960	Primeras técnicas de hibridación	1992	Concepto de la PCR en tiempo real
1969	Hibridación <i>in situ</i>	1993	Descubrimiento de las estructuras específicas de las endonucleasas para ensayos de corte
1970	Descubrimiento de las enzimas de restricción y transcriptasa reversa	1996	Primer aplicación del DNA de microarreglos
1975	Southern blotting	2001	Primera versión en sucio de la secuencia del genoma humano
1977	Secuenciación del DNA	2001	Aplicación del perfil de proteínas en enfermedades humanas
1983	Primera síntesis de oligonucleótidos		
1985	Análisis de Fragmentos polimórficos de restricción (RFLP)		

Posterior al origen de la PCR por Mullis empezaron a surgir variaciones en esta metodología como fue la PCR: Multiplex, anidada y en tiempo real. La PCR y RT-PCR en tiempo real permite observar el aumento del amplicón en cada ciclo

gráficamente por el incremento de fluorescencia y esto es posible por el uso de una sonda marcada con un fluorocromo que durante el proceso de amplificación se une a una de las cadenas de DNA blanco y es degradada en la etapa de polimerización, liberando fluorescencia. Este método tiene como ventajas el aumento de la sensibilidad y especificidad por la amplificación y el uso de una sonda respectivamente y es más rápida al observarse en tiempo real la amplificación, sin necesidad de observar el amplicón en un gel de agarosa y permite la cuantificación

del ácido nucleico a analizar mediante el uso de una curva de calibración (Tyagi S, 1996; Bustin SA, 2005; Marras SA, 2006).

## 2.2 Ventajas del diagnóstico molecular en el laboratorio clínico

Los métodos moleculares permitieron un avance en el diagnóstico debido a sus ventajas con respecto a metodologías microbiológicas (Ediciones Roche, 2003):

Tabla 4. Ventajas de métodos moleculares.

<b>Problemas con métodos convencionales</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Ventajas de la PCR y métodos de amplificación similares</b>
Microorganismos difíciles o imposibles de cultivar	Virus de la Hepatitis C: Este virus fue descubierto con la ayuda de técnicas moleculares	Trabaja aún con patógenos que son imposibles de cultivar
Tiempo largo requerido	En el diagnóstico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> su identificación en cultivo es de 2-4 semanas	Los resultados se obtienen en un día
No confiable	Diagnóstico de <i>Chlamydia trachomatis</i>	Alta sensibilidad y especificidad
No confiable en las etapas tempranas de infección, cuando los anticuerpos no son todavía detectables	Detección de hepatitis C y VIH en donadores de sangre	Resultado muy rápido, porque no depende de la producción de anticuerpos, sino de la presencia de ARN viral

El diagnóstico molecular permite detectar microorganismos: a) que no son factibles cultivar como el caso de algunos tipos virales (Ej. el Virus del Papiloma Humano), o b) son muy susceptibles en su viabilidad, si no se tienen condiciones de manejo muy controlados como el caso de la *Chlamydia trachomatis* obteniéndose falsos negativos en el cultivo, o bien, c) requieren un tiempo largo de cultivo para su identificación como en *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que por la PCR en mucho menor tiempo es identificado por género y especie. Otro ejemplo, del último tipo mencionado es para la Hepatitis C y el Virus de la Inmunodeficiencia

Humana el que permite que se detecten en un tiempo de una semana después de la infección contra tres meses cuando los anticuerpos son detectables. Los únicos métodos que permiten cuantificar y tipificar virus son los de tipo molecular (PCR, bDNA y secuenciación). Las desventajas del diagnóstico molecular es que si no se realizan por personal entrenado se tiene el riesgo de contaminación, obteniéndose falsos positivos, otro aspecto a considerar es el costo de estas pruebas.

### **2.3 Kits comerciales para diagnóstico molecular**

Fue a partir de los años noventas cuando empezaron a aparecer en el mercado diferentes kits para la realización de pruebas con importancia clínica y de las cuales no podían llevarse a cabo por otros métodos por no ser fácil su cultivo y por requerir de medidas de seguridad mayores (tipo III) como la carga viral de HIV-1. Esta prueba la comercializó la empresa farmacéutica Roche que es la que tiene la patente para usar la PCR y fue la primera empresa que obtuvo su aprobación por la FDA (la Administración de Medicamentos y Alimentos, que es el organismo que aprueba su uso en los Estados Unidos). Posterior a la aparición de la Carga Viral de HIV surgieron otras pruebas como la detección del Virus de Papiloma Humano (HPV) por el método de CH y que permite determinar la presencia de HPV de alto

riesgo (causante del cáncer cervicouterino) y/o de bajo riesgo (causante de condilomas o verrugas genitales). Sin embargo, no puede determinar que tipo de HPV están presentes (6, 11, 16, 18, 45, etc.) en una muestra. Esta prueba de detección de HPV también tiene aprobación de la FDA, pero exclusivamente en exudados endocervicales y la casa comercial que lo maneja es Digene, ahora Qiagene.

Existen otras metodologías para realizar carga viral de HIV-1 y que tienen aprobación de la FDA como son:

- A) El bDNA, implementado por Bayer, ahora Siemens.
- B) PCR en tiempo real por Abbott

Posterior a la aplicación de la PCR en la carga viral de HIV surgió el kit para la carga viral de hepatitis C (HCV), y la detección de estos dos tipos de virus. Los diferentes kits comerciales para la carga viral de HIV (Tabla 5), varían en su linealidad es decir, en el rango de lectura confiable de los resultados, sin embargo, cualquiera de estas metodologías moleculares presentan una sensibilidad y especificidad mayor del 95% (página web Roche Diagnostics).

Tabla 5. Características de diferentes kits comerciales para la prueba de Carga viral de HIV.

KIT	PRUEBA	CASA COMERCIAL	MÉTODO	LINEALIDAD	AÑO
Amplicor HIV Monitor 1.5 (estándar)	Carga viral	Roche	PCR	400 a 750,000 copias/mL	1995
Amplicor HIV Monitor 1.5 (ultrasensible)	Carga viral	Roche	PCR	50 a 100,000 copias/mL	1995
Versant HIV RNA 3.0	Carga viral	Siemens (Bayer)	bDNA	50 a 500,000 copias/mL	1997
NucliSens HIV QT	Carga viral	BioMerieux	NASBA	176 a 3,470,000 copias/mL	1998
Cobas TaqMan HIV	Carga viral	Roche	PCR en tiempo real	40 a 40,000,000 copias/mL	2001
Abbott's HIV-1 Viral Load Test	Carga viral	Abbott	PCR en tiempo real	40 a 40,000,000 copias/mL	2006

En el caso del kit de cuantificación de HIV-1 de Roche, Cobas Amplicor, tiene dos presentaciones:

- a) Carga viral de HIV estándar y

## b) Carga viral de HIV ultrasensible

Su diferencia es la linealidad que presenta cada una de las presentaciones, que a pesar de ser el mismo kit, se obtiene por modificaciones en el proceso como son el volumen de la muestra y tiempo de centrifugación.

En los demás kits comerciales para HIV su linealidad es amplia por lo tanto no tienen dos presentaciones como la empresa farmacéutica Roche (Tabla 5).

Otros kits comerciales para otras pruebas surgieron como fue el caso para *Mycobacterium tuberculosis* (MyT), *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (CT y NG) , Hepatitis B (HBV), y Citomegalovirus (CMV) utilizando las mismas empresas y metodologías mencionadas (Tabla 6).

Tabla 6. Kits comerciales diferentes a la carga viral de HIV.

KIT	PRUEBA	CASA COMERCIAL	MÉTODO	LINEALIDAD	AÑO
Amplicor CT/NG Test	Detección	Roche	PCR	>50 copias/mL	1992
Amplicor HIV Test v2.0	Detección	Roche	PCR	>50 copias/mL	1992
Amplicor HCV Test v2.0	Detección	Roche	PCR	>50 UI/mL	1993
Amplicor HCV Test v2.0	Detección	Roche	PCR	>50 UI/mL	1993
Amplicor MTB Test	Detección	Roche	PCR	>50 copias/mL	1994
Amplicor HCV Monitor 1.5	Carga viral	Roche	PCR	500 a 600,000 UI/mL	1995
Amplicor HBV Monitor Test, v2.0	Carga viral	Roche	PCR	1,000 a 40,000,000 copias/mL	1996
HC HPV DNA Test	Detección	Digene	CH	>50,000 copias/mL	1997
Cobas Amplicor CMV Monitor Test	Carga viral	Roche	PCR	600 a 100,000 copias/mL	1997
Trugene HIV	Genotipo	Siemens (Bayer)	PCR y Secuenciación	> 1000 copias/mL	2003
Viroseq HIV	Genotipo	Abbott	PCR y Secuenciación	> 1000 copias/mL	2004
HCII HPV DNA Test	Detección	Digene	CH	>5,000 COPIAS/mL	2005

A partir del año 2000 aparecieron otras casas comerciales diferentes a las empresas farmacéuticas y que utilizan la metodología de la PCR; dentro de las pruebas que ofrecen además de las ya mencionadas, están el de la detección de: Herpes simple 1 y 2, Genotipo de Apolipoproteína E (APOE), Genotipo de HPV, Virus de Epstein Barr (EBV), parvovirus B19, Mutaciones de Fibrosis Quística (FQ), toxoplasma, etc. (pagina web de Sacace, Seegene, Amplibion), ver Tabla 7.

Tabla 7. Empresas no farmacéuticas que venden kits para diagnóstico de enfermedades infecciosas o hereditarias por la PCR.

CASA COMERCIAL	MÉTODO	AÑO DE INICIO
Sacace	gel, tiempo real	2001
Seegene	gel, electroferograma	2005
Amplibion	gel, tiempo real	2002

En la actualidad las pruebas diagnósticas moleculares tienden a la automatización como en el caso del instrumento Cobas Amplicor de Roche el cual es semiautomatizado y es para la realización de las cargas virales de HIV, HBV y HCV, así como la detección de estos virus, CMV, *Mycobacterium tuberculosis*,

*Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoea* (Pagina web de Roche Diagnostics). En esta metodología de Cobas Amplicor por la PCR, la extracción del RNA/DNA, así como la mezcla de reacción de la PCR es manual, mientras que la amplificación y la detección es automatizada. Ya una vez realizado la mezcla de la PCR, se colocan los microtubos de reacción en el termociclador del Cobas Amplicor, y una vez

finalizada la amplificación, un brazo mecánico lleva a cabo diluciones de estos amplicones en unas copillas que mediante el uso de sondas marcadas con biotina y una reacción colorimétrica con avidina y peróxido de rábano se determina la cantidad de ácido nucleico del microorganismo por lectura en un lector de densidad óptica incluido en el instrumento (Figura 14) .

A)

B)

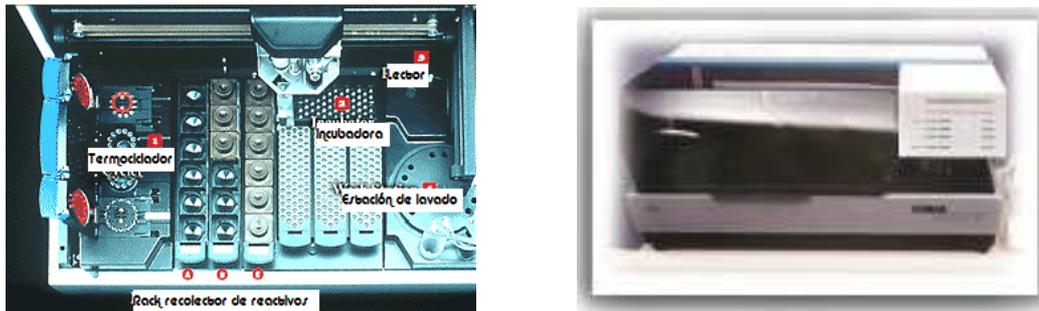


Figura 14. Cobas Amplicor. Instrumento automatizado de la empresa Roche utilizado para las cargas virales y de detección de HIV, HCV, HBV, CMV y la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*. A) Vista superior de la parte interna donde se muestra las diferentes partes del instrumento; B) Vista frontal del instrumento. Fotografías obtenidas el 27 de julio 2008 de la página web: <http://www.Roche.com/>

La información de la cuantificación por muestra se imprime en una impresora en forma exponencial (Ej. 2000 copias RNA HIV/mL plasma, se imprime como 2.00 E3 copias RNA HIV/mL). Existen equipos automatizados para la extracción de DNA y RNA a partir de una variedad de muestras como: Plasma, suero, sangre total y cultivos celulares. Estas están validadas, sin embargo, existen únicamente protocolos en investigación para otros tipos de muestras como orina, raspado

endocervical, raspado uretral, expectoración. Ejemplo de este tipo de equipos es el robot de Quiagen o el de Invitrogen (Pagina web de Qiagen e Invitrogen).

Estos equipos o instrumentos semiautomatizados, así como los de tipo manual también permiten ser interfaseados, esto es, que los resultados obtenidos por el instrumento puedan ser liberados en un sistema de computo por un servidor, de tal manera que cualquiera que disponga de este sistema y este autorizado pueda obtener el resultado de un paciente en cualquier computadora conectado al servidor. Actualmente los estudios de laboratorio por biología molecular están enfocados al análisis de una secuencia de ácido nucleico o gen de interés a fin de identificar la presencia o ausencia de un microorganismo, a la identificación de un genotipo o mutación con aplicación para enfermedades infecciosas y hereditarias. El encontrar un gen involucrado en una enfermedad hereditaria implica estudiar

familias de afectados con la enfermedad de interés y realizar análisis de ligamiento, esto es, utilizando marcadores polimórficos de diferentes cromosomas, hasta encontrar alguno que este significativamente asociado con la enfermedad. Después, se analizan más marcadores cercanos al que se encontró una asociación, hasta encontrar el gen responsable de la enfermedad y posteriormente su mutación. Todo este proceso obviamente involucra años de estudio. Sin embargo, el análisis de enfermedades hereditarias multifactoriales mediante estas metodologías, es un proceso tedioso y no siempre posible, principalmente porqué los marcadores genéticos están espaciados uno del otro y los estudios de asociación para localizarlos se vuelve difícil. A partir del desarrollo de los microarreglos en 1996 (Schena M, 1995), esto es, de una técnica semejante al dot blot, pero su detección es mediante fluorescencia con manejo de cantidades de ácidos nucleicos del orden de nanolitros y permite además la evaluación en forma simultánea de la expresión de miles de genes de un organismo.

Esta metodología y el desciframiento de la totalidad del código genético humano en el año del 2003 por Craig y Venter ha permitido estudiar en estos años enfermedades hereditarias crónicas multifactoriales donde grupos de variaciones génicas contribuyen colectivamente a la iniciación y evolución de la enfermedad (Kaput J, 2004) . Esta metodología fue adoptada por la comunidad científica para el estudio de un amplio rango de fenómenos biológicos. La mayoría de los estudios iniciales tuvieron un simple y poderoso diseño: La comparación de patrones de expresión de genes entre individuos normales con respecto a pacientes y de esta manera identificar la expresión diferencial. Estas tecnologías se han aplicado a la investigación en ciencia básica para entender la biología del cáncer y a varios estudios de correlación clínica para descubrir biomarcadores de detección temprana, respuesta al tratamiento y pronósticos para metástasis, recurrencia y

sobrevivencia (DeRisi J, 1996; Quackenbush, 2006; Esteller M, 2008). La aplicación ha sido también para el estudio de causas de asma (Rolph MS, 2006), enfermedades del corazón (Ohki R, 2005), enfermedades neuropsiquiátricos (Pierce A, 2004), infertilidad (Zhang X, 2005), metabolismo de fármacos y variabilidad en su respuesta (Wilkinson GR, 2005). Este tipo de respuestas puede estar influenciado por las características genéticas de una población determinada, por lo tanto, un mapa de haplotipos creará recursos adicionales para la identificación de genes asociados con enfermedades (Kaput J, 2004).

El entendimiento de los eventos moleculares y el desarrollo de biomarcadores confiables facilitarán el desarrollo de terapéuticas nuevas y la implementación de selección de pacientes para ensayos clínicos (Chung CH, 2007; Esteller M, 2008).

## **2.4 Características de un laboratorio de Biología Molecular**

Es importante que el Laboratorio este definido en tres áreas: Extracción de ácidos nucleicos, preparación de la PCR y área de amplificación. Se recomienda que el flujo sea unidireccional, empezando por la extracción, después la preparación de la

mezcla de PCR y finalmente la colocación de las muestras en los instrumentos para la amplificación, detección y análisis. Cuando menos las áreas de extracción de ácidos nucleicos y la de preparación deberán contar con luz U.V. que se prenderán durante la noche con la finalidad de degradar el DNA/RNA que haya en el ambiente. Es conveniente, que la extracción de ácidos nucleicos se realice en un gabinete de seguridad biológica tipo II que mantendrá estéril, libre de partículas el área de trabajo y evitará la contaminación entre la muestras, y el usuario (NCCLS: MM3-A2, 2006; Henry's, 2007; Hunt JL, 2008). En cada corrida analítica debe de usarse controles positivos, negativos y de extracción y estos deben añadirse en su respectivo tubo después de adicionar el DNA de las muestras en su tubo correspondiente. Es importante realizar alícuotas de las enzimas, oligonucleótidos,

agua, amortiguadores, con la finalidad de evitar contaminaciones y en el caso de que ocurran desecharlos sin desperdiciar el resto del material. Cada vez que se use un nuevo lote de reactivos debe validarse con muestras ya analizadas anteriormente. El personal debe de tener conocimientos en el tema de Biología Molecular y estar actualizado constantemente. Se recomienda evaluaciones periódicas de pipeteo, y el uso de guantes libres de polvo durante el proceso analítico y manejo de las muestras, así como usar bata y en el caso de manejo de cultivos y/o muestras contagiosas a nivel respiratorio, el uso de cubre bocas y el desecho deberá ser en bolsas específicas para material biológico infeccioso (NCCLS:M29-A2, 2001).

## **Descripción del Desempeño Profesional**

## I. Introducción

En nuestro país existen pocos laboratorios gubernamentales y privados que utilizan la Biología Molecular como una herramienta para su uso en la clínica mediante el diagnóstico de microorganismos infecciosos y de enfermedades hereditarias. Uno de estos Laboratorios es Carpermor, S.A. de C.V., Laboratorio de Referencia Internacional que se dedica al apoyo del diagnóstico médico a través del uso de pruebas de diferentes especialidades (Biología Molecular, Citología, Hematología, Histopatología, Inmunoquímica, Microbiología, Parasitología, Toxicología y Urianálisis) a laboratorios clínicos que lo soliciten con la finalidad de proporcionar resultados confiables y oportunos para su aplicación en la clínica del paciente, y a su vez proporciona estas pruebas para su aplicación en protocolos de investigación de empresas farmacéuticas. Esta empresa mexicana se inicio en 1990 y en la actualidad tiene las acreditaciones: ISO 15189 otorgado por la Entidad Mexicana de Acreditación (E.M.A), acreditación del Colegio Americano de Patólogos (CAP) y de ISO 9002:2000.

En el Departamento de Biología Molecular a mí cargo se realizan pruebas de tipo cualitativo, cuantitativos y de genotipo. Entre las cualitativas están las detecciones de: Virus de la Hepatitis C (HCV) por PCR, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* por SDA, *Mycobacterium tuberculosis* por PCR, Virus del Papiloma Humano (HPV) por la PCR y CH, y finalmente los cariotipos para el análisis cromosómico de cambios estructurales (translocaciones, inserciones, deleciones, isocromosomas) y/o numéricos (trisomias, monosomias, poliploidias, aneuploidias). Con respecto a las cuantitativas se hacen las cargas virales en plasma de: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) y el del Virus de la Hepatitis C (HCV) ambos por el método de PCR en tiempo real ó por el método

del Cobas Amplicor de Roche. Finalmente, en las pruebas de genotipo se realizan las del HPV, en el que se determina el tipo viral que está presente en una muestra de raspado endocervical o uretral; la prueba de genotipo de HIV en la que se determinan las mutaciones del virus, que confieren resistencia a los 16 medicamentos existentes en el mercado; la prueba de genotipo de la Apolipoproteína E (ApoE) que es para conocer los dos alelos presentes de la ApoE de un individuo y de esta manera conocer su susceptibilidad a presentar Alzheimer y la prueba de genotipo de HLA, que permite conocer los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad que son importantes identificar para un trasplante de órganos. En estas pruebas se encuentran las que son comerciales, pero también algunas que fueron desarrolladas en este Departamento y que involucran a los tres tipos de diagnóstico mencionadas.

Algunas de estas pruebas dieron lugar a 3 Tesis de Licenciatura en tres instituciones: La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., la Universidad del Valle de México y la U.N.A.M.

A continuación describiré algunas de las pruebas que se desarrollaron en el Departamento de Biología Molecular, describiendo la importancia médica del microorganismo en estudio, aspectos metodológicos, los análisis de resultados obtenidos y algunos comentarios acerca de las características funcionales de la prueba. Algunas de las metodologías empleadas son las que se describen con anterioridad en la introducción del presente trabajo. Dentro de los microorganismos que se eligieron para el desarrollo de pruebas diagnósticas están el Virus del Papiloma Humano que es el más importante agente causal de cáncer en mujeres a nivel mundial y en nuestro país, por lo que se describirán primeramente las pruebas implicadas con este virus, posteriormente se describirán las pruebas relacionadas con el Virus de la Hepatitis C, que es el agente infeccioso de estudio más importante en bancos de sangre después del Virus de la Inmunodeficiencia Humana y finalmente se describirá la detección de los alelos de

la Apolipoproteína E siendo importante como factor de susceptibilidad para presentar Alzheimer.

# I

## **Virus del Papiloma Humano (HPV)**

## **I. Introducción**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda malignidad más común en mujeres y sigue siendo una importante causa de muerte en países subdesarrollados (Burd M, 2003; Saturo M, 2004).

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal agente etiológico infeccioso asociado con la patogénesis del CaCu. Recientemente se ha demostrado que más del 95% de las mujeres con carcinoma cervical y el 50% con cáncer vulvar están infectadas con algún tipo de HPV (Torroella-Kouri M, 1998; Chen TM ,1993, Jastreboff AM, 2002). Más de 100 tipos de HPV han sido identificados (Jastreboff AM, 2002).

La infección por HPV es inicialmente asintomática y la transmisión puede ocurrir antes de que la expresión del virus se manifieste. Clínicamente el HPV infecta las células basales del epitelio y membranas mucosas (orales y genitales) y piel. (Cortes G, 2001; Jastreboff AM, 2002). Muchas mujeres infectadas no desarrollan signos o síntomas clínicos, pero son reservorios del virus por períodos variables de tiempo (Protocol, IARC,1997). El HPV latente puede ser asintomático y ser identificado solamente por técnicas de biología molecular, o subclínicamente, por observación mediante colposcopia (Jastreboff AM, 2002). El virus puede presentarse como lesiones benignas fácilmente controlables, denominadas condilomas o papilomas asociados a los HPV de bajo riesgo; sin embargo, los HPV de alto riesgo que infectan el tracto genital (cervix, vulva, vagina, pene y ano) están asociados con la formación de lesiones malignas (displásicas) o precancerosas que pueden llevar la transformación neoplásica. (Burd E, 2003; , Jastreboff AM, 2002).

Los HPV pueden ser detectados no solo en los carcinomas de cuello uterino, sino también en sus lesiones precursoras (displasia / CIN / Lesiones intraepiteliales), lo cual estaría indicando que el virus sería el iniciador de la enfermedad mientras que

otros factores genéticos celulares jugarían un rol crucial en la progresión de la enfermedad. (Torroella-Kouri M, 1998).

Los HPV son un grupo de virus de DNA que pertenece a la familia Papovaviridae, no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm. Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica, constituida por 72 capsómeros dispuestos en una estructura icosaédrica. (Jastreboff AM, 2002), ver Figura 15.

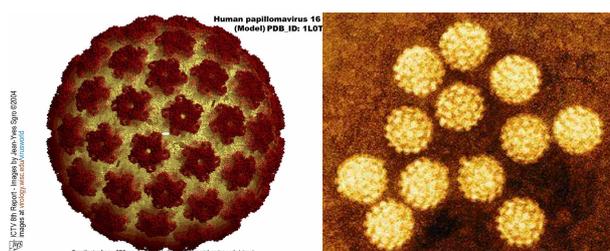


Figura 15. Microscopia electrónica del Papilomavirus Humano  
Tomada el 27 julio 2008 de <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>.  
Reprinted with permission from Photo Researchers, Inc., New York, NY.

El genoma viral consiste de una doble cadena circular de DNA con una longitud aproximada de 8000 pares de bases. Todas las secuencias encargadas de codificar a las proteínas virales denominadas ORFs (open reading frames) están restringidas a una sola cadena. A estas regiones se las designa con las letras E (por early = temprano) y L (por late = tardío), para indicar de esta manera la secuencia en el tiempo de su expresión durante el ciclo viral, más una Región Grande de Control (RLC). (Álvarez-Salas L, 1995; Jastreboff AM, 2002).

La región Temprana (E) representa el 45% del genoma y contiene 7 marcos de lectura abierta que codifican para proteínas no estructurales, cuya función es

controlar la replicación del DNA e inducir la transformación maligna de la célula huésped. Estos genes son codificados en las etapas tempranas de la infección y son conocidos como genes E.

La región tardía (L), corresponde al 40% del genoma y contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside: L1, una proteína de 54,000 Daltons que se produce en mayor cantidad, y la cual se encuentra muy conservada entre los diferentes tipos de HPV , y L2 que produce una menor cantidad de proteína, y es específica para cada tipo viral (Álvarez-Salas L, 1995; Cortes G, 2001), ver Figura 16.

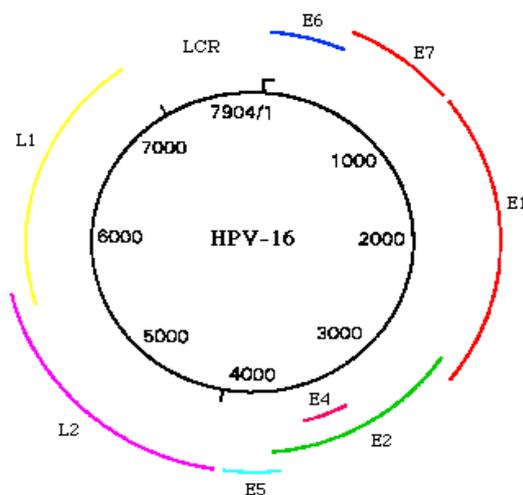


Figura 16. Mapa genético del Papilomavirus tipo 16  
Tomada el 28 de julio de 2008 de <http://www.medescape.com>.

Dos genes, Rb y p53, regulan la división celular normal. El primero produce los factores de transcripción necesarios para el avance a través del ciclo celular. Esto denota que Rb impide que la célula se divida hasta que se haya producido suficientes proteínas para la división celular. E2F es la proteína importante que Rb produce, lo que convierte a Rb en un gene/proteína supresor de tumores. Esto

impide que el ciclo celular prosiga hasta que se hayan acumulado suficientes proteínas, en especial la E2F. Cuando el HPV infecta una célula, el gen E7 se fija a Rb de tal modo que Rb libera E2F y las otras proteínas. Esta es una señal para que el ciclo celular avance. En tanto E7 permanezca fijo a Rb, el ciclo celular continuará causando un ciclo de reproducción celular incontrolada, que es una de las características que definen a una célula maligna.

P53 es el otro gen que el HPV ataca. En la célula, p53 actúa en respuesta al DNA dañado. Cuando se deteriora el DNA de una célula, p53 detiene la división celular y dirige a los genes comprendidos en la reparación de DNA a fin de corregir el daño. Si no es posible reparar el DNA, p53 causa entonces apoptosis (muerte celular programada), garantizando así que la célula dañada muera y no se reproduzca. En las células cancerosas, p53 a menudo aparece deteriorado o no funcional. Esto favorece que las células con DNA dañado o alterado sigan viviendo en vez de ser destruidas. La proteína E6 viral puede fijarse a p53 e inactivarlo. Lo anterior permite que el virus se apropie de la célula y se reproduzca a si mismo, dado que el gen p53 inhibido por el virus no puede detenerlo o comenzar el proceso de la muerte celular. La replicación repetida de células con información de DNA incorrecta es el inicio de la formación de un tumor maligno. Esto deriva en cáncer a medida que las células mutantes siguen reproduciéndose sin control.

La clasificación de los papilomavirus se basa en la especie de origen y el grado de homología del DNA. En humanos se han reportado más de 100 tipos. A diferencia de lo que ocurre en otras familias virales, las proteínas de la cápside de los diversos tipos de HPV son antigénicamente similares, por lo tanto, los HPV no pueden ser clasificados en serotipos, de tal forma su clasificación en genotipos y subtipos se basa en las diferencias a nivel de su secuencia de DNA. Se considera un nuevo tipo viral, sí tiene no mas de un 90% de homología en la secuencia de nucleótidos en las regiones E6, E7 y L1 y subtipos cuando tienen 90% al 98% y las variantes

cuando comparten 98- 99% de similitud (Chen T, 1993). Hasta el momento más de 100 tipos diferentes de HPV han sido caracterizados, y aproximadamente 40 infectan el tracto genital; estos pueden clasificarse en dos grupos principales, de acuerdo con el sitio de infección: cutáneos y mucosos. Los tipos de HPV mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6,11,43,44) son conocidos como tipos de "bajo riesgo", estos tipos virales no se integran al genoma de las célula hospedera por la poca afinidad de las oncoproteínas virales E6 y E7 a P53 y RB respectivamente. Mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 50, 51 -59, 61, 62, 64, 66-69, 71-74) son conocidos como virus de "alto riesgo"(Cortes G, 2001; Chen T, 1993; Jastreboff A, 2002; Saturo M, 2004). Dentro de esta clasificación los tipos virales 31,33, 35, 51, y 52 son conocidos como intermedio riesgo ya que es mas común encontrarlos en lesiones displásicas severas que en carcinomas. El HPV 16 se ha encontrado en más del 50% en carcinoma de células escamosas, mientras el HPV 18 se ha encontrado en más del 50% en adenocarcinomas (Jastreboff A,1992; Milde-Langosch K, 1993).

La transmisión del HPV ocurre primariamente de persona a persona por contacto directo con las áreas de la piel contaminadas. Los HPV genitales se transmiten por vía sexual, el HPV es muy resistente al calor y desecación y una transmisión vía fomites solo puede ocurrir como una exposición prolongada a la ropa contaminada compartida.

Algunos factores de riesgo propuestos que pueden incrementar el desarrollo del cáncer cervical se pueden observar en la tabla 8.

Tabla 8. Factores asociados para riesgo de Cáncer Cervicouterino.

<b>Factores de Riesgo</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento del numero parejas sexuales</li> <li>• Inicio de vida sexual a temprana edad</li> <li>• Prostitución</li> </ul>
<b>Asociación de factores de riesgo</b>

- Fumar (metabolitos de nicotina han sido identificados en la mucosa cervical de mujeres fumadoras)
- Infección con otras enfermedades de transmisión sexual
- Multiparidad

La sola presencia del virus no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia, aparentemente son necesarios otros factores para la progresión tumoral tales como factores genéticos, epigenéticos, hormonales, inmunológicos etc.(Bosh F, 2002). También se ha demostrado en los estudios grandes que el riesgo de desarrollar el cáncer cervical está asociado fuertemente a la persistencia de los tipos de HPV de alto riesgo independiente de otros factores incluyendo los productos químicos, las hormonas, y otras infecciones virales o bacterianas. (Implicaciones clínicas).

## **Capítulo 1**

### **Detección del Virus del Papiloma Humano por la PCR**

## **1.1 Secuencias de estudio**

Para la realización de esta prueba se mando a sintetizar a Invitrogen Inc. la secuencia de los oligonucleótidos L1, LC1 y LC2 que amplifican una parte del gen L1 de 430 pb (Satochi K, 2001). Estos oligonucleótidos comparten secuencias de DNA que son conservadas entre los diferentes tipos de HPV, de tal manera que permite amplificar los tipos virales de bajo y alto riesgo.

## **1.2 Muestras**

Para el desarrollo de esta prueba se procesaron 63 muestras de las cuales 50 fueron de pacientes femeninos y 13 de pacientes masculinos. Las muestras de pacientes femeninos fueron de raspado endocervical obtenidos con el medio de transporte Digene, y las muestras de pacientes masculinos fueron de la primera orina de la mañana. Se solicitó a los pacientes abstinencia sexual 3 días antes de la obtención de su muestra.

Se utilizó plásmido clonado con la región de amplificación L1 como control positivo. La clonación fue del amplicón de los oligonucleótidos L1, LC1 y LC2 al plásmido PC13 realizado de acuerdo a las especificaciones del kit Topo de Invitrogen.

## **1.3 Extracción de DNA**

La extracción se realizó mediante el kit GFX Genomics de Amersham Pharmacia de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

## **1.4 Amplificación por la PCR**

La amplificación se realizó de acuerdo al artículo de Satoshi Kado, utilizando los iniciadores: L1C1, L1C2 y L1C2M (Satochi K, 2001). Las condiciones de temperaturas de amplificación fueron las siguientes: 3 min. a 94°C, 40 ciclos de 1.5 min. a 95°C, 1.5 min. a 48°C y 2 min a 72°C con una extensión final de 2 min. a 72°C. en el termociclador Gene Cyclor de BioRad.

## **1.5 Detección**

10 µL de cada amplicón fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 3% con 15 µL de colorante Sybr.Green II (10mg/ml). El corrimiento se realizó a 80 volts por un tiempo de aproximadamente 45 min. Los amplificadores se observaron mediante luz U.V. y se realizó análisis de imagen con el programa Kodak ID 3.5. Como marcador de peso se uso el de escalera de 123 pb de Invitrogen. El producto amplificado esperado mediante estos cebadores es de 244 pb.

## **1.6 Control de extracción**

En el control de este proceso, la muestra a analizar se dividió en dos partes, en una de estas, se añadió el control positivo a manera de hacer la muestra positiva obligadamente, sirviendo de control positivo para este proceso.

Una vez añadido el plásmido se procedió a realizar el proceso completo de extracción en ambas partes de la muestra simultáneamente. De esta manera, si en el control positivo no existe evidencia de la presencia de DNA del HPV, nos indica que existe un efecto inhibitorio en la muestra, o bien, que no se realizó correctamente la extracción por lo cual se repite el proceso para esta muestra.

## **1.7 Control de amplificación**

En el control de este proceso se utilizaron controles negativo y positivo, con la finalidad de determinar si la amplificación se realizó correctamente.

El control positivo consistió en añadir DNA del plásmido control a la mezcla de reacción en el microtubo identificado como positivo (+).

El control negativo consistió en añadir sólo agua desionizada a la mezcla de reacción en el microtubo identificado como negativo (-).

Con la finalidad de que el contenido de la mezcla de reacción sea homogénea se realizó el cóctel de la reacción en un tubo, y una vez hecha esta actividad, se separó en cantidades iguales en los microtubos identificados previamente y que contienen el DNA de las muestras a analizar o los controles positivos o negativos.

También se llevó a cabo la amplificación de los controles positivos y negativos del proceso de extracción de DNA del HPV.

En los controles positivos o resultados positivos se observa la presencia de una banda de 244 pb que corresponde al amplicón y por lo tanto a la presencia de HPV; en los controles negativos o resultados negativos se observa la ausencia de esta banda. En el caso de que no se hubieran observado amplicones en los controles positivos sería indicativo de que no se realizó correctamente el proceso de amplificación y se repetiría la prueba para la muestra o muestras (Figura 4).

## **1.8 Resultados**

Las muestras se procesaron simultáneamente en el Dpto. y con el laboratorio de referencia Immunobiogen, Inc. De un total de 63 muestras procesadas, se obtuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 92%. De estas muestras, el 79% (50/60) fueron muestras de raspado endocervical y 21% (13/60) fueron muestras de orina. Considerando lo anterior se tiene los siguientes datos (Tabla 9):

**Detección de VPH por PCR**

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	33	2	35
Negativo	1	24	25
Total	34	26	60

Sensibilidad: 97%  
Especificidad 92%

**Orina**

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	4	1	5
Negativo	1	10	11
Total	5	11	16

Sensibilidad: 80%  
Especificidad 91%

**Raspado endo-cervical**

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	29	1	30
Negativo	0	14	14
Total	29	15	44

Sensibilidad: 100%  
Especificidad 93%

Tabla 9. Sensibilidad y especificidad clínica de la Detección del HPV en muestras de raspado endocervical, orina y ambos.

## 1.9 Discusión

Las condiciones que maneja Satoshi Kado fueron verificadas para este tipo de muestras, y resultaron ser las adecuadas para el proceso.

En todas las muestras analizadas: raspado endocervical y orina, su control positivo consistió en añadir el plásmido con HPV L1, y en estas fue posible observar la banda de 244 pb indicativo de que el proceso de extracción y amplificación fue realizado correctamente y que en este tipo de muestras para el método empleado no es común encontrar inhibidores de la PCR.

Existe reproducibilidad en los resultados ya que los controles, fueron posible observarlos en todas las corridas. La sensibilidad de este método es buena, si consideramos que no es posible cultivar el virus. Una de las diferencias entre las diferentes tipos de muestras, es que el volumen en muestras de orina es mucho mayor que las muestras de raspado (de 15-30 mL y 1 mL respectivamente), aún con está diferencia la sensibilidad es adecuada. En la literatura se menciona que estos iniciadores son específicos del HPV y permite detectar diferentes tipos virales, mediante el uso de un par de cebadores degenerados que permite amplificar los diferentes tipos. En el departamento se realizó la amplificación de controles empleados en la validación del kit Digene para captura de híbridos que contiene diferentes tipos de HPV, los cuales fueron detectados por esté método (6, 11, 16, 18, 33, 45, 52).

## **1.10 Comentarios**

Este método permite realizar la detección de HPV con una sensibilidad clínica de cerca del 100% para muestras endocervicales y del 80% en muestras de orina y una especificidad clínica del 91% y 93% respectivamente.

## **$\beta$ -actina como control interno**

### **1.11 Justificación**

Después de varios meses se mejoró a este sistema utilizando como control de extracción y amplificación el gen de  $\beta$ -actina que está presente en todas las células humanas. De esta manera, utilizando el mismo tubo de extracción se amplifica una región del gen L1 del HPV y una parte del gen de la  $\beta$ -actina, en vez de dividir en dos tubos para realizar el proceso de extracción y añadir el plásmido control

(con DNA del HPV). La ventaja es que de esta manera se evita las contaminaciones con el plásmido, que es más factible que ocurran.

## **1.12 Muestra**

Se procesaron 19 muestras de orina de pacientes masculinos, de los cuales 9 eran positivos para el HPV.

## **1.13 Control interno**

Se utilizó como control interno, la detección por amplificación de  $\beta$ -actina, mediante oligonucleótidos Lux (marcados con Fam o Joe) empleados para la PCR en tiempo real de la marca Invitrogen.

## **1.14 Extracción DNA**

La extracción se realizó mediante el kit Ultrasens de QIamp conforme a las instrucciones del proveedor Qiagen Incorporation.

## **1.15 Amplificación por la PCR**

La amplificación se realizó de acuerdo a lo mencionado anteriormente, modificando las condiciones de temperaturas de amplificación: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido por 45 ciclos de 20 seg. a 95°C, alineamiento de 20 seg. a 48°C, polimerización de 20 seg a 72°C y lectura de 20 seg a 79°C, un ciclo de 15 seg a 72°C; finalmente, el melting de 70-99°C con una variación de 1°C en cada cambio de temperatura, realizado en el termociclador Rotor Gene 3000 de Corbett Research.

Las reacciones de la PCR estándar para HPV fueron como se describe en la validación previa.

Las reacciones de la PCR en tiempo real fueron las siguientes: 1X Platinum qPCR SuperMix-UDG, 0.2  $\mu$ M Iniciador forward para  $\beta$ -actina marcado con Joe, 0.2  $\mu$ M iniciador Reverse para  $\beta$ -actina, agua desionizada c.b.p. 25  $\mu$ L.

### **1.16 Detección por electroforesis**

10  $\mu$ L de cada amplicón tanto para HPV como para  $\beta$ -actina fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 2  $\mu$ L de bromuro de etidio 10 mg/mL por cada 100 mL de agarosa. El corrimiento se realizó a 80 volts por un tiempo de aproximadamente 45 min. Los amplificadores se observaron mediante luz U.V. y se realizó análisis de imagen con el programa Kodak ID 3.5. Como marcador de peso se usó el de escalera de 123 pb de Invitrogen. El producto amplificado esperado mediante el uso de los iniciadores para VPH es de 244 pb y para los iniciadores de  $\beta$ -actina de 123 pb.

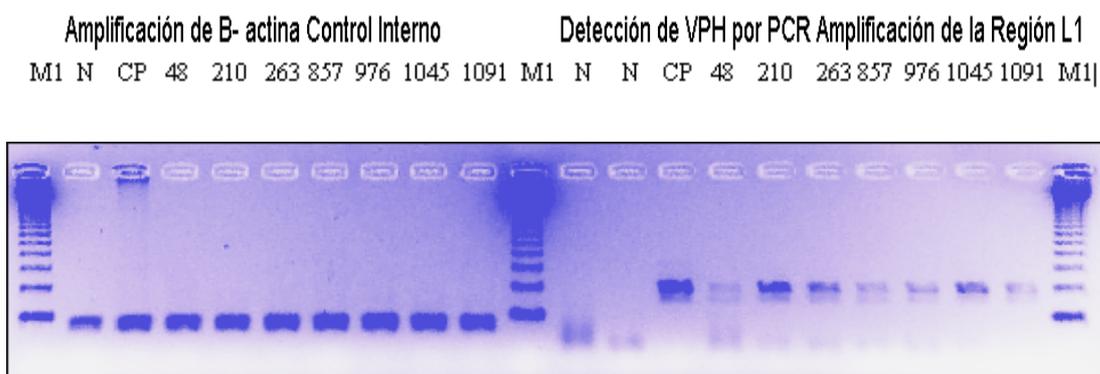
### **1.17 Resultados del control interno**

En las 19 muestras analizadas se observó la presencia del amplicón de  $\beta$ -actina en gel de agarosa con un amplificado de aprox. 123 pb, validando el proceso de extracción.

En cada PCR se utilizó un control positivo y otro negativo para el control interno. En todas estas muestras analizadas se observó el producto de amplificación esperado, validando el proceso de extracción del DNA en las muestras.

### **1.18 Resultados en las muestras**

En 9/19 muestras analizadas se detectó la presencia del HPV que fue lo esperado (Figura 17).



**Figura 17.** Amplificación de la región L1 del HPV y B-actina con iniciadores específicos . En cada pozo siguiente se encuentra las muestras identificadas con número interno. El amplificado esperado para  $\beta$ -actina es de **123 pb** y para la **región L1** de **246 pb**.

## 1.19 Discusión

En la detección de HPV es muy importante que ambos controles el positivo y el negativo salgan correctamente, para validar la corrida. En todas las muestras fue posible amplificar el gen de  $\beta$ -actina, indicando que el proceso de extracción y amplificación fue realizado correctamente y que es útil como control interno para validar el proceso de extracción. Una de las ventajas de usar este control interno es que en la misma extracción de DNA es posible usarse, sin necesidad de dividir la muestra, para añadirle el control de HPV, como anteriormente se realizaba, evitando de esta manera ocasionar contaminaciones entre las muestras con esta región L1 del HPV.

## 1.20 Comentarios

El control interno de  $\beta$ -actina es útil para validar el proceso de extracción o para identificar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras.

## **Capítulo 2**

### **Genotipo de HPV por la PCR multiplex**

## 2.1 Secuencias de estudio

Para el desarrollo de esta prueba, se busco del banco de genes ([www.nih.gov](http://www.nih.gov)) las secuencias completas de los genes E6 y E7 de los diferentes tipos de HPV por ser estas las proteínas relacionadas con la carcinogenesis. En esta búsqueda se encontraron únicamente 11 diferentes virus que infectan los genitales, 2 que corresponden al grupo de bajo riesgo oncogénico: 6, 11 y los 9 restantes que son de alto riesgo: 16, 18, 30, 33, 35, 45, 51 y 52. Una vez obtenidas estas secuencias se utilizó el programa Blast del mismo banco de genes para encontrar secuencias que no fueran conservadas, esto con la finalidad de distinguir los diferentes HPV. Este análisis fue a nivel de DNA y de aminoácidos.

El resultado obtenido del genotipo mediante el gen E6, debe coincidir con el del gen E7, de esta forma se confirma el resultado en una muestra de raspado endocervical o uretral. Se utilizaron líneas celulares como Hela y Caski que tienen el HPV 18 y 16 respectivamente como controles.

## 2.2 Diseño de los iniciadores

El diseño de los iniciadores para la amplificación de las regiones E6 y E7, se realizó buscando la región menos conservada, en el programa BLAST del National Institute of Health (NIH), de la secuencia de aminoácidos de los tipos virales de HPV seleccionados en el banco de genes; después se propuso la secuencia de nucleótidos para los iniciadores antisentido y sentido de cada región. Cada uno de los amplificadores de E6 y E7 para cada tipo viral presenta un tamaño de amplicón, que se visualiza por electroforesis en un gel de agarosa al 2 ó 3.5%.

## **2.3 Muestras**

Se procesaron un total de 44 muestras, 40 de raspado endocervical y 4 de raspado uretral, positivas en la detección del virus del papiloma humano por el método de captura de híbridos. Como controles positivos se usaron líneas celulares. En raspado endocervical: 15 positivos para los grupos de HPV de alto y bajo riesgo; 17 positivos para el grupo de HPV de alto riesgo y 8 positivos para el grupo de HPV de bajo riesgo. En raspado uretral: 2 para el grupo de HPV de bajo riesgo y 2 para el grupo de HPV de alto y bajo riesgo (Tesis de: Valdivia A, 2005).

## **2.4 Amplificación de regiones de los genes E6 y E7 del HPV**

La amplificación para los genes E6 y E7 fue en 2 etapas, la primera consistió en una amplificación multiplex, esto es del uso de varios pares de iniciadores, y la segunda mediante pares de iniciadores específicos para cada tipo viral dependiendo de lo encontrado en la primera amplificación. El hacerlo en dos etapas fue porque en algunos de los tipos virales, el amplicón presenta un tamaño semejante de pares de bases, lo que no permite identificar en un gel de agarosa a que tipo viral pertenece, para distinguir el tipo viral se lleva a cabo la segunda etapa de amplificación con iniciadores específicos para cada uno de los HPV que tienen semejanza de tamaño.

La estandarización del método corresponde a una Tesis de licenciatura (Valdivia A, 2005) y se describe en el siguiente punto.

## **2.5 Amplificación de la PCR multiplex**

Se agruparon los 11 tipos virales en 2 grupos, uno perteneciente a la región E6 y el otro a E7, a su vez estos se dividieron en dos para facilitar la visualización de las bandas de los amplificadores de cada tipo viral. Quedando de la siguiente forma (Tabla 10 y 11):

Tabla 10. Se presentan 4 grupos para la PCR multiplex. Dos grupos para la región E6 y dos grupos para la región E7. Se muestran los tipos de HPV que se detectan en cada grupo.

<b>Región E6</b>		<b>Región E7</b>	
<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>
6, 11, 30, 31, 35, 45, 51	16, 18, 33, 52	6, 11, 15, 30, 35, 51	16, 31, 33, 45, 52

Tabla 11. Grupo de los HPV que se detectan y los tamaños de cada amplicón para cada tipo de HPV, así como la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ).

<b>E6</b>				<b>E7</b>			
<i>GRUPO</i>	<i>TIPO</i>	<i>(pb)</i>	<i>T<sub>m</sub></i>	<i>GRUPO</i>	<i>TIPO</i>	<i>(pb)</i>	<i>T<sub>m</sub></i>
A	6	198	52-52	1	6	97	60
A	11	270	50-60	1	11	97	60
A	30	258	52-60	1	18	121	58
A	31	365	54-60	1	30	202	60-62
A	35	364	52-62	1	35	103	60
A	45	385	54-58	1	51	112	60
A	51	396	54-58				
				2	16	103	62
B	16	370	56-62	2	31	100	58-60
B	18	385	54-58	2	33	97	58
B	33	364	58-60	2	45	118	60
B	52	361	58-64	2	52	106	58

## 2.6 Condiciones de la PCR multiplex

La mezcla de reacción se define en la siguiente tabla (Tabla 12):

Tabla 12. Mezcla de la PCR multiplex y programa del termociclador.

<b>Programa del termociclador</b>	
Desnaturalización:	95°C 2 min
10 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	60°C 30s
Extensión:	72°C 30s
10 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	59°C 30s
Extensión:	72°C 30s
10 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	58°C 30s

Extensión:	72°C 30s
------------	----------

Master Mix	
Taq DNA polimerasa	0.6 uL
dNTP's 10mM	0.25 uL
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	1.5 uL
E6Af 20 mM	2 uL
E6Ar 20 mM	2 uL
Buffer 10X	2 uL
Agua	11.65 uL

## 2.7 Amplificación con iniciadores específicos

Posterior al análisis de los amplificadores por PCR multiplex se realizó la amplificación de los posibles tipos virales por pares de iniciadores específicos.

## 2.8 Condiciones de la PCR con iniciadores específicos

Las condiciones de amplificación son lo comentado en la siguiente tabla (Tabla 13):

Tabla 13. Programa del termociclador PalmCycler para el proceso de amplificación

Programa del termociclador	
Desnaturalización:	95°C 2 min
5 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	60°C 30s
Extensión:	72°C 30s
10 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	58°C 30s
Extensión:	72°C 30s
10 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 30s

Alineamiento:	57°C	30s
Extensión:	72°C	30s

10 ciclos de:		
Desnaturalización:	95°C	30s
Alineamiento:	56°C	30s
Extensión:	72°C	30s
10 ciclos de:		
Desnaturalización:	95°C	30s
Alineamiento:	55°C	30s
Extensión:	72°C	30s

## 2.9 Resultados en la detección del Genotipo del HPV

La detección se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3.5% a 75 volts por 90 min en 0.5x de TBE, visualizados con bromuro de etidio. Las muestras (10 µl) fueron cargadas con buffer de carga (2 µl) colocando un estándar de peso molecular de escalera de 123 pb y 10 pb. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz U.V. marca Hoefer Macro Vues-20.

El análisis fue identificando los diferentes amplicones (Figura 18 y 19). Se estableció como amplificación negativa para el tipo viral del VPH, la ausencia de la banda de tamaño esperado. En cada corrida se utilizó para cada grupo de iniciadores un control negativo que consistió en la amplificación de un tubo con toda la mezcla de la PCR, pero sin DNA.

**AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL  
CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 16**

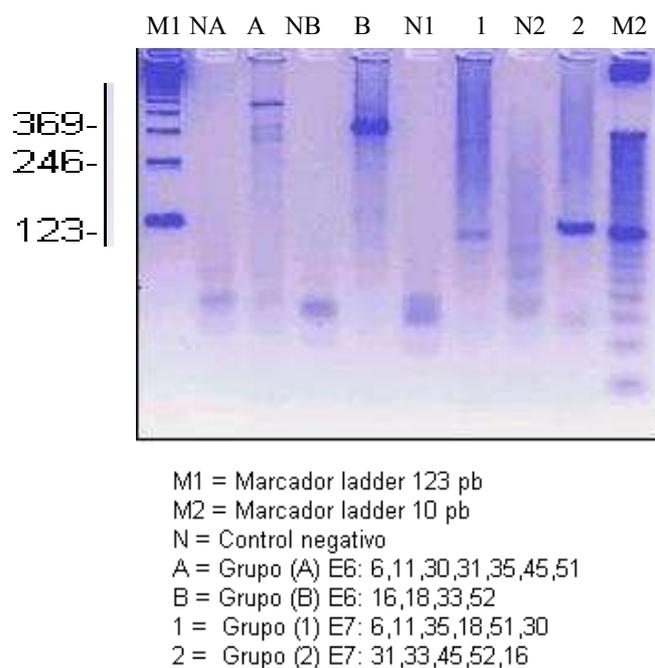


Figura 18. Amplificación por PCR multiplex en grupos del control del tipo viral 16, línea celular Caski, en la que se pueden observar las bandas esperadas dentro del grupo correspondiente. Fotografías tomadas en el Laboratorio.

#### AMPLIFICACIÓN DE E6 Y E7 POR PCR ESPECÍFICA DEL CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 16

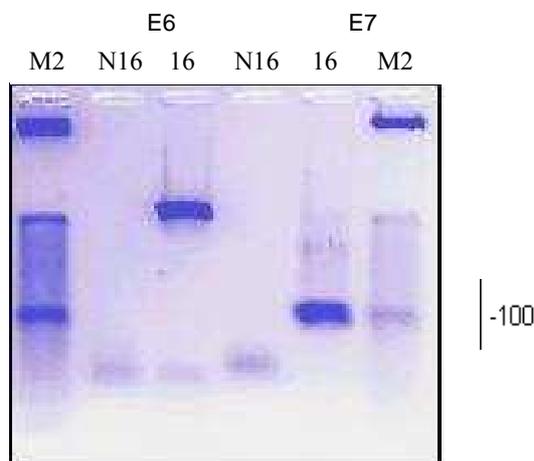


Figura 19. Amplificación específica del Control Positivo para el tipo viral 16 con los cebadores del tipo viral correspondiente; los pozos marcados como **M2** corresponden al marcador de 10 pb, los pocillos marcados como **16** y **N16** corresponden al tipo viral 16 más su control negativo de amplificación. La región E6 y E7 esta especificada como subíndice. Fotografía tomada en el laboratorio.

## **2.10 Discusión**

En el 83.76 % de las muestras (36/43) fue posible obtener la tipificación viral en la PCR multiplex. Sin embargo, en la amplificación mediante iniciadores específicos, únicamente el 52.79% (19/36) se obtuvo la tipificación. De las muestras que se obtuvo el genotipo los tipos virales más frecuentes fueron: 16 (40%), 6 (22%), 52 (13%), 11 (9%) y 31, 33, 45, 51 con 4% cada uno (Tesis de: Valdivia A, 2005). Se determinó que se requiere un número mayor de 14,000 copias HPV en el exudado endocervical para obtener un genotipo del virus.

## **2.11 Comentarios**

Con el método mencionado es factible obtener el genotipo del HPV, siendo importante que se tenga un número mayor de 14,000 copias del HPV en el exudado endocervical para obtener la tipificación viral.

## **Capítulo 3**

### **Genotipo de HPV en tejidos cervicales**

### 3.1 Resumen

Se conoce que existe un grupo de HPV de alto riesgo oncogénico, y que los virus más frecuentes en la población mundial corresponden al tipo 16 y 18. Sin embargo, no se conoce el grado de patogenicidad de cada uno de los virus de alto riesgo, y su comportamiento biológico. En nuestro país hay estudios de las frecuencias de HPV en mujeres mexicanas, pero son pocos. Esto nos motivó a realizar un estudio para conocer que tipos de HPV presentan los tejidos cervicales de mujeres mexicanas infectadas con este virus, así como determinar cuales son los más frecuentes en los diferentes estadios previos al cáncer cervicouterino: Lesión intraepitelial escamoso de bajo grado (LIEB), Lesión intraepitelial escamoso de alto grado (LIEA), cáncer invasor (CI). Este estudio correspondió a una Tesis de Licenciatura para obtener el Título de Q.F.B. (Gallegos J, 2007).

El proceso del genotipo fue realizado como se describió anteriormente.

### 3.2 Tipificación en tejidos embebidos en bloques de parafina

La detección de HPV se realizó en 143 muestras de cortes histológicos parafinizados con alteraciones celulares y con distintos grados de neoplasia intraepitelial (NIC). El sistema de L1 por PCR detectó el HPV en 35.7% (51/ 143) de las muestras. Se ordenaron respecto al diagnóstico histológico y se encontró que el 28.6% pertenecieron a NIC I (18/63); 50% a NICII (20/40); y el 33.3% respecto a NIC III (13/ 40). Cabe señalar que un resultado es detectado, sí se amplifica el control interno ( $\beta$ -actina) y la región L1 del HPV. En nuestro estudio se obtuvo el 100% (143/143) de la amplificación de  $\beta$ -actina. En Tabla 22 se encuentra un listado de muestras utilizadas para extracción de ácidos nucleicos

y detección del HPV por amplificación de la región L1 por PCR, con su código interno, diagnóstico histológico y diagnóstico molecular.

Se logro genotipificar (39 / 51) muestras, las restantes 12; 6 se agoto el material ya que eran biopsia muy pequeñas y no se realizo el genotipo, estas se encuentran sombreadas las celdas en la tabla para su identificación.(Tabla 14); y las 6 restantes no se logro obtener el tipo viral presente en la misma.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la tipificación del Virus del Papiloma Humano en las 51 muestras procesadas. Nota: El (\*) significa que solo la región E7 se logro amplificar. El (/) significa que no se logro identificar el tipo viral presente en la muestra

#### NIC I

No	Cod. Interno	Resultado PCR múltiplex	Resultado PCR Especifico
1	H-436	6,11,16,18,51	6, 11
2	H-725	18,45,51,16	18*
3	H-5722-1-04	16,31,33,52	16* y 51*
4	H-160-05		
5	H-188-05	18,16,45,31	16 y 31
6	H-485-2-05	6,11 y 33	16*
7	H-649-1-05	6, 11	6*
8	H-850-05	16,31,33,52	35* 16* y 11*
9	H-1671-05	16,18,31 y 33	
10	H-1967-05	18,45,51	51*
11	H-2072-05	16,31,33 y 45	30,45* y 51
12	H-2927-05	18,51	51*
13	H-3012-05	51,16,31 y 45	51
14	H-3350-05	33,45,51,18	45*
15	H-4033-05	35,31,16,6,11	16 y 11
16	H-4711-05	52,16	16
17	H-4797-2-05	6,11,35- 45,18,51	6, 51*
18	H-3892	16,31,52	16*

**NIC II**

19	H-570	16,18	16
20	H-857	11, 18 y 30	30
21	H-1091		
22	H-5739-04	18,51	18*
23	H-5768-04	16,31,45,52	16*,45*
24	H-5775-04	16,31,45,52	31 Y 16*
25	H-5949-04	16, 45, 31	/
26	H-6023-04	16,31,52,35,51	16
27	H-6337-04	16,18	16
28	H-6338-04	16, 45	16*
29	H-09	6,11,16,31,52,51 y 30	16, *51
30	H-217-05	35,51,6,11,16	6*,11*,35*
31	H-340-05	45,51	51
32	H-589-05	16, 18	16*
33	H-630-05	6, 11, 16	6* 16
34	H-1287-05	16,45,52	16
35	H-1872-05	18,31,52,16	"52, 16
36	H-3072-05	*	/
37	H-3225-05	31,16,52,18	16
38	H-4759-05	16,52,18*,45*,51*	51*

**NIC III**

39	H-48		
40	H-210		
41	H-263		
42	H-312-05	16,18,31 y 52	/
43	H-721-05	18,51,16	16*,18*
44	H-976		
45	H-1045		
46	H-1833-05	16,31,52	16*
47	H-1893-05		/
48	H-5761-04	16,30,31,33	16*
49	H-5945-04		16*
50	H-6117-04	16,30,31,33	16*
51	H-6209-04	31,33,52,51,16	16*

Obsérvese que en la Tabla 14 se muestran los tipos de HPV encontrados en las diferentes categorías de NIC; de estas el 37.5% tiene más de un tipo de HPV para

NIC I, 35.3% para NIC II y 17% para NIC III y carcinoma. El grupo de bajo riesgo sólo se encontró en las categorías de NIC I y NIC II.

### 3.3 Proceso de análisis de las diferentes categorías de muestras

El proceso se realizó de la siguiente manera (Figura 20):

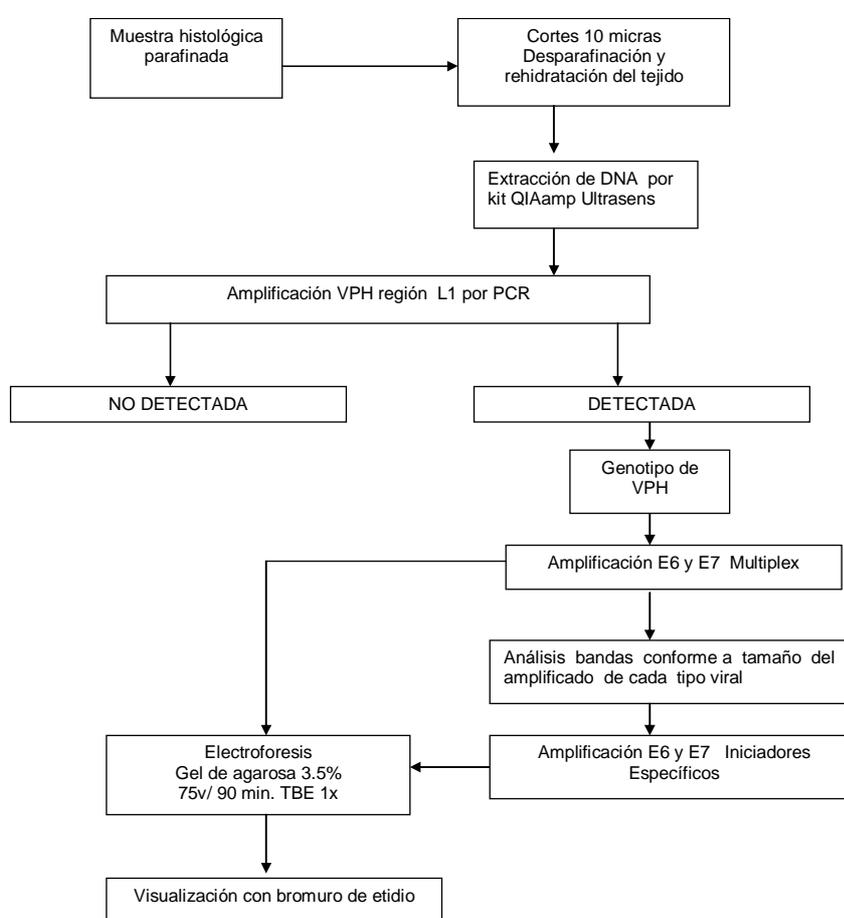


Figura 20. Esquema del proceso de análisis de las tejidos cervicales en bloque de parafina. Tomado de Gallegos J, 2007.

### 3.4 Resultados en la frecuencia de los tipos virales del HPV

La frecuencia respecto a los tipos virales se representa en el figura 21 y 22 donde se puede observar que el tipo viral predominante es el HPV-16 seguido por el HPV-51, mientras que los otros se encuentran en menor proporción. En la Tabla 15 se muestran los datos con los que se realizo la figura 21.

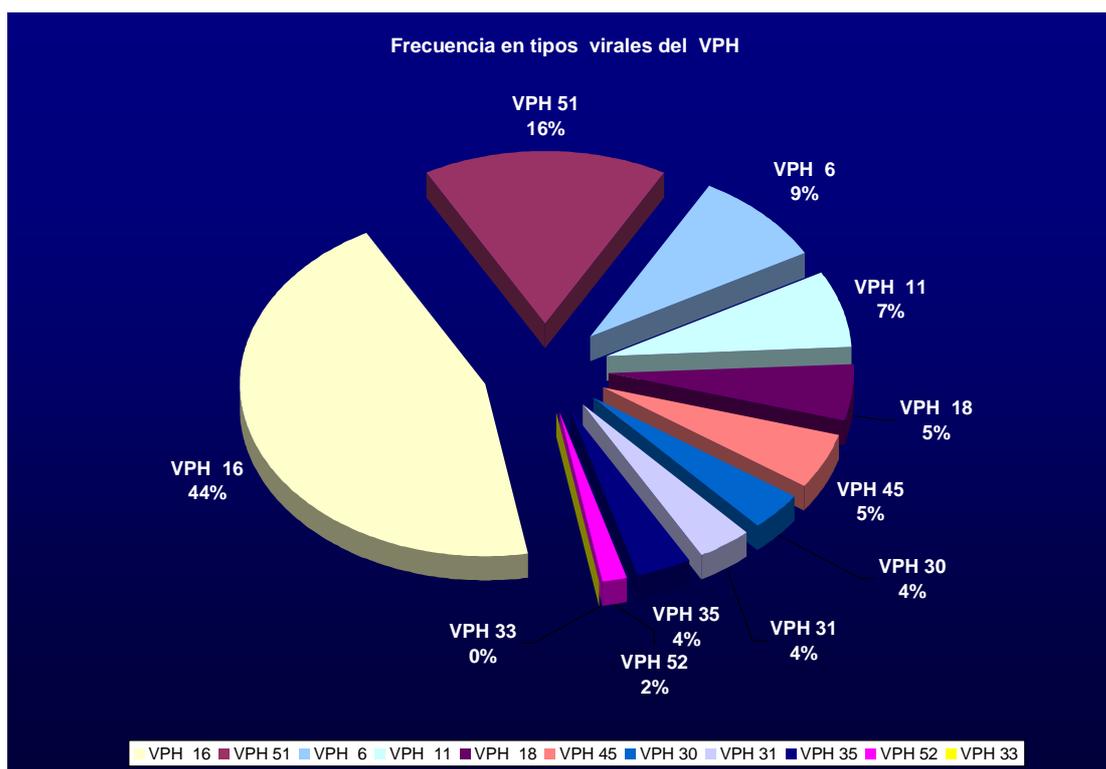


Figura 21. Frecuencia de los tipos virales encontrados en las 44 tejidos de bloque parafinados estudiados.

### 3.5 Resultados de la frecuencia del HPV por tipo de neoplasia

Esta predominancia de los virus tipo 16 y 51 del HPV se mantiene entre las diferentes categorías de NIC.

Tabla 15. Frecuencia de tipos virales en las muestras procesadas y ordenados por al diagnostico histológico.

CATEGORÍA	HPV-6	HPV-11
NIC I	3	3
NIC II	2	1
NIC III / Carcinoma in situ.	0	0
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
%	9%	7.20%

CATEGORÍA	HPV 16	HPV 18	HPV 30	HPV 31	HPV 33	HPV 35	HPV 45	HPV 51	HPV 52	Total
NIC I	7	1	1	1	0	1	2	6	0	25
NIC II	12	1	1	1	0	1	1	3	1	24
NIC III / Carcinoma in situ	6	1	0	0	0	0	0	0	0	7
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>56</b>
%	44%	5.30%	3.60%	3.60%	0%	3.60%	5.30%	16%	1.80%	100%

En la figura 22 se puede observar la frecuencia y prevalencia de los 11 tipos virales amplificadas con respecto a el grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que presentaron en el estudio histológico.

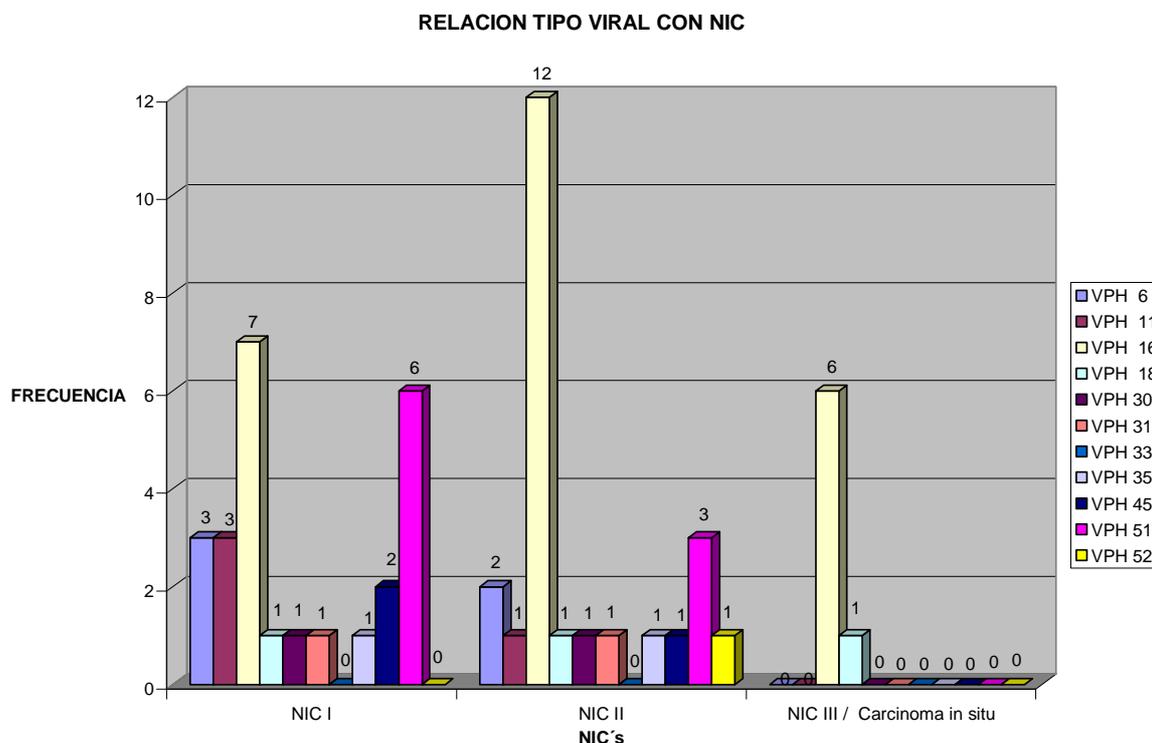


Figura 22. Categorías vs. Frecuencia. Ordenada por NIC donde se puede observar la frecuencia de cada tipo viral con respecto al diagnostico histológico.

### 3.6 Discusión

Respecto a la detección de HPV, amplificando la región L1, se logro obtener un resultado en 51 muestras que corresponden al (35.7%) de un total de 143, los casos se seleccionaron por el diagnostico histopatológico que permite diferenciar los estratos del epitelio cervical, detectando así el nivel de infiltración de las células infectadas o malignas así como áreas de invasión que se clasifica en distintos grados de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). La sensibilidad de la citología es

muy variable y va desde un 40% hasta 89% dependiendo de la experiencia del interobservador, el grado de inflamación, el cambio de epitelio plano a cilíndrico llamado metaplasma, infecciones por otros virus como el herpes II, bacterias, etc.

que producen o dan la apariencia de daño celular y hace se que confunda con alguna alteración que sugiera cambios compatibles con HPV. Esto fue un motivo por el cual en nuestro estudio, un numero bajo de muestras se detecto el HPV. Cabe señalar que el control interno utilizado amplificó en todas las muestras procesadas (143/143), lo que sugiere que no hubo degradación total a nivel del DNA por el formaldehído y el proceso de parafinización.

La carga viral presente en la muestra puede influir de manera significativa en la amplificación del HPV aun más en el caso de muestras con resultado histológico de NIC I, donde la carga viral puede ser bajo (Swan D, 1999).

Respecto al genotipo de HPV se logro obtener en (39/51) muestras con HPV. Solo en 6 muestras no se consiguió obtener el tipo viral presente, las posibles causas, es la presencia de otros tipos virales distintos a los 11 con los que se trabajo, o el bajo número de copias del virus; ya que se requiere de 14,000 copias aproximadamente para una buena amplificación, esto debido a que se emplean un pool de iniciadores y esto implica un incremento en el DNA.

De las 39 muestras, el tipo viral más frecuente fue el HPV-16, seguido del HPV-51. El tipo 16 prevaleció en todas las clasificaciones de neoplasia (NIC I, NIC II y NIC III) esto es común observarlo, cuando ya existe daño celular moderado o alto pero no en una neoplasia intraepitelial leve NIC I, ya que a nivel mundial se acepta que siempre este tipo de lesiones están relacionadas con los tipo virales de bajo riesgo

(Bosh F, 2002). Esta relación no es estricta como se puede constatar en nuestro estudio.

También se encontró que en NIC III y/o Carcinoma solo prevalecen los tipos virales de alto riesgo, en nuestro caso el HPV-16 y HPV-18, que es similar a lo encontrado en otros estudios y por tal motivo se les designa dentro del grupo de alto riesgo como los más oncogénicos y agresivos con una velocidad de replicación mayor respecto a otros tipos virales (Jastreboff AM, 2002).

El tipo viral HPV-51 fue el segundo más frecuente, y se encontró en mayor proporción en neoplasias clasificadas como NIC I y NIC II, lo cual lo clasifica en el grupo de mediano riesgo, sin embargo, en el presente estudio se asocia con el tipo viral HPV-16 en infecciones múltiples. Cabe mencionar que en el presente trabajo es uno de los más frecuentes, a diferencia de otras poblaciones.

El tipo viral HPV-18 solo se encontró en dos casos con diagnóstico como NIC III, lo que nos sugiere que en México no es prevalente este tipo viral mientras que en Europa y EEUU sí lo es (Burd E, 2003).

Otro factor importante es la infección múltiple encontrada en 14 muestras y aun más aquellas en las cuales se encuentra asociados, un tipo viral de bajo riesgo con uno de alto riesgo, como es el caso de muestras que fueron diagnosticadas por histología como NIC I y al realizar el genotipo se encontró una asociación de un tipo viral de alto riesgo generalmente HPV-16. La presencia de genotipos

múltiples de HPV tiende a aumentar con severidad la enfermedad cervical y el porcentaje de evolución a cáncer cervico uterino.

El porcentaje encontrado respecto al total de las muestras genotipificadas que tienen un tipo viral del grupo de alto riesgo es del 94.8% (37/39) esta relación es

similar en muestras de exudados endocervicales procesadas por la técnica de captura de híbridos (Digene corporation) presentando el 85% (Datos obtenidos en el Dpto. de Biología Molecular, 2006). Lo que nos sugiere que es necesario la implementación del genotipo del HPV para un mejor control. Una aproximación con nuestro estudio nos llevaría a realizar la siguiente hipótesis, que en México los tipos virales más prevalentes son HPV-16 y HPV-51. Aunque para confirmarla se necesitaría realizar un estudio más amplio y agregar otros tipos virales como el 58 que lo reportan como uno de los prevalentes en México y Latinoamérica.

Para verificar y hacer confiable el genotipo que se determina en la PCR múltiplex es necesario verificar el resultado mediante la amplificación específica del tipo viral señalado.

### **3.7 Comentarios**

El método de extracción del QIAamp ultrasens resulta eficiente para la extracción de ácidos nucleicos provenientes de tejido parafinado y para la amplificación de las regiones E6 y E7 en una PCR múltiplex para determinar el genotipo de HPV (Gallegos J, 2007).

La "calidad" de los productos de amplificación depende directamente de las condiciones en las que se lleva a cabo la PCR. La amplificación de ambas regiones, E6 y E7, son necesarias para la determinación del Genotipo (Gallegos J, 2007).

Existe una fuerte relación entre NIC III y los tipos virales HPV-16 y HPV-18. Esta relación no es estricta en el caso de NIC I con los tipos virales de bajo riesgo HPV-6 y HPV-11 y NIC II con los tipos virales de alto riesgo (Gallegos J, 2007).

El tipo viral HPV-18 a pesar que es considerado de alto riesgo y de una prevalencia significativa a nivel mundial en nuestro estudio no lo fue (Gallegos J, 2007).

El tipo viral HPV-51 es el segundo más frecuente, esto a nivel de NIC I y NIC II con una asociación con el tipo HPV -16 (Gallegos J, 2007).

La importancia de realizar un estudio por técnicas de biología molecular radica en la información útil al realizar el tamizaje de los distintos tipos virales, para una mejor atención respecto a la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente, ya que por separado las técnicas habituales carecen de sensibilidad y especificidad (Gallegos J, 2007).

El fracaso en la disminución de la mortalidad por cáncer Cervico uterino en México no solo es debido a la sensibilidad de las pruebas como al PAP y citología, sino una parte importante radica en la cobertura inapropiada de la población en riesgo (Gallegos J, 2007).

Han sido pocos los trabajos que se han realizado para caracterizar molecularmente al HPV en México y aquellos que puedan predecir la prevalencia del HPV en nuestra población. En el presente trabajo se sugiere que la presencia del HPV-16 y HPV-18 en un NIC I ó NIC II aumenta el riesgo de presentar CaCu en comparación con los otros tipos virales del grupo de alto riesgo, lo que indica la importancia de realizar el genotipo de HPV una vez establecida la presencia del mismo (Meijer CJ,

2006). Con el uso de la nueva vacuna tetravalente de Merck, Gardasil para los HPV: 6, 11, 16 y 18 que abarca a los más frecuentes a nivel mundial se espera que disminuya la incidencia de CaCu al combatir a los tipos 16 y 18 que representa el 70% de frecuencia de los HPV de alto riesgo (Muñoz N, 2003; Steinbrook, 2006), y como se observó en el presente trabajo al parecer son los más oncogénicos. Esta vacuna es profiláctica por lo que es útil en aquellas personas que aún no han tenido una vida sexual activa, por lo que su aplicación de tres dosis (0, 2 y 6 meses) se recomienda para niñas entre 11 a 12 años de edad (Steinbrook R, 2006). En nuestro laboratorio, la positividad del HPV en mujeres empleando el método de captura de híbridos es del 40% y de estos el 85% tienen cuando menos un virus del grupo de alto riesgo. Si de estas el HPV fuera el 16 y/o 18 aumentaría el riesgo aún más de tener CaCu. De aquí la importancia de realizar aparte del papanicolaou, la prueba molecular para detección de HPV, ya que se conoce aumenta la sensibilidad a cerca de un 100% ( Maryland M, 2007; ). Actualmente en Europa y Estados Unidos se recomienda realizar ambos estudios a mujeres arriba de los 33 años de edad y si resulta negativo, realizar el estudio cada año, si vuelve a ser negativo entonces el estudio se realizaría cada 3 años, en el caso de que sea positivo el seguimiento se haría cada 6 meses (Davey, 2003). El seleccionar mujeres arriba de 33 años, es porque se ha observado que en mujeres con menor edad es más frecuente encontrar que el virus se remite (Muñoz N, 2003). En nuestro país, si bien, ha disminuido la tasa de mortalidad de 24.97 por 100,000 mujeres en 1990 a 15.46 en el 2005 en mujeres de 25 años y más (Lozano, 2008), el papanicolaou no abarca a todas las mujeres sexualmente activa por problemas de índole social y educativo (Hidalgo-Martínez A, 2006), por lo que se hace necesario establecer mecanismos de información educativa, indicando la importancia de realizarse rutinariamente un estudio citológico.

## II

### **Virus de la Hepatitis C (HCV)**

## II.1 Introducción

El HCV infecta a un estimado de 170 millones de personas en todo el mundo y representa una pandemia viral. Esta infección se transmite principalmente por vía sanguínea, por lo tanto, es factible la transmisión del virus en transfusiones sanguíneas, en el uso de jeringas de adictos a drogas intravenosas, y a través de otros medios de exposición a membranas mucosas o percutáneas (Lauer MG, 2001). Se considera que el 5% de los infectados es por transmisión sexual.

El 80% de los infectados con el HCV desarrollarán la hepatitis crónica y dependiendo de diversos factores como la edad, el género, y consumo de alcohol se manifestará hasta los treinta años, por este motivo, se le conoce como la enfermedad lenta. El 20% de los pacientes crónicos presentarán Cirrosis y el 4% evolucionarán a carcinoma hepático y requerirán de un trasplante de hígado (Lauer MG, 2001; Cruz GJ, 2007).

Este virus presenta 6 genotipos diferentes: 1a, 1b, 2a, 2b/c, 3, 4, 5 y 6. Dependiendo del genotipo es la respuesta que presenta al tratamiento con el interferón, siendo el genotipo 1b el que ofrece mayor resistencia al tratamiento (Lauer, MG, 2001 ).

El HCV pertenece a la familia flavoviridae y está compuesto de una cadena de RNA de 9.5 Kb en sentido positivo que contiene un marco de lectura abierta ORF y dos regiones no traducidas UTR. Este genoma codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,000 aminoácidos, que es cortado en proteínas sencillas por una peptidasa del huésped en la región estructural y en proteasas virales de la región no estructural (NS, siglas en inglés), ver Figura 23. La región estructural contiene la proteína del núcleo (core) y dos proteínas de la envoltura (E1 y E2).

Las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4A tienen función de proteasas, NS3 también funciona como helicasa y NS5B es una RNA polimerasa dependiente de RNA. En la región NS5A se encuentra ubicada la región ISDR que le confiere sensibilidad a interferón (Lauer MG, 2001; Penin F, 2004).

Es en la región no traducida del NS5 la más conservada entre los diferentes genotipos del HCV, y por lo tanto es la más usada para la detección y carga viral mediante el método de PCR.

Diferentes kits comerciales entre ellos el Cobas Amplicor usan esta región NS5 para la amplificación.

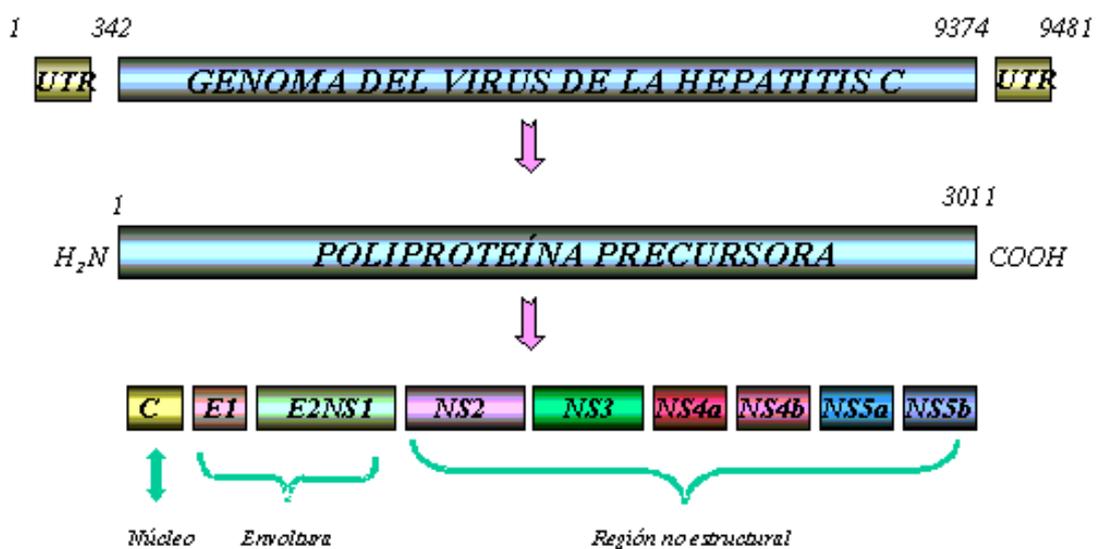


Figura 23. Genoma del Virus de la Hepatitis C. Figura obtenida de Gómez-Cordero I, 2003.

## **Capítulo 4**

### **Detección del Virus de la Hepatitis C**

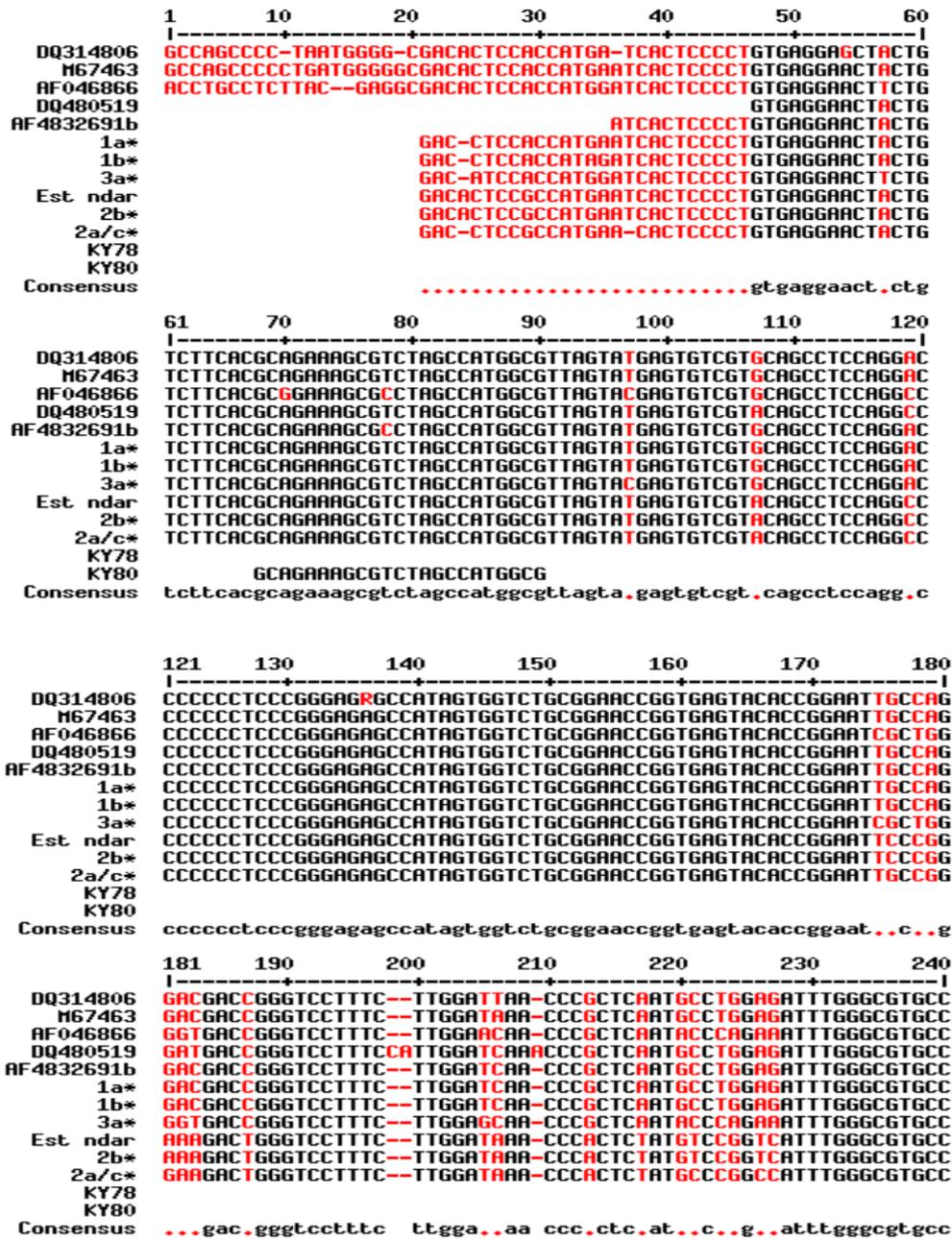
## **4.1 Secuencias de estudio**

En el Laboratorio desarrollamos la prueba de Detección de HCV usando la región NS5, y la selección de los oligonucleótidos se realizó mediante la comparación de las secuencias de la región NS5 entre los diferentes genotipos de la HCV. Las secuencias fueron obtenidas por Internet en el banco de genes del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) en la página [www.nih.gov](http://www.nih.gov); posteriormente después de tener las secuencias de los diferentes genotipos, se empleo el programa Blast de Multialin para la comparación de secuencias de estos genotipos lo que nos permitió identificar las secuencias conservadas. Estas secuencias se enviaron a Applied Biosystems para la síntesis de los oligoucleótidos y sonda TaqMan marcado con FAM. La prueba se realizó por la PCR anidado y por tiempo real en la segunda amplificación.

## **4.2 Alineamiento de secuencias de los genotipos de la HCV**

En el Laboratorio desarrollamos la prueba de Detección de HCV usando la región NS5, y la selección de los oligonucleótidos se realizó mediante la comparación de las secuencias de la región NS5 entre los diferentes genotipos del HCV. Las secuencias fueron obtenidas en Internet en el banco de genes del Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH) en la página [www.nih.gov](http://www.nih.gov); posteriormente después de tener las secuencias de los diferentes genotipos, se empleo el programa BLAST de Multialin para la comparación de secuencias de estos genotipos lo que nos permitió identificar las secuencias conservadas. Estas secuencias se enviaron a Applied Biosystems para la síntesis de los oligoucleótidos y sonda TaqMan marcado con FAM. La prueba se realizó por la PCR anidado y por tiempo real en la segunda amplificación.

Para comenzar con nuestro análisis se realizó un alineamiento de los genomas del virus de la hepatitis C (HCV) más comunes en México empleando el programa Multialin. <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html> (Figura 23).





Mediante este alineamiento obtuvimos una secuencia consenso la cual es conservada en los diferentes genotipos en las bases A,T,G,C, mientras que la bases que no son conservadas se nombraron con la letra N (Figura 24).

```

TCCNCCATNNANCACTCCCCTGTGAGGANCTNCTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCC
ATGGCGTTAGTANGAGTGTCGTNCAGCCTCCAGGNCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAG
TGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATNNCNNGNNGACNNGGTCCTTTCTTGGA
NNAACCCNCTCNAATNNCNNGNNAATTTGGGCGTGCCCCGCNAGANNNCTAGCCGAGTAG
NGTTGGGTNGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTNCNNNGG
AGGTCTCGTAGACCGTGCNNNNCATGAGCACNNNNTCCNAAACCTCAAAGAAAACCAA
ANGNAACACNAACCGNCGCCACANGACGTNAAGTTNCCGGGNGNNGNNCAGATC.

```

Figura 25. Secuencia consenso obtenida a partir del alineamiento de los diferente genotipos del Virus de la hepatitis C.

Esta secuencia se envió a Applied Biosystem para la síntesis de los iniciadores y la sonda TaqMan mediante el servicio: Assay by Design.

### 4.3 Muestras

Para este estudio se analizaron 6 muestras de plasma E.D.T.A. de pacientes con valores de carga viral conocido del cual se realizaron diluciones 1:10 ó 1:20 con solución salina 0.85% p/v y algunas de estas se repitieron de uno a cuatro veces. Otras 12 muestras de plasma E.D.T.A. se enviaron a un laboratorio de referencia: Specialty Laboratories o IBI para su comparación con nuestra metodología. También se analizaron 6 muestras del panel de calidad QHW702 de BBI Diagnostics. De una de estas muestras se obtuvo una concentración de 700 UI/mL y se realizaron diferentes diluciones para determinar la sensibilidad analítica.

#### **4.4 Sistema de amplificación por la PCR**

Una vez recibido este Sistema de Amplificación para la PCR en tiempo real por parte del proveedor, se validó mediante la correlación con un laboratorio externo, usando muestras de plasma que resultaron positivas y negativas por el laboratorio externo, así como de muestras con carga viral conocida y un panel de control de 6 muestras. La primera PCR se realizó mediante el uso de los oligonucleótidos mencionados por Zeuzem, 1998; posteriormente la segunda PCR fue con el uso del Sistema de Amplificación para la PCR en tiempo real.

#### **4.5 Resultados de las pruebas de reproducibilidad**

Se analizaron 6 muestras de plasma E. D. T. A. de pacientes procesados para Carga viral de HCV por PCR en el Cobas Amplicor HCV versión 2.0. Debido a que se conocía su carga viral, estas se emplearon como muestras de control positivo alto y bajo en sus diluciones 1:10 o 1:20 con solución salina 0.85% p/v previo a la extracción. Algunas de estas muestras se repitieron de uno a cuatro veces, así como sus diluciones. En cada corrida analítica se procesó un Control negativo el cual no amplificó en ningún caso. Los resultados se reportan en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados de ensayos de reproducibilidad. Muestras de pacientes empleadas como controles.

<b>Clave paciente/Dilución</b>	<b>Concentración (UI/mL)</b>	<b>Fecha</b>	<b>Resultado</b>
1158820 <sup>a</sup>	690	28ABRIL05	Detectado
1158820 <sup>a</sup> /1:10	69	28ABRIL05	Detectado
1320743 <sup>a</sup>	43800	07MAYO05	Detectado
1320743 <sup>a</sup> /1:10	4380	07MAYO05	Detectado
1280238 <sup>a</sup>	96100	25MAYO05	Detectado
1280238 <sup>a</sup> /1:10	9610	25MAYO05	Detectado
1280238 <sup>a</sup>	96100	10JUN05	Detectado
1280238 <sup>a</sup> /1:10	9610	10JUN05	Detectado
1280238 <sup>a</sup>	96100	18JUN05	Detectado
1280238 <sup>a</sup> /1:10	9610	18JUN05	Detectado
1280238 <sup>a</sup>	96100	29JUN05	Detectado
1280238 <sup>a</sup> /1:10	9610	29JUN05	Detectado
1346617 <sup>a</sup>	345000	22JUL05	Detectado
1346617 <sup>a</sup> /1:10	34500	22JUL05	Detectado
1351695 <sup>a</sup>	2550	26JUL05	Detectado
1351695 <sup>a</sup> /1:20	127	26JUL05	Detectado
1351695 <sup>a</sup>	2550	06AGO05	Detectado
1351695 <sup>a</sup> /1:20	127	06AGO05	Detectado
1345166 <sup>a</sup>	26100	09AGO05	Detectado
1345166 <sup>a</sup> /1:20	1305	09AGO05	Detectado
1345166 <sup>a</sup>	26100	15AGO05	Detectado
1345166 <sup>a</sup> /1:20	1305	15AGO05	Detectado
1345187 <sup>a</sup>	7590	24AGO05	Detectado
1345187 <sup>a</sup> /1:20	380	24AGO05	Detectado
1345187 <sup>a</sup>	7590	05SEP05	Detectado
1345187 <sup>a</sup> /1:20	380	05SEP05	Detectado
1404485 <sup>a</sup>	60100	12SEP05	Detectado
1404485 <sup>a</sup> /1:20	3000	12SEP05	Detectado

En el Laboratorio, la prueba de detección de HCV se enviaba a maquilar a un Laboratorio externo en Estados Unidos (Specialty o IBI), de estas muestras se tomó una alícuota de 1 mL de plasma y se procesaron con la metodología desarrollada. Los resultados se reportan en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados de ensayos de reproducibilidad. Comparación de resultados obtenidos con laboratorios externos de algunas muestras. ND= No detectado; D= detectado.

<b>Consecu- tivo</b>	<b>Clave paciente</b>	<b>Resultado Specialty</b>	<b>Resultado IBI</b>	<b>Resultado obtenido</b>
1	1110781 <sup>a</sup>	ND	-	ND
2	1014408 <sup>a</sup>	-	D	ND
3	2959 <sup>a</sup> 083	D	-	ND
4	1210946 <sup>a</sup>	ND	-	ND
5	1070586 <sup>a</sup>	ND	-	ND
6	1110781 <sup>a</sup>	ND	-	ND
7	1143447 <sup>a</sup>	ND	-	ND
8	1070586 <sup>a</sup>	ND	-	ND
9	1105079 <sup>a</sup>	ND	-	ND
10	1185193 <sup>a</sup>	D	-	D
11	1130621 <sup>a</sup>	ND	-	ND
12	AB109977	D	-	D

#### 4.6 Resultados de las pruebas de sensibilidad analítica

Se utilizó un panel de evaluación para HCV RNA Qualification Panel QHW702 de la empresa BBI Diagnostics y se empleó un método de extracción menos eficiente al utilizado normalmente en este proceso debido a la escasez de este material. Los resultados obtenidos pueden consultarse en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de ensayos de sensibilidad. ND= No Detectado; D=Detectado..Series de resultados obtenidos con material de control comercial

\*El fabricante indica que este valor es calculado.

<b>Control</b>	<b>Concentración (UI/mL)</b>	<b>Resultado</b>
QHW702-01	-	ND
QHW702-02	200 *	D
QHW702-03	5000	D
QHW702-04	8000	D
QHW702-05	40000	D
QHW702-06	100000	D

Con la finalidad de determinar el límite de detección se preparó una dilución a partir del control QHW702-03 (Concentración inicial 5000 UI/mL) con plasma negativo hasta una concentración final de 700 UI/mL. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 empleando plasma negativo para RNA de HCV. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados de ensayos de sensibilidad. Serie de resultados obtenidos a partir de diluciones de material de control comercial QHW702-03  
D= Detectado; ND= No Detectado.

<b>Concentración teórica(UI/mL)</b>	<b>Volumen del control (uL)</b>	<b>Volumen de plasma negativo (uL)</b>	<b>Resultado</b>
700	140	-	D
350	70	70	D
175	35	105	D
70	14	126	D
25	5	135	D
-	-	140	ND

Se realizó a partir de un pool de plasmas de resultados indetectables de HCV y del material de control QHW702-04 (8000 UI/mL) una solución de concentración teórica 25 UI/mL RNA HCV. Se procesó por quintuplicado. Los resultados obtenidos véanse en la tabla 20.

Tabla 20. Resultados de ensayos de sensibilidad.

<b>No. Réplica concentración teórica 25UI/mL RNA VHC</b>	<b>Resultado</b>
1	Detectado
2	Detectado
3	No Detectado
4	No Detectado
5	No Detectado

Especificidad. La secuencia blanco de los iniciadores utilizados en este método son 100% específicos del genoma del HCV.

## 4.7 Discusión

De los resultados de las pruebas de reproducibilidad:

1.- El método no presenta variación en cuanto al resultado cualitativo obtenido. Se encontró un 100% de reproducibilidad para muestras con concentración 69-345,000 UI/mL RNA HCV (resultados de la tabla 1).

2.- A partir de los resultados de comparación con dos laboratorios de referencia se determinó la sensibilidad y especificidad clínica (considerando los resultados de los laboratorios externos como verdaderos, resultados tabla 2).

Sensibilidad clínica=67%

Especificidad clínica=100%

De los resultados de las pruebas de sensibilidad analítica:

1.- Límite de detección tentativo de 25 UI/mL, determinado a partir de las réplicas analizadas (tabla 5) debido a que sólo se detectó RNA de HCV en 2/5 de las réplicas.

Por lo tanto se considera que el límite de detección es de 50 UI/mL, soportado por los resultados que se muestran en las tablas 3 y 4.

## 4.8 Comentarios

Este método permite detectar el virus de la hepatitis C a partir de 50 UI/mL siendo reproducibles los resultados. Actualmente se realiza el control de calidad externo mediante muestras que nos envía el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), tres veces al año y del cual hemos concordado al 100%. Este Colegio realiza comparaciones con cientos de laboratorios alrededor del mundo.

## Capítulo 5

### Carga viral del Virus de la Hepatitis C

## 5.1 Resumen

Una vez obtenida la prueba de detección de la Hepatitis C, se procedió a realizarla cuantitativa mediante la correlación con el sistema comercial Cobas Amplicor de HCV versión 1.5. Se utilizó la secuencia conservada de la región NS5, y fue utilizada para el diseño de los oligonucleótidos y la sonda Taqman empleando el programa Primer3plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. La secuencia de los oligonucleótidos y la sonda Taqman se enviaron a Applied Biosystem para su síntesis. se probaron varios diseños de sondas solicitadas a Applied Biosystems hasta que finalmente se obtuvo una óptima, de la cual se escribe su desarrollo. Este trabajo corresponde a la Tesis para obtener el Título de Q.F.B. de García Lilia (García L, en preparación).

## 5.2 Muestras

Se usaron muestras de pacientes positivos para: HCV, HBV, Virus de hepatitis A, parvovirus B19, Epstein Barr Virus (EBV), Citomegalovirus CMV, Herpes simple, HPV, Neisseria y Mycobacterium. Para probar si los iniciadores funcionaban, se utilizaron 8 muestras positivas confirmadas por la PCR en tiempo real y por el instrumento Cobas Amplicor, posteriormente se utilizaron las muestras positivas diferentes al HCV para demostrar la especificidad analítica, así como 4 muestras con genotipo 1b y 2a previamente determinado por el laboratorio de referencia Specialty Laboratorios y por los genotipos: 2b, 3<sup>a</sup>, 1b, 2a/c, 1a de de controles Armored del proveedor Asuragen. La linealidad y la sensibilidad analítica del método se determinó con amplificaciones por triplicado de diluciones de una muestra con carga viral de HCV de 770,000 UI/mL y 175,000 UI/mL respectivamente. La correlación entre la PCR en tiempo real y Cobas Amplicor

fue con el uso de 36 muestras, mientras que la variación intraensayo e interensayo fueron con 19 y 5 muestras respectivamente.

### **5.3 Extracción de RNA viral**

La extracción se realizó mediante el kit comercial QIAamp UltraSens Virus, y de acuerdo a las indicaciones del inserto del proveedor.

### **5.4 Ensayo inicial de los oligonucleótidos y sonda para la HCV**

Una vez que llegaron los oligonucleótidos y la sonda, se prepararon a una concentración de 600nm para los oligonucleótidos y 100nm para la sonda.

Se probó el sistema de amplificación y cuantificación de la PCR en tiempo real para la HCV, empleando diferentes muestras confirmadas como positivas para HCV por el método de la PCR-en tiempo real mencionado anteriormente y por el instrumento Cobas Amplicor de Roche.

### **5.5 Reacción de amplificación**

La PCR en tiempo real se realizó en tubos individuales para cada muestra teniendo un volumen final de 20  $\mu$ L por reacción con la siguiente composición (Tabla 21):

Tabla 21. Mezcla de reacción de la PCR en tiempo real.

Reacción de PCR en tiempo real		
	Reacción	Conc. Final
Enzima SuperScript III RT	0.4	1X
2x Reaction Mix	10.0	1X
Mezcla TaqMan VHC1	1.0	1X
Mezcla TaqMan VN	0.3	1X
Agua	1.3	
Volumen final por tubo:	13.0	
RNA templado:	7	

Al ser sometidas a la PCR en tiempo real las muestras, el amplificado obtenido fue el siguiente (Figura 26 y 27) :

Amplificado de 110 pares de bases.

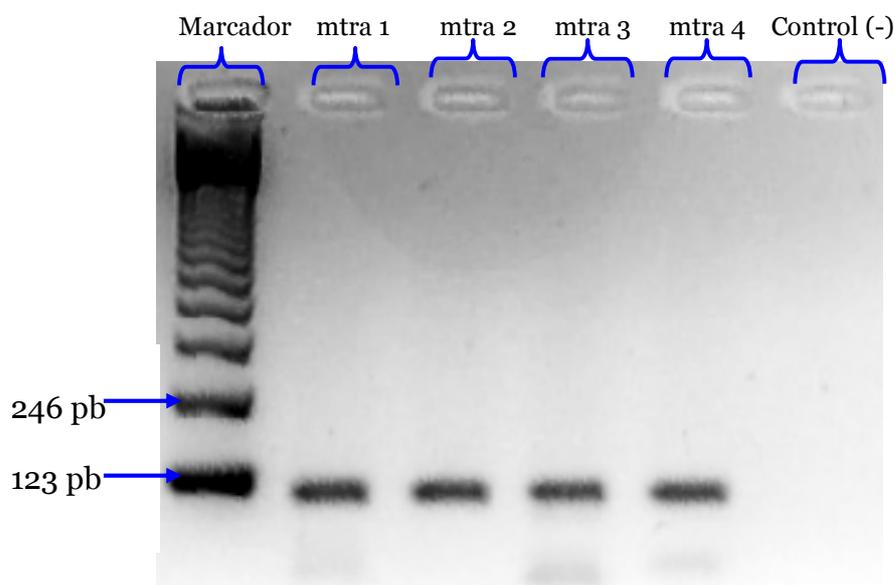
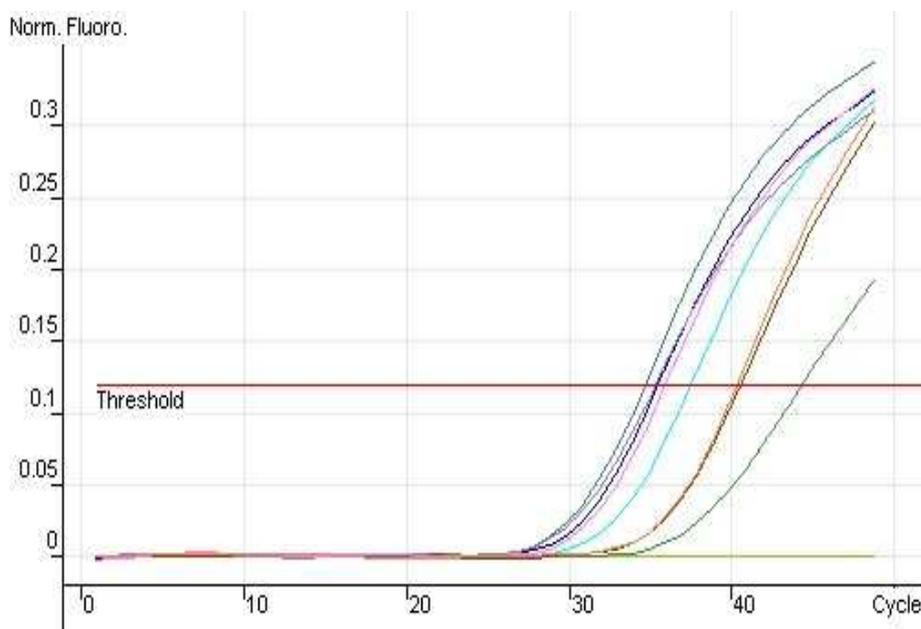


Figura 26. Amplificado de RNA de 110 pb de la región conservada del virus de la hepatitis C en gel de agasora al 2%



No.	Color	Name	Type	Ct
22	■	Control Negativo VHC	Unknown	
23	■	HCV- Muestra- 1	Unknown	44.53
24	■	HCV- Muestra- 2	Unknown	37.69
25	■	HCV- Muestra- 3	Unknown	35.68
26	■	HCV- Muestra- 4	Unknown	34.88
27	■	HCV- Muestra- 5	Unknown	40.74
28	■	HCV- Muestra- 6	Unknown	35.49
29	■	HCV- Muestra- 7	Unknown	36.12
30	■	HCV- Muestra- 8	Unknown	40.52

Figura 27. Gráfica que muestra la señal de fluorescencia consecuencia de la presencia del HCV contra el número de ciclos de la PCR en tiempo real.

La señal de fluorescencia para todas las muestras es positiva, lo que indica buena detección del virus de hepatitis C, del mismo modo el producto de amplificado es el esperado.

## 5.6 Especificidad analítica

El ensayo de la especificidad de los oligonucleótidos y la sonda utilizados en la PCR para reconocer únicamente a la secuencia de Hepatitis C se evaluó mediante la realización de una corrida con diferentes tipo de extracciones de RNA o DNA de muestras positivas para: Virus de Hepatitis A y hepatitis B, Virus de Papiloma Humano, Trichomona, Mycobacteria, Neisseria sp, Epstein Barr, Parvovirus B19, Herpes tipo I y II, Citomegalovirus y Virus de Inmunodeficiencia Humana (Figura 28).

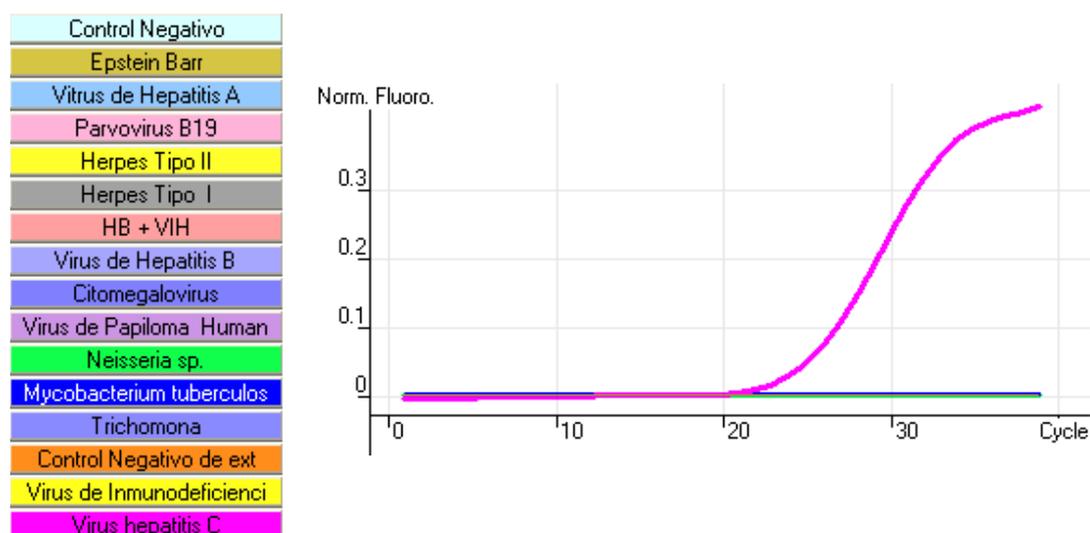


Figura 28. Gráfica y tabla de las señales de fluorescencia para diferentes tipos de RNA o DNA virales. Como observamos en la figura únicamente hay señal de fluorescencia para la muestra que tiene VHC, lo que nos indica especificidad de los primer y sonda al virus de la Hepatitis C sin que reconozca a otro tipo de secuencias nucleotídicas.

No.	Colour	Name	Type	Ct
2		50 µl	Unknown	
3		200 µl	Unknown	30.25
4		500 µl	Unknown	28.89
5		1000 µl	Unknown	29.36
7		50 µl	Unknown	
8		200 µl	Unknown	32.43
9		500 µl	Unknown	30.29

### 5.7 Determinación del volumen de plasma utilizado para realizar la extracción del RNA viral

Se realizaron extracciones de Virus de hepatitis C de una muestra positiva utilizando diferentes volúmenes de plasma: 50 µl, 200 µl, 500 µl, 1000 µl. Se realizó la PCR en tiempo real por

triplicado para cada volumen (Figura 29).

10		1000 $\mu$ l	Unknown	30.91
12		50 $\mu$ l	Unknown	
13		200 $\mu$ l	Unknown	29.93
14		500 $\mu$ l	Unknown	28.86
15		1000 $\mu$ l	Unknown	28.44

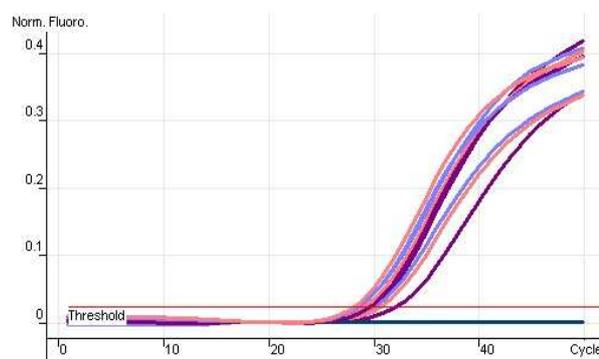


Figura 29. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real de extracciones virales realizadas a partir de diferentes volúmenes de muestra.

La extracción de RNA que presenta una mejor señal de fluorescencia fue a partir de 500  $\mu$ l de muestra. Se establece como 500  $\mu$ l el volumen que se utilizará para la extracción de RNA viral.

## 5.8 Determinación de la concentración de oligonucleótidos

Se realizaron ensayos para determinar HCV de muestras positivas, utilizando diferentes concentraciones de oligonucleótidos: 300 nmoles, 450 nmoles y 600 nmoles.

No.	Colour	Name	Type	Ct
2	■	450nm	Unknown	
3	■	450nm	Unknown	28.34
4	■	450nm	Unknown	27.81
5	■	450nm	Unknown	27.58
7	■	225nm	Unknown	
8	■	225nm	Unknown	31.72
9	■	225nm	Unknown	29.35
10	■	225nm	Unknown	30.02
12	■	900nm	Unknown	
13	■	900nm	Unknown	28.80
14	■	900nm	Unknown	27.67
15	■	900nm	Unknown	27.35

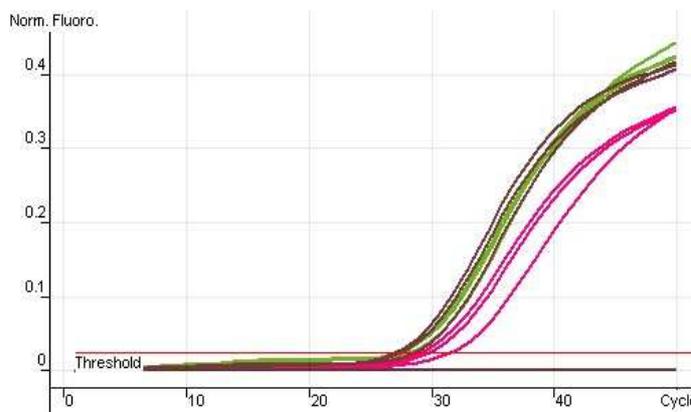
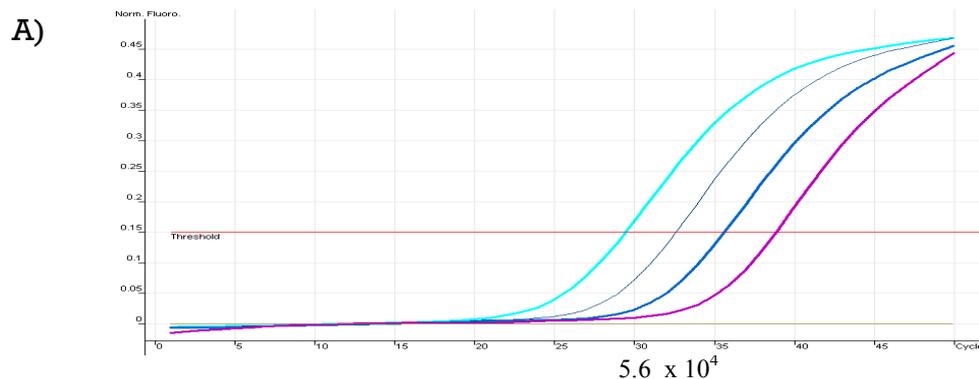


Figura 30. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real variando la concentración de oligonucleótidos

La mejor señal de fluorescencia se presentó cuando se emplea una concentración de 450 nanomoles, un exceso no favorece la reacción ya que la señal es la misma mientras, una disminución a 300 nanomoles reduce la señal de fluorescencia de la misma muestra.

## 5.9 Linealidad

La linealidad fue determinada realizando diluciones de una extracción de RNA viral de plasma con carga viral de HCV conocida (Figura 31).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)	% Var
1		Control Negativo	Negative Control				
2		770000	Standard	29.52	770,000.00	769,735.11	0.0%
3		77000	Standard	32.69	77,000.00	74,950.68	2.7%
4		7700	Standard	35.70	7,700.00	8,135.22	5.7%
5		770	Standard	38.94	770.00	748.99	2.7%
6		77	Standard		77.00		

B)

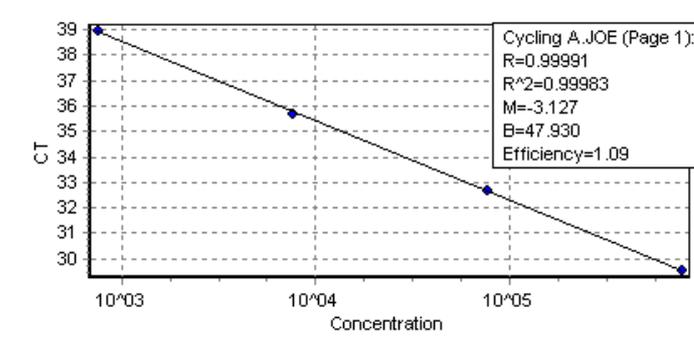


Figura 31. Gráfica de linealidad de la carga viral de HCV. A) Concentraciones empleadas en la curva; B) Correlación lineal de la curva.

La curva obtenida tiene un buena linealidad ya que el coeficiente de correlación es de 0.9999

## 5.10 Detección de los diversos genotipos de la hepatitis C

No.	Colour	Name	Type
-----	--------	------	------

En la detección de los diferentes genotipos del virus de la hepatitis C por nuestro método, resultó exitosa cuando se compara para el genotipo 1b y 2a de las extracciones virales de muestras previamente tipificadas en Speciallty, así como en el uso de un panel control empleado para genotipo de HCV, el cual tiene los genotipos: 2b, 3a, 1b, 2a/c, 1a.

### 5.11 Límite de detección

Se realizó la dilución de una muestra con carga viral conocida y se hace la detección por triplicado, la detección es exitosa hasta 175 U/ml de Virus de la Hepatitis C (Figura 32).

### 5.12 Correlación PCR en tiempo real Vs. Cobas Amplicor

Para realizar nuestra correlación se realizó extracciones de 36 muestras y fueron sometidas a PCR en tiempo real y el valor de copias obtenidas por éste método fue comparado con el obtenido por el Cobas Amplicor obteniendo un resultado de  $r=0.94$  (Tabla 22 y Figura 33).

1	■	N	Negative Control
2	■	175000	Unknown
3	■	17500	Unknown
4	■	1750	Unknown
5	■	525	Unknown
6	■	525	Unknown
7	■	525	Unknown
8	■	350	Unknown
9	■	350	Unknown
10	■	350	Unknown
11	■	175	Unknown
12	■	175	Unknown
13	■	175	Unknown
14	■	52.5	Unknown
15	■	52.5	Unknown
16	■	52.5	Unknown

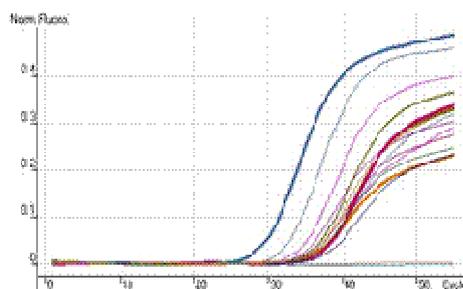


Figura 32. Gráfica y tabla que muestra la señal de fluorescencia contra el número de ciclos de PCR en tiempo real de muestras a diferente concentración de carga viral expresada en UI/ml.

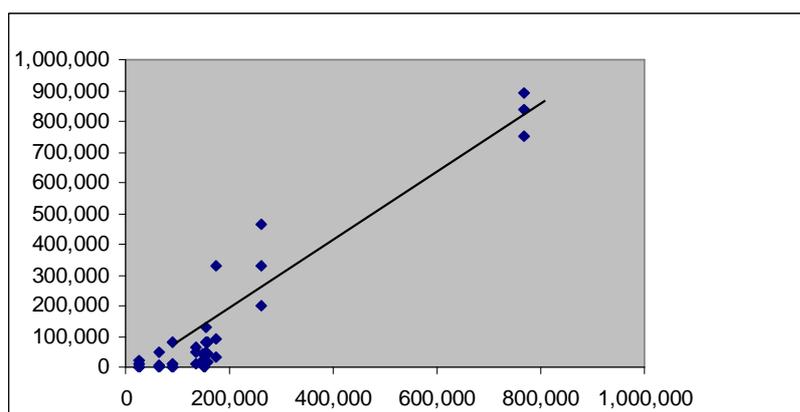


Figura 33. Gráfica que muestra la correlación de la carga viral obtenida por PCR tiempo real Vs Cobas Amplicor

Tabla 22 . Correlación entre el Cobas Amplicor y la PCR en tiempo real.

<b>Muestra</b>	<b>Carga viral Cobas Amplicor</b>	<b>Log</b>	<b>Carga viral PCR en tiempo real</b>	<b>Log</b>	<b>Diferencia log</b>
1	25,200	4.4	21,631	4.3	0.1
2	63,200	4.8	47,239	4.7	0.1
3	90,300	5.0	79,935	4.9	0.1
4	147,000	5.2	44,418	4.6	0.5
5	261,000	5.4	465,968	5.7	0.3
6	25,200	4.4	10,597	4.0	0.4
7	63,200	4.8	7,301	3.9	0.9
8	769,000	5.9	894,224	6.0	0.1
9	154,000	5.2	82,476	4.9	0.3
10	157,000	5.2	80,801	4.9	0.3
11	173,000	5.2	331,794	5.5	0.3
12	137,000	5.1	65,115	4.8	0.3
13	150,000	5.2	5,363	3.7	1.4
14	90,300	5.0	13,348	4.1	0.8
15	147000	5.2	8,979.87	4.0	1.2
16	261000	5.4	202,416.21	5.3	0.1
17	25200	4.4	582.95	2.8	1.6
18	63200	4.8	1,599.44	3.2	1.6
19	769000	5.9	749,602.93	5.9	0.0
20	154000	5.2	46,195.90	4.7	0.5
21	157000	5.2	14,104.82	4.1	1.0
22	173000	5.2	33,291.76	4.5	0.7
23	137000	5.1	10,403.85	4.0	1.1
24	150000	5.2	1,842.84	3.3	1.9
25	90300	5.0	745.3	2.9	2.1
26	147000	5.2	20,296.66	4.3	0.9
27	261000	5.4	329,343.34	5.5	0.1
28	25200	4.4	2,443.05	3.4	1.0
29	63200	4.8	5,042.67	3.7	1.1
30	769000	5.9	837,359.08	5.9	0.0
31	154000	5.2	130,314.96	5.1	0.1
32	157000	5.2	45,314.11	4.7	0.5
33	173000	5.2	93,907.48	5.0	0.3
34	137000	5.1	50,124.72	4.7	0.4
35	150000	5.2	4,105.82	3.6	1.6
36	90300	5.0	535.98	2.7	2.2

### 5.13 Variación intraensayo

La variación intraensayo fue evaluada al determinar la carga viral de HCV por la PCR en tiempo real de diferentes muestras realizando la extracción y la determinación de carga viral por triplicado (Tabla 23).

Tabla 23. Variación intraensayo por triplicado de 19 muestras.

N° Muestra	1er lectura	2da lectura	3er lectura	promedio	DS	CV
1	3,496	2,606	2,417	2,840	576	20%
2	16,520	18,567	12,843	15,977	2,901	18%
3	138,493	61,259	174,715	124,823	57,950	46%
4	37,115	34,389	44,028	38,510	4,969	13%
5	4,497	4,645	6,634	5,259	1,193	23%
6	102,257	124,738	141,779	122,925	19,823	16%
7	5,510	4,681	3,012	4,401	1,272	29%
8	25,128	26,915	18,236	23,426	4,583	20%
9	220,234	252,239	287,023	253,165	33,404	13%
10	130,104	164,462	156,303	150,290	17,951	12%
11	53,389	57,331	89,308	66,676	19,698	30%
12	58,376	102,384	81,522	80,761	22,014	27%
13	2,949	2,874	4,000	3,274	630	19%
14	19,934	20,751	14,548	18,411	3,371	18%
12	149,012	162,032	192,229	167,758	22,170	13%
16	64,983	112,079	120,384	99,149	29,878	30%
17	49,151	44,055	54,167	49,124	5,056	10%
18	2,233	2,988	2,104	2,442	478	20%
19	36,555	41,639	23,762	33,986	9,211	27%

### 5.14 Variación interensayo

La variación interensayo fue evaluada al determinar la carga viral de HCV por PCR en tiempo real de diferentes muestras en tres días diferentes (Tabla 24).

Tabla 24. Variación interensayo por triplicado de 5 muestras.

muestra	promedio	DS	CV
1	3,504.79	1036.24	30%
2	19,271.30	4584.20	24%
3	181,915.16	66652.89	37%
4	51,436.83	16165.44	31%
5	3,720.88	1917.34	52%

Obteniendo un coeficiente de variación de 24- 52%.

## 5.15 Discusión

El método demostró ser específico para el HCV al no tener reacción cruzada con los patógenos frecuentes en plasma y con muestras negativas verificadas por otros laboratorios de referencia (Specialty laboratories ó IBI). La linealidad mostró ser de 175 a 770,000 UI/mL, y una variabilidad intra e inter ensayo de 12-46% y de 24-52% respectivamente. El volumen de muestra de plasma necesario para realizar la carga viral de HCV se determinó de 500 mL, el cual permite tener las especificaciones mencionadas.

## 5.16 Comentarios

La biología molecular es un área que permite desarrollar la detección cualitativa y cuantitativa del virus de la hepatitis C (HCV), ensayo que nos permite el monitoreo del progreso del virus en las personas infectadas y/o el avance del tratamiento.

Este método se valida realizando la cuantificación de muestras clínicas por nuestro procedimiento (PCR en tiempo real) y los resultados fueron comparados con los obtenidos con Cobas Amplicor, obteniendo un alto coeficiente de correlación de 0.94.

### **III**

## **La enfermedad de Alzheimer**

### III.1 Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia progresiva que tiene el déficit de memoria como uno de sus síntomas más tempranos y pronunciados. Por lo general, el paciente empeora progresivamente, mostrando problemas perceptivos, del lenguaje y emocionales a medida que la enfermedad va avanzando. Esta enfermedad es la cuarta causa de muerte en las naciones industrializadas y es la más común de las demencias en adultos mayores afectando aproximadamente el 10% en individuos >65 años y 47% en aquellos >85 años (Forsythe E, 1998). La enfermedad debe su nombre al médico alemán Alois Alzheimer quien en 1907 publicó en una revista médica el caso de una mujer de 51 años de edad que había muerto después de cuatro años de padecer una demencia muy grave (Forsythe E, 1998). El estudio patológico del cerebro de esta paciente, evidenció una marcada atrofia de la corteza con el ensanchamiento de las cisternas. Los cortes histológicos que habían sido teñidos con técnicas argénticas (sales de plata) mostraron en el parénquima una abundante y masiva degeneración en la cual se destacaba **dos tipos de estructuras** particulares. Una de ella tenía forma de mancha por lo que fue nombrada **placa senil** (PS) formada de depósitos de péptidos amiloide  $\beta$  y la otra se caracterizaba por su forma de “flama” o **maraña neurofibrilar** (MNF) compuesto de proteínas tau hiperfosforiladas, tubulina y ubiquitina. Debido a que este caso fue la primera descripción detallada y formal de una demencia con posibles causa neurológicas, tuvo como consecuencia que la comunidad médica de aquellos tiempos pensará que había un tipo de demencia que no podía ser explicado sólo por el envejecimiento normal, sino que representaba una verdadera entidad neurodegenerativa (Forsythe E, 1998). En la actualidad su importancia es tal que el número de casos se estimó, en el 2002, en 18 millones. Aunque es más

común en las naciones desarrolladas se espera que en menos de 30 años dos terceras partes de los casos de la EA en el mundo estarán en los países en vías de desarrollo, uno de ellos es México. La EA de acuerdo a su evolución presenta cuatro tipos de estadios:

**Estadio 0:** Caracterizado por independencia en el trabajo, compras, finanzas y actividad social.

**Estadio 1:** Aparición de negligencia moderada y dificultades para encontrar palabras además de: pérdida de objetos, olvido de nombres de familiares, frecuencia del fenómeno "tenerlo en la punta de la lengua" y pérdida de la percepción espacial expresada en no saber volver a casa.

**Estadio 2:** Frecuentes y severas quejas de pérdida de memoria y lenguaje, incapacidad de funcionar independientemente fuera del hogar. Comienzan a requerir asistencia para higiene, vestirse y alimentación.

**Estadio 3:** Dejan de reconocer a su pareja, hijos e incluso su propio reflejo en el espejo. Comienzan a sufrir de mutismo o balbuceo incoherente. Presentan alucinaciones, delirios y conductas excéntricas tales como almacenar de todo. También comienzan a darse convulsiones, incontinencia y reflejos infantiles.

### **Genética molecular**

La etiología de la EA se desconoce por lo que no se ha podido hasta ahora encontrar un tratamiento eficaz para tratar a los enfermos. Debido a su presencia, la EA puede llegar a representar hasta el 80% de los casos de demencia que no tienen tratamiento. A pesar de que se desconoce la causa determinante de la enfermedad, existen tres principales factores de riesgo que han sido identificados. El primero de estos

factores es el envejecimiento. Sólo por el simple hecho de envejecer, a partir de los 65 años de edad, la enfermedad de Alzheimer aparece y su presencia se duplica cada cinco años, los otros dos factores son de tipo genético y ambiental.

La presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la Apolipoproteína E (ApoE) es el principal factor de susceptibilidad genética que ha sido identificado (Rosenberg RN, 2000). E2 esta asociado con el desorden genético de hiperlipoproteinemia tipo III ( Havel R, 1994). E4 esta implicado en la EA.. Los homocigotos E4/E4 tienen ocho veces más de riesgo de padecer la enfermedad que los que no tienen ese alelo. Esto quiere decir que la presencia del alelo  $\epsilon 4$  no produce la enfermedad, sino que sólo predispone a padecerla (Rosenberg RN, 2000). Estudios recientes han demostrado que el alelo  $\epsilon 4$  también se asocia a susceptibilidad a demencia de tipo vascular y otras vasculopatías. El ambiente es considerado otro importante factor de riesgo para padecer la enfermedad de Alzheimer. La complejidad de determinar los factores ambientales en la población abierta ha limitado entender cómo interaccionan esta serie de factores. En general, se asume que ninguno de estos tres factores, aunque predisponen a la EA la pueden predecir. Familias afectadas por este tipo de factores dan lugar a la enfermedad de Alzheimer de presentación tardía y esporádica. La heterogeneidad genética de la EA se encuentra muy bien establecida. Hay subtipos de la EA producidos por lo menos por tres genes, lo que quiere decir que, en realidad, existen tres subtipos genéticos de la EA. Las mutaciones que producen la enfermedad familiar y que se heredan de manera autosómica dominante se han encontrado en los genes que codifican para la proteína precursora del amiloide  $\beta$  (cromosoma 21), presenilina 1 (cromosoma 14) y presenilina 2 (cromosoma 1). No obstante, la existencia de estos casos hereditarios, el número de los casos es muy bajo en comparación con los que se relacionan con factores de riesgo. Las familias afectadas con mutaciones en este

tipo de genes dan lugar a la enfermedad de Alzheimer de presentación temprana (Rosenberg RN, 2000).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico se basa en pruebas escritas y verbales para conocer las funciones mentales, así como el conocimiento de la ocurrencia de algunos de los aspectos de los estadios en la evolución de la EA mencionados previamente. Otros apoyos al diagnóstico son la tomografía del cerebro que aporta datos sobre la destrucción neuronal, la determinación de los niveles de péptidos amiloide  $\beta$  (PA) y proteína Tau en líquido cefalorraquídeo (existe una correlación inversa entre el incremento de la proteína Tau y disminución de PA en pacientes con EA. Existe el 85% de sensibilidad y especificidad para diferenciar entre EA y degeneración frontotemporal) y estudios sobre el genotipo de la Apo E en los casos de Alzheimer de presentación tardía, esto con la finalidad de conocer si el paciente presenta el alelo  $\epsilon 4$  asociado con esta enfermedad, o bien, en individuos normales conocer si se es susceptible de presentar la EA. Un 40-65% de pacientes con Alzheimer heredaron al menos de sus padres un alelo E4 (Prince M, 1996; Tapiola T, 2000;). En los casos de pacientes con Alzheimer de presentación temprana lo más apropiado es el análisis genético de las mutaciones en los genes: proteína precursora del amiloide  $\beta$ , presenilina 1 y presenilina 2. Sin embargo, en algunos casos el diagnóstico definitivo se establece en una autopsia después de su muerte en la búsqueda de las placas seniles y de las marañas neurofibrilares.

### **Dislipidemias**

Los lípidos tienen diferentes funciones vitales en nuestro organismo, el colesterol y fosfolípidos forman parte de las membranas celulares. El colesterol es precursor de hormonas esteroidales y de ácidos biliares; circulan en la sangre formando complejos lipoproteicos llamados lipoproteínas las cuales están compuestas por un núcleo central de triglicéridos y ésteres de colesterol (lípidos no polares), revestido

por una capa de proteínas, fosfolípidos y colesterol libre, estos complejos son un medio de transporte y reservorio circulante para los lípidos (Havel R, 1994). La Apo E es una de las varias proteínas que forman las lipoproteínas. Apo E es un constituyente fundamental de remanentes de Quilomicrones, lipoproteínas de muy baja (VLDL) y de alta densidad (HDL). La Apo E interactúa con los receptores de lipoproteínas (LRP-Receptor Related Protein, receptores ApoE y los receptores de lipoproteínas de baja densidad) permitiendo la captación, degradación y uso de colesterol de los lipoproteínas por las células. La dislipidemias son trastornos en el metabolismo de los lípidos causadas por factores genéticos y/o ambientales como la edad, sexo, dieta y obesidad. La hiperlipidemia (HPL) de tipo III se caracteriza tanto por el aumento de colesterol y triglicéridos con la elevación de VLD y  $\beta$ -VLDL debido a la acumulación de remanentes de liproteínas. Estos pacientes poseen una alta incidencia de enfermedades coronarias y arteriales con alto riesgo de sufrir aterosclerosis prematura (Burnside N, 2005).

La HPL de tipo III usualmente se relaciona con pacientes que son homocigotos E2, aunque se sugiere que varios son los factores para su expresión.

### **Apolipoproteína E**

El gen de Apo E se esta localizado en el cromosoma 19, se encuentra cerca y ligado a los genes de Apo CI/CII. Este gen está formado por cuatro exones y tres intrones,

con una extensión de 3,597 nucleótidos, es polimórfico con tres alelos:  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4$ , y codifica tres isoformas de la proteína: normal E3; disfuncional E2 y E4 (Das H, 1985). Estos alelos se heredan de forma codominante dando como resultados seis genotipos: E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4, E3/4. Apo E3 es la isoforma de la proteína más común con una frecuencia de 77%, Apo E2 tiene una frecuencia de 8 – 11 % y Apo E4 de 12 – 15% en la población mundial. La isoforma E2 difiere de la E3 por el cambio de un aminoácido de Arg por Cys en la posición 158 la cual es la

región de unión a receptores celulares, reduciendo la capacidad de unión a los mismos originando un ineficiente transporte e intercambio de lipoproteínas (Das H, 1985). Estas isoformas difieren uno del otro únicamente por sustituciones de un aminoácido en las posiciones 112 y 158, pero tienen una profunda consecuencia fisiológica.

## Capítulo 6

### Genotipo de la Apolipoproteína E

## 6.1 Resumen

El análisis de la Apo E tiene una asociación con la EA, y si bien, no es determinante para que el Alzheimer se presente, juega un papel de susceptibilidad. Así mismo, se ha asociado en dislipidemias y por lo tanto esta proteína tiene un factor de riesgo en ambas enfermedades. Se enviaron a sintetizar los oligonucleótidos del gen ApoE que se encuentran aledaños al sitio de los codones que dan la diferencia a las diferentes isoformas (Arg por Cys en posición 158). Una vez que se amplifica esta región de la ApoE se corta con la enzima de restricción Hha I permitiendo mediante corrimiento en un gel de acrilamida al 12% la identificación de las bandas de diferente tamaño, y de esta manera determinar los alelos heredados por vía materna y paterna respectivamente (Reymer PW, 1995) . La metodología empleada consiste en un RFLP (ver metodologías moleculares). Se validó la prueba mediante el análisis en la población mexicana con la finalidad de detectar los tres alelos de la ApoE y a su vez conocer su frecuencia alélica en nuestra población. Así mismo se realizó un análisis de los genotipos de ApoE con respecto a pacientes dislipidémicos.

## 6.2 Muestras individuos normales y dislipidémicos

### Grupo control.

Se procesaron 50 individuos de la población mestiza mexicana sin antecedentes de dislipidemias y Alzheimer, entre 20 y 40 años de edad. Estas muestras se obtuvieron de donadores voluntarios de muestras de sangre total, las cuales se registraron.

### Grupo de estudio.

Se procesaron 50 individuos con niveles de triglicéridos > 200 mg/dL y de colesterol > 250 mg/dL, VLDL y HDL.

## 6.3 Extracción de DNA genómica

A partir de 5 mL de sangre periférica con EDTA o ACD, empleando el Kit Gene Catcher de Invitrogen.

## 6.4 PCR de la Apolipoproteína E (ApoE)

A partir del DNA genómico obtenido y usando los iniciadores específicos para la amplificación de la secuencia variable de 263 pb (ver Figura 34).

La amplificación consta de una desnaturalización a 94°C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de: 94°C durante 30 seg; 60°C durante 1 minuto; 72°C durante 1 minuto y finalmente para terminar la polimerización a 72°C durante 3 minutos. La mezcla de reacción de PCR contiene 0.1 mM de dNTPs 10 mM, 10% DMSO 100%, 1X de Buffer de PCR 10x (Invitrogen), 0.5 U de TaqDNA polimerasa 5U/uL (invitrogen), 50 pmoles de cada uno de los iniciadores, 7 uL de DNA (dilución 1:10) y la cantidad de agua libre de nucleasas suficiente para un volumen final de 20 uL.

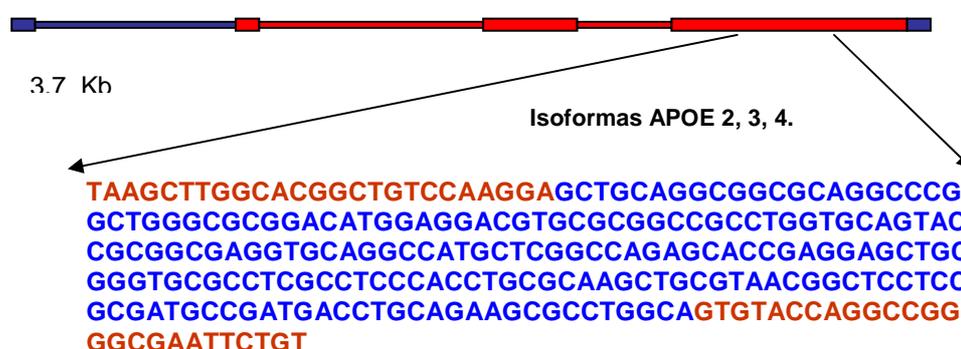


Figura 34. Amplificación del polimorfismo de la ApoE. La amplificación se realiza mediante los iniciadores marcados en negritas.

## 6.5 Polimorfismos de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Empleando el análisis de RFLP, se fragmenta el DNA que se amplificó por PCR empleando la enzima de restricción Hha I que reconoce la secuencia GCGC (ver figura 35). La restricción se realiza en un volumen final de 20 uL el cual contiene 10 uL del amplicón de la ApoE, 2uL de Buffer 10X, 0.5 uL de la enzima HhaI 5U/uL y 7.5 uL de agua libre de nucleasas a una temperatura de 37°C durante 2 horas.

```

TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCG
GCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGCGCGGCCGCCTGGTGCAGTAC
CGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGC
GGGTGCGCCTGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAACGGCTCCTCC
GCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCG
GCGAATTCTGT

```

Figura 35. Polimorfismo de la ApoE. El amplicón de la PCR obtenido utilizando los iniciadores marcados con negritas contiene el polimorfismo presente en la posición 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos. Estos polimorfismos se detectan mediante corte con la enzima HhaI que corta en la secuencia marcada con negritas y subrayada.

## 6.6 Detección de los polimorfismos

El polimorfismo ocurre ya que las diferencias en la secuencia (cambio de las bases) genera o elimina un sitio de corte (ver figura 35). Dependiendo de los sitios de corte de la enzima de restricción, se generan diferentes fragmentos que se detectan mediante su migración en un corrimiento electroforético de un gel de acrilamida al 12 % y por tinción con solución de bromuro de etidio 0.2 mg/L durante 10 minutos. Posteriormente la visualización de los fragmentos se realiza con un transiluminador de luz UV (ver Tabla 25 y Figura 36).

Tabla 25. Fragmentos Polimórficos de Restricción del Amplicón. Genotipo y bandas (Tamaños en pares de bases).

Genotipo	Bandas presentes
E2/E2	91, 104
E3/E3	48, 56, 91
E4/E4	48, 56, 72
E2/E3	48, 56, 91, 104
E2/E4	48, 56, 72, 91, 104
E3/E4	48, 56, 72, 91

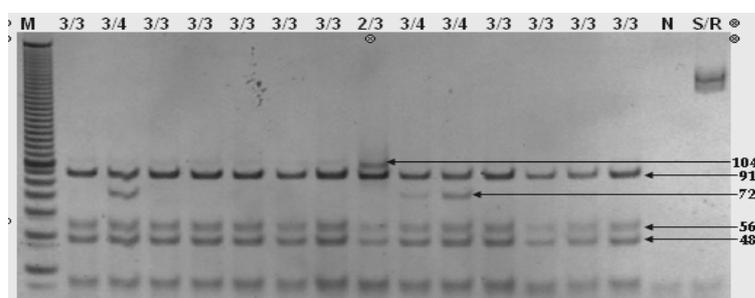


Figura 36. RFLP de PCR de la región polimórfica de Apo E. M: Marcador de peso ladder 10; N: Control Negativo; SR: Amplicón sin restricción; Genotipos 3/3, 3/4, 2/3.

## 6.7 Resultados en población mexicana normal

Hasta el momento se han analizado 35 individuos normales de los cuales se encontraron los genotipos: E3/E3, E3/E4, E2/E4, E2/E3, sin la presencia de los homocigotos E2/E2 y E4/E4 (Tabla 26). El alelo más frecuente fue el E3 con un 81.4 % y el de menor frecuencia fue el E4 con 5.7 %, alelo de importancia relacionado con la presencia de la EA (Tabla 27).

Tabla 26. Frecuencia de Genotipos de la ApoE.

<b>Genotipo</b>	<b>Individuos</b>	<b>Frecuencia genotípica (%)</b>
E3/E3	24	68.6
E3/E4	7	20.0
E2/E4	2	5.7
E2/E3	2	5.7

Tabla 27. Frecuencia de los alelos de la ApoE.

<b>Alelo</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Frecuencia alélica %</b>
E2	4	5.7
E3	57	81.4
E4	9	12.9

## 6.8 Población con dislipidemia y alteración en la glucosa

Se analizaron 96 muestras de pacientes que tenían alterado los niveles de lípidos como son los Triglicéridos, colesterol, HDL, LDL y los niveles de glucosa (ver Tabla 27). Los genotipos más frecuentes son E3/E3 seguido de E3/E4 y finalmente E2/E2 con una frecuencia del 2%. De acuerdo a los resultados que se observan, los genotipos con E2/E4 presentan los niveles de colesterol y de LDL son más altos, sin embargo, los niveles de triglicéridos es mayor para los de genotipo E3/E4 seguidos del genotipo E3/E3 (ver tabla 28).

Tabla 28. Características de la Población diabética con altos niveles de lípidos. Los valores son el promedio del grupo.

	ApoE 2/3		ApoE 3/4		ApoE 3/3	
	Controlados	No controlados	Controlados	No controlados	Controlados	No controlados
No de indiv.	1	2	11	11	23	57
Edad	57	63	46.0	57.0	52.0	57.0
Hb glicosilada	5.2	9.1	5.3	8.5	5.4	8.8
Glucosa	99.0	181.0	97.2	203.0	106.1	201.1
Colesterol	255.0	248.0	233.9	224.7	238.2	232.4
Triglicéridos	348.0	196.5	316.1	413.3	301.2	270.4
HDL	-	39.5	45.7	36.5	39.6	41.4
LDL	-	169.0	127.7	124.0	136.8	137.6
No-LDL	-	208.5	192.5	173.3	189.2	191.8
IA	-	6.3	6.3	5.9	6.4	5.9

## 6.9 Discusión

### Población normal

Estudios realizados en población mexicana por otros investigadores han mostrado que el alelo más frecuente es el E3, seguido de E4, siendo similar a lo reportado en poblaciones caucásicas. A diferencia de lo mencionado anteriormente, en nuestro trabajo el segundo alelo más frecuente es E2. Falta realizar la genotipificación y frecuencia alélica de la ApoE en pacientes con EA, así como su asociación con el alelo E4 para evaluar su utilidad real en el diagnóstico de esta enfermedad en la población mexicana.

### Población con hemoglobina glucosilada alterada y dislipidemias.

Los estudios realizados en nuestra población mexicana analizada muestran que el alelo más frecuente es el E3, seguido de E4. A diferencia de lo mencionado anteriormente, en nuestro trabajo el alelo menos frecuente es E2.

Las características de los grupos diabéticos controlados y no controlado se muestran en la tabla anterior. Los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada en sangre son mayores en el grupo de diabéticos no controlados que en los controlados, lo que confirma que la medición de la Hb glicosilada en el paciente diabético es considerado un buen marcador del grado de control glicémico. El promedio de edad de la población se encuentra entre los 46 y 63 años. Los niveles de Triglicéridos en plasma fue mayor en el grupo de diabéticos genotipo 3/4 y en los controlados genotipo 2/3, aunque de este último solo se encontró en la población un solo individuo.

El grupo de diabéticos genotipo 3/4 tiene significativamente mayores niveles de triglicéridos en sangre que los otros grupos y adicionalmente el mal manejo o control del paciente diabético aumenta los niveles de triglicéridos en sangre y disminución del las HDL. Sin embargo, no se encontraron diferencias significantes en los niveles de colesterol entre los grupo controlados y no controlados.

Tabla 28. Análisis estadístico de los resultados obtenidos

GENOTIPO	$\chi^2$	p	95% IC	RM
2 / 3	0.39	0.5344	0.8755- 11.4220	1.0000
3 / 4	4.49	0.0340	0.1555- 1.0635	0.4068
3 / 3	2.37	0.1238	0.9098- 5.7517	2.2876

Tabla 29. Prevalencia de los genotipos 2/3, 3/4, 3/3, en la población

<b>Prevalencia de genotipo en:</b>
------------------------------------

		<b>Alelo</b>	<b>frecuencia alélica</b>
		ε3	88.10
		ε4	10.47
		ε2	1.43

<b>Genotipo</b>	<b>Población total</b>	<b>Diabéticos no Controlados</b>	<b>Diabéticos Controlados</b>
2 / 3	<b>2.86%</b>	<b>2.86%</b>	<b>2.86%</b>
3 / 4	<b>20.95%</b>	<b>15.71%</b>	<b>31.43%</b>
3 / 3	<b>76.19%</b>	<b>81.43%</b>	<b>65.71%</b>

Tabla 30. Frecuencia alélica en la población

El alelo Apo ε2 es un factor asociado al aumento de lípidos en sangre. De la población estudiada la cual presentaba desorden lipémico encontramos una baja prevalencia del genotipo que posee el alelo ε2 (2/3), en un 2.86% y una frecuencia alélica del 1.43% lo que nos indica otras posibles causas del aumento de lípidos en esta población que pueden ser consideradas: dieta, actividad diaria, grupo étnico, y otros factores genéticos (Tabla 30 y 31).

## 6.10 Comentarios

No existe relación del alelo ε2 con la alteración de lípidos en pacientes diabéticos, aunque la prevalencia de genotipos que posean este alelo en la población es muy

baja lo que no es significativo para realizar un análisis ya que es bien conocido que el homocigoto E2/2 contribuye a la hiperlipidemia III y la arteroesclerosis pero el papel del heterocigoto E2/3, E2/4 no es muy clara.

Se encontró una mayor asociación del alelo ApoE ε4 con el incremento de los triglicéridos, bajos niveles de las HDL y altos niveles de las LDL en la población estudiada. Lo que reúne el cuadro para tener mayor factor de riesgo de enfermedad cardiaca.

Las diferentes pruebas mencionadas hasta ahora muestran un ejemplo de lo que es posible desarrollar en el laboratorio para su aplicación en el diagnóstico clínico molecular. Las diferentes metodologías presentadas son empleadas para la detección, cuantificación y genotipificación de diferentes microorganismos y genes involucrados en enfermedades hereditarias.

## **Análisis y discusión**

## **La biología molecular y el laboratorio clínico**

La experiencia profesional derivada de mi desarrollo en el Laboratorio Carpermor S.A. de C.V. nos permite afirmar que las estrategias experimentales en el diagnóstico clínico molecular son determinantes para el paciente y su seguimiento clínico.

El uso de las metodologías mencionadas y empleadas de manera rutinaria en el laboratorio, ha permitido tener avances en el diagnóstico, así como en la investigación básica. En este último caso, el análisis ha sido monogénico y ha contribuido al conocimiento que se tiene actualmente sobre los distintos fenómenos biológicos. Las ventajas de usar los métodos moleculares es que permite identificar la presencia de cualquier microorganismo en una forma directa, esto es, a través de su detección a nivel de DNA/RNA, a diferencia de los métodos inmunológicos donde su identificación está en función de la respuesta inmune y que aún sin la presencia del patógeno queda registrado en la memoria de los linfocitos B. Por otra parte, permite su identificación en una infección reciente sin esperar el tiempo de ventana que requiere nuestro sistema inmunológico para generar anticuerpos y por lo tanto detectar la infección. A nivel técnico no se requiere de la viabilidad del microorganismo para su identificación y sólo se requiere de pocas copias para su detección, lo que lo hace altamente sensible, con una poca cantidad de muestra de cualquier fluido orgánico. La alta especificidad está determinada con el uso de secuencias únicas del patógeno en estudio para la selección de los iniciadores.

Una desventaja muy importante para estas metodologías es la contaminación ya que una sola gota de una muestra positiva a una negativa la convierte en positiva, por lo tanto se requiere de medidas como las mencionadas en el tema de las "Características de un Laboratorio Clínico de Biología Molecular" para disminuir

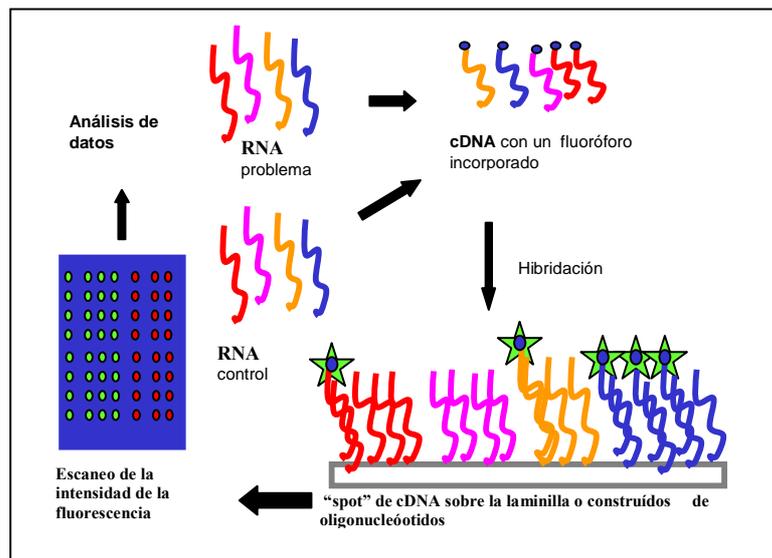
esta posibilidad. Otra desventaja es el costo de este tipo de pruebas, sin embargo, por lo mencionado anteriormente y por el hecho de que no hay otras áreas de la salud que puedan realizar cargas virales o detectar microorganismos donde es difícil su viabilidad y/o cultivo la biología molecular es una buena opción. A nivel de estudios genéticos de enfermedades hereditarias es una de las pocas metodologías que permiten su estudio y diagnóstico, permitiendo su análisis en un tiempo relativamente corto, aunque en la actualidad su estudio ha sido monogénico. Cabe mencionar que este tipo de estudios no fuera posible realizarlos sin la preparación en conocimientos y habilidades del capital humano que generan las distintas instituciones y universidades de nuestro país. La Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo (Q.F.B.) tiene la facultad de poder actuar en la investigación básica ó aplicada en las áreas de farmacia y de análisis clínicos en distintas disciplinas como la Bioquímica, Biología, Inmunología, Genética, Farmacología, etc. En el área de análisis clínico el/la Q.F.B. puede participar en la investigación de los distintos fenómenos biológicos que dan lugar a una enfermedad infecciosa o hereditaria y la aplicación de estos conocimientos en el desarrollo e implementación en el laboratorio clínico para su uso en el diagnóstico médico, disminuyendo costos en comparación con kits comerciales, o bien, creando pruebas inexistentes en el mercado.

### **Perspectivas de la biología molecular en el laboratorio clínico**

Con el conocimiento del genoma humano que fue descifrado en el 2003 por Venter y Collins y en el que se identifican 30,000 genes en lugar de los 100,000 que se creía, así como el uso del análisis simultaneo de la expresión de miles de genes por el método de microarreglos diseñada por Brown P.O. y Botstein D. en 1999, permitirá conocer la totalidad de los genes involucrados en una patología multigénica como por ejemplo el cáncer o la diabetes. El análisis del patrón de

expresión de los 30,000 genes en un individuo enfermo (de cáncer o por microorganismos) ha permitido encontrar patrones de expresión génica característicos para una patología determinada, y de esta manera establecer un diagnóstico certero y un tratamiento eficaz. A su vez, el análisis de haplotipos de polimorfismos presentes en diferentes poblaciones o etnias permitirá conocer la asociación de estos con la susceptibilidad o resistencia a enfermedades y al metabolismo de diferentes medicamentos lo que redundará en un futuro a un tratamiento eficaz y personalizado (Flores O, 2003). El uso de estas metodologías para encontrar estos patrones de expresión es lo que estudia la ciencia genómica y si es aplicada al tratamiento o metabolismo de fármacos se le denomina farmacogenómica. La metodología de microarreglos consiste en el uso de una matriz que contiene miles de secuencias de DNA de diferentes genes, separados y que al añadirse una extracción de RNA de un paciente con una patología determinada permite determinar por diferencia en la fluorescencia un patrón característico que difiere con el obtenido por un individuo normal (Figura 37).

A)



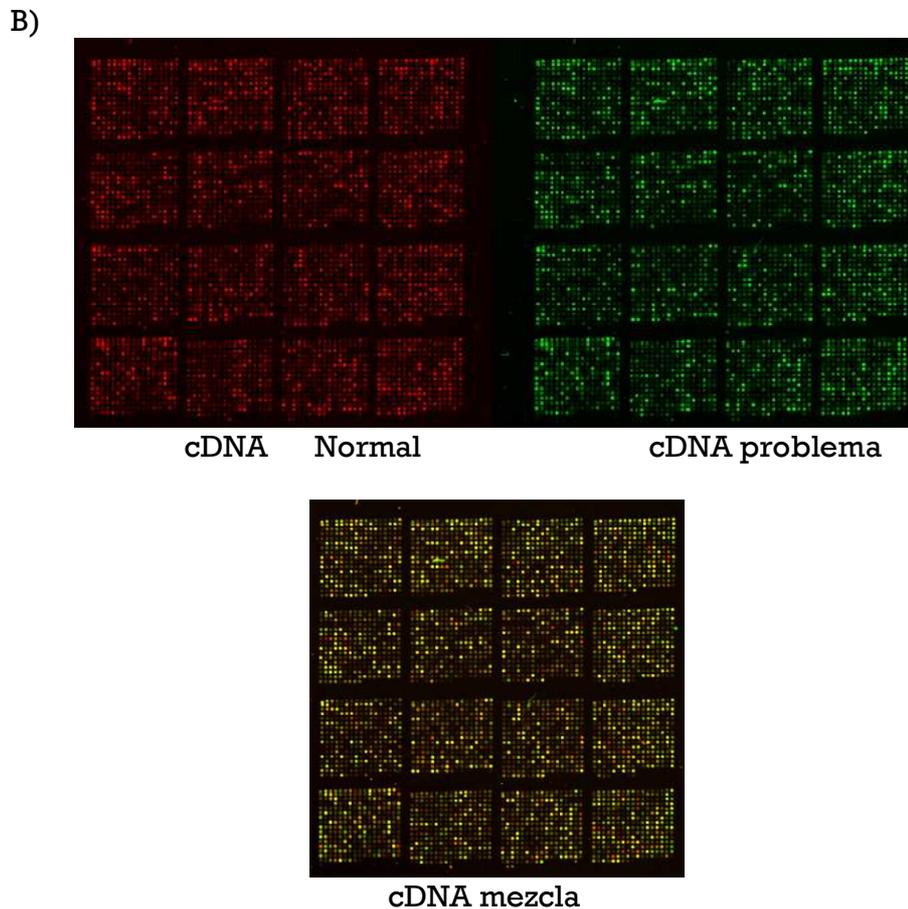


Figura 37. Método de microarreglo para expresión génica. A) Pasos del proceso de microarreglo: Se produce el cDNA marcado con fluorescencia para individuos normales y afectados, el cual se hibridan en una placa que contiene secuencias de genes que se quieren analizar. B) El cDNA de controles normales y de cDNA problema (pacientes) están marcados con diferente fluorocromo. En la mezcla de ambos se puede diferenciar la expresión génica. Amarillo = expresión en ambos; Verde= expresión en pacientes; rojo = expresión en controles. Fotografías tomadas de Flores O y Ramírez J, 2003.

Con respecto al diagnóstico en enfermedades infecciosas, recientemente existe un método implementado por Palacios y cols. para descubrir el agente causal de alguna enfermedad nueva, y es a través de la pirosecuenciación que consiste en la incorporación enzimática de nucleótidos complementarios dentro de una cadena de DNA que se elonga; este proceso resulta en la liberación de pirofosfatos, que se

registra en una cámara como emisión de luz. El DNA que se quiere analizar se encuentra cubriendo una micropartícula y está disperso en una placa con cientos de pozos y al cual se secuencian en paralelo. La secuenciación obtenida se analiza por un sistema informático para descartar las secuencias humanas e identificar residuos de secuencias que representan a un microorganismo. De está secuencia obtenida se clona por la PCR y se propaga en un cultivo celular, definiendo sus características morfológicas por microscopia electrónica y creando ensayos moleculares y serológicos para la detección de la infección ( Withley R, 2008), ver Figura 38 .

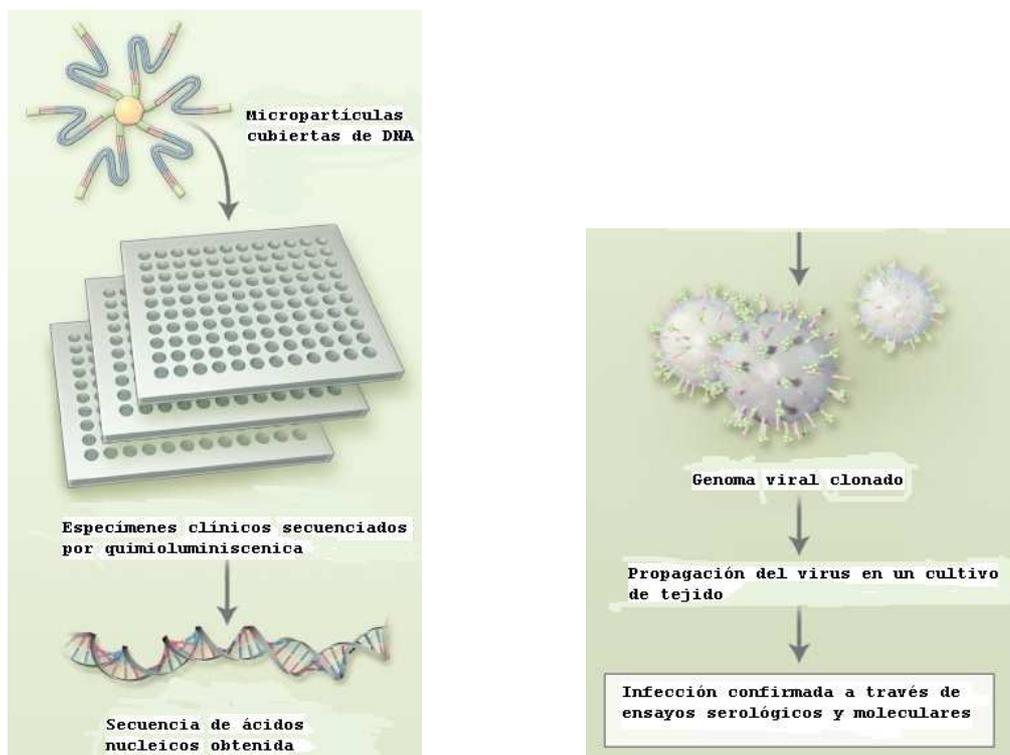


Figura 38. Uso elevado de pirosecuenciación para descubrimiento de patógenos. Se muestran los distintos pasos del método. Figura obtenida de Withley R, 2008.

Mediante esta metodología fue posible determinar la presencia de un arnavirus causante de la muerte de tres individuos que presentaron una misma sintomatología y que recibieron un transplante de un mismo donante, todo este

análisis se realizó en un tiempo corto, en comparación con los métodos convencionales (Palacios G, 2008).

Con estas metodologías y las mencionadas anteriormente permitirán obtener medidas preventivas en la salud, como es el caso de definir la certeza ó susceptibilidad (riesgo) de presentar enfermedades hereditarias, el tipo y pronóstico del tratamiento a recibir para el caso de diferentes tipos de cáncer, y los medicamentos personalizados que tendrán un mejor efecto terapéutico y menores reacciones secundarias de acuerdo a la persona y a la etnia a la que pertenece, conocer la presencia de algún microorganismo patógeno aún antes de iniciar con la sintomatología, permitiendo tener un control de la infección.

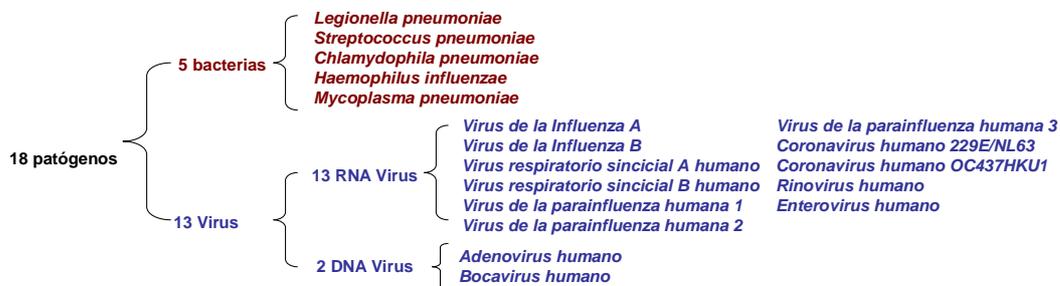
### **Perspectivas del Departamento de Biología Molecular de Carpermor**

En el Departamento actualmente se adquirió un secuenciador de Applied Biosystems y se está implementando las siguientes pruebas:

- De paternidad mediante el uso de un kit que detecta los alelos de 16 marcadores cromosómicos diferentes y que se emplea a nivel forense en Estados Unidos.
- Detección de las mutaciones dinámicas de enfermedades hereditarias como la de Huntington, distrofia miotónica, X-frágil. Estas enfermedades se caracterizan por presentar el fenómeno de anticipación, esto es, de presentar los síntomas mas severos y a una edad más temprana en cada generación.
- Detección de trisomias de los cromosomas 13, 15 y 21.
- Detección de un panel de 7 microorganismos de transmisión sexual como son: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*,

*Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, Virus de Herpes Simplex, *Ureaplasma urealyticum*.

- Detección de un panel de 18 microorganismos de enfermedades respiratorias:
- Genotipo de HIV para determinar las mutaciones que confieren resistencia a los medicamentos y Genotipo de HCV para determinar cual de los 6 tipos de HCV esta presente en una muestra de plasma de un paciente.



A largo plazo se esta proponiendo la adquisición de un instrumento de microarreglos para su aplicación en el análisis de patrones específicos de expresión génica de diferentes tipos de cáncer como mama, leucemias y gástrico. Así como de patrones de expresión involucrados en el metabolismo de medicamentos y que servirá para conocer los efectos secundarios de acuerdo al genotipo de un individuo. Este tipo de estudios, están actualmente en investigación, sin embargo, todo lo mencionado esta involucrado en la prevención y control de enfermedades que es a donde se dirige los estudios clínicos. Como puede observarse existe una amplia gama de pruebas diagnósticas que pueden desarrollarse en el ámbito de la genética y biología molecular.

## Recomendaciones

El presente trabajo permite conocer una parte del ámbito de trabajo que tiene el/la Q.F.B. en el área de análisis clínicos, donde su conocimiento y habilidades puede aportar a nuestro país en el sector de la salud beneficios para una gama de pacientes con distintas patologías, así como en la investigación de las mismas. Es importante tener claro cual es la disciplina en la que se quiere seguir estudiando y trabajando, menciono esto, porqué en realidad el conocimiento nunca se termina y porqué si bien, es posible tener un conocimiento general de las distintas disciplinas es necesario dedicarse a una en específico para poder aportar lo mejor de uno mismo, con la seguridad de que rendirá frutos nuestro esfuerzo. Cabe mencionar que lo anterior aplica tanto a nivel público como a nivel privado como es en mi caso. Otro aspecto importante, es el mantenerse actualizado en los temas de interés asistiendo y aún mejor participando en congresos y cursos. Sí se cuenta con la posibilidad de continuar con un postgrado es mejor, en el sentido de que permite conocer nuevas metodologías e interrelacionarnos con científicos que nos permitirán tener una colaboración en proyectos, y aunque esto no es limitativo, siempre y cuando, uno tenga contacto con los egresados de la carrera, evidentemente es más difícil. También es importante seleccionar un lugar de trabajo donde se cuenta con los equipos e instrumentos para realizar el desarrollo de las pruebas y los distintos protocolos, así como la oportunidad de mantenerse actualizado. Espero que lo aquí describo les sea de utilidad en el conocimiento de la Biología Molecular y de su aplicación en el Laboratorio Clínico y les sirva de ejemplo de lo que nos permite realizar nuestra carrera a beneficio de nuestro país. Siendo indispensable mencionar que aunque tenía las bases del conocimiento de la genética por las materias optativas que tome durante la carrera, prácticamente aprendí de las metodologías de biología molecular durante mi estancia en el CINVESTAV y en forma autodidacta en el trabajo, por lo tanto, se afirma la necesidad de implementar en la carrera de Q.F.B. la materia teórica y práctica de

Biología molecular, a manera de facilitar al estudiante su incorporación a la sociedad laboral, sin la necesidad de una capacitación previa sobre estas metodologías antes de aplicarlas a su ámbito profesional. En base a que se requiere de cada vez más materias que se deben de considerar en la carrera según la especialización al área de farmacia ó de análisis clínico resulta conveniente que este se lleve a cabo en semestres más tempranos al que se realiza actualmente.

## **Comentarios finales**

## **La biología molecular en el laboratorio clínico**

La biología molecular y la genética son ciencias que iniciaron en el siglo XX y que han aportado conocimientos importantes sobre los diferentes aspectos biológicos. Las metodologías de la biología molecular se emplean actualmente en diversas ramas de la biología, y en el laboratorio clínico no es la excepción. Mediante su empleo ha permitido el desarrollo de diferentes pruebas diagnósticas a nivel de detección, cuantificación y de genotipo. El uso de estas metodologías ofrece una alta sensibilidad y especificidad aún en muestras con un número bajo del microorganismo de interés sin la necesidad de que estos sean viables. También permite usarse en las cuantificaciones virales y en la expresión de genes involucrados en enfermedades hereditarias y que en la actualidad no existen otras metodologías para realizarlos. Actualmente en nuestro país, en el Instituto de Medicina Genómica, se están realizando estudios de los haplotipos presentes en la población mexicana con la finalidad de integrarlo a otros estudios de este tipo que se están realizando a nivel mundial y de esta manera investigar su asociación con diferentes patologías. En un futuro la biología molecular y la genética tendrán un impacto en el conocimiento de los genes humanos involucrados en las diferentes tipos de cáncer u otras enfermedades, aquellos involucrados en un efecto secundario a un medicamento, y el efecto genético de las diferentes razas en una enfermedad, de igual manera tendrá un impacto en el conocimiento de nuevas enfermedades de tipo infeccioso, así como de su conocimiento del mecanismo de como estos genes actúan, dando auge a ciencias como la genómica y la farmacogenómica.

## **La biología molecular en el laboratorio clínico**

La licenciatura de Q.F.B. es multidisciplinaria ya que se nos formó profesionalmente en tres ámbitos principalmente: La química, farmacia y biología. Esto nos proporciona las bases para dedicarnos a un área específica dentro de la investigación básica o aplicada a la farmacia o análisis clínicos. En este último caso, la automatización de las pruebas es cada vez mayor, con la capacidad del análisis de miles de muestras por día. Sin embargo, el conocimiento del origen de las pruebas nos permite entender el funcionamiento de estos equipos y el desarrollo de pruebas diagnósticas mismas que pueden posteriormente ser automatizadas. Para la biología molecular como ciencia relativamente nueva, está automatización apenas esta ocurriendo, así como los diferentes tipos de pruebas con aplicación clínica; lo que permite un excelente campo para el desarrollo e implementación de pruebas clínicas. Por lo anteriormente mencionado, es indispensable que en la licenciatura se den prácticas con el empleo de metodologías moleculares con el afán de que se comprendan y se palpe su aplicación en las diversas ciencias, principalmente porque tendrá un auge aún mayor en el futuro. Estudiante y maestro, es importante tener en cuenta las necesidades que tiene el país para actuar en consecuencia en el beneficio de la población mexicana, porque por “mi raza hablará el espíritu”.

---

---

## LITERATURA CITADA

Alvarez-Salas LM y E López-Bayghen. Regulación genética de los Papilomavirus humanos genitales. *Salud Publica Mex*; 37:240-247, 1995.

Alwine JC y cols. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper. *Methods Enzymol*; 68: 220-242, 1979.

Bauman JG y cols. A new method for fluorescent microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome labelled RNA. *Exp Cell Res*; 128: 485-490, 1980.

Benjamin Lewin. *Genes VII*. Séptima edición, 2000.

Bersch Carren. A brief history of medical diagnosis and the birth of the clinical laboratory. Part 5a – The foundation of molecular science and genetics. *MLO*, Septiembre, 2006. [www.mlo-online.com](http://www.mlo-online.com), revisado en junio 12 de 2008.

Bolton ET y McCarthy BJ. A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*; 48:1390-1397, 1962.

Bosh F y cols. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55: 244-265, 2002.

Broker TR y cols. Electron microscopic visualization of tRNA genes with ferritin – avidin: biotin labels. *Nucleic Acids Res*; 5: 363-384, 1978.

Burd E. M. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 1-17, 2003.

Burnside Nancy J y cols. Type III hyperlipoproteinemia with xanthomas and multiple myeloma. *J Am Acad Dermatol*; Noviembre: S281-S284, 2005.

Bustin SA y Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potencial use in clinical diagnosis. *Clin Science*; 109: 365-379, 2005.

- 
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention USA. National Office of Public Health Genomics. Genomic in Practice, 2006. <http://www.cdc.gov/genomics/phpractice.htm>
- Chen TM y cols. Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res.* 53:1167- 1171, 1993.
- Chung CH, Levy S y cols. Genomics and proteomics: Emerging technologies in clinical cancer research. *Clin Rev Oncol Hem*; 61: 1-25, 2007.
- Cohen SN y cols. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*; 70: 3240-3244, 1973.
- Coleman WB, Tsongalis GJ (eds.) *Pathology and Laboratory Medicine. Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian.* Humana Press. Primera edición, 1997.
- Cortes G y Leal C. Papilomavirus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis. Revista Salud Pública y Nutrición*; 2: 1-8, 2001.
- Cruz Gallegos y cols. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en una población de donadores y de pacientes con sospecha de hepatitis referidos a un banco de sangre del Estado de México. *Enf Inf Microbiol* 27(2): 49-54, 2007.
- Daly MJ y cols. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet*; 29: 229-232, 2001.
- Davey D y Zarbo R. Human papillomavirus testing. Are you ready for a new era in cervical cancer screening?. *Arch Pathol Lab Med*;127:927-929, 2003.
- DeRisi J y cols. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*; 14: 457-460, 1996.
- Das HK y cols. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem*; 260: 6240-6247, 1985.
- Digene Corporation. hc2 HPV DNA Test. Primera revisión, 2005. Pagina web: [http://www.digene.com/labs/labs\\_product.html](http://www.digene.com/labs/labs_product.html), revisado el 17 de mayo 2008.
- Dorak MT. *Real-Time PCR (Advanced Methods Series).* Oxford: Taylor & Francis, 2006 . Pagina web: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>, revisado el 20 de mayo de 2008 .

---

Ediciones Roche. Senses, Sensors and Systems. A journey through the history of Laboratory diagnosis. Primera edición, 2003.

Esteller M. Molecular origins of cancer. Epigenetics in cancer. N Eng L Med; 358: 1148-1159, 2008.

Flores Herrera O y cols. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México. (2003). <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.

Forsythe E, Ritzline PD. An overview of the etiology, diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. Phys Ther; 78:1325-1331, 1998.

Gall JG y Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA; 63: 378-383, 1969.

Gallegos Bolaños Jazbet. Tesis: "Detección y Genotipo del VPH en muestras de tejido cervical por PCR". Título de Q.F.B. Campus Chapultepec, Universidad del Valle de México, octubre de 2007.

García García Lilia. Tesis: "Implementación de un Método para Carga Viral de Hepatitis C (VHC)". Título de Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. En preparación.

Gillespie D y Spiegelman S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J Mol Biol; 12: 829-842, 1965.

Glosario vocabulario bioquímica y biología molecular. [www.biorom.uma.es/contenido/Glosario/N.html](http://www.biorom.uma.es/contenido/Glosario/N.html).

Gómez-Cordero I, Álvarez-García M. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. Rev Biomed; 14: 253-268, 2003.

Hall BD y Spiegelman S. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. Proc Natl Acad Sci USA; 47: 137-146, 1961.

Havel Richard, McCollum Award Lecture, 1993: Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis-new perspectives, Am J Clin Nutr; 59:795-799, 1994.

Henry's. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Saunders Elsevier, 21th edición, 2007.

- Hernández Carolina. Técnicas para Evaluar Inmunidad Viral. UNAM, 2005. <http://depa.pquim.unam.mx/inmunologia/temprevisados/inmunidadviral.ppt#257,1,Técnicas para Evaluar Inmunidad Viral>.
- Hidalgo-Martínez A. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed*; 17:81-84, 2006.
- Hirschhorn JN y cols. A comprehensive review of genetic association Studies. *Genet Med*; 4: 45-61, 2002.
- Hunt JL. Molecular pathology in anatomic pathology practice. A review of basic principles. *Arch Pathol Lab Med*; 132: 248-260, 2008.
- Invitrogen, Inc. Pagina web: [www.invitrogen.co.jp/qpcr/dluxselect.shtml](http://www.invitrogen.co.jp/qpcr/dluxselect.shtml), revisado el 12 de junio de 2008
- Jastreboff AM y cols. Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J*. 78:225-228, 2002.
- Jimenez-Sanchez G y cols. Human disease genes. *Nature*; 409: 853-855, 2001.
- Johnson GC y cols. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet*; 29: 233-237, 2001.
- Cann IKO e Ishino Y. Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* 152: 1249-1267, 1999.
- Kaput J y Rodriguez RL. Nutricional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics*; 16: 166-177, 2004.
- Killeen A (editor). *Methods in Molecular Medicine. Molecular Pathology Protocols*. Humana Press. Primera edición, 2001.
- Lauer MG y cols. Hepatitis C Virus Infection. *N England J Med*. 345: 41-52, 2001.
- Lozano, Knaul, Gómez-Dantés, Arreola-Ornelasy Mendez, 2008, Tendencias en la mortalidad por cáncer de Mama en México, 1979-2006. FUNSALUD, Documento de trabajo. Observatorio de la Salud.
- M29-A2. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 21, No. 23, segunda edición, 2001.

Manual del Corbett Research: Rotor-Gene 5 Software Manual, 2002.

Maryland M, y cols. Human Papillomavirus DNA versus papanicolaou screening test for cervical cancer. *N Engl J Med*; 357: 1579-1588, 2007.

Marras SA, Tyagi S, y Kramer FR. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Eur J Int Med*; 48-60, 2006.

Mapa genético del Papilomavirus tipo 16 Tomada de : [www.medescape.com](http://www.medescape.com)

Meijer CJ, Snijders PJ y Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecologic Oncology*; 103: 12-17, 2006.

Microscopia electrónica del Papilomavirus Humano

Tomada de <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>

Milde-Langosch K y cols. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. *Human Pathol*; 24:590-594, 1993.

MM3-A2. Molecular diagnostics methods for infectious diseases; approved guideline. NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 26, No. 8, segunda edición, 2006.

Mullis K y cols. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*; 51: 263-273, 1986.

Muñoz N, Bosh X, de San José S y cols. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*; 348: 518-527, 2003.

Ohki R y cols. Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis. *Int J Cardiol*; 102: 233-238, 2005.

Palacios G y cols. A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *N Eng J Med*; 358. pagina web: [www.nejm.org](http://www.nejm.org) Febrero 2008.

Penin F y cols. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*; 39: 5-19, 2004.

---

Pierce A y Small SA. Combining brain imaging with microarray: isolation molecules underlying the physiologic disorders of the brain. *Neurochem Res*; 29: 1145-1152, 2004.

Prince MJ. Predicting the onset of Alzheimer's disease using Bayes' theorem. *Am J Epidemiol*; 143:301-308, 1996.

Programa Multalin. Pagina web: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

Programa Primer3plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

Promega. *Protocols and Applications Guide*, Tercera edición, 1996.

Quackenbush J. Current concepts. Microarray analysis and tumor classification. *N Eng J Med*; 354: 2463-2472, 2006.

Reymer PWA y cols. Apolipoprotein E genotyping on agarose gels. *Clin Chem*; 41:1046-1047, 1995.

Roche Diagnostics. Pagina web: <http://www.Roche.com/>, revisado en mayo 24 de 2008

Rolph MS y cols. Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. *Pharmacol Ther*; 109: 284-294, 2006.

Rosenberg RN. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning. *Neurology*; 54:2045-2054, 2000.

Sanger F y cols. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 74: 5463-5467, 1977.

Satochi K y cols. Detection of Human Papillomaviruses in Cervical Neoplasias Using Multiple Sets of Generic Polymerase Chain Reaction Primers. *Gynecologic Oncology*; 81: 47-52, 2001.

Saturo Motoyama y cols. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis; 5: 9-199, 2004.

Schena M y cols. Quantitative monitoring of gene expression, patterns with a complementary DNA microarray. *Science*; 270: 467-470, 1995.

Seegene. Pagina web: [www.seegene.com](http://www.seegene.com)

Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*; 399 (Suppl):A23-31, 1999.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Mol Microbiol*; 98: 503-517, 1975.

Steinbrook R. The potential of human papillomavirus vaccines. *N Engl J Med*; 354: 1109-1112, 2006.

Swan D y cols. Human Papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiology*; 37: 1030-1034, 1999.

Tapiola T y cols. Three-year follow-up of cerebrospinal fluid tau, Beta Amyloid 42 and 40 concentrations in Alzheimer's disease. *Neuroscience Lett*; 280:119-122, 2000.

Torroella-Kouri M. y cols. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol*; 70:115-120, 1998.

Whitley R. The New Age of Molecular Diagnostics for Microbial Agents. *N England J Med*; 358: 1-3, 2008.

Wikipedia, La encyclopedia libre. Página web: <http://en.wikipedia.org/wiki/Portada>

Wilkinson GR. Drug therapy. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Eng J Med*; 352: 2211-2221, 2005.

Valdivia Flores Alejandra. Tesis: "Genotipo del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de pacientes femeninos". Título de Biología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, agosto de 2005.

Zeuzem S, Lee HL y cols. Quantitation of the Initial Decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology*; 27: 1149-1156, 1998.

Zchang X y cols. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril*; 83 Suppl 1: 1169-1179, 2005.