



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estandarización de la técnica High Resolution
Melting para la determinación de los polimorfismos
rs2287622 en el gen *ABCB11* y rs2097937 en el gen
ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del
Embarazo.

T E S I S

Para obtener el título de:

Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

Diana Iris Cayetano Platero

ASESOR DE TESIS:

Dra. en C. Irma Eloisa Monroy Muñoz

ASESOR INTERNO:

Dra. en C. Maritere Domínguez Rojas



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la técnica High Resolution Melting para la determinación de los polimorfismos rs2287622 en el gen ABCB11 y rs2097937 en el gen ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del Embarazo.

Que presenta la pasante: **Diana Iris Cayetano Platero.**
Con número de cuenta: **313239520** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la técnica High Resolution Melting para la determinación de los polimorfismos rs2287622 en el gen ABCB11 y rs2097937 en el gen ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del Embarazo.

Que presenta la pasante: **Diana Iris Cayetano Platero.**

Con número de cuenta: **313239520** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la técnica High Resolution Melting para la determinación de los polimorfismos rs2287622 en el gen ABCB11 y rs2097937 en el gen ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del Embarazo.

Que presenta la pasante: **Diana Iris Cayetano Platero.**
Con número de cuenta: **313239520** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la técnica High Resolution Melting para la determinación de los polimorfismos rs2287622 en el gen ABCB11 y rs2097937 en el gen ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del Embarazo.

Que presenta la pasante: **Diana Iris Cayetano Platero.**

Con número de cuenta: **313239520** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la técnica High Resolution Melting para la determinación de los polimorfismos rs2287622 en el gen ABCB11 y rs2097937 en el gen ABCB4 en pacientes con Colestasis Intrahepática del Embarazo.

Que presenta la pasante: **Diana Iris Cayetano Platero**.
Con número de cuenta: **313239520** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Genómica Humana del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza de los Reyes”, bajo la dirección de la Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz.



“You don’t need to be gifted. You just need to have enough commitment to accept being bad at something for as long as it takes to get good at it.”

-Neil Strauss

Agradecimientos

A mis padres, por brindarme todas las herramientas para dar siempre lo mejor de mí. Por creer en mis capacidades, por apoyarme en mis decisiones, por hacerme ver mis errores, y por haber estado ahí a pesar de que su intento por darnos más hacía que se perdieran algunos momentos.

A mis hermanos; Diego, por protegerme y cuidarme; y Eric, por alegrar mis días con sus risas y amor incondicional.

A la familia Cayetano, mis abuelitos y mi tía, por cuidarme y procurarme tan diligentemente todos estos años.

A la familia Platero, especialmente a mis tíos, porque sé que detrás de cada esfuerzo de mis padres hay uno suyo.

A la Dra. Irma, por brindarme la oportunidad de estar en el laboratorio, por brindarme un espacio para aprender, por su constante disposición para conmigo y por hacer todo lo que tuvo en sus manos para avanzar en este proceso y porque a pesar de mi actitud reservada, me permitió ver la increíble mujer que es.

A mis amigos:

Carla, por ser mi mejor amiga, por creer siempre en mí, incluso más de lo que yo podía hacerlo en mí misma. Gracias por siempre escucharme, pero sobre todo gracias por nunca juzgarme.

Dani, por ser esa amistad constante en mi vida, por ponerme siempre los pies sobre la tierra. Gracias por no haberte alejado.

Montse, mi lab-partner, gracias por ser mi compañera, por enseñarme que dar un poco más a veces es necesario. Gracias por ayudarme, por tenerme paciencia, y aún más importante por haber sido mi amiga todos esos años.

Lau, Karina y Eli, gracias por permitirme conocerlas ese último año, son quienes le agregaron un poco de dulce a la amarga experiencia que llegué a tener algunos años ahí.

A la Universidad, a la Facultad, especialmente a la profesora Maritere, por ser quién es, por amar tanto lo que hace y lo que enseña que me hizo darme cuenta lo fascinante que puede llegar a ser la carrera.

Dedicatorias

A mi madre, por todo lo que hoy tengo, porque sé que todos sus sacrificios han tenido mi nombre escrito.

A mi padre, por sembrar en mi el amor a la ciencia, por enseñarme que cuestionar mi alrededor y ser un poco diferente nunca es malo.

A mi yo de 11 años, por seguir creciendo y haber aprendido que no se necesitaba ser alguien más para ser feliz.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	3
2. ÍNDICE DE FIGURAS	4
3. ÍNDICE DE TABLAS.....	6
4. RESUMEN.....	7
5. INTRODUCCIÓN.....	8
6. MARCO TEÓRICO.....	10
6.1. Ácidos biliares	10
6.2. Secreción biliar.....	12
6.2.1. Transportadores en la membrana basolateral o sinusoidal.....	14
6.2.2. Transportadores hepatocaniculares.....	15
6.2.3. Regulación homeostática del metabolismo biliar	16
6.3. Fisiología hepática del embarazo	17
6.4. Colestasis Intrahepática en el embarazo.....	17
6.4.1. Diagnóstico	19
6.4.2. Tratamiento.....	21
6.5. Etiologías.....	22
6.6. ABCB11/BSEP	23
6.7. ABCB4/MDR3.....	24
6.8. Variaciones genéticas en BSEP y MDR3 y sus repercusiones clínicas.	25
6.8.1. Repercusiones clínicas	27
6.9. High Resolution Melting (HRM)	29
6.9.1. Historia.....	29
6.9.2. Fundamento de la técnica.....	30
6.9.2.1. Características de la técnica.....	31
6.9.2.1.1. Colorantes fluorescentes.....	31
6.9.2.1.2. Eliminación del fondo y normalización de la curva.	31
6.9.3. Genotipificación por High Resolution Melting.....	32
7. JUSTIFICACIÓN	35
8. OBJETIVOS	36
9. HIPÓTESIS	37
10. METODOLOGÍA.....	37

10.1.	Selección de muestras.....	37
10.2.	Extracción de DNA.....	37
10.3.	Cuantificación de DNA.....	38
10.4.	Amplificación de fragmentos por PCR de punto final.....	39
10.5.	Purificación del DNA.....	42
10.6.	Reacción de secuenciación.....	42
10.7.	Purificación en columna.....	43
10.8.	Secuenciación.....	43
10.9.	HRM.....	44
10.10.	Análisis Bioinformático.....	46
11.	RESULTADOS.....	46
11.1.	Resultados de secuenciación.....	46
11.2.	Resultados de HRM.....	50
12.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
13.	CONCLUSIÓN.....	61
14.	PROSPECTIVAS.....	62
15.	REFERENCIAS.....	63

1. ABREVIATURAS

ABCB4	Casete de unión a ATP miembro de la subfamilia B 4
ABCB11	Casete de unión a ATP miembro de la subfamilia B 11
ALT	Aminotransaminasa
AST	Aminotransferasa
BRIC	Colestasis Intrahepática recurrente benigna
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares
CIE	Colestasis Intrahepática del embarazo
DLID	Lesión al hígado inducida por fármacos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
qPCR	PCR en tiempo real
ssDNA	DNA de una sola cadena
dsDNA	DNA de doble cadena
FXR	Factor X Farnesoide
GGT	gamma glutil transpeptidasa
HRM	High Resolution Melting
MDR3	Proteína de resistencia a múltiples fármacos tipo 3
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFCI	Colestasis Intrahepática familiar progresiva
RXR	Factor X retinoide
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los principales ácidos biliares en humanos.	12
Figura 2. Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema colector de bilis y el sistema linfático	13
Figura 3. Transportadores basocelulares	14
Figura 4. Localización de transportadores en los hepatocitos	15
Figura 5. Modelo tentativo de la proteína BSEP	24
Figura 6. Modelo esquemático de ABCB4.....	25
Figura 7. Desnaturalización de la cadena doble de DNA a cadena sencilla mientras la temperatura aumenta	30
Figura 8 Curvas de desnaturalización obtenidas en HRM.....	32
Figura 9. Curvas de ejemplificación para genotipificar genotipos.....	33
Figura 10. Diagrama de la reacción de PCR punto final en gradiente.....	40
Figura 11. Gel de electroforesis del gen ABCB4 para el polimorfismo rs2097937	41
Figura 12. Gel de electroforesis del gen ABCB11 para el polimorfismo rs2097937	41
Figura 13. Gráfico de purificación con el kit ExoSAP-IT®	42
Figura 14. Diagrama de la PCR de secuencia basada en el método de Sanger...	43
Figura 15. Diagrama del programa utilizado para la qPCR y la técnica de HRM ..	45
Figura 16. Curva de desnaturalización para el gen ABCB11	45
Figura 17. Curva de desnaturalización para el gen ABCB4	45
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de un fragmento del gen ABCB11 de una muestra que contiene el polimorfismo rs2287622.....	48
Figura 19. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma homocigoto mutado	48
Figura 20. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma heterocigoto.....	49
Figura 21. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma homocigoto silvestre.....	49

Figura 22. Curva de desnaturalización del gen ABCB11 que proporciona el equipo CFX96 de Bio-Rad.	50
Figura 23. Curva normalizada de desnaturalización del gen ABCB11 para el polimorfismo rs2287622 que da el software Precision Melt Analysis™.	51
Figura 24. Alineamiento de la secuencia de un fragmento del gen ABCB4 de una muestra que contiene el polimorfismo rs2097937.....	51
Figura 25. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2097937 en su forma homocigoto mutado.	52
Figura 26. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2097937 en su forma heterocigoto.....	52
Figura 27. Curva de desnaturalización del gen ABCB4 que proporciona el equipo CFX96 de Bio-Rad.	53
Figura 28. Curva normalizada de desnaturalización del gen ABCB4 para el polimorfismo rs2097937 que da el software Precision Mil Analysis™.....	53
Figura 29. Alineamiento en BLAST de la muestra del grupo naranja (2135).....	54

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores relacionados con el padecimiento de CIE.....	22
<i>Tabla 2. Polimorfismos asociados a la presencia de CIE en mujeres</i>	<i>26</i>
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los polimorfismos <i>rs2097937</i> y <i>rs2287622</i>	39
Tabla 4. <i>Reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción de qPCR para la amplificación de los fragmentos a analizar por la técnica HRM.</i>	<i>44</i>
Tabla 5. Polimorfismos <i>rs2287622</i> y <i>rs2097937</i> en los genes ABCB11 y ABCB4, respectivamente, en la secuencia de DNA de 15 pacientes con CIE.....	46
Tabla 6. Genotipos asignados según la secuencia de DNA de 15 pacientes con CIE, en un fragmento de los genes ABCB11 y ABCB4 que contienen la presencia los polimorfismos <i>rs2287622</i> y <i>rs2097937</i> , respectivamente.	47
Tabla 7. Genotipos asignados para cada grupo presente en la curva normalizada de desnaturalización para el polimorfismo <i>rs2287622</i> del gen ABCB11	51
Tabla 8. Genotipos asignados para cada grupo presente en la curva normalizada de desnaturalización para el polimorfismo <i>rs2097937</i> del gen ABCB4.....	54

4. RESUMEN

La colestasis intrahepática del embarazo o *CIE*, también conocida como colestasis obstétrica, es la enfermedad del hígado más específica durante el embarazo. Normalmente se presenta en el tercer trimestre del embarazo con prurito, regularmente en las palmas de las manos y planta del pie, una función anormal del hígado y una elevación de los ácidos biliares en suero.

Esta enfermedad se puede diagnosticar con pruebas de laboratorio en las que se presentan niveles elevados de ácido biliar y una mayor actividad de las aminotransferasas hepática; sin embargo, durante el embarazo existen cambios fisiológicos en la función del hígado que dificultan el diagnóstico y su seguimiento.

Debido a esto, en este trabajo se propone la estandarización de una nueva técnica como posible apoyo al diagnóstico, en la cual se evalúan dos polimorfismos en los genes *ABCB11* (*rs2287622*) y *ABCB4* (*rs2097937*) (principales transportadores biliares) que han sido previamente reportados como causa para el padecimiento de la enfermedad.

La técnica a estandarizar se conoce como Desnaturalización de Alta Resolución (HRM, por sus siglas en inglés), esta técnica se puede utilizar de distintas formas, no obstante, este trabajo busca optimizar la genotipificación de los polimorfismos estudiados, con ayuda de otra técnica molecular (secuenciación tipo Sanger) para de esta manera determinar la susceptibilidad de la paciente a padecer *CIE* y posibles enfermedades hepáticas subsecuentes.

Se utilizaron 15 muestras de sangre periférica de pacientes embarazadas del INPer ya diagnosticadas con *CIE*, primero se extrajo el DNA para poder realizar tanto la técnica de HRM como la secuenciación. Para la primera técnica fue necesario realizar una PCR tiempo real, y los resultados obtenidos se sometieron a un análisis bioinformático con la ayuda del software Precision Melt Analysis [™], el cual agrupa cada muestra en clusters según su temperatura de desnaturalización. Todos los resultados así obtenidos se corroboraron con las secuencias nucleotídicas de cada muestra de las pacientes, lo que permite concluir que las condiciones utilizadas para HRM permiten genotipificar estos dos polimorfismos.

5. INTRODUCCIÓN

La colestasis intrahepática del embarazo (CIE) es un trastorno propio de la gestación humana que casi siempre aparece durante el segundo o tercer trimestre. Se caracteriza por prurito y ácidos biliares elevados en la sangre materna e implicar el aumento del riesgo de parto pretérmino, óbito y líquido amniótico meconial; por eso se considera una gestación de alto riesgo.

La causa de la CIE es desconocida; sin embargo, se involucran factores hormonales, genéticos y ambientales. Se han reportado algunos factores de riesgo como la etnicidad, una historia familiar de enfermedades biliares, hepatitis C, CIE en embarazos previos, gestación múltiple y edad materna mayor a 35 años.

La incidencia de colestasis intrahepática del embarazo varía ampliamente de acuerdo con los reportes en la literatura, no obstante, en México no hay estudios que permitan establecer su prevalencia; sin embargo, este problema debe investigarse siempre que exista una sospecha clínica y en los casos de óbitos inexplicables.

La finalidad del estudio es brindar información que permita realizar estudios posteriores respecto a las causas genéticas involucradas en esta enfermedad en la población mexicana, esto a través de la estandarización de una técnica que posibilite el estudio de la prevalencia de dos polimorfismos asociados a la CIE ya reportados en otras poblaciones. Los polimorfismos se encuentran en dos genes que codifican proteínas involucradas en el flujo biliar, el polimorfismo *rs2287622* presente en el gen *ABCB11* y el *rs2097937* presente en el gen *ABCB4*.

El estudio se realizó en 15 muestras de DNA obtenidas de sangre periférica de pacientes diagnosticadas con colestasis intrahepática del embarazo; con dichas muestras se procedió a estandarizar las condiciones para llevar a cabo la genotipificación mediante la técnica de Desnaturalización de Alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés). Para confirmar los resultados obtenidos por HRM se utilizó secuenciación tipo Sanger y se realizó un análisis bioinformático con diversas herramientas tales como BioEdit y Blastn.

El objetivo final de este estudio fue obtener las condiciones de trabajo óptimas para la genotipificación de ambos polimorfismos, con la finalidad de emplear la técnica como una herramienta que fortalezca el diagnóstico temprano que permita la prevención de posibles complicaciones en el embarazo y el parto, así como el fortalecimiento del diagnóstico de enfermedades genéticas subsecuentes.

6. MARCO TEÓRICO

6.1. Ácidos biliares

El hígado se localiza en un sitio estratégico, circunstancia que le permite estar en contacto con buena parte de las sustancias endógenas y exógenas, estas últimas llegan a él a través de la circulación portal; incluso, hay sustancias que a su paso por este órgano se depuran y no salen a la circulación general, como: la insulina o las sales biliares que se depuran entre 70 y 80% (García, 2006)

Como muchas funciones de nuestro organismo, la formación de bilis es considerado un proceso vital porque permite, entre otras cosas, metabolizar y transformar en productos más solubles a las sustancias que se van a eliminar. (García, 2006)

La bilis es un líquido isotónico que contiene básicamente: agua (82%), sales biliares (12 %), fosfolípidos (4%), colesterol (1%) y pequeñas cantidades de otras sustancias como: bilirrubina, inmunoglobulina A, metabolitos de hormonas, electrolitos, prodrogas y sus metabolitos. La secreción basal de bilis es de aproximadamente 500 a 600 mL (García, 2006)

Los ácidos biliares presentes en la bilis, son productos finales del catabolismo del colesterol; para la conversión de este colesterol se necesitan de 17 enzimas diferentes localizadas en lugares como el citosol, el retículo endoplasmático, la mitocondria y los peroxisomas. (Chiang, 2013)

Estas enzimas se ven implicadas en dos vías de síntesis: la vía neutral o la clásica y la vía alterna o ácida. La primera vía interviene en un 80 a 90% de la síntesis de los ácidos biliares. Sobresale la participación de tres enzimas: colesterol 7 alfa hidroxilasa, esterol 12 alfa hidroxilasa y esterol 27 hidroxilasa; mediante la vía alterna se forma el ácido quenodesoxicólico. (García, 2006)

En condiciones fisiológicas normales la mayoría de los ácidos biliares que se encuentran, son en un 70% el ácido cólico y el otro 30% por ácido quenosesoxicólico y otros ácidos biliares secundarios que producen las enzimas bacterianas al pasar por el intestino. (García, 2006)

Cuando se habla del metabolismo de los ácidos biliares, es importante distinguir la naturaleza química de la cadena lateral de la del núcleo esteroideo. En el caso de la cadena lateral, el principal atributo es si los ácidos biliares están conjugados (con glicina o taurina) o no conjugados. En el caso del núcleo esteroideo, es importante el número, la posición y la configuración de los grupos hidroxilo. (Hoffman,1990)

No obstante, dentro de la bilis los ácidos biliares están presentes casi por completo en su forma conjugada ya que su conjugación en el hepatocito es un proceso altamente efectivo y dicha conjugación mejora su solubilidad. En humanos, la mayoría de los ácidos biliares se encuentran conjugados con glicina y la menor parte con taurina. (Hoffman,1990)

A los ácidos biliares conjugados con estos aminoácidos (glicina o taurina) se les conoce como ácido biliares primarios; estos forman micelios con los fosfolípidos y el colesterol para poder ser almacenados en la vesícula biliar y después ser secretados al intestino y poder llegar a la segunda porción del duodeno a través de las vías biliares para llevar a cabo su principal función, que es facilitar la digestión y la absorción de nutrientes. Ahí mismo, se convierten en ácidos biliares secundarios a través de mecanismos en los que se pierden los aminoácidos y el grupo hidroxilo, entonces el ácido cólico deriva en ácido desoxicólico y el ácido quenodesoxicólico en ácido litocólico. (Chiang, 2013)

Posterior a esto, se reabsorben en el intestino y regresan de nuevo al hígado, a este proceso se le conoce como circulación enterohepática, que es bastante efectiva en humanos. Pequeñas cantidades de estos ácidos pueden derramarse a la circulación sistémica, reabsorberse cuando pasan a través de los túbulos renales, y después circulan de regreso al hígado a través de la circulación sistémica. (Chiang, 2013)

El 95% de los ácidos biliares secretados en el ducto biliar son reabsorbidos en los colaginicitos (células epiteliales del conducto biliar) y reciclados de vuelta a los hepatocitos, mientras que el otro 5% es excretado en heces. (Chiang, 2013)

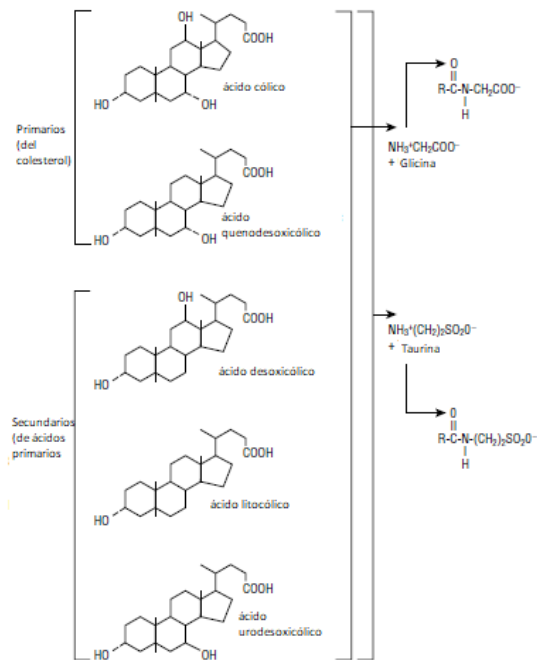


Figura 1. Estructuras químicas de los principales ácidos biliares en humanos. Los ácidos biliares primarios se forman en el hígado, mientras que los secundarios se forman en el intestino grueso por bacterias por medio de una 7-hidroxilación. (Hoffman, A.F. 1990).

Un elemento importante durante el transporte de ácidos biliares es la fosfatidilcolina, que cumple con un rol de protección en el espacio interluminal. Durante la formación de bilis, las sales biliares son exportadas por la proteína BSEP (bomba exportadora de sales biliares, por su siglas en inglés) a través de micelas mezcladas con la fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés). Estos complejos sirven para proteger el epitelio del lumen de la toxicidad y actividad detergente de las sales biliares, además permite que la secreción se lleve a cabo sin daño a las células que le rodean. Así, la secreción de la PC junto con las sales biliares es esencial para mantener un adecuado flujo biliar. Con el fin de mantener un flujo normal, la salida de las sales biliares que lleva a cabo BSEP debe ser balanceada por la presencia de PC. (Dixon, P. H., & Williamson, C, 2008)

6.2. Secreción biliar

Para comprender el concepto de secreción biliar es importante mencionar que los hepatocitos son un elemento importante para dicho proceso, dentro de estos se encuentran dos dominios distintos: el basolateral o sinusoidal y el dominio apical o

canalicular; la bilis se forma por la secreción activa de compuestos osmóticamente activos dentro del espacio canalicular, a ello sigue el movimiento pasivo del agua a través de los canales de este (acuaforinas) y a través de las uniones intercelulares. (García. C, 2006)

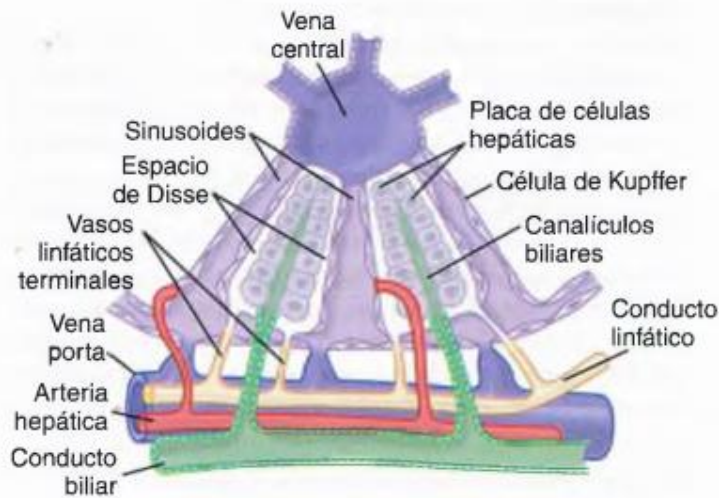


Figura 2. Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema colector de bilis y el sistema linfático. Los hepatocitos secretan bilis dentro de diminutos canales que se distribuyen como una red minúscula de túbulos o canículos entre las células hepáticas adyacentes. Esta bilis canicular contribuye con 70% de la producción diaria en adultos y se modifica por la secreción y absorción conforme pasa a través de los conductos biliares que contribuyen con el otro 30% de la secreción biliar. La secreción biliar se concentra aún más en la vesícula biliar (hasta 10 veces), antes de llegar al intestino. (URL 4)

Entonces, la secreción biliar es un proceso osmótico que se determina por la secreción activa de solutos orgánicos dentro de los canículos, seguido por la salida pasiva de agua, electrolitos y otras sustancias (como la glucosa) a través de las uniones intercelulares. (García, 2006)

Los compuestos osmóticamente activos incluyen: sales biliares, glutatión y sus conjugados; productos mezclados con ácido glucurónico y algunos aniones orgánicos, como el bicarbonato y el cloro. La porción basolateral del hepatocito está en contacto directo con la sangre portal por medio de sinusoides fenestrados y el espacio de Disse. Muchas sustancias, después de captarse, llegan al polo canalicular, ya sea por difusión en el citoplasma acuoso o, bien, fijas a enzimas

citoplasmáticas o incluso en vesículas, dependiendo de su hidrofobicidad. (García, 2006)

Enseguida se analizan estos transportadores que se encontraron en el hígado, en el íleon terminal y en las células del túbulo contorneado proximal renal; sitios que participan en la circulación enterohepática y hepatorenal de las sales biliares. (García, 2006)

6.2.1. Transportadores en la membrana basolateral o sinusoidal

Estos transportadores son decisivos para la formación de bilis, porque 95% de las sales biliares que se excretan en la bilis se reabsorben por el intestino (circulación enterohepática). Este proceso es muy eficiente con un primer paso de extracción de sales biliares conjugadas en el rango del 75 al 90%. Las sales biliares no conjugadas son ácidos débiles sin carga eléctrica a pH fisiológico del plasma; por tanto, pueden atravesar la membrana celular por difusión pasiva. (García, 2006)

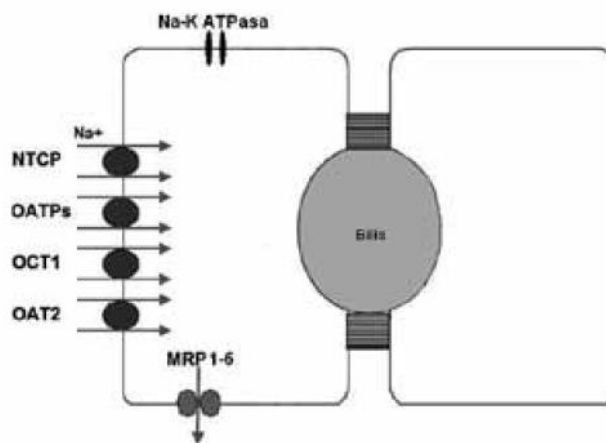


Figura 3. Transportadores basocelulares. Na⁺-K⁺-ATPasa: sodiopotasio- ATPasa; NTCP: sodio taurocolato cotransporte; OATP: polipéptido transportador de uniones orgánicos; OCT: transportador de cationes orgánicos; OAT: transportador de aniones orgánicos; MRP: proteína resistente a multidrogas. (García. C. 2006)

El transporte de sales biliares conjugadas ocurre, contra un gradiente de concentración de 5 a 10 veces entre la sangre portal y el citosol del hepatocito; es regulado por mecanismos dependientes o independientes del sodio. Los ligandos deben disociarse de la albúmina al hacer contacto con la membrana sinusoidal. En

condiciones fisiológicas, las sales biliares se remueven, principalmente por hepatocitos de la zona acinar 1(periportal) (García, 2006)

6.2.2. Transportadores hepatocaniculares

El transporte en esta membrana se considera el paso para la formación de bilis y de muchas sustancias endógenas y exógenas de nuestro organismo. Los transportadores también pertenecen a la familia ABC. La secreción canicular de las sales biliares la regula un transportador que se conoce como “gen hermano de la glicoproteína P” que pertenece a la familia de transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés). Estos transportadores se localizan en el polo apical o canicular de los hepatocitos (García, 2006)

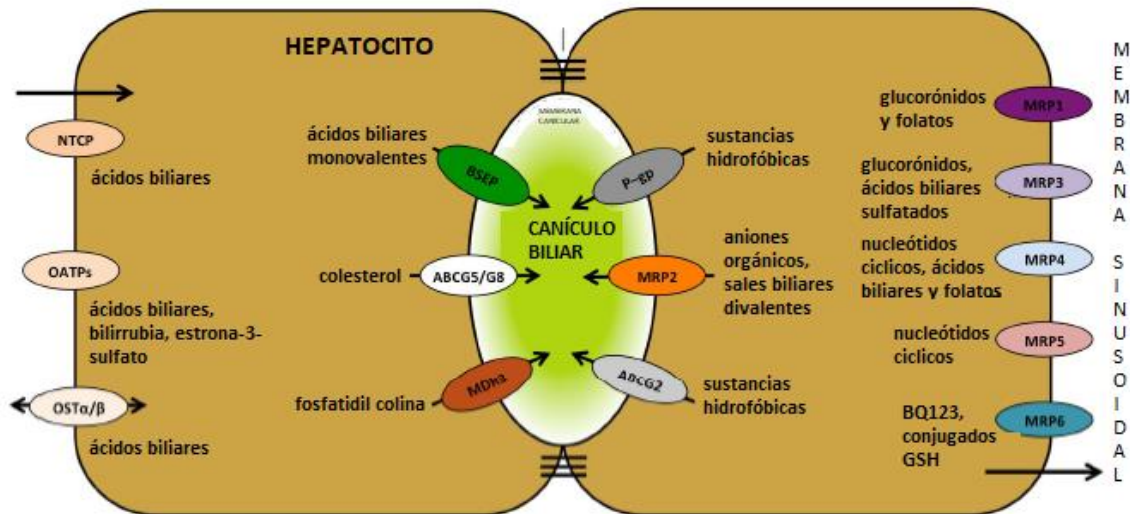


Figura 4. Localización de transportadores en los hepatocitos. Las sales biliares se absorben en la membrana sinusoidal a través del péptido cotransportador de taurocolato de sodio (*NTCP*) de manera dependiente del sodio y en menor grado a través de un transporte independiente del sodio por las proteínas transportadoras de aniones orgánicos (*OATP*). Luego, se transportan a la membrana canicular y se transportan a través de la bomba de exportación de sales biliares (*BSEP*) al canalículo. La proteína de resistencia a múltiples fármacos tipo 3 (*MDR3*) y la esterolina 1 (*ABCG5 / G8*) completan la formación de bilis al hacer caer la fosfatidilcolina (*PC*) desde el interior hacia el exterior, además de transportar el colesterol. Las sales biliares, el *PC* y el colesterol forman micelas mixtas que constituyen la base de la bilis. La glicoproteína *P* y la proteína de resistencia al cáncer de mama (*ABCG2*) transportan una variedad de sustancias hidrófobas a la bilis y confieren resistencia a múltiples fármacos (*MDR*). Además, un número sustancial de proteínas relacionadas con múltiples fármacos (*MRP*) se localizan en la membrana sinusoidal excepto *MRP2*. Transportan una amplia gama de aniones orgánicos y sustancias conjugadas. También participan en *MDR* y algunos de ellos, p. Ej. *MRP4*, así como el transportador de solutos orgánicos (*OST*), actúan como sistema de rescate para concentraciones demasiado altas de sales biliares dentro de la célula (Kluth, 2014)

- a. BSEP. La bomba que exporta sales biliares depende completamente de ATP para su función y se expresa exclusivamente en el hígado; se localiza en las microvellosidades en las vesículas subcaniculares (García, 2006)
- b. Mdr-2 (abc Cs). La glicoproteína resistente a multidrogas representa a la familia de transportadores dependientes de ATP que participan en la extracción de numerosos compuestos orgánicos endógenos y exógenos. La glicoproteína P resistente a multi fármacos-3 funciona como una flipasa de fosfolípidos. No se ha visto que la glicoproteína resistente a multi fármacos-1 tenga algún papel en la formación de bilis, no obstante, su amplia especificidad de sustratos y su gran expresión en varios tejidos, convirtiéndolo en uno de los principales determinantes para la absorción y distribución de drogas, así como de los efectos terapéuticos y tóxicos potenciales de las mismas (García 2006)
- c. Glicoproteína P resistente a multi fármacos-2 (ABC Cs). Es el único miembro de la familia que reconoce un amplio espectro de aniones orgánicos. Este transportador se considera la principal fuerza de manejo del flujo de bilis independiente de sales biliares a través de la secreción de glutatión reducido (García, 2006)
- d. MDR3. Es considerada una bomba exportadora de fosfolípidos. Este transportador funciona como una flipasa que elimina, básicamente, fosfatidilcolina de la superficie interna a la externa de la membrana canicular (García, 2006)

6.2.3. Regulación homeostática del metabolismo biliar

Los ácidos biliares son extremadamente citotóxicos, por lo que su síntesis y transporte está fuertemente regulado. El receptor hormonal nuclear FXR (farnesoid-X- receptor), por sus siglas en inglés, es el principal receptor de ácidos biliares en los hepatocitos (y enterocitos) y actúa para regular los niveles de ácidos biliares intracelulares con un rango bastante estrecho. Los ácidos biliares primarios se unen a FXR, seguido de una hetero dimerización con RXR (retinoid-X-receptor), por sus siglas en inglés, el complejo receptor se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta en los promotores de los genes diana. Por lo tanto, FXR actúa como

un regulador importante de los niveles de ácidos biliares al regular sus concentraciones, su metabolismo y transporte (Dixon & Williamson, 2008)

6.3. Fisiología hepática del embarazo

El hígado durante la gestación sufre algunos cambios similares a los que ocurren en pacientes que sufren hepatopatías, el tamaño y la forma del hígado permanecen inalterados, aunque existe un ligero aumento del flujo sanguíneo. Las modificaciones en la función hepática durante la gestación son complejas y las pruebas funcionales se encuentran alteradas. (Cerillo, *et.al.*, 2005)

En el perfil bioquímico, se muestra como principal variante, un ascenso de la fosfatasa alcalina, que se evidencia principalmente en el tercer trimestre del embarazo, no obstante, esta elevación no denota un problema colestásico, si no que se debe principalmente a la elevación de isoenzimas placentarias y a un mayor metabolismo óseo. Los niveles de transaminasas, bilirrubina total, ácidos biliares séricos y gamma glutamil transpeptidasa son normales, aunque se sabe que en la embarazada hay un “retraso de eliminación biliar”. Entonces el prurito gestacional se atribuye a una retención de sales biliares, comprobable, aunque no exista ictericia. (Cerillo, *et.al.*, 2005)

Es frecuente observar un discreto grado de anemia por hemodilución (incremento mayor de la volemia respecto a la masa eritrocitaria), sin encontrar alteraciones en la serie blanca y plaquetas. El perfil bioquímico también puede mostrar una hiperlipidemia mixta, así como una hipoalbuminemia dilucional, no obstante, tanto la biopsia hepática, así como los estudios de imagen resultan normales, sin revelar alteraciones patológicas. (Cerillo, *et.al.*, 2005)

6.4. Colestasis Intrahepática en el embarazo

La colestasis puede clasificarse de dos formas, en extrahepática, que es cuando existe un impedimento mecánico para el drenaje de la bilis en los grandes ductos del sistema biliar, e intrahepática, cuando se encuentra trastornado cualquiera de los mecanismos implicados en la síntesis de los ácidos biliares dentro del hepatocito, o en su secreción desde este hacia su sistema canicular (Medina, 2012)

Durante el embarazo hay una reducción de la síntesis biliar que, si se combina con un defecto subclínico preexistente en el sistema de transporte activo biliar a través de los conductos epiteliales del hepatocito, dará lugar a una forma reversible, no obstructiva, de colestasis intrahepática (SEGO, 2008)

Se desconoce la causa de la reducción biliar durante el embarazo, pero se cree que se debe a las altas concentraciones de hormonas circulantes (estrógenos y progesterona) en el último trimestre del embarazo (SEGO, 2008)

La colestasis intrahepática del embarazo o *CIE*, también conocida como colestasis obstétrica, es la enfermedad del hígado más específica durante el embarazo. Normalmente se presenta en el tercer trimestre del embarazo con prurito, regularmente en las palmas de las manos y planta del pie, una función anormal del hígado y una elevación de los ácidos biliares en suero. Los síntomas y anomalías bioquímicas se resuelven rápidamente después del parto, no obstante, se puede repetir en embarazos posteriores y con el uso de anticonceptivos hormonales (Williamson & Geenes, 2014)

El prurito que se presenta puede tener una severidad variable. Cuando es severa puede impedir el sueño y se puede asociar con *dermatitis artefactia* como una consecuencia del rascado. Las mujeres con CIE raramente padecen ictericia, aunque en algunas ocasiones se presenta un color más oscuro en la orina y heces pálidas. Las anomalías bioquímicas que se asocian con esta enfermedad incluyen un aumento de ácidos biliares en el suero y transaminasas hepáticas. El grado en que aumentan los ácidos biliares es variable y esto comúnmente se refleja en la heterogeneidad etiológica de la CIE. Los niveles en suero de transaminasas como alanina aminotransaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) también se encuentran elevados. Existe un debate sobre el tipo de examen bioquímico que se debe usar para diagnosticar la enfermedad. Los ácidos biliares que se encuentran en suero son más específicos que la elevación de las transaminasas hepáticas, y son de hecho más valiosas para la predicción de embarazos con riesgos fetales o complicaciones. La elevación de los ácidos biliares en el suero materno puede presentarse antes de los síntomas clínicos, coincidir con

ellos o presentarse semanas después del prurito. Los niveles de bilirrubina sérica se elevan lentamente en una porción pequeña de casos, la gama glutil transpeptidasa (GGT) está elevada en aproximadamente el 30% de los casos. Los niveles de fosfatasa alcalina pueden ayudar en el diagnóstico de la colestasis intrahepática del embarazo ya que la isoenzima placentaria se eleva en el embarazo (Dixon & Williamson, 2008).

El primer caso de prurito sin explicación asociado con una visible ictericia apareciendo en el tercer trimestre del embarazo y mejorando después del parto se reportó en 1883. Esta enfermedad pasó desapercibida hasta mediados de la década de los 50s cuando las características clínicas fueron descritas por varios grupos escandinavos. Agrupamientos familiares y la ocurrencia endémica de la colestasis en el embarazo muestra su posible origen genético (Lammert, 2000).

En países como Finlandia, Suecia, Portugal y Chile se ha propuesto que su presentación es más común en invierno , así como en pacientes con embarazo gemelar (20 a 22%), en embarazos obtenidos por fertilización *in vitro* (con respecto a embarazos espontáneos, 82.7% vs 0.7%), en mujeres con la presencia de la enfermedad en embarazos previos y en seropositivas a hepatitis C. (Medina, 2012).

6.4.1. Diagnóstico

En 2006, el Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos del Reino Unido publicó unas guías para el diagnóstico y seguimiento de la CIE, donde se menciona que anomalías inexplicables en las transaminasas tales como la gamma glutamil transferasa o las sales biliares deben ser suficientes para confirmar el diagnóstico de la CIE, mencionan también que el incremento de la fosfatasa alcalina en el embarazo es usualmente placentario por lo que su presencia no refleja alguna enfermedad hepática.

Además, recomiendan la realización de pruebas de función hepática (medición de transaminasas, gamma-glutamyl transferasa, bilirrubinas y ácidos biliares totales); y si estas resultan normales y el prurito es persistente, las guías recomiendan repetir las pruebas semanalmente, así como una última medición a partir de 10 días después del nacimiento, para confirmar su normalización (Medina, 2012).

No obstante, sostienen que se deben cuestionar o interrogar a la paciente sobre el consumo de algún medicamento, antes de realizar las pruebas de función hepática y que sus irregularidades no tengan explicación (Royal College of Obstetricians and Gynecologists, 2011).

También recomiendan excluir otras causas de prurito y disfunción hepática, y los estudios que sugieren son: perfil de hepatitis A, B y C, pruebas de detección del virus de Epstein Barr y citomegalovirus, estudios de autoinmunidad para hepatitis crónica y cirrosis biliar primaria (anticuerpos antimúsculo liso y antimitocondriales) y ultrasonido hepático (Medina, 2012).

Aún no existe consenso sobre el valor ideal en los niveles de ácidos biliares en suero que permita hacer el diagnóstico de CIE; la literatura recomienda el empleo de un punto de corte de 10 a 14 $\mu\text{mol/L}$ (Medina, 2012).

Entre las pruebas estándar del hígado, la ALT es un parámetro altamente sensible. Los niveles de transaminasa en suero son normales hasta el parto en embarazos sanos y, por lo tanto, cualquier aumento debe alertar y guiar a futuras pruebas. La ALT es liberada a la sangre incrementando sus concentraciones cuando existe daño celular en el hígado. Se ha reportado que del 20 al 60% de mujeres con prurito y ácidos biliares en suero elevados tienen de 2 a 10 veces un aumento en las transaminasas (Lammert, 2000).

Se piensa que la ALT es un indicador más sensible que la AST, porque su incremento suele ser más marcado. También se han observado concentraciones elevadas de gamma glutamil transferasa en 30% de las pacientes con CIE (Medina, 2012).

Las bilirrubinas son normales en la mayoría de los casos y tienen un valor limitado en su diagnóstico y seguimiento; sin embargo, cuando se elevan a expensas de la forma conjugada, su incidencia puede ser, incluso, de 25%, y sus concentraciones llegan a alcanzar hasta 6 mg/dL (Heikkinen, 1983).

No se ha reportado que exista correlación entre los valores de los ácidos biliares totales y otras pruebas hepáticas como AST, ALT o bilirrubinas totales (Medina, 2012).

La alfa glutatión-s-transferasa es una enzima de detoxificación que se libera rápidamente a la circulación ante el daño hepático agudo. Se ha sugerido que puede ser un marcador más sensible y específico de la integridad hepática que las otras pruebas de la función hepática (Knapen, Peters, Mulder, Steegers EA, 2000).

Un estudio de Juotsiniemi y colaboradores confirmó que las concentraciones promedio de la enzima están elevadas en los casos de colestasis respecto del grupo control (51.0 vs 1.62 $\mu\text{mol/L}$) (Juotsiniemi, Leino, Timonen, Pulkki K, Ekblad U, 2008).

No obstante, a pesar de la recomendación que se hace acerca de realizar todas estas pruebas no existe un consenso mundial que permitan establecer criterios de diagnóstico para la CIE, y tampoco una prueba confirmatoria de la enfermedad ya que todas las antes mencionadas deben ir de la mano para establecer el diagnóstico y de esta manera no confundir la patología con algunas otras presentes en el embarazo.

6.4.2. Tratamiento

La CIE al ser una enfermedad específica del embarazo sus síntomas suelen desaparecer después del parto por lo que su tratamiento se enfoca sólo a reducir tales síntomas y prevenir complicaciones principalmente fetales; esto debido a que el pronóstico materno en casos de CIE es bueno en general. El prurito suele desaparecer en los primeros días después del nacimiento, acompañado de normalización en las concentraciones séricas de los ácidos biliares y otras pruebas hepáticas (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).

En contraste con el favorable pronóstico materno, la CIE para el feto conlleva un riesgo significativo, llegando en ocasiones hasta la letalidad. Las principales complicaciones son los nacimientos pretérmino, líquido amniótico meconial, muerte fetal y aumento en el riesgo de síndrome de distrés respiratorio neonatal (asociado

a la entrada de ácidos biliares a las vías respiratorias) (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).

Se han estudiado varios fármacos y hasta el momento el ácido ursodesoxicólico ha sido el más prometedor y el que ha mostrado mayor efectividad en los ensayos clínicos; este medicamento tiene varios mecanismos de acción: incrementa el flujo biliar, protege a los hepatocitos de la apoptosis causada por los ácidos biliares y disminuye la secreción endógena de estos ácidos. Este ácido ha sido empleado para el alivio de los síntomas, así también para mejorar las pruebas bioquímicas a nivel hepático. Además, no se han encontrado efectos adversos fetales o maternos (Medina, 2012).

6.5. Etiologías

La etiología de la CIE es multifactorial, e involucra factores genéticos, hormonales y ambientales. Los metabolitos de los estrógenos y la progesterona se han visto involucrados en la patogénesis de la CIE. La colestasis, en mujeres usando anticonceptivos orales con alto contenido de estrógenos, es similar a la CIE. Un alto nivel de estrógenos, individuos genéticamente predispuestos, puede inducir CIE por procesos de transporte y sulfatación de ácidos biliares dañados. (García-Romero, 2019)

Tabla 1. Factores relacionados con el padecimiento de CIE

Factores	Relación con la CIE
Factores hormonales	<p>La CIE ocurre principalmente durante el tercer trimestre de la gestación, cuando las concentraciones de estrógeno alcanzan su pico máximo.</p> <p>La CIE se presenta con mayor frecuencia en embarazos gemelares, asociados a niveles de estrógenos circulares mayores que en las gestaciones únicas. (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).</p> <p>También puede estar relacionada con alteraciones en el metabolismo de progesterona, por lo que su administración es considerada como un factor de riesgo. (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).</p>
Factores genéticos	<p>La predisposición genética de la CIE ha sido sugerida por casos familiares, etnicidad y variaciones geográficas, y variaciones en genes que codifican para proteínas hepatobiliares. Se pueden alterar los ductos biliares y la composición de la membrana celular de los hepatocitos, así como producir una disfunción en los transportadores caniculares biliares (Medina, 2012).</p> <p>Se han encontrado variantes en los genes MDR3/ABCB4, ATP8B1/FIC1, y BSEP/ABCB11 encontrados en pacientes con CIE (García-Romero, 2019).</p>

	<p>Estas pueden conducir a problemas en la secreción de los ácidos biliares y producir colestasis. (Medina, 2012). Se han descrito tres variantes de colestasis hereditarias: la colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1, cuya fisiopatología obedece a mutaciones del gen ATP8B1. La tipo 2, en la que hay una disfunción de la BSEP, y obedece a mutaciones del gen ABCB11. Y la tipo 3, que se involucra a la proteína MDR3 por mutaciones del gen ABCB4. (Medina, 2012)</p>
Otras etiologías	
<p>Algunos autores han propuesto la fertilización <i>in vitro</i> como factor de riesgo para CIE, pero hasta el momento no está claro si los métodos de reproducción asistida afectan la incidencia o la severidad (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).</p> <p>La variación estacional que se ha observado en países como Finlandia, Suiza y Chile sugieren que factores ambientales pueden modular la expresión de la enfermedad; sin embargo, aún no se ha logrado identificar con claridad cuáles son los factores específicos que pueden verse involucrados (Maya, Zuñiga, Maya. J.L, 2012).</p>	

6.6. ABCB11/BSEP

El gen *ABCB11* o casete de unión a ATP miembro de la subfamilia B 11 es un gen que codifica para el transportador BSEP y se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos. Este gen consta de 28 exones y está localizado en el cromosoma 2q24. La proteína BSEP humana contiene 1321 aminoácidos con un peso molecular de 140 kDa (Lai, 2013).

Como otros transportadores ABC, BSEP contiene 12 hélices que atraviesan la membrana y dos dominios llamados Walker A y Walker B con sitios de unión ATP. El análisis de secuencia de BSEP indica que contiene 3 sitios de glicosilación ligada a N. Tanto las porciones N- como C-terminales de la molécula están ubicadas en la cara citoplásmica de la membrana plasmática. El primer bucle extracelular contiene cuatro sitios de N-glicosilación que actúan en la estabilidad, el tráfico y la función de BSEP. Además, esta proteína se puede modificar mediante fosforilación y ubiquitinación (Lai, 2013).

BSEP es responsable del flujo de bilis dependiente de sales biliares, que depende de la hidrólisis de ATP. No puede ser estimulado por ningún otro nucleótido y no es impulsado por un gradiente de pH dependiente de ATP o un potencial de membrana positivo interno; transporta principalmente especies de sales biliares monovalentes, incluidos los conjugados de taurina y glicina de sales biliares primarias, ácido cólico (CA) y ácido quenodesoxicólico (CDCA), y la sal biliar secundaria, ácido desoxicólico (DCA), así como ácido ursodesoxicólico (UDCA) (Soroka & Boyer, 2014).

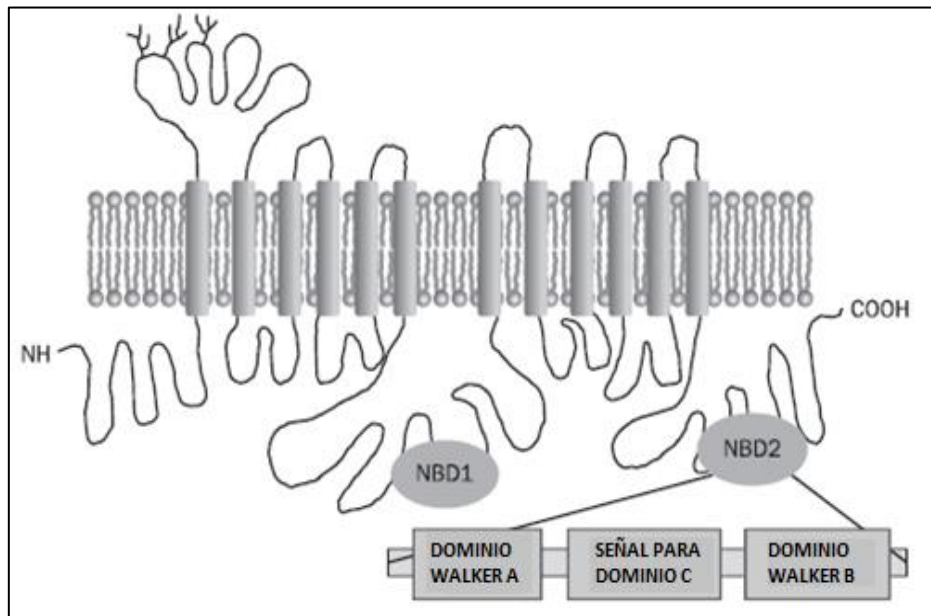


Figura 5. Modelo tentativo de la proteína BSEP. La proteína contiene dos dominios transmembrana (TMDs) y dos dominios de unión de ATP (NBDs). Se indican los dominios funcionales (Walker A y Walker B) (Lai, 2013)

6.7. ABCB4/MDR3

ABCB4, también llamada proteína de resistencia a múltiples fármacos 3 (MDR3), es una proteína transmembrana de 1279 aminoácidos. *ABCB4*, que pertenece a la familia de transportadores del casete de unión a ATP (ABC), consta de dos mitades homólogas, cada una de las cuales contiene seis hélices transmembrana (TMH) y un pliegue de unión a nucleótidos citoplasmático (NBF) (Morita & Terada, 2014).

ABCB4 tiene dos sitios de consenso de N-glicosilación en el primer bucle extracelular. El gen *ABCB4* humano en el cromosoma 7q21.1 tiene 28 exones y 27 intrones y está ubicado adyacente al gen *ABCB1* (Morita & Terada, 2014).

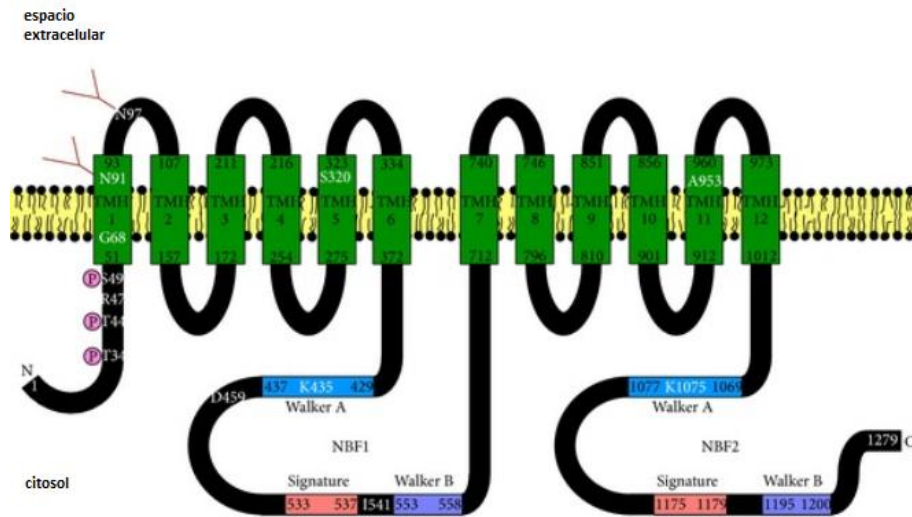


Figura 6. Modelo esquemático de ABCB4. ABCB4 consta de doce TMH que atraviesan la membrana plasmática y dos NBF citosólicos que contienen los motivos Walker A, Walker B y distintivos. N y C indican los extremos N y C de ABCB4, respectivamente (Morita, Terada, 2014).

Esta molécula es una flipasa que transloca fosfolípidos hacia la cara externa de la membrana canalicular; el transporte es un mecanismo específico, contra un gradiente de concentración y de protección celular, porque los fosfolípidos incluyen a las sales biliares dentro de micelas mixtas, transportándolas y sobre todo evitando que ejerzan sus funciones emulsificantes en las membranas celulares. De los fosfolípidos secretados en la bilis, la mayor concentración corresponde a fosfatidilcolina y el resto son fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Morita & Terada, 2014).

6.8. Variaciones genéticas en BSEP y MDR3 y sus repercusiones clínicas.

Se han reportado casos que presentan mutaciones en los genes *ABCB4* y *ATP8B1*, y variaciones genéticas en los genes *ABCC2* y *ABCB11*, varias de éstas son polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

En 2014, Dixon, Wadsworth, Chambers, Donnelly, Cooley, Buckley, Mannino, Jarvis, Syngelaki, Geenes, Paul, Sothinathan, Kubitz, Lammert, Tribe, Ch'ng, Marschall, Glantz & Williamson realizaron un estudio en el que analizaron 6 genes con posibles variantes genéticas asociadas a CIE. Entonces, encontraron una relación estadísticamente significativa entre los SNPs y haplotipos estudiados con la enfermedad, principalmente en los genes *ABCB4* y *ABCB11*.

Tabla 2. Polimorfismos asociados a la presencia de CIE en mujeres

Gen	Polimorfismo	Posición	Frecuencia alelo menor
<i>ABCB11</i>	rs2287622	NG_007374.1:g.62506T>C, NM_003742.2:c.1331T>C, NP_003733.2:p.Val444Ala	0.4538 (Mexicana)
	rs2058996	NG_007374.1:g.58885A>G	0.595 (Global)
	rs7605199	NG_007374.1:g.36380T>C	0.391 (Global)
	rs3814382	NG_007374.1:g.3846T>C	0.719 (Global)
	rs7577650	NG_007374.1:g.1624C>T	0.454 (Global)
<i>ABCB4</i>	rs2097937	NG_007118.2:g.83846C>T	0.66 (Global)
	rs31676	NG_007118.2:g.44869A>G	0.642 (Global)
	rs1149222	NG_007118.2:g.40974C>A	0.616 (Global)
	rs4148826	NG_007118.2:g.40330A>G	0.36 (Global)
	rs2109505	NG_007118.2:g.35343A>T	0.187 (Global)
	rs2302386	NG_007118.2:g.22805T>G	0.205 (Global)

De todos los polimorfismos antes presentados en el gen *ABCB4* encontraron que *rs2109505* muestra una asociación más significativa con la presencia de CIE, aunque aún se desconoce la causa exacta. Sin embargo, de acuerdo con dbSNP de NCBI su incidencia tanto en población mexicana (0.2054) como a nivel mundial (0.187) no es tan alta respecto a los otros polimorfismos asociados

Otro de los polimorfismos asociados a CIE, es el ***rs2097937***, el cual presenta una mayor incidencia (0.66) y genera un cambio en la secuencia de nucleótidos de Citosina por Timina. Hasta el momento, no se ha reportado cómo se asocia este cambio con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.

Respecto a los polimorfismos del gen *ABCB11*, su frecuencia reportada en población mexicana y a nivel mundial es más alta. Además, si se conoce un cambio en la secuencia de aminoácidos, siendo V444A. El alelo más común (T) codifica para Valina, mientras que el alelo más raro (C) codifica para Alanina.

En 2008, Dixon & Williamson, realizaron un estudio en dos poblaciones (en 333 individuos del Reino Unido y 158 de Europa continental) y encontraron que los homocigotos (CC) son más susceptibles a padecer CIE que los homocigotos (TT).

6.8.1. Repercusiones clínicas

Las mutaciones en los genes que codifican para la bomba exportadora de sales biliares, transportadores de fosfolípidos biliares (*MDR-3*) y proteínas de resistencia a multi fármacos (*MRP-2*) resultan en una colestasis que puede ser progresiva; se conoce como colestasis intrahepática familiar progresiva (PFCl, por sus siglas en inglés).

Se han descrito tres variantes de colestasis hereditarias: la colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 1, cuya fisiopatología obedece a mutaciones del gen *ATP8B1*. La tipo 2, en la que hay una disfunción de la *BSEP*, y obedece a mutaciones del gen *ABCB11*. Y la tipo 3, que involucra a la proteína *MDR3* por mutaciones del gen *ABCB4* (Medina, 2012).

En madres con familiares con PFCl o BRIC (colestasis intrahepática recurrente benigna), se ha observado una alta incidencia de CIE. Esto indica que las mutaciones heterocigotas de las proteínas de transporte hepatobiliar pueden predisponer a CIE. Esta hipótesis está fundamentada por el descubrimiento de 6 mujeres con historia de ICP en la familia de un paciente con PFCl3, estas mujeres resultaron heterocigotas para una misma delección (1712delT) en el gen *MDR-3*. De manera adicional, en la secuenciación del DNA de una paciente con CIE y gammaglutamil transferasa elevada, sin historia familiar de PFCl, se encontró una mutación (C546A) (Lammert, 2000)

Las mutaciones en la bomba exportadora de sales biliares (*BSEP*), se han relacionado con Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva (PFCl) tipo 2 (PFCl2);

esta enfermedad se presenta de forma autosómica recesiva. Al describir 30 mutaciones en el gen que expresa el transportador, los pacientes fenotípicamente se parecen a los que padecen la enfermedad de Byler. Se muestran similitudes con la enfermedad anterior desde el punto de vista clínico, bioquímico e histológico, sólo que puede ser más grave e incluso puede provocar insuficiencia hepática en edades más tempranas. El impedimento en la excreción de sales biliares da como resultado la acumulación intracelular y el daño hepatocanicular con apoptosis o necrosis celular (García, 2006).

Las mutaciones en *ABCB11* que conducen a una pérdida de función son la base molecular de al menos tres formas clínicas de enfermedad hepática: colestasis intrahepática recurrente benigna tipo 2 (BRIC2), PFIC2, colestasis intrahepática en el embarazo y lesión al hígado inducida por fármacos (DLID). En los adultos, la presencia de polimorfismos funcionalmente relevantes en *ABCB11* pueden ser la causa de una predisposición a trastornos hepáticos adquiridos (Soroka & Boyer, 2014).

En los últimos años, cada vez más estudios han descrito mutaciones en BSEP en mujeres con CIE y han encontrado que los polimorfismos del gen BSEP estaban estrechamente relacionados con el riesgo de padecer la enfermedad. (Soroka & Boyer, 2014).

Para el caso de las mutaciones humanas en *ABCB4*, éstas dan como resultado un amplio espectro de fenotipos, que van desde la colestasis intrahepática familiar progresiva tipo 3 (PFIC3) hasta los trastornos hepáticos colestásicos del adulto.

La PFIC3 se caracteriza por una alta γ -glutamyl transpeptidasa y la aparición temprana de colestasis persistente que progresa a cirrosis e insuficiencia hepática antes de la edad adulta. En muchos casos de PFIC3, el trasplante de hígado es la única terapia. El nivel de fosfolípidos biliares en pacientes con PFIC3 se reduce drásticamente a pesar de la presencia de ácidos biliares. Esta colestasis puede ser causada por la toxicidad de las sales biliares detergentes que no están asociadas con los fosfolípidos, lo que conduce a lesiones del canalículo biliar y del epitelio biliar. El defecto *ABCB4* también está involucrado en la colestasis intrahepática del

embarazo (ICP), la colelitiasis asociada a fosfolípidos bajos (LPAC) y la cirrosis biliar primaria (Morita & Terada, 2014).

6.9. High Resolution Melting (HRM)

La detección integral de nuevas variantes de DNA se ha basado tradicionalmente en la secuenciación. Sin embargo, a pesar de los avances recientes, la secuenciación es costosa y requiere mucho tiempo. Es por eso que se han diseñado métodos más sensibles y específicos, como lo es el análisis de curvas de desnaturalización del DNA de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés). (Cho, 2008)

6.9.1. Historia

La desnaturalización del DNA ocurre cuando éste se encuentra en doble cadena (dsDNA) y se separa quedando en dos hebras de DNA de cadena sencilla (ssDNA). Esta desnaturalización puede ser monitoreada con colorantes fluorescentes que se unen a estas cadenas (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

De primera instancia, el análisis de una curva de desnaturalización fluorescente, fue introducida como parte integral de la PCR en tiempo real (qPCR), pero fue hasta 2002 que la técnica de HRM se estableció; esto como una colaboración académica e industrial entre la Universidad de Utah y Idaho Technology, como una forma sencilla de genotipificar, escanear mutaciones y emparejamiento de secuencias. Su popularidad ha ido creciendo debido a que no se necesitan procesos separados de las muestras, ya que tras realizar la PCR, las curvas de desnaturalización se generan monitoreando la fluorescencia de un colorante específico. (URL 1)

Un paso fundamental para el desarrollo de la técnica fue la selección de un colorante fluorescente, debido a que antes de encontrar uno que se acoplara a la técnica, se utilizaban oligonucleótidos marcados en sentido directo (5'-3') para poder obtener una señal de fluorescencia; de esta manera las variantes de un solo nucleótido en su forma heterocigota y homocigota podían ser identificados, sin embargo, sólo se

identificaban las variantes que se encontraban en la región que el oligonucleótido marcado amplificaba (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

Es por eso, que el uso de colorantes fluorescentes que pudieran identificar heterodúplex de manera eficiente, permitió eliminar el uso de oligonucleótidos marcados y por primera vez las variantes heterocigotas que se encontraban en cualquier región del producto amplificado podían ser fácilmente identificadas sin procesos subsecuentes a la PCR (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

6.9.2. Fundamento de la técnica

La técnica se lleva a cabo en muestras de DNA de doble cadena (dsDNA) y comúnmente se utiliza una PCR en tiempo real, antes del análisis por HRM, para así amplificar la región de DNA de interés. (URL4)

El proceso del análisis de HRM es simplemente un calentamiento preciso del amplicón de DNA obtenido a una temperatura que va de 50°C a 95°C. Y en algún punto de este proceso la temperatura de fusión del amplicón se alcanza y las dos cadenas del DNA se separan. (URL 4)

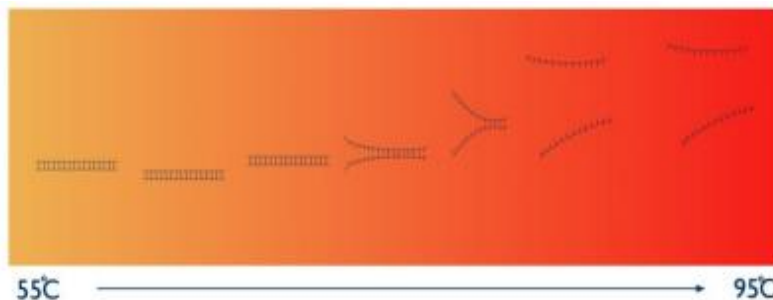


Figura 7. Desnaturalización de la cadena doble de DNA a cadena sencilla mientras la temperatura aumenta. (URL1)

Una de las características más importantes de la técnica es el monitoreo del proceso de desnaturalización en tiempo real, lo cual se logra a través del uso de un colorante fluorescente; el colorante usado es un químico intercalante del DNA y posee una cualidad única, y es que se une únicamente al DNA de doble cadena. (URL 4)

Tras la unión al dsDNA presente en la reacción, el colorante presenta una reacción de fluorescencia intensa, mientras la temperatura aumenta, la fluorescencia va

disminuyendo y en una temperatura determinada la fluorescencia cae de manera drástica, reflejando la desnaturalización del DNA pasando de dsDNA a ssDNA. La temperatura de fusión (T_m) del dsDNA está caracterizada por el contenido GC, su longitud y la secuencia; ésta es la temperatura a la cual la fluorescencia se normaliza en un 50%. (URL 4)

6.9.2.1. Características de la técnica.

6.9.2.1.1. Colorantes fluorescentes.

Tradicionalmente se usaba SYBR Green I como un colorante sensible y conveniente para la PCR y para HRM ya que es capaz de detectar variantes heterocigotas, pero el protocolo requiere purificar las muestras tras la PCR, seguido de la adición de altas concentraciones de colorante, no obstante es difícil garantizar la saturación del producto de PCR con éste colorante, ya que solo se pueden usar concentraciones limitadas antes de que inhiba la PCR. Aunque se ha informado de genotipificación de una sola base con SYBR Green I, los resultados han sido cuestionados

Por tanto, se han desarrollado colorantes que aseguran la saturación de la doble cadena y que son compatibles con la PCR en un gran rango de concentraciones. Entre éstos se encuentran los de la marcae LC Green; así como Syto9 y Eva Green, que son ideales para la identificación de las variantes heterocigotas (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

6.9.2.1.2. Eliminación del fondo y normalización de la curva.

Para obtener el cálculo preciso de la T_m y su normalización, se requiere eliminar el fondo lineal de la curva que surge de un atributo físico de la fluorescencia: a medida que aumenta la temperatura, la fluorescencia disminuye. A temperaturas más bajas, se hace evidente un componente exponencial de fondo que surge de la unión del colorante a altas concentraciones de cebadores.

Se han descrito métodos para eliminar el fondo lineal y exponencial y se incorporan en un software comercial de HRM, y consiste en realizar una extrapolación lineal (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

La T_m de un producto de PCR es una métrica conveniente, pero es solo un punto de la curva de desnaturalización. Entonces, se obtiene mayor información a partir de la curva de completa de HRM que sólo de la T_m (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

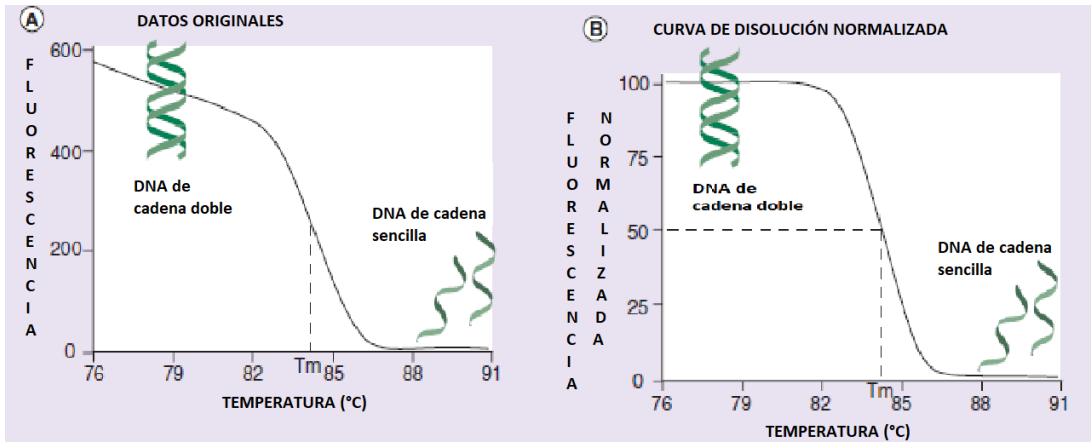


Figura 8 Curvas de desnaturalización obtenidas en HRM. A) Datos originales de fluorescencia. Se muestra la caída lineal de la fluorescencia a una baja temperatura, seguido de una caída rápida centrada cerca de la temperatura de fusión (T_m). La fluorescencia es baja cuando la cadena de DNA es de sencilla. B) Los datos originales están normalizados entre el 0 y 100% después de eliminar el fondo para que la curva pueda ser horizontal. (Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. 2007)

6.9.3. Genotipificación por High Resolution Melting

La genotipificación por HRM fue introducida en 1997, este método es sin duda más eficiente que técnicas alelo-específico ya que ésta permite distinguir muchos más alelos y su hibridación es monitoreada en un rango de temperaturas en lugar de una sola

El análisis de las curvas de HRM permite la genotipificación sin sondas, incluso cuando el cambio de secuencia es de solo una base. Por ejemplo, una variación en la secuencia de DNA de A>C con los posibles genotipos A/A, A/C y C/C, se distinguen fácilmente si se genera un pequeño amplicón con cebadores de PCR que rodean el locus variable (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

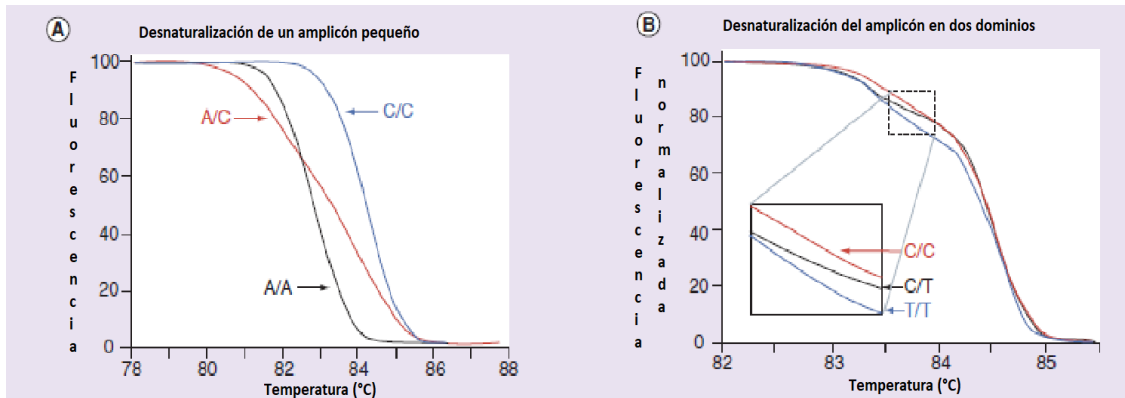


Figura 9. Curvas de ejemplificación para genotipificar genotipos. Las curvas A/A y C/C son similares en forma, no obstante, la T_m del homocigoto C/C es aproximadamente 1°C más alta que la del homocigoto A / A. La curva de desnaturalización del heterocigoto A/C difiere en forma de la de los homocigotos con una transición más gradual en un rango de temperatura más amplio. El mayor rango resulta de la desnaturalización de cuatro genotipos diferentes: dos homocigotos (A/A y C/C) y dos heterocigotos (A/C y C/A) (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

La genotipificación por HRM sin sondas (genotipificación directa del producto de PCR) se describió por primera vez utilizando cebadores marcados con fluorescencia. Sin embargo, resultaba más difícil genotipificar a medida que aumentaba el tamaño del amplicón y la distancia desde el cebador marcado; es por eso que, para la detección, el cebador marcado tenía que estar en el mismo dominio de desnaturalización que la variante. Este problema se resolvió en 2003 con la introducción de colorantes de saturación. Con estos colorantes, el producto de PCR se marca en toda su longitud, de modo que se detectan todos los dominios de desnaturalización (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

Para la genotipificación de una sola base, en la mayoría de los casos se pueden distinguir los heterocigotos entre sí por diferencias en la forma de la curva, pese a eso pueden ocurrir cambios idénticos en regiones cercanas, pero en diferentes ubicaciones dentro del mismo amplicón, lo que puede dificultar la identificación de los genotipos heterocigotos (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

En el caso de los homocigotos, no todos pueden distinguirse con ayuda de la T_m . Aproximadamente el 84% de todos los cambios de una sola base dan como

resultado un intercambio A:T a G:C con una diferencia de T_m de aproximadamente 1°C en amplicones pequeños. En el 16% restante, el par de bases está invertido o es neutral (A:T a T:A o G:C a C:G) y la diferencia de T_m es menor. En aproximadamente el 4% de los cambios de una sola base, la simetría del vecino más cercano no predice diferencias en la T_m . En tal caso, es necesario mezclar para completar la genotipificación; se mezcla un homocigoto conocido en cada homocigoto desconocido y la mezcla se desnaturaliza nuevamente. Alternativamente, se puede añadir un genotipo conocido a todas las muestras antes de realizar la PCR y el análisis cuantitativo de los heterocigotos (Reed, Kent & Wittwer, 2007).

7. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas son una complicación grave del embarazo y representan un desafío para el ginecólogo y el hepatólogo. Ocurre en aproximadamente el 3% de todos los embarazos, y puede provocar diversas morbilidades maternas y perinatales. Los datos relacionados con las frecuencias de enfermedad hepática en la población mexicana indicaron patrones similares a los observados en otros países; sin embargo, se observó una frecuencia total de 11.3% de enfermedad hepática durante el embarazo en contraste con el 3% reportado en todo el mundo. La colestasis intrahepática es una enfermedad que se puede diagnosticar con pruebas de laboratorio en las que se presentan niveles elevados de ácido biliar en suero $> 10 \text{ mol / L}$ (la mayoría de las complicaciones ocurren con niveles $> 40 \text{ mol / L}$) y una mayor actividad de las aminotransferasas hepáticas. Sin embargo durante el embarazo existen cambios fisiológicos en la función del hígado que dificultan el diagnóstico y su seguimiento, es por eso la importancia de un diagnóstico oportuno.

A nivel mundial se han asociado varios polimorfismos de los genes *ABCB4* y *ABCB11*, que codifican para proteínas del transporte biliar, con el desarrollo de esta enfermedad; a pesar de ello aún no se ha descrito su incidencia en población mexicana.

Por ello, la genotipificación de los polimorfismos rs2287622 en el gen *ABCB11* y rs2097937 en el gen *ABCB4*, y otros más, podrían representar un avance en la forma de diagnosticar dicha enfermedad y a su vez permitir el seguimiento requerido que prevenga posibles complicaciones en el embarazo.

Los polimorfismos o variantes de un solo nucleótido (SNP) han sido asociados a muchas enfermedades, por lo que durante los últimos años se han desarrollado técnicas que permitan su identificación en la secuencia de DNA, la técnica más común para esto es la secuenciación, pero es costosa y tardada. Así pues, no existen criterios unificados para llevar a cabo la genotipificación, por tanto, la confiabilidad en la asignación de genotipos es variable y depende de la calidad del

DNA purificado y de la técnica utilizada para genotipificar, lo que puede conducir a resultados erróneos que tienen bases metodológicas.

Por todo lo anterior, este trabajo buscó estandarizar la técnica de HRM a través de la genotipificación de dos polimorfismos que han sido asociados a CIE. Todo esto en pacientes diagnosticados con la enfermedad a través de pruebas bioquímicas. De igual manera, se realizó la secuenciación de los fragmentos que contenían los polimorfismos con el objetivo de confirmar a través del análisis de la secuencia que los genotipos asignados por la técnica HRM eran correctos.

8. OBJETIVOS

- GENERAL

Estandarizar la técnica High Resolution Melting para genotipificar los polimorfismos rs2287622 en el gen *ABCB11* y rs2097937 en el gen *ABCB4* en muestras de sangre de pacientes diagnosticadas con colestasis intrahepática del embarazo.

- PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones para la secuenciación por el método de Sanger de 15 muestras de DNA.
- Analizar mediante herramientas bioinformáticas las secuencias para identificar la presencia o ausencia de los polimorfismos a genotipificar.
- Genotipificar los polimorfismos rs2287622 y rs2097937 por la técnica High Resolution Melting.
- Corroborar los genotipos obtenidos por la técnica de High Resolution Melting con el electroferograma de las secuencias obtenidas.
- Establecer las condiciones óptimas para la genotipificación de los polimorfismos por la técnica High Resolution Melting.

9. HIPÓTESIS

Si las diferencias observadas en las curvas de desnaturalización obtenidas con la técnica de HRM se corroboran mediante secuenciación, entonces podremos asignar los genotipos correspondientes para los polimorfismos rs2287622 en el gen *ABCB11* y rs2097937 en el gen *ABCB4*.

10. METODOLOGÍA

10.1. Selección de muestras

Se eligieron 15 mujeres embarazadas con diagnóstico de colestasis intrahepática confirmado a través de pruebas bioquímicas, del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

Las muestras utilizadas fueron tomadas con 2 tipos de tubos BD Vacutainer® de 5 mL, la mayor parte se tomaron en tubos para suero con gel separador, debido a que se realizó una química sanguínea previa a la extracción del DNA; y el resto en tubos con anticoagulante EDTA.

10.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA para las muestras en el tubo BD Vacutainer® para suero con gel separador se encontraban coaguladas, por lo que se realizó un proceso diferente, en el que se rompió el coágulo macerándolo con ayuda de un pistilo. Posterior a esto se realizaron de 2 a 3 lavados utilizando aproximadamente 2 mL de solución de lisis celular del kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega, por muestra; y centrifugado a 14000 rpm por 3:30 min.

Para la extracción de DNA para las muestras en el tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 10 seg para separar la sangre en 3 capas que son el plasma, el paquete eritrocitario y la capa leucocitaria. Esta última capa se transfirió a un tubo Eppendorf® de 1.5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur.

Posterior a esto, se utilizaron los reactivos presentes en el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.

Como metodología en común se realizó lo siguiente:

1. Se adicionó 1 mL de solución de lisis celular y se agitó durante 10 minutos con ayuda del vórtex.
2. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 3 min 30 seg. El proceso se repitió hasta que se logró obtener un precipitado sin residuo eritrocitario.
3. Posteriormente, se agregaron 600 de solución de lisis nuclear y 30 de proteinasa K, para dejar incubando durante 24 hrs aproximadamente en Thermomixer a 55°C.
4. Pasadas las 24 hrs, se agregaron 600 de la solución de precipitación de proteínas, se agitó con ayuda del vórtex, para después dejar incubar la muestra en hielo durante 5 min.
5. Transcurridos los 5 min, se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 3 min 30 seg.
6. Al obtener el sobrenadante tras la centrifugación, se traspasó a otro tubo y se agregaron 600 de isopropanol, para después dejarlo incubar en hielo durante 5 min.
7. A los 5 min, se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 3 min 30 seg.
8. Se decantó el isopropanol agregado, y se agregaron 600 de etanol y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones.
9. Se decantó el etanol agregado, y se dejó secar el DNA obtenido.
10. Tras 15 minutos aproximadamente, se agregaron de 30 a 50 de Buffer de Rehidratación de DNA y se dejó en el Thermomix a 55°C durante 1 hr.

10.3. Cuantificación de DNA.

El DNA obtenido de las muestras fue cuantificado con ayuda del equipo NanoDrop™2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific™, para posteriormente almacenarlas a -20°C para su posterior uso.

10.4. Amplificación de fragmentos por PCR de punto final.

- Estandarización de la técnica

Como primer paso para el análisis de las muestras de DNA obtenidas, se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos que permitieran amplificar un fragmento de los genes ABCB4 y ABCB11 que contuvieran el polimorfismo buscado, *rs2097937* y *rs2287622* respectivamente. Para el diseño de los oligonucleótidos se empleó un programa llamado “Primer Select” de DNASTAR. Durante su diseño, se buscó cumplir con condiciones que permitieran optimizar la obtención del fragmento, tales como la temperatura media de alineamiento (T_m), tanto del oligonucleótido “forward” como del oligonucleótido “reverse” para que éstas fueran cercanas y de esta manera evitar la formación de productos inespecíficos.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los polimorfismos *rs2097937* y *rs2287622*

Polimorfismo	Forward	Reverse
<i>rs2097937</i>	5'- GGGCTCTTTCTTGCTTTATGGA-3'	3'-AATGGGTTGGGTAGACAGGAAA -5'
<i>rs2287622</i>	5'- GACACCCACCATTCCTTCACAG-3'	3'-GGGGCATAACATAAACGCACACA -5'

Posterior a eso, se realizó la estandarización de la PCR de punto final, en donde se utilizó una alícuota de 30 ng/ μ L de DNA control obtenido de la misma manera que las muestras analizadas, y alícuotas de los oligonucleótidos a una concentración de 10 pmol/ μ L.

Para PCR de punto final se utilizó el kit HotStarTaq® MasterMix de QIAGEN y el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf®.

Para poder establecer la T_m experimental fue necesario realizar un gradiente de temperatura, en el que se abarcará la temperatura media de alineamiento de cada par de oligonucleótidos.

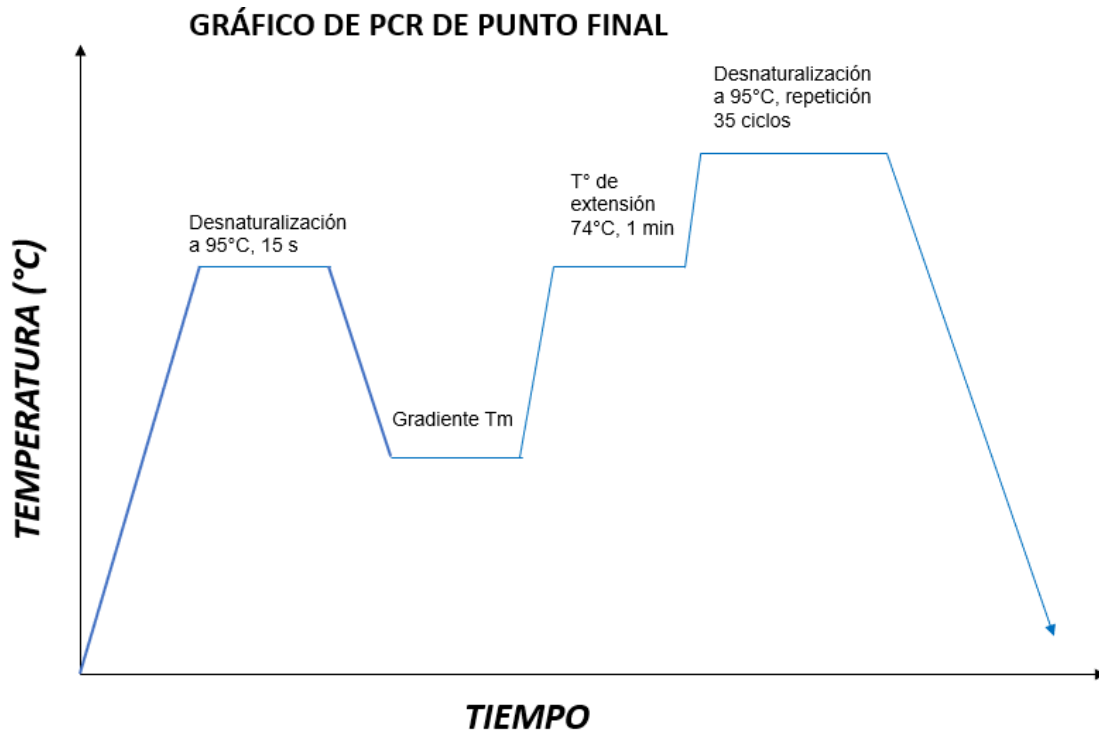


Figura 10. Diagrama de la reacción de PCR punto final en gradiente. El gradiente de Tm es desde los 50°C

Después, se realizaron geles de agarosa al 1.5% para verificar la presencia de los productos esperados. Siendo entonces, las temperaturas elegidas para la amplificación de cada polimorfismo (*rs2097937* y *rs2287622*) de 53.2°C y 55.3°C, respectivamente. Los aspectos considerados para la elección de las temperaturas fueron: la intensidad de la banda en cada temperatura, la proximidad a la banda del tamaño esperado y la inexistencia de bandas intensas que pudieran dar lugar a productos inespecíficos.

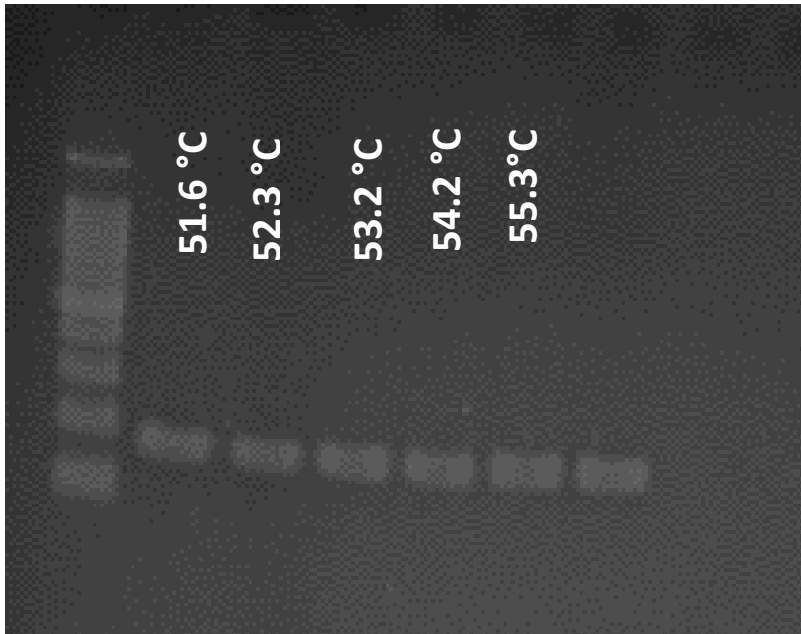


Figura 11. Gel de electroforesis del gen ABCB4 para el polimorfismo rs2097937

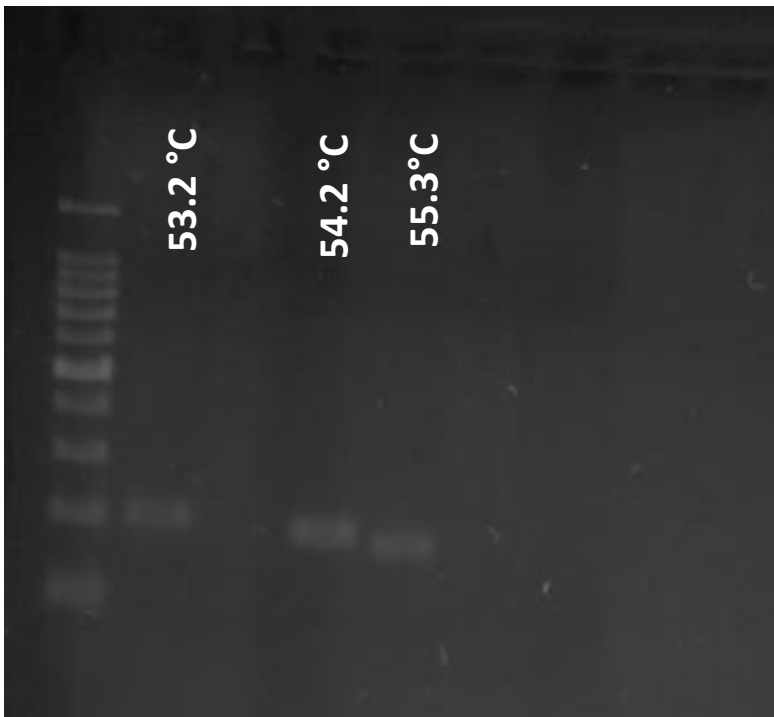


Figura 12. Gel de electroforesis del gen ABCB11 para el polimorfismo rs2097937

10.5. Purificación del DNA

Para poder realizar una reacción de secuenciación es necesario eliminar las impurezas del DNA, para esto se realizó una purificación con el kit ExoSAP-IT®, que contiene una enzima conocida como exonucleasa, la cual degrada cualquier residuo de DNA de cadena sencilla.

Esta técnica está basada en mantener la temperatura óptima en la que trabaja la enzima durante el tiempo que trabaje la enzima, para después inactivarla elevando la temperatura. Esto se ejemplifica en la figura 13.

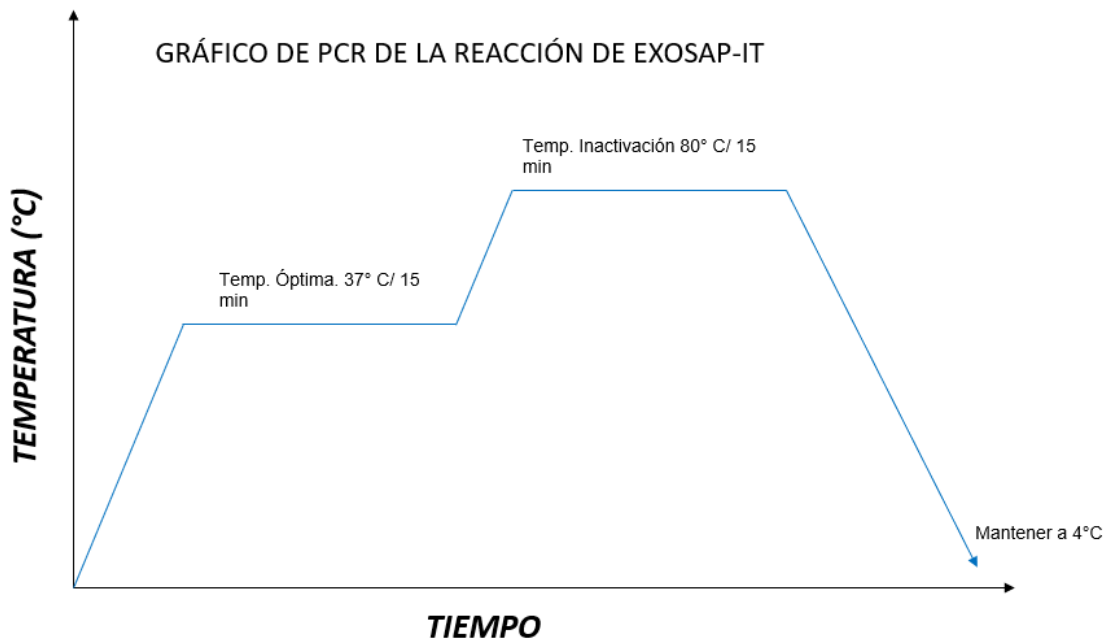


Figura 13. Gráfico de purificación con el kit ExoSAP-IT®

10.6. Reacción de secuenciación

Para la reacción de secuenciación se utilizó el producto purificado resultante de cada PCR de punto final, debido a que esta técnica está basada en el método de secuenciación de Sanger fue necesario utilizar el kit BigDye® v3.1 Terminator Sequencing Cycle (Applied Biosystems).

De igual manera se utilizó el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf® conservando algunas características de la PCR punto final previamente realizada, pero modificando la temperatura, tiempo y ciclaje que favoreciera el tamaño del fragmento obtenido, como se observa en la figura 14.

Las reacciones de secuenciación realizadas en cada una de las muestras se hicieron sólo con el oligonucleótido en sentido directo (forward), a una concentración de 3.2 mM.

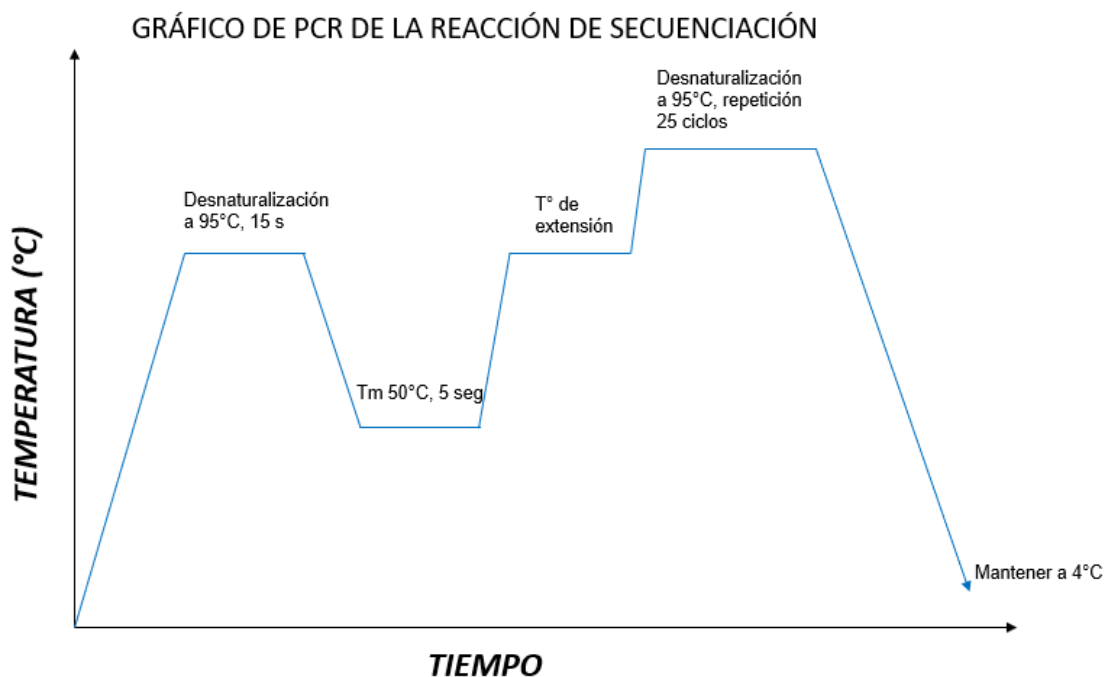


Figura 14. Diagrama de la PCR de secuencia basada en el método de Sanger.

10.7. Purificación en columna

Tras obtener el producto final, fue necesario purificar con ayuda de las columnas que se encuentran en el kit Dye Ex 2.0 spin kit® (QIAGEN), esto con la finalidad de eliminar los nucleótidos terminadores que no se adhirieron en la reacción de secuenciación y así evitar posteriores interferencias.

10.8. Secuenciación

Estos productos de reacción de secuenciación ya purificados se secaron por completo a 85°C y se resuspendieron con formamida. Fue necesario realizar una desnaturalización de los productos para optimizar la secuenciación.

El equipo utilizado fue el secuenciador 3130 Genetic Analyzer y POP7 de Applied Biosystems, como polímero.

10.9. HRM

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó una T_m en la que ambos fragmentos amplificaron, basado en la figura 11 y 12, así como el mismo programa para la amplificación

Para poder montar cada muestra fue necesario utilizar una placa de 96 pozos, cada reacción preparada con el kit Precision Melt Supermix™ de Bio-Rad. Debido a la cantidad de muestras utilizadas, cada reacción se realizó cuatro veces por muestra.

Tabla 4. *Reactivos y volúmenes utilizados para cada reacción de qPCR para la amplificación de los fragmentos a analizar por la técnica HRM.*

Reactivo	Cantidad en μL por cada rx (volumen final de 10 μL)
Precision Melt Supermix	5
Primer F (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5
Primer R (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5
H ₂ O	3
DNA (30 ng/ μL)	1

El programa empleado para la fase de desnaturalización se incluye en la figura 15, empleando el equipo CFX96 de Bio-Rad.

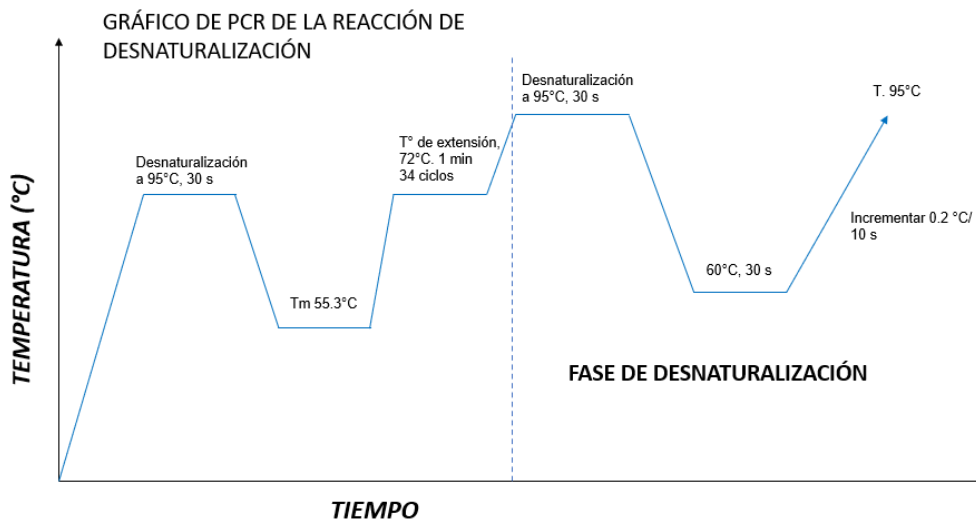


Figura 15. Diagrama del programa utilizado para la qPCR y la técnica de HRM.

El equipo CFX96 nos permite observar un gráfico que muestra un pico de desnaturalización, esto indica la especificidad de los oligonucleótidos empleados, entre más picos se encuentren, más estructuras secundarias o productos diferentes se encuentran en la reacción.

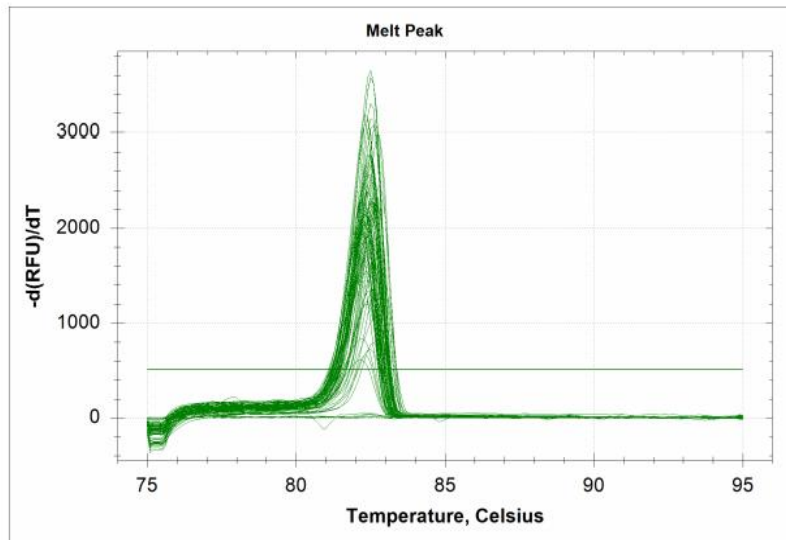


Figura 16. Curva de desnaturalización para el gen ABCB11. La curva muestra la fluorescencia que se genera en la reacción mientras la temperatura va aumentando. Se muestra un sólo pico lo que demuestra que los oligonucleótidos son específicos.

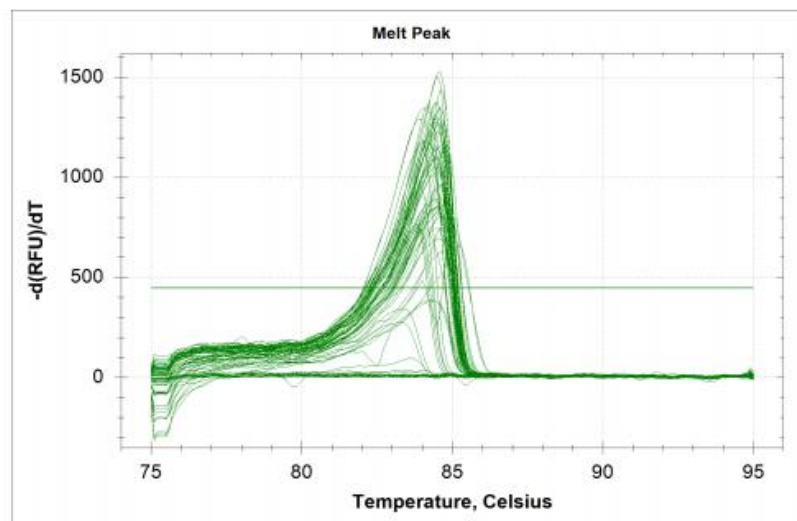


Figura 17. Curva de desnaturalización para el gen ABCB4. La curva muestra la fluorescencia que se genera en la reacción mientras la temperatura va aumentando. Se muestra un solo pico lo que demuestra que los oligonucleótidos son específicos.

10.10. Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas se analizaron en el software BioEdit v7.0.5. con la finalidad de verificar que la asignación de las bases en la secuencia tuviera concordancia con los picos presentes en el electroferograma. Además de asignar genotipos a cada una de las muestras analizadas, según este.

Después, cada secuencia se alineó en Blastn de NCBI, para así identificar la presencia o ausencia del polimorfismo buscado e identificar cual era el cambio de bases generado.

Para finalizar, los resultados obtenidos del equipo CFX96 que realizó la qPCR, se procesaron con un software específico para la técnica de HRM llamado Precision Melt Analysis™ de Bio-Rad.

11.RESULTADOS

11.1. Resultados de secuenciación

De las 15 muestras analizadas con la secuenciación tipo Sanger, se encontró que sólo 3 de éstas no presentaban un cambio en la secuencia que indicará la presencia del polimorfismo rs2097937. Todas las demás muestras presentaron el cambio reportado en en la posición 83846 de la secuencia génica; para el caso del análisis de las secuencias en el polimorfismo rs2287622, fueron 8 muestras las que no presentaron cambio. Para este polimorfismo se reporta un cambio de bases en la posición 62506 de la secuencia génica, no obstante el cambio reportado es de una Timina por cualquiera de las otras 3 bases nitrogenadas, siendo el cambio de Timina a Citosina la única encontrada. Lo antes mencionado se encuentra descrito en la Tabla 5, todos estos resultados fueron obtenidos tras el alineamiento de las secuencias en la plataforma Blastn.

Tabla 5. Polimorfismos rs2287622 y rs2097937 en los genes ABCB11 y ABCB4, respectivamente, en la secuencia de DNA de 15 pacientes con CIE

PACIENTE	ABCB4 (rs2097937)	ABCB11 (rs2287622)
2074	C>T	S/C
2075	S/C	T>C
2076	S/C	S/C

2077	C>T	S/C
2078	C>T	S/C
2109	C>T	S/C
2116	C>T	T>C
2119	C>T	T>C
2125	C>T	T>C
2126	C>T	T>C
2128	C>T	S/C
2129	C>T	T>C
2134	C>T	S/C
2135	C>T	S/C
2136	S/C	T>C

**En la tabla se muestra el cambio de bases encontrado en cada muestra en la posición reportada por dbSNP para cada polimorfismo. S/C representa sin cambio en la posición. Ejemplificado en la figura 19.*

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los electroferogramas de cada una de las muestras siendo de rs2097937 las figuras 25 y 26 y para el polimorfismo rs2287622 las figuras 19, 20 y 21, se procedió a realizar un análisis de los picos obtenidos en la posición reportada y de esta manera asignar los genotipos para cada polimorfismo. (Tabla 6)

Los criterios que se tomaron en cuenta para esto fueron para el caso de las muestras heterocigotas, fue la superposición de dos picos en una sólo posición, pues denota la diferencia de bases en cada alelo (figura 20 y 26).

Para las muestras con el genotipo homocigoto simplemente se observó que existiera el cambio en la posición reportada y el pico del electroferograma estuviera definido, esto se observa en las figuras 19, 20, 21.

Tabla 6. Genotipos asignados según la secuencia de DNA de 15 pacientes con CIE, en un fragmento de los genes ABCB11 y ABCB4 que contienen la presencia los polimorfismos rs2287622 y rs2097937, respectivamente.

PACIENTE	GENOTIPO (ABCB4)	GENOTIPO (ABCB11)
2074	T;T	T;T
2075	C;T	C;C
2076	T;T	C;T
2077	T;T	T;C
2078	T;T	T;C
2109	C;T	C;C
2116	T;T	C;T
2119	T;T	C;T
2125	T;T	C;C
2126	T;T	C;T

2128	T;T	T;T
2129	T;T	T;T
2134	T;C	T;T
2135	T;T	T;T
2136	C;T	C;C

*En la tabla se encuentran los genotipos asignados a cada una de las muestras según los picos encontrados en el electroferograma, en la posición reportada. Ejemplificado en la figura 19,20,21,24,25 y 26. Para ABCB4: T;T (homocigoto mutado), C;T (heterocigoto), C;C (homocigoto silvestre). Para ABCB11: C;C (homocigoto mutado), T;C (heterocigoto), T;T (homocigoto silvestre)

Homo sapiens ATP binding cassette subfamily B member 11 (ABCB11), RefSeqGene (LRG_1199) on chromosome 2

Sequence ID: [NG_007374.2](#) Length: 122929 Number of Matches: 1

Range 1: 62527 to 62664 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
250 bits(135)	1e-62	137/138(99%)	0/138(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGAAC	TTTGTGTTTTCTTTCTTCTCCAGATTCTAAATGACCTCAACATGGCCATTAAA	60	
Sbjct 62527	CTGAAC	TTTGTGTTTTCTTTCTTCTCCAGATTCTAAATGACCTCAACATGGTCAATTAAA	62586	
Query 61	CCAGGGG	AAATGACAGCTCTGGTAGGACCCAGTGGAGCTGGAAAAAGTACAGCACTGCAA	120	
Sbjct 62587	CCAGGGG	AAATGACAGCTCTGGTAGGACCCAGTGGAGCTGGAAAAAGTACAGCACTGCAA	62646	
Query 121	CTCATT	CAGCGATTCTAT	138	
Sbjct 62647	CTCATT	CAGCGATTCTAT	62664	

Figura 18. Alineamiento de la secuencia de un fragmento del gen ABCB11 de una muestra que contiene el polimorfismo rs2287622. En el alineamiento se observa uno de los cambios de bases reportados por NCBI, siendo el cambio de una Timina (T) por una Citosina (C).

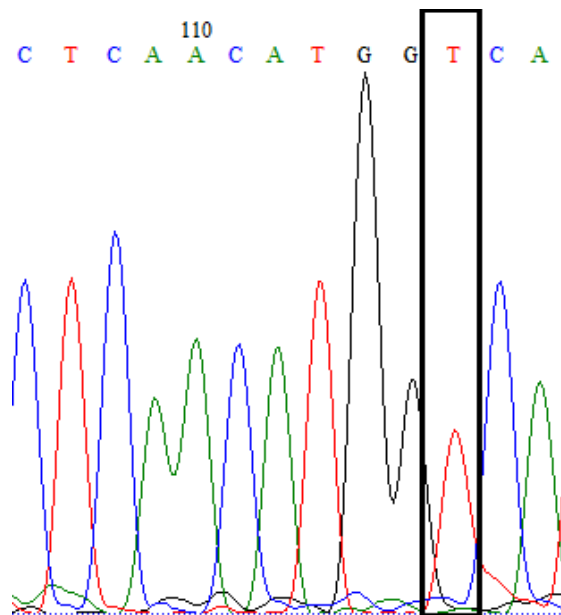


Figura 19. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma homocigoto mutado. Basados en este electroferograma se asignaron los genotipos C;C para las muestras que presentaban un pico en el electroferograma igual al marcado en el recuadro negro.

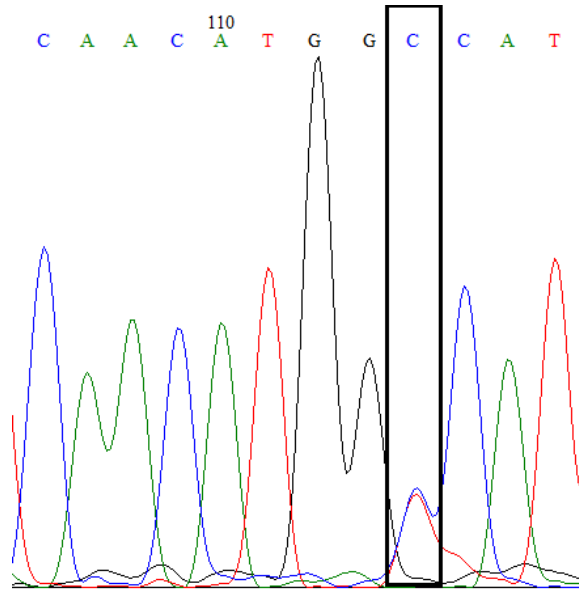


Figura 20. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma heterocigoto. Basados en este electroferograma se asignaron los genotipos T;C para las muestras que presentaban un pico en el electroferograma igual al marcado en el recuadro negro.

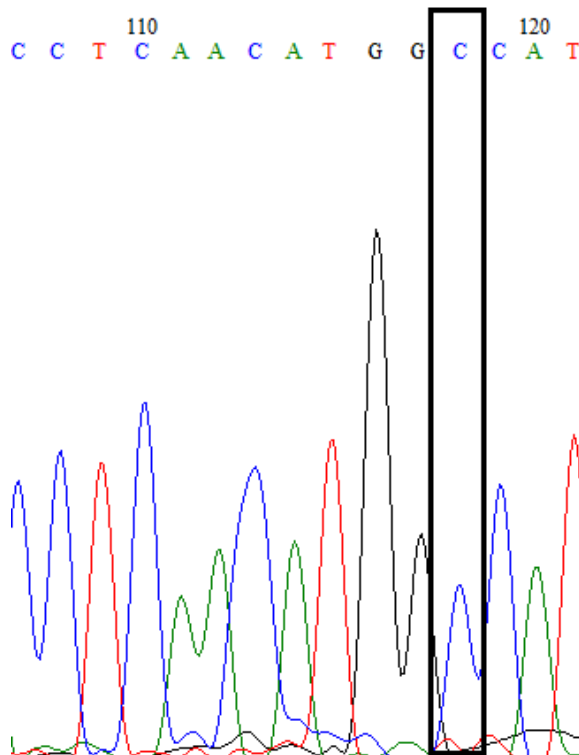


Figura 21. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2287622 en su forma homocigoto silvestre. Basados en este electroferograma se asignaron los genotipos C;C para las muestras que presentaban un pico en el electroferograma igual al marcado en el recuadro negro.

11.2. Resultados de HRM

En la figura 22 y 27, se observan los resultados del equipo tras la qPCR, en donde sólo se observa la temperatura de desnaturalización de cada muestra, y tras someter estos mismos resultados en el software Precision Melt Analysis™ se obtuvieron los resultados presentados en las figuras 23 y 28, donde cada una de las muestras fue asignada en grupos o “clusters” dependiendo de su T_m.

En la figura 23 se observa la presencia de los 3 clusters esperados y la dispersión de algunas muestras debido a la concentración por lo cual quedan fuera de esos tres clusters. Para la figura 28 donde se observa un cuarto grupo más definido, fue necesario realizar un alineamiento en Blastn que permitiera identificar cambios en la secuencia, que justificaran la aparición del cuarto grupo (figura 29).

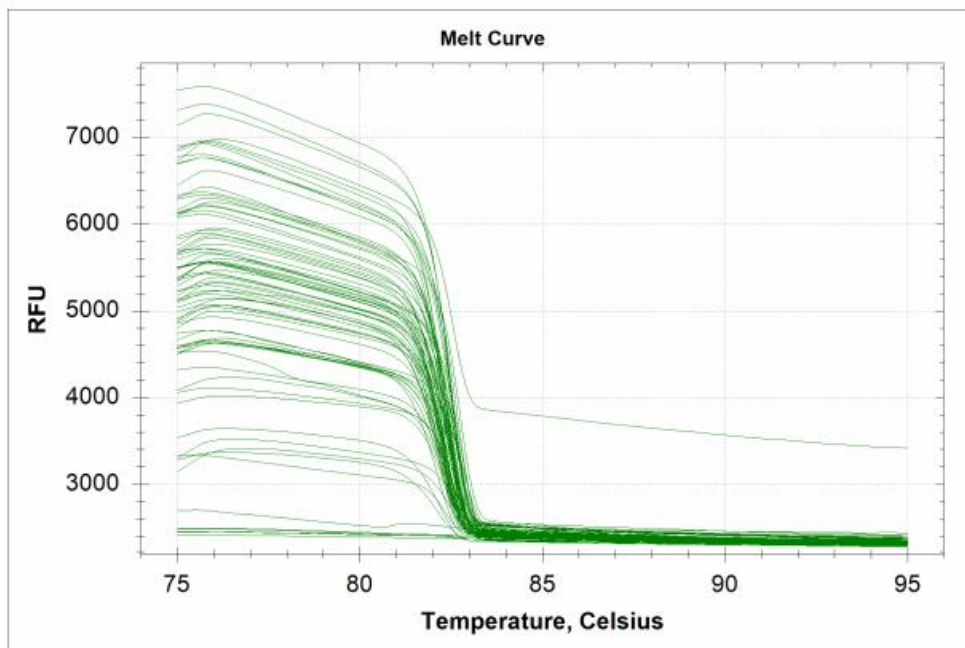


Figura 22. Curva de desnaturalización del gen ABCB11 que proporciona el equipo CFX96 de Bio-Rad.
Esta curva sólo muestra la disminución de la fluorescencia para cada muestra mientras la temperatura aumenta debido a la desnaturalización del DNA de doble cadena.

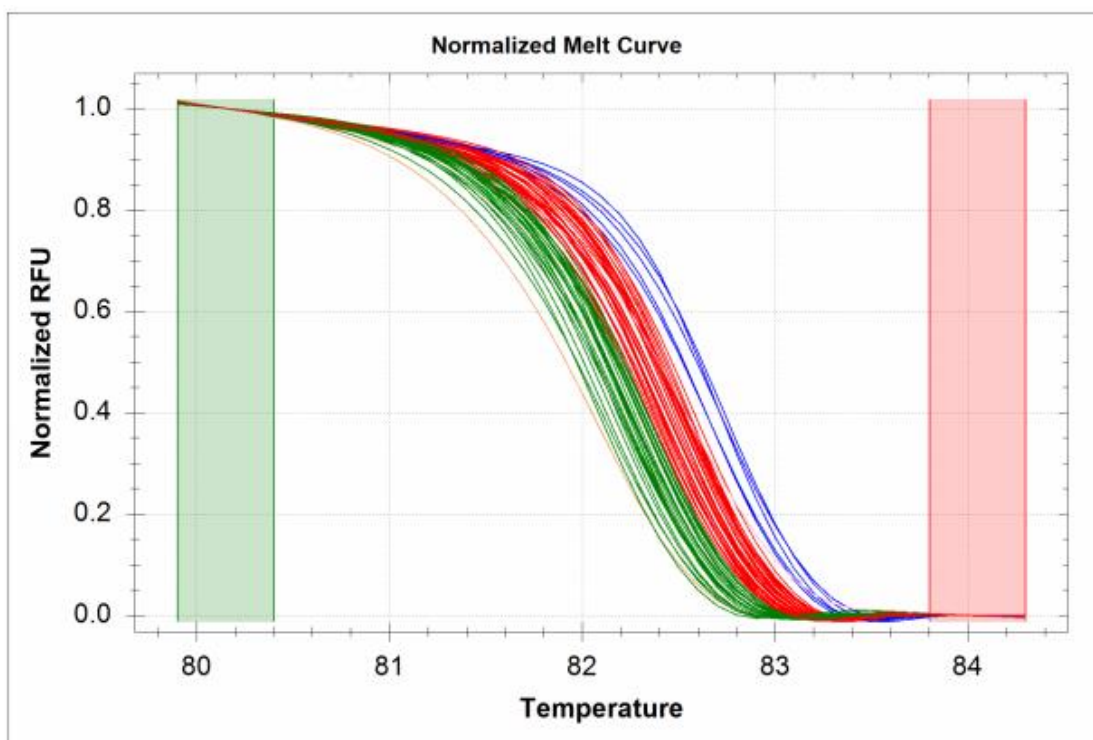


Figura 23. Curva normalizada de desnaturalización del gen ABCB11 para el polimorfismo rs2287622 que da el software Precision Melt Analysis™. Esta curva representa el asignamiento de las muestras en 4 grupos diferentes dependiendo del genotipo que se tiene para el polimorfismo rs2287622.

Tabla 7. Genotipos asignados para cada grupo presente en la curva normalizada de desnaturalización para el polimorfismo rs2287622 del gen ABCB11

Grupo en la curva normalizada de desnaturalización	Genotipo
Grupo 1(rojo)	T;T
Grupo 2(azul)	C;C
Grupo 3 (verde)	T;C

Homo sapiens ATP binding cassette subfamily B member 4 (ABCB4), RefSeqGene on chromosome 7

Sequence ID: [NG_007118.2](#) Length: 85388 Number of Matches: 1

Range 1: 83776 to 83892 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
211 bits(114)	4e-51	116/117(99%)	0/117(0%)	Plus/Plus
Query 1	TCAAAGTTTTTTAAATGAATGAATTTCCAGCTTTATCATCCAACATCAAGAGAAAATGAA	60		
Sbjct 83776	TCAAAGTTTTTTAAATGAATGAATTTCCAGCTTTATCATCCAACATCAAGAGAAAATGAA	83835		
Query 61	ATTGCCCTACTGAGCTAACTCTGAAAGCACATATCGGTTCCATAAAGCAAGAAAGAG	117		
Sbjct 83836	ATTGCCCTACCGAGCTAACTCTGAAAGCACATATCGGTTCCATAAAGCAAGAAAGAG	83892		

Figura 24. Alineamiento de la secuencia de un fragmento del gen ABCB4 de una muestra que contiene el polimorfismo rs2097937. En el alineamiento se observa un cambio de Citosina (C) por Timina (T), siendo el reportado por NCBI.

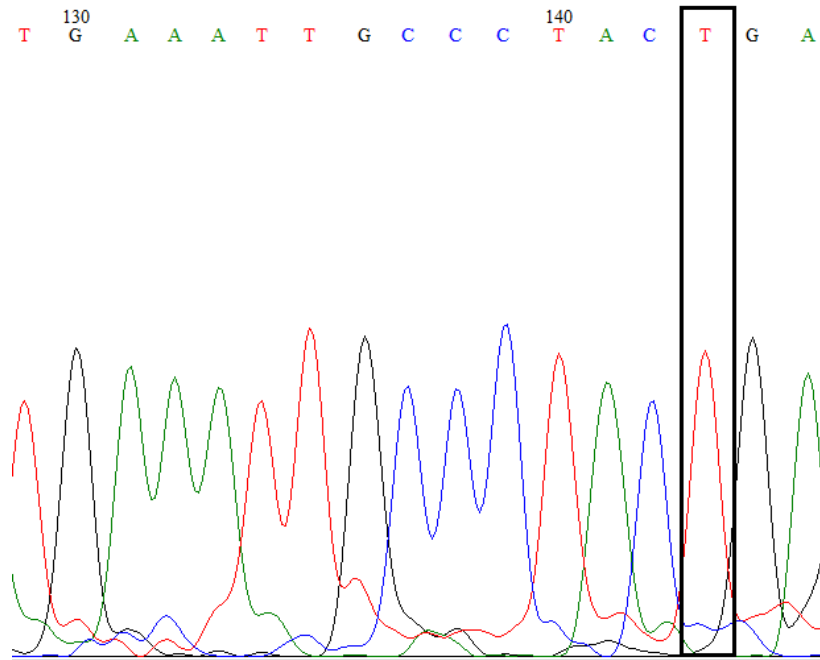


Figura 25. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2097937 en su forma homocigoto mutado. Basados en este electroferograma se asignaron los genotipos T;T para las muestras que presentaban un pico en el electroferograma igual al marcado en el recuadro negro.

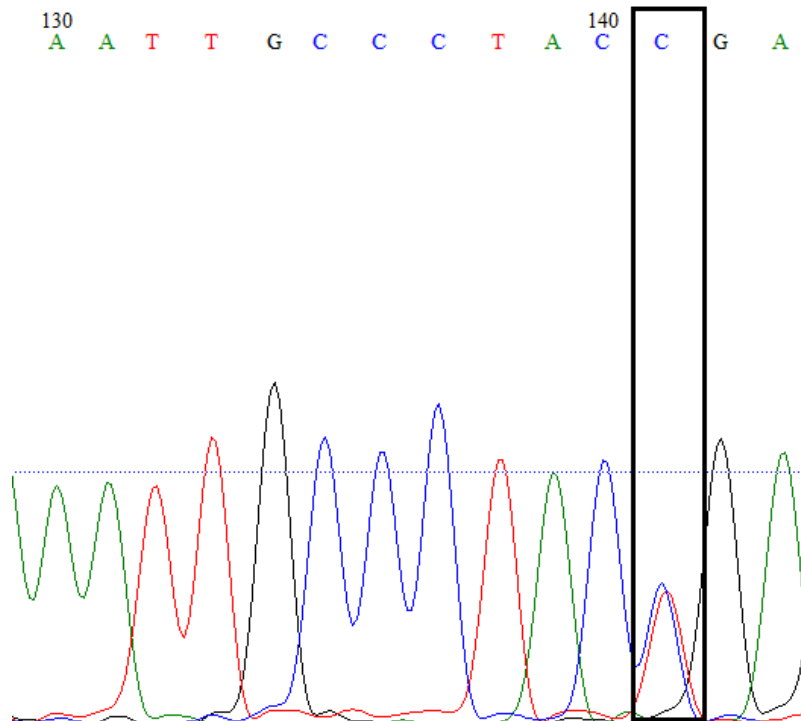


Figura 26. Electroferograma una secuencia que contiene el polimorfismo rs2097937 en su forma heterocigoto. Basados en este electroferograma se asignaron los genotipos C;T para las muestras que presentaban un pico en el electroferograma igual al marcado en el recuadro negro.

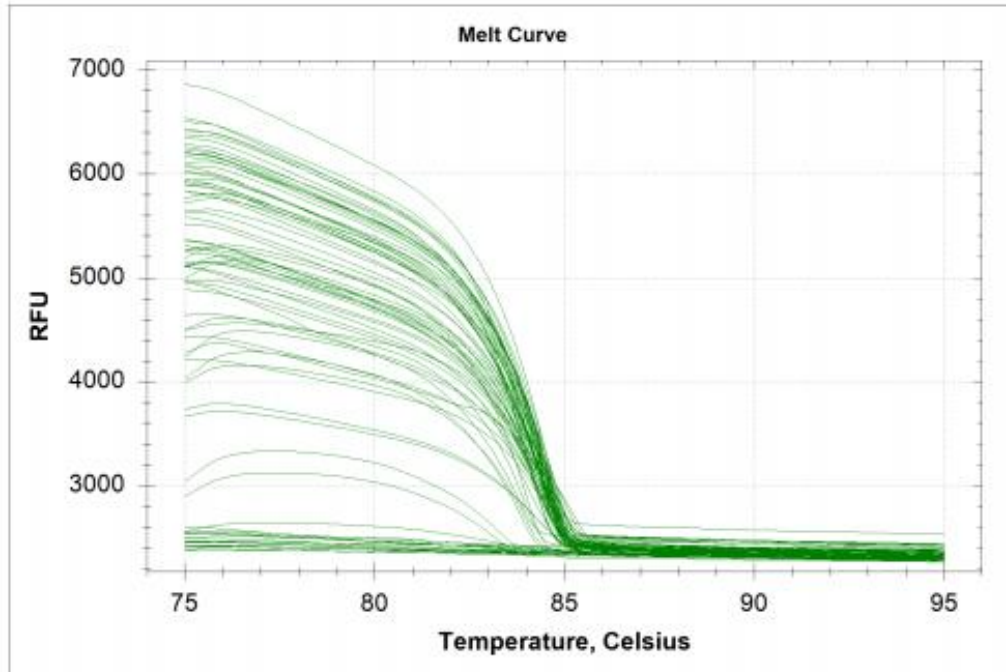


Figura 27. Curva de desnaturalización del gen ABCB4 que proporciona el equipo CFX96 de Bio-Rad. Esta curva sólo muestra la disminución de la fluorescencia para cada muestra mientras la temperatura aumenta.

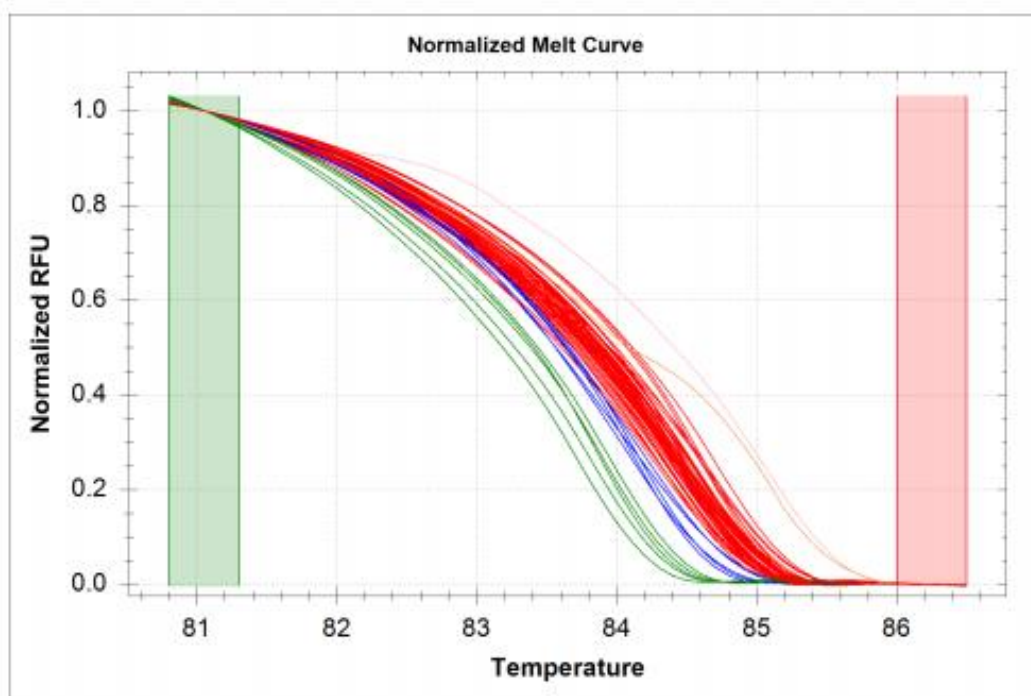


Figura 28. Curva normalizada de desnaturalización del gen ABCB4 para el polimorfismo rs2097937 que da el software Precision Melt Analysis™. Esta curva representa el asignamiento de las muestras en 4 grupos diferentes dependiendo del genotipo que se tiene para el polimorfismo rs2097937.

Tabla 8. Genotipos asignados para cada grupo presente en la curva normalizada de desnaturalización para el polimorfismo rs2097937 del gen ABCB4

Grupo en la curva normalizada de desnaturalización	Genotipo
Grupo 1(rojo)	T;T
Grupo 2(azul)	C;T
Grupo 3 (verde)	C;T
Grupo 4 (naranja)	Muestra 2135

*El software de desnaturalización asignó a la muestra 2135 en un grupo diferente debido a que tiene dos variantes génicas diferentes. (Figura x)

Después de analizar las curvas normalizadas obtenidas del software para cada polimorfismo, se analizaron los grupos asignados para determinar el genotipo de cada una (tabla 7 y 8) y de igual manera comparar estos genotipos con los asignados mediante la secuenciación tipo Sanger.

Homo sapiens ATP binding cassette subfamily B member 4 (ABCB4), RefSeqGene on chromosome 7

Sequence ID: [NG_007118.2](#) Length: 85388 Number of Matches: 1

Range 1: 83723 to 83895 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
302 bits(163)	5e-78	170/173(98%)	1/173(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGTTTC-ATAGCCTCATCTCTCTGGTAATTTTCTAAATCATTCTATTGTGGAATCAAAGT	59		
Sbjct 83723	TGTTCAATAGCCTCATCTCTCTGGTAATTTTCTAAATCATTCTATTGTGGAATCAAAGT	83782		
Query 60	TTTTTAAATGAATGAATTTCCAGCTTTATCATCCAACATCAAGAGAAAATGAAATGCCCC	119		
Sbjct 83783	TTTTTAAATGAATGAATTTCCAGCTTTATCATCCAACATCAAGAGAAAATGAAATGCCCC	83842		
Query 120	TACTGAGCTAACTCTGAAAGCACATATCGGTTCCATAAAGCAGGAAAGAGCCC	172		
Sbjct 83843	TACCGAGCTAACTCTGAAAGCACATATCGGTTCCATAAAGCAAGAAAGAGCCC	83895		

Figura 29. Alineamiento en BLAST de la muestra del grupo naranja (2135). Este alineamiento muestra una delección en la posición 83728 y un cambio de bases de Adenina (A) por Guanina (G) en la posición 83885.

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La colestasis intrahepática del embarazo es un trastorno propio de la gestación humana que casi siempre aparece durante el segundo o tercer trimestre. La tasa de recurrencia en embarazos posteriores es de entre 60 y 70%. No se asocia con complicaciones maternas, y el cuadro revierte dos a ocho semanas después de la terminación del embarazo, sin dejar alguna secuela en la madre. Sin embargo, existe evidencia de que las mujeres con este trastorno tienen riesgo de enfermedad hepática en el futuro y padecerla puede tener repercusiones para el feto (Medina. J. 2012).

Aunque el diagnóstico de la colestasis depende de un correcto abordaje clínico del caso y del uso de varias pruebas bioquímicas, algunas alteraciones hepáticas que se consideran normales durante el embarazo pueden complicar su diagnóstico, por tanto resulta importante proponer nuevos métodos que permitan entregar diagnósticos certeros y oportunos con el fin de evitar óbitos “sin causa aparente” e informar al paciente del posible riesgo de padecer otro tipo de enfermedades hepáticas.

En el estudio realizado por Dixon y colaboradores se analizaron varios polimorfismos en genes implicados en la formación y en el transporte biliar con la finalidad de establecer la relación que existía entre estos y la CIE. Partiendo de esto, se escogieron dos polimorfismos que presentaran una mayor incidencia en la población mundial, siendo que no existen registros en población mexicana y existen pocos estudios de la etiología genética de la enfermedad. (Dixon. P. H. *et.al.* 2014)

El estudio de los polimorfismos tiene muchas aplicaciones en medicina, investigaciones biológicas, etc. En algunos casos las enfermedades genéticas pueden ser causadas por polimorfismos. De esta forma, los investigadores pueden usar los polimorfismos como marcadores de ciertas enfermedades, por ejemplo, si el presentar ciertos polimorfismos puede ser causal de riesgo para el desarrollo o progresión de alguna enfermedad. (Checa, M.A. 2007)

La secuenciación del DNA es la prueba de oro para la detección de nuevos polimorfismos, pero resulta muy costosa, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para realizar este tipo de escaneo.

Para el caso de la discriminación alélica, es decir, la identificación de polimorfismos ya identificados no existe el método ideal; los usados actualmente emplean cuatro mecanismos generales para llevarla a cabo: hibridación alelo-específica, ligación de oligonucleótidos alelo-específicas, incorporación de oligonucleótidos alelo-específica y corte enzimático alelo-específico. (Checa, M.A. 2007)

En el caso de la técnica HRM, su fundamento está basado en explotar las diferencias que existen entre los no apareamientos de cadenas heteroduplex de

DNA y de los apareamientos de cadenas homoduplex de DNA. La técnica se vuelve específica debido a la técnica previa utilizada al análisis (qPCR) que está basado en la creación de dos sondas alelo-específicas. A pesar de ello, la obtención de resultados confiables radica en el software utilizado.

El software Precision Melt Analysis, proporciona los resultados como se observa en la figura 23 y 28, presentando un gráfico de fluorescencia vs T_m , y agrupa cada una de las muestras en “clúster” o grupos según la T_m a la que se desnaturaliza la cadena de DNA. La interpretación de la curva y asignación de genotipos es relativamente sencilla si se toman en cuenta los siguientes criterios: como el contenido de GC, la formación de cadenas homoduplex y heteroduplex, el tamaño del amplicón, así como la clase a la que pertenece el polimorfismo a identificar; debido a que son estas características las que determinan el comportamiento de la curva. (Erali, M., Voelkerding, K. V., Wittwer, C. T. 2008).

La formación de cadenas heterodúplex y homodúplex, es un criterio importante al asignar los genotipos de tipo homocigoto para cada grupo, aunado al contenido GC del amplicón. Tomando en cuenta que una cadena homoduplex se presenta de dos maneras; que ambas cadenas no presentan el polimorfismo (rs2287622 T>C y rs2097937 C>T) y se mantiene el mismo apareamiento entre bases (T-A para rs2287622 y GC para rs2097937) o que ambas cadenas lo presentan y de igual manera existe un correcto apareamiento de bases (G-C para rs2287622 y T-A para rs2097937).

Dependiendo de las secuencias individuales, los amplicones de diferentes variantes homocigotas generan a veces curvas de formas muy similares que son difíciles de distinguir; considerando que la unión de las bases C-G se da por tres puentes de hidrógeno, mientras la de T-A se da por dos puentes de hidrógeno, es natural pensar que la T_m de una cadena de DNA con un enlace C-G será mayor a la T_m de una cadena con enlace T-A. De ahí que, observar la T_m de las curvas que presentan mayor similitud puede ayudar a determinar el genotipo de la variante. (Bruzzone, C. M., & Steer, C. J. 2015)

En resumen, si se observa la figura 23 en donde se presenta la curva obtenida para el polimorfismo rs2287622, el grupo azul presenta un alargamiento de la T_m por lo tanto se le asignó el genotipo de homocigoto mutado (unión C-G en las cadenas de DNA). Por el contrario, el grupo rojo presenta su T_m a menor temperatura respecto al grupo rojo, vinculándolo a lo antes mencionado, a este grupo se le asignó el genotipo de homocigoto silvestre o normal (unión T-A en las cadenas de DNA)

Para el caso de las cadenas heteroduplex, la unión entre las bases nitrogenadas se va a ver afectada por el cambio que pueda existir en alguna de las cadenas de DNA, por ejemplo, para el polimorfismo rs2287622 donde el cambio es T>C y rs2097937 donde el cambio es C>T, la unión de las bases va a ser nulo. Entonces, cuando los amplicones de muestras heterocigotas (que contienen tanto homo- y heterodúplex) se desnaturalizan, las curvas resultantes tienen una forma característica, diferente de la forma típica que resulta de una muestra homocigótica.

Así, en la curva de desnaturalización del polimorfismo rs2287622 (figura 23) el grupo verde, asignado con el genotipo heterocigoto (sin enlace, T>C) presenta un cambio en la curva bastante distintivo y su T_m es incluso menor (respecto a los °C) a los grupos azul y rojo asignados como homocigoto mutado y silvestre, respectivamente.

Lo mismo aplica para la interpretación de la curva del polimorfismo rs2097937 (figura 28). Sin embargo, el análisis de esta curva permite introducir y/o mencionar aspectos relevantes que pueden influenciar los resultados y que estos no se puedan analizar con la misma sencillez que el polimorfismo anterior.

Estos aspectos radican principalmente en: la calidad de la muestra de DNA obtenida, su concentración, la calidad del amplicón obtenido, así como la longitud de este. De igual manera la importancia de una buena selección de oligonucleótidos, de reactivos para la PCR y la técnica de HRM (principalmente el colorante que da la fluorescencia), y finalmente del software.

Uno de los factores más importantes asociados con la calidad del DNA que puede afectar los resultados, es la presencia de sales en la muestra, ya que éstas cambian sutilmente la termodinámica de la transición de la desnaturalización del DNA. Si no

se controla, el arrastre de sal y otros artefactos experimentales, se puede complicar la interpretación de las curvas, lo que lleva a una menor reproducibilidad y mayores tasas de error. Además, un DNA de baja calidad puede producir productos de PCR inespecíficos, lo que en última instancia da como resultado una puntuación incorrecta de los resultados en los análisis de HRM o reacciones fallidas. Las muestras que se amplifican tarde o no alcanzan una meseta de señal alta en la fase de PCR pueden dar como resultado datos de HRM no concluyentes o de baja resolución. (URL 1)

De igual manera, en lo que respecta al DNA utilizado, la concentración puede jugar un papel importante en la obtención de resultados, en la figura 28 y en la descripción de la tabla 8, se observa que el software asignó las mismas muestras en dos grupos diferentes, el grupo de color verde y el grupo color azul. Profundizando, aunque el software permite hasta cierto punto la normalización de variaciones en las concentración de las muestras analizadas, cuando la variación es muy alta, se genera una mayor dispersión de las muestras, impidiéndole al software evaluar de forma correcta las diferencias en la secuencia de las muestras.

Debido a esto, se recomienda la cuantificación espectrofotométrica y la dilución de la muestra de DNA a una concentración estándar para introducirla en la PCR. Aunque algunos instrumentos contienen un software de superposición de curvas, estas pueden enmascarar algunas diferencias de muestra, por eso mejor minimizar estas diferencias antes de realizar el análisis. (Erali, M., & Wittwer, C. T. 2010)

Por lo que para poder asignar de manera más asertiva el genotipo de las muestras agrupadas en los grupos verde y azul se tuvo que recurrir a observar la secuencia previamente obtenida (figura 23), siendo entonces el genotipo heterocigoto del polimorfismo rs2097937.

Lo antes mencionado, permite establecer el papel fundamental que tiene la secuenciación de Sanger en la interpretación de resultados y por ende en la estandarización de la técnica; pues, aunque se realizó como un método confirmatorio dentro del análisis, su uso permitió una mejor interpretación de la

curva obtenida y por consiguiente a la búsqueda de los errores que pudieron darse al realizar la técnica de HRM.

Ahora bien, la diferencia más marcada entre los resultados obtenidos entre la curva del polimorfismo rs2097937 y el polimorfismo rs2287622 es la aparición de un cuarto grupo (figura 28), en el que se asigna una única muestra; debido a que esta muestra de igual manera se encontraba en el grupo rojo fue necesario revisar la secuencia completa obtenida de dicha muestra, encontrando lo que se observa en la figura 29, una deleción al inicio del fragmento y un cambio de bases (A>G) al final del fragmento, dando pie a explicar cómo la longitud del fragmento puede afectar los resultados.

En general, se recomiendan longitudes de amplicón de 100 a 300 pb para el análisis de HRM de diferentes variantes de secuencia, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inversiones, inserciones y deleciones. Se debe tomar en cuenta que al diseñar oligonucleótidos para el análisis de genotipado de SNP de HRM, la longitud del amplicón debe ser corta para evitar la detección de variantes fuera de la región de interés. (URL 1)

A medida que disminuye el tamaño de los amplicones, aumentan las diferencias de T_m entre los genotipos, lo que permite una mejor diferenciación. Además, la distinción entre las dos poblaciones homocigotas en la curva comienza a disminuir a medida que aumenta el tamaño del amplicón. (Erali, M., Voelkerding, K. V., Wittwer, C. T. 2008).

El tamaño de los amplicones utilizados para genotipificar los dos polimorfismos ya mencionados tienen una longitud de aproximadamente 240-250 pb; en resumen, a medida que aumenta el tamaño del amplicón, es posible que se detecten sitios de mutación adicionales, lo que dará como resultado un patrón de desnaturalización más complejo donde se vuelve más difícil distinguir entre las diferentes variantes de secuencia.

Por consecuencia, para evitar la aparición de grupos extras en la curva, lo ideal sería disminuir el tamaño del amplicón, no obstante, se debe considerar que los

amplicones más pequeños pueden producir señales de fluorescencia más bajas, presumiblemente debido a una menor incorporación de colorante en la secuencia más corta.

Cabe destacar, que pese a estos errores cometidos en lo que respecta al polimorfismo rs2097937, los resultados obtenidos tanto en la secuenciación de las muestras como en los datos de HRM, no tienen mayor discrepancia; y al desglosar las posibles causas se puede buscar una mejora en cada una de ellas permitiendo que la estandarización de las condiciones para la identificación de este polimorfismo se logre.

Al mismo tiempo, algo que podría fortalecer la interpretación de las curvas en lo que respecta a la asignación del grupo heterocigoto es utilizar un software que realice una superposición de las curvas. Es decir, que, en lugar de obtener una curva para cada muestra utilizada, y que esto dificulte la interpretación debido a la discrepancia que puede existir en las secuencias o problemas experimentales como el pipeteo o la evaporación de las muestras, se obtenga una sólo curva para cada grupo. Una curva que muestre mayor sensibilidad para la detección del grupo heterocigoto debido al cambio en la secuencia (figura 8), ya que el escaneo de genes depende de la detección de heterocigotos por diferencias de forma de las curvas de fusión, no de diferencias homocigotas que afectan principalmente a la T_m . (Erali, M., Voelkerding, K. V., Wittwer, C. T. 2008).

La precisión de la detección de variantes aumenta superponiendo las curvas para centrarse solo en las diferencias de forma, no en las diferencias de T_m que están influenciadas por la varianza de la muestra y el instrumento. (Erali, M., Voelkerding, K. V., Wittwer, C. T. 2008).

También es importante mencionar que el poder de la técnica HRM depende directamente de la resolución del instrumento que se utiliza. La resolución de las curvas depende del control de temperatura, la medición de la temperatura y la medición de la fluorescencia. (Herrmann, M. G. 2006)

Finalmente, es necesario repetir algunos puntos del proceso para llegar al punto de la estandarización y así evitar todos los problemas antes expuestos, y que la técnica para identificar estos polimorfismos sea reproducible y a la par aplicable al área del diagnóstico.

13. CONCLUSIÓN

- Se logró estandarizar las condiciones de secuenciación para las muestras, así como la obtención de secuencias óptimas que permitieran su posterior uso.
- Tras el análisis de las secuencias, se logró establecer la presencia y/o ausencia de los polimorfismos en cada una de las muestras.
- Se pudieron analizar los resultados obtenidos tras realizar la técnica de HRM, destacando errores que pueden influir en una mala interpretación de estos.
- Con las curvas de desnaturalización obtenidas con la técnica HRM, fue posible asignar genotipos para los polimorfismos rs2097937 y rs2287622 que se encontraban en las muestras analizadas
- Fue posible establecer una relación entre los resultados arrojados por la técnica HRM con las secuencias obtenidas, confirmando así los genotipos asignados.

14. PROSPECTIVAS

- Corregir los errores cometidos durante el transcurso de la estandarización de la técnica.
- Aumentar la población de estudio para aumentar la especificidad y sensibilidad de las condiciones establecidas para la técnica High Resolution Melting.
- Proponer y estudiar otros polimorfismos asociados a la Colestasis Intrahepática del Embarazo con la finalidad de lograr el establecimiento de la técnica como apoyo al diagnóstico.

15. REFERENCIAS

Artículos científicos

1. Ali, M. K., Abdelbadee, A. Y., Shazly, S. A., Abbas, A. M., & Mohammed, S. A. (2013). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Evidence Based Women's Health Journal*, 3(1), 1-4.
2. Bruzzone, C. M., & Steer, C. J. (2015). High-Resolution Melting Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms. *Molecular Typing of Blood Cell Antigens*, 5-27.
3. Cerrillo, M., Argüello, A., Avilés, C., Amezcua, A., Martínez, L.G., & Gonzalez, G., (2005). Colestasis Gravídica: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. *Archivos de Medicina. Asociación Española de Médicos Internos Residentes*. octubre - noviembre, año/vol. 1, número 005
4. Checa, M.A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*. Vol. 20. No.3. julio – septiembre 2007. pag. 213-221
5. Chiang, J. Y. L. (2013). Bile Acid Metabolism and Signaling. *Comprehensive Physiology*, 1-3.
6. Cho, M. H., Ciulla, D., Klanderma, B. J., Raby, B. A., & Silverman, E. K. (2008). High-Resolution Melting Curve Analysis of Genomic and Whole-Genome Amplified DNA. *Clinical Chemistry*, 54(12), 2055-2058
7. Dixon, P. H., Wadsworth, C. A., Chambers, J., Donnelly, J., Cooley, S., Buckley, R., Mannino, R., Jarvis, S., Syngelaki, A., Geenes, V., Paul, P., Sothinathan, M., Kubitz, R., Lammert, F., Tribe, R. M., Ch'ng, C. L., Marschall, H.-U., Glantz, A., Khan, S. A., Williamson, C. (2014). A Comprehensive Analysis of Common Genetic Variation Around Six Candidate Loci for Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *American Journal of Gastroenterology*, 109(1), 76-84.
8. Dixon, P. H., & Williamson, C. (2008). The molecular genetics of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstetric Medicine*, 1(2), 65-71.
9. Erali, M., & Wittwer, C. T. (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50(4), 250-261.

10. Erali, M., Voelkerding, K. V., & Wittwer, C. T. (2008). High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 50-58.
11. Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2017). High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. *Molecular Diagnostics*, 79-102.
12. García-Romero, C. S., Guzman, C., Cervantes, A., & Cerbón, M. (2019). Liver disease in pregnancy: Medical aspects and their implications for mother and child. *Annals of Hepatology*, 18(4), 553-562.
13. García, C. (2006). Fisiopatología de la colestasis. *Medicina Interna de México* Volumen 22, Núm. 5, septiembre-octubre, 2006
14. Herrmann, M. G. (2006). *Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes*. *Clinical Chemistry*, 52(3), 494–503.
15. Herranz, X. & González, A. (2004). Aproximación diagnóstica al paciente con colestasis. GH CONTINUADA. noviembre-diciembre. Vol. 3 No. 6.
16. Hoffman, A. (1999). The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease. *ARCH INTERN MED/ VOL 159, DEC 13/27, 1999*
17. Kluth, M. (2014). Molecular *in vitro* analysis of the human ABC transporter MDR3. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Tesis de Doctorado.
18. Lai, Y. (2013). The bile salt export pump (BSEP/ABCB11). *Transporters in Drug Discovery and Development*, 327-352.
19. Lammert, F., Marschall, H.-U., Glantz, A., & Matern, S. (2000). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *Journal of Hepatology*, 33(6), 1012-1021.
20. Maya, J., Zuñiga, D., & Maya, J.L. (2012). Diagnóstico y manejo de la colestasis intrahepática del embarazo. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Acta Médica Grupo Ángeles*. Volumen 11, No. 1, enero-marzo 2013.
21. Medina, J.N., Jáuregui, R.A., Medina, N., & Medina, D. (2012) Colestasis Intrahepática del Embarazo: una revisión. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80(4):285-294

22. Morita, S., & Terada, T. (2014). Molecular Mechanisms for Biliary Phospholipid and Drug Efflux Mediated by ABCB4 and Bile Salts. *BioMed Research International*, 2014, 1-11.
23. Ovadia, C., & Williamson, C. (2016). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Recent advances. *Clinics in Dermatology*, 34(3), 327-334
24. Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597-608.
25. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2008). Hepatopatía y embarazo. *Prog Obstet Ginecol*. 2008;51(5):321-6.
26. Soroka, C. J., & Boyer, J. L. (2014). Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: Therapeutic implications of BSEP mutations. *Molecular Aspects of Medicine*, 37, 3-14
27. Williamson, C., & Geenes, V. (2014). Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 124(1), 120-133.

Páginas web

URL 1.

Applied Biosystems. A Guide to High Resolution Melting Analysis (HRM) Analysis. Disponible en: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_070283.pdf Revisado el: 20 de septiembre de 2020

URL 2.

BIO-RAD. Precision Melt SuperMix. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10022094.pdf> Revisado el: 25 de agosto de 2020

URL 3.

BIO-RAD. Precision Melt Analysis™ Software. Disponible en: https://www.bio-rad.com/es-mx/product/precision-melt-analysis-software?source_wt=precision-

[melt-analysis-software_surl&ID=df190aee-f184-497e-bfb6-b6dd632c99b5](#)

Revisado el: 25 de agosto de 2020

URL 4.

Anatomía y fisiología del hígado. Disponible en:

<https://dianadeleonmedicina.wordpress.com/2018/11/04/anatomia-y-fisiologia-del-higado/> Revisado el: 13 de abril de 2020

URL 5.

Gene Quantification. Begginers Guide to High Resolution Melting. Disponible en:

<https://www.gene-quantification.com/hrm-beginners-guide.pdf> Revisado el: 20 de septiembre de 2020

URL 6.

Roche. High Resolution Melting: Optimization Strategies. Disponible en:

https://lifescience.roche.com/documents/05382238001_11.08.pdf Revisado el: 20 de septiembre de 2020

URL 7.

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. (2011, abril). *Obstetric cholestasis*. Disponible en:

https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg_43.pdf

Revisado el: 20 de abril de 2020