



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

UTILIDAD DEL DNA OBTENIDO A PARTIR DE  
DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS  
BIOLÓGICAS EN EL ESTUDIO DEL  
POLIMORFISMO NA1/NA2

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGA  
P R E S E N T A  
JEZABEL GRANDA SANDOVAL



México, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS

VOCAL: DRA. MARÍA BENITA L. FERNANDEZ  
SALGADO

SECRETARIO: DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEON

1er SUPLENTE: DR. LEON PATRICIO MARTINEZ CASTILLA

2do SUPLENTE: DRA. CECILIA BONIFAZ ALFONZO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

ASESOR DEL TEMA:

---

DRA. DIANA ELODIA AGUILAR LEÓN

SUSTENTANTE

---

JEZABEL GRANDA SANDOVAL

Gracias  
A mis padres Silvia y Felipe  
A mi hermano Aldo  
Por el apoyo constante he incondicional  
que me brindaron para alcanzar mis objetivos

Gracias a la  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Y A TODOS LOS CATEDRATICOS  
Por transmitirme sus conocimientos y experiencias

Gracias a todos aquellos  
que me brindaron su amistad y apoyo

# Índice

Introducción.....	1
I Marco teórico	
1.- DNA	
1.1.- Historia.....	3
1.2.- Estructura.....	5
1.4.- Extracción y purificación.....	8
2.- Reacción en cadena de la polimerasa	
2.1.- Fundamentos y Usos.....	10
2.2.- Análisis de DNA.....	13
3.- Muestras biológicas	
3.1.- Mononucleares de sangre periférica.....	16
3.2.- Linfocitos B c/EBV.....	17
3.3.- Fibroblastos.....	18
3.4.- Tejido en parafina .....	19
3.5.- Células en carbowax.....	22
4.- Polimorfismo.....	23
5.- Receptores para la porción Fc del IgG (Fc $\gamma$ R) .....	25
5.1.- Activación de los receptores Fc $\gamma$ .....	26
5.2.- Inhibición de los receptores Fc $\gamma$ .....	27
5.3.- Receptor Fc $\gamma$ RIII.....	28
II Hipótesis.....	30
III Objetivos.....	31

IV Metodología	
6.- Obtención de muestras	
6.1.- Células mononucleares de sangre periférica.....	32
6.2.- Linfocitos B transformados con EBV.....	32
6.3.- Fibroblastos.....	33
6.4.- Tejido en parafina .....	33
6.5.- Células en carbowax.....	34
7.- Extracción y cuantificación de DNA.....	35
8.- Reacción en cadena de la polimerasa.....	36
V Resultados y análisis.....	37
VI Conclusiones.....	47
Anexo I Cuenta celular.....	48
Bibliografía.....	49

## INTRODUCCIÓN

El ácido desoxiribonucleico (DNA) es el portador de la información genética de cada individuo y además de explicar las características fenotípicas, es la base para la expresión de las proteínas, tanto en términos estructurales como de su función. Cuando se producen alteraciones en la secuencia del DNA pueden aparecer proteínas con mutaciones, las cuales logran, en algunos casos, hacerlas más eficientes, deficientes e incluso pueden obtenerse variantes que carecen totalmente de función. Por otra parte, se han descrito cambios que no alteran de manera importante la actividad de las proteínas. Existen cambios de ciertos receptores específicos de poblaciones celulares que participan en procesos inflamatorios que pueden derivar en daño tisular, uno de estos cambios es el asociado al receptor para la fracción Fc de la IgG Fc $\gamma$ RIIIb, el cual presenta un tipo de polimorfismo denominado "Antígeno de neutrófilo" (NA1/NA2) que consiste en el cambio de cuatro aminoácidos del dominio extracelular. Estos cambios en su estructura se deben a cambios en el DNA, por lo que es posible utilizar este ácido nucleico como materia prima para el análisis de los alelos NA1/NA2.

Las alteraciones del DNA son estudiadas por disciplinas como la patología molecular, una subdisciplina de la biología molecular, que se centra en el estudio de los ácidos nucleicos utilizando técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus diferentes variables, microarreglos, entre otras, cuya finalidad es el establecimiento de procedimientos de análisis que permitan realizar el diagnóstico de enfermedades cuyo origen puede ser molecular.

Al finalizar el presente trabajo, se espera contar con evidencia que permita demostrar que durante el estudio de un polimorfismo presente en algunos trastornos con fisiopatogenia autoinmune, la fuente para la obtención de DNA puede ser diversa, desde tejidos que se encuentran embebidos en parafina y han estado almacenados por algunos años, hasta células frescas obtenidas a partir de sangre periférica, facilitando así el estudio de enfermedades poco frecuentes ó raras. Además, se demostrará que independientemente del origen del DNA se podrá contar con muestras cuya pureza y calidad permitirán su uso en una técnica de biología molecular como la PCR.

El DNA será obtenido a partir de cinco diferentes tipos de muestras biológicas conservadas mediante distintos procedimientos:

1. Células mononucleares de sangre periférica
2. Linfocitos B transformados con el virus de Epstein Barr en cultivo
3. Fibroblastos
4. Tejido en parafina
5. Células fijadas en carbowax

La selección de las fuentes de DNA obedece a las necesidades del laboratorio de investigación donde fue desarrollado el procedimiento experimental. Primordialmente se reciben muestras de sangre periférica, mismas que son transformadas con el virus de Epstein Barr, sin embargo existen muestras como tejido del que se obtienen fibroblastos, así como tejido en parafina, que si bien no son muestras que se trabajen constantemente en el laboratorio, se tiene acceso a ellas por colaboración con otros laboratorios.

# I MARCO TEÓRICO

## 1 ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (DNA)

### 1.1 HISTORIA

Durante años se acostumbró relacionar la herencia de las características físicas y fisiológicas con la sangre, la gente creía que los niños recibían la sangre de sus padres y que con la unión sanguínea, se obtenían nuevas características que, como en el caso de las físicas, podían ser observadas en los hijos <sup>(1)</sup>.

A finales de 1800 el postulado de la sangre como factor de herencia fue cuestionado y eventualmente descartado. En sustitución, los científicos descubrieron y se interesaron en los ácidos nucleicos, que son moléculas organizadas en unidades funcionales llamadas genes. Los científicos pensaron que los genes controlaban la herencia con la producción específica de proteínas, sin embargo, los genes como base de la herencia eran difíciles de aceptar ya que la cantidad de ácidos nucleicos en la célula es insignificante <sup>(1)</sup>.

Los primeros estudios de genética fueron realizados por Mendel, quien demostró que los caracteres pasan de padres a hijos de manera predecible. Su trabajo permitió concluir que dichos caracteres están controlados por unidades hereditarias discretas que ahora conocemos como genes. Posteriormente, con ayuda del microscopio fue posible la identificación de los cromosomas en los organismos eucariotes y a principios del siglo XX Walter Sutton y Theodore

Boveri propusieron que los genes son transportados por los cromosomas. Esta propuesta es la base de la teoría cromosómica de la herencia, que afirma que los caracteres hereditarios están controlados por genes que residen en los cromosomas y que son fielmente transmitidos a través de los gametos, manteniendo así la continuidad genética de generación en generación <sup>(2)</sup>.

Posteriormente se confirmó la idea de que los genes se encuentran en los cromosomas, y con esta premisa los investigadores centraron su atención en identificar cuál era el componente químico de los cromosomas que acarreaba la información genética, el DNA o las proteínas, ya que ambos son componentes químicos de los cromosomas <sup>(2)</sup>.

El suceso inicial que condujo a la aceptación del DNA como material genético fue la publicación en 1944 de Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty sobre la naturaleza química de un <<principio transformante>> en bacterias. Este trabajo, en conjunto con posteriores descubrimientos de otros equipos de investigación, permitió tener evidencias experimentales directas de que es el DNA y no las proteínas la biomolécula responsable de la herencia <sup>(2)</sup>.

Una vez reconocida la importancia del DNA en los procesos genéticos, se intensificó la investigación para conocer tanto la estructura como su función <sup>(2)</sup>. La estructura, así como la composición del DNA fueron determinados tras varios años de estudios, comenzando con los realizados por Johan Friedrich Miescher en 1869 <sup>(3)</sup> quien descubrió los ácidos nucleicos a los que llamó nucleína tras separar los núcleos del citoplasma celular <sup>(2)</sup>, posteriormente

Oswald Avery en 1943 propuso que el DNA era la molécula que contenía el código genético. La estructura de la doble hélice fue investigada en un inicio por Rosalind Franklyn, quien tomó algunas fotografías de difracción de rayos X de una hebra de DNA, sin embargo su trabajo no fue publicado. A finales de 1940 Erwing Chargaff descubrió que en la estructura del DNA se tenía el mismo número de residuos de adenina que de timina (A=T) y la misma cantidad de residuos de citosina que de guanina (C=G), estas relaciones finalmente fueron denominadas las leyes de Chargaff. En 1953 James Watson y Francis Crick, con ayuda de las fotografías de Rosalind Franklyn, y a través de sus estudios de construcción de modelos e imaginación, lograron evidenciar la estructura helicoidal del DNA. A partir de este descubrimiento se dio inicio a lo que hoy en día se conoce como biología molecular <sup>(3)</sup>.

## 1.2 ESTRUCTURA

El DNA es una macromolécula cuya unidad estructural son los nucleótidos (Fig. 1), éstos poseen tres componentes característicos, una base nitrogenada, una pentosa y un grupo fosfato <sup>(4)</sup>

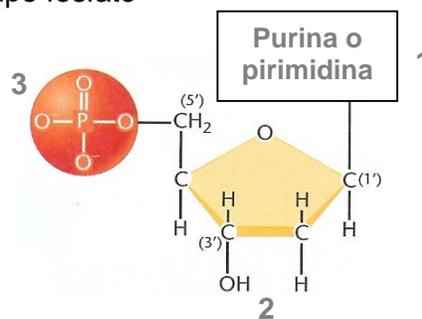


Figura 1. Nucleótido constituido por:  
Una base nitrogenada (1), una pentosa (2) y  
un grupo fosfato (3). Imagen tomada y  
modificada de Cummings y Klug (2006)

Las bases nitrogenadas son derivados de dos pares de compuestos, purinas y pirimidinas, las purinas constan de un doble anillo de nueve lados y las

pirimidinas constan de un anillo de seis lados (Fig. 2a). El DNA contiene dos purinas, adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidinas, citosina (C) y timina (T). Tanto el DNA como el RNA contienen A, C y G, solo el RNA posee uracilo (U) <sup>(2)</sup>. El nombre de los ácidos nucleicos depende de la pentosa que presentan <sup>(2)</sup>. Los ácidos ribonucleicos (RNA) contienen D-ribosa, mientras que los ácidos desoxirribonucleicos (DNA) contienen 2'-desoxi-D-ribosa (Fig. 2b) <sup>(4)</sup>.

Las secuencias largas específicas de A, T, G y C en el DNA son el reservorio de la información genética.

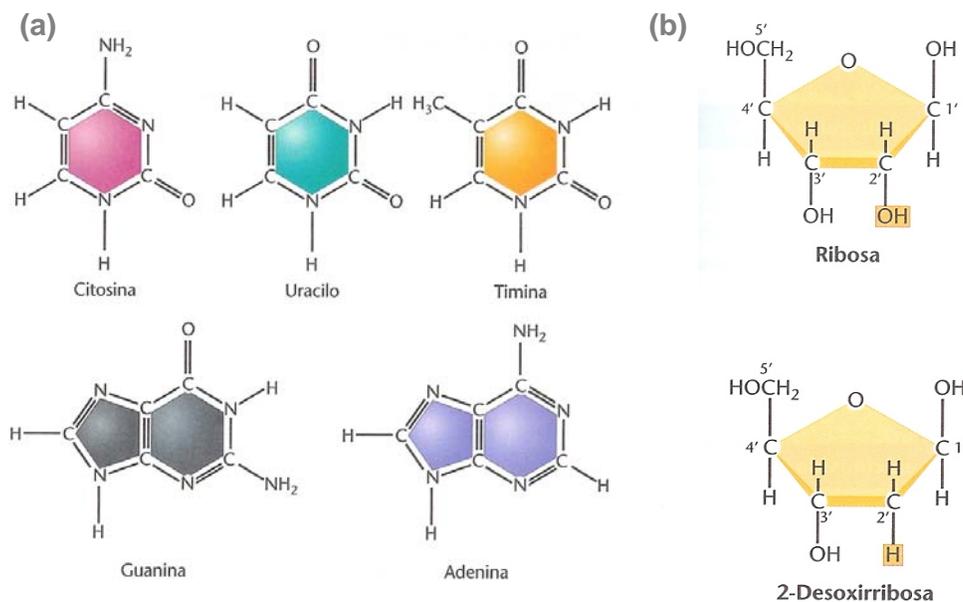


Figura 2. (a) Estructura química de las pirimidinas y de las purinas. (b) Estructura química de la ribosa y de la 2-desoxirribosa, pentosas presentes en el DNA y RNA Imagen tomada y modificada de Cummings y Klug (2006)

Los nucleótidos sucesivos del DNA son unidos covalentemente a través de los grupos fosfato, donde el fosfato ocupa la posición 5' de un nucleótido, se une al grupo 3'-hidroxi del siguiente nucleótido, y crea una unión fosfodiéster. La

columna formada por enlaces posfodiéster es hidrofílica. El grupo hidroxilo de los residuos de azúcar se une con moléculas de agua. El grupo fosfato, con un pKa cercano a cero, está completamente ionizado y cargado negativamente a un pH de 7, la carga negativa es neutralizada generalmente por interacciones iónicas con proteínas cargadas positivamente, iones metálicos y poliaminas.

Todos los enlaces posfodiéster tienen la misma orientación a lo largo de la cadena dando una polaridad específica y un final diferente 5' y 3'. Por definición, el extremo 5' une un nucleótido en la posición 5' y el extremo 3' une al nucleótido en el punto 3'. Por convención, la estructura de una sola hebra de los ácidos nucleicos siempre se escribe con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, es decir en sentido 5' → 3' (Fig. 3) <sup>(4)</sup>.

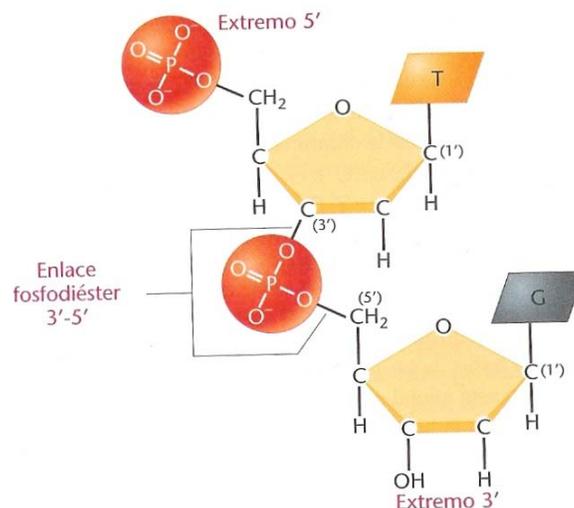


Figura 3. Unión de dos nucleótidos mediante la formación de un enlace fosfodiéster. Imagen tomada y modificada de Cummings y Klug (2006)

El DNA está formado por dos hebras con las características antes mencionadas, las polaridades de las dos cadenas de nucleótidos entrelazados son opuestas, y se dice que ambas cadenas son antiparalelas. Las dos cadenas de nucleótidos se mantienen unidas mediante enlaces débiles

denominados puentes de hidrógeno. El establecimiento de tales enlaces es muy específico, debido al encaje a modo de llave y cerradura entre la forma y las cargas de las bases nitrogenadas. La adenina solo empareja con la timina y la guanina solo con la citosina, se dice de las bases que forman estas parejas que son complementarias.

Aunque los puentes de hidrógeno son individualmente débiles, su acción combinada mantiene las dos cadenas unidas de forma estable. Por otro lado, es importante que los enlaces entre las bases sean relativamente débiles, ya que las dos cadenas deben separarse para que se lleve a cabo la replicación. Los pares de bases, que corren por el interior de la doble hélice, son estructuras hidrófobas planas que tienden a apilarse debido a la exclusión de las moléculas de agua. Este apilamiento obliga a las dos cadenas entrelazadas del DNA a adoptar su conformación helicoidal <sup>(5)</sup>.

### ***1.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN***

Debido a que el DNA genómico se encuentra dentro de la célula, es necesario liberarlo para poder estudiarlo, esto se logra mediante distintos métodos de lisis celular, como el uso de soluciones hipotónicas, en las cuales la concentración molar total es menor que la de la célula en un estado fisiológico normal. Bajo estas circunstancias, el agua se difunde al interior de la célula ocasionando un hinchamiento de las células y su posterior lisis. El DNA de las células, también puede extraerse utilizando algunos detergentes como el SDS, entre otros.

Una vez liberado el DNA es necesario eliminar las proteínas presentes, ya que éstas pueden desnaturalizar al DNA, lo cual se logra mediante agitación suave con una solución de fenol y/o una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico; esto ocasiona que precipiten las proteínas y puedan separarse por centrifugación, también pueden utilizarse enzimas como proteinasa K. El siguiente paso es separar al DNA del RNA y esto se logra mediante su precipitación con etanol. Durante el proceso de extracción es necesario evitar el contacto de las muestras biológicas con nucleasas que puedan degradar el DNA y en parte esto se logra mediante el uso del material estéril y el uso de guantes por parte del experimentador.

## 2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 2.1 FUNDAMENTOS Y USOS

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica *in vitro* que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas, pequeñas cantidades de DNA <sup>(6)</sup>.

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 y le valió el premio Nobel de química en 1993 <sup>(30)</sup>. El método de la reacción se basa en el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos específicos de la región que se desea amplificar, a fin de que actúen como cebadores en la síntesis de nuevas copias del DNA. Estos oligonucleótidos se hibridan de forma específica con cada una de las dos cadenas complementarias del DNA en zonas que flanquean la región de interés <sup>(7)</sup>.

La reacción de amplificación se realiza en un volumen pequeño de solución, contenido en tubos de microcentrifuga, capilares o placas con pozos. La reacción esta constituida por DNA (o RNA) que se desea amplificar, los oligonucleótidos, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) que son el sustrato para polimerizar el nuevo DNA <sup>(7)</sup>, la DNA polimerasa, una solución amortiguadora que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la polimerasa, iones divalentes como el  $Mg^{2+}$  agregado comúnmente como cloruro de magnesio, que actúa como cofactor de la polimerasa y el termociclador, que es un equipo que se puede programar para obtener diferentes temperaturas y tiempos, según se desee <sup>(30)</sup>.

La enzima que se utiliza para la reacción, debe ser termoestable ya que la reacción se lleva a cabo a altas temperaturas, las cuales aumentan la especificidad de la reacción <sup>(7)</sup>. La Taq DNA polimerasa que fue originalmente aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* y que habita en medios acuáticos que se encuentran a temperaturas que oscilan alrededor de los 70°C, funciona de manera óptima a 72°C. Otros tipos de DNA polimerasas obtenidas a partir de métodos recombinantes son producidas en la bacteria *E. coli* ó de otros microorganismos, como *Pyrococcus furiosus*, que habita a 100°C, así mismo, las polimerasas pueden ser generadas también mediante la inserción del gen que produce dicha enzima en vectores apropiados <sup>(30)</sup>.

La PCR involucra tres pasos principales (Fig. 5): En el primer paso, la hebra molde es calentada, para romper los enlaces que unen las dos hebras que forman al DNA. En el segundo paso, la temperatura se reduce y los *primers* ó cebadores también específicos flanquean la hebra molde. En el tercer paso, la DNA polimerasa cataliza la formación de una cadena nueva de DNA a partir del DNA molde. La síntesis comienza donde se localizan los *primers* y la enzima se mueve a lo largo de la molécula y se van ensamblando los nucleótidos adicionados al tubo de reacción <sup>(6)</sup>. Los ciclos de desnaturalización, hibridación y síntesis de DNA se repiten numerosas ocasiones. Los productos de cada ciclo de amplificación sirven de moldes para el ciclo sucesivo, y así se obtiene el doble de producto al final de cada ciclo, es decir la cantidad de DNA aumenta de manera exponencial <sup>(30)</sup>.

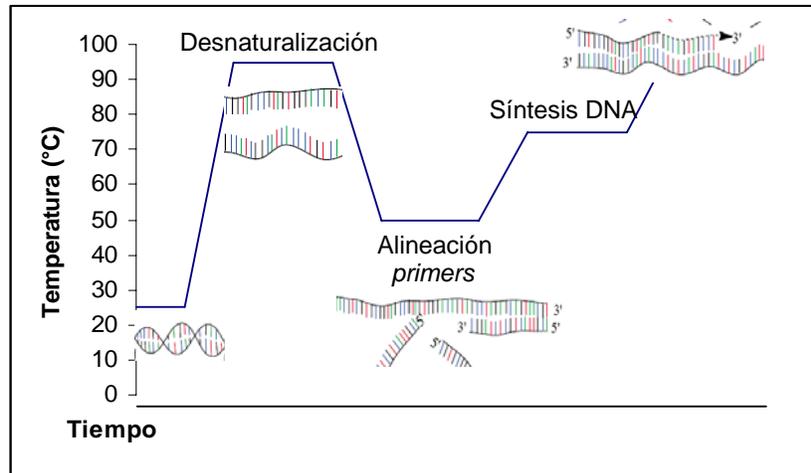


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa  
Imagen modificada de Andy Vierstraete 1999.

La temperatura de hibridación elegida para la PCR es generalmente igual o superior en 2 a 3°C a la temperatura de fusión del oligonucleótido ( $T_m$  o meeting temperature). La manera de calcular ésta temperatura es:

$$T_m = (2 \times \text{numero de A y T}) + (4 \times \text{numero de G y C})$$

El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento genético con alto grado de pureza. Por su alta sensibilidad, ésta técnica permite identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide <sup>(6)</sup>. La PCR puede aplicarse a estudios de investigación básica, como son el estudio de variaciones de secuencias nucleotídicas, reordenamiento de cromosomas, marcadores cromosómicos, etc. <sup>(7)</sup>.

En estudios clínicos, la PCR se aplica al diagnóstico de numerosas enfermedades genéticas, identificación de virus y bacterias patógenas, diagnóstico de neoplasias, estudios de paternidad, en medicina legal, etc. En

algunas condiciones específicas incluyendo las enfermedades hereditarias como las hemofilias,  $\beta$ -talasemias; ó bien en enfermedades neoplásicas la PCR puede ser utilizada para estudiar las mutaciones y cambios en el genoma que dan lugar a los trastornos congénitos ó al desarrollo tumoral, etc. <sup>(7)</sup>.

## **2.2 ANÁLISIS DEL DNA**

### **ESPECTROFOTOMETRIA UV**

Una lectura con el espectrofotómetro de ultravioleta permite verificar la pureza del DNA debido a la interacción entre la luz UV con los sistemas anulares de las purinas y de las pirimidinas. Los ácidos nucleicos presentan una mayor absorción de luz ultravioleta a 260nm. La relación de 260/280 es de aproximadamente 1.8, si la relación es mayor es probable que se tenga contaminación con RNA. Si existe contaminación con proteínas, la relación es menor <sup>(20)</sup>.

### **ELECTROFORESIS**

La electroforesis es una técnica de separación que consiste en el transporte de moléculas con carga a través de una disolución por la acción de un campo eléctrico <sup>(7)</sup>. Se coloca la muestra (molécula) en un soporte, que es una sustancia porosa (un trozo de papel filtro o un gel semisólido) <sup>(8)</sup>, se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos con cargas eléctricas opuestas y los iones presentes en la disolución se mueven hacia uno u otro electrodo según su propia carga <sup>(7)</sup>.

- Los cationes (iones con carga positiva) se mueven hacia el cátodo (electrodo con una carga eléctrica negativa).
- Los aniones (iones con carga negativa) se mueven hacia el ánodo (electrodo con una carga eléctrica positiva).

Debido a que las moléculas de DNA poseen una carga negativa, migran hacia el polo positivo, lo que haría difícil la separación si se realizara únicamente mediante la separación basada estrictamente en el campo eléctrico <sup>(8)</sup>, por lo que es necesario utilizar distintos medios de soporte para realizar la separación.

Los medios de soporte, pueden ser selectivos o no selectivos. Los medios de soporte no selectivos, son inertes, por lo que no intervienen de forma directa en la separación de los componentes de una muestra que solo dependen de la carga eléctrica de la molécula. Los medios selectivos introducen un factor adicional y permiten la separación según el tamaño de las moléculas, además de su carga eléctrica. Entre los medios no selectivos se encuentran el papel, acetato de celulosa y el gel de agarosa, entre los selectivos se encuentran el del de almidón y el gel de poliacrilamida <sup>(7)</sup>.

El uso de geles de poliacrilamida o de agarosa que pueden prepararse con distinto tamaño de poro, proporciona la base para la separación de las moléculas ya que la separación de las moléculas esta dada por la diferencia en sus tamaños ya que las moléculas más pequeñas migran más rápido que las moléculas grandes, por estas características el poder de resolución es tan

grande que pueden separarse con claridad polinucleótidos que se diferencian en un solo nucleótido de longitud <sup>(8)</sup>.

Además del soporte, la electroforesis requiere de una disolución amortiguadora que sirve para transportar la corriente eléctrica, fijar y mantener el pH del medio constante. Esto permite determinar si los componentes de una muestra se moverán hacia el ánodo o hacia el cátodo durante una separación electroforética <sup>(7)</sup>.

Cuando finaliza la electroforesis, las bandas de las moléculas de distintos tamaños se visualizan con compuestos que se unen a ellas, un ejemplo es el bromuro de etidio que es un agente intercalante, se introduce entre las bases de DNA y al ser iluminado con luz UV se observa de un color naranja intenso. Sin embargo el uso de éste compuesto esta siendo sustituido por otros fluorocromos con mayor poder de detección y menor toxicidad como es el caso del Syber green que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente.

## 3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

### 3.1 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (SP)

La sangre se compone de un líquido denominado plasma y elementos celulares, entre los cuales se encuentran leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Cada uno de los tres elementos celulares de la sangre tienen funciones específicas, los eritrocitos contienen hemoglobina, que es una proteína que se encarga del transporte de oxígeno y bióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales, los leucocitos (de los cuales existen cinco tipos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos) defienden al organismo contra patógenos extraños como bacterias y virus. Por otra parte, las plaquetas son necesarias para mantener la hemostasia. Con frecuencia, las variaciones en términos del número ó funciones de los elementos sanguíneos son el primer signo de enfermedad que se presenta en tejidos corporales <sup>(9)</sup>.

Las células mononucleares incluyen a los monocitos y linfocitos, dichas células son obtenidas a partir de la punción venosa, ya que es el método más fácil y adecuado para obtener un volumen de sangre suficiente para llevar a cabo un gran número de pruebas. Al usar este procedimiento, se disminuye la posibilidad de error por dilución con líquido tisular o constricción de los vasos sanguíneos por el frío o la emoción, fenómeno que puede presentarse durante la punción capilar (que es el método utilizado en el caso de niños y en caso de quemaduras extensas o cuando sólo se requiere pequeñas cantidades de sangre) <sup>(13)</sup>.

### **3.2 LINFOCITOS B TRANSFORMADOS CON EL VIRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)**

Los linfocitos son células que se originan en la médula ósea, constan de distintos subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos. Una clase de linfocitos es la de los linfocitos B que son las únicas células capaces de producir anticuerpos.

El EVB se une a las células B mediante a interacción de la glicoproteína gp350/gp220 de su envoltura con la molécula CD21 del linfocito (esta molécula es también el receptor para el componente C3b del complemento); las membranas se fusionan permitiendo la entrada del EBV al citoplasma celular. La partícula de EBV es desarticulada y el genoma es transportado al núcleo celular en donde se establece rápidamente un estado de latencia viral, todo asociado con la activación, proliferación, transformación y posible inmortalización del linfocito B latentemente infectado.

El EBV activa a los linfocitos B que están en periodo de reposo y los obliga a entrar en el ciclo celular. Las células infectadas con EBV empiezan a multiplicarse en un modo que depende en la alta densidad celular y en la producción autócrina de citocinas promotoras de crecimiento de las células B. Con el tiempo, las células EBV positivas continúan proliferando y evolucionando en linfocitos de crecimiento más rápido y más independientes de los mecanismos autócrinos de crecimiento.

El EVB (EBV/HHV-4) tiene un doble tropismo celular por los linfocitos B humanos por lo que la replicación/latencia de este virus ha sido estudiada extensamente en líneas de células B humanas transformadas, y esta técnica ha demostrado ser inmensamente valiosa para un número de situaciones donde son requeridas células B humanas (por ejemplo, en la producción de anticuerpos monoclonales humanos). Por tanto el objetivo ha sido utilizar alternativas de la técnica convencional de transformación de células B con EBV de manera que sea efectiva al realizarla en una forma práctica sin todos los requerimientos y principalmente a un bajo costo para la disponibilidad en muchos laboratorios.

La infección del EVB fácilmente transforma células B en reposo provenientes de la sangre periférica en líneas celulares linfoblásticas. La tasa de transformación puede ser desde el 10 al 100%. Las líneas celulares linfoblásticas sirven para varios propósitos, como la génesis tumoral por el VEB, fuente de estudio del DNA (desordenes genéticos) y células disponibles para estudios inmunológicos, biología celular y molecular <sup>(10)</sup>.

### **3.3 FIBROBLASTOS**

El fibroblasto juega un papel crítico en la cimentación de colágeno y otras proteínas de la matriz en respuesta a la lesión. Esta función reparadora puede ser una respuesta a la lesión física ó a la destrucción tisular por otras causas. En ambos casos, el fibroblasto responde a conjuntos de señales procedentes de su microambiente, estas señales comprenden mediadores, citocinas y factores de crecimiento liberados por células inmunitarias e inflamatorias,

plaquetas, células endoteliales y células musculares. Una estimulación excesiva del fibroblasto puede llevar a una activación persistente con fibrosis extensa <sup>(31)</sup>.

Los fibroblastos son las células del tejido conectivo que secretan la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibras de adhesión y fibras de soporte, principalmente colágeno fibrilar. Los fibroblastos son células muy versátiles que tienen la capacidad de diferenciarse en otras células del tejido conectivo en respuesta al un daño o a estímulos adecuados. Existen evidencias de que los fibroblastos son células tejido-específicas, es decir, que presentan diferencias dependiendo del tejido al que pertenecen <sup>(11)</sup>, sin embargo ciertas capacidades son comunes a todos estos tipos de células <sup>(31)</sup>.

Estas células especializadas proporcionan un apoyo estructural, forman barreras a las lesiones, anclan leucocitos durante la inflamación y reparan el tejido lesionado. En estado inalterado, in vivo, los fibroblastos se mantienen generalmente inmóviles, en respuesta a una lesión se observa un aumento en el número de fibroblastos y de su actividad metabólica <sup>(31)</sup>.

### **3.4 TEJIDO EN PARAFINA**

Uno de los materiales mas comúnmente utilizados en los laboratorios de patología e investigación es el tejido embebido en parafina. El material biológico conservado de esta forma constituye una fuente incalculable de información <sup>(12)</sup>.

De manera general la conservación se lleva de la siguiente manera:

Fijación, la finalidad de fijar los tejidos es conservarlos con el menor grado de alteración, inhibiendo el crecimiento bacteriano, aumentando la dureza del tejido para facilitar la preparación de finas películas de éste, interrumpir procesos celulares que podrían llevar a la célula a lisis. Dicha fijación puede realizarse por métodos físicos como el calor ó por congelación, así como distintos procesos químicos, incluyendo fijadores como formol al 4%, 5% y 10%, el alcohol, ácido acético ó ácido Pícrico, así como el bicloruro de mercurio y el bicromato de potasio, entre otros. La elección del fijador depende del tejido y coloración que se va a emplear. El tiempo de fijación varía de pocos minutos a varias horas <sup>(32)</sup>.

Deshidratación: Los tejidos contienen grandes cantidades de agua, tanto intra como extracelular, que debe ser eliminada y reemplazada por parafina. Este proceso se denomina deshidratación. Debe ser realizado mediante el uso de alguna sustancia que tenga la capacidad de mezclarse con el agua y que tenga cierta afinidad por ella, de manera que pueda penetrar fácilmente entre las células de los tejidos. La deshidratación se logra mejor utilizando distintas concentraciones del agente deshidratador. El agua contenida en los fragmentos que serán impregnados, es extraída mediante baños sucesivos en soluciones de etanol con agua a diferentes concentraciones, que generalmente van desde el 70% hasta 100% <sup>(33)</sup>.

Aclaramiento: Es la extracción y sustitución del agente deshidratante por Xilol, Benzol, Toluol, Cloroformo o Xileno, <sup>(32)</sup> que es un líquido que disuelve la parafina con la cual el tejido será impregnado. La palabra aclarar, representa que, además de eliminar el alcohol, muchas de estas sustancias tienen la propiedad de volver translúcidos o transparentes a los tejidos. Ello se debe a su elevado índice de refracción, y a los cambios ópticos que se producen cuando el agente aclarante penetra entre los elementos tisulares refractantes. Los mejores agentes aclarantes deben eliminar rápidamente el alcohol y aclarar sin producir endurecimiento, además de favorecer su rápida evaporación durante los baños de parafina. Al agregar el agente aclarante no debe existir turbidez <sup>(33)</sup>.

Inclusión: Este proceso comprende la impregnación de todos los tejidos con un medio que ocupe todas las cavidades naturales, espacios e intersticio tisular, lo cual proporciona la consistencia firme necesaria para hacer cortes lo suficientemente delgados sin provocar distorsión morfológica y sin alterar las relaciones espaciales del tejido y los elementos celulares, mediante la utilización de un microtomo, ya sea de cuchillas normales o desechables. Dicho medio generalmente es parafina. El proceso es realizado tres veces con parafina líquida a una temperatura promedio de 56°C. Posterior a la inclusión se hace solidificar la parafina y se forman bloques de 3x2x1.5 centímetros que contienen el tejido a estudiar <sup>(32)</sup>.

Después de los pasos anteriores, se lleva a cabo el corte y montaje o uso de las muestras.

### **3.5 CÉLULAS EN CARBOWAX**

El carbowax esta constituido por un polímero (polietilenglicol) y, así como el método de inclusión en parafina, es útil para la conservación de tejidos, con la diferencia que el carbowax es un medio que no necesita deshidratación y aclaramiento por lo que hay menor daño del tejido <sup>(34)</sup> y se utiliza principalmente en fluidos corporales, a fin de conservar sus componentes celulares.

El carbowax penetra y conserva la estructura celular, ayuda a mantener los elementos nucleares y protege contra secado al aire libre <sup>(35)</sup>, por lo anterior, se consideró que podría ser un buen método de conservación de células.

## 4 POLIMORFISMO

En términos estrictos, se dice que existe polimorfismo cuando el alelo más común de un determinado *locus* génico representa menos de 99% de los alelos de la población. Se denominan alelos a los múltiples genes del mismo *locus* génico que codifican la misma proteína. De cada *locus* génico, cada individuo posee dos alelos, uno del padre y otro de la madre. Si los alelos son iguales, el individuo se denomina homocigoto, mientras que si son distintos, se denomina heterocigoto. Con frecuencia, el gen que codifica una determinada proteína presenta alelos diferentes en una población de individuos y por definición, cuando existe polimorfismo en un *locus* génico, al menos el 2% de la población debe ser heterocigota para ese *locus*.

La existencia de distintos alelos se debe a los cambios producidos en un alelo precursor durante la evolución de las especies. Por lo general, los alelos suelen diferenciarse en el cambio de una base por otra, generalmente mutaciones de sentido equivocado. En la gran mayoría de los casos, las proteínas producidas por los alelos de un *locus* determinado suelen funcionar de forma análoga, debido a que la diferencia de aminoácidos no suele afectar a la estructura y la función de la proteína.

La mayoría de los *loci* génicos presentan un alelo normal, que es el que posee la mayoría de la población, mientras que los otros alelos alterados son raros. Sin embargo, existen algunos *loci* génicos que no presentan un alelo con la suficiente frecuencia como para denominarle normal. Esta última situación presenta un ejemplo extremo de polimorfismo genético.

Los polimorfismos en el DNA se producen aún con mayor frecuencia en regiones no codificantes, lugares del genoma que tienen poca influencia sobre la expresión genética. Así la mayor parte de los polimorfismos del DNA no están asociados a efectos fenotípicos. Finalmente, algunas alteraciones genéticas producen un profundo efecto sobre el fenotipo y causan un estado de enfermedad de forma consistente: son las mutaciones.

## 5.- RECEPTORES PARA LA PORCIÓN Fc DE LA IgG (FcγR)

Los receptores para la porción Fc de la IgG (FcγR) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se dividen en FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) (Fig. 6), los cuales se expresan en diferentes tipos celulares y presentan distinta afinidad a la IgG monomérica o a ésta inmunoglobulina al formar complejos inmunes (CI) y tienen diverso grado de polimorfismo. A pesar de que estos tres receptores unen a la IgG, sus efectos celulares son diferentes el FcγRI, FcγRIIIa y FcγRIIIa son receptores de activación caracterizados por la presencia de Inmunorreceptores con Motivos de Activación basados en Tirosinas (ITAM), ya sea de manera intrínseca en el receptor (FcγRIIIa), o como parte de una cadena accesoria  $\gamma$  o  $\zeta$  (FcγRI, FcγRIIIa), por otro lado el FcγRIIb es un receptor de inhibición caracterizado por la presencia de un Inmunorreceptor con Motivos de Inhibición basados en Tirosinas (ITIM) de manera intrínseca en el receptor. La excepción es el FcγRIIIb, éste receptor se encuentra anclado a una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se encuentra en la membrana celular, por lo tanto no contiene dominios ITAM o ITIM (21, 22, 23).

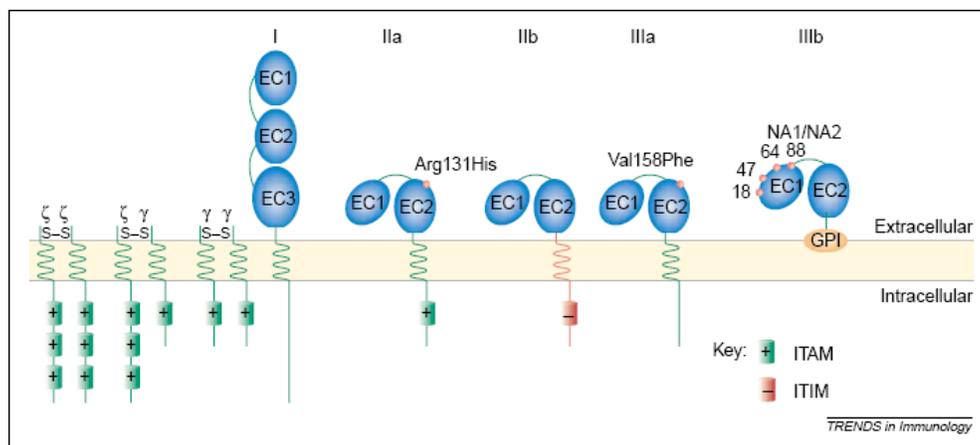


Figura 6. Receptores para la fracción Fc de la IgG (FcγR).  
Imagen tomada y modificada de *TRENDS in immunology*, Vol.22 No.9  
September 2001.

## 5.1 ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES $Fc\gamma$

La activación del receptor se da tras su unión con el complejo inmune, dicha unión da como resultado un cambio conformacional que conlleva a la activación de una familia de tirosina kinasas llamadas SRC, como lo son Hck, Lyn y Fyr, que se encargan de la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en el ITAM (Fig. 7). Posteriormente, se produce el agrupamiento de moléculas con dominios SH2, como la kinasa Syk, que se unen al ITAM fosforilado, como una clase de anclaje molecular. Posteriormente, se produce la activación de la kinasa IP3, la cual desencadena la formación de PIP3 y a su vez la unión de moléculas con dominios PH como PLC $\gamma$  y otra serie de kinasas como Tec dentro de las cuales se incluyen btk, itk y emt, que son expresadas en diferentes tipos de células mieloides. La fosfolipasa C del subtipo gama (PLC $\gamma$ ) da lugar a dos componentes: diacilglicerol (DAG) y el 1,4,5-trifosfato (IP3). El DAG permanece unido a la membrana e IP3 promueve el paso continuo de calcio <sup>(22,23)</sup>.

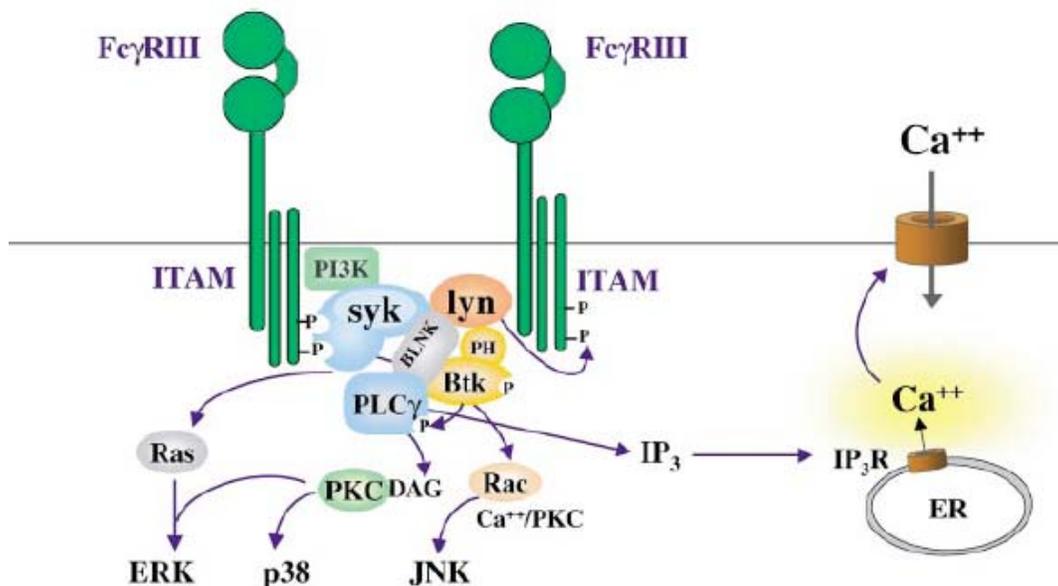


Figura 7. Activación celular del receptor de activación  $Fc\gamma$ RIII. Imagen tomada y modificada de Annu. Rev. Immunol. 2001.19:275-290

## 5.2 INHIBICIÓN DE LOS RECEPTORES Fc $\gamma$

La inhibición al igual que la activación inicia con un cambio conformacional del receptor tras su unión con los complejos inmunes, dicho cambio activa una kinasa de la familia SRC llamada Lyn. Esta modificación desencadena el agrupamiento de fosfatasa que contiene dominios SH2 como SHP1, SHP2 y fosfatasa que contienen dominios inositol llamadas SHIP. Esta modificación que se realiza en el dominio SH2, que es el sitio de unión para la fosfatasa SHIP, impide la activación de ITAM por hidrólisis de PIP3, que es una molécula que participa en la cascada de activación. En ausencia de PIP3, las proteínas de unión a dominios PH como Btk y PLC $\gamma$ , son liberadas de la membrana y la señal de entrada de calcio a la célula es bloqueada (Fig.8) <sup>(22,23)</sup>.

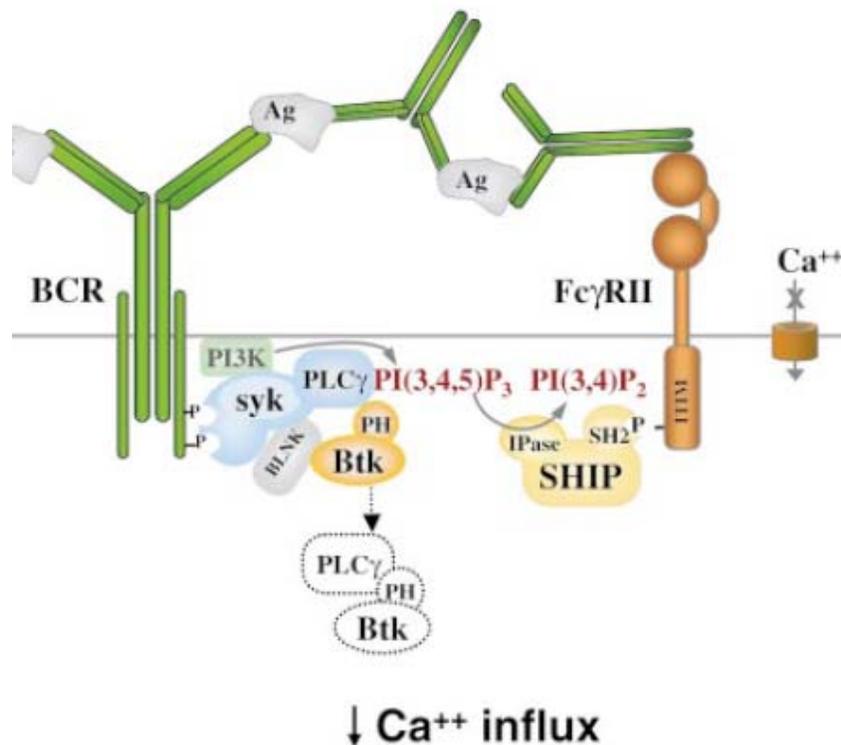


Figura 8. Vías de señalización activadas por la unión de BCR y Fc $\gamma$ RIIb. Imagen tomada y modificada de Annu. Rev. Immunol. 2001.19:275-290

Resumiendo, las consecuencias de la transmisión de señales después de la unión receptor Fc con la inmunoglobulina son, en el caso de la activación, la entrada de calcio a la célula y en el caso de la inhibición, el bloqueo de ésta. El calcio tiene una función importante en este tipo de respuesta ya que funciones como la fagocitosis, liberación de citocinas e inflamación son dependientes de calcio, es decir, si no hay suficiente concentración de calcio en la célula, dichos procesos no son posibles <sup>(22)</sup>.

### 5.3 RECEPTOR Fc $\gamma$ RIII

Los Fc $\gamma$ RIII están formados por dos genes (IIIA y IIIB), los cuales producen transcritos correspondientes IIIa y IIIb. En el aminoácido 158 del dominio extracelular (DEC) 1 se ha descrito un polimorfismo trialélico del Fc $\gamma$ RIIIA que no es funcional en si mismo <sup>(14)</sup>, mientras que en Fc $\gamma$ RIIIB, el DEC 2 presenta un polimorfismo denominado NA (neutrophil antigen), el cual tiene dos formas alélicas comunes denominadas NA1 y NA2 <sup>(15)</sup>. El alotipo NA1 participa en la fagocitosis de partículas opsonizadas por IgG1 e IgG3 e interacciona con mayor eficiencia con CI constituidos por IgG3 que el alotipo NA2 <sup>(16)</sup>, y se ha sugerido que los individuos NA1 tienen mayor capacidad fagocítica que los portadores del alotipo NA2 <sup>(17)</sup>. Debido a que el Fc $\gamma$ RIIIb tienen gran importancia en distintos mecanismos relacionados con la fagocitosis y en la eliminación de CI distintos investigadores han estudiado sí los polimorfismos de este receptor se pueden asociar con el desarrollo de enfermedades que involucran una respuesta inmune alterada, especialmente relacionadas con fenómenos autoinmunes.

Debido a que éste receptor no posee dominios ITAM o ITIM, algunos autores indican que el receptor FcγRIIIB funciona como un señuelo de complejos inmunes que posteriormente son presentados al receptor FcγRIIA, sin embargo algunos autores mencionan que la activación del receptor FcγRIIIB sin la presencia del receptor FcγRIIA induce un aumento en la concentración de calcio intracelular, incrementando así la degranulación e incrementando la actividad fagocítica, lo que demostraría un rol activo dentro de la activación de receptores para la fracción Fc de la IgG cuando ésta forma complejos inmunes,

## ***II HIPÓTESIS***

- ❖ El método de conservación u obtención de las muestra no influirá en el rendimiento, pureza y calidad del DNA que será utilizado en la técnica de PCR.

### **III OBJETIVOS**

#### ***OBJETIVO GENERAL***

- ↻ Obtener DNA genómico para su uso en el estudio del polimorfismo NA1/NA2 del Receptor para la fracción Fc de la IgG (Fc $\gamma$ RIIIb).

#### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- ↻ Obtener DNA genómico de diferentes tipos de muestras biológicas.
- ↻ Determinar si el rendimiento y la calidad del DNA es compatible con un ensayo de PCR.

## **IV METODOLOGÍA**

### **6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

#### **6.1 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (SP)**

Se obtuvieron cinco muestras de aproximadamente 5 mL de sangre periférica en tubos vacutainer™ con heparina, posteriormente se transfirieron de 4 a 5 mL de la muestra a un tubo de 13x100 con rosca marca Pirex, que contenía la misma cantidad de Ficoll-Hypaque, evitando que la sangre y el Ficoll se mezclaran, posteriormente se centrifugó a 1100 rpm de 10 a 15 min en una centrifuga Beckman, al finalizar se obtuvieron diferentes fracciones, glóbulos rojos y granulocitos ubicados al fondo del tubo, Ficoll-Hypaque, células mononucleares que se veían como un anillo blanco y en la parte superior del tubo se encontraba el plasma. Parte de la fracción mononuclear, fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 ml para realizar la extracción de DNA. Las células restantes fueron utilizadas para la transformación con EBV.

#### **6.2 LINFOCITOS B TRANSFORMADOS CON EL EBV**

La transformación podría considerarse el siguiente paso de la obtención de células mononucleares, tras la obtención la fracción mononuclear, ésta fue transferida a un tubo de 13x100 con rosca, al que se le adicionó 1.0 mL de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino, se le adicionó 0.5 mL del sobrenadante de células Marmoset productoras de *EBV*, además del mitógeno fitohemaglutinina. Los siguientes días se evaluó el crecimiento de las células hasta la obtención de una cuenta total de  $1 \times 10^6$  cel/ml, al obtener éste número de células se tomaron 5 mL del cultivo celular y se centrifugaron 20 min a 1100

rpm para obtener un paquete celular que fue utilizado para la extracción de DNA.

### **6.3 FIBROBLASTOS**

Para la obtención de este tipo de células, pueden llevarse a cabo dos metodologías, una de ellas es utilizando células que se han mantenido previamente en cultivo y se recuperaron para mantenerlas en nitrógeno líquido, o bien a partir de muestras recientes.

Para células que han sido congeladas y se descongelan, es necesario procesarlas lo más rápido posible ya que el DMSO puede ser tóxico. Antes de colocar las células en la nueva caja para cultivo, fue necesario lavarlas con una solución amortiguada de fosfatos (PBS) 1x, posteriormente se transfirieron a las cajas de cultivo con medio RPMI al 20% de suero fetal bovino, se mantuvieron en incubadora y fue necesario revisar frecuentemente las células. Cuando se contó con una confluencia del 90 al 100%, se cosecharon las células con ayuda de tripsina, tras la cosecha, las células estaban listas para la extracción de DNA.

### **6.4 TEJIDO EN PARAFINA**

A partir de bloques de tejido en parafina y con ayuda del microtomo LEICA RM-2145, se obtuvieron 5 cortes de 8 micras de cada bloque, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL para comenzar con la extracción de DNA.

Para la obtención del DNA, fue necesario sacar a las células de la parafina, esto se logró utilizando xilol, que es un medio donde el material de inclusión, en este caso parafina, es miscible, se comenzó con la adición del xilol y una incubación a 60°C durante 30 min en un Horno personal Hyb™, posteriormente se realizó una centrifugación durante 5 min a 14000 rpm, se adicionó 1 mL de xilol y se realizó una incubación de 10 min y posteriormente una centrifugación de 5 min a 14000 rpm.

Para comenzar a rehidratar el tejido, fue necesario adicionar una mezcla de etanol:xilol, si al adicionar esta mezcla se observaba una coloración blanca, era necesario adicionar nuevamente xilol e incubar y centrifugar, posteriormente se utilizó etanol en concentraciones que van desde etanol absoluto hasta etanol al 20 o 25%, finalizando con agua. Antes de utilizar las células, se eliminó el agua presente y se secan las células utilizando acetona.

### **6.5 CÉLULAS FIJADAS EN CARBOWAX**

El procedimiento fue básicamente de eliminar dicho medio en el que se encuentran embebidas las células, para lo que fue necesario realizar diversos lavados con solución amortiguadora de fosfatos. Debido a que no se contaba con algún método para determinar si se ha eliminado la totalidad del carbowax, se realizaron de 4 a 5 lavados con el buffer. Al finalizar los lavados, las células estaban listas para realizar la extracción de DNA.

## **7 EXTRACCIÓN DE DNA**

La extracción de DNA comenzó con la adición de una mezcla de Tris-HCL, EDTA y SDS que ocasiona la lisis de la célula y la liberación del material genético, debido a que al interior de la célula se encuentran proteínas que pueden degradar al DNA es necesario eliminarlas, esto se logró con la adición de la proteinasa K. Posteriormente se adicionó una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, donde al finalizar se obtuvieron dos fases, una acuosa y una orgánica, donde por las características químicas del DNA, éste se localizaba en la porción acuosa, mientras que en la fase orgánica se localizaran a los componentes proteicos de la célula. Los siguientes lavados con cloroformo y alcohol isoamílico sirvieron para eliminar las proteínas que quedaron después del primer lavado. Al finalizar se adicionó el alcohol isoamílico que precipitó al DNA, haciéndolo visible como un hilo viscoso, que tras una incubación a 4°C pudo ser aislado mediante centrifugación, posteriormente fue lavado con etanol al 70% y finalmente tras secarlo (eliminar restos de etanol) se resuspendió en agua y pudo ser cuantificado, para posteriormente ser utilizado en un ensayo de PCR.

### **CUANTIFICACIÓN DE DNA**

La cuantificación de las muestras se hizo mediante espectrofotometría UV, se realizó una dilución de 1:1000 para cada muestra y se tomo 1 mL para la lectura en el espectrofotómetro, se tomó nota de la absorbancia a 320, 230, 260 y 280nm. Finalmente se realizó el cálculo de la concentración y la pureza.

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Abs } 260\text{nm}}{\text{Abs } 280\text{nm}}$$

$$\text{Concentración } \mu\text{g/mL} = \text{Abs } 260\text{nm} \times 50$$

## 8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones; se utilizó una mezcla comercial que ya cuenta con los elementos necesarios para que se lleve a cabo la reacción, como son: dNTP's, Taq polimerasa, MgCl y el buffer, agua para PCR, como control se utilizaron *primers* para el gen GAPDH con un peso aproximado de 1000pb, el tamaño de los amplificados de los genes NA1 y NA2 son de 118pb y 171pb respectivamente (Fig.9). Para el análisis del polimorfismo, se utilizó como primer sentido: 5' CTC AAT GGT ACA GCG TGC TT 3'; como *primer* antisentido para el gen NA1: 5' GCC TCA TCT CAA GCC AGG CC 3'; *primer* antisentido para NA2: 5' AAC GAC AGT GGA GAG TAC AGG TG 3'; el proceso de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, alineación a 63°C y extensión a 72°C, seguidos de una extensión final de 72°C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% y fueron visualizados con Syber green.

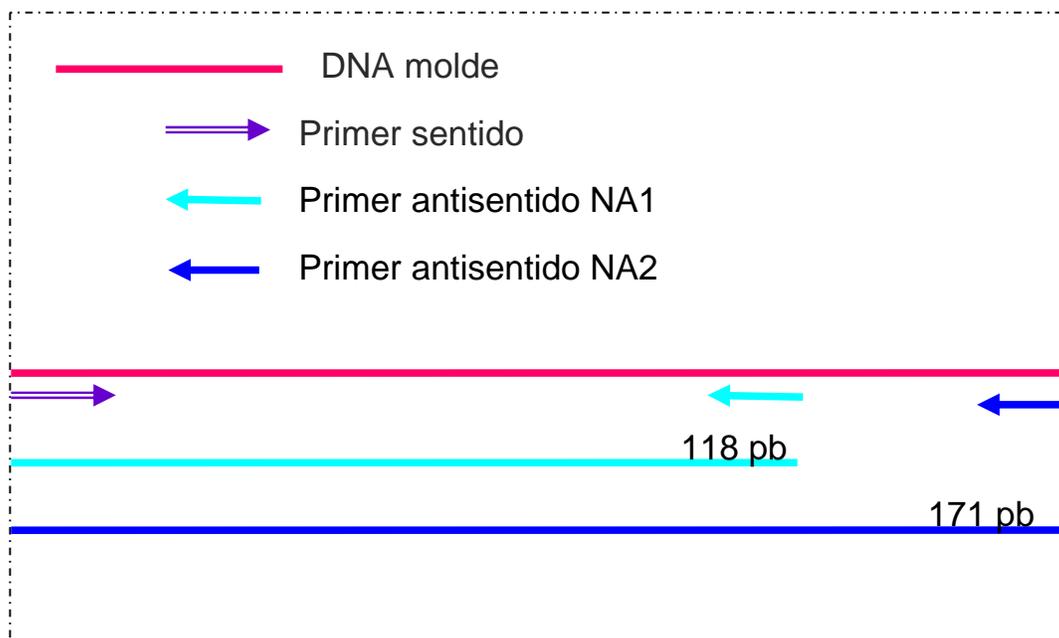


Figura 9. Representación gráfica de los amplificados

## V RESULTADOS Y ANÁLISIS

### ***CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA***

Tras la extracción de DNA realizado a las células de sangre periférica, fue posible obtener DNA con una pureza y concentración adecuadas para la realización de un ensayo de PCR, las concentraciones, como podemos ver en la tabla 1, van desde 0.3  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0.7 $\mu\text{g/ml}$ , por otra parte, la pureza de las muestras se encuentra alrededor de 1.5, parámetro que se estableció como adecuado para los ensayos de PCR.

Al finalizar las extracciones de DNA se realizó una electroforesis para ver la integridad del DNA obtenido, ya que es posible que se al finalizar la extracción se obtuviera DNA degradado y en consecuencia no sería útil para la reacción, los resultados de la PCR se encuentran expresados en la tabla 2, se realizó la PCR con el control positivo, que en el caso del presente trabajo se trata del gen GAPDH, posteriormente se realizó la PCR para los alelos NA1 y NA2.

<b>Extracción DNA</b>				
	Cuantificación			
Muestra	260nm	280nm	Conc. $\mu\text{g/ml}$	Pureza
SP1	0.009	0.006	0.45	1.5
SP2	0.006	0.004	0.3	1.5
SP3	0.014	0.009	0.7	1.6
SP4	0.01	0.007	0.5	1.4
SP5	0.006	0.004	0.3	1.5

<b>PCR</b>				
Muestra	GADPH	NA1	NA2	Genotipo
SP1	+	+	+	NA1/NA2
SP2	+	+	+	NA1/NA2
SP3	+	+	-	NA1/NA1
SP4	+	+	+	NA1/NA2
SP5	+	+	+	NA1/NA2

Tabla 2 Resultados de la PCR para células de sangre periférica

### **LINFOCITOS CON EBV**

En el caso de los linfocitos transformados con el EBV, fue posible la obtención de muestras de DNA con características de pureza y concentración aceptables para el ensayo de PCR, en la tabla 3, podemos ver los resultados de concentración y pureza, las concentraciones de las muestras van desde 0.7µg/ml hasta 1.5 µg/ml, en los resultados de pureza se tienen valores que van desde 1.3 hasta 1.6, estos valores se consideran adecuados para realizar la PCR .

De la misma manera que las células de sangre periférica, las células transformadas con EBV se les realizó una electroforesis, donde se observó que el DNA no estaba degradado, por lo que se procedió a realizar la PCR para el control y los alelos que se están estudiando, podemos ver los resultados en la tabla 4.

<b>Extracción DNA</b>				
Cuantificación				
Muestra	260nm	280nm	Conc. µg/ml	Pureza
LEBV1	0.014	0.011	0.7	1.3
LEBV2	0.015	0.011	0.75	1.4
LEBV3	0.03	0.02	1.5	1.5
LEBV4	0.01	0.008	0.5	1.3
LEBV5	0.014	0.009	0.7	1.6

Tabla 3. Cuantificación y determinación de pureza del DNA obtenido a partir de células transformadas con EBV

<b>PCR</b>				
Muestra	GADPH	NA1	NA2	Genótipo
LEBV1	+	-	+	NA2/NA2
LEBV2	+	+	+	NA1/NA2
LEBV3	+	+	-	NA1/NA1
LEBV4	+	+	+	NA1/NA2
LEBV5	+	+	+	NA1/NA2

Tabla 4. Resultados de la PCR para células con EBV

## TEJIDO EN PARAFINA

El DNA obtenido a partir de los bloques de parafina cuenta con características que permiten utilizarlo en un ensayo de PCR, los resultados de la cuantificación, pueden verse en la tabla 5, puede verse que las concentraciones están entre 0.65 $\mu$ g/ml hasta 1.05  $\mu$ g/ml, mientras que la pureza es similar en todas las muestras ya que son resultados que se encuentran alrededor de 1.0.

Los resultados de la PCR se encuentran plasmados en la tabla 6, en ella podemos ver que el DNA funcionó para la reacción del control y de los alelos en estudio.

<b>Extracción DNA</b>				
	Cuantificación			
Muestra	260nm	280nm	Conc. $\mu$ g/ml	Pureza
TP1	0.009	0.008	0.45	1.1
TP2	0.015	0.015	0.75	1.0
TP3	0.016	0.016	0.8	1.0
TP4	0.021	0.021	1.05	1.0
TP5	0.013	0.013	0.65	1.0

Tabla 5 Cuantificación y determinación de pureza de células obtenidas a partir de tejido en parafina.

<b>PCR</b>				
Muestra	GADPH	NA1	NA2	Genotipo
TP1	+	+	-	NA1/NA1
TP2	+	+	-	NA1/NA1
TP3	+	+	+	NA1/NA2
TP4	+	+	-	NA1/NA1
TP5	+	+	-	NA1/NA1

Tabla 6 Resultados de la PCR para células de tejido en parafina

### **FIBROBLASTOS**

De las muestras procesadas, ambas cumplen con las características necesarias para ser utilizadas en un ensayo de PCR, las concentraciones son de 0.2 µg/ml y 0.6µg/ml, en la pureza se tienen datos de 1.4 y 1.5, estos resultados pueden observarse en la tabla 7

Para la PCR, como realizó con las muestras anteriores, se les realizó una electroforesis para ver la integridad, encontrándose en buenas condiciones para su uso, los resultados se encuentran en la tabla 8.

<b>Extracción DNA</b>				
	Cuantificación			
Muestra	260nm	280nm	Conc. µg/ml	Pureza
F1	0.012	0.008	0.6	1.5
F2	0.004	0.003	0.2	1.3

Tabla 7. Cuantificación y pureza de fibroblastos

PCR				
Muestra	GADPH	NA1	NA2	Genotipo
F1	+	+	+	NA1/NA2
F2	+	+	-	NA1/NA2

Tabla 8. Resultados de la PCR para los fibroblastos

### ***CÉLULAS EN CARBOWAX.***

Como en todas las muestras, se realizó una electroforesis para determinar la integridad del DNA obtenido a partir de las células conservadas en carbowax, encontrándose todas las muestras con degradación (Fig.10), por tal motivo no se realizó la cuantificación y por ende la PCR.



Fig. 10. Electroforesis del DNA de células en carbowax (carriles 2 al 6), células de SP (carriles 7 al 10) y células con EBV (carriles 11 al 14)

## PCR

En la figura 11, se muestra el resultado de la electroforesis correspondiente al PCR del gen utilizado como control positivo, aquellas que dieron resultado positivo fueron utilizadas para el PCR de los genes NA1 y NA2.

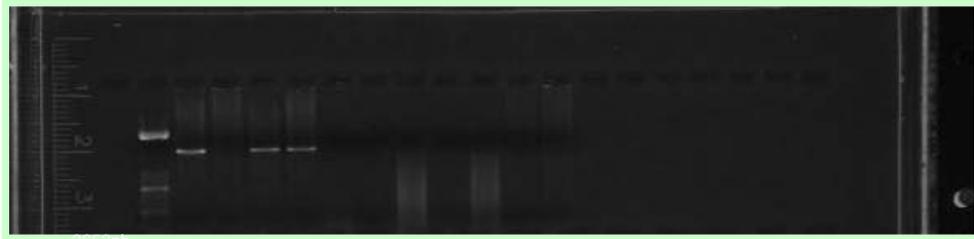


Fig. 11. electroforesis del gen constitutivo (GADPH), cuyo peso es de 1000pb.

La PCR de los genes NA1 y NA2 se realizo en tubos por separado, la razón es que ambos genes solo se diferencian en 53pb, lo que dificultaría su diferenciación en el gel (Fig.12).

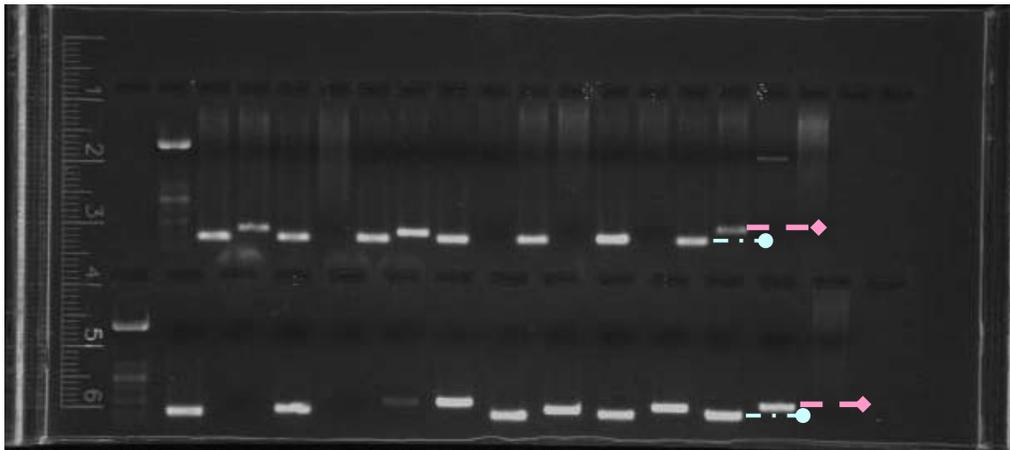


Fig. 12. Electroforesis NA1 y NA2, marcador DNA ladder 50bp, invitrogen.

NA1 118pb     - - - ●  
NA2 171pb     - - - ◆

## ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN

En la figura 13, podemos ver la comparación entre las concentraciones de las diferentes muestras, donde se ve claramente que la muestra con la mayor concentración es la proveniente de células transformadas con EBV, debido probablemente a que estas células se encuentran en cultivo y por ende en constante división, lo que deriva en la obtención de un mayor número de células. En el caso del DNA obtenido a partir de los cortes de tejido en parafina, no se tiene el dato exacto de la cantidad de células que se obtienen por corte, pero en el caso del presente trabajo, el uso de 5 muestras de 8 micras, permiten la obtención de 0.7  $\mu\text{g/mL}$ . Para las células de sangre periférica y los fibroblastos presentan una concentración similar, esto puede atribuirse a que en el caso de las células de sangre periférica, una parte es utilizada para la extracción de DNA y el resto sirven para la transformación con el EBV, lo que reduce la cantidad de células disponibles para la extracción; en el caso de los fibroblastos, cuando se realizaba la cosecha, no todas las células se desprendían de la caja de cultivo, aproximadamente un 40 a 30% se quedaba adherida, lo que reduce el número de células. Para el caso de las muestras de carbowax, como se mencionó anteriormente, no se obtuvo DNA, en el caso de estas muestras, se encontró en la bibliografía, que se han mantenido en un tiempo de almacenamiento no mayor a 4 días y las extracciones de DNA han sido exitosas, si se considera que las muestras llevaban almacenadas más de 1 año, encontramos la razón del porque no se obtuvo DNA.

### **COMPARACIÓN PUREZA**

En la figura 14, la muestra que presenta una mayor pureza es la obtenida a partir de células de SP, ya que como se explico en la sección de metodología, la obtención de células se hace mediante gradiente de densidad donde al final se obtienen diferentes fases, lo que en cierta forma garantiza que se tenga un paquete celular libre de contaminantes, por otra parte, las células que permanecieron en cultivo (CEBV y fibroblastos) poseen la misma pureza, debido probablemente, a que ambas células se encuentran expuestas a los mismos componentes del medio de cultivo, en tercer lugar se encuentra la muestra obtenida a partir de tejido en parafina y finalmente se encuentra la muestra obtenida a partir de células conservadas en carbowax.

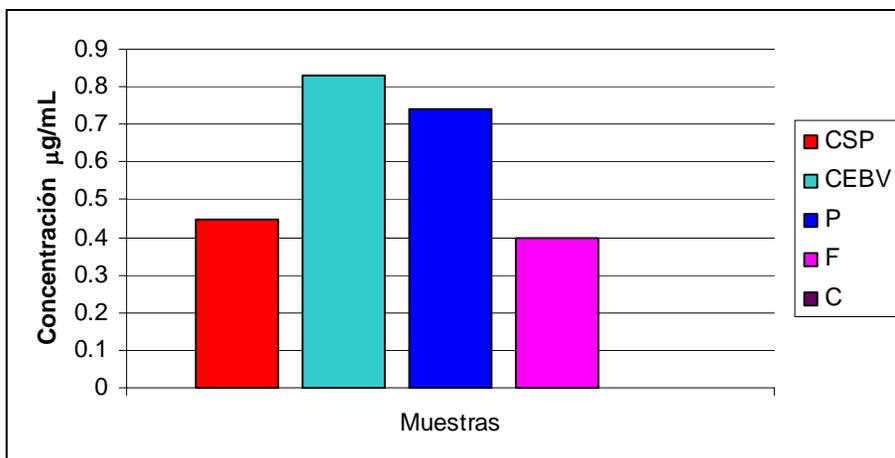


Figura 13. Concentración  
Células de sangre periférica (CSP): 0.45 µg/mL  
Células con EBV (CEBV): 0.83 µg/mL  
Células de parafina (P): 0.74 µg/mL  
Fibroblastos (F): 0.4 µg/mL  
Células en carbowax (C): ----

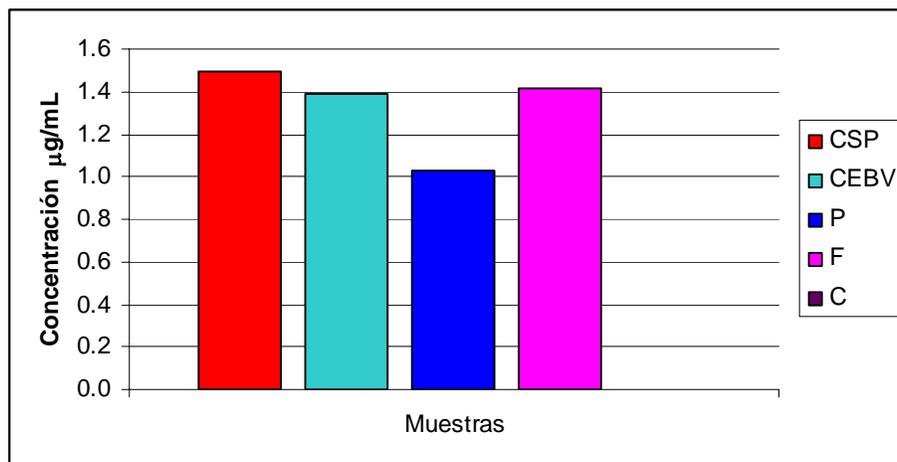


Figura 14. Pureza  
Células de sangre periférica (CSP): 1.5  
Células con EBV (CEBV): 1.4  
Células de parafina (P): 1.0  
Fibroblastos (F): 1.4  
Células en carbowax (C): ----

## VI CONCLUSIONES

Se logró obtener DNA a partir de cuatro de las cinco muestras planteadas. Para determinar si el método de conservación influyo en la calidad del DNA es necesario considerar la concentración y pureza, ya que pueden obtenerse muestras de DNA de una alta pureza, pero que tengan una concentración baja y viceversa. Considerando las características antes mencionadas, podríamos establecer como el método de menor influencia al cultivo celular, mientras que, en el caso de las muestras procesadas, el peor fue el carbowax. Sin embargo es importante considerar el tiempo de almacenamiento que podría ser otro factor que influye sobre la calidad del DNA obtenido.

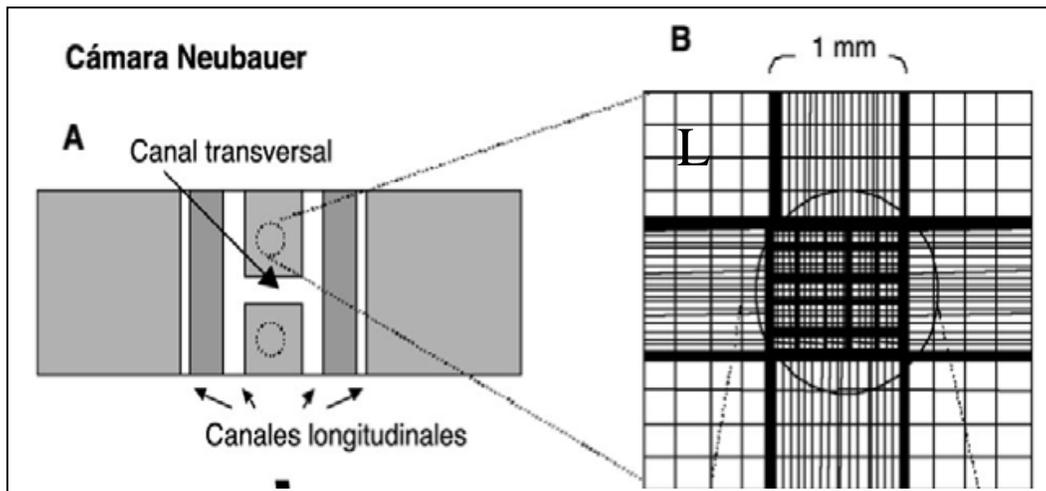
Entonces podemos decir que el método de conservación si influye en las características de pureza y concentración del DNA que se utilizará en la técnica de PCR.

## ANEXO I

### CONTEO CELULAR

Determinar el número de células en una preparación o un cultivo, frecuentemente es necesario para la estandarización de distintas condiciones experimentales. Las células pueden ser cuantificadas directamente con el microscopio, incluso puede determinarse la viabilidad celular con ayuda de reactivos como el azul tripano que es un colorante supravital.

Uno de los métodos comúnmente utilizados es la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado una cuadrícula. Es un cuadrado de 3 x 3 mm. con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. El área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.



Para el cálculo del número de células se utiliza la siguiente fórmula:

$$\#cél. = L/4 \times 10 \times D$$

Donde: L= al número de células en los cuatro cuadrantes (L)

D = Factor de dilución.

**BIBLIOGRAFIA:**

1. Alcano, Eduard. DNA technology, 2° ED. Harcourt, U.S.A. 1999
2. R. Cummings, Michael. Conceptos de genética. 8ª Ed. Prentice Hall, España, 2006.
3. L. Hunt, J. "Molecular Pathology in Anatomic Pathology Practice". Arch Pathol Lab Med. Vol 132 (2008). p. 248 – 259.
4. Lehninger. Principles of biochemistry. 4ªEd. U.S.A. 2005.
5. F. Griffiths, Anthony. Genética. 7° Ed. España, Mc Graw Hill. 2002.
6. Satz, M.L. "La reacción en cadena de la polimerasa. El método y sus aplicaciones". Ciencia hoy. Vol 4 (1993), num. 23.
7. Fuentes Arderiu, X. et.al. Bioquímica clínica y patología molecular. Vol I, 2ª Edición. Editorial Reverte. España. 1998.
8. Voet. D. et.al. Bioquímica. Ediciones Omega, 1992. España.
9. Mc Kenzie, B. Hematología clínica. 2ª Ed. Manual moderno. 2000.
10. Masanobu S 2004
11. Leal L. et.al. "Aislamiento y cultivo de fibroblastos endoneurales" Acta Biológica Colombiana, Vol. 9 (2004) No. 2: p. 57-65.
12. De Armas, Y. "Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. Rev. Esp. Patología, Vol. 39 (2006), No. 3: p 171-174
13. Jiménez M. et.al., Manual de practicas, laboratorio de fisiologia, 2003, facultad de química, UNAM.
14. Ravetch JV, et.al. Immune inhibitory receptors. Science (2000) 290:84-

15. Nimmerjahn F, Ravetch J. Divergent immunoglobulin-G subclasses activity through selective Fc receptors binding. *Science* (2005). 310: 1510-1512
16. Salmon JE, Millard SS, et.al. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIIa in an oxidant dependent and allele sensitive manner. *J Clin Invest* (1995) 95:2877-85
17. Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity *Journal of Clinical Immunology* (2005) 25: 1-18
18. Jürgen G. Hans, et.al. DNA extracción from bronchial aspirates for molecular cytology: Which method to take?. *Analytical Cellular Pathology* Vol. 25 (2003) p:83-88
19. F. Nasuti Joseph, et.al. Semicuantitative analysis on the cellular preservation quality of Normosol® and Carbowax® solutions for thyroid fine-needle aspiration specimen. *Diagnostic cytopathology* Vol. 22, No.5 p: 319-322.
20. Étienne, Jaqueline, *Bioquímica genética, biología molecular*. Editorial Masson, Barcelona, 2001.
21. Dijkstra Hilde, et.al. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *TRENDS in immunology*, Vol.22, No.9, September 2001, p: 510-515
22. Gómez Luis, et.al. Receptores Fc $\gamma$  autoinmunidad. *Acta medica colombiana*, Vol.30, No.1, enero-marzo 2005 pp: 27-34
23. Ravetch, Jeffery, et.al. IgG Fc Receptors, *Annu. Rev. Immunol.* Vol. 19, 2001, pp: 275-290.

24. Hogarth, Mark. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity, *Current opinion in immunology*, 2002, 14:798-802.
25. Chuang, Frank, et.al. Convergence of Fc $\gamma$  receptor IIA and Fc $\gamma$  receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils, *The journal of immunology*, 2002, 164:350-360.
26. Vossebeld, Paula, et.al. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositide 3-kinase occurs upstream of Ca<sup>2+</sup>-signalling inducen by Fc $\gamma$  receptor cross-linking in human neutrophils. *Biochem. J.* 1997, 323:87-94.
27. Takai, Toshiyuki, Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *Journal of clinical immunology*, Vol. 25, No 1, January 2005.
28. Fairhurst, Ann-Marie. Rheumatoid Peripherals blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species. *Arthritis Reserch & Therapy*, 2007, 9:R29.
29. Nimmerjahn F, Ravetch J. Fc $\gamma$  receptors: old members and new family members. *Immunity* 2005, 24:19-28.

## Consulta electrónica

30. Herver, Jean-Piere. et.al. Biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa (la PCR) [en línea]. Cochabamba, Bolivia, abril 2006.  
<http://www.icampus.ucl.ac.be/courses/SBIM2520/document/genemol/bio molespa/PCR/PCR.html>. [consulta 20 agosto 2008].
31. William N. et.al. Tratado de reumatología, Eslevier España. [en línea]  
<http://books.google.com.mx/books?id=rGk49UD03hMC> [consulta 30 septiembre 2008]
32. Ballesteros D., Procesamiento del tejido en el laboratorio [en línea]  
Universidad Nacional de Colombia, 2005.  
<<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005168/lecciones/Capitulo3/Lec3-6.html>> [consulta 30 septiembre 2008]
33. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Practica No. 3, procesamiento de la muestra. [en línea] 2003.  
<[http://dieumsnh.qfb.umich.mx/patologla\\_pract/pagina\\_nueva\\_2.htm](http://dieumsnh.qfb.umich.mx/patologla_pract/pagina_nueva_2.htm)> [consulta 30 septiembre 2008]
34. Tecnología Médica Mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico [en línea]< <http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/generalidades-inclusin.html>> (consulta 17 octubre 2008)
35. Thermo electron Corporation. Shandon Cell-Fix™ spray fixative. [on line]  
[http://www.thermo.com/ethermo/CMA/PDFs/various/file\\_23533](http://www.thermo.com/ethermo/CMA/PDFs/various/file_23533)> (consulta 17 octubre 2008)