

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RESTAURACIÓN DE ADN EN
PLASMA SANGUÍNEO

TORRES TRUJILLO JULIANA DEL PILAR

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2009

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RESTAURACIÓN DE ADN
EN PLASMA SANGUÍNEO

JULIANA DEL PILAR TORRES TRUJILLO

Fabio A. Aristizábal Gutiérrez, Director

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

para optar por el título de

Bióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2009

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la Justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Agosto de 1946

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RESTAURACIÓN DE ADN
EN PLASMA SANGUÍNEO

JULIANA DEL PILAR TORRES TRUJILLO

Fabio Ancízar Aristizábal, Gutiérrez Ph d.
Director

Dabeiba Adriana García Robáyo, Msc
Codirector

Dr. Francisco María Rebollo Pardo
Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2009

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RESTAURACIÓN EN PLASMA
SANGUÍNEO

TORRES TRUJILLO JULIANA DEL PILAR

Ingrid Shuler García
Decana Académica Facultad de ciencias

Andrea Patricia Forero
Directora de Carrera

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2009

DEDICATORIA

*“Este trabajo lo dedico a
Dios,
a mi familia y a Andrés;
a cada uno de ellos gracias por su
Apoyo y ayuda durante el desarrollo
del trabajo con el que culmino mi carrera profesional ”*

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios que me dio fuerza para culminar esta etapa de mi vida y me ayudo a afrontar los obstáculos que se presentaron a lo largo del proceso.

Agradezco al Grupo de Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia; al profesor Fabio Aristizábal por toda la ayuda brindada durante el desarrollo de trabajo de grado.

Gracias a mis padres y hermanos por el amor y la confianza a lo largo de toda mi carrera y por su apoyo durante cada uno de los procesos de finalización.

Gracias a Andrés por ser la persona que me dio su apoyo, ayuda y amor en la culminación de esta etapa tan importante en mi vida, a demás por cada una de las palabras de aliento para seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Virus del papiloma humano	15
2.2 ADN libre en plasma	17
2.3 Restauración de ADN	19
2.4 PCR en tiempo real.....	20
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	22
3.1 Formulación del problema	22
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 General	24
4.2 Específicos	24
5. HIPOTESIS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Métodos.....	26
6.1.1 Obtención de muestras.....	26
6.1.2 Extracción de ADN.....	26
6.1.3 Restauración de ADN en muestras de plasma sanguíneo	27
6.1.4 Evaluación de la calidad de ADN.....	28
6.1.5 Muestras evaluadas para VPH.....	29
6.1.6 PCR en tiempo real	29

6.1.7	Amplificación de ADN.....	29
6.1.8	Curva Estándar	30
6.1.9	Análisis estadístico	31
7.	RESULTADOS	32
7.1	PCR en tiempo real.....	35
7.1.1	Estandarización de la curva para PCR en tiempo real.....	36
7.2	Análisis estadístico	39
8.	DISCUSIÓN.....	42
9.	Conclusiones	47
10.	Recomendaciones.....	48
11.	Referencias	49

RESUMEN

El método de restauración de ADN es un proceso que en la actualidad no ha sido estudiado a profundidad, pero que ha sido empleado con resultados satisfactorios en el momento de hacer pruebas a diferentes tipos de muestras, como biopsias de pacientes con cáncer de pulmón, plasma sanguíneo de pacientes con cáncer de seno entre otros. En el presente trabajo se realizó el proceso restauración de ADN en 20 muestras de plasma sanguíneo de mujeres que asistieron a toma de citología,

A partir del banco de muestras que fueron utilizadas en estudios previos realizados dentro del grupo de investigación se seleccionaron muestras con resultados débiles y negativos en la amplificación del gen β -globina. Las muestras fueron restauradas por dos métodos diferentes, en donde la variación era la enzima empleada, era la base del proceso. Se usaron enzimas con ADN polimerasa Klenow , para el primer proceso; y el método con ADN polimerasa Klenow mas lígasa para el segundo.

Posterior al proceso de restauración se realizó la evaluación de la calidad por medio de PCR convencional para los dos métodos, obteniendo óptimos resultados sobre las muestras. Para evaluar el proceso sobre muestras que se usan para detección de *Virus del Papilloma humano* se llevo a cabo una PCR convencional bajo los primers GP5+/GP6+. Adicionalmente se realizó el proceso de cuantificación de ADN por medio de PCR en tiempo real, donde se encontró una diferencia significativa entre los dos métodos, siendo el método de Klenow mas efectivo que al método en el que se hizo adición de ligasa.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte en mujeres colombianas, siendo el Virus del papiloma humano el principal factor de riesgo para su desarrollo. El genoma del virus está formado por las regiones: temprana (E1-E8), tardía (L1 y L2) y codificadora (ORF). El papel oncogénico principal se atribuye a los genes E6 y E7 quienes inhiben el proceso de apoptosis e inducen a la proliferación celular.

Actualmente, el plasma sanguíneo, es una fuente importante de indicadores moleculares, siendo una herramienta pronóstico en varios tipos de patologías entre estas el cáncer. Sin embargo, el estudio de las muestras obtenidas de dichos pacientes, puede requerir de procesamiento y de almacenamiento en frío por largos periodos de tiempo, lo que puede causar, respectivamente, contaminación y degradación de los componentes sanguíneos, entre ellos los ácidos nucleicos, dificultando el estudio de las muestras recolectadas y perdiendo, además de información valiosa, gran cantidad de muestras que podrían ayudar a investigaciones futuras.

En los últimos años gran cantidad de científicos han intentado aplicar nuevas técnicas moleculares para reparar o mejorar la calidad del ADN en muchos campos de investigación como por ejemplo en estudios filogénicos, genética de poblaciones, medicina arqueología entre otros, implementando diferentes métodos de restauración de ADN, los cuales han arrojando resultados significativos.

En el presente estudio, se emplearon muestras de plasma sanguíneo, que fueron almacenadas por un periodo de tiempo de un año de mujeres que asistieron a control médico en una I.P.S en la ciudad de Bogotá. En las muestras se aplicó la técnica de restauración de ADN, que consiste en incubar las muestras con Taq's Polimerasa, DNTP's y buffer para mejorar la calidad de la molécula.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Virus del papiloma humano

El *Virus del Papiloma Humano* (VPH) es un virus de transmisión sexual, se transmite por contacto genital, siendo el principal factor de riesgo para cáncer cervical; afecta la membrana mucosa y está clasificado dentro de la familia *Papovaviridae* del genero *Papillomaviridae* donde la característica principal es la ausencia de envoltura; su cápside es icosaédrica de 72 capsómeros, y está compuesto por 8000 pb de longitud de ADN circular (Muñoz *et al.*, 2006), se divide funcionalmente en dos tipos de genes: 8 genes tempranos (E) encargados de la replicación del ADN, regulación transcripcional y transformación del ADN en la célula infectada y 2 genes tardíos (L) que codifican las proteínas de la cápside viral (Serman, 2002).

Este tipo de cáncer es el segundo más común en el mundo (Woodman *et al.*, 2007; Ault, 2006; Longworth y Laimins, 2004; Marshall, 2003), y en Colombia causa muerte en mujeres en edad reproductiva (Piñeros *et al.*, 2005; Ferlay *et al.*, 2004) este tipo de cáncer se desarrolla en el cérvix, la parte del útero que se une con la vagina. Inicialmente se forman lesiones precursoras denominadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) que se dan en tres etapas (Figura 1), en donde el 16% a 36% de los casos que presentan la etapa NIC III que es la neoplasia cervical que se convierte en cáncer cervical (Zuna *et al.*, 2006; Graflund *et al.*, 2002; Southern y Herrington, 1998).



Modificado de cms7.blogia.com/.../20081106174446-diagram2.jpg

Figura 1. Lesiones precursoras causadas por el Virus del papiloma humano, que conllevan al desarrollo de Cáncer de cuello uterino.

Existen más de 100 tipos diferentes del virus y al menos 40 de ellos afectan la parte genital y se calcula que un 80% de las mujeres se infectan con VPH en algún momento de su vida (Woodman *et al.*, 2007; Scheurer *et al.*, 2005). Los tipos del virus están agrupados en: *bajo riesgo* en los que se encuentran los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 y de *alto riesgo* entre los cuales están los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 70, estos últimos, por mutaciones principalmente de sus genes E6 y E7, son uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del cáncer cervical ya que estimulan la carcinogénesis cervical (Ault, 2006; Wiley y Masongsong, 2006; Jung *et al.*, 2004).

Los genes E6 y E7 del VPH codifican las proteínas oncogénicas, la oncoproteína E6 aumenta la degradación del p53 (regulador del ciclo celular) además de inhibir a sus coactivadores y a inhibidores de ciclinas como p21 y p27; mientras que la oncoproteína E7 induce la transcripción de genes requeridos para la entrada a la fase S del ciclo celular ya que libera el factor de transcripción E2F-1 (mediante unión con la proteína pRB) (Narisawa-Saito y Kimono, 2007; Johung *et al.*, 2007; Shai *et al.*,

2007; Longworth y Laimins, 2004; Cho *et al.* 2002), por lo que su acción conjunta promueve la proliferación celular, impide los procesos de necrosis y apoptosis y genera transformación celular convirtiéndose así en precursores del cáncer. En los tipos de VPH de bajo riesgo, las oncoproteínas resultantes no son tan eficientes en su efecto en el p53 y el pRB como en los de alto riesgo.

El método convencional para el tamizaje del cáncer cérvico-uterino es la citología cérvico-vaginal y su interpretación se basa en los cambios morfológicos de las células, observados mediante la tinción de la prueba de Papanicolaou. Un examen anual es lo que permite prevenir hasta un 70% de las neoplasias (Cavazza y Correnti 2004). Sin embargo, el método Papanicolaou tiene limitaciones importantes entre las cuales se encuentra el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes para mejorar su sensibilidad y la sobre-valoración de los hallazgos citológicos, sobre todo en las evaluaciones de los cambios morfológicos, donde la citología únicamente permite sugerir la presencia de una infección por VPH pero hasta ahora no es posible hacer la detección certera del virus. (Cavazza y Correnti 2004).

2.2 ADN libre en plasma

El plasma es el componente líquido de la sangre, contiene en su mayoría agua, pero en él también se encuentran proteínas libres, hormonas, azúcares, factores coagulantes, entre otros. Actualmente el ADN libre en plasma es una fuente importante de indicadores moleculares para observar condiciones generales en varios tipos de pacientes; puede revelar diferentes situaciones patológicas como infecciones, varios tipos de desordenes y enfermedades autoinmunes, asociadas a muerte celular (Fournie *et al.* 1995, Zheng *et al.* 2006); encontrándose así alteraciones genéticas y epigenéticas (Arias *et al.*, 2007). Además es empleado en procesos de

diagnóstico de enfermedades durante la gestación como preclampsia, aberraciones cromosómicas fetales entre otras (Zheng et al. 2006).

Desde la década de 1970 se han reportado en numerosos estudios un aumento de ADN libre en el plasma de pacientes con cáncer, incluso, se presenta una mayor cantidad de ADN libre en suero en pacientes con metástasis (plasma sin factores coagulantes que se produce luego de la coagulación de la sangre), que en pacientes con enfermedades localizadas (Anker *et al.* 2000). Más adelante, se encontró que el ADN libre de pacientes con cáncer, comparte propiedades biofísicas con el ADN del tumor como disminución de la estabilidad, presencia de oncogenes específicos, alteraciones de microsatélites entre otros (Woodman *et a.*, 2007); y es precisamente gracias a las alteraciones microsatelitales, que se hace posible utilizar el ADN libre en plasma o suero como un marcador de diagnóstico para identificar tumores específicos así como la etapa tumoral en que se encuentran (Anker *et al.* 2000) pero para esto se requieren cantidades en microgramos de ADN.

Las pruebas realizadas con ADN de plasma sanguíneo pueden ser altamente sensibles y específicas, tanto que es posible pensar en hacer un seguimiento durante el proceso de la enfermedad en pacientes con cáncer.

En lo que respecta al VPH y al cáncer cervical, a pesar de tratarse de una enfermedad local, es posible encontrar ADN viral liberado por lisis celular, apoptosis o por procesos metastáticos en el plasma de pacientes infectados (Mutirangura, 2001), y es además factible utilizarlo para el seguimiento control postratamiento, control de recurrencias entre otros (Tong y Lo, 2006; Widschwendter *et al.*, 2003).

Sin embargo, por el procesamiento de las muestras se pueden afectar de manera significativa el ADN en cuanto a su estructura, cantidad y calidad; impidiendo realizar estudios moleculares de ADN en plasma, ya que este puede ser degradado por la influencia de AADNsas, mecanismos o acciones físicas como la hidrólisis, oxidación o destrucción por enzimas, que en consecuencia, originan pequeños fragmentos de ADN, un bajo número de copias, presencia de nicks en los fragmentos

de doble cadena; minimizando la posibilidad de la amplificación mediante la PCR (Pusch, et al. 1998). Esto ha causado controversias en cuanto a la utilización del ADN de plasma para la detección de ácidos nucleicos de origen viral libre por la diferencia de niveles -a veces nulos- de concentración encontrados en estudios realizados a pacientes con cáncer cervical en diferentes poblaciones y utilizando diferentes métodos de detección y/o conservación de las muestras (Mutirangura, 2001).

2.3 Restauración de ADN

Debido a la fragilidad e inestabilidad del ADN, este puede degradarse por los procesos de extracción, conservación y purificación (Arias *et al.* 2007), presentando daños ya sea inducidos por los procedimientos a los que se somete o por su propia naturaleza al estar almacenados por amplios periodos de tiempo (Paabo S. 1989), exposiciones ambientales a radiación o agentes nocivos (Mitchell *et al.* 2005), llegando a presentar modificaciones y fragmentación en su estructura (Mitchell, et al. 2005; Push, et al. 1998).

Estos daños tienen diferentes grados de efecto en los resultados y eficiencia de las PCR (Sikorsky et al. 2007), muchos de estos daños es posible repararlos y aumentar la calidad de la amplificación en PCR (Mitchell *et al.* 2005, Arias *et al.* 2007).

Para los daños causados en el ADN se emplea un proceso llamado restauración el cual consiste en reparar los sitios donde los nucleótidos se han perdido, rellenando fragmentos de una sola hebra de ADN mediante un tratamiento con taq polimerasa y dNTPs antes de realizar la PCR (Bonin *et al.* 2003); obteniendo cadenas largas listas para la amplificación. (Bonin et al.2003).

Bonin y colaboradores (2003) evaluaron el proceso de restauración de ADN en muestras almacenadas, para estudios epidemiológicos moleculares y en el análisis de diferentes neuropatologías, donde es posible amplificar secuencias hasta 300 pb.

La técnica de restauración es reciente; se conocen pocos estudios y en plasma sanguíneo existe muy poca información. Arias y colaboradores (2007), aplican el proceso de restauración en muestras de plasma sanguíneo aplicando PCR convencional. Su estudio mostró muy buenos resultados, y utilizan los siguientes pasos:

1. Extracción del ADN;
2. Tratamiento de restauración Pre-PCR (Restauración),
3. Amplificación.

Los ensayos de este estudio se realizaron en muestras almacenadas de plasma sanguíneo de pacientes con cáncer, fueron seleccionadas por la inhabilidad de amplificar para el gen de B-globina en el procedimiento convencional de PCR. En los resultados arrojados se observó un incremento significativo en la eficiencia de la amplificación y una alta concentración del producto e intensidad en las bandas de muestras restauradas visualizadas en electroforesis con respecto a las que no fueron restauradas (Arias *et al.* 2007)

Finalmente el proceso restauración de ADN consiste en reparar los sitios donde los nucleótidos se han perdido, rellenando un fragmento de una sola hebra de ADN mediante un tratamiento con taq polimerasa y dNTPs antes de realizar la PCR (Bonin *et al.* 2003).

2.4 PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real es una técnica que permite la amplificación exponencial de secuencias cortas de ADN dentro de una molécula de ADN de cadena doble. Es una técnica bastante sensible por esto se requiere ADN de buena calidad. Esta PCR implica el uso de un par de primers, cada uno alrededor de 20 nucleótidos

de longitud, que son complementarios a una secuencia definida en cada una de las dos hebras. Por este método se pueden hacer análisis cuantitativos de las muestras.

La PCR cuantitativa detecta en tiempo real la amplificación de la molécula de interés. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Las secuencia Alu son fragmentos de ADN aproximadamente de 300 pares de bases que con ligeras variaciones puede encontrarse en un gran número de lugares en el genoma y logran mejorar la sensibilidad de la detección de genes en pruebas de PCR. Las primeras secuencias de este tipo se identificaron mediante la endonucleasa Alu, de la cual han recibido su nombre, aunque actualmente se analizan mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis esto por ser inserciones estables del genoma. Son las secuencias móviles más abundantes del genoma humano.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema

El *Virus del Papilloma humano* es el principal factor de riesgo para el cáncer cervical, y es el virus más recurrente actualmente entre las mujeres; siendo la detección, un punto importante para su control. (Hausen 2002)

Estudios recientes arrojan excelentes resultados en el estudio del ADN plasmático por medio de pruebas moleculares, ya que este ADN es una fuente valiosa de un gran número de indicadores moleculares que describen las condiciones generales de pacientes con cáncer (Arias et al. 2007). Pero en los estudios de muestras de ADN existen varias limitaciones ya que por la naturaleza de la muestra se altera su composición, sufriendo daños y fragmentaciones en las cadenas. La degradación de ADN se da por varias razones: La contaminación con otros tipos de ADN (Mitchell *et al.* 2005, Push *et al.* 1998); daños y diversas lesiones durante la extracción del ADN por lavados con sílica, enzimas proteolíticas, extracción por fenol y/o repetidas precipitaciones con etanol; almacenamiento de las muestras por largos periodos de tiempo (Paabo 1989) que pueden ser usadas para estudios futuros y seguimiento de pacientes en hospitales. Además del deterioro durante los procesos de purificación resultando un bajo porcentaje de productos específicos nucleares amplificados (Paabo 1989, Push *et al.* 1998, Arias *et al.* 2007).

Como se mencionaba anteriormente, el ADN de plasma por ser una fuente importante de marcadores tumorales puede ayudar a una detección temprana y mejora en los tratamientos de enfermedades como el cáncer de cuello uterino, que en la actualidad es frecuente en mujeres en edad reproductiva y afecta a un gran porcentaje de la población femenina en Colombia. Pero para dichos estudios se requiere un ADN de buena calidad que pueda mostrar datos representativos en el momento de evaluación de las muestras.

Por esto se requieren ensayos de nuevos procedimientos para mejorar la calidad de ADN y obtener un tamaño adecuado en diferentes tipos de muestras entre estas las de plasma sanguíneo. Por lo anterior en el presente trabajo se empleó un proceso de restauración en el ADN de plasma, para tratar las alteraciones y daños presentes en los ácidos nucleicos, asociados al almacenamiento o a diferentes métodos de extracción.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Comparar dos métodos de restauración de ADN en plasma sanguíneo de mujeres que asistieron a toma de citología para detección de VPH

4.2 Específicos

- 1.** Identificar, con el método de PCR convencional, las muestras que requieren restauración.
- 2.** Evaluar el incremento en la calidad del ADN alcanzados con los dos métodos de restauración en las muestras previamente identificadas, bajo el método de PCR en tiempo real.
- 3.** Evaluar las muestras restauradas para detección del Virus del Papiloma Humano

5. HIPOTESIS

Existen diferencias significativas en la mejora de la calidad del ADN tratado, entre los métodos de restauración con ADN polimerasa Klenow y el método con ADN polimerasa Klenow mas ligasa de muestras en plasma sanguíneo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Métodos

6.1.1 Obtención de muestras

La selección de muestras de ADN de plasma se realizó en el Banco de muestras de del Grupo Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia de pacientes que asistieron a toma de citología cérvico-uterina y Cáncer de cérvix, en una I.P.S de Bogotá durante el transcurso del mes de mayo de 2008. Se seleccionaron 20 muestras al azar que en estudios anteriores arrojaron resultados débiles y negativos en la evaluación de la calidad del ADN por medio de una PCR convencional en la amplificación del gen de B-globina, que incluían muestras de negativas y positivas para VPH.

6.1.2 Extracción de ADN

La obtención del ADN se llevo a cabo empleando 200µl de la muestra de plasma sanguíneo, se le adiciono 4ul de proteinasa K de una concentración de 20 microgramos/ mililitro, y se incubo a 55°C toda la noche. Posteriormente se realizo extracción por fenol-cloroformo y se precipitó con etanol según las especificaciones de Sambrook y Russel en el 2001.

El método consiste en tratar las muestras en un volumen igual de fenol cloroformo, seguidamente de una agitación manual durante cinco minutos y centrifugado durante otros 5 minutos a 8000 rpm. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo ependorf donde se realizó la precipitación del ADN, empleando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Inmediatamente fueron incubadas

durante toda la noche a -70°C y posteriormente fueron centrifugadas durante 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C .

El sobrenadante fue descartado y el *pellet* lavado con etanol al 70%. A continuación se dejó evaporar el etanol, y el ADN se resuspendió en 100 ml de Buffer TE (Tris 10 mM + 1 mL de EDTA, pH 8,0). Al terminar el proceso se almacenó a -20°C hasta el proceso de restauración.

6.1.3 Restauración de ADN en muestras de plasma sanguíneo

Para la restauración de ADN en plasma sanguíneo se emplearon dos tipos de enzimas diferentes: 1. ADN polimerasa de E. Coli, Klenow (Epicentre, Biotechnologies) Referencia KP810250 2. ADN polimerasa de Klenow mas ligasa. (Epicentre, Biotechnologies) Referencia KP81001K.

Para la prueba con la enzima klenow, se realizó una mezcla de solución con contenido de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.0 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton® X-100, dNTPs y buffer: 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 5.0 mM DTT. Posteriormente se adiciono 5ul de cada una de las 20 muestras de ADN de plasma para un volumen final de 25 ul, la mezcla se colocó en vórtex durante 1 minuto. La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora.

Para la prueba con klenow mas ligasa se realizó una mezcla de solución con contenido de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.0 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton® X-100, dNTPs y buffer: 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM MgCl₂, 5.0 mM DTT y ligasa. Posteriormente colocó 5ul de cada una de las 20 muestras de ADN de plasma para un volumen final de 25 ul y se colocó en vórtex durante 1 minuto. La mezcla fue incubada a 22°C durante toda la noche.

6.1.4 Evaluación de la calidad de ADN

La calidad del ADN tanto de las muestras restauradas y sin restaurar fue confirmada por PCR convencional con los *primers* PC03 (Forward: 5`CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG3`) / PC04 (Reverse: 5`CCCGAGTAGCTGGGATTACA3`), los cuales amplificaron un fragmento de 110pb del gen constitutivo de β -globina (Arias *et al.*, 2007). La mezcla de la reacción contenía buffer de PCR 1X, MgCl₂ 3,5mM, mezcla de dNTPs 800 μ M (200 μ M de cada uno), PC03 1 μ M, PC04 1 μ M, 1,25U de Taq polimerasa (Promega M7502) y agua destilada estéril hasta completar un volumen de reacción de 25 μ L.

Las reacciones fueron corridas en el equipo My Cycler™ Thermal Cycler (Biorad) con las siguientes condiciones: 4 minutos a 94°C, seguidos por 40 ciclos de amplificación de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 4 minutos. Como control positivo se usó ADN linfocitario y como control negativo agua destilada.

El producto de la PCR se visualizó mediante una electroforesis en Gel de Agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio (0,5 ug/ml); colocando 20 μ l del producto amplificado (Gen de 110 pb) en cada uno de los pozos. Esta electroforesis se corrió durante aproximadamente 60 minutos a 100 voltios en buffer TBE 1X, los productos de amplificación fueron visualizados con luz ultravioleta con un analizador Biorad Power PAC 3000 posteriormente la imagen del gel fue digitalizada con el programa Quantity One (Bio Rad).

6.1.5 Muestras evaluadas para VPH

Después de realizar el proceso de restauración por los dos métodos se realizó una evaluación de las muestras por medio de PCR convencional con primers GP5 (Forward 5'- TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC -3')/ GP6 (Reverse 5'- GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC -3')

El producto de la PCR se visualizó en electroforesis en Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) se colocó 20 ul de cada una de las muestras en los pozos.

6.1.6 PCR en tiempo real.

Se realizó una PCR en tiempo real para hacer un análisis cuantitativo de ADN de las muestras con los dos métodos de restauración de ADN.

6.1.7 Amplificación de ADN.

Para comparar los dos métodos de restauración se realizó una cuantificación del ADN de las muestras restauradas y no restauradas de plasma. Para esto, el ADN concentrado fue medido usando el sistema de PCR en tiempo Real (PCR-TR) con SYBR® Green (Master Mix, Applied Biosystems), usando secuencias repetitivas del Gen ALU 115pb. La PCR en tiempo real se llevó a cabo siguiendo el protocolo establecido por Umetani et al. (2006)

TABLA N° 1. Secuencias de los *Primers* ALU 115 (Umetani *et al*, 2006)

<i>Primers</i>	Tipo	Secuencias
ALU115	Forward	5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG -3'
	Reverse	5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3'

6.1.8 Curva Estándar

Se realizó un curva de calibración de diferentes concentraciones con ADN linfocitario patrón (1,5ng/μL) fue corrida en paralelo con cada análisis como referencia cuantitativa equivalente a las muestras desconocidas

Tabla N° 2. Diluciones seriadas de la Curva Estándar del PCR-TR a partir de ADN Linfocitario con una concentración de 1,5ng/μL.

Dilución	Concentración ng/μL
1:10	1,5
1:100	0,15
1:1000	0,015
1:10000	0,0015
1:100000	0,00015

La PCR en tiempo real se llevo a cabo en un volumen de reacción final de 25μL que contenía 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2μM de cada primer y 2μL de ADN. Las amplificaciones del ADN fueron corridas por duplicado, en placas de reacción de 96 pozos en el equipo 7500 de PCR de Tiempo Real (Applied Biosystems).

La amplificación fue iniciada a 95°C por 10 minutos y complementada por 50 ciclos de amplificación (denaturación a 95°C por 20 segundos, anillamiento a 64°C por 30 segundos y una extensión de 72°C por 32 segundos). Durante el ciclaje, las emisiones de cada una de las muestras fueron registradas y los datos de fluorescencia fueron procesados por el Software 7500 versión 2.0.1., para producir los valores del CT (por su sigla en inglés Threshold Cycle) de cada una de las muestras.

6.1.9 Análisis estadístico

Para el análisis de los dato se empleó una prueba no paramétrica de rangos signados Wilcoxon para realizar la comparación de datos entre los dos métodos de restauración utilizando el programa Microsoft Excel.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la calidad de ADN de las 20 muestras de plasma sanguíneo restauradas por los dos métodos: klenow y klenow con la adición de ligasa y de las muestras sin restaurar por medio de PCR convencional. A continuación se presentan los resultados del ensayo para muestras no restauradas y restauradas (Figura 2), donde se observan 5 carriles que indican el número de muestra. La figura 2A se observan bandas débiles es decir que no presentan buena definición para la amplificación del gen β -globina identificando el fragmento de 110pb en gel de agarosa al 1%. En la observación de todas las figuras se muestra el incremento en la calidad por los métodos de restauración en la amplificación de las muestras con respecto a las de la figura 2.

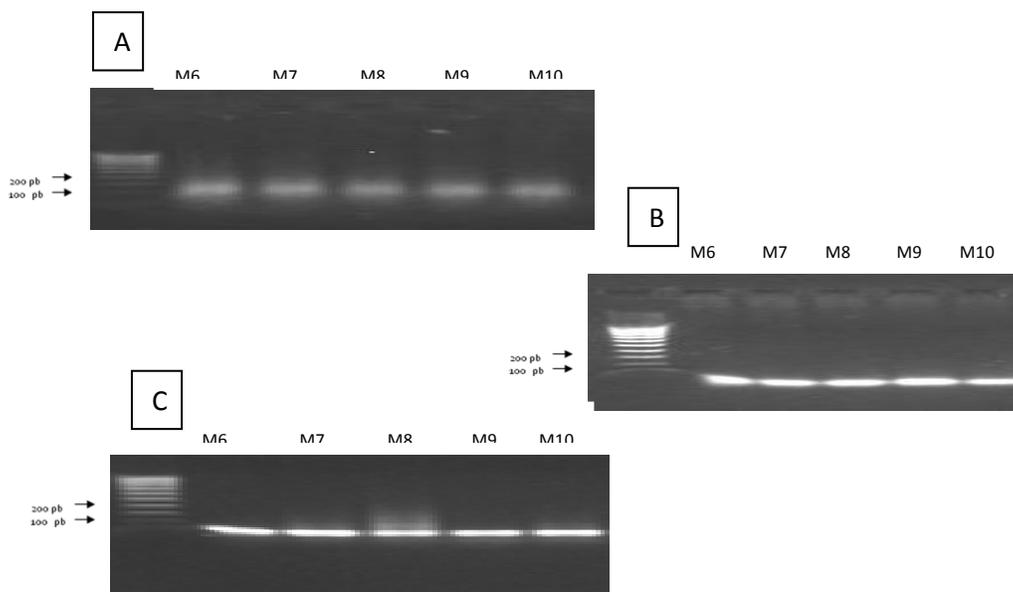


Figura 2. Geles representativos de la electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del gen de β Globina de 110pb (M= Numero de muestra). A. Muestras con resultados débiles en el momento de la amplificación. B. Muestras restauradas con la enzima Klenow C. Muestras restauradas con la enzima Klenow mas ligasa

De las 20 muestras restauradas bajo los dos métodos, 16 amplificaron para beta-globina después de ser sometidas al proceso de restauración con Klenow sola, y 12 amplificaron con la adición de ligasa. Aparentemente sólo se podían detectar algunas diferencias en la intensidad de algunas de las bandas de los amplímeros para algunas de las muestras en estudio.

Tabla 3. Resultados de la Amplificación del gen β -globina de las muestras bajo PCR convencional después de haber realizado cada uno de los dos métodos de restauración de ADN.

Muestra No.	Resultado de PCR convencional		
	Sin restauración	Klenow	Kleno + Ligasa
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Débil	Positivo	Negativo
3	Negativo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Positivo	Negativo
6	Débil	Positivo	Positivo
7	Débil	Positivo	Positivo
8	Negativo	Positivo	Positivo
9	Débil	Positivo	Positivo
10	Débil	Positivo	Positivo
70	Negativo	Positivo	Positivo
71	Débil	Negativo	Positivo
72	Negativo	Negativo	Positivo
73	Débil	Negativo	Positivo
74	Negativo	Positivo	Negativo
75	Débil	Positivo	Negativo
76	Débil	Positivo	Negativo
78	Débil	Positivo	Negativo
79	Débil	Positivo	Positivo
Total	0	16	12

Detección de VPH en muestras restauradas

Después del procedimiento de restauración, las muestras fueron evaluadas con los primers GP5/GP6 usados frecuentemente para amplificación en la detección del Papilloma humano.

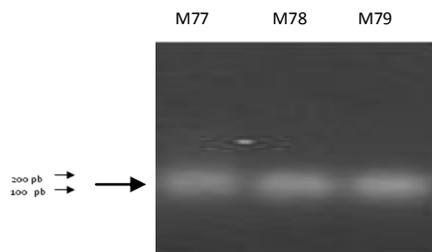


Figura 3. Gel Representativo de la electroforesis de muestras de plasma evaluadas bajo los primers GP5/GP6.

Dentro del análisis de las 20 muestras evaluadas, que luego del periodo de almacenamiento daban todas negativo para VPH, se encontró que 4 de ellas eran positivas luego de ser sometidas al proceso de restauración por klenow y 3 luego del proceso por klenow mas ligasa.

Tabla 4. Resultados de la Amplificación por PCR convencional con los primers GP5/GP6 para detección del VPH antes y después del proceso de restauración.

Muestra No.	Evaluación de VPH		
	Sin restauración	Kenow	Kleno + Ligasa
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo

8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo	Negativo
71	Negativo	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	Negativo
73	Positivo	Positivo	Negativo
74	Negativo	Negativo	Negativo
75	Negativo	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	Negativo
77	Positivo	Positivo	Positivo
78	Positivo	Positivo	Positivo
79	Positivo	Positivo	Positivo
Total	0	4	3

7.1 PCR en tiempo real

Para determinar cuánto mejoró la calidad del ADN, se cuantificó mediante PCR en tiempo real, la cantidad de ADN presente en cantidades equivalentes de ADN aisladas, sometidas y no sometidas a los procesos de restauración. Los tratamientos comparados fueron tres, muestras sin restaurar, muestras restauradas con klenow y muestras restauradas con klenow mas ligasa.

Para PCR en tiempo real se realizó una cuantificación absoluta tomando como referencia una curva estándar de concentraciones conocidas, la cual arrojó un $R^2=0.992$ (Figura 6).

7.1.1 Estandarización de la curva para PCR en tiempo real

Con el fin de obtener valores de referencia de concentraciones conocidas para ser comparadas con muestras desconocidas se hicieron ensayos con diluciones de ADN linfocitario patrón (1,5ng/μL)

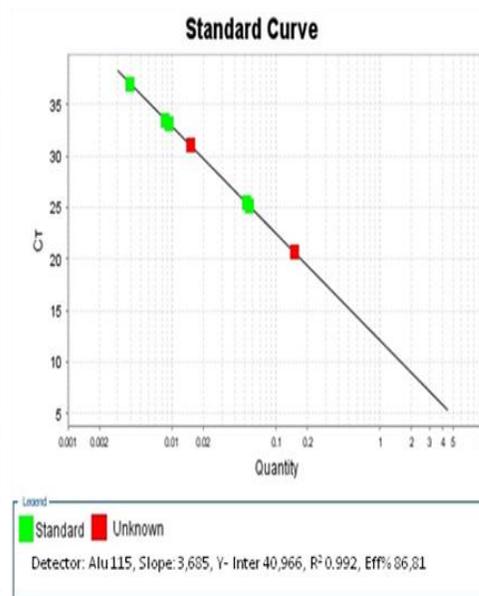
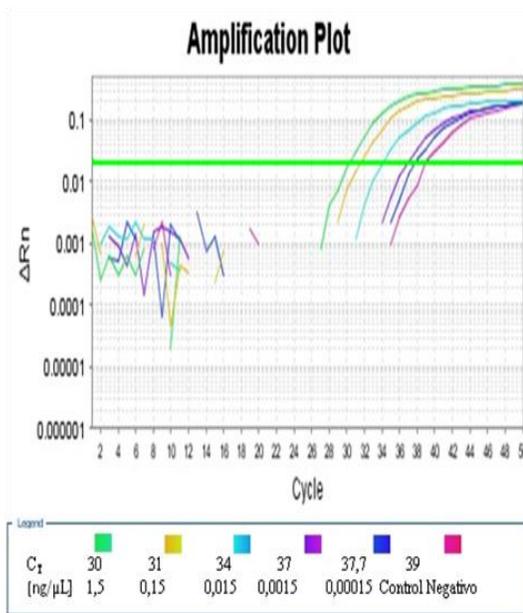


Figura 5. Curva estándar de PCR en tiempo real de ADN linfocitario

Figura 6. Regresión Lineal de la curva estándar. Ct vs cantidad de ADN para ALU 115

La curva estándar por PCR en tiempo real presentada en las figuras 5 y 6 indican que a menor Ct mayor concentración de ADN, donde el valor de Ct es la intersección entre la curva de amplificación y la línea base. Entre mayor sea el valor Ct menor es la concentración final de ADN.

El equipo mostro datos en los cuales se dan valores de C_T y de las moléculas del gen ALU que amplificó el fragmentos de 115pb. El análisis cuantitativo arrojó diferentes

concentraciones de ADN para las muestras restauradas y sin restaurar; a continuación se muestran los datos.

Tabla 5. Resultados cuantitativos arrojados el equipo SYBR® Green. PCR en tiempo real.

Muestra	Tratamiento	CT	Cantidad
1	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	0	0
	Klenow+Ligasa	0	0
2	Sin Restaurar	45,22096634	3,98962E-05
	Klenow	35,16214371	0,03145143
	Klenow+Ligasa	0	0
3	Sin Restaurar	38,23661423	0,004095092
	Klenow	34,50687027	0,04856731
	Klenow+Ligasa	0	0
4	Sin Restaurar	34,30331802	0,055585615
	Klenow	32,63724518	0,167784959
	Klenow+Ligasa	0	0
5	Sin Restaurar	35,26015472	0,0294724
	Klenow	31,63243866	0,326673687
	Klenow+Ligasa	34,9127655	0,037106976
6	Sin Restaurar	32,46191406	0,188470915
	Klenow	30,65661621	0,623919427
	Klenow+Ligasa	37,68787384	0,005892347
7	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	31,37300873	0,387993068
	Klenow+Ligasa	34,27782822	0,056533113
8	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	30,55888176	0,665692687
	Klenow+Ligasa	34,39616013	0,052266814
9	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	30,84440041	0,550872386
	Klenow+Ligasa	39,0616951	0,002369515
10	Sin Restaurar	41,57761002	0,000446821
	Klenow	29,52074051	1,32505703
	Klenow+Ligasa	34,39616013	0,052266814

	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	47,20853806	1,06796E-05
70	Klenow+Ligasa	30,69268227	0,609175384
	Sin Restaurar	37,1432457	0,008455293
	Klenow	43,28198624	0,000144315
71	Klenow+Ligasa	31,44896507	0,368935376
	Sin Restaurar	34,26861572	0,056879513
	Klenow	49,43559265	2,43902E-06
72	Klenow+Ligasa	30,83335876	0,554920435
	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	33,76846695	0,079247795
73	Klenow+Ligasa	48,9741478	3,31208E-06
	Sin Restaurar	47,35787964	9,67274E-06
	Klenow	32,79567719	0,151052609
74	Klenow+Ligasa	45,47408295	3,37318E-05
	Sin Restaurar	32,81679153	0,148952499
	Klenow	31,73211288	0,305780828
75	Klenow+Ligasa	46,9496994	1,26793E-05
	Sin Restaurar	32,46191406	0,188470915
	Klenow	31,68564606	0,315349132
76	Klenow+Ligasa	46,9496994	1,26793E-05
	Sin Restaurar	30,84440041	0,550872386
	Klenow	30,0714283	0,919706285
77	Klenow+Ligasa	33,85677719	0,074740477
	Sin Restaurar	39,20654678	0,002152512
	Klenow	29,04667282	1,814492345
78	Klenow+Ligasa	36,86327744	0,010180124
	Sin Restaurar	0	0
	Klenow	30,55888176	0,665692687
79	Klenow+Ligasa	32,52200317	0,181109011

Se realizo una comparación entre la totalidad de las muestras que se encontraron dentro de los rangos de C_t arrojados por la curva estándar comparado con la cantidad de ADN para observar la mejora de la calidad

Tabla 6. Comparación de los resultados de la restauración a partir de la amplificación por PCR en tiempo real. 0 indica que no se encuentra en los rangos de Ct y 1 indica que si lo presento.

Muestra	Dentro del Rango (30>Ct<37,7)			Cual es mejor (Menor Ct y Mayor Cantidad)		
	Sin restaurar	Klenow	Klenow+Ligasa	Sin restaurar	Klenow	Klenow+Ligasa
2	0	1	0	0	1	0
3	0	1	0	0	1	0
4	1	1	0	0	1	0
5	1	1	1	0	1	0
6	1	1	1	0	1	0
7	0	1	1	0	1	0
8	0	1	1	0	1	0
9	0	1	0	0	1	0
10	0	0	1	0	0	1
70	0	0	1	0	0	1
71	1	0	1	0	0	1
72	1	0	1	0	0	1
73	0	1	0	0	1	0
74	0	1	0	0	1	0
75	1	1	0	0	1	0
76	1	1	0	0	1	0
77	1	1	1	1	0	0
78	0	1	1	0	1	0
79	0	0	1	0	0	1
Total	8	14	11	1	13	5
%	42,1%	73,7%	57,9%	5,3%	68,4%	26,3%

7.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleo la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon de rangos signados. Aplicando esta prueba el valor t fue de -1,88 concluyendo que hay diferencias significativas entre los dos métodos

Estos datos se analizaron utilizando el método no paramétrico de Wilcoxon, para el cual se restó la cantidad de ADN obtenido en el método Klenow (método A) del obtenido en el método Klenow+Ligaza (método B) para cada muestra. Luego, definimos como parámetro de referencia una media $\mu_0 = 0$ para el resultado de la muestra, según la cual compararemos los métodos.

Se definieron dos hipótesis a comprobar:

- a) $\mu = \mu_0$ - Esto significaría que los dos métodos no son significativamente diferentes, por lo que aplicar uno u otro para mejorar la calidad del ADN sería irrelevante.
- b) $\mu \geq \mu_0$ - Lo cual significaría, una vez descartada la anterior, que por el método B obtenemos una cantidad de ADN significativamente mayor que por el método A, por lo cual podríamos decir que es mejor para realizar restauración de ADN.

Se analizaron los datos siguiendo la metodología de prueba para lo cual se tomaron los valores absolutos de la diferencia entre el valor de la observación (el resultado de la resta B-A) y la media hipotética μ_0 para luego ordenarlos de mayor a menor y asignarles una jerarquía de 1 a 16 que luego se complementó con el signo de la observación correspondiente. Luego se definieron las sumas de las jerarquías t_+ correspondientes a todas las observaciones cuyo valor es mayor al de μ_0 y la suma de las jerarquías t_- correspondientes a todas las observaciones cuyo valor es mayor al de μ_0 . El resultado se observa en la tabla 6.

Tabla 7. Datos del análisis estadístico de Wilcoxon.

Muestra	Cantidades (ng/μl)				[Jerarquia]	Jerarquia	T-	T+
	A	B	(B-A)	[(B-A)-μ0]				
	Klenow	Klenow + Ligaza						
5	0,32667369	0,03710698	-0,28956671	0,28956671	5	-5	5	0
6	0,62391943	0,00589235	-0,61802708	0,61802708	13	-13	13	0
7	0,38799307	0,05653311	-0,33145995	0,33145995	7	-7	7	0
8	0,66569269	0,05226681	-0,61342587	0,61342587	12	-12	12	0
9	0,55087239	0,00236951	-0,54850287	0,54850287	9	-9	9	0
10	1,32505703	0,05226681	-1,27279022	1,27279022	15	-15	15	0
70	1,068E-05	0,60917538	-0,6091647	0,6091647	11	11	0	11
71	0,00014432	0,36893538	0,36879106	0,36879106	8	8	0	8
72	2,439E-06	0,55492043	0,554918	0,554918	10	10	0	10
73	0,0792478	3,3121E-06	-0,07924448	0,07924448	2	-2	2	0
74	0,0792478	3,3732E-05	-0,07921406	0,07921406	1	-1	1	0
75	0,15105261	1,2679E-05	-0,15103993	0,15103993	3	-3	3	0
76	0,30578083	1,2679E-05	-0,30576815	0,30576815	6	-6	6	0
77	0,31534913	0,07474048	-0,24060865	0,24060865	4	-4	4	0
78	0,91970628	0,01018012	-0,90952616	0,90952616	14	-14	14	0
79	1,81449234	0,18110901	-1,63338333	1,63338333	16	-16	16	0
					Suma T	107	29	

Teniendo como número de muestras $N = 16$, se validaron las hipótesis bajo un nivel de significancia $\alpha=0,05$ ingresando a las tablas de de niveles de probabilidad buscando un $P = \alpha/2=0,025$ que para el caso de $N=16$ se acerca más a $P =0,02533$ con un $T = 30$.

- a) Por tratarse de una hipótesis alternativa bilateral, tomamos como estadística de prueba T_+ por ser el menor, y sabemos que si es menor que T rechazamos la hipótesis. Como $T_+=29 < 30=T$ podemos decir con un nivel de significación de 0,05 que los dos métodos arrojan resultados diferentes y por lo tanto la decisión sobre utilizar uno u otro no es irrelevante. Sin embargo, es importante anotar que es un resultado muy estrecho, y que con un nivel de significancia de 0,04, los métodos nos serian diferentes.
- b) Como ya se comprobó que son diferentes, se validó la segunda hipótesis alternativa unilateral, para la cual tomamos como estadística de prueba T_+ ya que un valor suficientemente pequeño de este indicaría que no se cumple la hipótesis. Como en la validación anterior, rechazamos la hipótesis y podemos

decir con un nivel de significancia de 0,05 que el método A, Klenow es mejor que el método B, Klenow + Ligaza.

Para esta prueba no se encontraron datos de estudios anteriores de cuantificación de resultados del proceso de restauración.

8. DISCUSIÓN

Siguiendo el método descrito de restauración de ADN en plasma sanguíneo, se logró obtener una buena definición sobre la amplificación de las muestras, respecto a las muestras que no presentaron una buena calidad de amplificación en el momento de la evaluación por PCR convencional. Este resultado es acorde con el trabajo de Arias y colaboradores 2007, donde realizaron estudios con muestras almacenadas de ADN de plasma sanguíneo de pacientes con cáncer de pulmón y pacientes con cáncer de seno.

El procedimiento permitió una mejora en la eficiencia de la amplificación en la detección de un gen -b-globina- de única copia en PCR convencional, con los métodos de restauración de ADN bajo las enzimas Taq polimerasa Klenow y Klenow más ligasa. En la figura 2 se contrasta la amplificación en los dos momentos: antes y después de ser restauradas mostrando el cambio en la acentuación de las bandas.

La mejora en la calidad de ADN empleando las dos enzimas Klenow y la Klenow más ligasa comprueba que la aplicación de taq polimerasa, sobre las reacciones empleadas en el proceso de mejora del ADN, restaura los "nicks" después de la rehibridización de ADN, usando la otra cadena como molde. Debido a la posición aleatoria de los "nicks", la reconstrucción de fragmentos de secuencias largas es suficiente para que se obtenga una buena amplificación (Bonin et al. 2003)

Las enzimas que fueron aplicadas a las muestras para los procesos de restauración no presentaron mayores diferencias en el momento de la evaluación de la calidad de ADN mediante el proceso de PCR convencional, donde las bandas observadas presentaban una intensidad muy similar en el momento de la amplificación, lo que indicó que las dos son eficientes para el proceso, aunque se obtuvo menor eficacia en el proceso por klenow mas ligasa. Sin embargo, en el momento de obtener los resultados de cuantificación por PCR en tiempo real se pudo observar la diferencia entre los dos métodos.

En la evaluación de las muestras para la detección de VPH (Posterior al proceso de restauración), con la electroforesis se corroboraron resultados positivos para las 4 muestras de las 20 evaluadas, que fueron las mismas que presentaron resultados positivos en el proceso de detección. Las muestras positivas fueron las numero 73,77,78 y 79 indicando la presencia del virus bajo los primers GP5/GP6. Lo anterior muestra que el proceso de restauración no afectaría las muestras negativamente, en este caso, para el proceso de detección del virus; pero cabe notar que no se presentaron muestras nuevas con detección del virus. Lo que nos indicaría que el proceso de restauración no arroja resultados positivos en el momento de hacer detección del virus.

La técnica de evaluación de calidad por PCR convencional con β -globina es una técnica que puede mostrar resultados cualitativos, pero para determinar cuánto mejoró la calidad del ADN sometido a un proceso de restauración se empleo la técnica de PCR en tiempo real, la cual fue más sensible y arrojó datos más precisos del proceso; además, dado que se partió de cantidades equivalentes, se puede comparar el cambio que se detectó en las cantidades de ADN medidas en las muestras sin restaurar frente a la medida en las muestras pareadas que fueron restauradas–Tabla 5-. El sistema de

PCR en tiempo real proporciona mayor sensibilidad y robustez, con la posibilidad añadida de cuantificar la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los dos métodos de restauración, aceptando la hipótesis planteada donde existen diferencias significativas en la mejora de la calidad del ADN tratado, entre los métodos de restauración: Taq polimerasa Klenow y el método con taq polimerasa Klenow mas ligasa en muestras de plasma sanguíneo.

Los datos de C_t mostraron que la enzima Klenow fue aparentemente más efectiva (cantidad de muestras restauradas) y eficiente (cantidad de ADN restaurado en cada muestra) que la Klenow mas ligasa (Tabla 7), esto último corroborado además por el análisis estadístico de las cantidades de ADN obtenidas; sin embargo, se esperaban resultados contrarios, ya que la kenow mas ligasa presenta mayor eficiencia por la acción catalizadora de la ligasa entre las moléculas de ADN y por su alta eficiencia de ligación de ADN. Posiblemente la poca efectividad de la enzima Klenow mas ligasa podría deberse a que un exceso de la cantidad de la ligasa que disminuye la efectividad del proceso de amplificación por PCR en tiempo real, lo que explicaría además que para amplificación por PCR convencional la diferencia no sea tan evidente (tabla 3). Otra posible razón podría atribuirse a que la ligasa tenga una acción representativa sobre el mejoramiento del proceso de restauración, únicamente para fragmentos mayores al fragmento de 115 pb evaluado.

La línea base en la curva estándar se ubicó sobre la concentración 0.01ng/ul y el primer ciclo empezó a amplificar en un C_t de 30 y una dilusion de 1,5 ng /ul y en un

C_t final de 37,7; Es importante considerar que un valor C_t superior o menor a los ciclos indicados en la curva estándar muestra datos indeterminados, lo cual ocurrió en varias de las muestras.

El porcentaje de muestras que amplificó para el rango establecido con la enzima klenow fue del 73,3% sobre el total de las muestras, deduciendo que hubo una acción representativa de la enzima sobre el ADN. El porcentaje de amplificación dentro del rango establecido para klenow mas ligasa fue de 57,9% lo cual nos indica que su acción restauradora sobre el ADN fue mucho menor, además, la eficiencia de la enzima klenow fue mucho mayor ya que en el 68,4% de las muestras se obtuvo una mayor cantidad de ADN restaurado que con la enzima klenow mas ligasa.

Comparando las muestras antes del proceso de restauración y posterior a la restauración, se observa claramente que aumentaron sus niveles de ADN por las disminuciones en los valores de los C_T arrojadas por el equipo, pero con los porcentajes anteriores podemos reafirmar que una fue más eficiente sobre el proceso que la otra.

Los datos muestran que en la mayoría de muestras sin restaurar el valor de C_t es mayor y en las muestras restauradas con los métodos el C_t es mucho menor, confirmando que C_t es inversamente proporcional a la cantidad de ADN, lo que es claro en la tabla 3. Lo anterior es un indicador de que la técnica es válida a muestras de plasma almacenadas por un amplio periodo de tiempo y con presencia de daños en el ADN pero es conveniente señalar que las técnicas no arrojaron resultados completamente definitivos ya que hubo muchos resultados indeterminados lo que puede indicar una baja consistencia en el proceso.

Para los métodos de restauración de ADN en plasma sanguíneo con las enzimas klenow y klenow más ligasa no se encontraron estudios de amplia divulgación en la literatura consultada, que fuera coincidente con esta prueba. La novedad del presente estudio es la evaluación cuantitativa del proceso por PCR en tiempo real, ya que tampoco se encontraron estudios de restauración de ADN analizados bajo este procedimiento.

9. Conclusiones

- Las enzimas ADN polimerasa de E. Coli, Klenow y la ADN polimerasa de E. Coli Klenow mas ADN ligasa pueden mejorar la calidad de las molécula de ADN que presenten daños en la estructura.
- Se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos de restauración evaluados, klenow y klenow mas ligasa.
- El proceso de restauración de ADN no mejora la detección para el virus del VPH
- La PCR en tiempo real favoreció obtener resultados más claros sobre la comparación entre los dos métodos de restauración, ya que en PCR convencional las diferencias entre los métodos no se hicieron notar significativamente, sin embargo es importante estudiar más a fondo el efecto de las enzimas usadas en la restauración sobre el proceso de amplificación por PCR en tiempo real, ya que este pudo ser una de las causas de la inconsistencia de los datos (baja efectividad del proceso con Klenow mas ligasa).

10. Recomendaciones

- Sería aconsejable ampliar el número de muestras e intentar trabajar con diferentes poblaciones, para ratificar que el proceso es efectivo sobre varios tipos de muestras.
- Es importante hacer ensayos con otros tipos de enzimas taq polimerasa de E-coli para que el proceso de restauración tenga una efectividad de un 100% sobre la totalidad de las muestras.
- Se recomienda evaluar la enzima klenow mas ligasa en fragmentos de ADN más grandes para descartar o corroborar que la enzima no es eficiente en el proceso de restauración para 115pb.
- Se recomienda también evaluar la incidencia de la ligasa en el proceso de amplificación por PCR en tiempo real para aclarar su efecto sobre los resultados obtenidos.

11. Referencias

- Arias Y., Carillo E., and Aristizábal F. 2007. Plasma ADN Restoration por PCR Applications. *J Clin Pathol.* 60:952-954.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M, 1999. Detection of circulating tumour ADN in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 65–73.
- Ault KA, 2006. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006 Suppl:40470
- Bonin S., Petrera F., Niccolini B., Stanta G. 2003. PCR Analysis in Archival Postmortem Tissue. *Journal Clinical Pathology: Mol Pathol.* 56:184-186.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC Cancer Base No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon; 2004.
- Fournie G, Courtin J, Laval F, et al. 1995. Plasma ADN as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 91: 221-7
- Graflund M, Sorbe B, Hussein A, Bryne M, Karlsson M. 2002. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 12:32-41.

- Johung K, Goodwin EC, DiMaio D. 2007. Human Papillomavirus E7 Repression in Cervical Carcinoma Cells Initiates a Transcriptional Cascade Driven by the Retinoblastoma Family, Resulting in Senescence. *J Virol.* 81: 2102 - 16.
- Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. 2003. Changes in concentration of ADN in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem.* 49:1028-9.
- Longworth MS, Laimins LA. 2004. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:362–72.
- Marshall K. 2003. Cervical dysplasia: Early intervention. *Altern Med Rev.* 8:156-170.
- Mitchell David, Willerslev Eske, Hansen Anders. 2005. Demage and Repair of Ancient ADN. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutation Research.* 571:265-276
- Mutirangura A. 2001. Serum/plasma viral ADN: mechanisms and diagnostic applications to nasopharyngeal and cervical carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 945:59-67.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. 2007. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* Jul 23 en publicación
- Paabo S. 1989. AncientADN: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:939–1943.
- Piñeros M, Ferlay J, Murillo R. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia INC. IARC Ministerio de protección social, 2005.

- Pusch Carsten, Giddings Ian and Scholz Michael. 1998. Repair of Degraded Duplex ADN from Prehistoric Samples Using Escherichia coli ADN polymerase I and T4 ADN ligase. *Nucleic Acids Research*. 26:3:857-859.
- Sambrook and Russell (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. (Sambrook and Russell cites the paper: Glasel J. (1995). "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios". *BioTechniques* 18: 62–63.)
- Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Guillaud M, Follen M, Chen Z, Dillon LM, Adler-Storthz K. 2005. Correlation of Human Papillomavirus Type 16 and Human Papillomavirus Type 18 E7 Messenger RNA Levels with Degree of Cervical Dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14:1948–52.
- Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. 2007. The Human Papillomavirus E6 Oncogene Dysregulates the Cell Cycle and Contributes to Cervical Carcinogenesis through Two Independent Activities. *Cancer Res*. 67: 1626 – 35.
- Southern SA, Herrington CS. 1998. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Inf*. 74:101–9.
- Tong YK, Lo YMD. 2006. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta*. 363:187-96.
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ. 2006. Increased Integrity of Free Circulating ADN in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin Chem*. 52:1062-9.

- Widschwendter A, Blassnig A, Wiedemair A, Muller-Holzner E, Muller HM, Marth C. 2003. Human papillomavirus ADN in sera of cervical cancer patients as tumor marker. *Cancer Lett.* 202:231-9.
- Wiley D, Masongsong E. 2006. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv.* 61:S3-14.
- Woodman CB, Collins SI, Young LS. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.*7:11-22.
- Zheng ZM, Baker CC. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286-302.
- Zong X, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. 2007. Is the quantity of circulatory cell-free ADN in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations?. *Ann Hematol* 86:139–143
- Zuna RE, Wang SS, Schiffman M, Solomon D. 2006. Comparison of human papillomavirus distribution in cytologic subgroups of low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer.* 108:288-97.
- “Concepts and Applications of Inferential Statistics”, Richard Lowry, Vassar College, 1999.