

**Universidad ORT Uruguay**  
**Facultad de Ingeniería**

**Pasantía Laboral en el Laboratorio de Diagnóstico  
Molecular ATGen-Diagnóstica**

**Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en  
Biotecnología**

**Natalie Berkovich - 165806**  
**Tutor: Carlos Sanguinetti**

**2014**

## **Declaración de autoría**

Montevideo 30 de abril de 2014.

Yo, Natalie Berkovich, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realicé la pasantía para obtener el título de Licenciatura en Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay;
- Cuando consulte el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando cité obra de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicado previamente a su entrega; excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in black ink that reads "Natalie Berkovich". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Natalie Berkovich

165806

## **Dedicatoria**

Al finalizar mi carrera profesional he logrado uno de mis objetivos en mi vida y quiero darles las gracias de manera especial a las personas que me apoyaron superando todos los obstáculos para lograrlo, con todo respeto y amor dedico este triunfo:

A mi hermana Verónica Berkovich, por estar siempre a mi lado, brindándome todo su amor, entrega y dedicación. Ella ha sido y será un gran pilar en mi vida, transmitiéndome día a día la inspiración y la pasión con la que cada uno debe hacer las cosas que desea.

A mis padres que hicieron toda en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega.

A mis hermanos Claudia Berkovich y Eduardo Berkovich, por su constante amor inexplicable, porque siempre me han apoyado incondicionalmente.

A mis hermanas del alma, mis amigas, mis cómplices, porque gran parte de lo que soy, se lo debo a ellas. Porque mi vida no sería lo mismo, ustedes me traen felicidad, paz, amor, diversión y apoyo incondicional.

Al Coordinador Académico de la Carrera, Carlos Sanguinetti, porque puso en mi camino esta nueva pasión. Agradecerles a él y a la Universidad ORT Uruguay que me brindaron una beca completa para poder cursar esta hermosa carrera.

A mis compañeras y amigas que me apoyaron durante estos cuatro años y que pasan a formar parte del resto de mi vida.

A la empresa Celsius quien me abrió las puertas para poder realizar mi pasantía laboral en el laboratorio ATGen-Diagnóstica. A la Directora Técnica Sofía Tedesco, porque confió en mí integrándome en su grupo de trabajo. A todos mis compañeros/as a los cuales les agradezco infinitamente todo lo que me han enseñado y apoyado.

Gracias a todos, porque sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir tantos momentos.

## **Abstract**

El presente trabajo trata de una pasantía laboral en el laboratorio de diagnóstico molecular ATGen-Diagnóstica realizada durante el 1 de agosto de 2013 hasta el 31 de diciembre del 2013.

ATGen es una empresa biotecnológica dedicada a proveer soluciones para el cuidado de la salud humana.

La empresa desarrolla, produce y comercializa kits de diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, así como desórdenes genéticos y factores de predisposición a enfermedades cardiovasculares, de coagulación, inflamatorias, etc. Estos kits están dirigidos a laboratorios clínicos.

Además cuenta con un Laboratorio de Análisis Clínicos basado en técnicas moleculares.

El trabajo recopila información de la aplicación de la biología molecular en la salud humana, seguido de un estudio de mercado del diagnóstico molecular en el Mundo y en Uruguay, orientado a agentes infecciosos (virus de inmunodeficiencia humano, virus de la hepatitis B y familia de herpes virus) y genética molecular (predisposición, farmacogenómica y cáncer).

Continúa con una descripción empresarial, tecnológica y la metodología utilizada por la empresa para llevar a cabo sus objetivos.

El alcance de la pasantía es el entrenamiento técnico en la prestación de servicios de diagnóstico molecular en salud humana y las principales tareas realizadas fueron:

- recepción;
- verificación e ingreso de las muestras;
- procesamientos de las muestras;
- informe de resultados;
- y toda otra tarea inherente al cargo de técnico de servicios.



## **Palabras Claves**

Biología Molecular, Diagnóstico Molecular, Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, PCR en tiempo real, Real Time PCR.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	10
1.1 Biología Molecular Aplicada a la Salud Humana .....	10
1.2 El Mercado del Diagnóstico Molecular.....	12
1.2.1 Agentes Infecciosos.....	12
1.2.2 Genética Molecular .....	13
1.2.3 Farmacogenómica .....	14
1.2.4 Cáncer.....	15
1.3 En Uruguay .....	16
<b>2. Objetivo</b> .....	20
<b>3. ATGen-Diagnóstica</b> .....	21
3.1 Antecedentes de la Empresa .....	21
3.2 Foco de Negocios de la Empresa:.....	21
3.3 Perfil Empresarial.....	23
3.4 Descripción del Laboratorio.....	23
3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26
3.5.1 Fundamento .....	27
3.5.2 PCR en Tiempo Real .....	29
<b>4. Metodología</b> .....	36
4.1 Metodología para el tratamiento de una muestra: .....	36
4.1.1 Recepción de la muestra: .....	36
4.1.2 Aislamiento de ADN/ARN: .....	37
4.1.3 Amplificación:.....	38
4.1.4 Procedimientos técnicos de aseguramiento de calidad de los resultados obtenidos.....	39
4.1.5 Realización de un informe:.....	43
4.2 Descripción metodológica de los diferentes diagnósticos. ....	43
4.2.1 Estudios de Predisposición.....	44
4.2.2 Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas.....	54
<b>5. Alcance de la Pasantía</b> .....	63
<b>6. Resultados Obtenidos</b> .....	64
<b>7. Discusión</b> .....	65

<b>8. Análisis Económico</b> .....	66
<b>Conclusiones</b> .....	68
<b>9. Bibliografía</b> .....	69

# 1. Introducción

## 1.1 Biología Molecular Aplicada a la Salud Humana

La biología molecular se ha convertido en una herramienta fundamental para el diagnóstico clínico; esta disciplina ha tenido y tendrá un gran impacto en la medicina genómica, la farmacogenómica y el diagnóstico molecular. La biología molecular se encarga del estudio de la biología a nivel molecular; relaciona las estructuras de las biomoléculas con las funciones que desempeñan en la célula y el organismo. En la jerga científica la biología molecular se relaciona con el estudio de los ácidos nucleicos (ADN ácido desoxirribonucleico y ARN ácido ribonucleico).

La concepción anterior sitúa los inicios de esta disciplina en 1953, con la publicación del modelo de la doble hélice de la molécula de ADN por parte de James Watson y Francis Crick (1,2).

Recién en el siglo XX son reconocidos los trabajos de Gregor Mendel publicados en 1866 (3), los cuales fueron el pilar del nacimiento de la genética moderna. Mendel había determinado patrones hereditarios utilizando el color de los guisantes, y aplicando sobre ello simples reglas aritméticas. Anteriormente a estos trabajos ya se intuía la existencia de ciertas partículas que influían en las generaciones futuras por su forma y organización (4). La combinación de los hallazgos de estos trabajos pusieron en evidencia los mecanismos que intervienen en las características observables de los seres vivos, en otras palabras el fenotipo (lo que vemos de un ser vivo). El problema estaba en que biólogos y genetistas defendían que los genes tenían que ser proteínas, y es en 1944 cuando se produce el verdadero salto, con la publicación del trabajo de Avery, MacLeod y McCarty (5), quienes afirmaron que el “principio transformante” causante de la transformación bacteriana es el ADN y no las proteínas, lo que afirma que es el ADN el material hereditario. Todos estos nuevos conceptos llevan a físicos y químicos a pensar diferente; encaminando a la biología molecular a comprender los mecanismos por los cuales el ADN codifica y dirige la expresión de proteínas en cantidades y en tipos celulares apropiados, en otras palabras fueron la base conceptual de cómo el ADN dirige la expresión de una función.

El ADN humano consiste en un par de cadenas de nucleótidos unidas por enlaces de hidrógeno, formando una doble hélice. Esta molécula está compuesta por 3000 megabases ( $3 \times 10^9$  bases) (1, 6, 7). En un individuo adulto todo el ADN de todas sus células abarca una distancia de  $2 \times 10^{13}$  metros (3, 6), lo que significa que podríamos ir a la Luna y volver colocando el ADN total uno a continuación del otro. La madeja resultaba muy larga y muy fina para entender la información que sólo estaba en el

interior de un ancho de 2,3 nm (1, 7). Esta molécula se encuentra superenrollada y ocupa un pequeño espacio en el núcleo de cada una de las células que forman el cuerpo humano.

Salteando años de aprendizaje en 1983 (8) se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) por el Dr. Kary Mullis, revolucionando la investigación biológica y médica, la cual le valió el Premio Nobel de Química en 1993 (9). La PCR es considerada una de las técnicas más revolucionarias del siglo XX, siendo un paso importante para el avance de la biología molecular y el diagnóstico genético. Las aplicaciones abarcan un amplio espectro desde la medicina hasta la agricultura y la ganadería. En el campo de la medicina, La PCR es realmente útil en la detección de enfermedades de origen genético, en el campo de la microbiología para la identificación de agentes infecciosos, así como el diagnóstico de enfermedades virales, además ha sido una técnica de gran impacto en la medicina forense. La PCR no sólo permite estudiar organismos vivos, sino que también sus restos fósiles o congelados (6).

Nuevamente saltando años de aprendizaje basados en la PCR y los hallazgos de Sanger en el año 1977 (secuenciación por di deoxi) (8) nuevamente otro gran impacto en el sector fue el “Proyecto Genoma Humano” (PGH). Este proyecto comienza en 1990 y finaliza en 1998 (10). El PGH empieza en Estados Unidos con la organización del Instituto Nacional de Salud (NIH) y el Departamento de Energía, y con la participación de otros países como el Reino Unido, Francia, Japón, China, Italia y Alemania. El gran impacto de este proyecto no fue solo por el resultado frío que establece la secuencia de bases del ADN que contienen los cromosomas humanos y logra construir un mapa de los 30 a 40 mil genes determinando el orden preciso de los aproximadamente 3.200 millones de nucleótidos del genoma humano (genotipo), sino por las expectativas de comenzar a conocer ciertamente la relación fenotipo - genotipo. Con el PGH queda claro que las diferencias en el ADN de algunos individuos coincidían con el desarrollo de patologías agudas o crónicas.

A partir de ese momento estratégicamente dos líneas de investigación se establecieron, por un lado las empresas privadas (Craig Venter a la cabeza (10)) a desarrollar tecnologías para acelerar el proceso de secuenciado y por otro, la academia a vincular alteraciones de secuencias del ADN con probabilidades de desarrollar patologías.

Gracias al PGH y las técnicas de amplificación de ADN la biología molecular instauró el diagnóstico molecular. El desarrollo de estas técnicas debería generar soluciones terapéuticas personalizadas. Actualmente se podría predecir qué población responderá a un nuevo tratamiento, dejando de lado el porcentaje de eficacia de una nueva conducta terapéutica. Todos estos avances le dan paso a la medicina

personalizada o a la medicina a medida, la cual está orientada hacia diagnósticos más precisos, estimaciones más confiables de padecer determinadas patologías y a orientar y ajustar los tratamientos según el perfil genético del paciente. Debido a todo esto, la industria farmacéutica se ve influenciada por los últimos avances de nuevas ciencias como la farmacogenómica, en donde se busca entender el funcionamiento genético para crear medicamentos personalizados con mayor eficacia y seguridad.

## **1.2 El Mercado del Diagnóstico Molecular**

### **1.2.1 Agentes Infecciosos**

Enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y otros parásitos son las principales causas de muerte, discapacidad, trastornos sociales y económicos para millones de personas. Alrededor de 14 y 17 millones de personas mueren por año debido a enfermedades infecciosas, en países en desarrollo (11). El desarrollo de nuevas herramientas en diagnóstico como la hibridación, secuenciación y la PCR, ha sido de gran utilidad, especialmente cuando los microorganismos son difíciles de cultivar, ya que permiten su identificación sin la necesidad de aislarlos y de mantenerlos vivos.

Las primeras pruebas de diagnóstico molecular que llegaron al mercado fueron las pruebas de enfermedades infecciosas, y es uno de los sectores con mayor crecimiento de la industria del diagnóstico in vitro. Hoy en día más del 80% de los diagnósticos moleculares en el mundo, son usados para enfermedades infecciosas (11). Las pruebas de carga viral se han convertido en estándar para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y las infecciones por citomegalovirus humanos (CMV). El mercado de diagnóstico en EE.UU en enfermedades infecciosas, obtuvo un ingreso de US\$3800 millones en el 2005 y mientras que en el 2012 tuvo un ingreso de US\$ 6400 millones. Esperando que el segmento crezca a una tasa anual de 7 a 8% en los próximos años (11). Lo cual es una excelente oportunidad de mercado para los competidores de diagnóstico molecular.

Hoy en día podemos encontrar al menos los siguientes diagnósticos moleculares para enfermedades infecciosas en el mercado mundial con valores sustantivos de facturación:

Virus:

- Citomegalovirus (CMV).

- Virus de Epstein-Barr (EBV),
- Virus de hepatitis C (HCV),
- Virus de hepatitis B (HBV),
- Virus herpes simplex 1 y 2 (HSV I/II),
- Virus de inmunodeficiencia humana (HIV),
- Virus del papiloma humano (HPV)
- Virus influenza.

#### Bacterias.

- *Bartonella henselae*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Legionella pneumoniae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Staphylococcus aureus MR*
- *Helicobacter pylori*
- *Salmonella spp.*

#### Hongos

- *Aspargillus spp/Candida spp*
- *Pneumocystis carinni*

### **1.2.2 Genética Molecular**

#### **Predisposición**

Cuando se producen variaciones en la secuencia de ADN, se pueden producir diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares entre individuos. En el genoma hay distintos tipos de polimorfismos; VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) y SNPs (single nucleotide polymorphism). El 90% de la diversidad fenotípica en el humano se explica por los SNPs. La medicina genómica se encarga del estudio de los polimorfismos y cuál es la asociación con las enfermedades humanas.

El mercado de estudios genéticos moleculares para trastornos hereditario es relativamente el más pequeño, en términos de ventas globales por fabricantes. Se estima que la venta de kits y reactivos para este segmento fue de US\$ 755 millones en todo el mundo en el 2011, y que continúa creciendo con una tasa anual del 10 %, estimándose para el 2016 una venta de US\$ 1,215 millones. Hay cientos de estudios diferentes para enfermedades genéticas, pero el número de personas que se realizan estos estudios son muy bajos, y muchos laboratorios realizan sólo algunos. Los estudios más comunes o los que se venden con mayor frecuencia son: el de La fibrosis quística, factor V Leiden y Factor II. En EE.UU la mayoría de los Kits utilizados para el diagnóstico de enfermedades hereditarias son los aprobados por la FDA (food and drug administration), mientras que algunos laboratorios de diagnóstico molecular continúan utilizando kits desarrollados por ellos. A pesar de esto, se estima que el mercado de EE.UU para estudios de genómica molecular es de aproximadamente US\$150 millones (12). Estudios sugieren que este ya es un mercado maduro y que continúa creciendo.

Algunas de las principales aplicaciones diagnósticas son:

- Hemocromatosis hereditaria (mutaciones H63D y C282Y);
- Genotipado de la apolipoproteína E (Apo E);
- Enzima Metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T y MTHFR A1298C));
- Hipercoagulabilidad (mutaciones en el factor V y II de la coagulación humana, de Leiden y 20210);
- Enfermedades inflamatorias (NOD2);

### **1.2.3 Farmacogenómica**

De los estudios de variabilidad genética se derivó la farmacogenómica, disciplina que evalúa la influencia de los polimorfismos genéticos en la respuesta a los fármacos. La mayoría de los fármacos actúan por medio de la interacción con proteínas tales como receptores, enzimas y proteínas de señalización intracelular. Estas proteínas presentan variaciones dentro de cada individuo determinadas por polimorfismos genéticos, que afectan la sensibilidad a los fármacos. En la actualidad, es posible conocer qué polimorfismos están asociados con la respuesta terapéutica a un medicamento concreto (13). En los últimos años se han introducido varios kits para estudios farmacogenéticos. El estudio más conocido en el mercado es el test para los polimorfismos presentes en el gen del citocromo P450. Este gen es el responsable de metabolizar una amplia gama de medicamentos comunes, como los antidepresivos, medicamentos para la ansiedad, medicamentos que contralan la hipertensión, el tamoxifeno para el cáncer de mama, etc. También es muy conocido el diagnóstico para el genotipo de la HLA-B57 el cual detecta la hipersensibilidad al abacavir, un medicamento para los tratamientos contra el HIV. La venta de kits farmacogenéticos

no fue el esperado, ya que muchas de estos diagnósticos no han sido adoptados de forma generalizada, esto se debe en parte a la falta de educación de los médicos y en parte debido a la falta de reembolso del seguro para algunas pruebas. Las compañías de seguro argumentan que se necesitan más datos clínicos antes de que puedan realizarse estas pruebas.

Se estima que la venta mundial de Kits para estudios de farmacogenómica aprobados es de menos de U\$S 20 millones en el 2011, y que en los próximos años el crecimiento no va a ser muy alentador (12).

Algunos de los estudios que podemos encontrar en el mercado hoy en día son:

- Transportador de serotonina.
- Receptor nicotínico  $\alpha$ -7 (CHRNA7).
- Canal de potasio (MiRP1)
- A-Aducina.
- N-acetiltransferasa 2.
- Receptor activado por proliferador del peroxizoma (PPAR $\gamma$ 2).
- ApoE (apolipoproteína E).
- Protrombina y Factor V.
- Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
- ECA (enzima convertidora de la angiotensina I).

#### **1.2.4 Cáncer**

El cáncer es considerado como una enfermedad genética, clasificándosele como un desorden somático acumulativo. Los genes involucrados son principalmente: oncogenes, genes supresores de tumor, genes reparadores del ADN y genes reguladores del ciclo celular. La determinación y caracterizar las mutaciones en estos genes, las convierte en marcadores moleculares que permiten hacer un diagnóstico precoz, guiar la terapia y determinar resistencia a tratamientos.

El segmento de los estudios moleculares para el cáncer es relativamente pequeño, sucede lo mismo que para el caso de los estudios de predisposición, ya que el número de personas que se realiza ese tipo de test para diagnóstico de cáncer es muy pequeño. En general las pruebas de diagnóstico molecular no son utilizadas con frecuencia, muchos del diagnóstico de cáncer se llevan a cabo utilizando técnicas clásicas de laboratorio (microscopia, tomografías, radiografía, etc). En el mercado hay al menos 25 ensayos disponibles, que utilizan técnicas de PCR y secuenciación. Algunos ejemplos de estos estudios son: leucemias y linfomas, JAK-2 (mutación

asociada al síndrome mieloproliferativo crónico), BRCA 1 y 2 (mutaciones asociadas al cáncer de mama), BCR-ABL (translocación del gen BCR del cromosoma 22 al 9) entre otros. A pesar de que la venta de kits de diagnóstico moleculares para cáncer es chico hoy en día, se espera que dentro de unos años, este segmento tenga un desarrollo mayor, ya que este tipos de estudios tiene un valor clínico muy alto.

Se estima que la venta mundial en el 2011 de kits y reactivos para test moleculares para el cáncer está en el rango de los U\$S 150 millones (12), esto incluye test de predisposición genética, diagnóstico, el pronóstico, la selección de la terapia y el seguimiento de la enfermedad.

### 1.3 En Uruguay

En Uruguay, las empresas privadas que se encargan del desarrollo de kits de diagnóstico molecular son muy pocas. La mayoría de estos trabajos se encuentran concertados en instituciones públicas y privadas de investigación, las cuales tienen escaso desarrollo a nivel empresarial. Algunas entidades encargadas de las actividades de investigación y desarrollo en el área de biología molecular son las facultades de Medicina, Química y Ciencias, de la Universidad de la República a través de sus Cátedras e Institutos especializados, como también el instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y el Polo Tecnológico en Pando el cual incorporó equipamiento científico de última generación. El Instituto Pasteur de Montevideo posee una serie de plataformas tecnológicas de última generación, mejorando las capacidades de desarrollar e innovar con un potencial interés comercial que nos acerca con la industria.

Dentro del mercado uruguayo existen algunas empresas que se encargan de brindar servicios de diagnóstico molecular. Varios de los laboratorios uruguayos ofrecen sus servicios con desarrollo *in house* (elaborados por ellos mismos). Otros se encargan de importar kits de empresas que hoy en día son reconocidas a nivel mundial y otros combinan ambas estrategias. En la siguiente tabla se destacan las empresas que brindan servicios de diagnóstico molecular aplicado a la salud humana en Uruguay. (Tabla 1).

**Tabla 1.** Oferentes de exámenes de biología molecular de uso clínico.

Servicio de Diagnóstico	Laboratorio
<b>Virus</b>	
Citomegalovirus	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM
Enterovirus	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM
Virus de Epstein-Barr	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM
Virus de hepatitis C	

Virus de hepatitis B	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM
Virus herpes simplex 1 y 2	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM,
Virus de inmunodeficiencia humana	ATGen, IGM,
Enterovirus	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM
Virus del papiloma humano	ATGen, IGM, GENIA, AEPSM

### Bacterias

<i>Chlamydia trachomatis</i>	ATGen, AEPSM
<i>Micobacterium tuberculosis</i>	ATGen, IGM, AEPSM

### Genómicas

Hemacromatosis hereditaria (HH)	ATGen, IGM, LDB, GENIA
La enzima convertidora de angiotensina (ECA)	ATGen, IGM
Apolipoproteína E (Apo E)	ATGen, IGM
Factor V Leiden (FV)	ATGen, IGM, LDB, GENIA, AEPSM
Factor II 20210 (FII)	ATGen, IGM, LDB, GENIA, AEPSM
Enzima Metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	ATGen, IGM, LDB, GENIA
NOD2	ATGen, IGM
Fibrosis quística	IGM, LDB

### Desórdenes genéticos

X-Frágil	ATGen, IGM, LDB, AEPSM
----------	------------------------

### Farmacogenómica

Isoenzima CYP2C9	ATGen, IGM, GENIA
Citocromo P450 2D6	ATGen, IGM
K-ras	GENIA, IGM
EGFR	GENIA, IGM

### Nutrigenómica

PPAR $\gamma$ 2	ATGen, IGM
Proteína G	ATGen, IGM

### Cáncer

BRCA 1 y 2	IGM, GENIA
BCR-ABL	ATGen, IGM, GENIA
JAK2	ATGen, IGM, GENIA

IGM: Instituto de Genética Médica LDB: Laboratorio de Diagnóstico Biotecnológicos. AEPSM: Asociación Española Primera en Socorros Mutuos.

**Genia** es un laboratorio de biología molecular, el mismo brinda estudios de diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, de predisposición, cáncer, así como también se encarga de estudios de paternidad. La empresa se divide en otro sector, el área agropecuaria y el de alimentos. Fue fundada por el Dr. Carlos Azambuja en 1993, recibió una capitalización de la Corporación Nacional para el Desarrollo (CND), que años más tarde logra recompensarle las acciones, siendo hoy en día una sociedad anónima integrada por tres socios uruguayos. Genia se encarga de exportar

servicios del área de medicina molecular y farmacogenético a varios países como: Brasil, Chile, Argentina, Paraguay, Bolivia, México y España.

**El Instituto de Genética Médica (IGM)** se encuentra situado en el Hospital Italiano de Montevideo. El laboratorio está conformado por profesionales de la salud y las ciencias básicas formados en diferentes áreas de trabajo clínico y paraclínico. Esta área se encarga básicamente de asesorar a los pacientes acerca de sus estudios, Diagnosticando y siguiendo el tratamiento. Aparte de la consulta médica cuenta con laboratorios de citología, bioquímica y biología molecular. El instituto se encarga de las distintas áreas de diagnóstico:

- Diagnóstico Postnatal
  - Citogenética Convencional
  - Citogenética Molecular
  - Molecular
- Diagnóstico Prenatal
- Diagnóstico Prenatal Cromosómico
- Diagnóstico de Errores Congénitos del Metabolismo
- Estudios moleculares en Cancer
- Estudios de Filiación (paternidad, maternidad, etc)

**El laboratorio de Diagnóstico Biotecnológico (LDB)** brinda servicios en genética médica. El laboratorio cuenta con diagnósticos de citogenética y biología molecular. Los Dres. Horacio Cardoso y Beatriz Crispino fueron los protagonistas del desarrollo empresarial, los cuales contaban con formación en citogenética y genética humana. Para el 2008 el Dr. Víctor Raggio se une a la empresa para aportar con sus conocimientos en genética clínica y las aplicaciones de las herramientas de la genética en medicina.

Actualmente el laboratorio se dedica al servicio de: diagnóstico citogenético prenatal y postnatal, así como incursiona en el área tumoral (especialmente en el área hemato-oncológica). También realiza diagnóstico molecular de afecciones hereditarias y de enfermedades infecciosas. Presentan un área de investigación, innovación y desarrollo aplicada a la salud humana.

La **AEPSM** cuenta con un laboratorio de biología molecular, el cual brinda servicios de diagnóstico molecular a pacientes para un tratamiento adecuado. En asociación con el laboratorio de técnicas especializadas, también perteneciente a la AEPSM, el sector de biología molecular en unión con el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, investigan y desarrollan para mejorar el sistema.

Por último **ATGen-Diagnóstica** es una empresa biotecnológica que brinda servicios de diagnóstico molecular y cuenta con una división de I+D que se encarga del desarrollo de proyectos propios. En el apartado 3 de esta tesis se continúa con una descripción más exhaustiva de la empresa.

Este trabajo de grado se realizó cómo una pasantía laboral en el laboratorio de biología molecular de **ATGen-Diagnóstica**.

## **2. Objetivo**

1. Obtener experiencia laboral en una empresa biotecnológica la cual se dedica a proveer servicios y productos para el diagnóstico molecular en el área de la salud humana.
2. Obtener formación en el sistema de calidad instaurado en la empresa (ISO 9001 y GMP)
3. Obtener experiencia en el desarrollo y utilización de técnicas de biología molecular en el diagnóstico.

## 3. ATGen-Diagnóstica

### 3.1 Antecedentes de la Empresa

**ATGen** nace en el 2001 como la primera empresa biotecnológica incubada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (UdelaR). ATGen culmina en 2005 su proceso de incubación en la UdelaR y pasa a formar parte del Grupo Celsius. La empresa apunta al desarrollo, producción y comercialización de productos innovadores surgidos de los avances en el campo de biología molecular. La empresa ofrece servicios de análisis moleculares genéticos y de enfermedades infecciosas. El laboratorio se encuentra habilitado desde el año 2001 para Fabricación, Importación y Distribución de Reactivos de Diagnóstico. ATGen se encuentra habilitada por el MSP desde el año 2006 como Laboratorio de Análisis Clínicos con un Nivel "B" de complejidad, especializado en técnicas de Biología Molecular.

### 3.2 Foco de Negocios de la Empresa:

Las siguientes tablas muestran los productos desarrollados (Tabla 2) y servicios (tabla 3) ofrecidos por la empresa para su venta a empresas que cuentan con laboratorios de biología molecular (en el caso de los productos) y que no cuentan (en el caso de los servicios).

**Tabla 2.** Productos de diagnóstico molecular que se comercializan por ATGen-Diagnóstica según su nombre comercial (14).

<b><u>Productos</u></b>	<b><u>Presentaciones</u></b>
APOE	20 y 50 Reacciones
FII 20210	20 y 50 Reacciones
FV Leiden	20 y 50 Reacciones
HH C282Y & H63D	20 y 50 Reacciones
MTHFR C677T	20 y 50 Reacciones
MTHFR A1298C	20 y 50 Reacciones
Pre FRAXA	10 y 20 Reacciones
TOXO	20 y 50 Reacciones
Kit de extracción de ADN	50 y 100 Reacciones

**Tabla 3.** Servicios de Diagnóstico Molecular ofrecidos por ATGen-Diagnóstica según su nombre comercial (14).

<b><u>Servicios</u></b>
<b><i>Diagnóstico de Predisposición</i></b>
Factor V de Leiden G1691A o Q506
Protrombina G20210A
MTHFR C677T
MTHFR A1298C
Hemocromatosis Hereditaria H63D & C282Y
ApoE genotipos E2, E3 y E4
PPAR pro12ala
NOD2 3020insC
ECA1
Proteína G C825T
X Frágil
CYP450 2C9 genotipos 2 y 3
JAK II
<b><i>Enfermedades Infecciosas</i></b>
Toxo
HCV diagnóstico
HCV carga viral
HCV genotipado
HBV diagnóstico
HBV carga viral
HIV diagnóstico
HIV carga viral
Familia Herpes
HPV
<b>Sexado</b>
Nena o Varón

### **3.3 Perfil Empresarial**

#### **Política de calidad**

La empresa se rige bajo un sistema de gestión integral de calidad, implementado el sistema de calidad ISO 9001:2008 y cumpliendo el reglamento técnico del MERCOSUR de Buenas Prácticas de Fabricación exigido por el Ministerio de Salud Pública (MSP). Asegurando la calidad y seguridad de sus productos, y cumpliendo la reglamentación vigente en el país en lo que tiene que ver con los servicios de diagnóstico molecular.

**ATGen-Diagnóstica** busca siempre una buena relación con sus clientes, satisfaciendo sus necesidades. La empresa conserva un capital humano en un ambiente de trabajo en equipo, manteniendo una cultura de prevención de riesgos laborales y respeto al medio ambiente. Respecto a los proveedores, busca mantener una relación perdurable, en donde se orienta al crecimiento mutuo y al mantenimiento de la calidad de los insumos adquiridos.

**ATGen-Diagnóstica** busca revalorizar la actividad innovadora de la empresa, para así asegurar un crecimiento sustentable apoyado en su capital intelectual. Divulgar y apoyar el uso de herramientas moleculares como elementos preventivos, pronóstico o diagnóstico que contribuya a mejorar la calidad de vida.

#### **Misión de ATGen-Diagnóstica:**

Brindar soluciones de diagnósticos *in-vitro* aplicadas a la salud humana proporcionando productos y servicios de calidad y seguridad generando valor sustentable a través de la innovación y los desarrollos.

#### **Visión de ATGen-Diagnóstica:**

Posicionarse a nivel global como una empresa de diagnóstico *in-vitro* de vanguardia, aplicada a la salud.

### **3.4 Descripción del Laboratorio**

El laboratorio de Biología Molecular está diseñado de manera que cumpla con las normativas vigentes de la autoridad sanitaria competente y de acuerdo con los procedimientos de calidad para el manejo de muestras biológicas. El laboratorio se encuentra habilitado por el MSP.

El diseño del laboratorio cuenta con tres áreas delimitadas:

**Pre-amplificación (zona 1):** En esta zona se preparan las mezclas de reacción para la PCR (la mezcla de reacción se define como la mezcla de reactivos para la realización de una reacción de PCR). Es una zona libre de ADN y ARN.

Equipos e instrumental que se encuentran en la zona de pre-amplificación:

- Microcentrífuga
- Vortex
- Cabinas de flujo laminar
- Micropipetas automáticas de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl.
- Gradillas
- Punteros resistentes a aerosoles (con filtro)
- Heladera
- Freezer

**Área de extracción (zona 2):** En esta zona se realiza la purificación del material a analizar (ácidos nucleicos) para efectuar posteriormente las PCR.

Equipos e instrumentos que se encuentran en esta área:

- Centrífugas
- Vortex
- Cabinas de flujo laminar.
- Estufas
- Micropipetas automáticas de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Punteros resistentes a aerosoles (con filtro)
- Gradillas
- Heladera
- Freezer

**Área Post-Amplificación (zona 3):** En esta área se ubican los termocicladores en real time y en gradiente, la zona de lavados y una zona para realizar electroforesis.

Los equipos e instrumental que se encuentran en esta área son los siguientes:

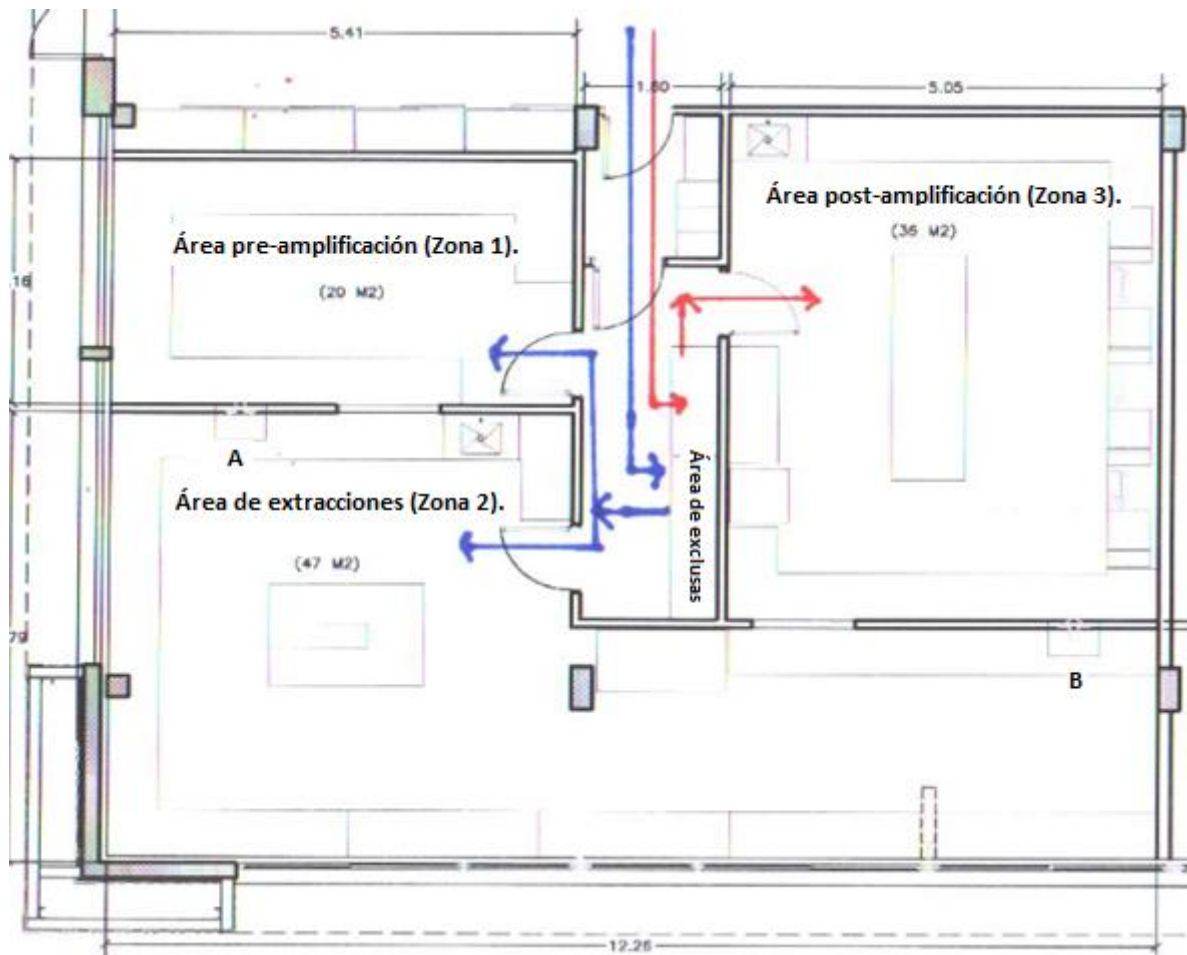
- Termocicladores en tiempo real
- Termocicladores en tiempo final
- Cubas de electroforésis
- Fuentes de poder
- Sistema de tinción de geles
- Micropipetas automáticas de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Centrífuga
- Estufa
- Freezer
- Heladera
- Computadoras

En esta área se realizan los siguientes procesos:

- Amplificación del ARN o ADN con el termociclador en tiempo real
- Amplificación del ADN con el termociclador en tiempo final
- Digestión con enzimas de restricción
- Electroforesis en geles de poliacrilamida
- Tinción y visualización de los productos en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

### **Circulación del personal dentro del laboratorio:**

Las áreas del laboratorio están separadas entre sí. Con el fin de evitar al máximo la contaminación de las muestras. Una vez que se ingresa al laboratorio se debe dirigir a la zona de esclusas (figura 1), donde se encuentran túnicas de dos colores diferentes, cada color se utiliza según la zona a donde se desee ingresar. Es importante tener en cuenta que el uso de cofias, barbijo en el caso de que el personal tenga barba y/o bigotes. Los guantes, son de uso exclusivo de cada zona. Las áreas están comunicadas por pass throughs (nichos por donde se pasan los materiales y reactivos entre zonas que requieren diferente vestimenta). El acondicionamiento y la operatividad del laboratorio son importantes ya que minimiza el riesgo de contaminación.



**Figura 1:** Plano del laboratorio ATGen-Diagnóstica. Las flechas indica el flujo del personal. Una vez que se ingresa al laboratorio se debe dirigir a la zona de exclusas, en donde se encuentra tónicas de dos colores diferentes. Las flechas azules indican el flujo del personal para las zonas 1 y 2, en donde el color de las tónicas es el mismo; mientras que las flechas rojas indican el flujo del personal hacia la zona 3, en donde se debe utilizar una túnica exclusiva para esta área. Las áreas están comunicadas por pass throughs (en el plano están identificadas con las letras A y B), por dónde se pasan los materiales y reactivos entre zonas que requieren diferente vestimentas.

### 3.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La tecnología de la PCR ha revolucionado el proceso de aislar y amplificar un segmento específico de ADN. Una potente aplicación de la PCR es su uso en diagnóstico molecular. La necesidad de detectar pequeñas cantidades de moléculas de relevancia clínica se ha incrementado significativamente en los últimos años. Por ejemplo, la detección de infecciones de baja carga viral, mutaciones puntuales en los genes o aberraciones genéticas en tumores etc., todos requieren metodologías altamente sensibles. La técnica de PCR proporciona la primera solución práctica a la superación de las limitaciones de sensibilidad. **ATGen-Diagnóstica** utiliza esta tecnología para brindar servicios y comercializar productos de diagnóstico molecular orientado a la salud humana.

### 3.5.1 Fundamento

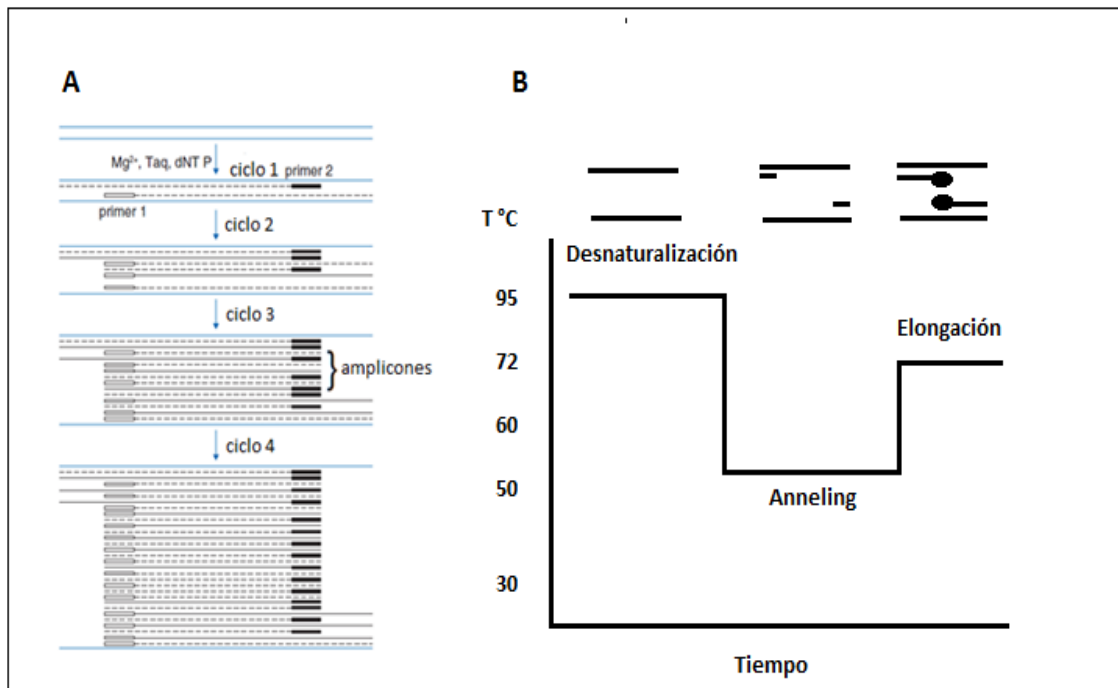
La PCR permite la síntesis específica y exponencial de una región de ADN. Para llevarlo a cabo se requiere de dos secuencias conocidas de ADN flanqueantes al sitio de interés. Sobre estas secuencias conocidas se diseñan y sintetizan químicamente oligonucleótidos que hibridan específicamente sobre el ADN blanco (15, 16).

Utilizando la temperatura como factor desnaturante de la doble hebra de ADN blanco y luego disminuyendo la temperatura permitimos a los oligonucleótidos unirse específicamente al ADN en cuestión por complementariedad de bases.

La estructura formada entre el ADN blanco y los oligonucleótidos se conoce como replicón. El replicón es reconocido por una ADN polimerasa quien copia el ADN blanco siguiendo con exactitud las instrucciones de éste nuevamente basando en la complementariedad de bases.

Para esto la ADN polimerasa requiere de sustratos, los sustratos son los dNTPs (deoxi ATP, TTP, CTP y GTP).

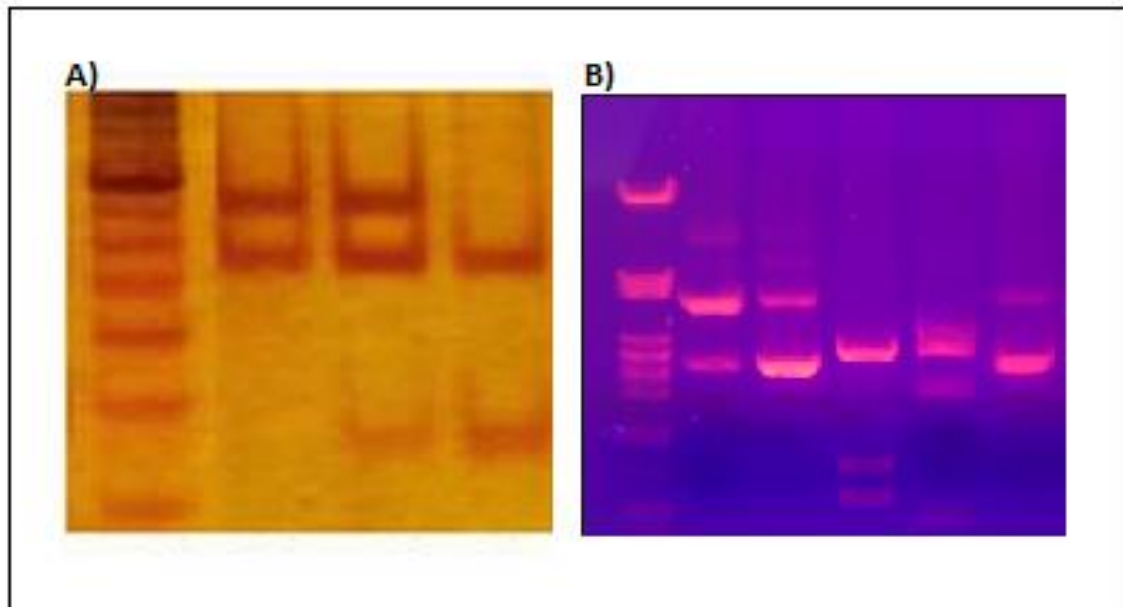
La desnaturalización del ADN se consigue mediante el calentamiento de la muestra de ADN en un entorno acuoso, normalmente a una temperatura de 94°C durante pocos segundos. La hibridación de los oligonucleótidos cebadores específicos a cada hebra se consigue entonces mediante la reducción de la temperatura de la mezcla de reacción a la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) que se fija por lo general entre 50°C y 65°C y depende de la secuencia y el largo de los oligonucleótidos utilizados como cebadores. Cinéticamente los oligonucleótidos al ser más cortos logran unirse al ADN blanco antes que se renaturalice la doble hebra. Después de la etapa de hibridación del cebador, la temperatura se eleva a aproximadamente 72 °C, (una temperatura óptima para la enzima ADN polimerasa que media la replicación de la hebra). Todo el ciclo se repite entonces un número predeterminado de veces (15, 17) (ver figura 3). Cada nueva molécula de ADN recién sintetizada (amplión), va a ser una nueva secuencia molde para las siguientes rondas de amplificación (ciclos de la PCR). En el caso si se partiera de una molécula del fragmento que se desea amplificar, al cabo de 30 ciclos se obtendría aproximadamente 1 billón de moléculas de ADN del fragmento amplificado (16).



**Figura 3. A)** Representación esquemática que indica el principio de la PCR y sus componentes clave. La duplicación de una región dentro de una molécula diana de ADN se facilita mediante la hibridación específica de dos cebadores de oligonucleótidos diferentes (cebador 1 y el cebador 2). Una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN reconoce estos cebadores y extiende la cadena de ADN en dirección 5' a 3', mientras que se utilizan dNTP. **B)** Ciclos repetidos de separación de las hebras por el calor de desnaturalización (melting), e hibridación de los primers (annealing) y nueva síntesis de hebras de DNA (elongación) da lugar a la amplificación exponencial de la región específica de DNA, la cual es definida por el diseño de los primers que se utilizan. En general, el número mínimo de ciclos de PCR realizados es de 20 ciclos a 50 ciclos que suelen ser considerados como un límite superior (Tomada de 17 y modificada). Primers es equivalente cebadores

El producto de amplificación generado durante la PCR se puede verificar mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (en nuestro caso ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa o acrilamida). La matriz funciona como una malla que ofrece resistencia a las moléculas que son sometidas a una fuerza eléctrica, De acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen los fragmentos de ADN (cargados negativamente) se desplazan por el gel a través de un campo eléctrico hacia el polo positivo. Los fragmentos más chicos migran más rápido, viéndose en la parte inferior del gel.

Los geles de agarosa son coloreados con un agente intercalante de ADN, como el Bromuro de etidio, que luego es visualizado en luz UV, mientras que para el caso de geles de poliacrilamida se realiza una tinción con nitrato de plata (18), que por interacción electrostática se une al ADN y se visualiza a simple vista (ver figura 4).



**Figura 4:** La figura A muestra un ejemplo de un gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. La figura B se visualiza un ejemplo de un gel de agarosa al cual se le adicionó bromuro de etidio y es visualizado con luz UV.

### 3.5.2 PCR en Tiempo Real

Esta técnica fue reportada por primera vez en 1992 por Higuchi y colaboradores (19) y rápidamente fue incorporada en laboratorios de investigación y clínicos. La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácidos nucleicos. Utiliza los mismos principios de la PCR, pero a diferencia, la amplificación y la visualización del producto amplificado sucede en un mismo tubo cerrado. Para que suceda la reacción se deben utilizar los mismo componentes que la PCR (un molde de ADN, cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción, y una ADN polimerasa termoestable), y originalmente a dicha mezcla se le adiciona un agente intercalante del ADN que fluoresce en presencia de éste (bromuro de etidio) resultando que a mayor fluorescencia mayor cantidad de ADN. (20). La medición de la intensidad del fluoróforo se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real. El principal problema de esta técnica es la inespecificidad de los resultados, ya que no sabemos si el aumento de la fluorescencia corresponde exactamente o en su totalidad al fragmento deseado.

Estos inconvenientes se subsanaron con la incorporación de un tercer oligonucleótido a la mezcla de reacción, llamado sonda y que hibrida en la región interna amplificada. La sonda posee en uno de los extremos un fluoróforo y en el otro un "quencher" que absorbe la luz emitida por el fluoróforo si este se encuentra a una distancia menor a 20 mers. Durante la reacción de amplificación la ADN polimerasa valiéndose de su actividad correctora degrada la sonda, separando el quencher del fluoróforo, lo que resulta en la emisión de luz que es captada por una cámara y es proporcional a la cantidad de ADN específico efectivamente amplificado.

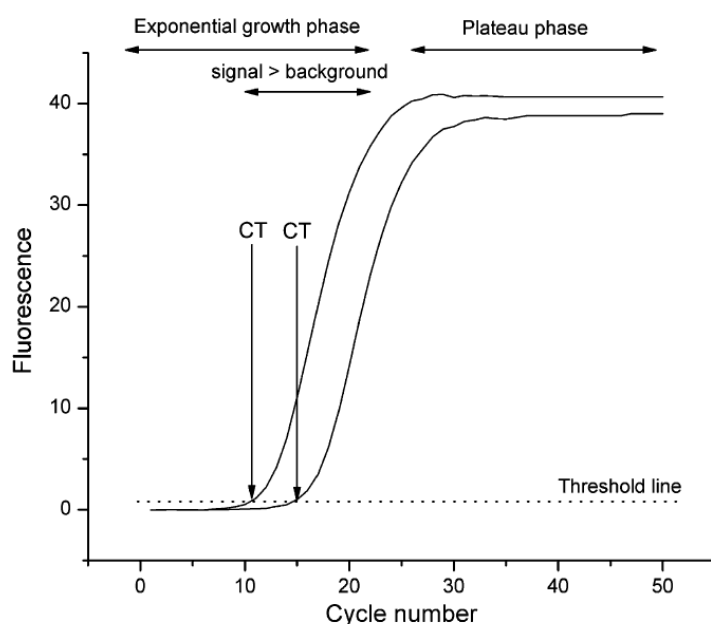
Actualmente existe una gran variedad de diseños de sondas (escorpio, FRET, etc.).

Una variante de la PCR en tiempo real es la PCR retrotranscriptasa o RT-PCR, en donde lo que se busca detectar es ARN (por ejemplo de virus) en vez de ADN. Primero se debe realizar una copia de ADNc del ARN utilizando un enzima transcriptasa inversa (RT), una vez copiado el ADNc este actúa como molde para la amplificación mediante la PCR (21).

### **Monitoreo de la fluorescencia durante la PCR real time.**

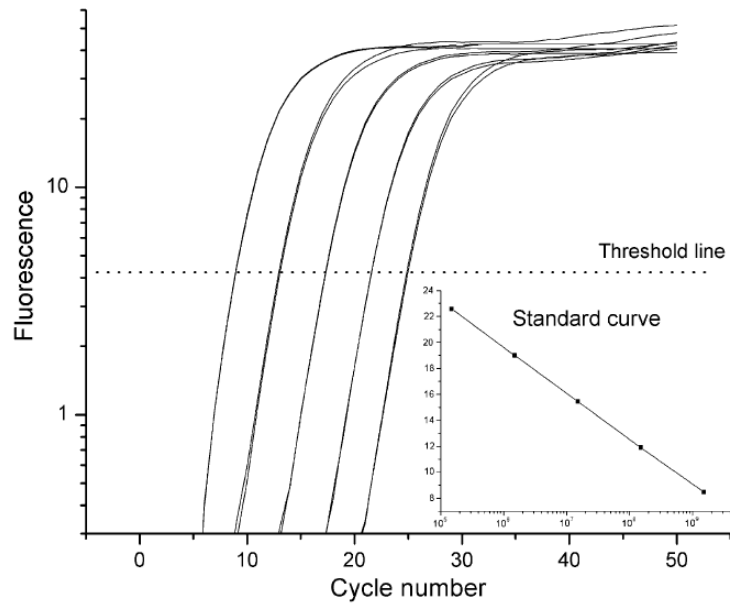
Los resultados se basan en la detección y cuantificación de las sondas fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. La sonda genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto formado. Los termocicladores de PCR en tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos (ver figura 5). En los ciclos iniciales la señal es débil y no se logra distinguir del fondo. Durante varios ciclos, la señal aumenta de manera exponencial, hasta que los niveles de la señal se saturan. (19). La cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción se correlaciona con la cantidad de ADN/ARN iniciales. El valor umbral o threshold corresponde al momento en donde las muestras comienzan su fase exponencial de amplificación ya que se produce un cambio significativo de fluorescencia, y el corte entre el threshold y la curva de amplificación determina el ciclo umbral o Ct que se emplea para la cuantificación (22). El ciclo umbral es inversamente proporcional a la concentración inicial de molde presente en las reacciones. A mayor concentración, la muestra amplificará antes y menor será su ciclo umbral (figura 5). Para la cuantificación de cargas virales presentes en muestras (por ejemplo VIH, HCV, HBV, etc.) se realiza una cuantificación absoluta, esto se lleva a cabo utilizando curvas de calibración. Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. Estas son construidas a partir de concentraciones conocidas del blanco que se desea amplificar y cuantificar. Es importante que la curva de calibración este rigurosamente validada con absoluta exactitud, ya que la cuantificación de la carga viral va a depender exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (figura 6).

Para la detección de polimorfismos puntuales, estrategias como las curvas de desnaturalización (melting curve) son una buena alternativa. Estas curvas se realizan al finalizar la reacción de amplificación. El resultado se basa en que aquellas sondas

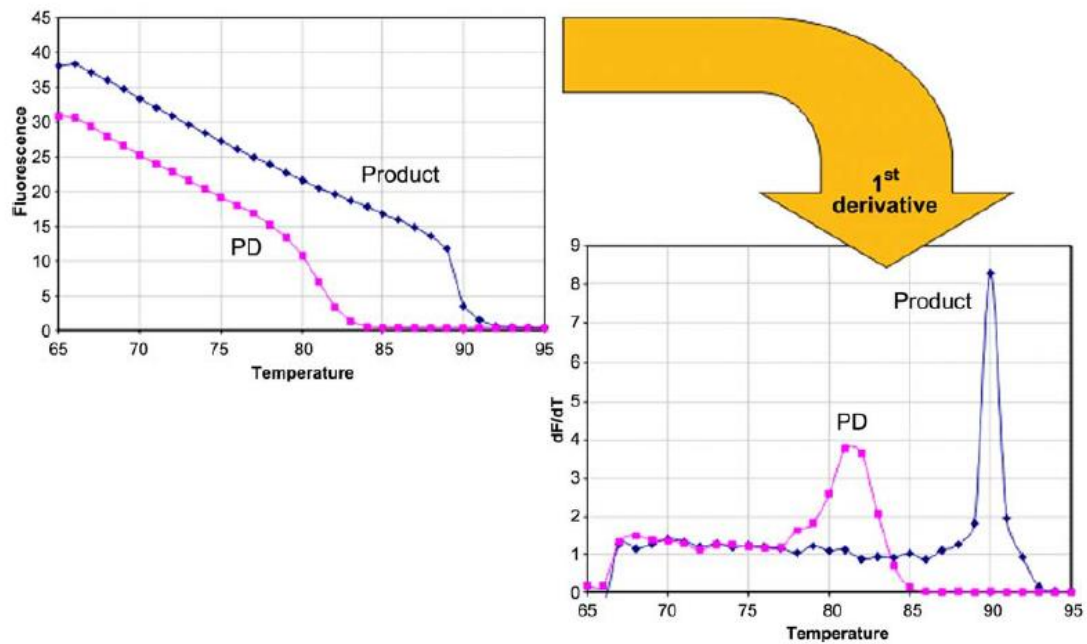


**Figura 5:** Curva de amplificación de PCR en tiempo real. La fase exponencial corresponde a la detección temprana de la PCR, donde la amplificación alcanza la mayor tasa exponencial. La región lineal, es cuando los reactivos comienzan a declinar y la reacción se torna más lenta. La fase plateau o fase estacionaria, es donde los reactivos se han consumido y la reacción de PCR se detiene. Dos valores se obtienen en una curva de PCR en tiempo real: La línea de base o threshold la cual se fija por encima del ruido de fondo y el Ct que corresponde al número de ciclos necesarios para alcanzar el threshold, este valor se tiene en cuenta para la cuantificación del ADN/ARN de interés. (Tomada y modificada de 17).

que poseen mismatch de hibridación se desnaturalizan a temperaturas menores que las que hibridan perfectamente. Para esta estrategia se utilizan sondas de hibridación (como por ejemplo FRET y Beacons) y no las Taqman ya que estas se degradan durante la amplificación lo que no permite realizar curvas de melting, La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura; se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta gradualmente desde 50-60°C hasta 95°C, dependiendo el caso, la fluorescencia detectada depende de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN. Los productos que se encuentran hibridados, y con una intensidad de fluorescencia alta comienzan a desnaturalizarse provocando que el agente intercalante del ADN doble cadena, o que la sondas se separen de su blanco, este hecho provoca una disminución de la señal de fluorescencia que puede seguirse en función de la temperatura (22). El punto de desnaturalización o la temperatura de melting ( $T_m$ ), corresponde al punto más alto de la curva. Los datos de la temperatura en función de la fluorescencia son luego analizados por un software, y visualizados de forma gráfica como la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura ( $df/dt$ ) (figura7).



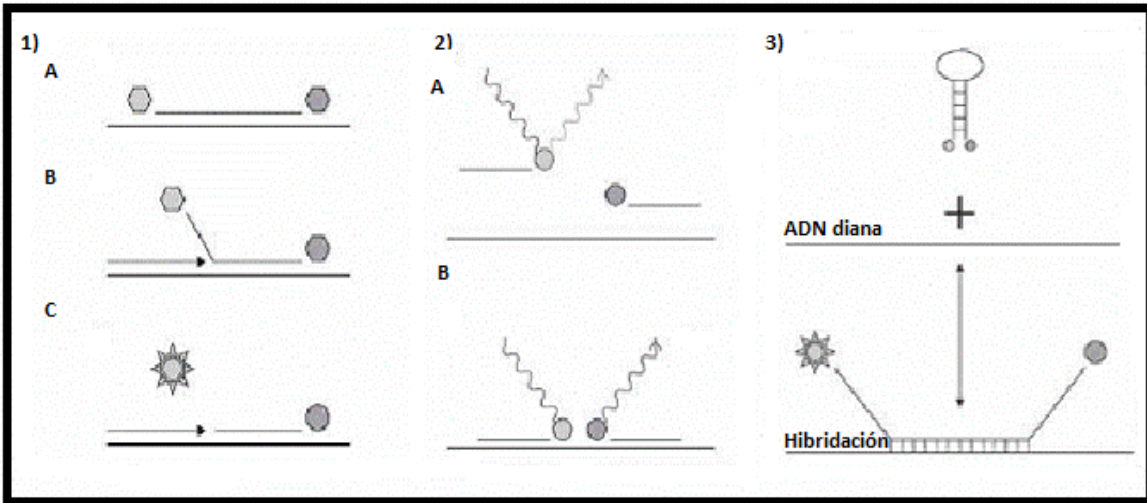
**Figura 6:** Esta gráfica muestra una curva estándar. El principio se basa en comparar muestras desconocidas con amplificadas de los cuales se conoce el número de moléculas iniciales (estándar). El número de moléculas de una muestra desconocida es calculado por la extrapolación de los datos obtenidos con la curva estándar. (Tomada y modificada de 17).



**Figura 7:** Curva de desnaturalización. La primera gráfica muestra la fluorescencia en función de la temperatura. La segunda corresponde a la curva de desnaturalización derivatizada. En esta segunda gráfica se observa un pico correspondiente a la  $T_m$  para la muestra en azul y el rosa se ve un pico menor que corresponde a la  $T_m$  de la presencia de dímeros (PD del inglés primer-dimers). (Tomada y modificada de 17).

## Sondas fluorescentes.

Existen dos tipos de sistemas de detección por fluorescencia: los agentes intercalantes y las sondas de hibridación específica. Los agentes intercalantes son fluorocromos que se unen de manera inespecífica al surco menor de la doble hélice de ADN; los más empleados en PCR en tiempo real son Bromuro de Etidio, SYBR Green y Eva Green. La desventaja de esta estrategia, como se dijo anteriormente, es la inespecificidad, ya que los agentes intercalantes se unen a cualquier producto que este siendo producido durante la reacción, ya sea el que queremos amplificar, como productos inespecíficos, como los dímeros de primer (que son comunes en la PCR). EL segundo sistema son las sondas de hibridación específicas, estas sondas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Existe una gran diversidad de sondas fluorescentes de ADN, dentro de las que se destacan Taqman, FRET, y Molecular beacon. Las sondas Taqman (sondas de hidrólisis) se hibridan de forma específica a la secuencia del producto amplificación. En el extremo 5' de la sonda se encuentra unido un fluorocromo donador (fluorocromo reportero) que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación del ADN diana, la actividad 5'-3' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa degrada la sonda, separando el fluorocromo y el quencher, esto permite que se produzca la emisión de la fluorescencia siendo captado por el lector del termociclador. Las sondas FRET (sondas de hibridación), también se hibridan de manera específica dentro del producto de amplificación, la diferencia está que en este caso se trata de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva el donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Mientras las sondas están hibridadas, los fluorocromos están próximos. Al ser excitados, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite fluorescencia que detecta el lector del equipo. Las sondas Molecular beacons son bastante parecidas a las anteriores, tiene un fluorocromo donador en el extremo 5' y un aceptor en el extremo 3', la diferencia está que en la zona de unión específica con el ADN diana se forma una estructura secundaria en forma de asa. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que el donador y el aceptor estén muy cerca uno del otro, en esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Cuando la sonda se hibrida con el ADN diana la sonda se abre, alejándose el donador y el aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (ver figura 8) (19, 21, 22).



**Figura 8:** La figura corresponde a las distintas sondas específicas. La figura 1) corresponde a las sondas Taqman, la figura 2) a las sondas FRET, y la figura 3) pertenece a las sondas Beacons.

## **4. Metodología**

### **4.1 Metodología para el tratamiento de una muestra:**

En el siguiente apartado se detallan las tareas realizadas durante el desarrollo de la pasantía con el fin de cumplir los objetivos planteados.

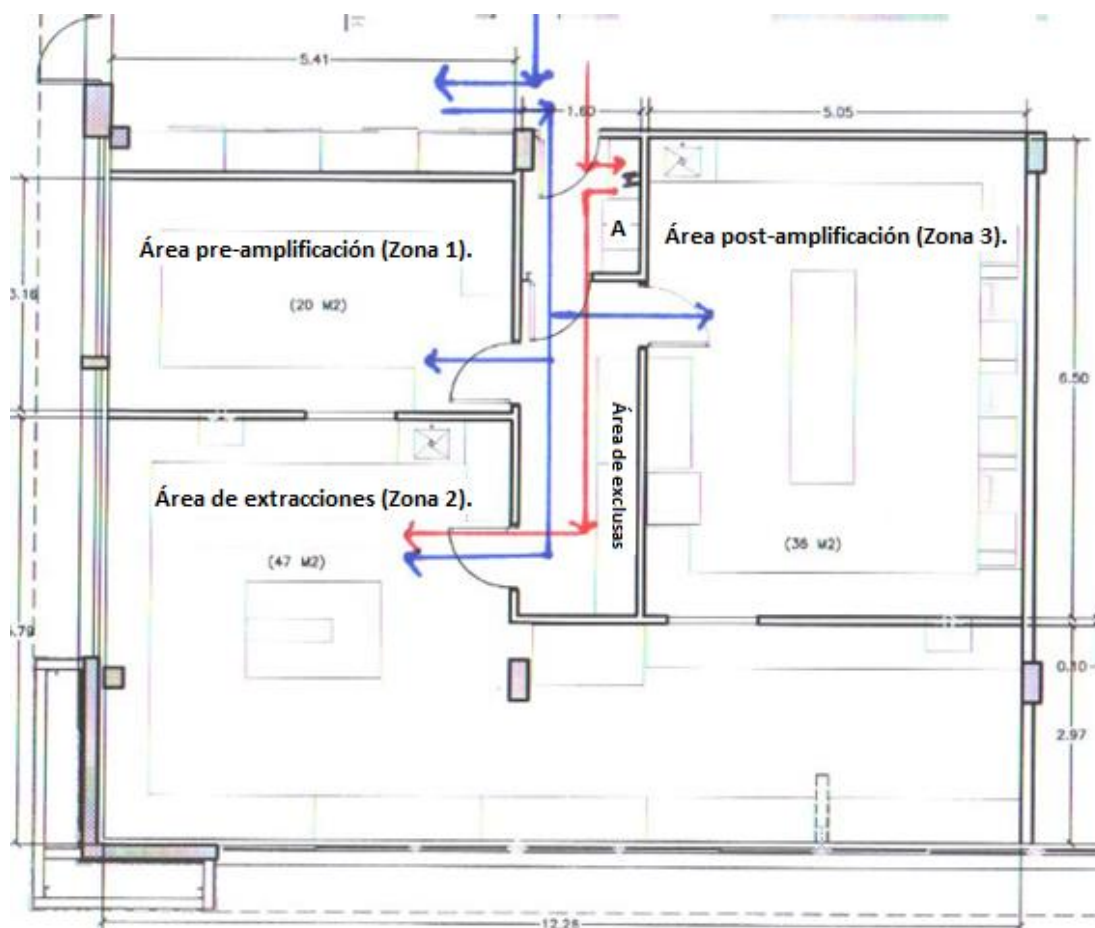
#### **4.1.1 Recepción de la muestra:**

La empresa cuenta con varios clientes a los que presta servicios de diagnóstico molecular. Al menos dos veces por semana el cadete recoge las muestras y las lleva al laboratorio (ver foto 9). Al ingresar las muestras al laboratorio se deben verificar en las condiciones que llegan, es importante que todas las muestras estén refrigeradas durante los traslados y que estén correctamente rotulados y tapados los contenedores. Cada muestra viene con una orden adjunta, en donde se debe corroborar los datos del paciente, es imprescindible que los datos de la etiqueta de la muestra correspondan a la de la orden. En el caso que estas condiciones no sean las adecuadas, se debe pedir nueva muestra al cliente correspondiente, mientras que todas las condiciones sean las adecuadas se prosigue a almacenar las muestras hasta su procesamiento (sangre entera se mantiene en heladera de 4 a 8°C y el resto de las muestras como: plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido broncoalveolar, exudado se mantiene en freezer a -20°C). Una vez que las muestras están almacenadas se deben ingresar los datos del paciente al software de control (24), el cual genera un código de números correlativos, que se utiliza para identificar a la muestra durante el proceso.

El tipo de muestra depende del estudio a realizar:

- Para los estudios que se busca ADN genómico las muestras deben venir en sangre entera en tubos con EDTA (anticoagulante los cuales quelan los iones  $Mg^{2+}$ ) para evitar la coagulación de la sangre y que las células se mantengan en buenas condiciones. Ejemplos de estudios solicitados: FV, FII o P20210, MTHFR, ECA I/D, HH 1 y 2, JAK 2.
- Para los estudios donde se solicita la detección de ADN viral, por ejemplo diagnóstico de HIV, familia herpes: CMV, EBV, HHV6, HSV I/II, las muestras deben venir en sangre entera con EDTA (en el caso de familia herpes pueden venir muestras como: líquido cefalorraquídeo o líquido broncoalveolar).

- Para los estudios en donde se busca ADN/ARN viral (HCV diagnóstico, genotipo y cuantificación; HBV diagnóstico y cuantitativo y HIV carga viral) se solicita se envíe plasma en EDTA.
- Para la detección de HPV las muestras son exudados vaginales, uretrales o de lesiones (vienen en tubos Falcon de 15 ml con 500 µl de medio de transporte y el cepillo con el cual se toma la muestra).



**Figura 9:** Plano del Laboratorio ATGen-Diagnóstica. Las flechas rojas indican el flujo de muestras, el cadete ingresa por la puerta principal del laboratorio en donde se encuentra con lockers para guardar sus cosas personales (indicado con la letra A en el plano), luego debe dirigirse hacia la sala de extracciones en donde dejas las muestras y son recepcionadas por el personal técnico de laboratorio. Las flechas azules indican el flujo de insumos que ingresan al laboratorio, que dependiendo del material a la zona que se dirige.

#### 4.1.2 Aislamiento de ADN/ARN:

Los estudios se separan según el ácido nucleico que se quiere identificar. Se cuenta con cuatro kits diferentes para extracciones:

- Kit ADN fácil para extracción de ADN genómico, el cual es utilizado para los estudios de predisposición como: factor V, factor II, MTHR, JAK 2, Hemocromatosis hereditaria 1 y 2, enzima convertidora de angiotensina (ECA). Este kit fue diseñado y es fabricado y comercializado por ATGen-Diagnóstica. Este ensayo se basa en la lisis osmótica diferencial de células y la posterior precipitación alcohólica del ADN genómico.
- kit QIAamp® DNA Mini Kit de QIAGEN es utilizado para la extracción de ADN Viral, como por ejemplo: HPV, HIV diagnóstico, HBV diagnóstico y cuantitativo y familia herpes (CMV, EBV, HHV6, HSV I/II). Este kit se basa en la extracción de ADN por columna. El ADN se une específicamente a la membrana de gel de cílica que se encuentra en el fondo de la columna, mientras que los contaminantes pasan a través de ella. Inhibidores de la PCR, tales como cationes divalentes y proteínas, se eliminan por completo en dos pasos de lavado, dejando el ADN puro para ser eluido en agua o en un tampón suministrado por el kit. Esta tecnología permite la extracción de ADN genómico, bacteriano o ADN viral de muestras de sangre o tejidos humanos.
- Para la purificación de ARN viral se utiliza el kit de QIAGEN: QIAamp® MiniElute Virus Spin kit. Este kit se utiliza para la extracción de ARN para el estudio de cuantificación de carga viral de HIV (Ver el instructivo en el anexo 3). Básicamente utiliza el mismo principio del kit anterior, se utiliza el sistema de columnas, en donde los ácidos nucleicos se unen específicamente a la membrana, luego con lavados se eliminan los inhibidores de la PCR, y por último se eluye el ácido nucleicos con agua o tampón que provee el kit. Este kit es utilizado para muestras que vienen en plasma o fluidos corporales libres de células.

Las extracciones poseen una sala exclusiva para estas tareas que se comunica mediante un pass throughs con la sala de pre-amplificación dónde el ácido nucleico es adicionado a la mezcla de reacción de PCR previamente preparada.

#### **4.1.3 Amplificación:**

Mediante PCR se amplifica la secuencia de ADN / ARN que se busca. En el punto 4.2 se realiza una descripción detallada de las distintas estrategias de PCR para amplificar ácidos nucleicos dependiendo el estudio solicitado.

#### **4.1.4 Procedimientos técnicos de aseguramiento de calidad de los resultados obtenidos.**

**Aseguramiento de calidad de los resultados obtenidos:** Este tipo de procedimientos se aplica para el análisis y evaluación de los resultados obtenidos, con el fin de asegurar la calidad de los mismos. Para los diagnósticos basados en la PCR se debe tener ciertas precauciones, para evitar la aparición de falsos positivos, ya que la sensibilidad del ensayo es muy alta. Es preciso trabajar de forma cuidadosa, en áreas separadas en el laboratorio, que evitan las contaminaciones cruzadas (contaminaciones con productos previamente amplificados), e incluir controles negativos en todos los ensayos (control que incluye los mismos componentes que la reacción utilizada para realizar el diagnóstico menos la muestra, permitiendo verificar la ausencia de contaminación de los reactivos y de la manipulación). También es importante evitar los falsos negativos, que comúnmente se originan por la presencia de sustancias inhibitorias en la muestra, o porque la PCR no está funcionando adecuadamente, para este evitar este tipo de resultados se utilizan controles positivos internos (estos controles se encargan de controlar todos los pasos del diagnóstico, desde la extracción hasta la amplificación y la cuantificación para el caso de diagnósticos cuantitativos). A continuación se describen algunas actividades que se desarrollan para tal fin.

- Ensayos de aptitud intralaboratorio: este tipo de ensayo se utiliza para evaluar el desempeño de los analistas del laboratorio para un mismo ensayo. Es importante la reproducibilidad entre analistas (que el resultado obtenido para un analista sea el mismo que para otro analista del mismo laboratorio), como la repetibilidad (se realiza el análisis de la muestra por duplicado por cada analista del laboratorio).
- Ensayos de aptitud interlaboratorio: Se refiere a la evaluación externa de la calidad de los resultados de ensayo o desempeño del laboratorio. ATGen-Diagnóstica participa en programas de control de calidad externo organizado por Collage of American Pathologists (CAP). La empresa está registrada en dos tipos de programas: uno que consiste en el estudio de mutaciones genómicas, en donde se le envía tres muestras por mutación a estudiar, al menos dos veces al año (se envían muestras para estudiar las mutaciones para Factor V, Factor II, MTHFR, hemocromatosis, entre otros); y el otro programa consiste en el estudio de HIV-ARN carga viral, en donde se reciben tres envíos anuales que consisten, cada uno, en cinco muestras a estudiar. Estos controles se analizan en iguales condiciones que el resto de las muestras, con la diferencia que se repiten por todo el personal técnico del laboratorio. La empresa participa en otros programas como: Subprograma de Biología Molecular del CEEC, y del Programa de Biología Molecular de RfB (Referenzinstiut Fur Bioanalytik) de Alemania.

Los distintos controles que se describen a continuación, se deben incluir en paralelo con el procesamiento de muestras, con el fin de controlar las diferentes etapas del procesamiento de las muestras y así poder asegurar la validez de los ensayos:

#### **4.1.4.1 Controles de calidad para estudios de predisposición:**

**4.1.4.1.1 Control intralaboratorio:** Cuando se procesan este tipo de muestras se debe realizar por duplicado al menos 1 muestra si se procesan hasta 10 muestras, 2 si son entre 10 y 20 muestras, y 3 si son más de 20. Es importante que la repetibilidad de estas muestras sean del 100% para que se pueda validar el ensayo.

**4.1.4.1.2 Controles de PCR en tiempo final.** El resultado obtenido es controlado en varias etapas:

- (a) Control de la extracción de ADN: una vez finalizada la PCR se debe verificar la presencia de amplificación en las muestras analizadas, en el caso de no detectar amplificación en algunas de las muestras, debe repetirse la amplificación o desde la extracción del ADN a partir de la muestra clínica (dependiendo el caso).
  
- (b) Controles positivos y negativos: por cada ensayo se debe incluir un control negativo, para el que no debe haber amplificación (cada 15 días se realiza un control negativo, el cual sufre todo el proceso desde la extracción); y un control positivo, que consta de una muestra de ADN el cual se sabe su genotipo (heterocigota para la mayoría de los estudios).
  
- (c) Control interno de restricción enzimática: El diagnóstico de algunas de las alteraciones a nivel del ADN está dado por la utilización de enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas de ADN con las que se digiere el producto de PCR de cada reacción de amplificación, este tipo de técnica se conoce como PCR-RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Generalmente la mayoría de los ensayos están autocontrolados, ya que el producto de PCR presenta un sitio de restricción que define el genotipo y otro sitio de restricción adicional que está presente en todos los productos de PCR.

**4.1.4.1.3 Controles de PCR en tiempo real:** Para los estudios de Factor V, Factor II y MTHRF que se realizan por la PCR en tiempo real, el diagnóstico es visualizado en curvas de desnaturalización. La desnaturalización diferencial de una sonda, dependiendo si se encuentra o no la mutación. En el caso que la mutación esté presente la sonda hibrida perfectamente provocando una temperatura de melting mayor que cuando se encuentra presente el alelo presente es normal (que presenta un mismatch con la sonda). Para este tipo de ensayo también se deben considerar algunos de los controles que se mencionaron anteriormente como: control de extracción de ADN (verificar la presencia de amplificación en las muestras analizadas), un control positivo (heterocigota para la mayoría de los estudios), un control negativo (el cual sufre todo el proceso desde la extracción) y un control intralaboratorio (que valida la repetibilidad del ensayo).

#### **Interpretación de los controles:**

- El control de los intralaboratorio o por duplicado debe coincidir totalmente para que se valide la corrida y se continúe verificando el resto de los controles.
- Control positivo, control negativo y control interno conformes: se valida el ensayo.
- Control negativo y control interno conforme, pero control positivo no conforme: se valida la corrida.
- Control positivo y control interno conforme, pero control negativo no conforme: se repite el ensayo.
- Control positivo y control negativo conforme, pero control interno no conforme: se repite el ensayo.

#### **4.1.4.2 Controles de calidad para determinación de agentes**

**infecciosos:** Como se mencionó anteriormente el diagnóstico de agentes infecciosos puede ser cualitativo, por lo que el diagnóstico está determinado por la presencia o ausencia de amplificación de la muestra por la PCR. Mientras que para el diagnóstico cuantitativo se basa en el análisis informático, en donde se compara el Ct de las curvas de amplificación obtenida para cada muestra, con una curva de calibración obtenida de la regresión lineal entre el Ct y el logaritmo en base 10 de las concentraciones de la muestra (n° copias/ml o unidades internacionales/ml (UI/ml)). Estos resultados son controlados en varias, desde la extracción hasta la PCR, con el fin de validar los ensayos, por lo que cada día que se realicen ensayos en donde se esté determinando agentes infecciosos (ya sea para cualitativo o cuantitativo) se deben incluir los siguientes controles:

- a) Control negativo: este control debe verificar la ausencia de amplificación. Se debe utilizar un control negativo de extracción de ADN o ARN, según el caso (control que sufre el mismo proceso que las muestras, pero que se adiciona agua o buffer).
- b) Control positivo: puede ser ADN o ADNc (ADN copia para el caso de virus ARN), para el cual debe haber amplificación.
- c) Control interno de extracción y amplificación: se agrega a la muestra desde la extracción del ácido nucleico, permitiendo verificar todo el proceso.

#### **Interpretación de los controles:**

- Control positivo, control negativo y control interno conformes: se valida totalmente el ensayo.
- Control negativo y control interno conforme. Pero control positivo no conforme: se repite la corrida en el caso que la muestra sea negativa.
- Control positivo y control interno conforme, pero control negativo no conforme: se repite el ensayo.
- Control positivo y control negativo conforme, pero control interno no conforme: se repite el ensayo.

#### **4.1.5 Realización de un informe:**

Confirmación del resultado. La Dirección Técnica chequea los resultados obtenidos por el Técnico y elabora el informe.

Para validar los resultados que involucran a la técnica de PCR en tiempo final, es importante verificar el resultado obtenido en los geles de poliacrilamida para cada muestra y para cada estudio, corroborando el registro realizado por el técnico (para cada estudio hay un registro en donde se anotan entre varias cosas los resultados interpretados por el técnico). La dirección técnica debe completar la validación, verificando en los geles, los controles internos, positivos y negativos, según se describió en el punto anterior.

Para las pruebas que involucran técnicas de PCR en tiempo real, se verifica el resultado emitido por el técnico, comparando con lo generado por el equipo (curvas de amplificación establecidas por el software). Se deben verificar los controles internos, positivos y negativos para poder validar el ensayo.

**Informe y Validación del ensayo:** Una vez revisado los resultados del ensayo por la Dirección Técnica esto son ingresados al NODUM, corroborando que todos los datos del paciente sean correctos. Para validar un resultado el Director Técnico debe ingresar la fecha del día que valida el informe, luego genera un informe que varía según el estudio y el resultado, pero básicamente su estructura consiste en:

- Encabezado: logo del laboratorio.
- Título: título del estudio realizado.
- Etiqueta: datos del paciente y del laboratorio solicitante.
- Procedimiento de análisis: breve descripción de la metodología utilizada.
- Resultados: resultado obtenido para esa muestra.
- Marco teórico: resumen de la patología asociada al estudio solicitado.
- Validación: nombre y firma del Director Técnico que valida el resultado emitido.
- Bibliografía: bibliografía que avala el estudio realizado.
- Pie de página: datos de contacto.

#### **4.2 Descripción metodológica de los diferentes diagnósticos.**

A modo de ejemplo a continuación se describen algunas de las metodologías que se desempeñan rutinariamente.

## **4.2.1 Estudios de Predisposición.**

### **4.2.1.1 Factor V Leiden, Factor II y MTHFR.**

#### **4.2.1.1.1 Fundamento.**

La mutación en el gen que codifica para el **Factor de Coagulación V (Leiden)** es la causa genética más común de trombosis venosa. El locus del gen del factor V se encuentra en el cromosoma 1 (1q21-25). La mutación se produce por una sustitución de Guanina por una Adenina en el nucleótido 1691 (G1691A), en el exón 10, este tipo de variación del ADN se denomina SNP o polimorfismos de una sola base. El cambio de nucleótido genera en la proteína un reemplazo del aminoácido Arginina en la posición 506 por Glutamina (R506Q) (24). La sustitución de este aminoácido ocurre en el sitio de clivado de la proteína C activada (PCa), lo que impide la regulación por parte de PCa generando un desbalance en la cascada de coagulación, perdiendo el efecto anticoagulante del FV activado (FVa), produciendo así trombofilia. Se trata de una herencia dominante autosómica. La mutación de Leiden es la causa genética más común en las trombosis venosas presentes en los 20 al 40 % de los casos (25).

El diagnóstico de la mutación de Leiden se estudia en aquellas personas con historia personal o familiar que hayan tenido trombosis venosa, tromboembolismo pulmonar, enfermedades vasculares periféricas, entre otras. Diagnosticar esta mutación es importante para poder establecer una etiología para la trombosis y así prevenir o realizar un tratamiento dependiendo de las circunstancias clínicas (24).

El análisis se basa en la amplificación por PCR en tiempo real de un fragmento del exón 10 en donde se encuentra la mutación buscada. Sobre el producto amplificado se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante sondas fluorescentes utilizando la tecnología de PCR en tiempo real. La detección de este polimorfismo se realiza por curvas de desnaturalización o melting, esta técnica consiste a someter a los productos amplificados en la PCR a un gradiente de temperatura. La estrategia planteada por ATGen es la utilización de sondas FRET (figura 10). Esta estrategia implica que durante el aumento gradual de la temperatura la sonda A, dependiendo si se encuentra la mutación (la hibridación es perfecta, entonces la temperatura de melting es mayor) o está presente el alelo normal (la hibridación es imperfecta por lo que la temperatura de melting es menor).

Durante el aumento gradual de la temperatura el ADN se separa en una hebra simple lo que genera un decaimiento de la fluorescencia la cual es monitoreada para luego analizar los datos. Los datos de la temperatura en función de la fluorescencia son analizados por un software, y visualizados de forma gráfica como la derivada de la

fluorescencia en función de la derivada de la temperatura ( $df/dt$ ). La presencia de un desapareamiento de base entre la hebra amplificada y la sonda fluorescente, es suficiente para generar diferencia en la temperatura de melting ( $T_m$ ). La presencia de un SNP en la zona de hibridación de la sonda genera variación de temperatura de melting, lo que permite asociar la  $T_m$  con los correspondientes genotipos (25).

**La protrombina humana (Factor II o P20210)** es una proteína que actúa en la cascada de la coagulación sanguínea. El gen que codifica para esta proteína es un gen candidato para la trombosis venosa. La protrombina es codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 11, la mutación de dicho gen es un cambio en un nucleótido, lo que conocemos como SNP (por sus siglas en inglés single nucleotide polymorfismo). Esta mutación es un cambio de una Guanina por una Adenosina en el nucleótido 20210 (G20210A) de la región 3'UT del gen que codifica para el Factor II (26). La mutación ha sido encontrada en 1-2 % de individuos sanos, 6,2% de pacientes con un primer episodio en trombosis venosa profunda (TVP) y 18 % de los pacientes con trombofilia familiar no explicada. El diagnóstico de esta mutación permite establecer un riesgo relativo de trombosis (27).

El Kit analiza el SNP que involucra un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 20210 (G20210A) de la región 3'UT del gen que codifica para el Factor II de la coagulación humana. La detección de la mutación del factor II involucra una amplificación por PCR en tiempo real seguido de curvas de desnaturalización o melting del producto amplificado, utilizando el mismo criterio que se usa para el Factor V Leiden.

**El gen de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)** está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3.). La enzima juega un papel central en el metabolismo del ácido fólico, convirtiendo el 5, 10 metilentetrahidrofolato reductasa en 5, Metilentetrahidrofolato, esta es la forma dominante que circula como ácido fólico (28).

Existen dos variantes genéticas de este gen, dos SNPs fueron reportados, uno es el cambio de C por T en el nucleótido 677 en el exón 4 y la otra variante un cambio de una A por una C en el exón 7 en la posición 1298. Ambas mutaciones generan un cambio de aminoácido de la enzima, haciendo que está presente menos actividad lo que influye en el aumento en el riesgo trombótico (28).

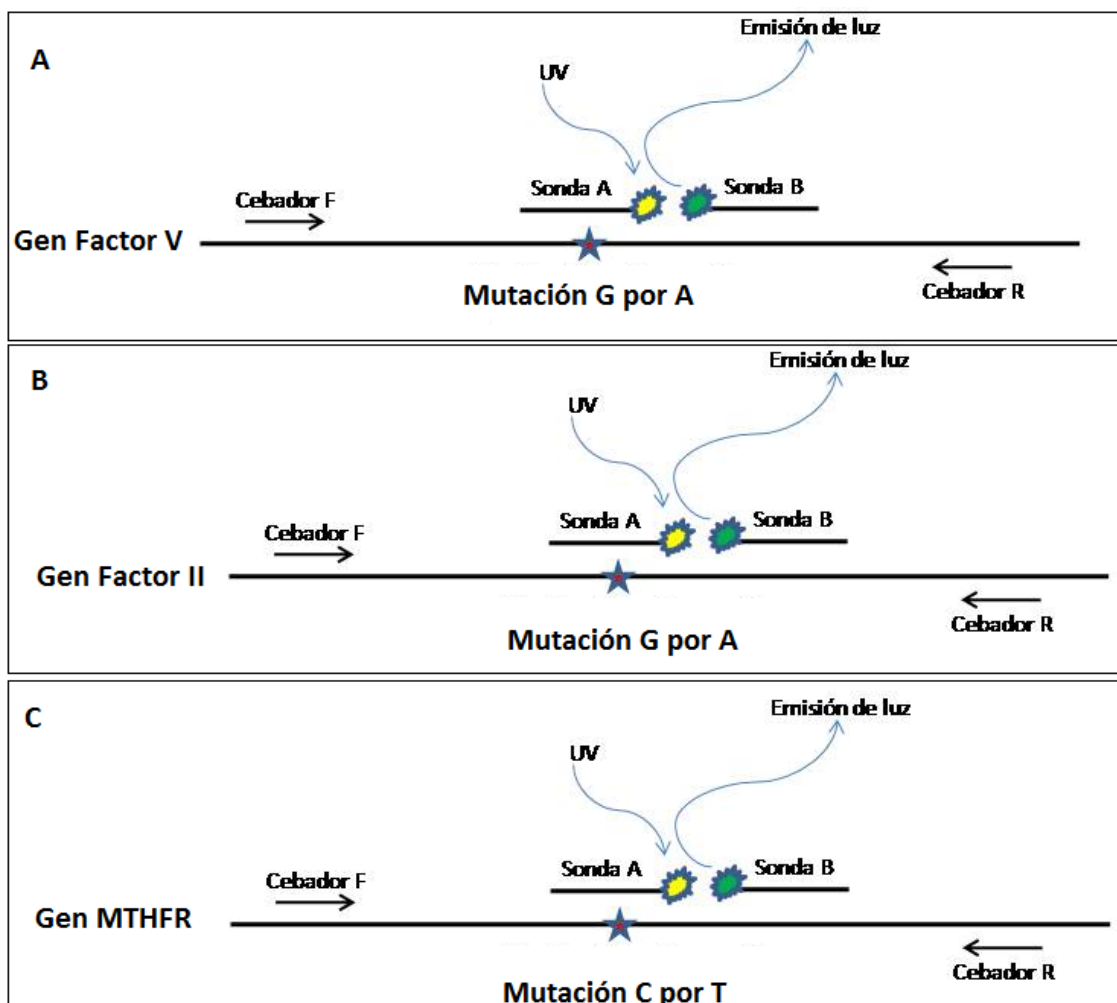
El kit de ATGen analiza un polimorfismo puntual que involucra un cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) en el exón 4 del gen que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. Esta alteración se traduce en un cambio alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína. La detección de la mutación

de MTHFR (C677T) involucra una amplificación por PCR en tiempo real seguido de curvas de desnaturalización o melting del producto amplificado, utilizando el mismo criterio que se usa para el Factor V Leiden.

Para analizar la mutación de FV, FII y MTHFR se utilizan los Kits desarrollado por investigadores del área de I+D de ATGen-Diagnóstica.

#### 4.2.1.1.2 Diseño Tecnológico:

Como se dijo anteriormente la estrategia experimental utilizada para estos kit es la utilización de sondas FRET (figura 10).



**Figura 10:** Estrategia experimental utilizada para la detección del SNP para los distintos genes. Esta estrategia implica que durante el aumento gradual de la temperatura la sonda A, dependiendo si se encuentra la mutación (la hibridación es perfecta, entonces la temperatura de melting es mayor) o está presente el alelo normal (la hibridación es imperfecta por lo que la temperatura de melting es menor). En la figura A se muestra la estrategia experimental utilizada para el gen factor V. La figura B muestra la estrategia que se utiliza para el gen de Factor II. Por último la figura C, se refiere a la estrategia utilizada para el gen de MTHFR.

#### 4.2.1.1.3 Uso de los Kits:

Para los estudios de FV, F II y MTHFR se realiza la extracción de ADN genómico con el Kit de ADN fácil. Una vez que se logra aislar el ADN se prosigue con la amplificación del SNPs.

En la zona de pre-amplificación se preparan las mezclas para la amplificación (cada kit contiene su mezcla de reacción para identificar el SNPs correspondiente). Por cada muestra se agrega en un tubo de PCR de 0,2 ml 18  $\mu$ L de mezcla de reacción (la misma contiene: los primers, dNTPs, la taq Polimerasa, sondas, Mg, buffer, agua ADN/ARN free). Para poder validar el ensayo es necesario tener en cuenta dos reacciones más, el control positivo y un control negativo, como se explica en el siguiente párrafo.

En la zona de extracciones, en una cabina UV para evitar contaminación, se adiciona 2  $\mu$ L del ADN extraído de la muestra, a los tubos de PCR con la mezcla de reacción correspondiente (las mezclas de reacción para FV adicionar el ADN para la muestra que se quiere detectar el SNPs de FV de Leiden y así para FII y MTHFR). En el tubo rotulado como control positivo, se coloca ADN de una muestra heterocigoto para la mutación, mientras que para el control negativo se adicionan 2  $\mu$ L de agua o el control negativo de extracción, este último sirve para confirmar que en la extracción no hubo contaminación.

Una vez pronto los tubo de reacción se colocan en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000, seleccionando el programa adecuado para cada kit (se utiliza el programa del ciclado según el instructivo). En el caso que se hace por primera vez, se debe configurar el ciclado.

Programa para la mutación Facto V Leiden (tabla 4):

**Tabla 4:** Esta tabla muestra el ciclado de PCR para la mutación de Leiden.

	Temp. °C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
35 ciclos	95	15 seg	No
	54	20 seg	Excitación 460 nm/Emisión 660 nm.
	72	10 seg	No

1 ciclo	95	15 seg	No
	40	60 seg	No
	50	60 seg	No
Melt	50 a 75	1°C/s	Emisión 510 nm.

Programa para la mutación Facto II o P20210 (tabla 5):

**Tabla 5:** Esta tabla muestra el ciclado de PCR para la mutación de Factor II.

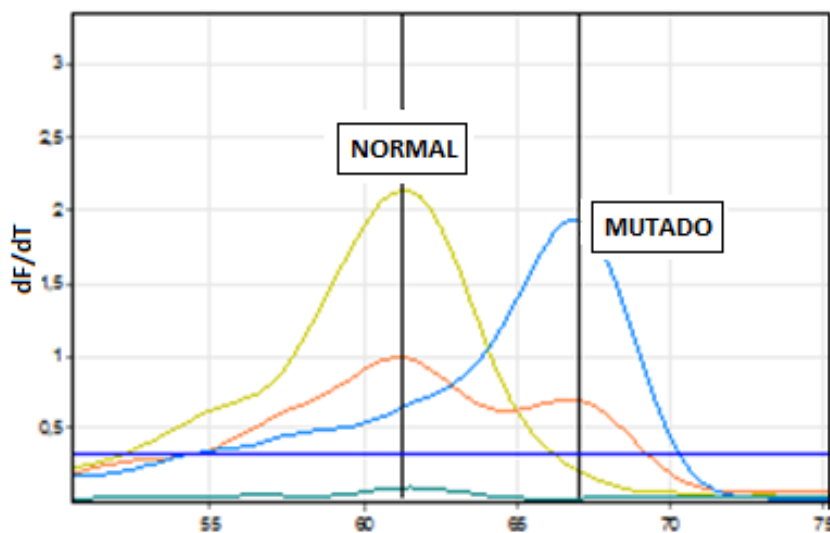
	Temp. °C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
40 ciclos	95	15 seg	No
	54	20 seg	Excitación 460 nm/Emisión 660 nm.
	72	10 seg	No
1 ciclo	95	15 seg	No
	40	60 seg	No
	50	60 seg	No
Melt	50 a 75	1°C/s	Emisión 510 nm.

Programa para la mutación MTHFR (tabla 6):

**Tabla 6:** Esta tabla muestra el ciclado de PCR para la mutación de MTHFR.

	Temp. °C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
40 ciclos	95	15 seg	No
	56	20 seg	Excitación 460 nm/ Emisión 660 nm
	72	10 seg	No
1 ciclo	95	15 seg	No
	45	60 seg	No
Melt	45 a 85	1 °C/s	Emisión 510 nm.

Terminada la corrida el software nos muestra una gráfica en donde se pueden ver las curvas de melting según el genotipo. Para poder ver estas curvas y establecer el genotipo, se deben realizar un análisis en donde se debe establecer el valor umbral de fluorescencia y picos máximos de fluorescencia (figura 11).



**Figura 11:** Gráfico obtenido luego del análisis de melting ya sea para FV, FII o MTHFR: Df, derivada de la fluorescencia; dT, la derivada de la temperatura. Línea amarilla: Muestra homocigota normal. Línea celeste: Muestra homocigota mutado. Línea naranja: Muestra heterocigota. La recta horizontal azul es el umbral de fluorescencia, mientras que la primera recta vertical en negro, identificada como NORMAL, representa el pico máximo de fluorescencia para las muestras normales o sin mutación, la segunda recta vertical en negro, marcada como MUTADA, es el pico de fluorescencia máximo para las muestras mutadas.

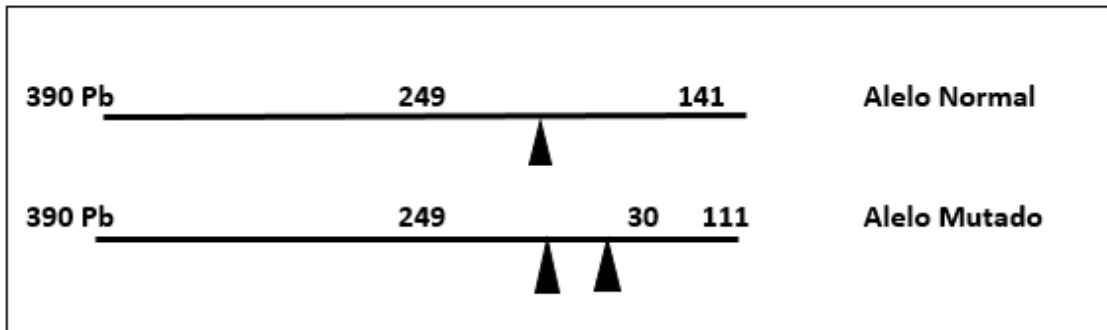
#### 4.2.1.2 Hemocromatosis Hereditaria C282Y y H63D.

##### 4.2.1.2.1 Fundamento:

La hemocromatosis hereditaria (HH) se relaciona con el trastorno producido por la acumulación patológica de hierro (Fe) en el organismo. La HH relacionada con el gen HFE o tipo I son las que adoptan las mutaciones homocigotas para C282Y o mutaciones heterocigota para H63D/C282Y. HH relacionada con el gen HFE o tipo uno es la clasificación del síndrome de HH cuando hay una mutación en el gen HFE, localizada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). La mutación homocigota del gen HFE, es cuando la proteína resultante tiene sustituida una tirosina por una cisteína en la posición 282 (C282Y). Mientras que la mutación heterocigota para H63D/C282Y es cuando en un alelo tiene la mutación C28Y y en el otro alelo la mutación H63D, esta última es cuando el aminoácido aspartato ha sido sustituido por la histidina en la posición 63 (29).

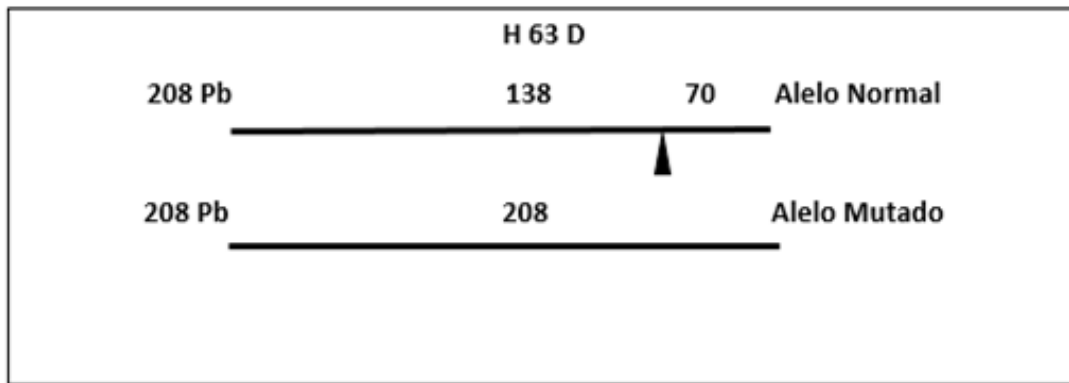
##### 4.2.1.2.2 Diseño Tecnológico:

Según el kit HH C282Y (ver instructivo en la siguiente página: <http://www.atgen.com.uy/predisposition/>), éste analiza un cambio de base de guanina por adenina en la posición 845 del gene HFE, lo que genera un reemplazo de una cisteína por una tirosina en el codón 282 de la proteína. El análisis requiere una amplificación por PCR de un fragmento del exón 4 del gen HFE. Sobre el producto de amplificación se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante digestión con una enzima de restricción (RFLP por sus siglas en inglés). (Figura 12)



**Figura 12:** Esta figura muestra el diseño tecnológico utilizado para la detección de la mutación C282Y. El tamaño del fragmento a amplificar es de 309 Pb. Las flechas indican donde corta la enzima de restricción, que para el caso del alelo normal, se produce un corte, obteniendo dos bandas, una de 249 pb y otra de 141 pb. Para el alelo mutado se producen dos cortes, obteniendo tres bandas, una grande de 249 pb, una de 111 pb y la más pequeña de 30 pb (esta banda en el gel de poliacrilamida al ser tan pequeña suele perderse).

El kit HH H63D (ver instructivo en la siguiente página: <http://www.atgen.com.uy/predisposition/>) analiza un cambio de base de citosina por guanina en el nucleótido 187 (187C→G) del gen, causando la sustitución de histidina por aspartato en la posición 63 de la proteína. El análisis requiere una amplificación por PCR de un fragmento del exón 2 del gene HFE. Sobre el producto de amplificación se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante digestión con una enzima de restricción (RFLP). (Figura 13)



**Figura 13:** Esta figura muestra el diseño tecnológico utilizado para la detección de la mutación H63D. La segunda figura muestra el diseño tecnológico de la mutación H63D. Para este gen el largo corresponde a 208 pb, en el momento de la restricción en el alelo normal se produce un corte, generando dos bandas una de 138 pb y otra de 70 pb. En el alelo mutado al generarse la mutación pierde el lugar de la restricción, por lo que no se produce la restricción y se ve la banda de 208 pb.

#### 4.2.1.2.3 Uso de los Kits:

Para la extracción de ADN genómico a partir de sangre entera con EDTA se recomienda usar el kit de ADN fácil, en donde se logra extraer una concentración de ADN genómico de 150 y 200 ng/μl, la cual es ideal para la amplificación por PCR.

En la zona de pre-amplificación se preparan las mezclas para la amplificación. Por cada muestra se agrega en un tubo de PCR de 0,2 ml 18 μL de mezcla de reacción (la misma contiene: los primers, dNTPs, la taq Polimerasa, Mg, buffer, agua ADN/ARN free). Para poder validar el ensayo es necesario tener en cuenta dos reacciones más, el control positivo (para el kit de C282Y cuenta con un control heterocigota, mientras que para el kit H63D cuenta con un control normal y un control heterocigota para la mutación) y un control negativo, como se explica en el siguiente párrafo.

En la zona de extracciones, en una cabina UV, se adiciona el ADN a los tubos de PCR con la mezcla de reacción. En los tubos correspondientes a las muestras se le adicionan 2 μL del ADN extraído. En el tubo rotulado como control positivo, se coloca ADN control positivo según el kit (para la mutación C282Y corresponde a ADN de una muestra heterocigota, mientras que para la mutación H63D se utilizan dos controles positivos, un ADN de una muestra normal y el ADN de una muestra heterocigota), mientras que para el control negativo se adicionan 2 μL de agua o el control negativo de extracción, este último sirve para confirmar que en la extracción no hubo contaminación.

En la zona post-amplificación colocar los tubos en el termociclador cuando se haya alcanzado los 94°C e iniciar el programa para HH H63D y para C282Y.

Programa para la mutación C282Y y H63D: 35 ciclos de 94 °C/0:30´, 56 °C/0:30´, 72 °C/0:30´; una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C y una extensión final de 3 minutos a 72 °C.

Una vez que termina el programa y la amplificación se prosigue con la digestión:

Por cada tubo en donde tuvo lugar la amplificación, adicionar 1 µl de la enzima de restricción según el kit, incubar 4 hs a 37°C (se puede incubar over night) y luego 10 minutos a 65°C.

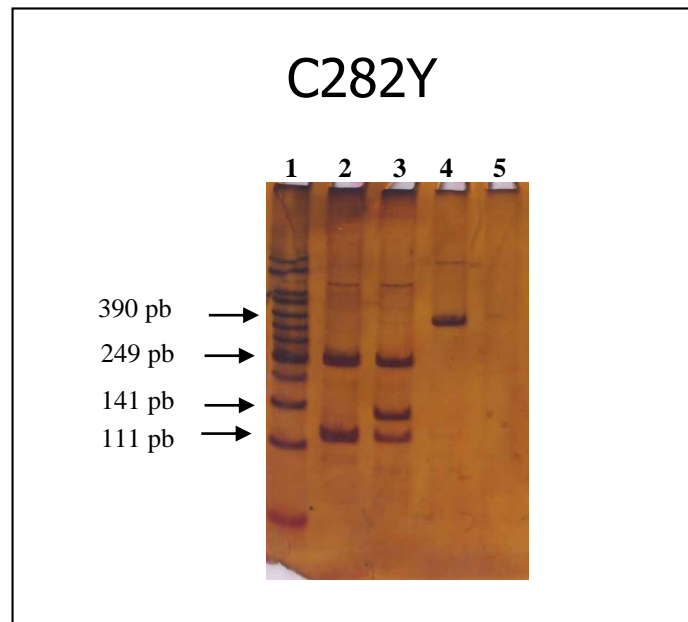
#### **4.2.1.2.4 Obtención de los resultados:**

##### **Interpretación de resultados para el kit C282Y:**

La siguiente tabla muestra las bandas esperados para la mutación C282Y (tabla 7). Los resultados se visualizan en el gel de poliacrilamida al 6%, luego de teñirse con el nitrato de plata (figura 14).

**Tabla 7:** Bandas esperadas luego de la digestión del producto de amplificación.

	Homocigota Normal	Heterocigota	Homocigota Mutado
C282Y	141 + 249 pb	30 + 111 + 141 +249 pb	30 + 111 +249 pb



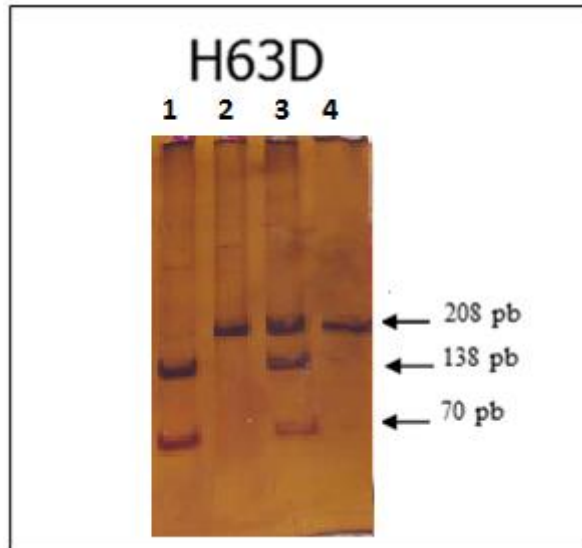
**Figura 14:** Gel de acrilamida al 6%. Carril 1: PM HH C282Y. Carril 2: Producto de PCR luego del corte con la enzima de restricción de un individuo mutado. Carril 3: Producto de PCR luego del corte con la enzima de restricción de un individuo heterocigota (el ADN control debe dar este resultado). Carril 4: Producto de PCR (ADN control). Carril 5: Control Negativo de PCR.

### Interpretación de resultados para el kit H63D:

La siguiente tabla muestra las bandas esperados para la mutación HH H63D (tabla 8). Los resultados se visualizan en el gel de poliacrilamida al 6%, luego de teñirse con el nitrato de plata (figura 15).

**Tabla 8.** Bandas esperadas luego de la digestión del producto de amplificación.

	Homocigota Normal	Heterocigota	Homocigota mutado
H63D	70 + 138 pb	70 + 138 + 208 pb	208 pb



**Figura 15:** Gel de acrilamida al 6%. Carril 1: Producto de PCR luego del corte con la enzima de restricción de un individuo normal. Carril 2: Producto de PCR (ADN control). Carril 3: Producto de PCR luego del corte con la enzima de restricción de un individuo heterocigoto. Carril 4: Producto de PCR (ADN control).

## 4.2.2 Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas.

### 4.2.2.1 CMV/EBV/HHV6.

#### 4.2.2.1.1 Fundamento

**El virus de Epstein-Barr (EBV)** es el agente causal de la mononucleosis infecciosa, también ha sido vinculado con diversos tumores de los seres humanos, como el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin y (en pacientes con inmunodeficiencias) el linfoma de células B. El virus pertenece a la familia Herpesviridae y consta de un núcleo de ADN bicatenario lineal. La detección de ADN, ARN o proteínas del EBV ha sido útil para demostrar la relación del virus con diversas neoplasias malignas. Se utiliza la PCR para detectar ADN del EBV en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de algunos enfermos con SIDA, linfomas, así como para controlar la cantidad de ADN del EBV presente en la sangre de pacientes con enfermedades linfoproliferativas (30).

**La infección por citomegalovirus humano (HCMV)** se caracteriza por una infección primaria que conduce a una persistencia de toda la vida del genoma viral. Periódicamente, el virus se reactiva de su latencia y recupera su capacidad de multiplicarse. CMVH es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con SIDA o los receptores de trasplante de órganos sólidos. El diagnóstico precoz de

la infección por HCMV en pacientes de alto riesgo es esencial a fin de iniciar tratamientos preventivos. La detección por PCR cualitativa de ADN de HCMV en los leucocitos o de plasma se considera el método más sensible. La PCR en tiempo real basada en la tecnología TaqMan proporciona un medio preciso para cuantificar ADN viral con la principal ventaja de evitar la manipulación posterior a la PCR que puede ser la fuente de contaminación de ADN. La identificación del ADN del CMV por medios de esta reacción en la sangre puede predecir el riesgo de que progrese la enfermedad y la identificación del ADN por medio PCR en LCR ayuda a Diagnosticar la encefalitis o poliradiculopatías por citomegalovirus (30).

**El herpesvirus humano 6 (HHV-6)** es un virus linfotrópico T ubicuo que infecta esencialmente a los niños a los 36 meses de edad. La infección primaria causa una enfermedad febril indiferenciada, con un subconjunto de los niños que presentan las manifestaciones clásicas de roseola infantum. De manera similar a todos los herpesvirus humanos, HHV-6 tiene como estrategia de persistir durante toda la vida en una forma latente después de la infección inicial. Este concepto se apoya en la detección de ADN de HHV-6 en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los sistemas nerviosos centrales de los adultos y los niños normales (30).

Varias enfermedades de adultos normales e inmunocomprometidos se han asociado con el HHV-6, incluyendo meningoencefalitis, fiebre después de un trasplante de órganos sólidos, y la enfermedad de Hodgkin. En pacientes con trasplante de médula ósea, se cree que el HHV-6 es el causante de la neumonitis intersticial y supresión de la médula ósea después de un trasplante. HHV-6 también se ha asociado con la esclerosis múltiple (30).

La detección de HHV-6 por PCR de ADN no indica si el HHV-6 persiste en un estado latente o un estado reactivado, lo que sería necesario determinar si el HHV-6 es el que cause enfermedad o es sólo una coincidencia.

#### **4.2.2.1.2 Diseño tecnológico**

El kit CMV/EBV/HHV6 Quat-RT (ver manual en: <http://www.sacace.com/> ) es una prueba de PCR en tiempo real para la detección y diferenciación cualitativa de Citomegalovirus (EBV), el virus de Epstein Barr (EBV), y el virus Herpes Humano 6 (HHV6) en muestras biológicas. El ADN es extraído de las muestras y es amplificado usando PCR por real time y detectado usando sondas (tipo Taqman) fluorescentes específicas para el ADN de CMV/EBV/HHV6 y el control interno (CI). El Control Interno ( $\beta$ -globina) sirve como un control de la extracción y la amplificación para cada muestra analizada e identificando posibles reacciones de inhibición. Entonces, se obtiene la amplificación de las muestras usando primers y una polimerasa específica (TaqF). En la PCR en tiempo real, los productos de amplificación son detectados usando

fluoróforos. Estos fluoróforos están unidos a las sondas de oligonucleótidos los cuales se unen específicamente a los productos amplificados durante la amplificación en el termociclador. Durante la PCR en tiempo real la intensidad de fluorescencia es monitoreada, finalizada la corrida a través del software podemos observar la gráfica de intensidad de fluorescencia en función de los ciclos, en donde se puede afirmar presencia o ausencia de ADN viral, según si se ve amplificación o no en los distintos canales.

#### **4.2.2.1.3 Uso del Kit**

Para la extracción de ADN, las muestras pueden venir en sangre entera o punción líquido cefalorraquídeo, se recomienda el uso del kit QIAamp DNA Mini Kit para la EXTRACCIÓN DE ADN Viral.

Para la amplificación se preparan las mezclas en la zona de pre-amplificación de la siguiente manera:

1. Preparar tubos de 0,2 ml rotulados con el número de la muestra a analizar, un control positivo y un control negativo.
2. Por cada muestra preparar el Mix de reacción:
  - 5µ de PCR-buffer-FRT, 10 µl de PCR mix-1 y 0,5 µl de Taq F polimerasa.
3. Agregar 10 µl del ADN extraído al tubo apropiado.
4. Preparar para cada corrida dos controles:
  - Control Negativo: 10 µl DNA-buffer.
  - Control Positivo: 10 µl de ADN de CMV/EBV/HHV6.

Una vez pronto los tubo de reacción se colocan en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000 y se siguen las instrucciones del manual.

El ciclado utilizado para la amplificación del producto es el siguiente:

- Hold: 95°C 15 min. 1 ciclo.
- Cycling 1: 95°C/5s, 60°C/20s, 72°C/15s; 5 ciclos.
- Cycling 2: 95°C/5s, 60°C/20s, 72°C/15s; 40 ciclos.95°C 15 minutos.

Finalizada la corrida el software nos muestra una gráfica de  $df/dt$  en función de los ciclos en donde cada virus es detectado en un canal en particular, siguiendo las instrucciones del manual se puede detectar presencia o ausencia del virus estudiado. Para el análisis de estas curvas se debe marcar el valor umbral o threshold y el programa nos da los Ct para poder calcular la cantidad de copias iniciales en las muestras.

#### **4.2.2.2 HBV cualitativo y cuantitativo.**

##### **4.2.2.2.1 Fundamento.**

La hepatitis B (HBV por sus siglas en inglés) es un virus de ADN envuelto que pertenece a la familia Hepadnaviridae. Aproximadamente 500 millones de personas en todo el mundo están infectados crónicamente con el HBV, desarrollando enfermedades como: cirrosis, enfermedades hepáticas terminales y carcinoma hepatocelular (31).

La detección y cuantificación de HBV que circula en el plasma o suero jugar un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de la infección por HBV, así como la evaluación de la respuesta a la terapia.

Para el diagnóstico y cuantificación de la carga viral de HBV se utilizan kits comerciales de Sacace BIOTECHNOLOGIES. Para el diagnóstico se utiliza el kit HBV Real-TM Qual, mientras que para la cuantificación se utiliza el kit HBV Real-TM Quant, siendo el cualitativo el más sensible de los dos.

##### **4.2.2.2.2 Diseño Tecnológico.**

Ambos kit se basan en la detección de ADN de HBV que es extraído de plasma, utilizando la técnica de PCR en tiempo real, para la amplificación del ADN y detección utilizando sondas fluorescentes específicas para el HBV y el control interno (CI). La presencia del CI permite no solo monitorear el proceso de extracción sino que también permite comprobar que no haya alguna posible inhibición de la PCR, también permite verificar que no se esté perdiendo DNA durante el proceso de extracción, permitiendo así asegurarnos presencia o ausencia de ADN viral, como también calcular con precisión la carga viral de HBV.

##### **4.2.2.2.3 Uso de los Kits.**

Para la extracción de ADN, las muestras deben venir en plasma, se recomienda el uso del kit QIAamp DNA Mini Kit para la EXTRACCIÓN DE ADN Viral. En el momento de la extracción se adiciona el Control Interno (CI) (cada kit de Sacace viene con un CI).

En la zona de pre-amplificación se preparan las mezclas de reacción en donde se deben rotular tubos de 0,2 ml con el número de la muestra a analizar. En el manual de cada kit se especifica la cantidad de cada uno de los reactivos que se deben usar por muestra. Se debe tener en cuenta el uso de dos reacciones más (en el caso donde se quiere Diagnosticar el HBV), que sería un control positivo (ADN de HBV) y un control negativo (se puede utilizar agua o un buffer en donde asegure que no haya ADN de HBV), estos dos controles y el CI son los que van validan el ensayo. En el caso donde se quiere cuantificar el ADN viral, el kit provee una curva estándar en donde es posible predecir la carga viral de las muestras.

Una vez pronto los tubo de reacción se colocan en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000 y se siguen las instrucciones del manual.

El ciclado utilizado para la amplificación del producto es el siguiente:

- Hold: 95°C 15 minutos
- Cycling: 95°C 20 segundos/ 60°C 40 segundos N° de ciclos: 42.

Finalizada la corrida el software nos muestra una gráfica de fluorescencia en función de los ciclos en donde es posible ver presencia o ausencia de amplificación de ADN viral, o en el caso de la cuantificación del ADN viral poder informar la cantidad de copias que hay por muestra analizada. Para el análisis de estas curvas se debe marcar el valor umbral o threshold y el programa nos da los Ct para poder calcular la cantidad de copias iniciales en las muestras.

### **4.2.2.3 HCV genotipado, cualitativo y cuantitativo.**

#### **4.2.2.3.1 Fundamento.**

El virus de la hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés) es un virus envuelto de la familia Flaviviridae, contiene un ARN monocatenario de sentido positivo con aproximadamente 9600 nucleótidos de longitud. El genoma viral está organizado en una región 5' no traducida, seguida por un marco de lectura abierta en la región 3' (32).

La infección por el HCV afecta a 130 a 170 millones de personas en todo el mundo. 27% de los pacientes infectados por HCV desarrollan infecciones crónicas. Aproximadamente el 25% de estos pacientes desarrolla cirrosis, el 1,6% de estos desarrolla carcinoma hepatocelular (CHC) (33).

Varios factores son importantes para el paciente, la edad, duración de la infección, el genotipo viral, los niveles de ARN de HCV, para la CHC la presencia de síntomas se decide si tratar o no (33).

Se recomienda antes del inicio de las terapias antivirales la realización de una biopsia hepática y determinar el genotipo de HCV, por los que la detección y cuantificación, así como saber el genotipo de HCV que circula en el plasma o suero juega un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de la infección por HCV, así como la evaluación de la respuesta a la terapia.

Para el diagnóstico, genotipo y cuantificación de la carga viral de HCV se utilizan kits comerciales de Sacace BIOTECHNOLOGIES. Para el diagnóstico se utiliza el kit HCV Real-TM Qual, para saber el genotipo del VHC se utiliza el kit HCV Real-TM Genotype, mientras que para la cuantificación se utiliza el kit HCV Real-TM Quant.

#### **4.2.2.3.2 Diseño Tecnológico**

Los tres kit básicamente se basan en la detección de una región específica del ARN del HCV que es extraído de plasma. El ARN del HCV es extraído del plasma, amplificado y detectado usando sondas fluorescentes específicas para HCV y para el control interno (CI). El control interno no solo monitorea el proceso de extracción sino que también permite comprobar que no haya alguna posible inhibición de la PCR.

#### **4.2.2.3.3 Uso de los kits**

Para los kit cualitativo y cuantitativo del ARN del HCV básicamente se sigue con los siguientes pasos:

Para la extracción de ARN, las muestras deben venir en plasma, se recomienda el uso del kit QIAamp ARN Mini Kit para la EXTRACCIÓN DE ARN Viral. En el momento de la extracción se adiciona el CI (cada kit de Sacace viene con un CI).

En la zona de pre-amplificación se preparan las mezclas de reacción en donde se deben rotular tubos de 0,2 ml con el número de la muestra a analizar. En el manual de cada kit se especifica la cantidad de cada uno de los reactivos que se deben usar por muestra. Se debe tener en cuenta el uso de dos reacciones más (en el caso donde se quiere Diagnosticar el HCV), que sería un control positivo (ARN de HCV) y un control negativo (se puede utilizar agua o un buffer en donde asegure que no haya ARN de HCV), estos dos controles y el CI son los que van validan el ensayo. En el caso donde se quiere cuantificar el ARN viral, el kit provee una curva estándar en donde es posible predecir la carga viral de las muestras.

Para el kit en donde se busca saber el genotipo del HCV se sigue con los siguientes pasos:

Para la extracción de ARN, las muestras deben venir en plasma, se recomienda el uso del kit QIAamp ARN Mini Kit para la EXTRACCIÓN DE ARN Viral.

En la zona de pre-amplificación se preparan las mezclas de reacción en donde se deben rotular tubos de 0,2 ml con el número de la muestra a analizar. El kit contiene tres mezclas de reacción para detectar 5 genotipos distintos y un control interno, dos de las mezclas de reacción amplifican 2 genotipos, mientras q la tercer mezcla detecta un genotipo y el CI (PCR-mix-1-FRT HCV 1b/3 con primers y sondas específicas para los subtipos 1b, 3; PCR-mix-2-FRT HCV 1a/2 con primers y sondas específicas para los subtipos 1a, 2; PCR-mix-3-FRT HCV 4/CI con primers y sondas específicas para el subtipo 4 y el control interno). El kit cuenta con 3 controles positivos para poder validar el ensayo, donde cada control positivo cuenta con ARN de dos genotipos distintos además se debe adicionar un control negativo (generalmente agua o un buffer).

Para la posterior amplificación se debe realizar un paso previo para la Transcriptasa Reversa, donde copia ARN a ADNc:

#### Transcripción Reversa (según reactivos del kit):

1. Preparar el mix de reacción: adicionar 5,0 µl RT-G-mix-1 en el tubo que contiene RT-mix. Por cada muestra a analizar adicionar 10 µl de RT-G-mix-1 con RT-mix y 0,5 µl de M-MLV.
2. Adicionar 10 µl del mix en cada uno de los tubos de muestra, rotulados correctamente.

3. Pipetear 10 µl de ARN de las muestras a analizar en su correspondiente tubo con el mix de reacción.
4. Incubar los tubos en el termociclador a 37°C durante 30 minutos.
5. Incubar los tubos a 95°C por 5 minutos.
6. Diluir el ADNc obtenido 1:2 con TE-buffer (adicionar 20 µl de TE-buffer por cada tubo). El ADNc puede almacenarse a -20°C durante una semana.

Una vez realizada la dilución del ADNc, se prosigue con La PCR-RT.

Una vez pronto los tubo de reacción se colocan en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000 y se siguen las instrucciones del manual.

El ciclado utilizado para HCV genotipo es el siguiente:

- Desnaturalización: 95°C 15 minutos
- Cycling: 95°C 20 segundos/ 60°C 40 segundos. N° de ciclos: 45.

Finalizada la corrida el software nos muestra tres gráficas en tres canales distintos donde cada mezcla es reconocida en un canal distinto. De esta forma es posible saber qué tipo de genotipo tiene. Dentro del análisis que se realiza en la gráfica de fluorescencia en función de los ciclos, se debe fijar la línea umbral o threshold y el software te da los valores de los Ct.

El ciclado utilizado para HCV cualitativo y cuantitativo es el siguiente:

- Hold: 50°C – 30 min
- Desnaturalización: 95°C – 15 min.
- Ciclado: 95°C - 20 seg  
60°C - 40 seg  
N° de ciclos: 42.

Finalizada la corrida el software nos muestra una gráfica de fluorescencia en función de los ciclos en donde es posible ver presencia o ausencia de amplificación de ARN

viral, o en el caso de la cuantificación del ARN viral poder informar la cantidad de copias que hay por muestra analizada. Para el análisis de estas curvas se debe marcar el valor umbral o threshold y el programa nos da los Ct para poder calcular la cantidad de copias iniciales en las muestras.

## **5. Alcance de la Pasantía**

La pasantía laboral permite obtener experiencia en el desempeño dentro de una organización, así como, reafirmar los conocimientos adquiridos, poniéndolos en práctica durante el desarrollo de las actividades de pasantía.

## **6. Resultados Obtenidos**

La pasantía en la empresa me permitió expandir mis conocimientos de cómo funciona un laboratorio de biotecnología enfocado al área de la salud humana.

Las destrezas y habilidades adquiridas curricularmente han facilitado la inducción empresarial según la Dirección Técnica.

Durante los 4 meses de pasantía he recibido la inducción empresarial necesaria, he sido evaluada positivamente y hoy formo parte del personal estable de la empresa.

Hoy en día soy funcionaria estable de la empresa, se me contrató bajo el cargo de técnica en servicios, en donde mis tareas principales son:

1. Recepción, verificación e ingreso de muestras.
2. Procesamiento de muestras (desde la extracción del ácido nucléico hasta la amplificación por la técnica de PCR).
3. Informe de resultados.

## 7. Discusión

La medicina personalizada o a medida, la cual está orientada hacia diagnósticos más precisos, estimaciones más confiables de padecer determinadas patologías y a orientar y a ajustar los tratamientos según el perfil genético ha tenido su mayor desarrollo muy recientemente. Su implementación cada vez más frecuente en la práctica médica ha propiciado el desarrollo de nuevas industrias y a que las industrias tradicionales dedicadas a la salud humana adecúen sus nuevos productos a los hallazgos de la medicina genómica. Es así que la industria farmacéutica se ha visto influenciada por los últimos avances de nuevas ciencias como la farmacogenómica, en donde se busca entender el funcionamiento genético para crear medicamentos personalizados con mayor eficacia y seguridad.

Gracias a los avances tecnológicos para conocer la secuencia de los genomas y al desarrollo de técnicas que permiten la amplificación del ADN la biología molecular instauró el diagnóstico molecular. El desarrollo de estas técnicas debería generar soluciones terapéuticas personalizadas. Actualmente se podría predecir qué población responderá a un nuevo tratamiento, dejando de lado el porcentaje de eficacia de una nueva conducta terapéutica.

En términos generales sabemos que los genomas se adaptan (mutan) a velocidades mucho menores que los ambientes, esto lleva al desarrollo cada vez más frecuente de los que conocemos enfermedades “del desarrollo”, obesidad, hipertensión, síndrome metabólico etc. Estas patologías son multigénicas y multifactoriales por lo que abren un gran espectro de posibilidades de nuevos desarrollos para su diagnóstico o tipificación precoz. La biología molecular será sin dudas una de las disciplinas con mayor desarrollo en los próximos años sobre todo en su aplicabilidad a la medicina, el mercado del diagnóstico molecular está en pleno desarrollo, siendo éste una muy buena opción para quienes quieran formar parte, ya sea para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico molecular, desarrollo de nuevos kits para el diagnóstico de patologías que aún no han sido modelo de estudios, como también implementar nuevos centros que se enfoquen a la medicina personalizada para ofrecer no sólo un diagnóstico, sino también soluciones terapéuticas personalizadas con la ayuda de la farmacogenómica y los “nuevos medicamentos a medida”.

## 8. Análisis Económico

El diagnóstico molecular es el segmento de mayor crecimiento en el mercado de diagnóstico in vitro, ofreciendo múltiples oportunidades de entrada y de crecimiento para aquellas empresas interesadas en el rubro. En 1990 el mercado de diagnóstico molecular había dejado U\$S10 millones por ventas en todo el mundo, mientras que para el 2011 fue de U\$S 4,2 mil millones, el cual tuvo un crecimiento de una tasa anual del 33% (34). Este mercado incluye las ventas de reactivos, instrumentos y kits a laboratorios clínicos, como también reactivos que pueden ser utilizados por los laboratorios para el desarrollo de sus propios procedimientos internos. Este mercado incluye también, los servicios ofrecidos por los laboratorios clínicos que han logrado desarrollar sus propios productos, y al mismo tiempo empresas de diagnóstico que utilizan sus propias marcas y ofrecen servicios de diagnóstico. Gracias a la disponibilidad de las nuevas herramientas en el diagnóstico molecular, la medicina moderna ha tenido un adelanto similar a los rápidos avances en el campo de la tecnología digital que se ha producido en la última década. En EE.UU, los diagnósticos para las enfermedades infecciosas y el tamizaje de la sangre constituyen gran parte del mercado (> 70 %). Mientras que la genética, la medicina personalizada y el cáncer abarcan un 13,9 % aproximadamente del mercado (11). Debido a que las enfermedades infecciosas son un segmento maduro, estas otras categorías (predisposición, cáncer y farmacogenómica) están creciendo más rápidamente en términos relativos. El diagnóstico molecular también está empezando a emerger como una herramienta importante para trastornos hereditarios, enfermedades cardiovasculares, y otras áreas de la salud. El mercado global de los diagnósticos moleculares para el 2011 fue de U\$S 4,2 mil millones y se espera que crezca para el 2016 con \$ 6,9 mil millones, esto representa una tasa de crecimiento anual del 10,6 %. Este mercado está influenciado por tres grandes ramas del diagnóstico molecular; enfermedades infecciosas que abarca el 64% del mercado con una venta de U\$S 2,688 millones, el tamizaje de sangre donada que también abarca el 18% con una venta de \$746 millones y por último enfermedades genéticas (cáncer y farmacogenómica) abarca el 18% con una venta de U\$S 755 millones. De varios análisis se revela que solo ocho compañías controlan el 86% del mercado de diagnóstico molecular, las cuales recaudaban aproximadamente U\$S 4,2 millones en el 2011. A pesar de esto se sabe que pequeñas empresas continúan apareciendo y que van creciendo año a año. En la siguiente tabla se muestra los principales actores de este mercado (tabla 9) (34).

La fuerza impulsora detrás de la rápida expansión del mercado de diagnóstico en su mayoría se puede atribuir a los acontecimientos extraordinarios en tecnologías inmunológicas y de ADN que impulsan la entrada de nuevas empresas y a empresas ya establecidas. Se esperan una contribución significativa en el crecimiento del diagnóstico molecular de las nuevas tecnologías en biochips y nanobiotecnología. Así como también a los desarrollos recientes en el campo de la farmacogenómica para

hacer rápidos avances en diagnóstico enfermedades y lograr una terapia adaptada a la composición genética de un individuo (a lo que llamamos “medicina personalizada”). Casi la totalidad de los Diagnósticos Moleculares que se utilizan hoy se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Pero día a día con el desarrollo de nuevas tecnologías el diagnóstico va tomando nuevos rumbos, la secuenciación masiva ha revolucionado este segmento y permitirá, en un futuro próximo, la secuenciación de secuencias de ADN a velocidades sin precedentes y a costos más reducidos, permitiendo el desarrollo de nuevas aplicaciones para diagnóstico cáncer, postnatal, prenatal y enfermedades genéticas.

**Tabla 9.** Compañías líderes en el mundo del mercado de diagnóstico molecular (34).

<b>Compañía</b>	<b>Ingresos en el 2011 (U\$S- millones)</b>	<b>Porcentaje de mercado</b>
Roche	U\$S 1,229	29.3%
Qiagen	U\$S 502	12.0%
Abbott	U\$S 442	10.6%
Novartis Dx	U\$S 398	9.5%
Gen-Probe	U\$S 353	8.4%
BD	U\$S 285	6.8%
Cepheid	U\$S 236	5.6%
Siemens Dx	U\$S 155	3.7%
Others	U\$S 589	14.1%
<b>Total</b>	<b>U\$S 4,189</b>	<b>100%</b>

## **Conclusiones**

Los objetivos planteados para esta pasantía fueron cumplidos plenamente, incluso permitió por primera vez testar en un laboratorio de Biología Molecular aplicada al diagnóstico la adecuación del perfil del egresado de la Licenciatura. Se puso a prueba el mencionado perfil en un ambiente profesional diferente al académico. A mi entender el hecho de que se contratara como efectiva valoriza la metodología de pasantía laboral y confirma la adecuación de la formación recibida para desarrollar estas tareas.

## 9. Bibliografía

1. Moya N, Cancho M, García O, Alzola B. Medicina personalizada: La salud a la carta. Fundación de la innovación Bankinter. 2005.
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Nature 1953; 171: 737-738.
3. Aleixandre J, Perez F. Enseñanza de las ciencias. Revista de investigación y experiencias didácticas. 1987; 5(3): 239-246.
4. Jesús B. Investigación y gestión en la genética humana: el ámbito sanitario, la protección de datos y la investigación. [Tesis doctoral]. [Granada]: Universidad de Granada; 2005.
5. Oswald T, Avery MD, Colin M, Macyn M. Studies on the chemical transformation of pneumococcal type III. The Journal of Experimental Medicine. 1944; 79: 137-158.
6. Solari J. El material genético: ADN y cromosomas genética humana. 3ra.ed. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 2007.
7. Somoza A. ADN, mucho más que material genético [Internet]. mi+d: un lugar para la ciencia y tecnología. 2010 [citado 7 de marzo de 2014]. Disponible desde: <http://www.madrimasd.org/informacionIdi/analisis/analisis/analisis.asp?id=43551>
8. Sanchez IP, Saldaña HB. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 2004; 7(3); 323-335.
9. Dr. Kary Banks Mullis [Internet]. 2009 [citado 8 de marzo de 2014]. Disponible desde: <http://www.karymullis.com/>
10. Escrig AJ, Gobernado I, Herranz AS. Secuenciación de genoma completo: un salto cualitativo de los estudios genéticos. Rev Neurol. 2012; 54(11): 692-698.
11. Debnath M, Prasad GB, Bisen P. Molecular diagnostics: promises and possibilities. New York: Springer. 2010.
12. Pokorski M, editores. Respiratory Regulation: Clinical advances. New York: Springer. 2013.
13. López M, Mallorquín P, Vega M. Genotipado en la salud humana. Madrid: Genoma España Salud humana; 2005.
14. Disponible desde: <http://www.atgen.com.uy/>

15. Srael S. El proyecto genoma humano. SALUD. 2000; (106): 54-59.
16. Brockman J. J. Craig Venter [Internet]. Edge. 2014 [citado 8 de marzo de 2014]. Disponible desde: [http://edge.org/memberbio/j\\_craig\\_venter](http://edge.org/memberbio/j_craig_venter)
17. Verkuil E, Belkum A, Hays JP. Principles and technical aspects of PCR amplification. New York: Springer. 2008.
18. Sanguinetti C, Dias N, Simpson A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 1994; 17(5): 914-921.
19. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 1993; 11: 1026–1030.
20. Lew AM. The polymerase chain reaction and related techniques. Current Biology Ltd. 1991; 3: 242-246.
21. Ohan NW, Heikkla JJ. Revertase transcription polymerase chain reaction: and overview of the technique. Biotech Adv. 1993; 11: 13-29.
22. Kubista M, et al. The real-time polymerase chain reaction. ELSIVER. 2006; 27: 95–125.
23. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Driven RJ, Ronde H, Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein. C. NATURE. 1994; 369: 64-67.
24. Disponible desde: <http://www.nodum.com.uy/>
25. De los Santos J. Desarrollo de kits para genotipado de SNPs en los genes humanos FII, FV y MTHFR, utilizando la tecnología de la PCR en tiempo real. [Tesis de maestría]. [Montevideo]: Universidad de la República; 2003.
26. Glueck CJ, et al. Resistance to activated protein C and lagg-perthes disease. Clinical Orthopaedics & Related Research. 1997; 338: 139-152.
27. Poort S, Rosendaal F, Reitsma P, Bertina R. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombina gene is associated with elevated plasm prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. blood. 1996; 88: 3698-3703.
28. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: A HuGE review. American Journal of Epidemiology. 2006; 165 (1): 1-13.

29. Ortiz I, Paredes JM, López A, Moreno E. Hemocromatosis: etiopatogenia, diagnóstico y estrategia terapéutica. *Medicine*. 2012;11(19): 1153-1161.
30. Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. HARRISON principios de medicina interna. 16(1); Mc Graw Hill; 2006.
31. Rehermann B, Nasciombeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*. 2005; 5:215-229.
32. A. Jirillo E. Hepatitis C virus disease. Immunobiology and clinical applications. New York: Springer; 2008.
33. B. Thongsawat S, Piratvisuth T, Pramoolsinsap C, Chutaputti A, Tanwandee T, DittayaThongsuk. Resource utilization and direct medical costs of chronic hepatitis C in Thailand: A heavy but manageable economic burden. 2012: 12-18.
34. Hughes MD. Molecular diagnostic market trends and outlook [Internet]. IVD Marketreach Enterprise Analysis. Stanford; 2013 [citado 10 de marzo de 2014]. Disponible desde: <http://www.eacorp.com/images/PDFS/Molecular%20Diagnostics%20IVD%20Article%20v21%20MEK%20-%20Reprint%20FINAL.pdf>