



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS DE ALTA
RESOLUCIÓN DE LA CURVA DE DISOCIACIÓN EN LA
BÚSQUEDA DE MUTACIONES PUNTUALES EN EL GENOMA
MITOCONDRIAL HUMANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

JORGE NOÉ GARCÍA CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MONTIEL DUARTE

REVISORES: D.C. CARLOS CORTES PENAGOS

D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO

D.C. RAFAEL ORTIZ ALVARADO



MORELIA, MICHOACÁN, ABRIL, 2012

AGRADECIMIENTOS		v
RESUMEN		vi
1. ANTECEDENTES		1
1.1 MITOCONDRIA		1
1.1.1. Fosforilación Oxidativa	1	
1.1.2. Genoma Mitocondrial	2	
1.1.2.1. Características	5	
1.1.2.1.1. Herencia Materna	5	
1.1.2.1.2. Haplogrupos	5	
1.1.2.1.3. Diferencias en el Código Genético Mitocondrial		6
1.1.2.1.4. Elevada Tasa de Mutación		7
1.1.2.1.5. Heteroplasmia y Efecto Umbral		8
1.1.2.1.6. Segregación Replicativa	9	
1.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL CÁNCER		9
1.2.1. Efecto Warburg	9	
1.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno y Carcinogénesis		10
1.2.3. Heteroplasmia y Desarrollo del Cáncer		10
1.2.4. Mutaciones del mtADN y Cáncer		11
1.2.4.1. Mutaciones Comunes como Marcadores de Tumorigénesis		12
1.2.4.2. Haplogrupos Mitocondriales Asociados a Riesgo de Cáncer		12
1.2.4.3. Inestabilidad de Microsatélites Mitocondriales		13
1.2.4.4. Inserciones	14	
1.2.4.5. Deleciones	14	
1.2.4.6. Mutaciones en el <i>D-loop</i>		15
1.2.4.6.1. Mutaciones en el <i>D-loop</i> Reportadas en Cáncer Cervicouterino	16	
1.3. CANCER CERVICOUTERINO	16	
1.3.1. Virus del Papiloma Humano y Factores de Riesgo		17
1.3.2. Etapas Cáncer Cervicouterino	18	
1.3.2.1. Carcinoma <i>in situ</i> (Etapa 0)		18
1.3.2.2. Etapa 1	19	
1.3.2.3. Etapa 2	19	
1.3.2.4. Etapa 3	20	
1.3.2.5. Etapa 4	21	
1.4. ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE LA CURVA DE DISOCIACIÓN (HRM) EN LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES		22
2. JUSTIFICACIÓN		24
3. HIPOTESIS		25

4. OBJETIVO		26
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	26	
5. MATERIAL Y MÉTODOS		27
5.1. Muestras		27
5.2. Extracción de ADN de Sangre	28	
5.3. Extracción de ADN de Biopsias	28	
5.4. Evaluación de la Integridad del ADN	29	
5.5. Cuantificación de la Concentración del ADN		29
5.6. Amplificación Muestras	29	
5.7. Purificación de los Amplicones.	30	
5.8. Concentración de los Amplicones.	31	
5.9. Diseño de <i>Primers</i> .		31
5.10. Secuenciación.		31
5.11. Análisis de Resultados de la Secuenciación.		33
5.12. Análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (HRM)		34
5.12.1 HRM del Fragmento de 100 pb		36
5.12.2. HRM del Fragmento de 372 pb	36	
5.12.3. Estandarización de las condiciones para el análisis por HRM de los fragmentos 1, 2 y 3.	36	
6. RESULTADOS		37
6.1. Extracción de ADN	37	
6.2. Amplificación de las Muestras.	37	
6.3. Diseño de <i>Primers</i>		38
6.4. Secuenciación		39
6.5. Determinación de Haplogrupos	40	
6.5.1. Individuos Sanos	40	
6.5.2. Pacientes de Lesiones de Cáncer Cervicouterino (CaCu)		45
6.6. Análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (HRM)		48
6.6.1. Evaluación del Fragmento de 105 pb mediante HRM		48
6.6.2. Evaluación del Fragmento de 372 pb mediante HRM		51
6.6.3. Estandarización de las condiciones necesarias para realizar el análisis por HRM de los fragmentos 1, 2 y 3		52
6.6.3.1. Gradiente de Temperatura		52
6.6.3.2. Efecto de la Pureza de los <i>Primers</i> en los Picos de la Temperatura de Disociación Obtenidos por HRM		54
6.6.3.3. Efecto de la Concentración del Templado en los Picos de la Temperatura de Disociación Obtenidos por HRM		57
6.6.3.4. Duplicados de las Reacciones	61	
6.6.3.5. Elección de las Mejores Condiciones Para Realizar el HRM con los distintos fragmentos evaluados.		66
6.6.4. Evaluación del Análisis Mediante HRM en los Fragmentos 1 y 2		68
6.6.4.1. Análisis Mediante HRM del Fragmento 1 de Pacientes con Lesiones de CaCu		69
6.6.4.2. Análisis Mediante HRM del Fragmento 2 de Pacientes con Lesiones de CaCu		70

7. DISCUSIÓN	71
7.1. Secuenciación y Determinación de Haplogrupos	71
7.2. Análisis por Estandarización de las Condiciones Necesarias para Realizar el HRM de los Fragmentos 1, 2 y 3.	72
7.2.1. Efecto de la pureza de los <i>primers</i> en la Tm	73
7.2.2. Efecto de la Concentración Inicial de Templado en la Tm.	74
7.2.3. Duplicados de las Reacciones.	77
7.2.4. Elección de las Mejores Condiciones Para Realizar el HRM con los distintos fragmentos evaluados.	78
7.2.5. Evaluación del HRM en la Búsqueda de Mutaciones en los Fragmentos Utilizados.	79
8. CONCLUSIONES	82
9. PERSPECTIVAS	83
10. REFERENCIAS	84
11. ANEXOS	89

“Invertir en conocimientos, produce siempre los mejores intereses”.

Benjamin Franklin

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por estar siempre presentes y porque gracias a su cariño, apoyo y confianza he llegado a realizar mis grandes metas en la vida, esta vez la culminación de mi carrera profesional.

A mi director de tesis D.C. Rafael Montiel Duarte por haberme brindado la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, por todo su apoyo durante la realización de mi trabajo de tesis.

A M.C. Andrea Jiménez por todo el conocimiento que compartió conmigo, y su invaluable ayuda durante mi proyecto.

A M.C. Hilda Ramos por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, siempre al tanto de las necesidades de los demás en el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos del galerón 7 de L ANGEPIO porque cada uno aportó parte de su conocimiento, consejos y ayuda durante mi proyecto.

A mis revisores de tesis D.C. Carlos Cortes Penagos, D.C. Rosalio Mercado Camargo, D.C. Rafael Ortiz Alvarado, M.C. Luz Elena Arévalo León y Maria Rocio Lara Madrigal.

A mis amigos por estar ahí siempre en las buenas y en las malas.

A todas las personas que a su manera me apoyaron a lo largo de ese camino que concluye con el presente trabajo.

RESUMEN

Las mitocondrias son indispensables para las células eucariotas debido principalmente a que realizan la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, poseen su propio material genético y participan en otros procesos como el metabolismo y la apoptosis. El deterioro en las funciones de la mitocondria ha sido implicado en una amplia variedad de patologías humanas incluyendo el cáncer. En los últimos diez años se han encontrado mutaciones en el ADN mitocondrial (mtADN) en distintos tipos de cáncer y algunas de estas mutaciones han sido propuestas como biomarcadores moleculares de ciertos tipos de cáncer. El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad del análisis de alta resolución de la curva de disociación (HRM) en la detección de mutaciones puntuales en el mtADN utilizando fragmentos de alrededor de 300 pares de base (pb). Se utilizaron muestras de ADN de sangre y de biopsia de 3 pacientes de cáncer cervicouterino (CaCu), además de muestras de ADN de sangre de dos individuos sanos pertenecientes a dos haplogrupos mitocondriales distintos. Estos últimos se utilizaron para estandarizar las condiciones necesarias para la detección de mutaciones puntuales mediante HRM. Se realizó una búsqueda inicial de mutaciones mediante la secuenciación de algunas regiones del mtADN de las muestras. Además, se diseñó un set de *primers* para realizar la búsqueda de mutaciones mediante HRM. De este set de *primers*, fueron seleccionados 3 pares para buscar algunos polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) diagnósticos de los haplogrupos mitocondriales, y compararlo con los resultados obtenidos mediante secuenciación. Se evaluaron 3 distintas concentraciones iniciales de templado y 3 grados de pureza de *primers*. Mediante secuenciación no se detectó ninguna mutación en las regiones secuenciadas del mtADN de pacientes de CaCu. De estas muestras se determinó el haplogrupo mitocondrial mediante la búsqueda de SNPs característicos, y se lograron detectar estas mutaciones puntuales mediante HRM utilizando un fragmento de 105 pb. En fragmentos con un tamaño superior a los 200 pb no fue posible detectar mutaciones puntuales bajo las condiciones evaluadas.

1. ANTECEDENTES

1.1 MITOCONDRIA

Las mitocondrias son organelos celulares que miden aproximadamente 0.2 a 10 μm de diámetro transversal y de 1 a 4 μm de longitud, están presentes en la mayoría de las células eucariotas, las mitocondrias son indispensables para las células ya que llevan a cabo la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (Attardi y Schatz, 1988). Además las mitocondrias participan en otras funciones como el metabolismo, la homeostasis del calcio, apoptosis, señalamiento y diferenciación celular (Czarnecka y Bartnik 2011). Las mitocondrias poseen su propio material genético, y la maquinaria necesaria para realizar la síntesis de las proteínas codificadas en su genoma. Cada célula posee múltiples mitocondrias y éstas a su vez poseen cientos o miles de copias de ADN mitocondrial (mtADN). Aproximadamente el 97.5% de las 1500 proteínas que conforman a la mitocondria están codificadas en el genoma nuclear, son traducidas en el citoplasma y transportadas a la mitocondria, el otro 2.5% de los genes está codificado en el genoma mitocondrial (Baysal, 2006).

1.1.1. Fosforilación Oxidativa

Una de las principales funciones de la mitocondria es la síntesis de ATP a partir de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), acoplada a la cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria, ésta es la principal forma en que las células obtienen energía. El metabolismo de los carbohidratos es completado en la mitocondria, cuando el piruvato, proveniente de la glicolisis, es oxidado a CO_2 y agua. La fosforilación oxidativa es una vía celular muy eficiente para la obtención de energía, ya que por cada molécula de glucosa oxidada, se obtienen 36 ATPs, mientras que en la glicolisis por cada molécula de glucosa se obtienen 2 ATPs.

Las proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones están localizadas dentro de la membrana mitocondrial interna e incluyen los complejos I, II, III y IV de la cadena del transporte de electrones, y la ATP sintasa (complejo V). En el genoma mitocondrial se encuentran codificadas 13 subunidades de los complejos I, III, IV y V del transporte de electrones. En este proceso los electrones provenientes del ciclo de Krebs son combinados con oxígeno molecular produciendo agua y protones que son expulsados fuera de la membrana hacia la matriz mitocondrial. Posteriormente los protones entran nuevamente al espacio intermembranal hasta la ATP sintasa, este flujo de protones lleva a la condensación de adenosin difosfato (ADP) y un fosfato inorgánico (Pi) para producir ATP, el cual posteriormente es exportado al citosol. (DiMauro & Bonilla 1997, Wallace 1997).

1.1.2. Genoma Mitocondrial

El ADN mitocondrial humano (mtADN) es una molécula de doble cadena, circular de 16,569 pares de bases (pb). El mtADN se encuentra unido a ciertas proteínas de unión (*binding proteins*), formando un complejo denominado nucleoide (Malyarchuk *et al.* 2002). Contiene 37 genes que codifican: 13 proteínas de la cadena de fosforilación oxidativa, 7 subunidades para el complejo I, 1 para la subunidad III, 3 subunidades del complejo IV y 2 subunidades del complejo V; así como 22 ARN de transferencia y dos ARN ribosomales (12S y 16S) esenciales para la síntesis de proteínas dentro de la mitocondria (Shen *et al.* 2011) (Figura 1).

Las cadenas del mtADN reciben el nombre de cadena H (pesada o *heavy*) por su alto contenido en guanina (G), y la cadena L (ligera o *light*). La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena pesada, estas secuencias se distribuyen de forma muy compacta, llegando incluso a superponerse. La cadena ligera solamente contiene la información para la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa y ocho tRNA (Attardi, 1988).

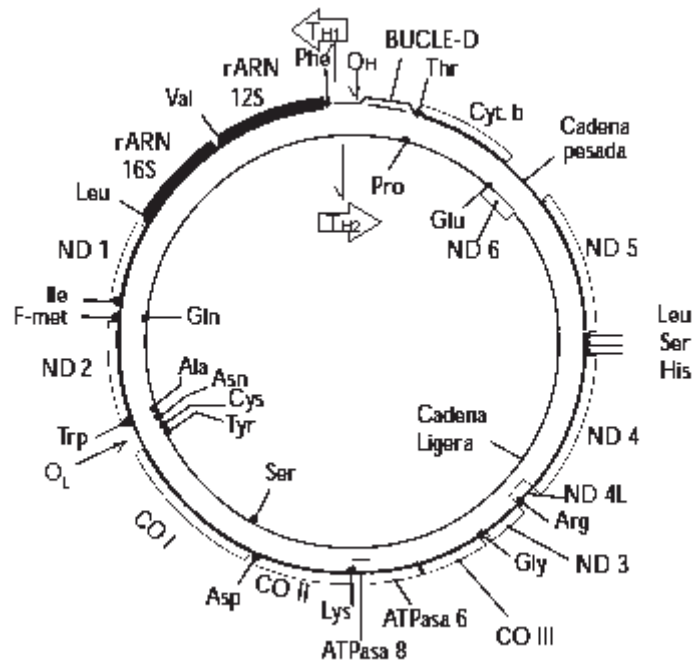


Figura 1. Genoma mitocondrial. Se muestran los genes que codifican: rRNA 12S y 16S, tRNA señalados con la abreviatura del aminoácido que transportan, y secuencias codificadoras de proteínas: 3 subunidades de la Citocromo C Oxidasa (CO I, COX II, COIII), 1 para el Citocromo B (Cyt. b), 6 subunidades de la NADH Deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) y 2 de la ATP sintasa (ATPasa 6 y ATPasa 8). Además se observan las cadenas ligera y pesada, el origen de la replicación de la cadena pesada (O_H), el origen de la replicación de la cadena ligera, y los promotores de la transcripción T_H y T_L .

El asa de desplazamiento o *D-loop*, es una estructura donde las 2 hebras de la doble cadena de la molécula de ADN están separadas por una tercera hebra de ADN. La tercera hebra tiene una secuencia que es complementaria a una de las hebras principales y se aparea con ella, desplazando a la otra cadena principal, la cual forma una estructura en forma de horquilla por complementariedad de bases (Shen *et al*, 2011). El *D-loop* es la región mayor no codificante, ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre los genes que codifican para los tRNAs de prolina y el de fenilalanina.

En el *D-loop* se encuentran el origen de replicación de la cadena H (O_H), los promotores para la transcripción de la cadena pesada (P_H) y de la cadena ligera (P_L), además de dos lugares de unión a factores de transcripción (Tfam),

tres bloques de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación (CSB I, CSB II y CSB III) y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (TAS) (Coskun *et al.* 2003) (Figura 2). Esta región destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes y por su elevada variabilidad intrapoblacional (Vigilant *et al.* 1991), la cual se concentra en tres regiones o segmentos hipervariables (HVS): la región hipervariable I (HVS I) abarca las posiciones 16,024-16,365), la región hipervariable II (HVS II) las posiciones 73-340 y la región hipervariable III (HVS III) las posiciones 438-574. La región más polimórfica es la región HVS I, por lo que ha sido utilizada en estudios de genética, paleogenómica, antropología y la medicina forense.

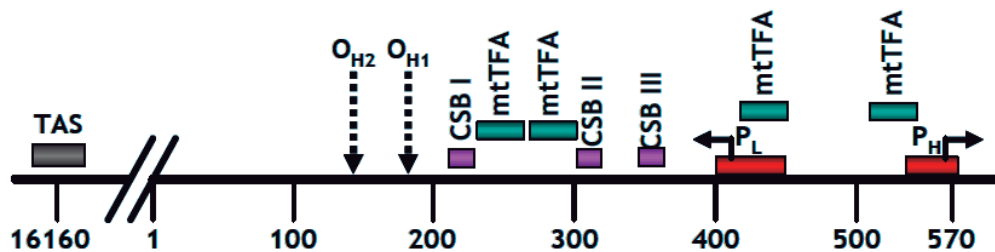


Figura 2. Esquema de la región control o asa de desplazamiento (*D-loop*) del mtADN desde la posición 16,000 a la 570. Los números designan la posición en el mtADN y las cajas de colores representan elementos reguladores. La región control incluye los promotores de las cadenas L (ligera) y H (pesada), los sitios de unión del factor A de transcripción mitocondrial (mtTFA), los bloques de secuencia conservada (CSB) I, II y III, y los orígenes de replicación 1 y 2 de la cadena H (O_{H1} y O_{H2}). TAS: Secuencia de asociación y terminación.

La secuencia completa de un humano se publicó por primera vez en 1981 (Anderson *et al.* 1981). Desde entonces se emplea como la secuencia de referencia (CRS) con la que se comparan las diferencias encontradas en otros genomas mitocondriales. No obstante, en 1999 (Andrews *et al.* 1999) se publicó una versión corregida de esta secuencia (*revised Cambridge Reference Sequence*, (rCRS) manteniendo la numeración original, por lo que es la que se utiliza actualmente como referencia en todos los estudios en los que se analiza mtADN humano.

1.1.2.1. Características

El genoma mitocondrial posee ciertas características especiales que lo distinguen del genoma nuclear. Entre las principales está lo compacto que es dicho genoma, casi todos sus genes se encuentran uno inmediatamente después del otro, aunque existen pequeñas secuencias intergénicas, siendo la mayor el *D loop*.

1.1.2.1.1. Herencia Materna

La herencia del mtADN no responde a la genética mendeliana, el mtADN es esencialmente heredado vía materna (Brandon *et al.*, 2006), el ovocito, con más de 100,000 moléculas de mtADN, es quién aporta la mayoría de mitocondrias durante la fecundación, ya que las mitocondrias paternas se encuentran en la cola del espermatozoide y ésta se pierde en el momento de la fecundación, por lo que la cantidad de mitocondrias aportadas vía paterna es muy baja. Las pocas mitocondrias paternas aportadas suelen eliminarse al ser reconocidas y ubiquitinadas para su degradación (Sutovsky *et al.* 1999). Además, recientemente en *C.elegans* se demostró que las mitocondrias paternas y el mtADN paterno son eliminadas en el ovocito fertilizado, mediante autofagia por degradación lisosomal (Sato & Sato 2011, Al Rawi *et al.* 2011).

1.1.2.1.2. Haplogrupos

Debido a las características de herencia del mtADN las poblaciones humanas pueden ser divididas en base a la variación de secuencia en ciertas posiciones del genoma mitocondrial, conocidas como polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs). Estas mutaciones acumuladas en periodos de tiempo relativamente cortos, se agrupan secuencialmente formando linajes independientes conocidos como haplotipos (Torroni *et al.* 1996). En el proceso de la evolución y migraciones humanas, los descendientes de un haplotipo original podrían acumular posteriormente mutaciones adicionales y generar un grupo relacionado de haplotipos que es conocido como haplogrupo (Rui *et al.* 2011). El análisis de la distribución de los SNPs en la población permite la reconstrucción de

las antiguas migraciones humanas. En la actualidad existen árboles filogenéticos basados en las secuencias de los distintos haplogrupos, los cuales son específicos a nivel de continente (van Oven & Kayser. 2008) (Figura 3).

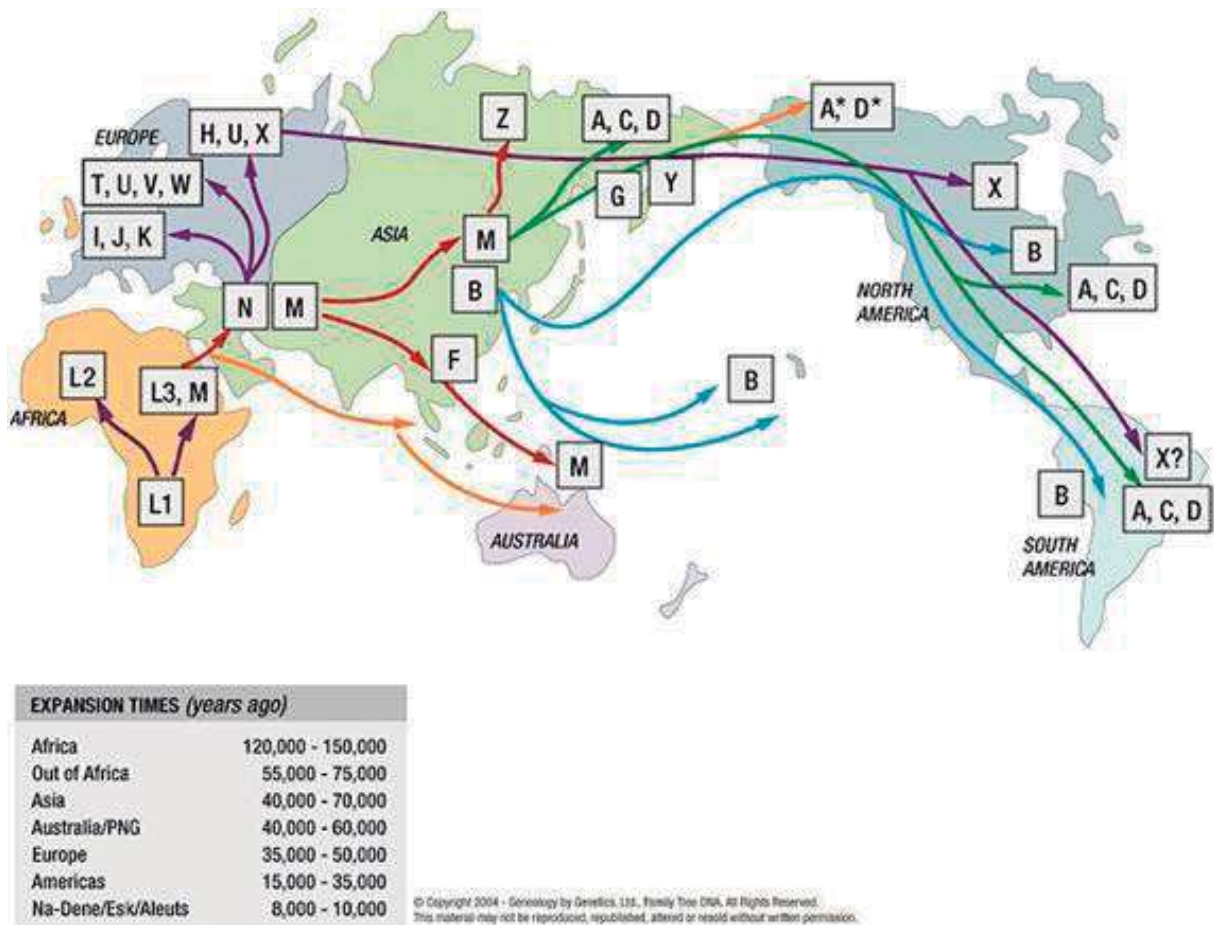


Figura 3. Mapa de la hipótesis de las migraciones humanas, basada en el origen y dispersión de los haplogrupos del ADN mitocondrial (Genetics Ltd., 2004).

1.1.2.1.3. Diferencias en el Código Genético Mitocondrial

El código genético mitocondrial humano (Tabla 1) difiere del nuclear en algunos codones: UGA codifica triptófano en lugar de ser un codón de paro, AGA y AGG son codones de paro en lugar de codificar arginina, AUA y AUU codifican metionina en vez de isoleucina, éstos dos junto con el codón AUG son los tres codones de inicio posibles.

Tabla 1. Código genético mitocondrial humano.

Phe F	UUU UUC	Thr T	ACU ACC ACA ACG	Asp D	GAU GAC
Leu (1) L (UUA/G)	UUA UUG	Ala A	GCU GCC GCA GCG	Glu E	GAA GAG
Leu (2) L (CUN)	CUU CUC CUA CUG	Tyr Y	UAU UAC	Cys C	UGU UGC
Ile I	AUU* AUC	Ter	UAA UAG	Trp W	UGA UGG
Met M	AUA AUG	His H	CAU CAC	Arg R	CGU CGC CGA CGG
Val V	GUU GUC GUA GUG	Gln Q	CAA CAG	Ser (2) S (AGU/C)	AGU AGC
Ser (1) S (UCN)	UCU UCC UCA UCG	Asn N	AAU AAC	STOP	AGA AGG
Pro P	CCU CCC CCA CCG	Lys K	AAA AAG	Gly G	GGU GGC GGA GGG

Tabla 1. El código genético mitocondrial humano difiere del código genético universal, UGA codifica para triptófano en lugar de ser un codón de paro y AUA codifica para metionina en lugar de isoleucina. *AUU codifica para isoleucina durante la elongación pero puede codificar para metionina para el inicio de ND2 (Fearnley & Walker, 1987; Peabody, 1989). Temperley (2010) demostró que la mitocondria humana usa solamente UAA y UAG como codones de paro.

1.1.2.1.4. Elevada Tasa de Mutación

La tasa de mutación del mtADN, es de 5 a 10 veces mayor en comparación con el ADN nuclear (Ritcher, 1988), esto se debe principalmente a que el genoma mitocondrial se encuentra asociado por cercanía a la membrana mitocondrial interna, la cual es el sitio principal de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto hace al mtADN más susceptible a daño por ROS comparado con el

ADN nuclear. Anteriormente se creía que otra de las causas principales de la elevada tasa de mutación del mtADN con respecto al ADN nuclear era la carencia de reparación recombinante y reparación por escisión como en el genoma nuclear (Ritcher. 1988), pero actualmente se sabe que la mitocondria es capaz de reparar la mayoría de las lesiones del mtADN (Larsen *et al*, 2005). La reparación de rompimiento de doble cadena en el mtADN puede ser conducido por recombinación homóloga, debido a la presencia de múltiples copias de mtADN; o la unión de extremos no homólogos, como ocurre en el núcleo (Bacman *et al*. 2009). Si bien ciertas mutaciones del mtADN podrían no ser reparadas y acumularse a lo largo de la vida, aun no se logra clarificar si las mutaciones en el mtADN son una causa o una consecuencia del proceso de tumorigénesis.

1.1.2.1.5. Heteroplasmia y Efecto Umbral

Normalmente todas las copias del mtADN en una célula son iguales, condición conocida como homoplasmia, pero en pacientes con enfermedades mitocondriales debido a mutaciones en el mtADN, con frecuencia se encuentra una mezcla de mtADN mutante y normal, condición conocida como heteroplasmia, (Shen *et al*. 2011). Se ha observado que la heteroplasmia forma parte del proceso evolutivo normal del mtADN, presentándose también en individuos sanos. En un estudio de 210 individuos españoles se determinó que solo el 30% eran homoplásmicos, el resto presentaron algún grado de heteroplasmia. Las formas prevalentes de heteroplasmia fueron mutaciones en las secuencias poli C de las regiones hipervariables I y II (Santos *et al*. 2008). Este efecto también ha sido reportado para otras poblaciones caucásicas (Brandstätter *et al*. 2004).

El fenotipo de una célula, tejido o individuo heteroplásmico depende del porcentaje de mtADN mutante. Si el número de moléculas mutantes es bajo, se producirá una complementación funcional por parte de las moléculas normales dentro de la célula. Al aumentar la proporción de moléculas mutantes la complementación de la función por parte de las moléculas normales se hace más difícil, de forma que se llega a un momento donde no es posible suplir la función;

es entonces cuando se manifiesta un fenotipo patológico. Lo previamente descrito se conoce como efecto umbral, por lo que la condición patológica no se hace aparente en los tejidos hasta que se haya sobrepasado el umbral de cada tipo celular específico, debido a los diferentes requerimientos de ATP de los distintos tipos celulares (Hsui-Chen *et al.* 2010).

1.1.2.1.6. Segregación Replicativa

Durante la mitosis y meiosis las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, lo que se conoce como segregación replicativa (Wallace 1986). La consecuencia de este proceso es que el porcentaje de moléculas mutantes puede variar entre tejidos y también puede ir cambiando a lo largo del tiempo, inclusive puede llegar a un estado de homoplasmia de moléculas de mtADN mutantes.

1.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN EL CÁNCER

El deterioro de las funciones mitocondriales ha sido implicado en una amplia variedad de patologías humanas incluyendo cáncer y en enfermedades relacionadas con la edad tales como diabetes mellitus tipo II, Alzheimer, artritis degenerativa, entre otras (Czarnecka y Bartnik, 2011).

1.2.1. Efecto Warburg

En 1956 Otto Warburg propuso que a diferencia de las células normales, las células cancerosas son dependientes de la glicolisis para la obtención de ATP, en lugar de utilizar la cadena de fosforilación oxidativa para dicha función, como sucede en las células normales. A este proceso se le conoce como efecto Warburg o “glicolisis aeróbica”, este cambio en la forma de producir energía es un paso indispensable hacia la malignidad celular, ya que la glicolisis aeróbica otorga a las células cancerosas una ventaja de crecimiento, y el daño a la cadena de fosforilación oxidativa, les provee una ventaja de proliferación (Simonnet *et al.* 2002).

1.2.2. Especies Reactivas de Oxígeno y Carcinogénesis

Existen diferentes mutaciones en el mtADN reportadas en una gran variedad de cánceres que se piensa contribuyen a una disfunción de la respiración oxidativa y a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y finalmente a un aumento en la desregulación de vías de señalización asociadas con la maduración, proliferación y la apoptosis (Carew *et al.* 2002)

Estas mutaciones pueden causar una variación en la secuencia de aminoácidos de las subunidades codificadas en el mtADN y podrían comprometer la función de la cadena respiratoria y estimular una sobreproducción de ROS. Una excesiva señalización asociada a ROS puede disminuir el potencial apoptótico de la célula, contribuyendo así a su inmortalización; iniciar vías de señalización entre el núcleo y la mitocondria que promueven un fenotipo celular invasivo (Amuthan, 2002) y regular modificaciones epigenéticas en el núcleo y afectar la estabilidad cromosómica (Desler, 2007).

La generación excesiva de ROS dentro de la mitocondria y el constante estrés oxidativo en el ambiente mitocondrial, puede provocar un amplio daño a los genes de la cadena de fosforilación oxidativa y aumentar la disfunción en la respiración y por lo tanto provocar la dependencia en la glucólisis para la síntesis de ATP. Además con el fallo de la cadena de respiración y la consecuente disminución en la síntesis de ATP y acumulación de especies reactivas de oxígeno en la matriz mitocondrial, se crea un ciclo en donde se promueven aun más mutaciones debido al daño que las especies reactivas de oxígeno pueden ocasionar al mtADN.

1.2.3. Heteroplasmia y Desarrollo del Cáncer

En un estudio basado en la resistencia a rotetona, un inhibidor de respiración celular, se desarrolló una técnica para aislar líneas celulares con mutaciones resultantes en una fosforilación oxidativa deficiente (Bai *et al.* 2004).

En tales condiciones selectivas, las células para cubrir sus requerimientos energéticos se adaptaron a la glicolisis para realizar la síntesis de ATP, lo que crea una condición bioenergética similar a la que se observa durante el desarrollo del cáncer (Efecto Warburg). Analizando las clonas resistentes a rotona, se aislaron y caracterizaron líneas celulares que portaban mutaciones homoplásmicas y heteroplásmicas en el mtADN además de una fosforilación oxidativa deficiente. Entre ellas dos líneas celulares portaban una mutación tanto en condiciones heteroplásmicas (76% mutante) como cercanas a la homoplasmia, la mutación observada provoca un cambio en el marco de lectura del gen ND5. Dicha mutación es idéntica a una encontrada en líneas celulares de cáncer de colon. En este estudio se observó que cuando la mutación estaba en condiciones heteroplásmicas el crecimiento tumoral aumentaba, e interesante la formación del tumor era relativamente menor o inhibida cuando la mutación era cercana al 100% (Shen K et al. 2010). Aún se desconoce cómo intervienen las condiciones heteroplásmicas mutantes en el desarrollo y progresión del cáncer.

1.2.4. Mutaciones del mtADN y Cáncer

La participación de la mitocondria y el ADN mitocondrial (mtADN), en varios procesos celulares han hecho de este organelo celular el centro de atención de múltiples estudios debido a la relevancia de la información que podrían aportar estos estudios, particularmente en el proceso de tumorigénesis y progresión del cáncer. La asociación entre el mtADN y el cáncer ha sido discutida desde principios del siglo pasado y más recientemente, ha ganado atención debido a los reportes de mutaciones somáticas del mtADN en diversos tipos de tumores sólidos, incluyendo carcinomas y sarcomas, y también en leucemias y linfomas. (Carew y Huang, 2002).

1.2.4.1. Mutaciones Comunes como Marcadores de Tumorigénesis

En algunas revisiones, entre ellas la de Santos *et al.* (2008) se ha sugerido que algunas de estas mutaciones podrían ser candidatos para ser utilizadas como biomarcadores en cáncer, y además merecen estudios más amplios para conocer cómo está involucrado el mtADN en esta enfermedad, a través de la utilización de modelos experimentales y mediante el uso de análisis de tumores de distintas etapas de avance para determinar: si las mutaciones aparecen en etapas tempranas durante la tumorigénesis; si dichas mutaciones se conservan a lo largo del desarrollo del cáncer hasta etapas tardías de invasión a órganos lejanos al sitio tumoral inicial; si éstas propician otras mutaciones en etapas avanzadas; y la relación de estas mutaciones con la falla de la cadena respiratoria en etapas avanzadas del cáncer, solo por mencionar algunas interrogantes.

Todavía queda mucho por comprender acerca de cómo el mtADN está involucrado en una enfermedad tan compleja como el cáncer. Una de las incertidumbres es si las mutaciones somáticas en el genoma mitocondrial son determinantes para el inicio de la tumorigénesis, provocando una falla en la cadena de respiración, como fue propuesto por Warburg, o si dichas mutaciones en el mtADN son una consecuencia de la tumorigénesis por inestabilidad del genoma nuclear o por una deficiente o dañada interacción entre el núcleo y la mitocondria.

1.2.4.2. Haplogrupos Mitocondriales Asociados a Riesgo de Cáncer

Las variaciones de secuencia en el mtADN de los diversos haplogrupos mitocondriales parecen conferir susceptibilidad genética a distintas enfermedades entre ellas la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el Alzheimer y el cáncer. Se ha demostrado que los individuos con haplogrupos J y K tienen riesgo de desarrollar LHON, mientras que el haplogrupo H tiene un efecto protector de dicha enfermedad conferido por los polimorfismos en su mtADN (Brown *et al.* 2002).

Uno de los primeros polimorfismos descritos en el mtADN y su asociación al cáncer fue el A10398G, polimorfismo asociado al haplogrupo N. Fue el primer polimorfismo descrito como un factor asociado al desarrollo del cáncer de mama en la población polaca, 23% de pacientes con cáncer de mama eran portadores de la mutación (Darvishi *et al.* 2006). Ese mismo polimorfismo fue encontrado por Canter *et al.* (2005) con una alta frecuencia en mujeres afroamericanas con cáncer de mama invasivo. En hombres ha sido asociado en la severidad del cáncer de próstata en afroamericanos, al igual que los polimorfismos 6221 y 7389 (Ray *et al.* 2009).

1.2.4.3. Inestabilidad de Microsatélites Mitocondriales

Las regiones microsatélite mitocondriales son regiones cortas repetitivas de secuencia en el mtADN, un ejemplo es la región de poli C en las posiciones 303-315. Se ha propuesto que mutaciones o incluso variantes presentes en la población en general en este tipo de regiones, podrían conferir predisposición a ciertos tipos de cáncer o participar en el proceso de tumorigénesis, aunque aún permanece sin ser clarificado de qué forma intervienen (Yu *et al.* 2008).

En un estudio donde se utilizaron muestras de tumor y se compararon con muestras de sangre y tejido normal de pacientes de carcinoma maligno de tiroides y bocio nodular, se encontró inestabilidad del microsatélite mitocondrial en la región 303-315 en 2 de las 19 muestras de bocio nodular (10.53%), y 8 de 77 (10.39%) de las muestras de pacientes con carcinomas malignos de tiroides. La mayoría de las mutaciones detectadas fueron inserciones heteroplásmicas. Los resultados indicaron que las alteraciones en el *D-loop* podrían ocurrir antes de la tumorigénesis en la tiroides, y éstas posteriormente podrían acumularse durante el desarrollo del cáncer, por lo que se le confiere un rol tumorigénico al mtADN (Ding *et al.* 2009).

Se han hecho diversos estudios en los que se reportan cambios en la longitud de las secuencias cortas de bases repetidas que conforman los microsatélites, principalmente cambios en el microsatélite 303-315, y que han sido asociados a diversos tipos de cáncer, aunque ha sido reportado que esta variación se encuentra en la población sana (Santos *et al.* 2006, Santos *et al.* 2008).

1.2.4.4. Inserciones

También se han hecho estudios en animales modelo en los cuáles se han encontrado mutaciones en el genoma mitocondrial asociados con cáncer. Uno de estos estudios fue realizado utilizando ratas búfalo con sarcoma de Yoshida, un tipo de cáncer hepático (Taira *et al.* 1983). En dicho estudio se encontraron diferentes tipos de mutaciones, entre ellas una inserción en el *loop* TΨC del tRNA para cisteína. Dicha mutación provoca cambios en la estructura secundaria del tRNA, por lo que podría existir una síntesis de proteínas deficiente o incluso ser inhibida, provocando cambios fenotípicos en las células con este tipo de mutación.

1.2.4.5. Deleciones

Se han reportado más de 100 deleciones que han sido asociadas con varias enfermedades (<http://www.mitomap.org>). Entre estas deleciones, existe una de 4,977 pb que ocurre entre dos repeticiones directas de 13 pares de bases (ACCTCCCTCACCA) en las posiciones 13,447-13,459 y 8470-8482, y ha sido llamada la deleción común debido a que se ha encontrado en diferentes enfermedades esporádicas, tales como el Síndrome de Pearson, el síndrome de Kearns-Sayre y la oftalmoplegia externa crónica progresiva (Taylor *et al.* 2005). Esta deleción también se acumula en varios tejidos durante el envejecimiento, y ha sido utilizada como un biomarcador del daño al mtADN (Meissner *et al.* 2008).

En un estudio de pacientes con cáncer de colon se observó que de 104 pacientes, 20 (19.23%) presentaban la deleción de 4,977 pb en el tejido tumoral o en el tejido vecino al tumor y, de éstos, 10 presentaron la deleción en ambos tejidos, se concluyó que la deleción de 4,977 pb puede jugar un papel importante

en etapas tempranas del cáncer de colon, y también que está involucrado en la alteración del número de copias de mtADN en células cancerosas. Y los autores proponen dicha delección como un posible marcador para cáncer de colon en algunos pacientes (Chen *et al.* 2011).

1.2.4.6. Mutaciones en el *D-loop*

El *D-loop* es la única región no codificante que contiene elementos cruciales para la replicación y la transcripción del mtADN, por lo que mutaciones en esta región pueden afectar de forma significativa la replicación o transcripción del genoma mitocondrial (Coskun *et al.* 2004).

En un estudio en la población china de pacientes con cáncer de estómago, se evaluó la asociación de polimorfismos comunes detectados en una región del *D-loop* conocida como D310, la cual es una región de poli-C (CCCCCTCCCC) localizada entre las posiciones 303 y 315. D310 es parte de una secuencia conservada dentro del *D-loop* y está involucrada en la formación de un híbrido de ARN y ADN con el que se inicia la replicación de la cadena pesada del mtADN (Sanchez-Cespedes *et al.* 2001). El análisis para D310 consistió en la búsqueda de alteraciones de bases en esta región de poli C por delección o inserción de pares de bases. Se mostró la asociación de alteraciones en el primer tracto poli C de la región D310 y el riesgo de cáncer de estómago tanto de hombres como en mujeres y principalmente en individuos de más de 55 años. Además en este mismo estudio se buscó la asociación de otra mutación puntual en el *D-loop* en la posición 16,521 y se demostró que estadísticamente hay una asociación entre el cáncer de estómago y la heteroplasmia de moléculas de mtADN con el polimorfismo C/T en 16,521 (Wei *et al.* 2011).

Se ha demostrado que en pacientes con cáncer de mama, con múltiples polimorfismos en el *D-loop* del mtADN, se tiene un mal pronóstico de recuperación del cáncer (Ye *et al.* 2008). En la mayoría de los mtADN analizados en este

estudio de pacientes de cáncer de mama se encontraron las mutaciones T239C, A263G y C16207, todas presentes en el *D-loop*.

En varios estudios donde se evaluó el *D-loop* del mtADN, incluyendo cáncer de mama (Czarnecka *et al.* 2009), adenocarcinoma de endometrio (Czarnecka *et al.* 2010) y carcinoma vulvar (Klemba *et al.* 2010), las mutaciones fueron detectadas tanto en la región hipervariable I (posiciones 16024-16383) como en la región hipervariable II (posiciones 57-333).

1.2.4.6.1. Mutaciones en el *D-loop* Reportadas en Cáncer Cervicouterino

En un estudio en pacientes hindúes de cáncer cervicouterino, se detectaron mutaciones en el *D-loop* en el 95% de los pacientes (18 de 19), las mutaciones se encontraron en 55 diferentes posiciones a lo largo de las regiones hipervariables 1 y 2, aunque ninguna de estas mutaciones se encontró en más de 2 muestras diferentes. También se hizo un análisis entre las mutaciones encontradas y el grado histopatológico del tejido tumoral sin encontrar una asociación con las mutaciones encontradas en el *D-loop* (Sharma *et al.*, 2005).

1.3. CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda neoplasia maligna más común entre las mujeres alrededor de todo el mundo. Globalmente hay cerca de 500,000 nuevos casos anualmente. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo. En México, en el año 2009, se diagnosticaron cerca de 10 mil casos de CaCu, de los que se registraron cinco mil fallecimientos, así como otros 10 mil casos de lesiones tempranas del cérvix (Lizano-Soberón. 2009). En los años 90 esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% de los casos de cáncer. La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver a mujeres jóvenes infectadas con virus del

papiloma humano (VPH), que a edades de entre 20 y 30 años se les diagnóstica CaCu.

1.3.1. Virus del Papiloma Humano y Factores de Riesgo

En 1976 zur Hausen propuso que existe un vínculo entre la infección con el virus del papiloma humano (VPH) y el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer (zur Hausen, 1976). Actualmente se sabe que la infección es esencial pero no es el factor determinante en el desarrollo del cáncer, existen otros factores como alteraciones en protooncogenes, represores tumorales y la respuesta inmune.

De acuerdo con su capacidad de provocar carcinogénesis, a los VPH se les clasifica en VPH de alto riesgo y VPH de bajo riesgo. A este último grupo pertenecen virus como el VPH 6 y 11 que afectan a cerca del 1% de la población sexualmente activa, estando generalmente asociados con papilomas benignos. Los virus de alto riesgo, como los VPH 16 y 18, causan lesiones en la mucosa genital que pueden progresar a lesiones neoplásicas de alto grado y cáncer.

La mayoría (99.8%) de los casos de CaCu tienen su origen en la infección del virus, transmitido por vía sexual, por lo que los factores de riesgo del CaCu, siguen un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente. Hay una fuerte asociación entre el número de parejas sexuales que ha tenido tanto la mujer como su pareja a lo largo de la vida y la adquisición del VPH. Otros factores son la actividad sexual a edad temprana, tener historial de otras enfermedades de transmisión sexual, verrugas genitales o test papanicolau con resultados anormales.

La edad también es un factor importante ya que la infección es más común en mujeres entre los 18 y 30 años de edad, después de los 30 años la prevalencia decrece. El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere una infección a edades tempranas y una progresión lenta hacia cáncer.

El uso prolongado de anticonceptivos orales es otro factor importante en el desarrollo de CaCu, ya que el genoma viral contiene elementos que responden a glucocorticoides como la progesterona, que es un componente activo de los anticonceptivos orales, e induce la replicación viral (Lopez-Saavedra, 2006). La predisposición genética afecta la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad de resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (Lopez-Saavedra, 2006).

1.3.2. Etapas del Cáncer Cervicouterino

Las etapas del cáncer cervicouterino están numeradas de 1 a 4, de acuerdo al grado de malignidad celular e invasividad del cáncer hacia tejidos circundantes o distantes, cada etapa es dividida en A y B.

Etapa 1. El cáncer ha empezado a crecer en el tejido más profundo del cérvix, sin diseminarse al tejido circundante.

Etapa 2. El cáncer ha empezado a diseminarse fuera del cérvix hacia el tejido circundante.

Etapa 3. El cáncer se ha diseminado lejos del área circundante al cérvix. Tal vez ha crecido en la parte baja de la vagina y hacia los músculos y ligamentos que limitan la pelvis (pared de la pelvis). Puede crecer hasta bloquear las uretras.

Etapa 4. Es la etapa avanzada del cáncer cervicouterino. El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo fuera del cérvix y el útero.

1.3.2.1. Carcinoma *in situ* (Etapa 0)

Se denomina carcinoma *in situ* cuando las células del cérvix muestran cambios cancerosos. Pero estas células anormales están contenidas dentro de una superficie de la capa del cérvix. El carcinoma *in situ* no se considera cáncer, pero en algunas mujeres los cambios celulares provocados por el carcinoma *in situ* llevan al desarrollo de cáncer en años posteriores.

1.3.2.2. Etapa 1

El cáncer se encuentra en el cuello del útero, se divide en etapa 1A y etapa 1B. En la etapa 1A el crecimiento es muy pequeño solo puede observarse con un microscopio o un colposcopio. Se subdivide en etapa 1A1 y 1A2, en la etapa 1A1 el cáncer ha crecido menos de 3 mm dentro de los tejidos del cérvix y menos de 7 mm de ancho. La etapa 1A2 es cuando el cáncer ha crecido entre 3 y 5 mm dentro de los tejidos del cérvix pero es aun más pequeño de 7 mm de ancho.

Etapa 1B: las áreas cancerosas son más grandes, pero el cáncer aun se encuentra solo en los tejidos del cérvix y usualmente no se ha diseminado. En la etapa 1B1 el cáncer no es más grande que 4cm. En la etapa 1B2 el cáncer es más grande que 4 cm (Figura 4).

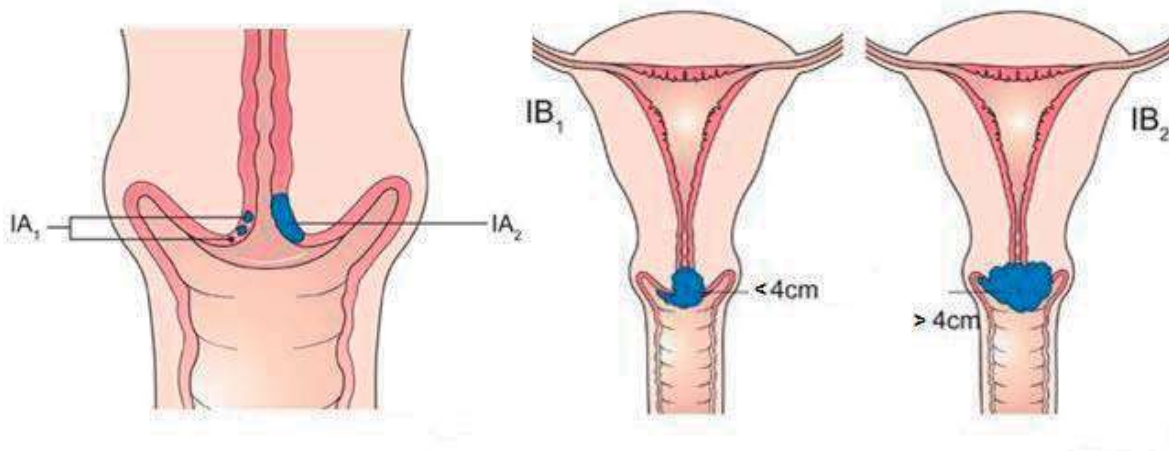


Figura 4. Se muestran las etapas 1A 1, 1A2, 1B1, 1B2 del cáncer cervicouterino (Modificado de Cancer Help UK, 2010).

1.3.2.3. Etapa 2

En la etapa 2, el cáncer ha iniciado a diseminarse fuera del cuello del útero hacia los tejidos circundantes, pero aun no crece en los músculos o ligamentos que limitan la pelvis o a la parte baja de la vagina (Figura 5). La etapa 2 se divide en 2A y 2B.

En la etapa 2A el cáncer se ha diseminado hacia abajo del útero e iniciado a crecer en la parte superior de la vagina. En la etapa 2A el tamaño del tejido canceroso es de 4 cm o menor. En la Etapa 2B se ha diseminado a los tejidos alrededor del cérvix.

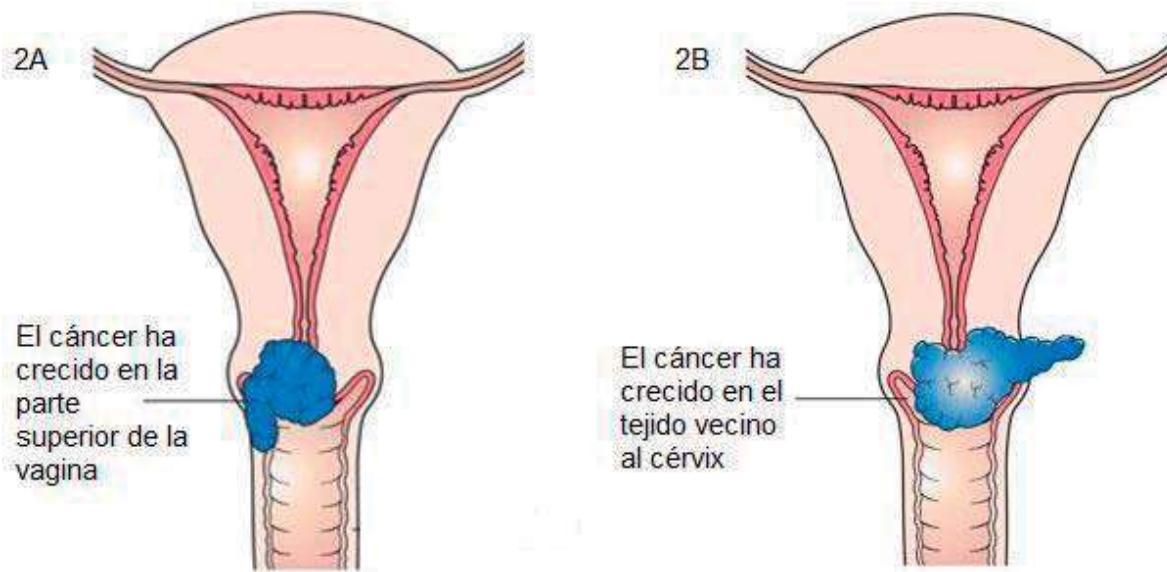


Figura 5. Se muestran las etapas 2A y 2B del cáncer cervicouterino (Modificado de Cancer Help UK, 2010).

1.3.2.4. Etapa 3

El cáncer se ha diseminado lejos del cérvix y del tejido circundante en el área de la pelvis. Pudiendo llegar hacia la parte más baja de la vagina y los músculos y ligamentos que limitan la pelvis y puede crecer hasta bloquear la uretra (Figura 6). Se divide en etapa 3A y 3B.

En la etapa 3A el cáncer se ha diseminado hacia el tercio más bajo de la vagina pero no hacia la pared pélvica. En la etapa 3B el tumor ha crecido a través de la pared pélvica y puede estar bloqueando una o ambas de las uretras renales.

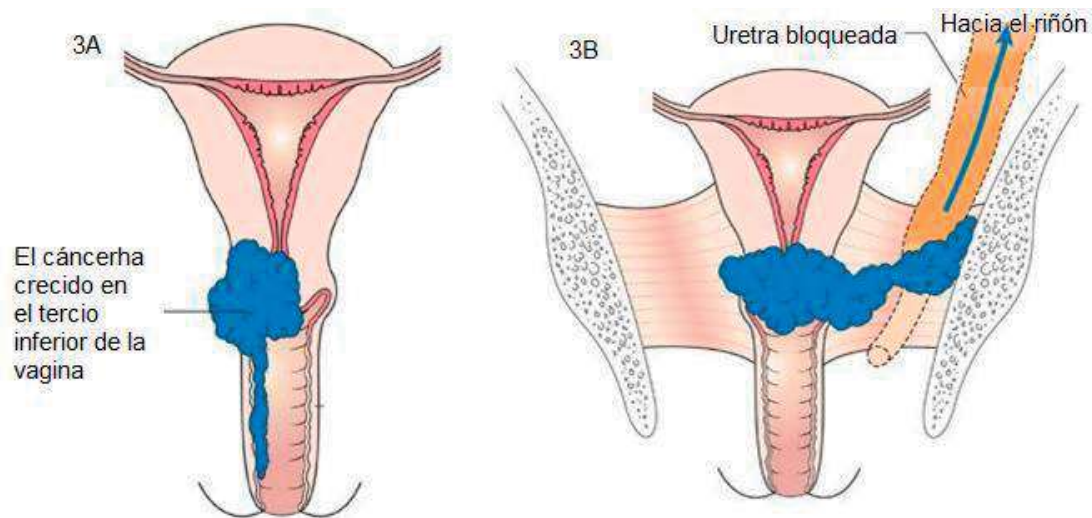


Figura 6. Se muestran las etapas 3A y 3B del cáncer cervicouterino (Modificado de Cancer Help UK, 2010).

1.3.2.5. Etapa 4

Es la etapa más avanzada del cáncer. El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo lejos del cérvix (Figura 7). Se divide en 4A y 4B.

La etapa 4A es cuando el cáncer se ha diseminado a órganos vecinos al cérvix como la vejiga o el recto. En la etapa 4B el cáncer se ha diseminado a órganos lejos del cérvix, por ejemplo hacia los pulmones.

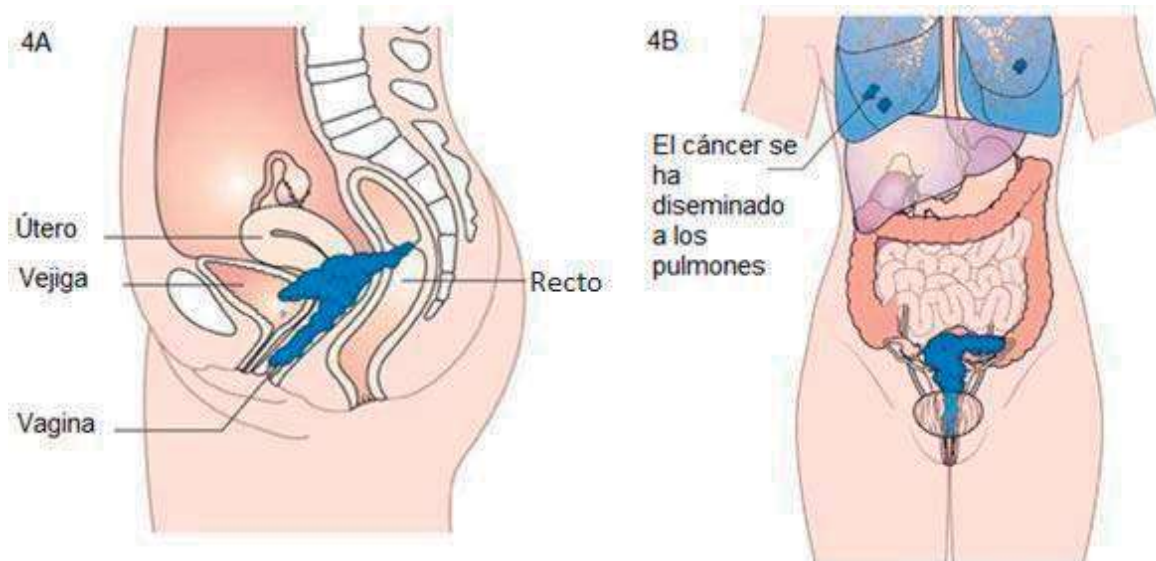


Figura 7. Se muestran las etapas 4A y 4B del cáncer cervicouterino (Modificado de Cancer Help UK, 2010).

1.4. ANÁLISIS DE ALTA RESOLUCIÓN DE LA CURVA DE DISOCIACIÓN (HRM) EN LA BÚSQUEDA DE MUTACIONES

Para realizar todos los estudios que pueden aportar conocimiento acerca del mtADN y su participación en el desarrollo y progresión del cáncer, son necesarias herramientas y técnicas que sean simples y confiables. Particularmente, que faciliten la búsqueda de mutaciones en el mtADN que puedan ser candidatas para esclarecer la participación del genoma mitocondrial y sus características particulares, tales como la heteroplasmia y el efecto umbral, en esta enfermedad. Además técnicas que puedan ser utilizadas como herramientas de diagnóstico temprano.

Para evaluar la presencia de mutaciones se han utilizado diversas técnicas, entre las cuales se encuentra la cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography DHPLC por las siglas en inglés) (Hsiu-Chuan, *et al.* 2010), la electroforesis en gel con gradientes temporales de temperatura (Chen, *et al.* 1999), entre otras. Estas técnicas han sido desplazadas en los últimos años por la secuenciación, que ha sido una gran herramienta para este fin, aunque con un costo muy superior. Otra opción utilizada para la búsqueda de mutaciones es la técnica de análisis de alta resolución de la curva de disociación (HRM, por las siglas en inglés de *High Resolution Melting*). Esta técnica de bajo costo, ha sido utilizada como una alternativa para buscar mutaciones en fragmentos de ADN (Krypuy, *et al.* 2006, Dobrowolsky, *et al.* 2009).

El análisis mediante HRM es un método para detectar variaciones de secuencia en el ADN, está basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) y la temperatura de disociación (T_m) de la cadena de ADN. Un fragmento de ADN disocia a una determinada temperatura de acuerdo a su secuencia de nucleótidos, por lo tanto mutaciones en un determinado fragmento de ADN provocarán una distinta T_m . Este tipo de análisis es simple y confiable, además disminuye el riesgo de contaminación de la muestra, ya que para realizarla solo es necesario extraer ADN y amplificar, no se requieren de pasos posteriores a la amplificación como en la secuenciación o en las otras técnicas mencionadas. Una vez estandarizadas las

condiciones para la amplificación de las regiones que serán evaluadas, el análisis por HRM se acopla a la amplificación en el mismo ensayo, además de que se tiene la ventaja de poder evaluar al mismo tiempo tantas muestras como se tenga capacidad para amplificar en el mismo equipo. Todo sin necesidad de tener que destapar los tubos o de realizar estudios posteriores a la amplificación, evitando así varios pasos donde existe el riesgo de contaminación de la muestra.

Existen diversos estudios en los cuales se ha utilizado el HRM en la búsqueda de mutaciones en fragmentos pequeños de ADN menores de 100 pb. En un estudio realizado en pacientes con encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctea y episodios semejantes a la apoplejía (Síndrome MELAS) y pérdida del oído aminoglucosídica, de los cuales se conocía la presencia de diversas mutaciones en el mtADN por secuenciación, se eligieron las mutaciones A8344G y A1555G respectivamente, para evaluar la capacidad del HRM de detectarlas en fragmentos pequeños de alrededor de 65 pares de base. El resultado fue que el 100% de las mutaciones fueron detectadas utilizando este método (Dobrowolski, *et al.* 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Para realizar los estudios relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer, son necesarias herramientas y técnicas que sean simples, confiables y que faciliten dichos estudios, particularmente en la búsqueda de mutaciones puntuales en el mtADN humano relacionadas con esta patología, ya que en los últimos años se han descrito mutaciones en el mtADN con una alta frecuencia en distintos tipos de cáncer, aunque no es del todo claro la forma en que participa el genoma mitocondrial en el proceso de carcinogénesis. Debido a las ventajas que ha demostrado tener el análisis por HRM frente a otros métodos utilizados, es de importancia evaluar la utilidad de esta técnica en la detección de mutaciones, ya que entre los beneficios que otorga esta técnica se encuentra la rapidez en la obtención de resultados y el impacto costo-beneficio. La finalidad de la evaluación del análisis por HRM, es estandarizar esta técnica para realizar la detección en el mtADN de mutaciones puntuales relevantes en pacientes con cáncer y posteriormente estas mutaciones puedan ser candidatas a utilizarse como biomarcadores moleculares de distintos grados de desdiferenciación celular en función de la detección en etapas tempranas de esta patología y se pueda ofrecer un mejor tratamiento a los pacientes.

3. HIPOTESIS

Debido a la capacidad de detección de cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN que posee la técnica de análisis de alta resolución de la curva de disociación es posible detectar mutaciones puntuales en el genoma mitocondrial en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino.

4. OBJETIVO

Evaluar la utilidad de la técnica de análisis de alta resolución de la curva de disociación (HRM), particularmente el pico de la temperatura de disociación (T_m) utilizando amplicones de alrededor de 300 pb, en la búsqueda de mutaciones puntuales en el mtADN en pacientes de cáncer.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Buscar mutaciones en el genoma mitocondrial de 3 pacientes de CaCu con distintas etapas de la enfermedad.
- Determinar mediante HRM el haplogrupo mitocondrial de los pacientes de CaCu y de los 2 individuos sanos.
- Evaluar la utilidad de fragmentos de alrededor de 300 pb en la detección de mutaciones puntuales mediante HRM utilizando distintas concentraciones de templado y distintos grados de pureza de *primers*

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Muestras

Se utilizaron muestras de lesiones de cáncer cervicouterino, las cuáles fueron donadas, bajo consentimiento informado, por pacientes del Hospital General Regional de León (HGRL) de la ciudad de León Guanajuato, en el periodo noviembre 2009 a marzo del 2010. El protocolo fue revisado y aprobado por el Departamento de Enseñanza e Investigación en conjunto con el Comité de Investigación de dicho hospital. Se utilizaron 2 muestras por paciente, una de sangre obtenida por punción venosa, colectada en tubo vacutainer con EDTA (1.8 mg/ml) y otra proveniente de biopsia; se utilizaron las muestras de 3 pacientes, cada uno con diferente etapa de avance del cáncer (Tabla 2). La toma de muestra fue realizada por la Dra. Patricia Ortega y el Dr. Adalberto Vázquez del HGRL y se contó con el apoyo de la Dra. Silvia Quintana, de la Dirección de Investigación de la Secretaría de Salud del Estado de Guanajuato, para la organización del circuito de colecta y envío de las muestras al LANGEBIO.

Tabla 2. Relación de las muestras de lesiones de cáncer cervicouterino, cada una de ellas con diferente etapa de avance del cáncer: lesión intraepitelial de bajo grado (LBG, etapa 1), carcinoma *in situ* (CIS) y metástasis (Invasor, etapa 4). Se muestra la edad de las pacientes, si se detectó virus del papiloma humano (VPH) en estudios de citología, los antecedentes hereditarios, el diagnóstico clínico y el diagnóstico histopatológico.

Muestra	Edad	Antecedentes Hereditarios	Detección de VPH en Citología	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Histopatológico
103	24	Diabetes	Si	LBG	LBG
89	47	Diabetes Cáncer	No	CIS	CIS
98	53	Negados	No	Invasor	Invasor

También se utilizaron 2 muestras de individuos sanos para realizar la estandarización de las condiciones necesarias para la amplificación, secuenciación y análisis de alta resolución de la curva de disociación.

5.2. Extracción de ADN de Sangre

A partir de 3 ml de sangre colectada en tubos vacutainer conteniendo 7.2 mg de EDTA, se añadió solución de NaCl al 0.9% hasta un volumen de 15 ml en tubos cónicos estériles de polipropileno de 15 ml y se mezcló suavemente por inversión. Posteriormente se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Se descartó la fase superior con pipeta Pasteur, con cuidado de no tomar la interfase de leucocitos. Se añadió solución de lisis de eritrocitos (TRIS HCl 0.02M pH 7.5 y MgCl₂ 0.005 M) hasta un volumen de 15 ml y se agitó suavemente. Después se centrifugó a 3500 r. p.m. 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante por decantación. Se añadió el buffer de lisis de eritrocitos cuantas veces fue necesario hasta tener una solución de eritrocitos. Posteriormente se añadió 3 ml de solución de lisis de leucocitos (TRIS pH 8.5 0.025M, NaCl 1M; EDTA pH 8.0 0.005 M), 200 µl de SDS al 10% y 128 µl de solución de proteinasa K del kit de extracción Quick Gene DNA tissue kit S (Life Science, Fuji film, No. Cat. DT-S). Se agitó hasta que la muestra tuviera un aspecto homogéneo. Se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche (16 horas). Se añadió 1 ml de NaCl 5.5 M y se agitó. Posteriormente se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente para eliminar el máximo de sales, que podrían interferir en la amplificación del ADN. Se añadió cloroformo (V/V) y se mezcló. A continuación se centrifugó a 3500 r.p.m. 15 minutos a 4°C. Se recuperó con pipeta Pasteur la fase superior y se traspasó a un tubo cónico de polipropileno nuevo y limpio. Se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló lentamente. El ADN se recuperó utilizando una pipeta Pasteur de cristal y se traspasó a un tubo eppendorf de 2 ml nuevo y estéril, posteriormente se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar.

Una vez seco se agregaron 500 µl de agua MilliQ estéril. Finalmente se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 8 volts/cm durante 30 minutos para evaluar la integridad del ADN extraído.

5.3. Extracción de ADN de Biopsias.

El ADN de las biopsias fue extraído con ayuda del sistema Quick Gene DNA tissue kit S (Life Science, Fujifilm, No. Cat. DT-S), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN de tejido animal, con las siguientes modificaciones: no se realizó el tratamiento con ARNasa posterior a la incubación de toda la noche a 55°C; se eluyó el ADN obtenido en 50µl de Buffer de elución. Posteriormente se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 8 volts/cm durante 30 minutos para evaluar la integridad del ADN extraído.

5.4. Evaluación de la Integridad del ADN

Después de realizar las electroforesis en geles de agarosa para evaluar la integridad del ADN, dichos geles se observaban con la ayuda del equipo Chemi Doc™ XRS (BIO-RAD) y el software Quantity One 4.6.1 Basic (BIO-RAD).

5.5. Cuantificación de la Concentración del ADN

Para cuantificar el ADN obtenido después de su extracción, amplificación, concentración y/o purificación siempre se utilizaron 2µl de muestra y se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo SCIENTIFIC) y el software ND-8000 V2.1.0 proporcionado por el fabricante junto con el equipo.

5.6. Amplificación Muestras

A partir del ADN extraído de sangre y biopsias se amplificó el ADN mitocondrial usando la enzima Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen No. Cat. 11304-029), esta polimerasa permite la amplificación de fragmentos de hasta 20 kilopares de bases (kb), por lo cual se eligió para amplificar el ADN mitocondrial en 2 fragmentos que se sobrepone de aproximadamente 8.5 kb cada uno, denominados fragmento A y B; los *primers*

utilizados fueron los descritos por Fendt et. al. (2009) (Tabla 3). El fragmento A abarca desde la posición 2669 hasta la 10937 y el fragmento B desde 10672 hasta la posición 2499, según la numeración de la secuencia de referencia (rCRS)(Andrews et al. 1999). El extremo 3' del fragmento B se superpone con el extremo 5' del fragmento A en 170 pares de bases (pb), en tanto que el extremo 3' del fragmento B se superpone con el extremo 5' del fragmento A en 265 pares de bases (Figura 8). Los productos de PCR fueron observados en gel de agarosa al 1.5%, dejándose correr 35 minutos a 8 volts/cm en cámara de electroforesis.

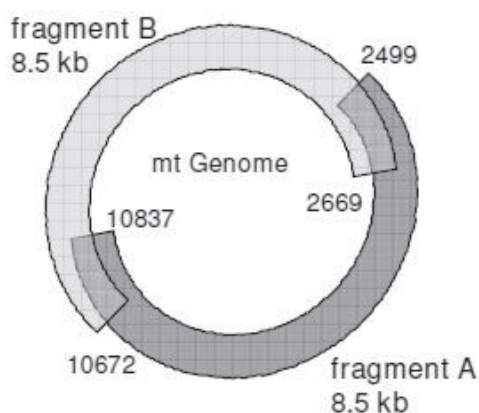


Figura 8. Genoma mitocondrial humano, se muestran los fragmentos A y B, a mbos de aproximadamente 8.5 kb, con los cuales fue amplificado el ADN mitocondrial, el fragmento A abarca desde la posición 2499 a la 10837, y el fragmento B de la posición 10672 hasta 2499.

Tabla 3. Lista de *primers* utilizados para la amplificación del ADN mitocondrial. Se muestra el nombre del *primer*, su secuencia en sentido 5' a 3' y el fragmento al que pertenece (Fendt et al. 2009).

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia 5' → 3'	Fragmento
FampA	AAATCTTACCCCGCCTGTTT	A
RampA	AATTAGGCTGTGGGTGGTTG	A
FampB	GCCATACTAGTCTTTGCCGC	B
RampB	GGCAGGTCAATTTCACTGGT	B

5.7. Purificación de los Amplicones

Los amplicones fueron purificados con el kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen No.Cat. K3-100-02 Lote 404110) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, obteniendo un total de 50 µl de muestra purificada.

5.8. Concentración de los Amplicones

Debido a que con la concentración de ADN obtenida después de la amplificación de las muestras por PCR y su posterior purificación no era suficiente para secuenciar, las muestras fueron concentradas utilizando el kit Amicon^R Ultra Centrifugal Filter Units (Tubos de 0.5ml, Membrana Ultracel^R de 30 K) (Millipore).

5.9. Diseño de *Primers*

Se diseñaron un total de 69 *primers* para el análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (*High Resolution Melting*, o HRM, por sus siglas en inglés), todos los *primers* utilizados fueron diseñados con el programa Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International Versión 5.00), utilizando como molde la secuencia del genoma mitocondrial de referencia (rCRS) (Andrews *et al.* 1999). La temperatura de disociación de los *primers* fue entre 59°C y 61°C y el contenido de GC entre 40-60%. Los criterios para el diseño de *primers* se ajustaron a las siguientes condiciones: concentración de ADN 250.0 pM, concentración de Iones monovalentes 17.0 mM, concentración de Mg²⁺ Libres 1.5 mM.

5.10. Secuenciación

Las muestras se mandaron secuenciar al área de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica Para La Biodiversidad. Se necesitaron 165 µl de cada muestra a una concentración de 40 ng/µl (2.5 µl por reacción). Las muestras fueron secuenciadas en placas de 96 pozos, cada muestra en una placa (ambos fragmentos: A y B), se utilizó el método de Sanger (secuenciación por capilares), utilizando 66 *primers* reportados por Ramos *et. al.* (2009) y Fendt *et al.* (2009), 32 *primers* para el fragmento A (16 *forward* y 16 *reverse*) y 34 *primers* (17 *forward* y 17 *reverse*) para el fragmento B (Tabla 4. Figura 9).

Tabla 4. *Primers* utilizados para secuenciar el genoma mitocondrial humano. Se muestra el nombre del primer, su secuencia de 5' a 3' y el fragmento al que pertenece. Los *primers* marcados con un asterisco pertenecen a los reportados por Fendt *et al.* (2009) el resto fueron reportados por Ramos *et al.* (2009).

Primer	Secuencia 5'-3'	Fragmento	Primer	Secuencia 5'-3'	Fragmento
FampA *	aaatcttaccgccctggtt	A	FampB*	gccatactagctcttgcgc	B
RampA *	aattaggctgtgggtggtg	A	RampB *	ggcaggtcaatttctactggt	B
411for	cggtatgcactttaacagtc	B	16281rev	gttggtatcctagtggtgag	B
909for	gattaaccaagtcaatagaa	B	15825rev	gtgaagtatagtagcggatgct	B
1404for	acttaagggtcgaagggtgatt	B	15349rev	gtgcaagaataggaggtggagt	B
2028for	gatagaatcttagttcaactt	B	14838rev	catcatcggagatgttgat	B
2646for	ggttcagctgtcttacttt	A	14325rev	aacttaatagtagtaggaagc	B
3239for	gcagagcccggtaatcgcata	A	13830rev	aagtcctaggaagtacagcga	B
3734for	aagtcaccctagccatattcta	A	13297rev	ggttgatgccgattgtaacta	B
4346for	gaacctatcctgagaatcca	A	12763rev	cgatgaacagttggaataggt	B
4896for	taccaaatctctccctacta	A	12226rev	cagttctgtgagctttctcgg	B
5468for	cagctactcctactatctc	A	11673rev	gttggatgagaatggctgtt	B
5995for	cagctctaagcctcttattc	A	11163rev	cgggtgatgatagccaaggtg	B
6511for	ctgctggcatcactatactacta	A	10648rev	ggcacaatattggctaagaggg	A
7111for	acaccctagaccaaacctacg	A	10154rev	ttctatgtagccgttgagttg	A
7713for	tcctaactcacaacaaaac	A	9647rev	agctcaggtgattgatactcc	A
8311for	tagcattaacctttaagtta	A	9220rev	gattggtgggtcattatgtgtt	A
8910for	cttaccacaaggcacacttaca	A	8600rev	agaatgatcagtagcggcg	A
9393for	cgagaaagcacataccaaggc	A	8000rev	caactcaaggagtcgcaggt	A
9874for	taatatttctactttacatcca	A	7359rev	ctactattaggacttttctgct	A
10360for	gtctggcctatgagtactaca	A	6739rev	gatatcatagctcagaccatacc	A
10892for	atcaacaacaacctatttagc	B	6154rev	ggaactagtcagttgcaaag	A
11461for	actcttaaaactaggcggcta	B	5571rev	aagtattgcaacttactgagg	A
11977for	ctccctctacatattaccacaac	B	5017rev	gaggagtatgctaagattttg	A
12500for	tgtgcctagaccaagaagtta	B	4421rev	cttatttagctgaccttactt	A
12988for	ctagcagcagcaggcaaatca	B	3947rev	tcgatgttgaagcctgagacta	A
13477for	gcaggaataccttctctacag	B	3382rev	ttcggtcgtaagcattagga	A
13950for	ctatctaggccttcttagag	B	2801rev	taatgcaggtttgtagttta	A
14440for	atactcctcaatagccatcgc	B	2263rev	gggtgtgaggagttcagttat	B
14898for	tagccatgcactactaccaga	B	1677rev	gttagctcagagcggtaagt	B
15416for	tacacaatcaaagacgcctc	B	1159rev	taagctgtggctcgtagtgt	B
15966for	agtctttaactccaccattag	B	638rev	ggtgatgtgagcccgtctaaa	B
16488for	ctgtatccgacatctggttct	B	151rev	ggatgaggcaggaatcaaagac	B

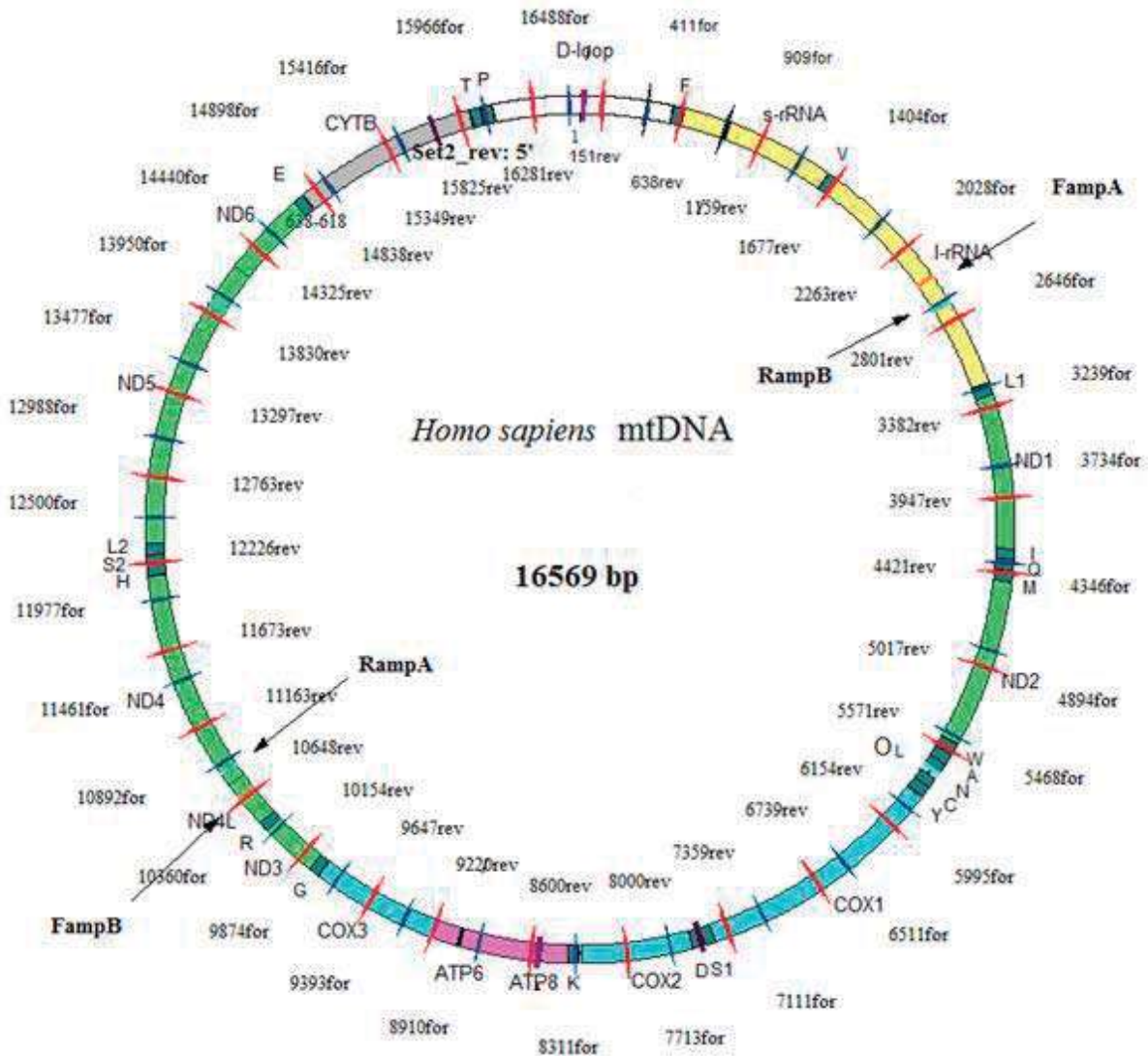


Figura 9. Localización de los *primers* utilizados para secuenciar el genoma mitocondrial, referidos en la T abla 4. Las líneas en color azul muestran la localización de los *primers* forward y las líneas en color rojo los *primers* reverse. Se muestran además los genes que codifican: rRNA 12S y 16S (en color amarillo), tRNA señalados con la abreviatura del aminoácido que transportan, y secuencias codificadoras de proteínas: 3 subunidades de la Citocromo C Oxidasa (COX1, COX2, COX3 en color azul), Citocromo B (CYTB en color gris), y subunidades de la NADH Des hidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 en color verde) y dos subunidadesde la ATP sintasa (ATP6 y ATP8 en color rosa).

5.11. Análisis de Resultados de la Secuenciación

Los electroferogramas fueron analizados con la ayuda de los software: BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.3 (Hall 2005) y Finch TV versión 1.4.0 (Geospiza Inc. 2006)

5.12. Análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (HRM)

Para evaluar la capacidad del HRM para detectar mutaciones puntuales en muestras de mtADN de pacientes con cáncer cervicouterino, se realizó la estandarización de este análisis con las muestras de los individuos sanos (RM y BA). Se evaluaron 5 fragmentos distintos y de diferentes tamaños, en los que se conoce que existen SNPs característicos de los haplogrupos A y H, a los cuales pertenecen las muestras de individuos sanos y de los pacientes de lesiones de cáncer cervicouterino (conocidos por secuenciación). Para 2 de estos fragmentos, uno de alrededor de 100 pb y otro de 372 pb, ya se había descrito en el laboratorio previamente las condiciones necesarias para su amplificación por PCR por lo que no fue necesario estandarizar. Para los 3 fragmentos restantes, denominados fragmento 1, 2 y 3, se eligieron tres pares de los *primers* diseñados (Tabla 6), éstos fueron pedidos a Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. y se estandarizaron las condiciones necesarias para su amplificación por PCR. El fragmento 1 tiene un tamaño de 235 pb, amplificado por los *primers* L535 y H769, dentro del cual, se encuentra el SNP A663G característico del haplogrupo A. El fragmento 2 tiene un tamaño de 318 pb, y dentro de éste se encuentra el SNP C7028C característico del haplogrupo H. Este fragmento fue amplificado con el *primer* L6930 y el H7248. El fragmento 3 tiene un tamaño de 318 pb, y dentro del cual se encuentra el SNP C14766T característico del haplogrupo A. Este fragmento fue amplificado con el *primer* L14680 y el H14998 (Tabla5).

Tabla 5. *Primers* utilizados para el análisis HRM, su secuencia y el tamaño del fragmento.

Primer	Tamaño Fragmento	Secuencia
L535	234	(Forward) 5' CCCATACCCGAACCAACC 3'
H769		(Reverse) 5' CTGCGTGCTTGATGCTTGTC 3'
L6930	318	(Forward) 5' GGATTCATCTTTCTTTTCACCGTAG 3'
H7248		(Reverse) 5' TGGTGTATGCATCGGGGTAGTC 3'
L14680	318	(Forward) 5' CGCACGGACTACAACCACG 3'
H14998		(Reverse) 5' GGCGTGAAGGTAGCGGATG 3'

El HRM se realizó en el equipo Light Cycler® 480 II (Roche), en placas de 96 pozos, en volumen de 20 μl por ensayo, con las siguientes condiciones: 10 μl de Buffer 2x HRM Master Mix, el cual contiene polimerasa, los dNTPs y Eva Green como fluorocromo; 7.4 μl de H_2O grado PCR, 1.2 μl de MgCl_2 , 0.2 μl de *primer forward* (0.1 μM) y 0.2 μl de *primer reverse* (0.1 μM) y 1 μl de ADN genómico con distintas concentraciones: 6 ng/ μl para los ensayos con fragmentos amplificados de 100 y 372 pb; y 5, 10 y 15 ng/ μl para la estandarización de condiciones para los fragmentos 1, 2 y 3. La estandarización se realizó utilizando las muestras de mtADN de individuos sanos y posteriormente se realizó un ensayo con las muestras de tumores. El programa con el que se realizó el HRM fue primeramente 1 ciclo de activación durante 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de amplificación: desnaturalización de la doble hebra de ADN a 95°C por 10 segundos, el alineamiento de los *primers* fue variable entre 56 y 60°C dependiendo del fragmento por amplificar (descripción más adelante) durante 30 segundos, una extensión a 72°C por 20 segundos. A continuación un ciclo de HRM: 95°C 1 minuto, 40°C 1 minuto, un calentamiento de 65°C a 95°C con 25 mediciones de fluorescencia entre estas temperaturas, finalmente 10 segundos a 40°C (Figura10).

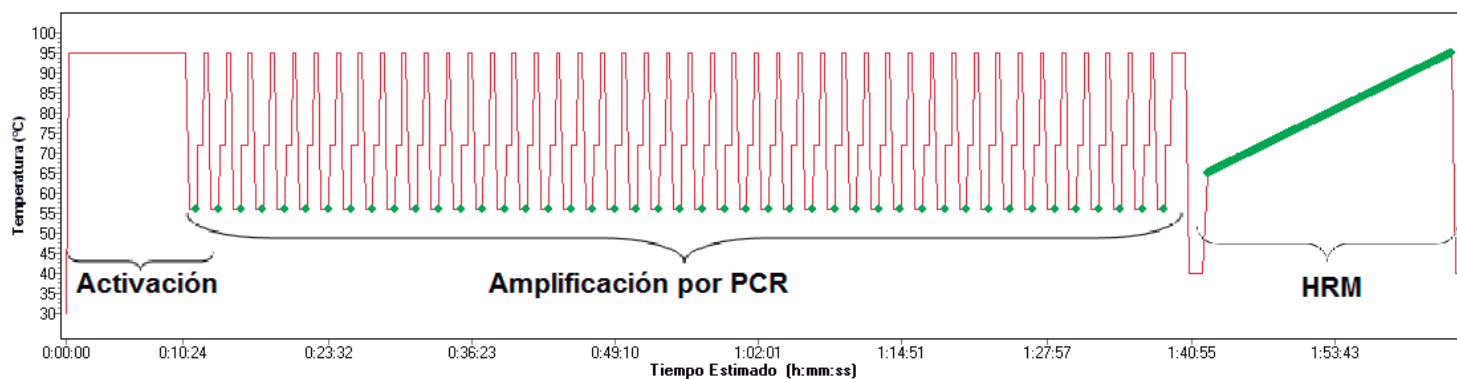


Figura 10. Gráfica del programa de amplificación y HRM. Se muestra en color rojo la curva de la temperatura y en color verde los puntos donde se midió la fluorescencia emitida para realizar la cuantificación del amplificado y el análisis mediante HRM.

5.12.1 HRM del Fragmento de 100 pb

Las condiciones para el análisis por HRM de este fragmento fueron las mismas que las descritas anteriormente, solo con un cambio a 56°C en la temperatura de alineamiento durante el programa del PCR.

5.12.2. HRM del Fragmento de 372 pb

Las condiciones para el análisis por HRM de este fragmento fueron iguales a las descritas previamente, solo hubo un cambio a 58°C en la temperatura de alineamiento durante el PCR.

5.12.3. Estandarización de las condiciones para el análisis por HRM de los fragmentos 1, 2 y 3

Como primer paso para la estandarización de las condiciones necesarias para la amplificación de los fragmentos 1, 2 y 3 se realizó un PCR punto final con un gradiente de temperatura, variando la temperatura de alineamiento en tres temperaturas: 56, 58 y 59°C.

Para la estandarización de las condiciones necesarias para realizar el análisis por HRM de los tres fragmentos, se utilizaron las muestras de individuos sanos (RM y BA) ya que se conocía por los resultados de la secuenciación que pertenecen a distintos haplogrupos mitocondriales (H y A respectivamente). Se evaluaron tres distintos grados de pureza de *primers*: desalados (DST), purificados mediante cartuchos de fase reversa (RP1) y purificados por cromatografía líquida de alta eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC por sus siglas en inglés), además se utilizaron tres distintas concentraciones de templado: 5, 10 y 15 ng/μl.

6. RESULTADOS

6.1. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de las muestras de biopsia y sangre de los 3 pacientes de cáncer cervicouterino, además del ADN de 2 muestras de sangre de individuos sanos. Las muestras fueron marcadas como 89 (paciente con carcinoma *in situ*), 98 (paciente de cáncer invasor), 103 (paciente con lesión de bajo grado) RM (individuo sano 1) y BA (individuo sano 2). El ADN extraído de biopsia fue eluido en 50 µl de buffer de elución del kit Quick Gene DNA tissue (Fujifilm) y el ADN extraído de sangre fue eluido en 50 µl de H₂O milli-Q.

6.2. Amplificación de las Muestras

A partir del ADN genómico extraído se realizó la amplificación del mtADN de las muestras tanto de tumor como de sangre y de los dos individuos sanos, en dos fragmentos denominados A y B, ambos con un tamaño de aproximadamente 8.5 kilobases (kb) (Figura 11).

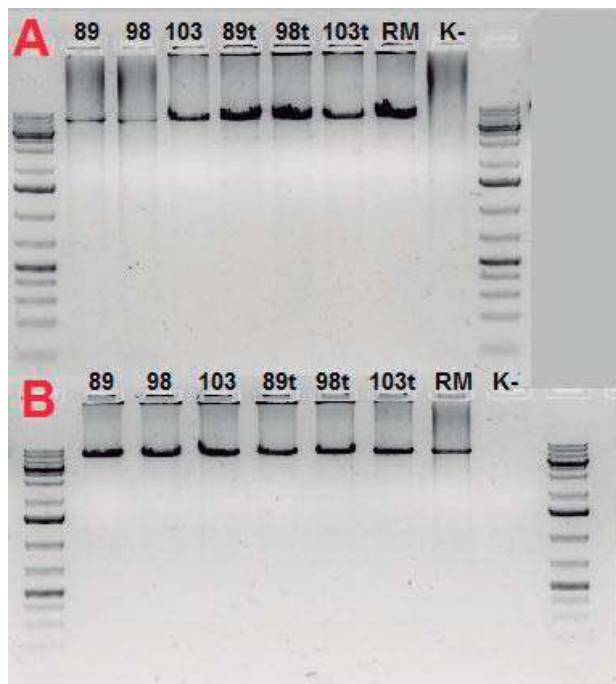


Figura 11. Se muestran los fragmentos (A y B) en los cuales fue amplificado por PCR el ADN mitocondrial, la **t** indica que la muestra es proveniente de biopsia, las restantes provienen de sangre, RM es un control positivo de un individuo sano y K- es un control negativo.

6.3. Diseño de *Primers*

Se diseñaron un total de 69 pares de *primers* para el análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (HRM) (Tabla 6) (Anexos TablaS1). El nombre de los *primers* corresponde a la posición donde inician la amplificación del ADN, indicando con L si son los *forward* y con H si son *reverse*. Las temperaturas de disociación de los *primers* se encuentran entre 59°C y 61°C, con un contenido de GC entre 40-60%.

Tabla 6. Secuencia de algunos *primers* para el análisis por HRM del mtADN. En el anexo 1 se muestra la tabla con todos la lista de *primers* diseñados para HRM.

<i>Primer</i>	Secuencia
L119	(Sense primer) 5' TCGCAGTATCTGTCTTTGATTCT 3'
H390	(Anti-sense primer) 5' TCTGGTTAGGCTGGTGTAGGG 3'
L330	(Sense primer) 5' CACTTAAACACATCTCTGCCAAACC 3'
H587	(Anti-sense primer) 5' GCTACATAAACTGTGGGGGGTG 3'
L535	(Sense primer) 5' CCCATACCCCGAACCAACC 3'
H769	(Anti-sense primer) 5' CTGCGTGCTTGATGCTTGTTTC 3'
L717	(Sense primer) 5' GAGTTCACCCTCAAATCACCACG 3'
H973	(Anti-sense primer) 5' GCTTTATTGGGGAGGGGGT 3'
L922	(Sense primer) 5' CAATAGAAGCCGGCGTAAAGA 3'
H1192	(Anti-sense primer) 5' GGGATATGAAGCACCGCCAG 3'
L1143	(Sense primer) 5' CTACGAGCCACAGCTTAAACACA 3'
H1429	(Anti-sense primer) 5' GCTAAATCCACCTTCGACCCTT 3'
L1372	(Sense primer) 5' CTACCCAGAAAACACTACGATAGCC 3'
H1678	(Anti-sense primer) 5' GGTTTAGCTCAGAGCGGTCAAGT 3'
L1619	(Sense primer) 5' CAAAGCACCAACTTACACTTAGG 3'
H1927	(Anti-sense primer) 5' CTTAGGTAGCTCGTCTGGTTTCG 3'
L1879	(Sense primer) 5' GCAAGGAGAGCCAAAGCTAAGAC 3'
H2129	(Anti-sense primer) 5' CCTAGTGCCAAAGAGCTGTTCC 3'
L2061	(Sense primer) 5' CAGAACCCTCTAAATCCCCTGT 3'
H2342	(Anti-sense primer) 5' AGGCTTATGCGGAGGAGAATG 3'
L2263	(Sense primer) 5' CAATTGGACCAATCTATCACCCTA 3'
H2499	(Anti-sense primer) 5' AACAGGCGGGGTAAGATTG 3'
L2431	(Sense primer) 5' CACAGGCATGCTCATAAGGAAAAG 3'
H2689	(Anti-sense primer) 5' GGGCAGGTCAATTCCTGCTG 3'
L2633	(Sense primer) 5' ATGGCTCCACGAGGGTTCAG 3'
H2962	(Anti-sense primer) 5' GGACTCTAGAATAGGATTGCGCTG 3'
L2911	(Sense primer) 5' CCAACGGAACAAGTTACCCTAGG 3'
H3179	(Anti-sense primer) 5' CATTACGGGGGAAGCG 3'

6.4. Secuenciación

Ninguno de los 8 mtADN de todas las muestras (2 de individuos sanos: BA y RM; 6 de pacientes de CaCu: 89, 89t, 98, 98t, 103 y 103t) fueron secuenciados en su totalidad debido a diversos problemas en la secuenciación, en especial del fragmento A que abarca de la posición 2,499 a la 10,837. Ya que no había polimerización en ninguno de los fragmentos pequeños mediante los cuales se secuenciaría el fragmento A. Posteriormente se realizaron diversas pruebas en donde se utilizaron diferentes concentraciones de *primers* y templado. Finalmente con algunas muestras se realizó una prueba en la que se agregó dimetil sulfoxido (DMSO) para facilitar la disociación de las hebras de ADN. Una vez hecho esto se logró secuenciar el fragmento A de las muestras utilizadas en esta prueba. Las posiciones de las cuáles se obtuvo la secuencia de los mtADN tanto en pacientes de CaCu como en individuos sanos se enlistan a continuación, de acuerdo a la secuencia de referencia (Andrews *et al.* 1999) y recordando que existen algunos nucleótidos intermedios que no fueron determinados y que el mtADN es una molécula circular de 16,569 pb.

- 89 sangre: desde la posición 12,049 a la posición 2,676 en total 7,196 pb.
- 89 tumor: desde la posición 10,975 a la 7,938 en total 13,573 pb.
- 98 sangre: desde la posición 14,010 hasta la posición 2,666 y de la posición 12,048 a la 13,769 en total 4,546 pb.
- 98 tumor: de la posición 12,040 a la posición 1,257 en total 5,786 pb.
- 103 sangre: de la posición 2,700 a la 10,845 en total 8145 pb.
- 103 tumor: de la posición 10,947 a la posición 2,320 y de la posición 2,707 a la 10,839 en total 16,074 pb.
- Individuo Sano BA: de la posición 10,754 a la posición 3,543 en total 9358 pb
- Individuo Sano RM: de la posición 8,430 a la 8,342 en total 16,482 pb.

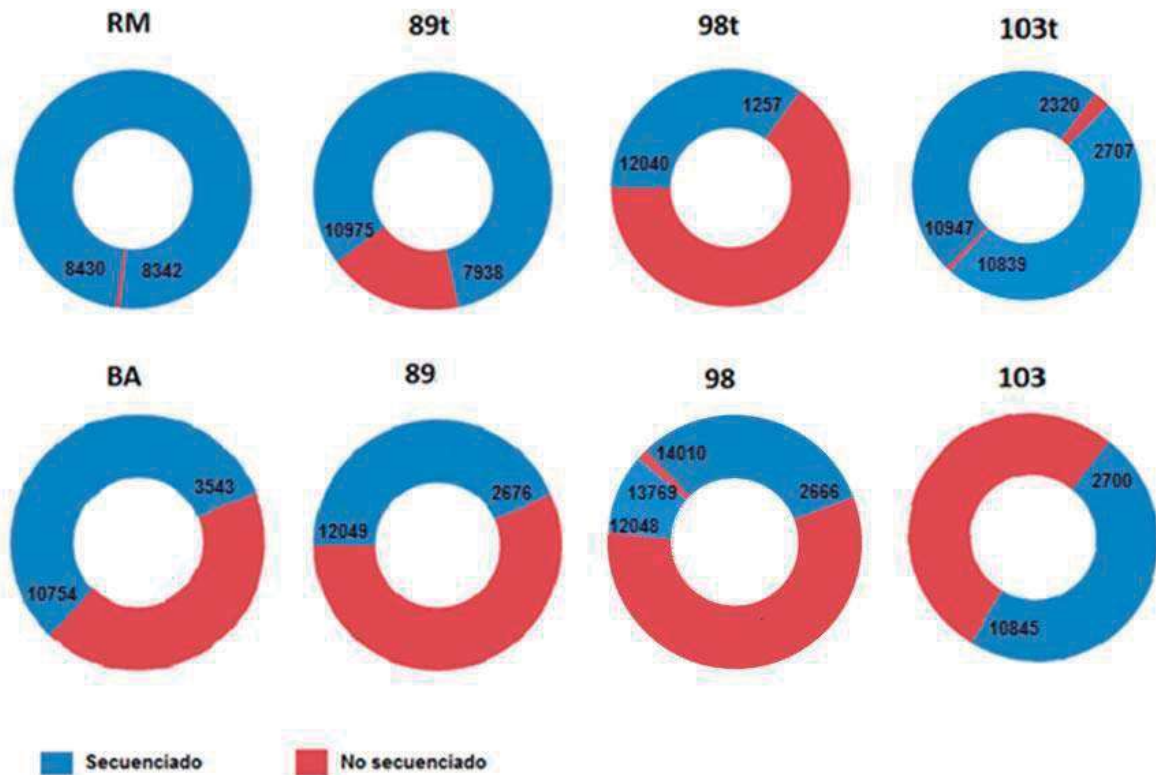


Figura 12. Regiones secuenciadas del genoma mitocondrial. En azul se muestran las regiones que se obtuvo la secuencia y en rojo las no secuenciadas, se numeran las posiciones entre las cuales se conoce la secuencia. Se muestran con una *t* las muestras provenientes de biopsia, el resto provienen de sangre tanto de pacientes de CaCu como de los dos individuos sanos utilizados en el estudio.

Por medio de alineamientos y análisis de los electroferogramas de los resultados de las secuencias se realizó la búsqueda de mutaciones en los mtADN de los pacientes de CaCu comparando las secuencias de sangre (tejido sano) con el mtADN de biopsia.

Sin embargo, en las regiones secuenciadas no se encontró ninguna mutación por lo que se decidió realizar la evaluación de la utilidad del análisis mediante HRM utilizando fragmentos en los que se encontraran los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) característicos de los haplogrupos mitocondriales, por lo que se determinó el haplogrupo mitocondrial tanto de las muestras de pacientes de CaCu y de los individuos sanos.

6.5. Determinación de Haplogrupos

La determinación de haplogrupos mitocondriales se realizó mediante alineamiento y comparación de secuencias utilizando el programa CLC Sequence Viewer versión 6.4 (CLC bio A/S).

6.5.1. Individuos Sanos

Inicialmente se decidió determinar el haplogrupo de los individuos sanos (BA y RM) mediante la alineación de los resultados de la secuenciación del mtADN, con la secuencia de referencia rCRS y se encontraron los siguientes SNPs, entre las posiciones 10,893 y 2260:

En el individuo BA se observaron los siguientes SNPs: C64T, A73G, T146C, T152C, A153G, A235G, C439T, A489G, 523d, 524d, A663G, A1736G, A11719G, A12007G, T12705C, T14766C, T16111C, T16223C, T16290C, A16319G, C16325T y C16362T.

En el individuo RM se observaron los siguientes SNPs: A14470T, C16114T, T16344C y C16519T.

Con estos SNPs diferenciales se tuvo como resultado que el individuo BA pertenece al haplogrupo A y el individuo RM al haplogrupo H. A continuación se enlistan los principales SNPs diferenciales de haplogrupos encontrados al alinear las secuencias RM, BA y la secuencia de referencia rCRS, perteneciente a un individuo con haplogrupo mitocondrial H, que se muestra como NC_012920.1. En las figuras se muestran los alineamientos de secuencias y los electroferogramas. En los alineamientos se encuentran marcadas con un círculo en color rojo las mutaciones diferenciales entre los haplogrupos (A y H) y en los electroferogramas se señala con un cuadro rojo la secuencia correspondiente al alineamiento mostrado en las figuras.

Adenina en la posición 73 es característica del haplogrupo H y guanina del haplogrupo A (Figura 13).

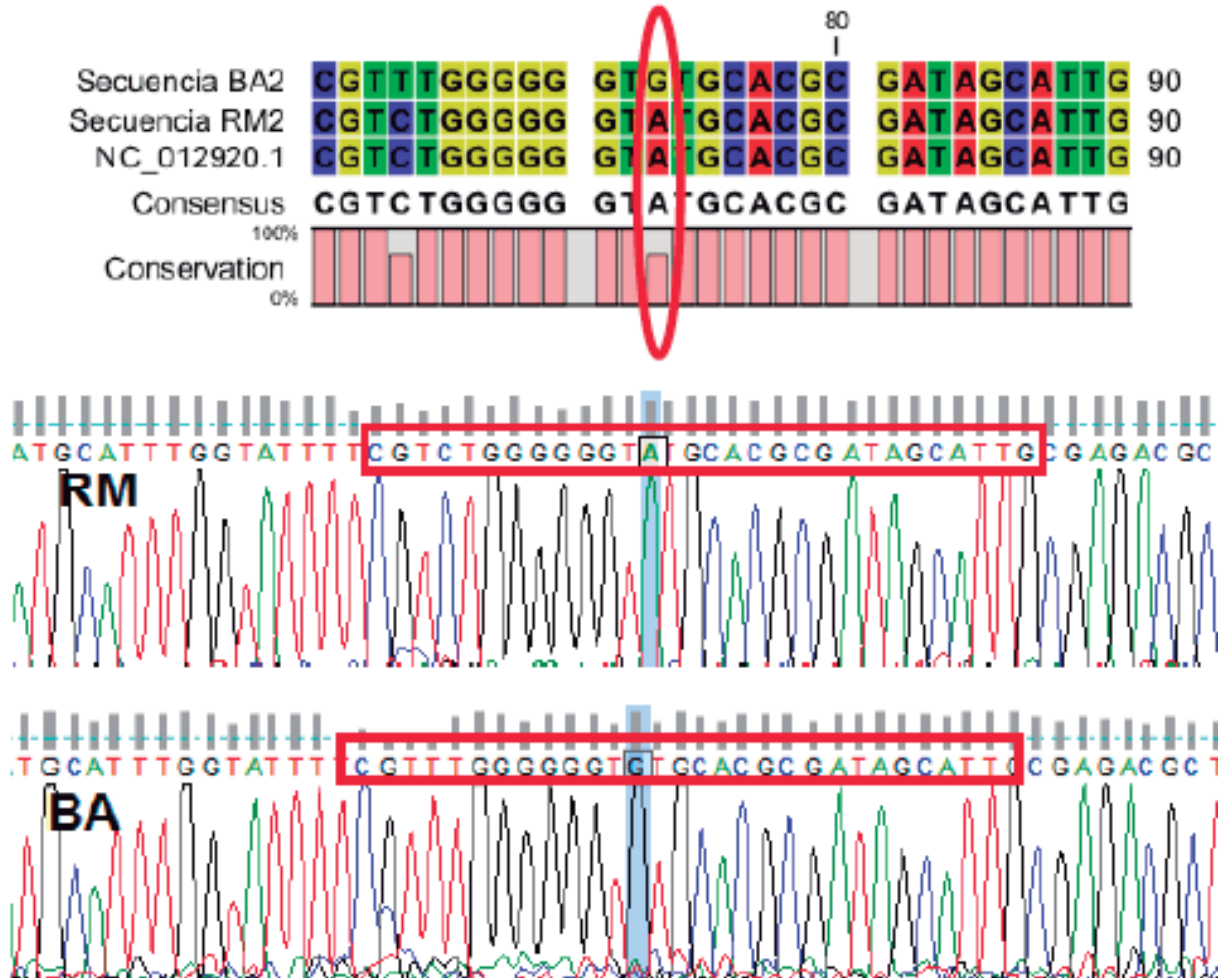


Figura 13. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras individuos sanos y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 73 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, guanina es característica del haplogrupo A, mientras que adenina es característica del haplogrupo H.

Adenina en la posición 663 es característica del haplogrupo A (Figura 14).

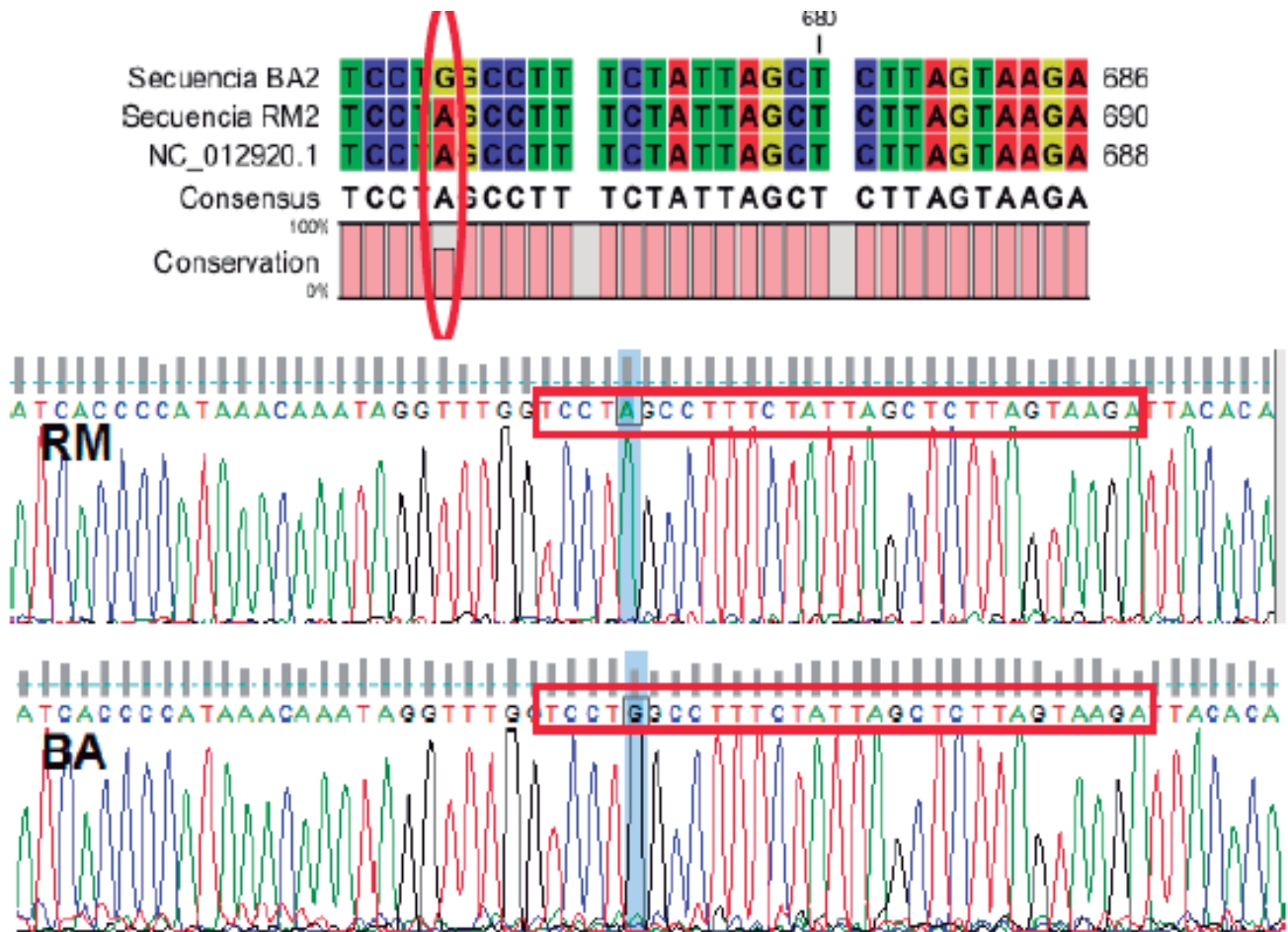


Figura 14. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras individuos sanos y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 663 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, guanina es característica de del haplogrupo A, mientras que adenina es característica del haplogrupo H.

Citosina en la posición 14,766 es característica del haplogrupo H (Figura 15).

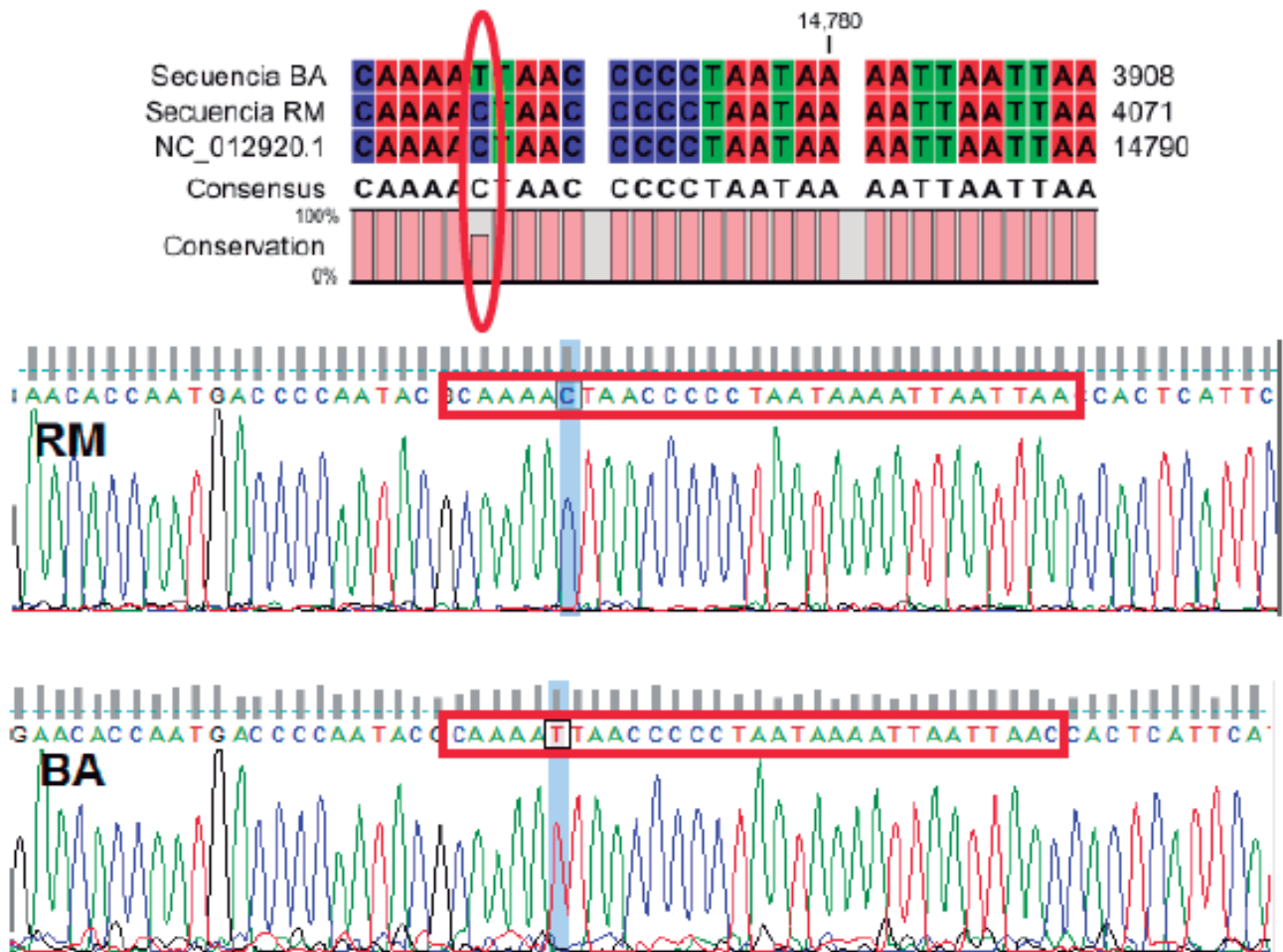


Figura 15. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras individuos sanos y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 14,766 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, timina es característica de del haplogrupo A, mientras que citosina es característica del haplogrupo H.

6.5.2. Pacientes de Lesiones de Cáncer Cervicouterino (CaCu)

La determinación de los haplogrupos mitocondriales de las muestras de pacientes con CaCu se realizó de acuerdo con los SNPs característicos de cada haplogrupo mediante alineamientos y comparación con la secuencia de referencia (rCRS) (Andrews *et al.* 1999) a partir de la cual están definidos los haplogrupos. A continuación se describen los SNPs más importantes característicos de cada haplogrupo.

Adenina en la posición 73 es característica del haplogrupo H y Guanina en esta posición es característica del haplogrupo A (Figura 16).

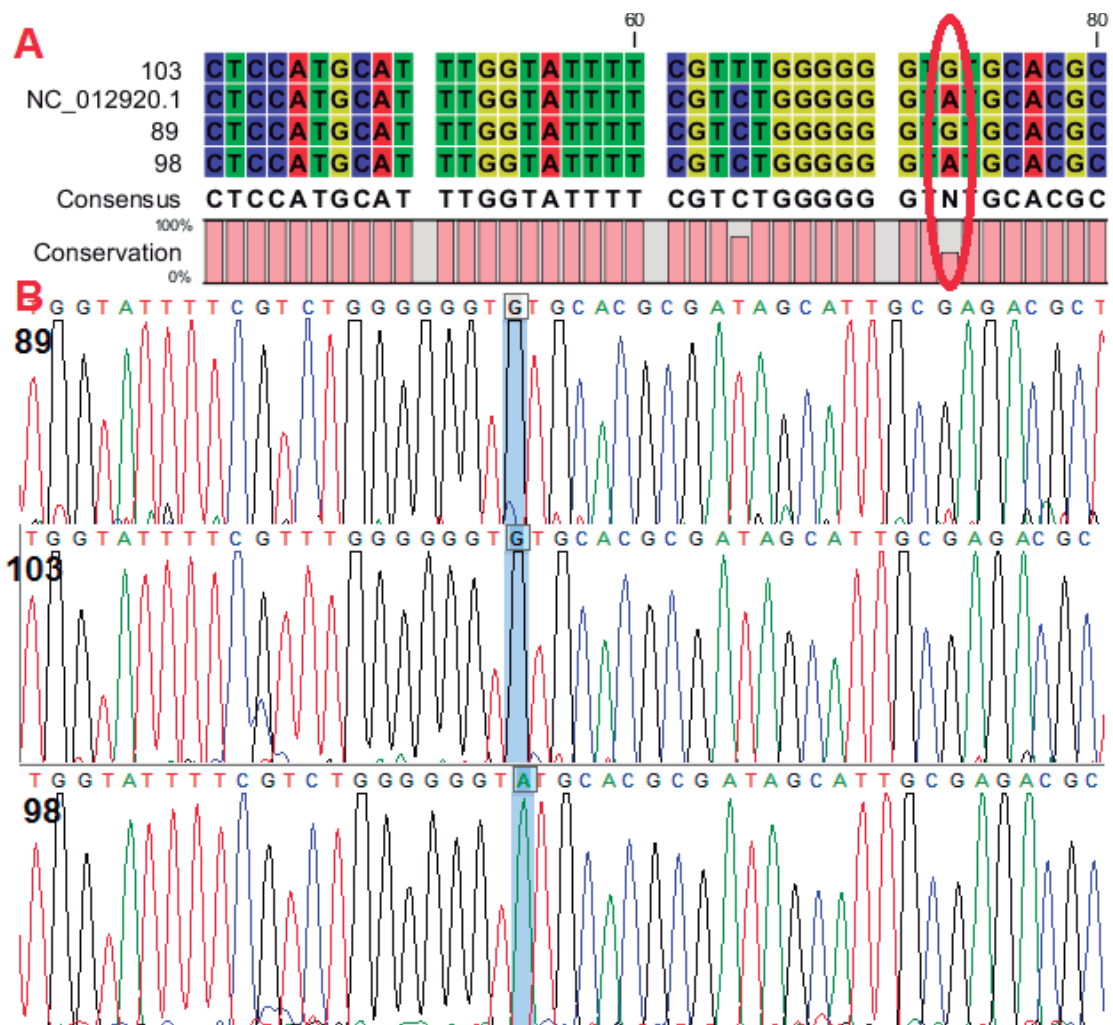


Figura 16. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras de tumor y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 73 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, guanina es característica del haplogrupo A, mientras que adenina es característica del haplogrupo H.

Adenina en la posición 663 es característica del haplogrupo H y Guanina en esta posición es característica del haplogrupo A (Figura 17).

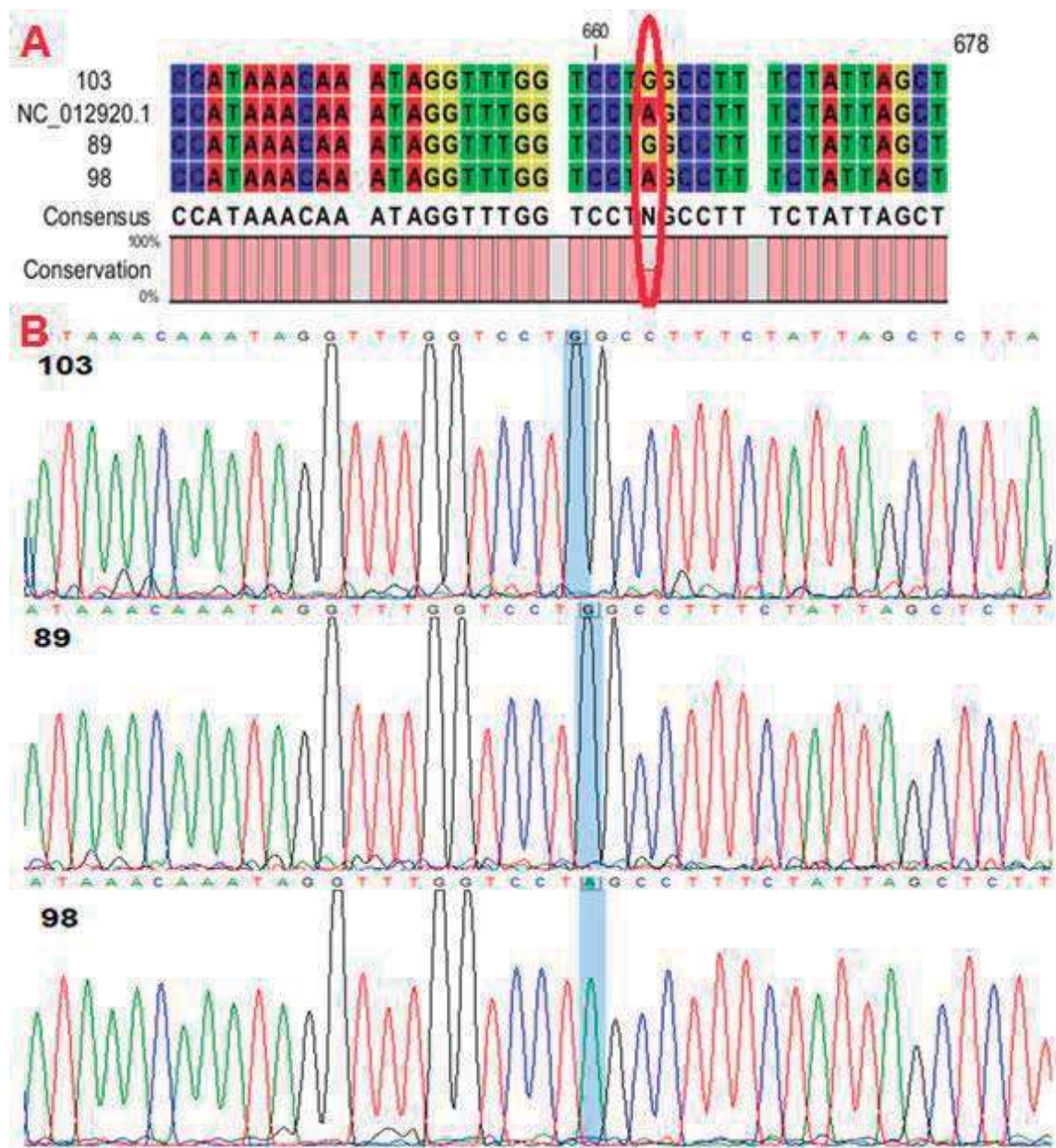


Figura 17. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras de tumor y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 663 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, guanina es característica del haplogrupo A, mientras que adenina es característica del haplogrupo H.

En la posición 14,766 timina es característica de del haplogrupo A, mientras que citosina es característica del haplogrupo H (Figura 18).

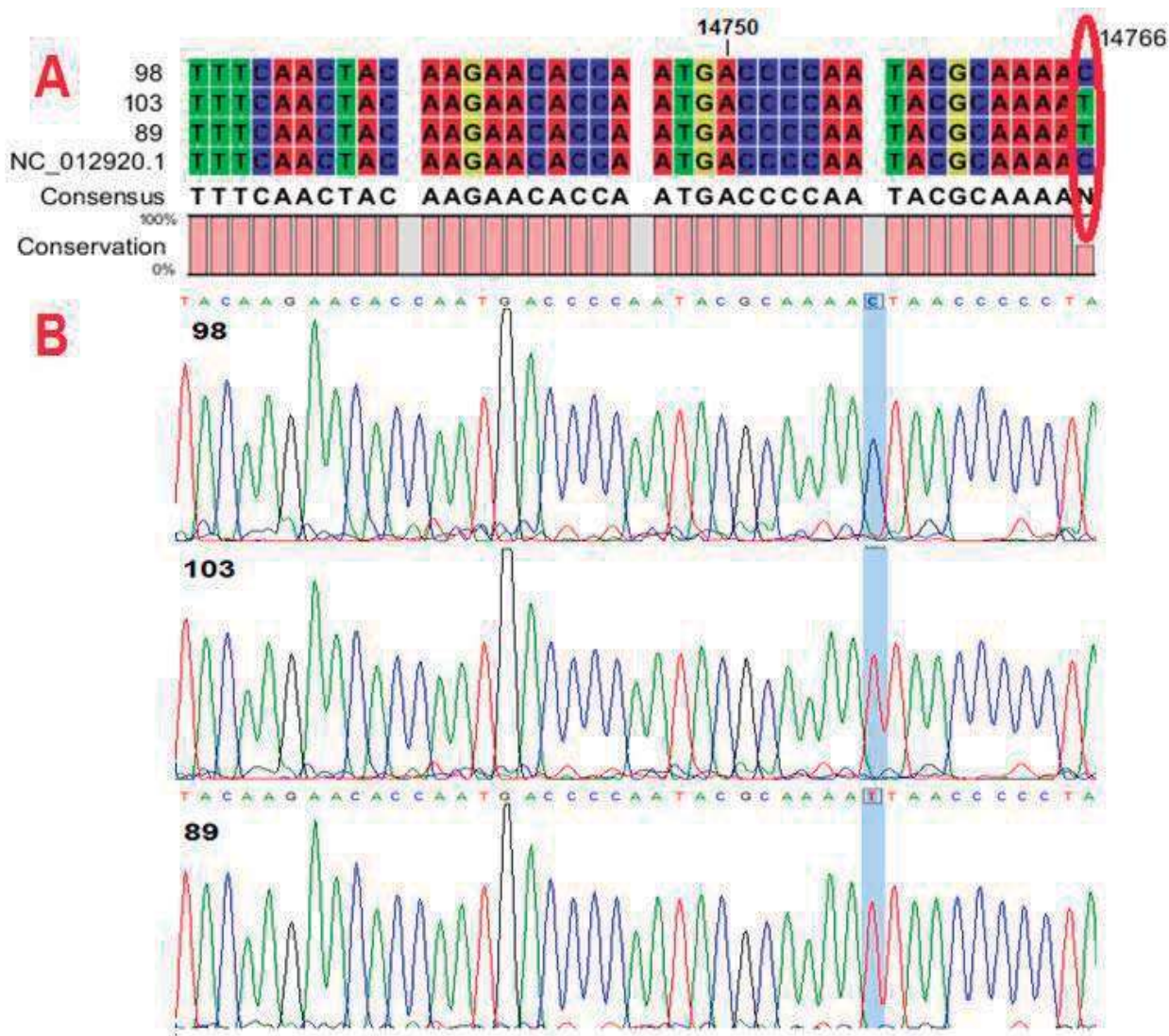


Figura 18. (A) Alineamiento de secuencias de las muestras de tumor y (B) sus electroferogramas. Se muestra un polimorfismo (SNP) en la posición 14,766 (círculo rojo en el alineamiento; rectángulo azul en el electroferograma). En esta posición, timina es característica de del haplogrupo A, mientras que citosina es característica del haplogrupo H.

Fueron determinados los haplogrupos mitocondriales de las muestras de los 3 pacientes de CaCu: la muestra 89 y 103 pertenecen al haplogrupo A y la muestra 98 al haplogrupo H.

Una vez conocidos los haplogrupos mitocondriales de todas las muestras se decidió realizar la estandarización del análisis por HRM para posteriormente mediante este método evaluar si es posible detectar la presencia de los SNPs característicos de cada haplogrupo, en fragmentos de alrededor de 300 pb, ya que aproximadamente es el tamaño de los fragmentos que amplifican los *primers* diseñados para HRM. Para realizar la estandarización se utilizaron las muestras de los individuos sanos ya que son las muestras que se tenían en una cantidad mayor y cada uno pertenecía a uno de los haplogrupos a los que pertenecen las pacientes de CaCu, H y A.

6.6. Análisis de Alta Resolución de la Curva de Disociación (HRM)

Este análisis se utilizó para determinar si tiene la capacidad de detectar mutaciones puntuales en muestras de mtADN en fragmentos de alrededor de 300 pb, para lo cual se realizaron previamente ensayos con un fragmento de 105 pb, y otro con un fragmento de 372 pb, posteriormente se inició la estandarización de las condiciones para realizar el análisis por HRM de los fragmentos de alrededor de 300 pb utilizando las muestras de los individuos sanos (RM y BA). Finalmente se realizaron los ensayos con las muestras de pacientes de lesiones de CaCu.

6.6.1. Evaluación del Fragmento de 105 pb mediante HRM

Para este ensayo se utilizaron los primers L6948 y H7052, diseñados para la determinación de haplogrupo H, ya que en este fragmento de 105 pb se encuentra el SNP C7028C característico del haplogrupo H.

Después de realizar el HRM se observó una diferencia en la curva de disociación (Figura 19) entre los dos individuos sanos: RM perteneciente al haplogrupo H, y BA perteneciente al haplogrupo A. La temperatura de disociación (T_m) de RM fue de 81.5°C y la de BA de 80.9°C, observándose una diferencia de 0.6°C entre ambas muestras (Figura 20).

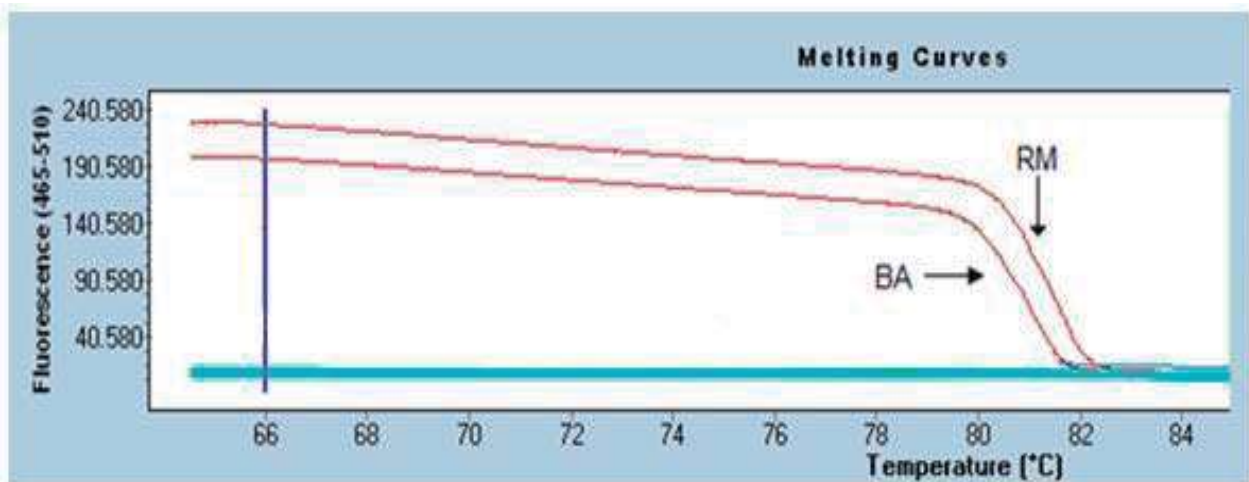


Figura 19. Curvas de Disociación de los fragmentos amplificadas de individuos sanos (RM y BA). Las muestras fueron amplificadas por medio de PCR en tiempo real, adicionando un ciclo de HRM para detectar variaciones en la temperatura de disociación (T_m) de las muestras en el fragmento deseado.

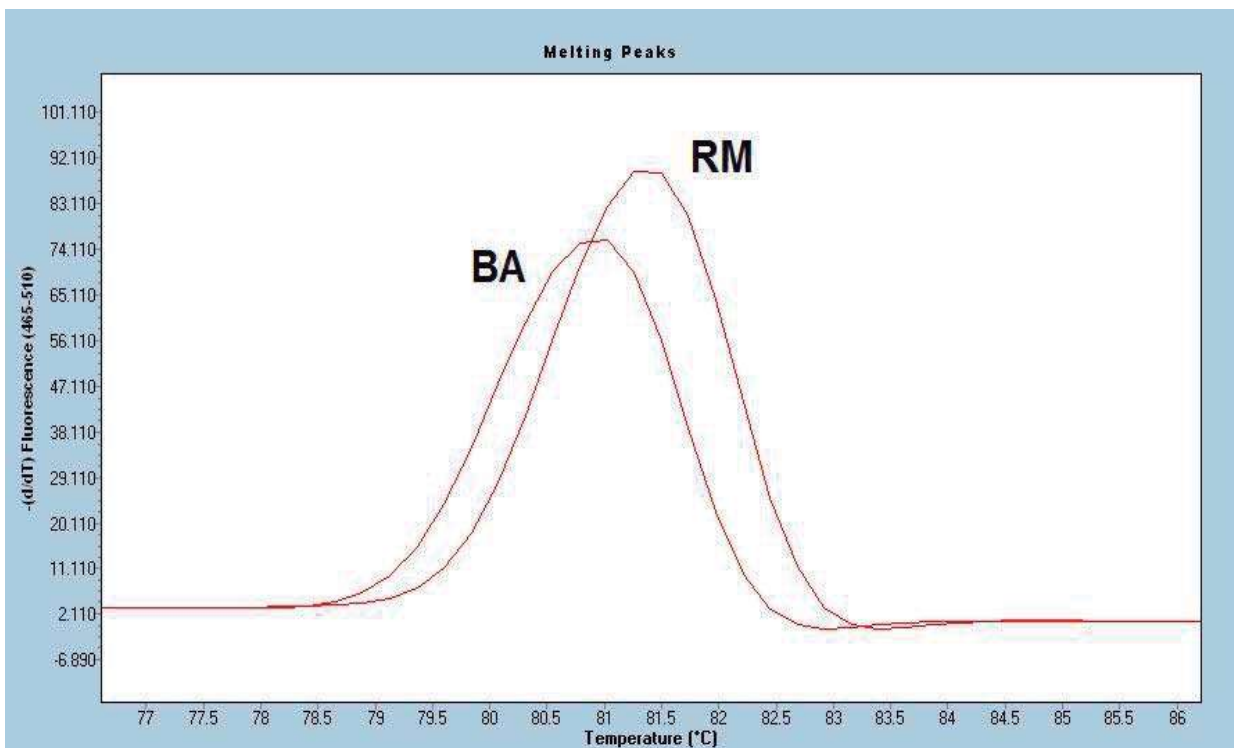


Figura 20. Picos de disociación de las muestras de individuos sanos calculados a partir de las curvas de disociación. BA perteneciente al haplogrupo A y RM al haplogrupo H.

Posteriormente se realizó el análisis por HRM del fragmento de 105 pb de 2 muestras sanguíneas de pacientes de CaCu de los que se conocía el haplogrupo por los resultados de la secuenciación, uno perteneciente al haplogrupo H (marcado en las figuras como 98) y otro del haplogrupo A (marcado como 89) estos fueron comparados con un control positivo de un individuo sano perteneciente al haplogrupo H. Se observa una diferencia de 0.6°C en la T_m entre las muestras del haplogrupo H (98 y el control positivo H) y la muestra perteneciente al haplogrupo A (89), la misma T_m se observó en los dos individuos del haplogrupo H (98 y el control positivo H) (Figura 21).

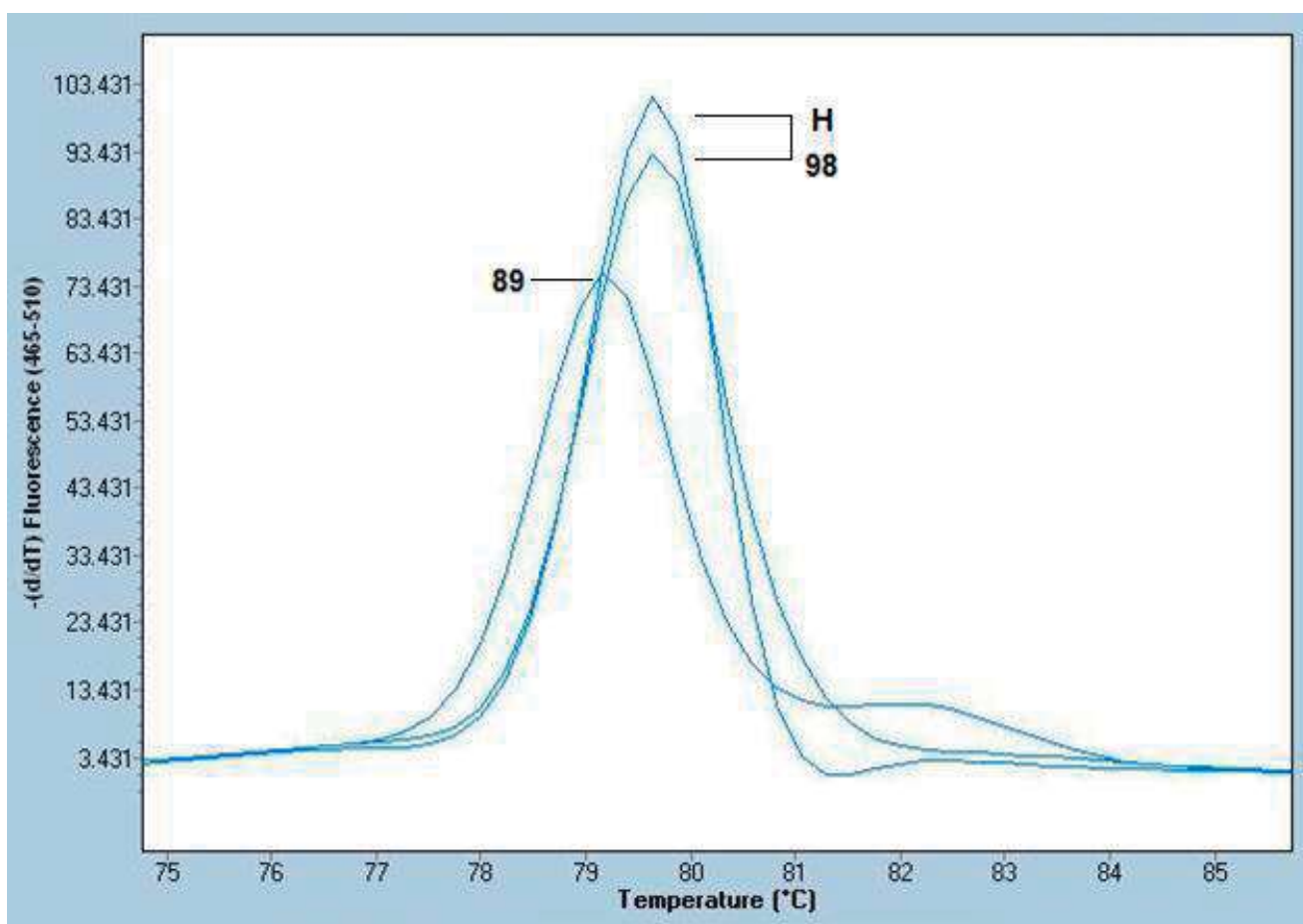


Figura 21. Picos de la temperatura de disociación calculados a partir de las curvas de disociación.

6.6.2. Evaluación del Fragmento de 372 pb mediante HRM

Se evaluó la capacidad del análisis por HRM de detectar mutaciones puntuales en el genoma mitocondrial en un fragmento de 372 pb, amplificado con el par de *primers* 7111for y 7359rev descritos por Ramos *et al.* (2009) (Tabla 3), las condiciones para su amplificación ya habían sido descritas previamente en el laboratorio por lo que únicamente se agregó al programa de PCR el ciclo adicional de HRM. Sin embargo, con fragmentos de este tamaño el análisis mediante HRM no es capaz de detectar mutaciones, tal como se muestra en la figura 22, no se observaron diferencias en los picos de la T_m para ninguna de las muestras.

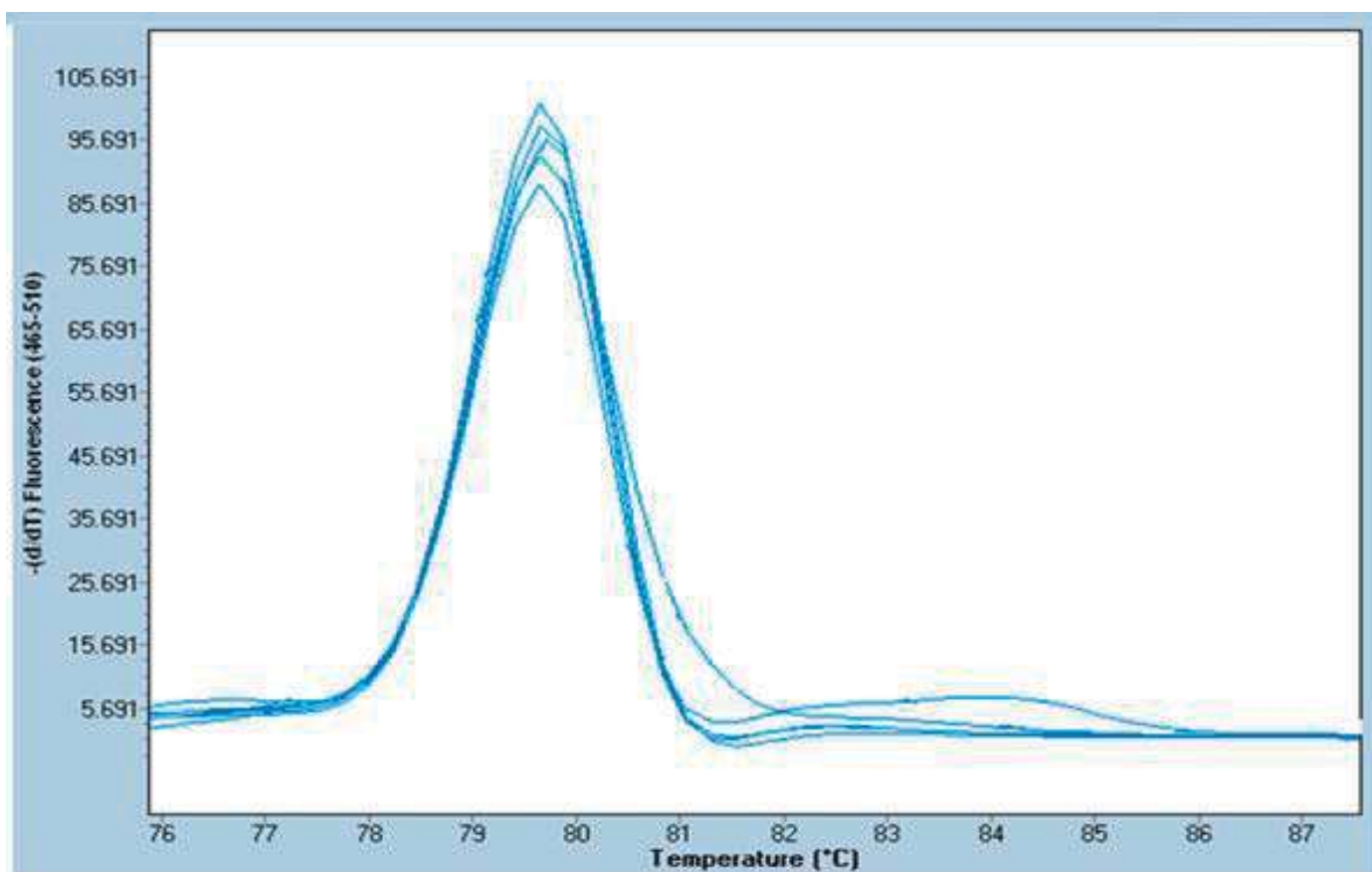


Figura 22. Resultados del HRM de muestras de tumor y sangre. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 372 pb. No se observaron diferencias en los picos de fusión de las muestras de tumores en la posición donde fueron encontradas por secuenciación.

6.6.3. Estandarización de las condiciones necesarias para realizar el análisis por HRM de los fragmentos 1, 2 y 3

Se eligieron tres fragmentos en los cuales se encuentran SNPs característicos de los dos haplogrupos (H y A) a los que pertenecen las muestras de individuos sanos y los pacientes de CaCu, con el fin de estandarizar las condiciones necesarias para la detección de mutaciones puntuales por medio de HRM en las muestras sanguíneas de pacientes con lesiones de cáncer cervicouterino. Las secuencias de los *primers* se muestran en la tabla 6.

6.6.3.1. Gradiente de Temperatura

Como primer paso para la estandarización de las condiciones necesarias para la amplificación de los 3 fragmentos se realizó un PCR punto final con un gradiente de temperatura, variando la temperatura de alineamiento en tres temperaturas: 56, 58 y 60°C. Posteriormente a la amplificación de los fragmentos, se realizó la evaluación de la mejor temperatura de alineamiento de los *primers* mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% a 8 v olts/cm. Se tomó en cuenta la especificidad de los *primers*, el tamaño esperado de los amplicones y la densidad de las bandas observadas en los geles. La mejor temperatura para los 3 pares de *primers* utilizados en la amplificación de los fragmentos, así como los 3 distintos grados de pureza utilizados (DST, RP1 y HPLC) fue 60°C (Figura 23).

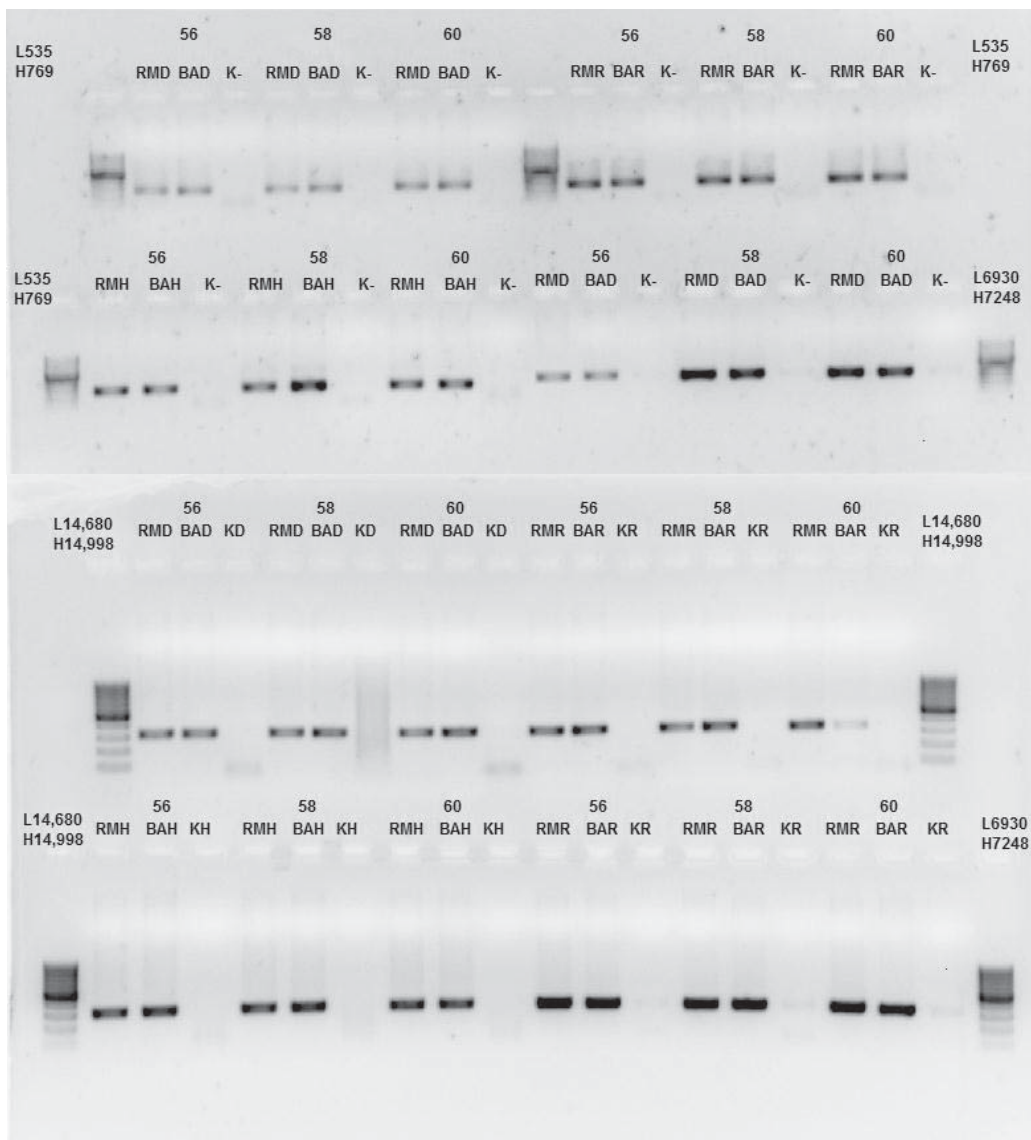


Figura 23. Fragmentos amplificados mediante PCR punto final de las 2 muestras de individuos sanos (RM, BA) y un control negativo (K-). Se muestran los distintos grados de pureza de los *primers* utilizados para su amplificación: DST, RP1 y HPLC; así como las diferentes temperaturas de alineamiento (56, 58 y 60°C). Se muestra en los extremos de la derecha e izquierda el nombre de los *primers* utilizados para la amplificación de cada fragmento.

Una vez que se conoció la temperatura ideal para la amplificación de los 3 fragmentos, se realizó el análisis mediante HRM según las condiciones descritas en la metodología. Se evaluó el efecto de la pureza de los *primers* y la concentración del templado en los picos de la temperatura de disociación de los fragmentos, así como la reproducibilidad de los resultados mediante duplicados de todas las reacciones. Posteriormente se eligieron las mejores condiciones para la búsqueda de mutaciones puntuales según las distintas condiciones evaluadas para cada fragmento.

6.6.3.2. Efecto de la Pureza de los *Primers* en los Picos de la Temperatura de Disociación Obtenidos por HRM

En el fragmento 1 se observa un desplazamiento del pico de T_m al utilizar diferentes grados de pureza de los *primers*. Con *primers* DST el pico de la T_m disminuye 0.5°C y 1°C al compararlo con los picos obtenidos al usar *primers* RP1 y HPLC respectivamente. En todas las condiciones para ambas muestras (RM y BA) el pico más pronunciado se observó al utilizar *primers* RP1 y el pico de menor tamaño se obtuvo al utilizar *primers* DST. No se mostraron cambios significativos en la emisión de fluorescencia al utilizar distintas concentraciones de ADN (Figura 24).

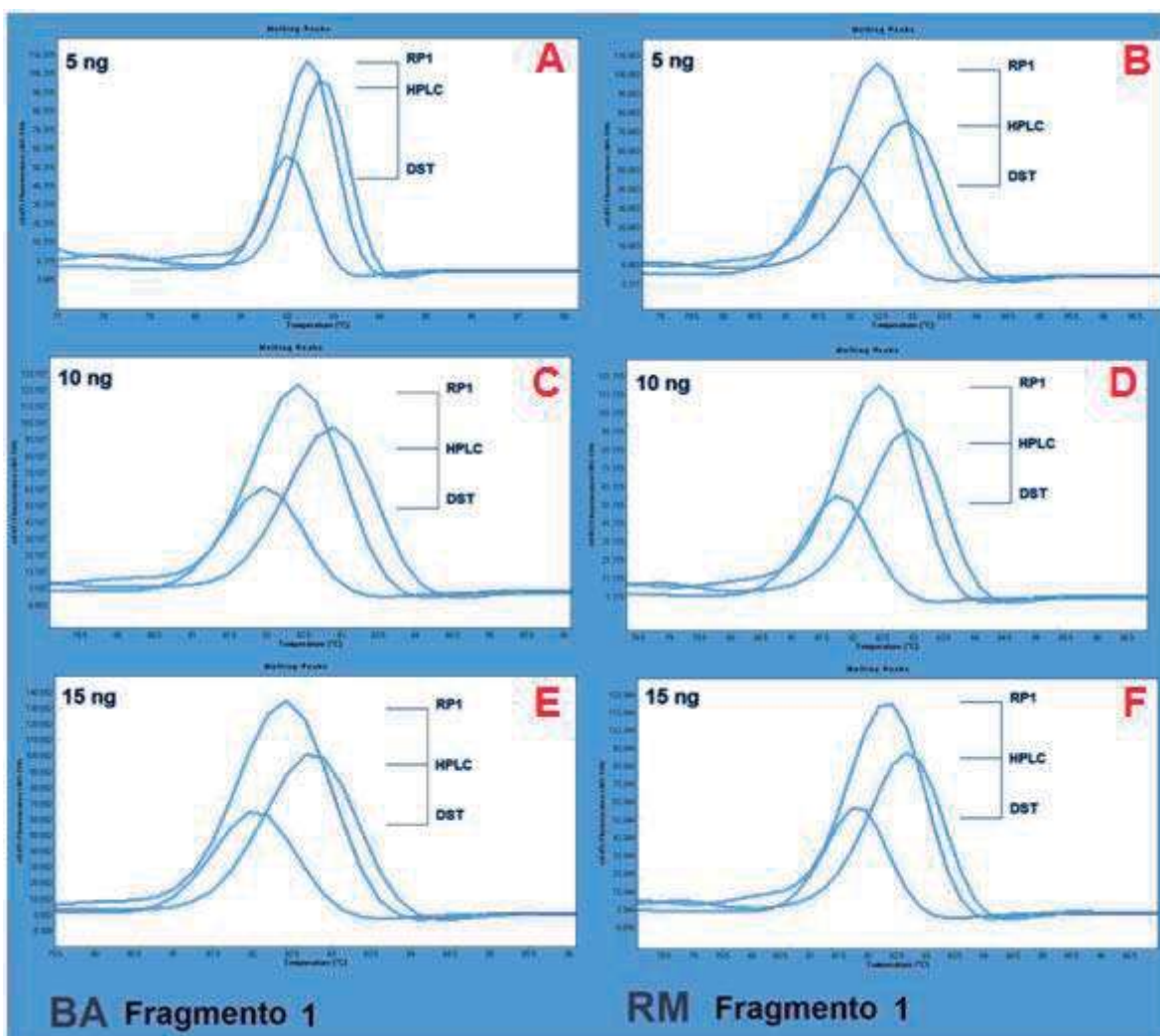


Figura 24. Gráficas de los picos de la T_m del fragmento 1, donde se observan los cambios en las curvas al utilizar distintas puridades de *primers* para la amplificación del fragmento.

En el fragmento 2 no se observó un cambio del pico de la T_m al utilizar distintos grados de pureza de los *primers* con concentraciones de 5 y 10 ng/ μ l de templado. En cambio al usar una concentración de 15 ng/ μ l de templado se observó un desplazamiento del pico de la T_m , hubo un incremento de 0.5°C al utilizar *primers* HPLC y RP1 que al usar *primers* DST para la amplificación del fragmento. Con éstos últimos y las distintas concentraciones de templado se observó un pico más acentuado en ambas muestras (BA y RM) que al utilizar *primers* RP1 o HPLC. No se observó amplificación clara del fragmento en la muestra RM al usar *primers* RP1 con ninguna de las 3 concentraciones de templado evaluadas, lo mismo sucedió con la muestra BA, pero únicamente a una concentración de 5 ng/ μ l de templado, que por lo contrario no amplificó con los *primers* HPLC cuando se usaron concentraciones de 10 y 15 ng/ μ l (Figura 25).

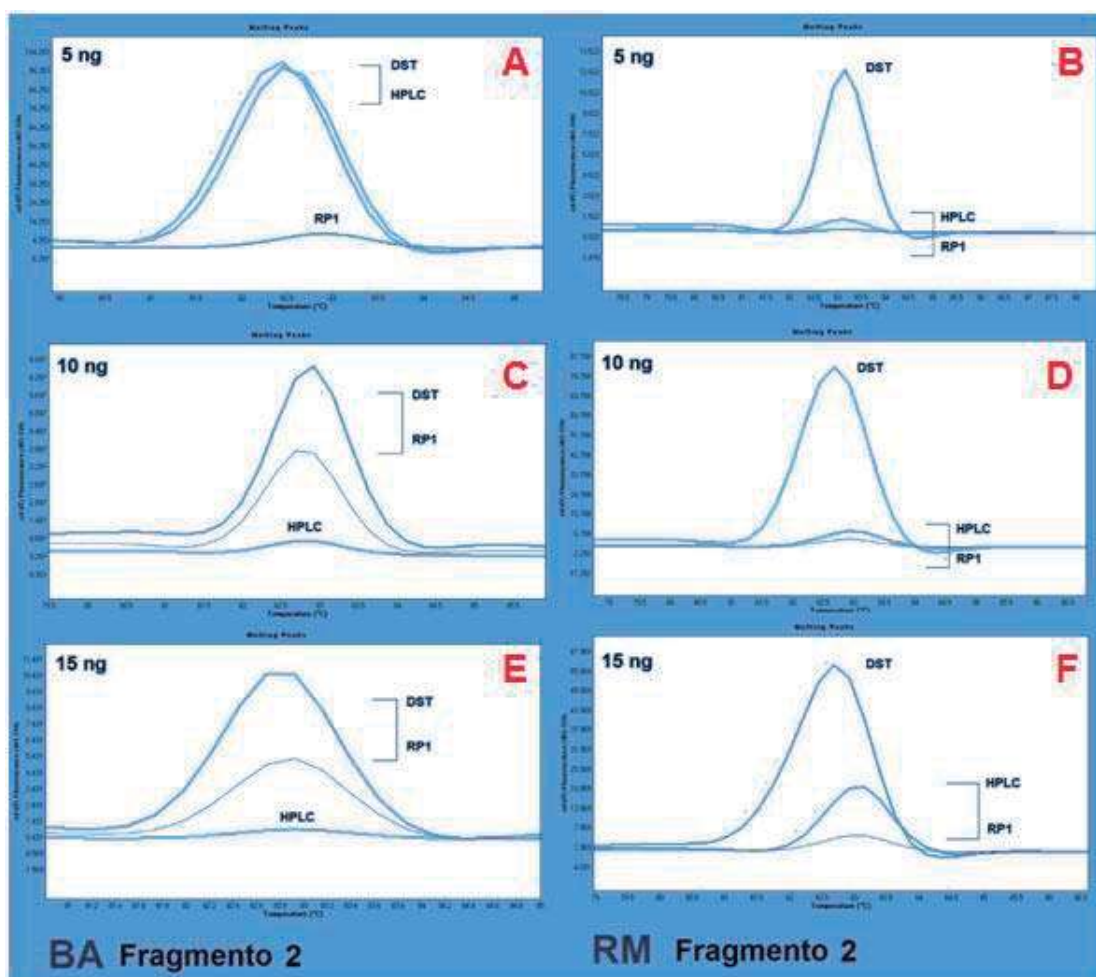


Figura 25. Graficas de los picos de la temperatura de disociación del fragmento 2, comparando distintas purzas de *primers* y distintas concentraciones de templado.

En el fragmento 3 no se observó un desplazamiento en el pico de la T_m , excepto en la muestra BA usando una concentración de 15 ng/ μ l de templado y *primers* RP1 hubo un descenso en el pico de 0.8°C. Por otro lado, no hubo un cambio significativo en la emisión de fluorescencia al utilizar distintas concentraciones de templado. Además se observó que la forma de las curvas de los picos de disociación son similares sin importar que para su amplificación se hayan utilizado *primers* de distintas puridades, a excepción de la curva del fragmento de la muestra RM amplificado con *primers* DST y una concentración de templado de 5 ng/ μ l, en esta misma muestra no se observó amplificación del fragmento al utilizar *primers* RP1 (Figura 26).

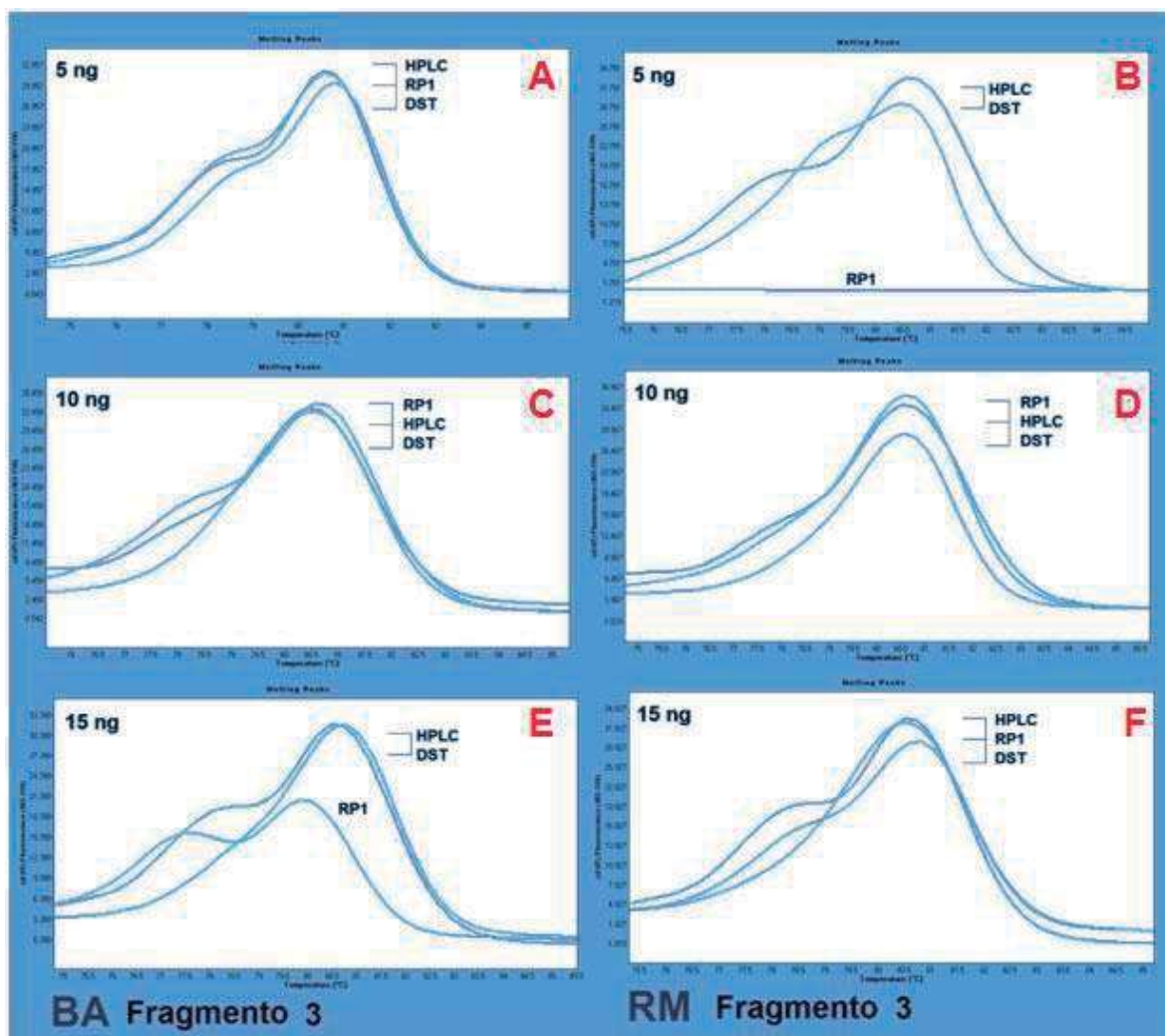


Figura 26. Graficas de los picos de la temperatura de disociación del fragmento 3.

6.6.3.3. Efecto de la Concentración del Templado en los Picos de la Temperatura de Disociación Obtenidos por HRM

Se utilizaron tres distintas concentraciones de templado (5, 10 y 15 ng/ μ l) para realizar el análisis de HRM, se esperaría un aumento en la intensidad de fluorescencia al incrementar la concentración del templado, sin mostrar un cambio en la T_m . Sin embargo, en los 3 fragmentos se observaron ciertas condiciones, descritas más adelante, donde se mostraron diferentes temperaturas de disociación al utilizar distintas concentraciones de templado.

En el fragmento 1 se observó que no existía una diferencia en las temperaturas de disociación entre los ensayos con *primers* DST en los cuales se utilizaron concentraciones del templado de 10 y 15 ng/ μ l, sin embargo al utilizar concentraciones de 5 ng/ μ l se observa que la temperatura de disociación aumenta con respecto a las otras concentraciones. Al utilizar *primers* de pureza RP1 la T_m fue igual en las 3 concentraciones que fueron evaluadas. Al utilizar *primers* con pureza HPLC se observó una diferencia en el pico de la T_m con el templado a una concentración de 10 ng/ μ l, la T_m se desplazó hacia adelante, hubo un aumento en el pico de la T_m de cerca de 2 °C. Al usar 5 y 15 ng/ μ l el pico de la temperatura de disociación fue el mismo (Figura 27).

Distinto a lo esperado, la intensidad de la fluorescencia no fue proporcional a la concentración de las muestras, en un ensayo con una concentración de templado de 5 ng/ μ l éste podía fluorescer de una igual manera e incluso de forma superior que un ensayo realizado con templado a una concentración de 15 ng/ μ l. Los amplificadores que mostraron una mayor fluorescencia fueron aquellos en los cuales se utilizaron *primers* con pureza RP1, los cuales mostraron una fluorescencia de aproximadamente 125 unidades de fluorescencia, mientras que los DST mostraron la mitad de esta cantidad y los *primers* grado HPLC mostraron una fluorescencia de alrededor de 100 unidades de fluorescencia.

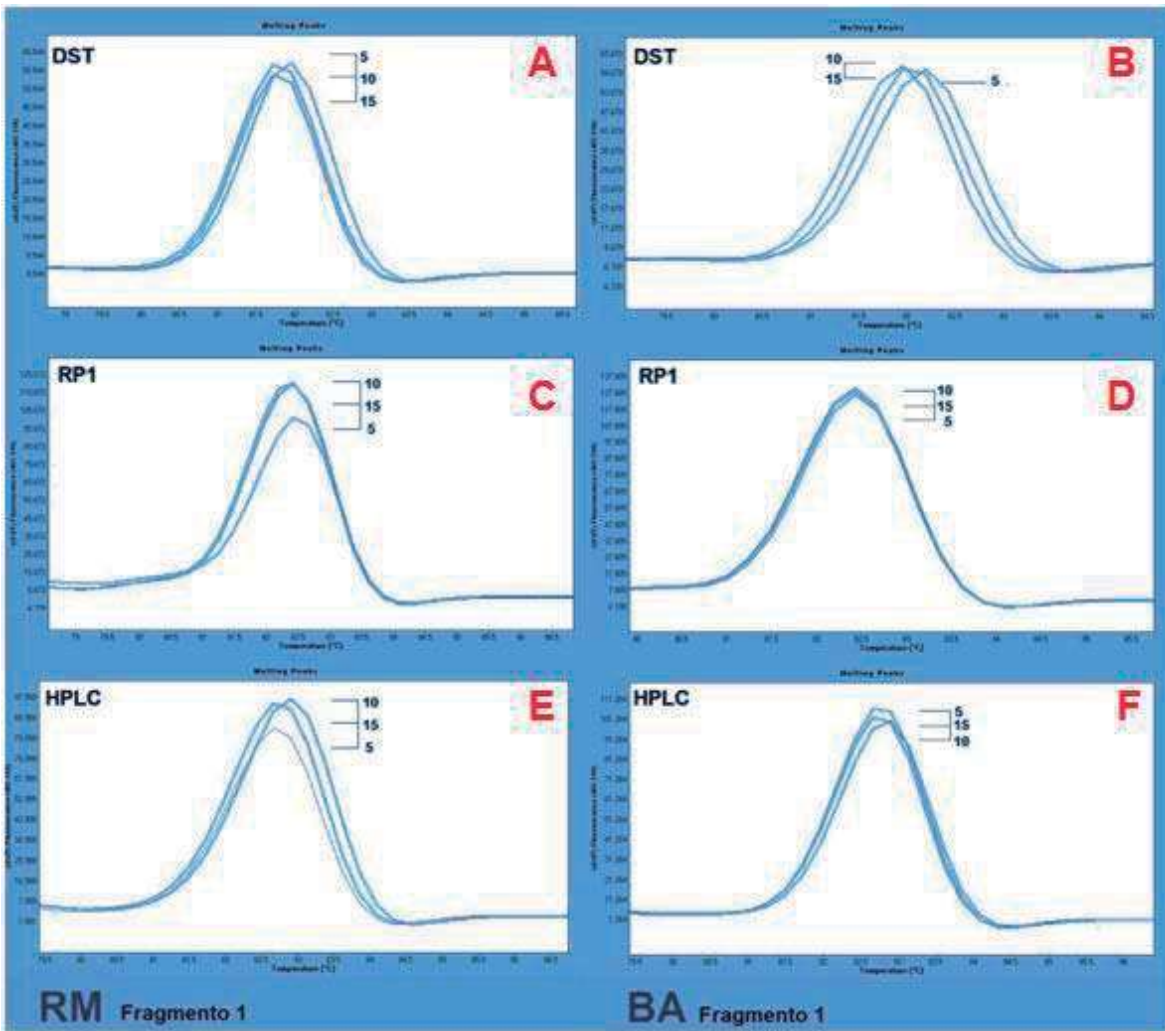


Figura 27. Gráficas donde se muestran los picos de la Tm y la comparación de los mismos al utilizar distintas concentraciones de templado, con ambas muestras de individuos sanos.

En el fragmento 2 el pico de la temperatura de disociación se mantuvo sin cambios en ambas muestras al utilizar concentraciones de templado de 10 y 15 ng/μl y con *primers* RP1 y HPLC, no se observó amplificación de este fragmento en las muestras a concentraciones de 5 ng/μl (Figura 27 C, D, E, F). Por su parte, en las amplificaciones con *primers* DST se muestra un desplazamiento de 0.3°C en el pico de la Tm en la muestra RM con 5 ng/μl de templado con respecto a las concentraciones de 10 y 15 ng/μl (Figura 27A). En la muestra BA amplificada con estos mismos *primers*, se observa que los picos de la Tm difieren entre sí en las 3 distintas concentraciones de templado empleadas en el ensayo (Figura 27B).

Los picos de la T_m del fragmento 2 muestran una relación directa entre la cantidad de fluorescencia emitida y la concentración de la muestra. Las reacciones con una mayor concentración de templado fluorescen más que aquellas donde se utilizó una menor concentración de muestra. Los *primers* con los cuales se observó una mayor fluorescencia al amplificar este fragmento fueron los DST, siendo alrededor de 20 veces más la cantidad de fluorescencia emitida por los fragmentos amplificados con estos *primers*, que los fragmentos amplificados con *primers* RP1 y 7.5 veces mayor que aquellos con *primers* HPLC (Figura 28).

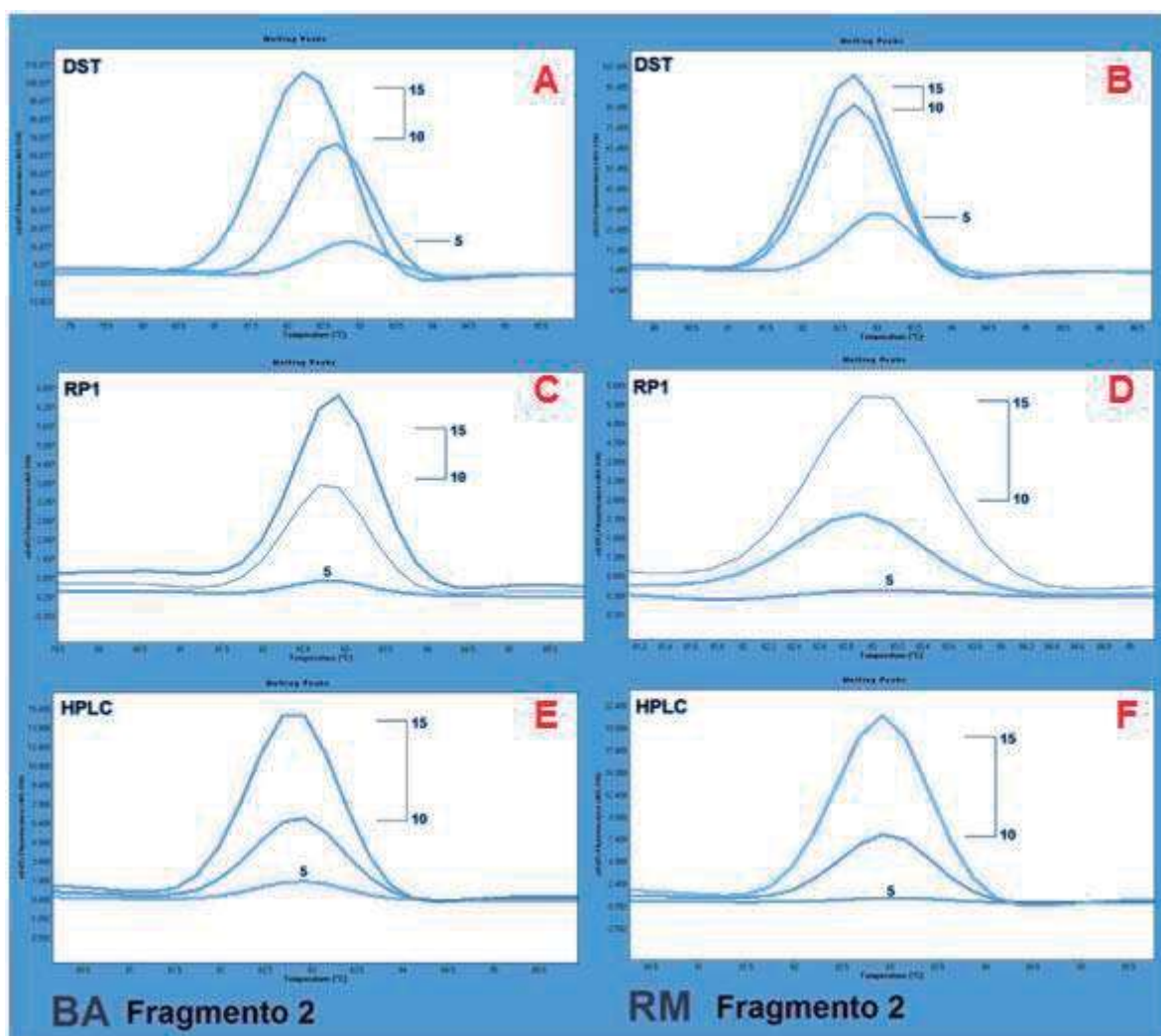


Figura 28. Gráficas de los picos de la temperatura de disociación del fragmento 2. Se observa una clara relación entre la fluorescencia emitida y la concentración del templado.

En el fragmento 3 no se observaron diferencias en los picos de la T_m entre las distintas concentraciones de templado en ambas muestras. La excepción fue la muestra RM amplificada con *primers* DST y una concentración de 10 ng/ μ l de ADN, donde el pico de la temperatura de disociación es menor 0.5°C (Figura 29B). La reacción con *primers* RP1 y 5 ng/ μ l de ADN no amplificó, por lo que no se puede establecer si hay o no una diferencia entre la concentración de templado con las otras concentraciones de la misma muestra (Figura 29D). No se observó una relación entre la concentración del templado y la cantidad de fluorescencia emitida. Para este fragmento, los tres diferentes grados de pureza de *primers* mostraron una emisión de fluorescencia similar.

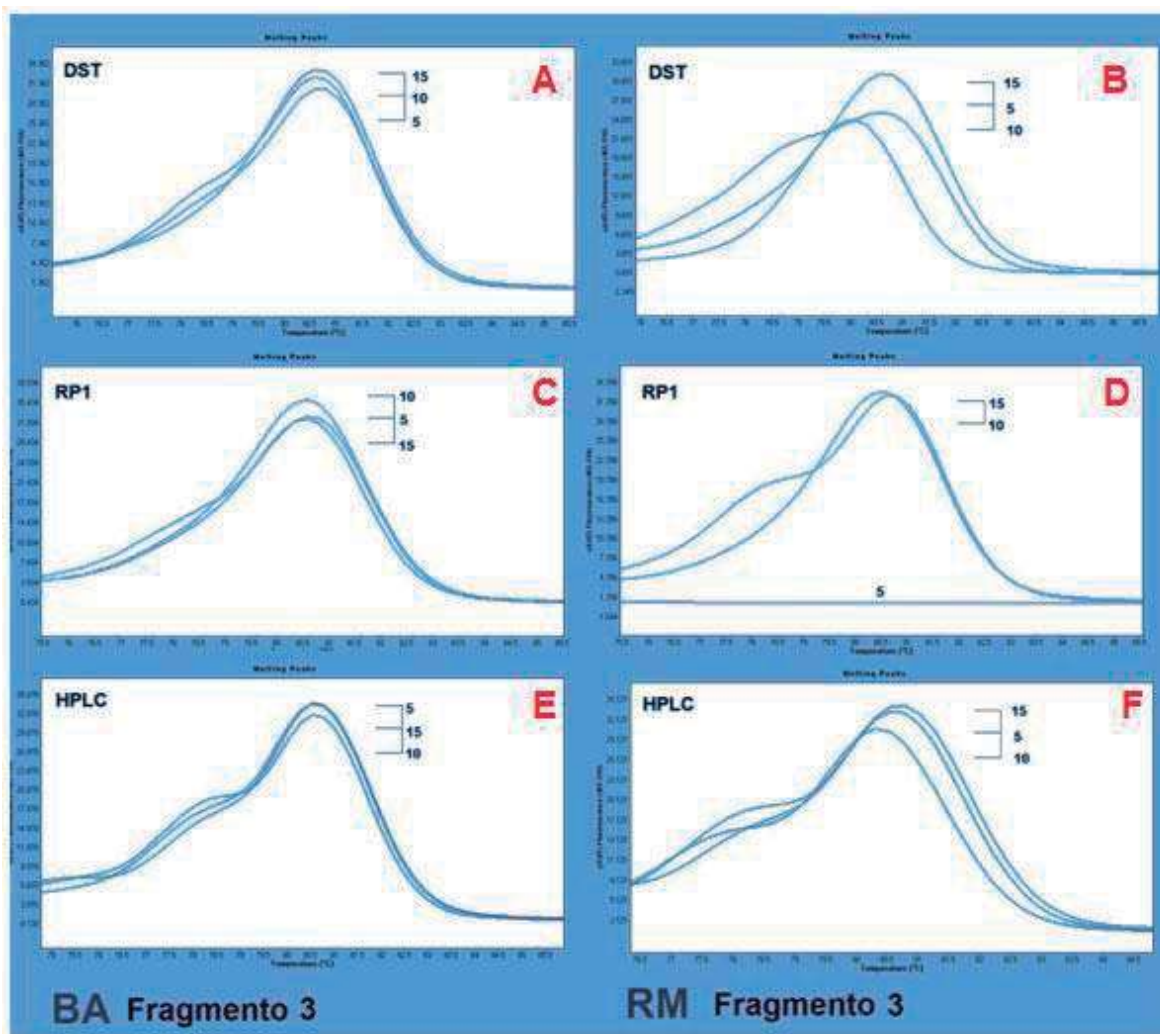


Figura 29. Gráficas donde se muestran los picos de la temperatura de disociación y la comparación de los mismos al utilizar distintas concentraciones de templado, con muestras de individuos sanos (BA y RM).

6.6.3.4. Duplicados de las Reacciones

Para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos por la técnica de HRM en cada ensayo se realizaron duplicados de cada una de las reacciones. Se evaluaron 2 muestras de individuos sanos pertenecientes a 2 haplogrupos mitocondriales distintos, con 3 distintos grados de pureza de *primers* y 3 concentraciones de ADN (5, 10 y 15 ng/ μ l) para cada uno de los 3 fragmentos analizados por HRM.

En cada figura se muestran 18 gráficas de los picos de las temperaturas de disociación de cada una de las distintas condiciones evaluadas para cada fragmento. Las primeras 9 gráficas de cada figura, mostradas en la parte superior de las figuras, (Figura 30) pertenecen al mismo individuo (BA) y las demás, en la parte inferior, corresponden al segundo individuo (RM). En cada gráfica se muestran dos curvas, una por cada reacción de los duplicados, estas curvas corresponden a los picos de las T_m obtenidas por HRM.

En la mayoría de las condiciones evaluadas en el fragmento 1, las curvas de la T_m de los duplicados de cada reacción se observaron con una forma muy similar, así como la misma T_m (Figura 30). En la muestra BA con *primers* DST y 5 ng/ μ l de templado se observó un desplazamiento de 0.3°C en el pico de la T_m respecto al duplicado de la misma reacción (Figura 30A). De la misma forma, en la muestra RM amplificada con *primers* HPLC y una concentración de 5 ng/ μ l de templado, el pico de la T_m también se desplazó 0.3°C (Figura 30P).

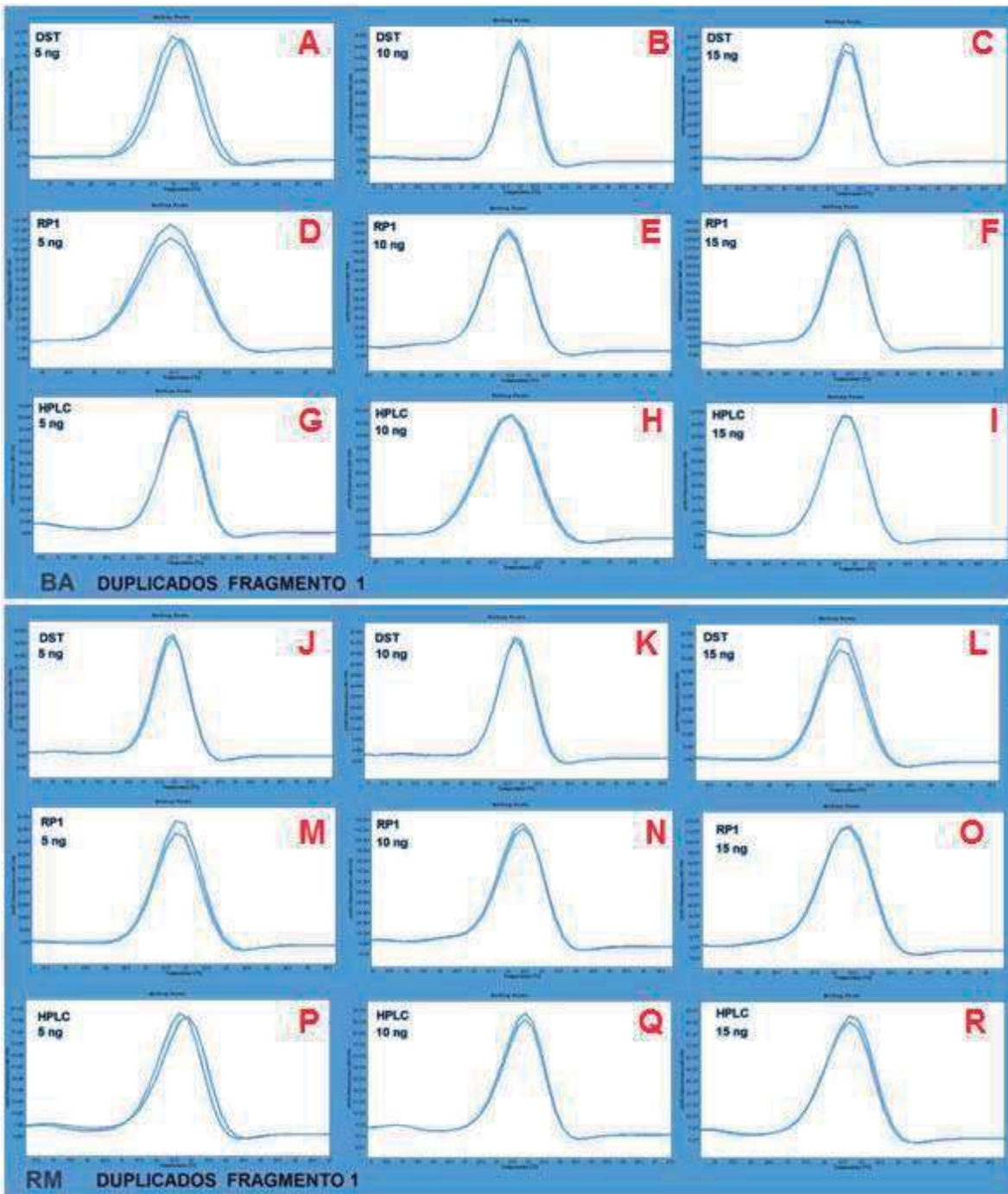


Figura 30. Graficas de las curvas de los picos de disociación de las muestras de individuos sanos: BA (A) y RM (B).

En el fragmento 2, las curvas en las graficas de los picos de la T_m son muy diferentes, tanto que no parecen ser duplicados. En casi todas las condiciones una de las dos curvas, muestra un pico menos pronunciado que su duplicado y en algunas además se observa un desplazamiento en el pico de la T_m . En la muestra BA solo con los *primers* RP1 y una concentración del templado de 5 ng / μ l se observó una forma similar en las curvas de las dos reacciones, así como un a

misma T_m (Figura 31A). En la muestra RM amplificada con *primers* DST y una concentración de 15 ng/ μ l de templado, se observa una curva similar pero con un desplazamiento de 0.3°C en el pico de la T_m (Figura 31L). En la misma muestra, pero con *primers* grado HPLC y una concentración de templado de 5 ng/ μ l se observó una curva similar en la gráfica del pico de la temperatura de disociación, aunque solo se observa un pico pequeño (Figura 31P).

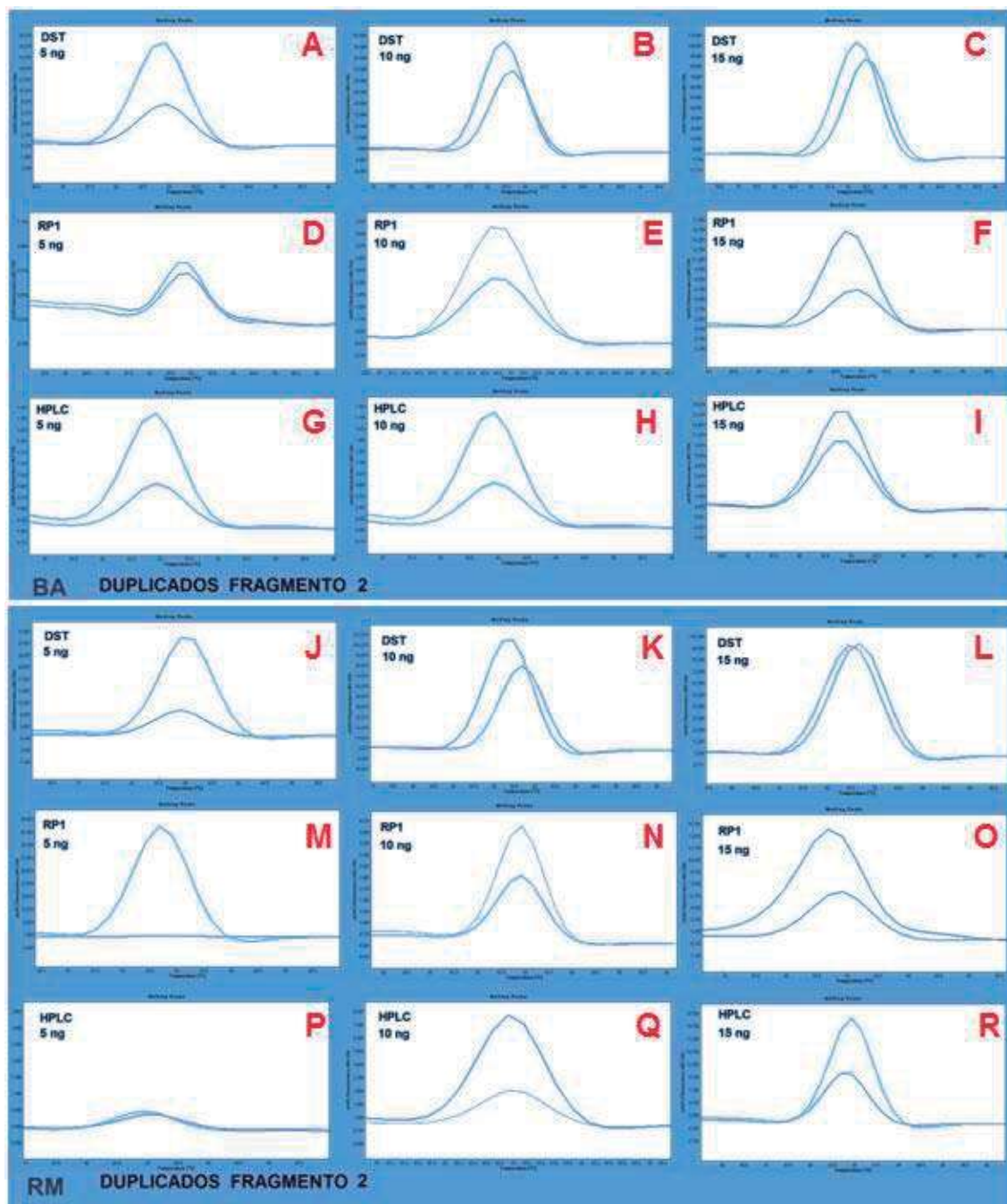


Figura 31. Gráficas de los picos de la temperatura de disociación del fragmento 2, aunque son gráficas de duplicados se observa una amplia variedad de forma de las curvas.

En todas las condiciones en las que fue evaluado el fragmento 3 de la muestra BA, se observan curvas muy similares en las gráficas de los picos de la T_m . Además el pico de la T_m fue el mismo en todas las reacciones (Figura 32).

En la muestra RM, solo en 4 condiciones (Figura 32K,L,N,R) se observan curvas del pico de la T_m similares: al utilizar *primers* DST, a concentraciones de 10 y 15 ng/ μ l de templado (Figura 32K,L), con *primers* purificados por RP1 y una concentración de 10 ng/ μ l de templado (Figura 32N), y al utilizar *primers* grado HPLC y una concentración de 15 ng/ μ l de templado (Figura 32R). Estas dos últimas condiciones, aunque tienen casi la misma forma de su curva que sus duplicados, no muestran el mismo pico de la temperatura de disociación, éste se desplaza 0.45°C y 0.25°C respectivamente.

En la misma muestra al utilizar *primers* RP1 y una concentración de 5 ng/ μ l de templado (Figura 32M) no se observó amplificación, al igual que en una de las reacciones al usar los mismos *primers* y 15 ng/ μ l de templado (31O). Al amplificar el fragmento usando *primers* HPLC y concentraciones de 5 y 10 ng/ μ l de templado (32P,Q), se observaron dos curvas distintas entre duplicados de una misma reacción. En una de las curvas de las gráficas de ambas condiciones se observó un pico menos pronunciado, pero se conservó la misma temperatura de disociación respecto a su duplicado (Figura 32Q).

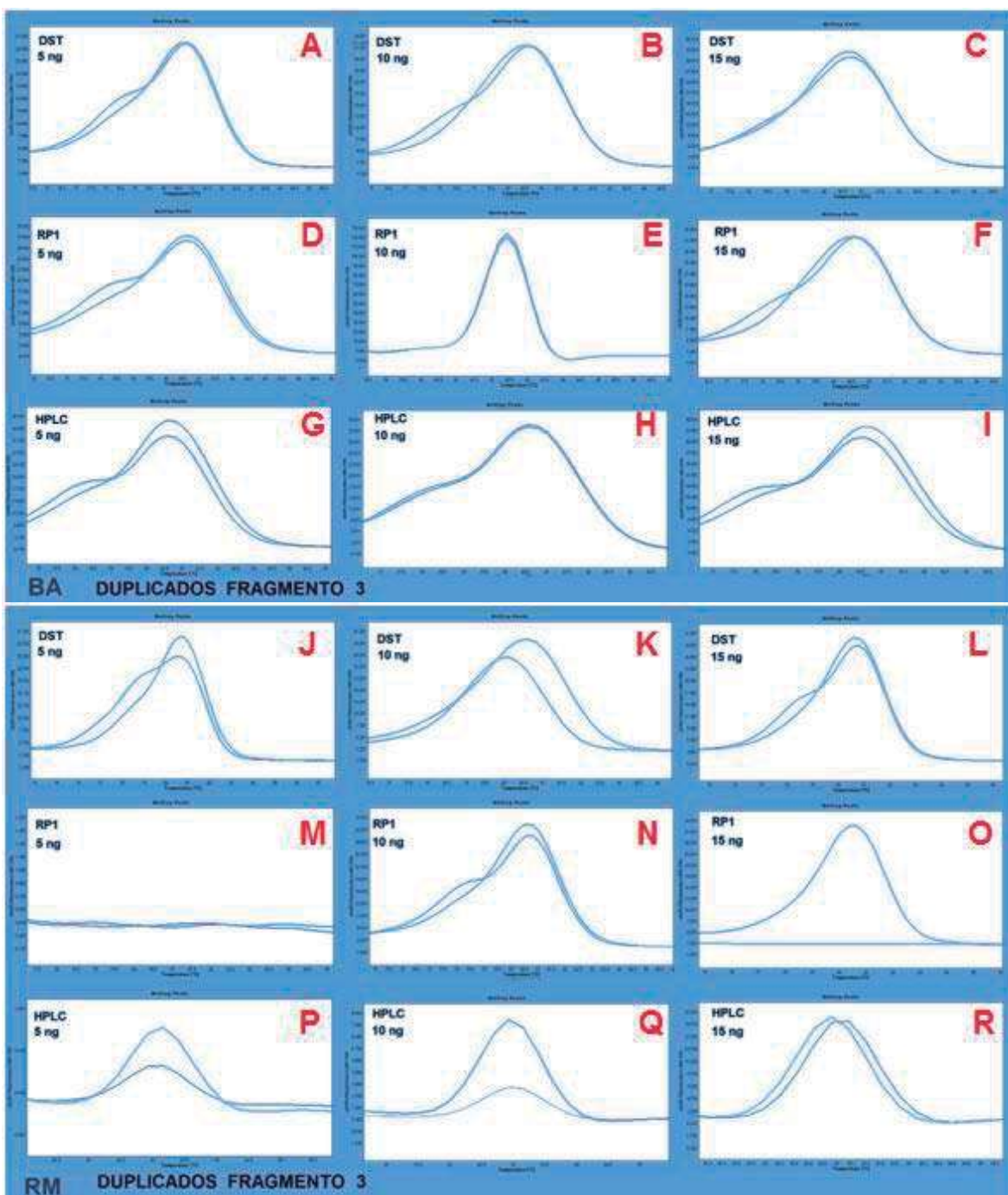


Figura 32. Gráficas de los picos de la temperatura de disociación del fragmento 3.

6.6.3.5. Elección de las Mejores Condiciones Para Realizar el HRM con los Distintos Fragmentos Evaluados

Para el fragmento 1 de 234 pb (Figura 33), las condiciones en la que se observó una diferencia en los picos de la T_m entre las dos muestras de individuos sanos (BA y RM) utilizadas para la estandarización fue al utilizar *primers* DST y con las tres diferentes concentraciones de templado (5 ng, 10 ng y 15 ng) (Figura 33A,B,C). No se observó ninguna diferencia en la temperatura de la curva de disociación entre ambas muestras analizadas al utilizar *primers* de pureza RP1 y HPLC (Figura 33D-I).

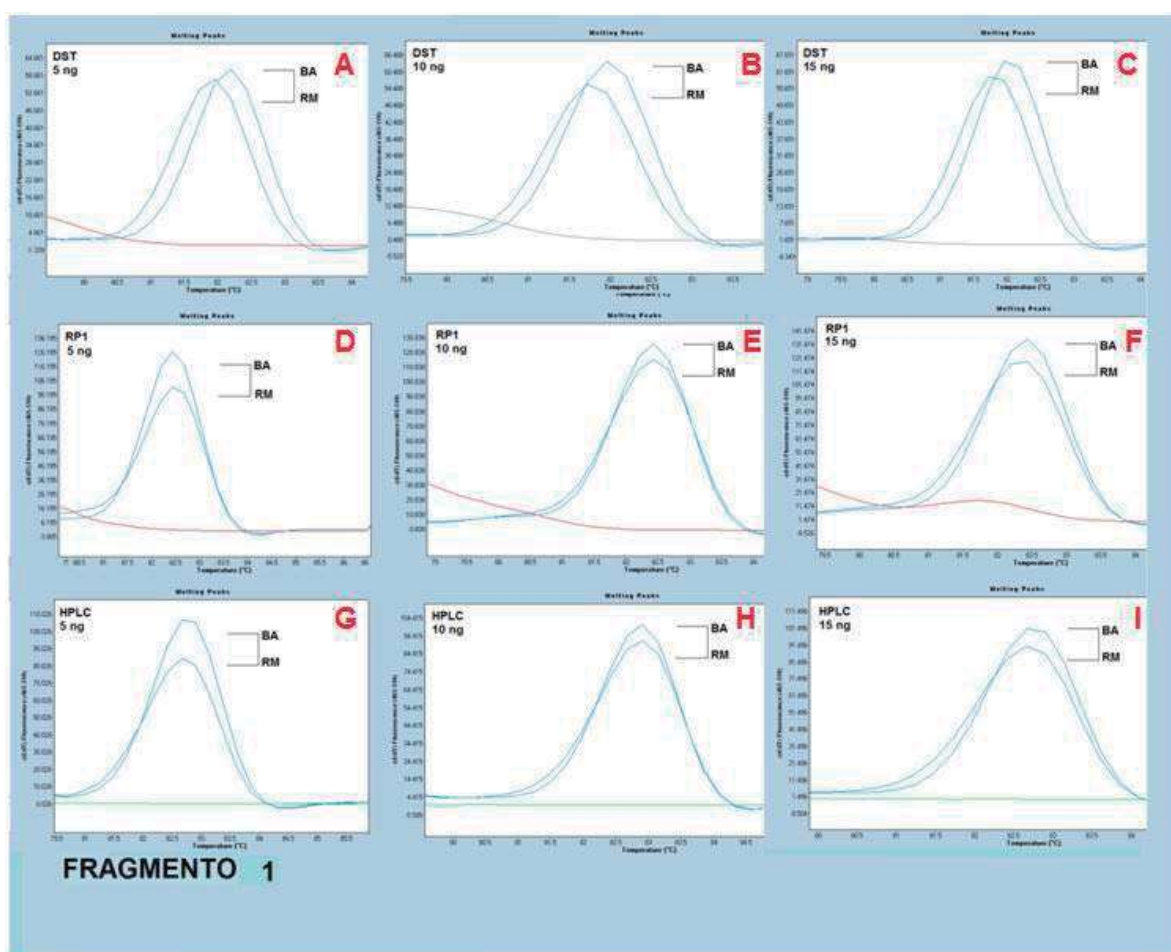


Figura 33. Evaluación de las condiciones con las que se realizó el HRM donde se comparan tres distintos grados de pureza de los *primers* utilizados: DST, RP1 y HPLC, además de tres distintas concentraciones del templado de ADN: 5 ng, 10 ng y 15 ng.

En el fragmento 2 (Figura 34) la única condición en la que se observó una diferencia en los picos de disociación entre las dos muestras de individuos sanos

(BA y RM) fue al utilizar *primers* desalados y una concentración de templado de 15 ng/ml (Figura 34C). No se observó ninguna diferencia en los picos de la Tm entre ambas muestras analizadas en ninguna otra condición (Figura 34).

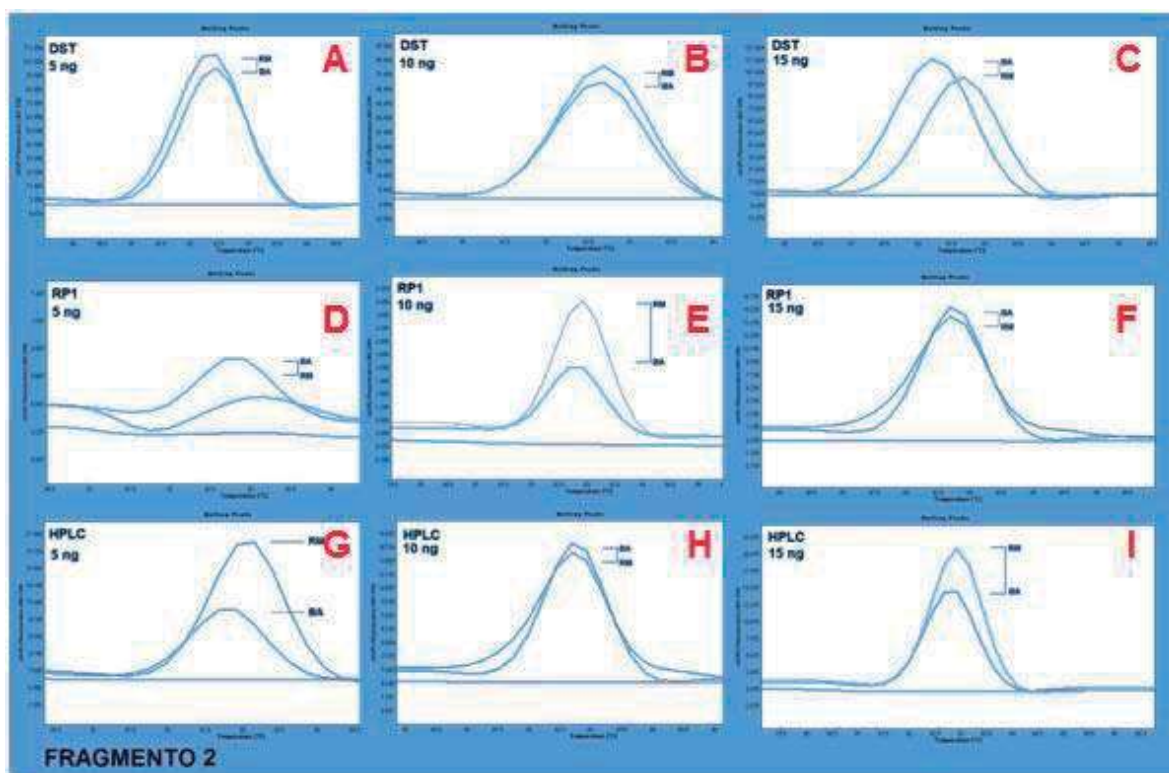


Figura 34. Gráficas de los picos de disociación donde se comparan tres distintos grados de pureza de los *primers* utilizados: DST, RP1 y HPLC, además de tres distintas concentraciones del templado de ADN: 5, 10 y 15 ng/ml.

En el fragmento 3 no se observaron diferencias el pico de la Tm entre las dos muestras analizadas con ninguna de las condiciones probadas (Figura 35). Tampoco se mostraron diferencias significativas en la forma de las curvas. Al no encontrar diferencias entre ambas muestras pertenecientes a distinto haplogrupos se decidió no realizar el análisis por HRM del fragmento 3 con las muestras de pacientes de cáncer cervicouterino.

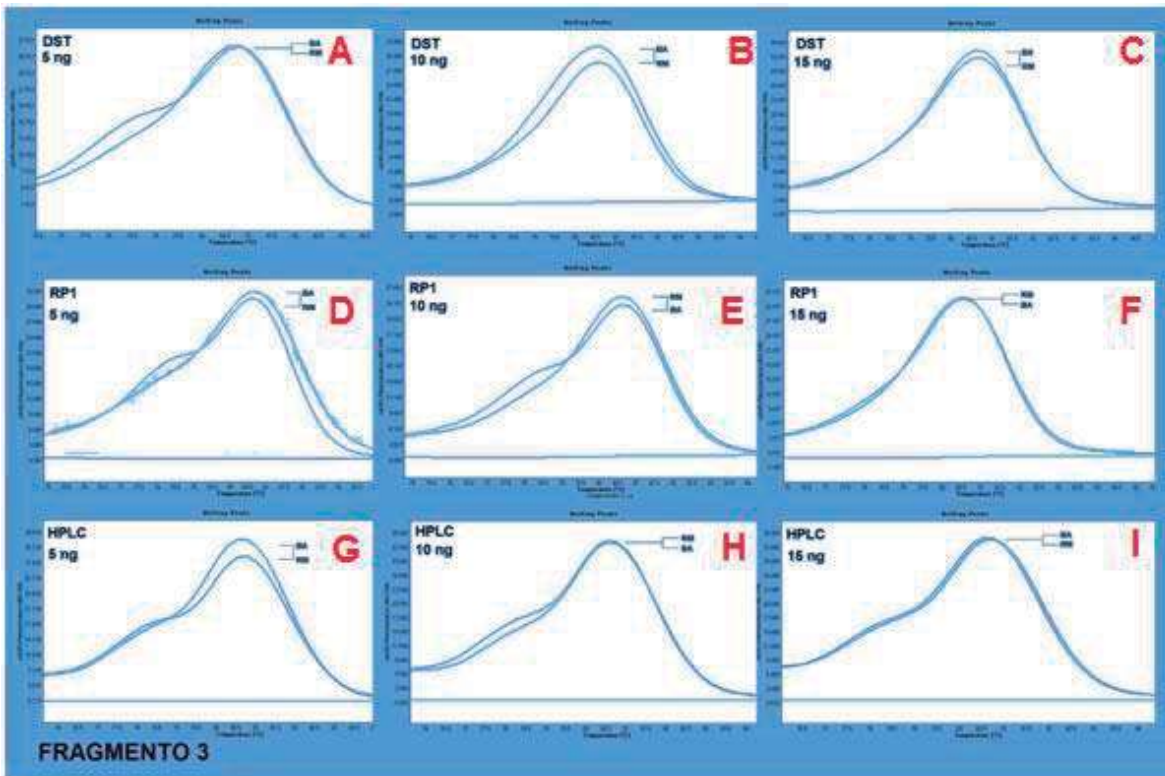


Figura 35. Gráficas de los picos de disociación del fragmento 3 con los distintos grados de pureza de los *primers* evaluados y las diferentes concentraciones de templado.

6.6.4. Evaluación del Análisis Mediante HRM en los Fragmentos 1 y 2

Una vez que se conocieron las condiciones en las que se podían detectar variaciones de secuencia para los fragmentos 1 y 2 utilizando las muestras de individuos sanos (RM y BA), se decidió evaluar bajo las mismas condiciones las muestras de pacientes de CaCu.

Para ambos fragmentos, las condiciones a las que se evaluó el análisis mediante HRM en la detección de mutaciones puntuales fueron: *primers* DST, una concentración inicial de templado de 15 ng/ml y una temperatura de alineamiento de 60°C.

6.6.4.1. Análisis Mediante HRM del Fragmento 1 de Pacientes con Lesiones de CaCu

Después de realizar el ensayo por HRM del fragmento 1 se observaron y compararon los picos de las T_m de cada una de las muestras (Figura 36). El primero de los picos se observó a 82°C , este pico corresponde a la T_m del fragmento con el SNP característico del haplogrupo H (muestra marcada como RM), a esta misma temperatura se observan los picos de la T_m de las muestras 98 y 103 pertenecientes a los haplogrupos H y A respectivamente. A 82.3°C se observó otro pico de T_m el cual pertenece a la muestra del individuo sano perteneciente al haplogrupo A (muestra BA), y por último a 82.5°C se observó el pico de la T_m de la muestra 89 la cuál es de un individuo del haplogrupo A. Con este tamaño de fragmento y las condiciones que se habían descrito en la estandarización se pudieron observar diferencias en los picos de las T_m , sin embargo, la muestra 103 perteneciente al haplogrupo A se observó a la misma temperatura que los picos de la T_m para el haplogrupo H, es decir 0.3°C menos que la muestra control del haplogrupo A, al cual pertenece la muestra 103.

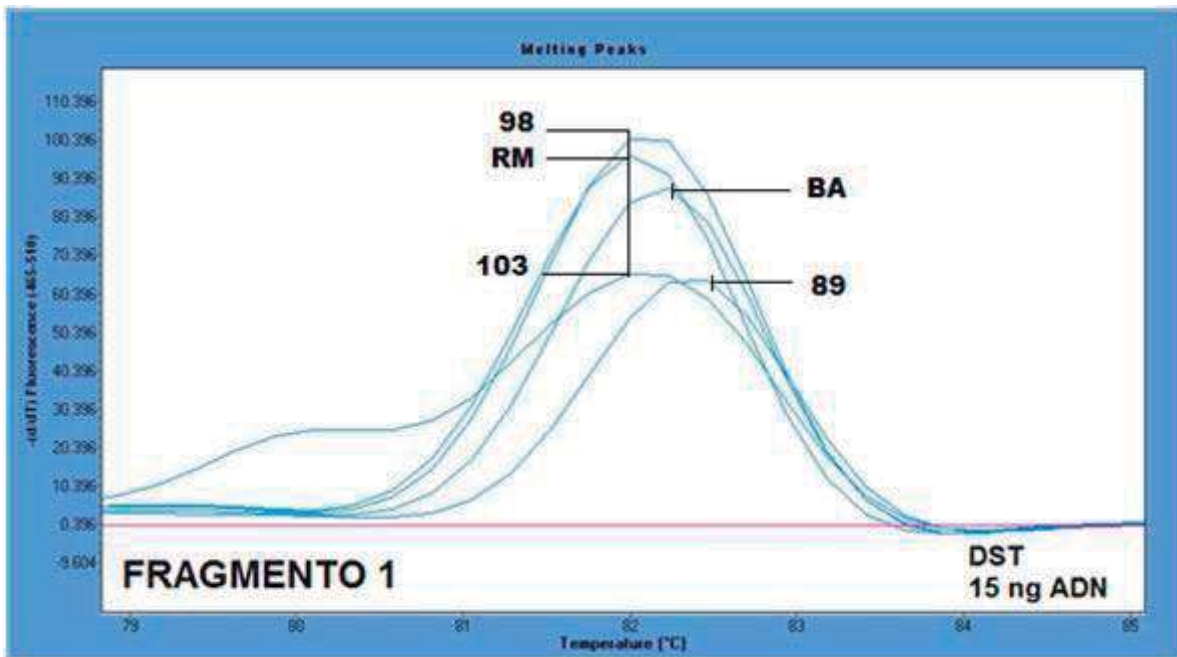


Figura 36. Picos de la T_m del fragmento 1 de muestras de pacientes de CaCu, con *primers* desalados y 15 ng de ADN como templado.

6.6.4.2. Análisis Mediante HRM del Fragmento 2 de Pacientes con Lesiones de CaCu

Se obtuvieron las graficas de los picos de la Tm del fragmento 2, el cual tiene un tamaño de 318 pb (Figura 37). Se observó que el pico de la Tm de la muestra 89 con un haplogrupo A corresponde a la misma Tm que la muestra control del individuo sano perteneciente al haplogrupo A, y se observó una diferencia de 0.3°C respecto a la muestra control del haplogrupo H (RM) (Figura 37A).

La muestra 98 de tejido con lesiones de CaCu perteneciente al haplogrupo H se observó que tiene la misma Tm (83.7°C) que el control del individuo sano del haplogrupo H (Figura 37B) mostrando una Tm 0.3°C más alta que la del haplogrupo A.

Sin embargo la muestra 103 que pertenece al haplogrupo A tuvo la misma Tm que el control del haplogrupo H, teniendo una diferencia con el control del haplogrupo A de 0.3°C (Figura 37C).

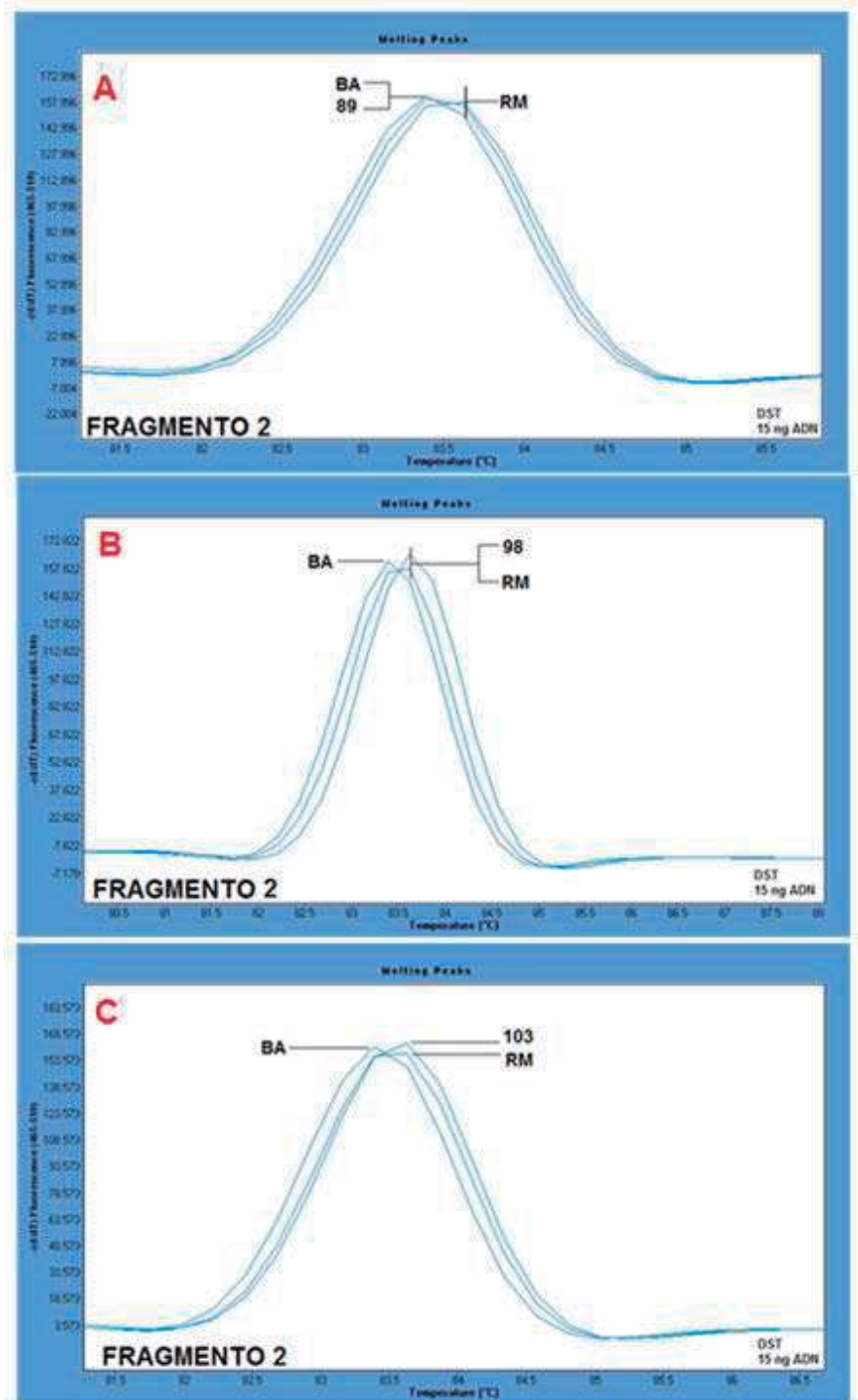


Figura 37. Picos de la Tm del fragmento 2 de pacientes con lesiones de CaCu.

7. DISCUSIÓN

7.1. Secuenciación y Determinación de Haplogrupos

Para la secuenciación del mtADN se utilizaron diversos pares de *primers* descritos en la sección de materiales y métodos (Ramos *et al.* 2009, Fendt *et al.* 2009) (Tabla 6) para cubrir la totalidad de los 2 fragmentos en los cuáles fue amplificado el mtADN de las muestras. Durante la secuenciación de las muestras se tuvieron distintos problemas con el fragmento A. Al parecer no se iniciaba la polimerización de ninguno de los fragmentos pequeños mediante los cuales iba a ser secuenciado dicho fragmento. Después se realizaron varias pruebas con algunas de las muestras variando la concentración de los *primers*, aumentando la concentración del templado y agregando dimetil sulfóxido (DMSO) a la reacción para facilitar la disociación de la doble hebra de ADN. Al agregar DMSO a la reacción de secuenciación, sin variar las concentraciones iniciales de templado y *primers* se logró secuenciar el fragmento A de las muestras utilizadas.

Si bien no se obtuvieron las secuencias completas de ninguna de las muestras, fue posible determinar el haplogrupo mitocondrial de cada una de ellas, Para su determinación se realizó una comparación con la secuencia de referencia (rCRS), a partir de las variaciones encontradas en cada muestra fueron determinados los haplogrupos de todas las muestras. Como se describió en los resultados, 2 de las muestras pertenecen al haplogrupo H, un individuo sano y un paciente de CaCu, el resto de las muestras fueron individuos con haplogrupo A. Ver figuras 13, 14 y 15 para individuos sanos y la figuras 16, 17 y 18 para pacientes de CaCu.

Aunque no se encontraron mutaciones en las regiones secuenciadas de las muestras de biopsia de pacientes de CaCu, se contaba con información suficiente para evaluar la utilidad del análisis mediante HRM en la detección de mutaciones puntuales en el mtADN. Dados los diferentes haplogrupos mitocondriales a los cuales pertenecen cada uno de los individuos sanos y pacientes de CaCu se decidió tomar los SNPs característicos de los haplogrupos para realizar el análisis mediante HRM utilizando algunos de los pares de *primers* diseñados, los cuales amplifican fragmentos de alrededor de 300 pb.

7.2. Estandarización de las Condiciones Necesarias para Realizar el Análisis por HRM de los Fragmentos 1, 2 y 3

Una vez que se decidió que los SNPs G663A, C7028C y C14766T, serían utilizados para realizar la evaluación del HRM, se eligieron 3 pares de *primers* para amplificar los fragmentos en los cuales se encuentran dichos SNPs característicos de los haplogrupos A y H (fragmentos 1, 2 y 3 respectivamente). Cada uno de los *primers* fueron pedidos sintetizar con 3 distintos grados de pureza: desalados (DST), purificados mediante fase reversa (RP1) y mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Se evaluó el efecto de la pureza de los *primers* y la concentración del templado en los picos de la temperatura de disociación de los fragmentos, así como la reproducibilidad de los resultados mediante duplicados de todas las reacciones. Posteriormente se eligieron las mejores condiciones para la búsqueda de mutaciones puntuales según las distintas condiciones evaluadas para cada fragmento.

Para realizar la estandarización de los tres fragmentos se utilizaron las muestras de los individuos sanos debido a que se tenía más cantidad de muestra que de las muestras de pacientes con CaCu, además estas últimas eran únicas. Primeramente se estandarizaron las condiciones para amplificar todos los fragmentos mediante PCR punto final, siendo 60°C la mejor temperatura de alineamiento para todos los *primers*. Las diversas condiciones que fueron tomadas en cuenta para la estandarización de la detección de los SNPs fueron distintas concentraciones de templado y los distintos grados de pureza de los *primers*. Además también se realizaron duplicados de cada una de las reacciones en los ensayos para observar reproducibilidad de los análisis. A continuación se discuten los efectos de las distintas condiciones evaluadas y cuál fue la mejor condición para realizar la detección de mutaciones puntuales en cada uno de los fragmentos mediante el análisis por HRM de las muestras de pacientes de CaCu.

7.2.1. Efecto de la pureza de los *primers* en la T_m

En el proceso de síntesis de *primers* de ADN, cada nucleótido es acoplado secuencialmente a la cadena del *primer* en crecimiento. En cada ciclo de acoplamiento, un pequeño porcentaje de los *primers* no son extendidos, lo que resulta en una mezcla de *primers* del tamaño deseado y *primers* con secuencias truncadas, con uno o dos nucleótidos faltantes. Mediante purificación se puede separar los *primers* de tamaño correcto de aquellos con secuencias truncadas (Berg *et al.* 2007).

Los 3 tipos de *primers* utilizados en este trabajo fueron: 1) desalados, en estos *primers* alrededor del 80% del total son del tamaño deseado, 2) purificados por medio de cartuchos de fase reversa (RP1), del 80 al 90% del total de los *primers* son del tamaño deseado, y 3) purificados por medio de HPLC, del 90 al 97% del total de los *primers* tienen el tamaño del diseño (Sigma-Aldrich Co, 2005).

Debido a lo anterior pueden existir diferencias en la temperatura de disociación (T_m) al utilizar distintos grados de pureza en los *primers* para amplificar un fragmento determinado. Debido a la presencia de fragmentos “truncados” carentes de una o dos bases o con una hibridación deficiente.

El análisis por HRM se basa en la cantidad de fluorescencia emitida por las hebras de ADN de doble cadena. Los fragmentos de ADN amplificados que sean de un tamaño menor como consecuencia de *primers* truncados y por lo tanto con una T_m menor, pueden modificar la T_m calculada por el equipo, ya que dichos fragmentos dejarán de emitir fluorescencia a una temperatura menor y esto modifica el pico de la T_m , calculada por el software.

En el fragmento 1 el desplazamiento del pico de la T_m concuerda con lo descrito anteriormente. En este fragmento, se observó una menor temperatura del pico de la T_m al utilizar *primers* DST. El pico de la T_m mayor se observó al utilizar los *primers* de mayor pureza.

En el fragmento 2 y 3 no se observaron cambios en los picos de la T_m con concentraciones de templado de 5 y 10 ng/ μ l. Esto no concuerda con los resultados observados en el fragmento 1. Los cambios podrían no haber sido detectados debido al tamaño de los fragmentos 2 y 3, los cuales son ambos 84 pb más grandes que el fragmento 1. El aumento en el tamaño del fragmento hace menos evidente un cambio en el pico de la T_m . Sin embargo, al aumentar la concentración de templado a 15ng/ μ l se observó un desplazamiento del pico de la T_m , el cual disminuyó 0.5 °C.

El cambio en las T_m observado al usar *primers* DST y 15 ng/ μ l podría explicarse debido a que al ser mayor la concentración de ADN utilizada, es de igual forma mayor la probabilidad de que un *primer* truncado sea utilizado para la amplificación de algún fragmento que posteriormente será amplificado con una secuencia truncada, de uno o dos pb menos que el fragmento deseado. Al usar concentraciones bajas de templado no se genera la cantidad suficiente de fragmentos “truncados” como para provocar un cambio significativo en la emisión de fluorescencia y consecuentemente en el pico de la T_m del fragmento calculado por el aparato.

La diferencia en el pico de la T_m puede ser consecuencia de que parte del extremo 5' de los fragmentos “truncados” se encuentra unido débilmente a la hebra complementaria o incluso podría no estar unido, siendo menor la T_m de estos fragmentos, dando como resultado una emisión de fluorescencia menor que en fragmentos en los cuales sus hebras están unidas perfectamente, provocando una disminución en el pico de la T_m del fragmento evaluado.

7.2.2. Efecto de la Concentración Inicial de Templado en la T_m

Uno de los efectos esperados al cambiar las concentraciones iniciales de templado, era que los picos de la T_m en las distintas concentraciones utilizadas se mantuvieran constantes. Cambios en el pico de la T_m sugieren la presencia de variaciones en la secuencia de nucleótidos en el ADN, ya que esta secuencia es la que determina la T_m del fragmento. Por lo que, si se tiene el fragmento de un

mismo individuo se esperaría que la T_m fuera la misma sin importar la concentración inicial del templado, que solo debería de mostrar una mayor señal de fluorescencia ya que hay más cantidad de ADN de doble cadena (dsADN). Sin embargo, el pico de la T_m en todos los fragmentos solo se mantuvo constante, sin importar las concentraciones iniciales, al utilizar *primers* RP1 y en el fragmento 2 con cualquiera de los 3 tipos de *primers*.

Las curvas observadas durante la amplificación por PCR previa al análisis mediante HRM de los fragmentos de ADN, siguen un comportamiento sigmoideo debido a la amplificación exponencial de los fragmentos mediante PCR. Esta curva sigmoidea al final llega a una etapa de meseta, lo cual es necesario para que el equipo en el cual se realiza el análisis mediante HRM, calcule correctamente la T_m de los fragmentos evaluados. Ya que al no alcanzar dicha meseta se pueden tener variaciones en los resultados, debido a T_m mal calculadas. Ésto posiblemente ocurrió en este estudio, ya que en algunas reacciones no se observó que se llegará a la meseta, aún después de 45 ciclos de amplificación. Por lo que seguramente si se utilizan bajas concentraciones iniciales de templado es más probable que se obtengan resultados erróneos. Además al utilizar concentraciones tan bajas se pueden llegar a tener errores de pipeteo, donde a pesar de tomar el volumen correcto, puede ser que no se tenga realmente la cantidad de moléculas de ADN que se espera en dicho volumen, y por lo tanto modifiquen los picos de la T_m calculadas por el aparato debido a la baja cantidad de fragmentos presentes que no son suficientes para alcanzar la meseta.

Estas mismas diferencias en las T_m calculadas debido a las bajas concentraciones, pueden haber modificado las curvas de tal forma que no fue posible detectar los SNPs en los fragmentos evaluados mediante HRM, por lo que se recomienda utilizar concentraciones más altas que $15\text{ng}/\mu\text{l}$ de templado inicial. Y definitivamente no utilizar concentraciones tan bajas como $5\text{ng}/\mu\text{l}$, con las cuáles hay mayor riesgo de tener resultados incorrectos, ya que se tiene mayor probabilidad de no alcanzar la meseta necesaria para que el aparato calcule de forma adecuada la T_m .

En los fragmentos 1 y 2 se observó que al utilizar concentraciones iniciales de templado de 5 ng y *primers* DST el pico de la T_m se desplazaba a una temperatura 0.3°C más alta que al utilizar los *primers* RP1 y HPLC. Posiblemente en los *primers* DST quedan algunos rastros de Dimetoxitritilo (DMT) y β Cianoetilo, las moléculas con las que se protegen los grupos funcionales de los nucleótidos cuando los *primers* están siendo sintetizados (Berg *et al.* 2007). Por lo que restos de estas moléculas elevan la T_m del fragmento. En cambio los *primers* RP1 y HPLC además del proceso de desalado también son separados mediante cromatografía, por lo que estas moléculas son eliminadas.

Otro efecto esperado al utilizar distintas concentraciones de templado era una diferencia en la cantidad de fluorescencia emitida por los fragmentos directamente relacionada con la concentración, en este caso 5, 10 y 15 ng/ μ l. A pesar de esto, la cantidad de fluorescencia emitida en los fragmentos 1 y 3 no fue de esta manera, solo se observó esto en el fragmento 2, en el que al aumentar la concentración inicial de templado se observó de igual forma una emisión de fluorescencia mayor.

En la literatura se encuentra un reporte de la búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* mediante el uso de HRM (De Leeneer, 2008). En dicho estudio se utilizó el mismo aparato que se utilizó en el presente trabajo (Light Cycler 480, Roche), sin embargo utilizaron una mayor concentración inicial de templado de la que se utilizó en este estudio. El equipo recomienda como máximo utilizar concentraciones iniciales de 30 ng/ μ l, pero en el estudio de De Leeneer *et al.* utilizaron 100 ng/ μ l para realizar los ensayos. No hay datos reportados en los cuáles se hayan analizado los picos de la T_m al utilizar diferentes concentraciones de templado. Estudios como el de De Leeneer *et al.* en el cuál se excedió el límite de templado sugerido por los fabricantes del aparato más de 3 veces, sería conveniente que hicieran disponibles los datos mediante los cuáles estandarizaron la concentración inicial de templado. Para complementar el presente estudio sería necesario realizar un análisis en el cual se aumente la concentración inicial de templado más allá de las recomendaciones del fabricante del equipo y observar el comportamiento de las T_m , para determinar si es mejor

realizarlo en dichas condiciones, tal como en el trabajo de De Leeneer *et al.* Se pueden realizar ensayos en los que se aumenten las concentraciones iniciales gradualmente hasta niveles como los de el estudio de De Leeneer *et al.* para observar si en algún momento los picos de la T_m se mantienen constantes, tal vez debido a las bajas concentraciones que utilizamos en este estudio hay más probabilidad de que el equipo con el que se realizó el análisis calcule las T_m de manera errónea. Quizá al aumentar las concentraciones iniciales de templado se obtengan resultados confiables.

7.2.3. Duplicados de las Reacciones

Se realizaron duplicados de los ensayos para evaluar la reproducibilidad de los resultados de cada una de las reacciones de los fragmentos. En los fragmentos 1 y 3 se observaron en casi todas las condiciones evaluadas (concentraciones de templado de 5, 10, 15 ng/ μ l y *primers* DST, RP1 y HPLC) la misma T_m y forma de la curva, que eran los resultados esperados (Figuras 30 y 32). En el fragmento 1 con la muestra BA usando 5 ng/ μ l de templado y *primers* DST (Figura 30A) y con la muestra RM usando 5 ng/ μ l de templado y *primers* HPLC (Figura 30P), se observó un ligero cambio en la T_m , pero la forma de la curva es igual. En el fragmento 2 por otra parte, no se observó el comportamiento esperado, las curvas de los duplicados tenían diferentes formas y T_m (Figura 31).

Este resultado es inesperado debido a que los demás duplicados de los otros fragmentos se observaron de forma muy similar. Debido a esto no se puede tener la certeza de que los resultados sean confiables, y sería necesario realizar nuevos ensayos para observar si definitivamente quedaría descartado usar el HRM en la búsqueda de mutaciones en las condiciones evaluadas en este fragmento ya que no se observó reproducibilidad en los ensayos.

Por otra parte, la falta de reproducibilidad entre duplicados, podría atribuirse también a errores de pipeteo, por lo que es imprescindible repetir el ensayo, idealmente incluyendo más réplicas.

7.2.4. Elección de las Mejores Condiciones Para Realizar el HRM con los Distintos Fragmentos Evaluados

Para poder realizar el análisis mediante HRM con el fin de detectar los SNPs característicos de los haplogrupos mitocondriales de las muestras de pacientes de cáncer cervicouterino (CaCu), como primer paso se buscaron las condiciones necesarias para poder detectar la existencia de dichas diferencias para cada uno de los 3 fragmentos evaluados, utilizando las 2 muestras de individuos sanos, RM y BA, ya que cada uno pertenece a distintos haplogrupos, H y A respectivamente.

En los 3 fragmentos las diversas condiciones evaluadas fueron 3 concentraciones iniciales de templado (5, 10 y 15 ng/ μ l) y 3 distintas purezas de *primers* (DST, RP1 y HPLC). Sin embargo, bajo estas condiciones solamente se lograron detectar las diferencias en los fragmentos 1 y 2. En el tercer fragmento bajo ninguna condición se detectaron variaciones de secuencia. Debido a la falta de tiempo para evaluar otras condiciones para dicho fragmento, se decidió no realizar el análisis mediante HRM de las muestras de CaCu en el fragmento 3.

En el fragmento 1 utilizando *primers* DST y con cualquiera de las 3 concentraciones iniciales de templado (5, 10, 15 ng/ μ l) fue posible detectar variaciones en la secuencia de los controles de los individuos sanos. Sin embargo, al usar *primers* RP1 o HPLC no se logró la detección del SNP A663G mediante el análisis por HRM. Debido al comportamiento observado de la T_m al utilizar las diversas concentraciones de templado, se decidió realizar los ensayos del fragmento 1 de las muestras de pacientes de CaCu utilizando *primers* DST y 15 ng/ μ l, ya que con esta concentración se alcanza la “meseta de amplificación” a partir de la cual es calculada la T_m y se obtienen resultados más confiables que al usar concentraciones más bajas.

En el fragmento 2 solo utilizando *primers* DST y una concentración de 15 ng/ μ l fue posible detectar el SNP evaluado de los individuos sanos utilizados como controles. En ning una de todas las demás condiciones evaluadas fue posible detectar la presencia del SNP C 7028C característico de haplogrupo H para posteriormente realizar los ensayos con las muestras de pacientes de CaCu. Por lo que se decidió reali zar el análisis mediante HRM del fragmento 2 utilizando la única condición en la que se pudo detectar la presencia del SNP.

7.2.5. Evaluación del HRM en la Búsqueda de Mutaciones en las Muestras de Pacientes de Cáncer Cervicouterino

Al utilizar el fragmento de 105 pb en la evaluación de la utilidad del HRM en la búsqueda de mutaciones puntuales, fue posible detectar la presencia del SNP característico del haplogrupo H y observar una diferencia significativa en la T_m respecto a la muestra perteneciente al haplogrupo A. Dobrowolsky *et al.* (2009) evaluaron la capacidad del HRM para detectar la mutación puntual A8344G en el mtADN, en pacientes con Síndrome de MELAS. La presencia de esta mutación ya había sido prev iamente detectada mediante secuenciación y se utiliz ó el análisis mediante HRM para evaluar su utilidad en la detección de dicha mutación utilizando un fragmento de 64 pb. Utilizando HRM se logró confirmar en el 100% de las muestras la presencia de esta mutación puntual (Dobrowolsky *et al.* 2009). El tamaño de los fragmentos tanto del presente estudio como el de Dobrowolsky *et al.* permiten la detección de mutaciones puntuales en el mtADN, ya que el tamaño de estos fragmentos de alrededor de 100 pb o me nos, permiten observar más fácilmente cambios en los picos de la T_m y detectar variaciones en la secuencia de mtADN. Por lo q ue, para reali zar estudios de diagnóstico o reali zar genotipificación de muestras es rec omendable el us o de fragmentos de este tamaño. Para realizar la búsqueda de mutaciones *de novo* en el mtADN no es recomendable debido al tamañ o del fragmento, ya que se tendrían que estandarizar las condiciones para cada uno de los pares de *primers* que serían utilizados y con dicho tama ño de fragmento se tendrían que usar más de 2 00 pares de *primers*.

También se evaluó la capacidad del HRM para detectar mutaciones puntuales en un fragmento de 372 pb. La evaluación mediante HRM de este fragmento, el cuál es de un tamaño mayor que cualquiera de los *primers* que fueron diseñados en este estudio, se realizó para observar el comportamiento de los picos de la Tm y para conocer si con el tamaño de ese fragmento era posible detectar mutaciones puntuales. Además, los resultados serían utilizados como una referencia previa antes de realizar la estandarización de los fragmentos 1, 2 y 3 para la detección de los SNPs característicos de los haplogrupos mitocondriales. La mutación evaluada fue la misma que para el fragmento de 105 pb. Sin embargo, con el tamaño de este fragmento, casi 4 veces más grande, no fue posible detectar la presencia de la mutación. En este caso el tamaño del fragmento es tan grande que los picos de la Tm de las diferentes muestras pertenecientes a distintos haplogrupos se observaron en el mismo punto (Figura 22).

En los análisis mediante HRM de los fragmentos de 234 y 318 pb en donde se evaluaron los SNPs A663 G y C7028C respectivamente, los resultados no fueron confiables ya que en ambos casos bajo las condiciones evaluadas, no se logró determinar con seguridad la presencia de mutaciones puntuales. Al igual que con el fragmento de 372 pb antes mencionado, el tamaño de los fragmentos es demasiado grande para que pueda ser visible una diferencia en la Tm. Ésto puede deberse a que con fragmentos cada vez más grandes es menos evidente la presencia de diferencias en la Tm. De Leeneer *et al.* (2008) utilizando el análisis de HRM en la búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, involucrados en la progresión del cáncer de mama, utilizaron fragmentos de un poco menos de 400 pb. En tal estudio se logró detectar la presencia de mutaciones, con una especificidad de 98.7%. Sin embargo, entre las mutaciones reportadas en el estudio de De Leeneer *et al.* hay varias que no son mutaciones puntuales, sino que son deleciones de fragmentos más grandes que producen una diferencia mayor en los picos de la Tm. Aunque también reportan la detección de mutaciones puntuales mediante HRM, utilizaron una concentración inicial de templado casi 7 veces mayor que la utilizada en el presente estudio, más de 3 veces la recomendada para resultados óptimos en el equipo de HRM. Con esto

se observa que hace falta evaluar una mayor cantidad de condiciones para utilizar esta técnica con resultados confiables.

Finalmente, podemos decir que dadas las ventajas que otorga el análisis mediante HRM, esta técnica puede tener buenos alcances para realizar la búsqueda de mutaciones puntuales en el mtDNA en pacientes de CaCu. Aunque todavía hacen falta más estudios y una estandarización más fina de las condiciones para utilizarlo con la finalidad de detectar mutaciones que puedan ser candidatas como marcadores tumorales o de diagnóstico temprano de esta enfermedad

8. CONCLUSIONES

- La pureza de los *primers* utilizados para realizar análisis mediante HRM influyen en los resultados del análisis, ya que se observaron cambios en la T_m al utilizar distintos grados de pureza de *primers*, se recomienda el uso de la misma pureza de *primers* al realizar la búsqueda de mutaciones mediante HRM.
- El tamaño del fragmento analizado mediante HRM es importante ya que en fragmentos pequeños (<100 pb) es más evidente el cambio en la T_m que en fragmentos de un tamaño mayor.
- La detección de mutaciones puntuales en el genoma mitocondrial humano utilizando el análisis de HRM no fue concluyente bajo las condiciones evaluadas en este estudio.
- Debido a las ventajas que confiere el análisis mediante HRM, se pueden tener buenos alcances para realizar la búsqueda de mutaciones en el mtDNA utilizando fragmentos mayores de 100 pb, aunque son necesarios más estudios y una estandarización más fina de las condiciones para realizar el análisis mediante HRM.

9. PERSPECTIVAS

- Completar la secuenciación de las muestras para realizar la búsqueda de posibles mutaciones en el mtADN asociadas con el desarrollo y/o progresión de CaCu.
- Secuenciación del mtADN en una amplia cantidad de muestras de pacientes con CaCu con diferentes grados de desdiferenciación celular.
- Búsqueda de mutaciones como posibles marcadores tumorales.
- Diseño de *primers* que amplifiquen fragmentos menores de 100 pb para la detección de posibles marcadores tumorales utilizando HRM.
- Optimización de condiciones para realizar el análisis mediante HRM de los marcadores tumorales.
- Una vez establecidas las condiciones para la detección de marcadores tumorales realizar pruebas en ciego para verificar la especificidad de la prueba.
- Es necesario evaluar más condiciones para lograr la detección de mutaciones puntuales (por ejemplo: aumentar la concentración inicial de templado y hacer gradientes de concentración de Mg⁺).

10. REFERENCIAS

A. Klemba, M. K., W. Kukwa et al. (2010). "Mitochondrial genotype in vulvar carcinoma-cuckoo in the nest." *Journal of Biomedical Science* vol. 17, no. 1.

Al Rawi, S., S. Louvet-Vallée, et al. (2011). "Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission." *Science* 334(6059): 1144-1147.

Amuthan, G., G. Biswas, et al. (2002). "Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells." *Oncogene* 21(51): 7839-7849.

Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature* 290(5806): 457-465.

Andrews, R. M., I. Kubacka, et al. (1999). "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA." *Nat Genet* 23(2): 147-147.

Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of Mitochondria." *Annual Review of Cell Biology* 4(1): 289-331.

Bacman, S. R., S. L. Williams, et al. (2009). "Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks." *Nucleic Acids Research* 37(13): 4218-4226.

Bai, Y., P. Hu, et al. (2004). "Genetic and Functional Analysis of Mitochondrial DNA-Encoded Complex I Genes." *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* 1011(1): 272-283.

Baysal, B. (2006). "Role of mitochondrial mutations in cancer." *Endocr Pathol* 2006 Fall(17(3)203-12).

Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J. L.(2007). *Biochemistry*. Sixth Edition. W.H. FREEMAN AND COMPANY, New York and Basingstoke.

Brandon, M., P. Baldi, et al. (2006). "Mitochondrial mutations in cancer." *Oncogene* 25(34): 4647-4662.

Brandstätter, A., H. Niederstätter, et al. (2004). "Monitoring the inheritance of heteroplasmy by computer-assisted detection of mixed basecalls in the entire human mitochondrial DNA control region." *International Journal of Legal Medicine* 118(1): 47-54.

Brown, M., E. Starikovskaya, et al. (2002). "The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J." *Human Genetics* 110(2): 130-138.

Cancer Help UK. (2010). "Cervical cancer stages". Cancer Research UK. Disponible en línea en: <http://cancerhelp.cancerresearchuk.org/type/cervical-cancer/treatment/cervical-cancer-stages?>

- Canter, J. A., A. R. Kallianpur, et al. (2005). "Mitochondrial DNA G10398A Polymorphism and Invasive Breast Cancer in African-American Women." *Cancer Research* 65(17): 8028-8033.
- Carew, P. H. a. J. S. (2002). "Mitochondrial defects in cancer." *Molecular Cancer* (1:9 doi:10.1186/1476-4598-1-9).
- Chen, T., J. He, et al. (2011). "The mitochondrial DNA 4,977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer." *BMC Medical Genetics* 12(1): 8.
- Chen, T.-J., R. G. Boles, et al. (1999). "Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis." *Clin Chem* 45(8): 1162-1167.
- Coskun PE, R. -P. E., Wallace DC. (2003). "Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum." *Proc Natl Acad Sci U S A*(Mar 4;100(5):2174-6).
- Czarnecka, A., Bartnik, A. (2011). "The Role of the Mitochondrial Genome in Ageing and Carcinogenesis." *Journal of Aging Research* 2011: 10 pages.
- Czarnecka, A., Klemba, et al. (2009). "Common mitochondrial polymorphisms as risk factor for endometrial cancer." *International Archives of Medicine* 2(1): 33.
- Czarnecka, T. K., K. Plak et al. (2010). "Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition." *Oncology Reports* vol. 24, no. 6: pp. 1521-1534.
- Darvishi, K., S. Sharma, et al. (2007). "Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer." *Cancer Letters* 249(2): 249-255.
- De Leeneer, K., I. Coene, et al. (2008). "Rapid and Sensitive Detection of BRCA1/2 Mutations in a Diagnostic Setting: Comparison of Two High-Resolution Melting Platforms." *Clin Chem* 54(6): 982-989.
- Desler, C., B. Munch-Petersen, et al. (2007). "Mitochondria as determinant of nucleotide pools and chromosomal stability." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 625(1-2): 112-124.
- DiMauro, E. B. S. (1997). "Mitochondrial encephalomyopathies." *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*: 201-235.
- Ding, Z., J. Ji, et al. (2010). "Analysis of mitochondrial DNA mutations in D-loop region in thyroid lesions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800(3): 271-274.
- Dobrowolski, S. F., J. Gray, et al. (2009). "Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling." *Human Mutation* 30(6): 891-898.
- Fearnley, I. M. and J. E. Walker (1987). "Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle." *Biochemistry* 26(25): 8247-8251.

Fendt, L., B. Zimmermann, et al. (2009). "Sequencing strategy for the whole mitochondrial genome resulting in high quality sequences." *BMC Genomics* 10(1): 139.

Genetics, Ltd. (2004). "Genealogy." *Family Tree DNA*. <http://www.familytreedna.com/>

Hsiu-Chuan, W.-C. Hsu, et al. (2010). "Advantages and considerations in the confirmation of mitochondrial DNA mutations by denaturing HPLC and pyrosequencing." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201(1): 13-20.

Krypuy, M., G. Newnham, et al. (2006). "High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer." *BMC Cancer* 6(1): 295.

Larsen, N. B., M. Rasmussen, et al. (2005). "Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?" *Mitochondrion* 5(2): 89-108.

Lijun Shen, H. F., Tao Chen, Jing He, Mei Zhang, Xiaosong Wei, Yijuan Xin, Yulin Jiang, Zhinan Ding, Jingzhang Ji, Jianxin Lu and Yidong Bai (2011). "Mitochondrial Research in Translational Medicine Evaluating mitochondrial DNA in cancer occurrence and development." *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* (Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923).

Lizano-Soberón (2009). "Detectan 10 mil casos anuales de cáncer cervicouterino en México." *Periodico Virtual Ciudadanía Express*.

López-Saavedra, L.-S. y. (2006). "Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina." *Cancerología*: 31-55.

Malyarchuk b., Rogozin i., Berikov b., derenko m. (2002). Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet.* 111(1): 46-53.

Meissner, C., P. Bruse, et al. (2008). "The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: A useful biomarker or more?" *Experimental Gerontology* 43(7): 645-652.

Ramos, A., C. Santos, et al. (2009). "Human mitochondrial DNA complete amplification and sequencing: A new validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification." *ELECTROPHORESIS* 30(9): 1587-1593.

Ray, A. M., K. A. Zuhlke, et al. (2009). "Sequence variation in the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I and prostate cancer in African American men." *The Prostate* 69(9): 956-960.

Richter, C. (1995). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing." *The International Journal of Biochemistry; Cell Biology* 27(7): 647-653.

Rui, B., W.-L. Li, et al. (2011). "Rapid identification of mtDNA somatic mutations in gastric cancer tissues based on the mtDNA phylogeny." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 709-710(0): 15-20.

Sanchez-Cespedes, M., P. Parrella, et al. (2001). "Identification of a Mononucleotide Repeat as a Major Target for Mitochondrial DNA Alterations in Human Tumors." *Cancer Research* 61(19): 7015-7019.

Santos, C., B. Sierra, et al. (2008). "Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Control Region of Human Mitochondrial DNA." *Journal of Molecular Evolution* 67(2): 191-200.

Santos, C., M. Martinez, et al. (2008). "Mitochondrial DNA mutations in cancer: a review." *Current topics in medicinal chemistry* 8(15): 1351-1366.

Santos, C., R. Montiel, et al. (2008). "Mutation patterns of mtDNA: Empirical inferences for the coding region." *BMC Evolutionary Biology* 8(1): 167.

Sato, M. and K. Sato (2011). "Degradation of Paternal Mitochondria by Fertilization-Triggered Autophagy in *C. elegans* Embryos." *Science* 334(6059): 1141-1144.

Sharma, H., A. Singh, et al. (2005). "Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer." *Cancer Cell International* 5(1): 1-6.

Shen, L., H. Fang, et al. (2010). "Evaluating mitochondrial DNA in cancer occurrence and development." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201(1): 26-33.

Sigma-Aldrich Co. (2005) "Custom Oligonucleotide Synthesis".

Simonnet, H., N. Alazard, et al. (2002). "Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma." *Carcinogenesis* 23(5): 759-768.

Sutovsky, P., R. D. Moreno, et al. (1999). "Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria." *Nature* 402(6760): 371-372.

Taira, M.; Yoshida, E.; Kobayashi, M.; Yaginuma, K.; Koike, K. (1983). Tumor-associated mutations of rat mitochondrial transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 11, 1635-1643

Taylor, R. W. and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." *Nat Rev Genet* 6(5): 389-402.

Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). "Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes." *Science* 327(5963):301

Torroni, A., K. Huoponen, et al. (1996). "Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations." *Genetics* 144(4): 1835-1850.

van Oven, M. and M. Kayser (2009). "Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation." *Human Mutation* 30(2): E386-E394.

Vigilant, L., M. Stoneking, et al. (1991). "African populations and the evolution of human mitochondrial DNA." *Science* 253(5027): 1503-1507.

Wallace, D. (1986). "Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance." *Somatic Cell and Molecular Genetics* 12(1): 41-49.

Wallace, D. (1997). "Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases." *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*: 237-269.

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.

Wei, L., Y. Zhao, et al. (2011). "Association of mtDNA D-Loop Polymorphisms with Risk of Gastric Cancer in Chinese Population." *Pathology & Oncology Research* 17(3): 735-742.

Ye, C., Y.-T. Gao, et al. (2008). "Association of Mitochondrial DNA Displacement Loop (CA)_n Dinucleotide Repeat Polymorphism with Breast Cancer Risk and Survival among Chinese Women." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17(8): 2117-2122.

Yu, M., Y. Shi, et al. (2008). "Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region are highly frequent events in familial breast cancer." *Journal of biomedical science* 15(4): 535-543.

11. ANEXOS

Tabla A1. Se muestran los 69 pares de *primers* diseñados para HRM y su secuencia.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>
L119	(Sense primer) 5' TCGCAGTATCTGTCTTTGATTCT 3'
H390	(Anti-sense primer) 5' TCTGGTTAGGCTGGTGTAGGG 3'
L330	(Sense primer) 5' CACTTAAACACATCTCTGCCAAACC 3'
H587	(Anti-sense primer) 5' GCTACATAAACTGTGGGGGTG 3'
L535	(Sense primer) 5' CCCATACCCCGAACCAACC 3'
H769	(Anti-sense primer) 5' CTGCGTGCTTGATGCTGTTC 3'
L717	(Sense primer) 5' GAGTTCACCCTTAAATCACCACG 3'
H973	(Anti-sense primer) 5' GCTTTATTGGGGAGGGGT 3'
L922	(Sense primer) 5' CAATAGAAGCCGCGTAAAGA 3'
H1192	(Anti-sense primer) 5' GGGATATGAAGCACC GCCAG 3'
L1143	(Sense primer) 5' CTACGAGCCACAGCTTAAACACA 3'
H1429	(Anti-sense primer) 5' GCTAAATCCACCTTCGACCTT 3'
L1372	(Sense primer) 5' CTACCCAGAAAACCTACGATAGCC 3'
H1678	(Anti-sense primer) 5' GGTTTAGCTCAGAGCGGTCAAGT 3'
L1619	(Sense primer) 5' CAAAGCACCCAATTACACTTAGG 3'
H1927	(Anti-sense primer) 5' CTTAGGTAGCTCGTCTGGTTTCG 3'
L1879	(Sense primer) 5' GCAAGGAGAGCCAAAGCTAAGAC 3'
H2129	(Anti-sense primer) 5' CCTAGTGTCAAAGAGCTGTCC 3'
L2061	(Sense primer) 5' CAGAACCCTTAAATCCCCTGT 3'
H2342	(Anti-sense primer) 5' AGGCTTATGCGGAGGAGAATG 3'
L2263	(Sense primer) 5' CAATTGGACCAATCTATCACCCTA 3'
H2499	(Anti-sense primer) 5' AAACAGGCGGGTAAGATTTG 3'
L2431	(Sense primer) 5' CACAGGCATGCTCATAAGGAAAAG 3'
H2689	(Anti-sense primer) 5' GGGCAGGTCAATTTCACTGGT 3'
L2633	(Sense primer) 5' ATGGCTCCACGAGGGTTCAG 3'
H2962	(Anti-sense primer) 5' GGACTCTAGAATAGGATTGCGCTG 3'
L2911	(Sense primer) 5' CCAACGGAACAAGTTACCCTAGG 3'
H3179	(Anti-sense primer) 5' CATTACGGGGGAAGGCG 3'
L3123	(Sense primer) 5' GTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC 3'
H3453	(Anti-sense primer) 5' GAAGGGTTGTAGTAGCCCGTAGG 3'
L3391	(Sense primer) 5' GGCTATATACAACCTACGCAAAGGC 3'
H3664	(Anti-sense primer) 5' CTGATCAGAGGATTGAGTAAACGG 3'
L3608	(Sense primer) 5' GCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTC 3'
H3925	(Anti-sense primer) 5' GTTCGACTCCCCTTCGGCA 3'
L3880	(Sense primer) 5' GAGACCAACCGAACCCCTT 3'
H4171	(Anti-sense primer) 5' GGAGGTGTATGAGTTGGTCGTAGC 3'

L4126	(Sense primer) 5' CGAACAGCATACCCCGAT 3'
H4436	(Anti-sense primer) 5' GTATGGGCCCGATAGCTTATTTAG 3'
L4376	(Sense primer) 5' GTGCCACCTATCACACCCA 3'
H4676	(Anti-sense primer) 5' GATTATGGATGCGGTTGCTTG 3'
L4620	(Sense primer) 5' CGTTCACAGAAGCTGCCAT 3'
H4913	(Anti-sense primer) 5' TGAGGGAGAGATTTGGTATATGATTG 3'
L4847	(Sense primer) 5' CGGCCTGCTTCTTCTACAT 3'
H5154	(Anti-sense primer) 5' GTAGGGTCGTGGTGCTGGAG 3'
L5106	(Sense primer) 5' ACTACCGCATTCTACTACTCAACTT 3'
H5442	(Anti-sense primer) 5' ATGGGGTGGGTTTTGTATGTTC 3'
L5375	(Sense primer) 5' CACACTACTCCCATATCTAACACG 3'
H5681	(Anti-sense primer) 5' GTGGGTTAAGTCCCATTGGTCT 3'
L5616	(Sense primer) 5' ACTGAACGCAAATCAGCCACTT 3'
H5921	(Anti-sense primer) 5' TCAACGGTCGGCGAACATC 3'
L5871	(Sense primer) 5' GCTTCACTCAGCCATTTACCTC 3'
H6150	(Anti-sense primer) 5' CTAGTCAGTTGCCAAAGCCTCC 3'
L6062	(Sense primer)(Sense primer) 5' CTACAACGTTATCGTCACAGCCC 3'
H6358	(Anti-sense primer) 5' AGGTGTAAGGAGAAGATGGTTAGGTC 3'
L6276	(Sense primer) 5' GGTGGAACAGTCTACCCCTCC 3'
H6555	(Anti-sense primer) 5' TGGTGTGAGGTTGCGGTCT 3'
L6528	(Sense primer) 5' CTACTAACAGACCGCAACCTCAAC 3'
H6764	(Anti-sense primer) 5' CACGATAAACCTAGGAAGCCA 3'
L6738	(Sense primer) 5' TCAATTGGCTTCTAGGGTTTATC 3'
H6984	(Anti-sense primer) 5' AGTTTGCTAATACAATGCCAGTCAG 3'
L6930	(Sense primer) 5' GGATTCATCTTTCTTTTACCAGTAG 3'
H7248	(Anti-sense primer) 5' TGGTGTATGCATCGGGGTAGTC 3'
L7206	(Sense primer) 5' GGAATGCCCCGACGTTACTC 3'
H7475	(Anti-sense primer) 5' CTTTGGGGGTTTCGATTCC 3'
L7409	(Sense primer) 5' CCACACATTGAAGAACCCG 3'
H7720	(Anti-sense primer) 5' TGTTAGGAAAAGGCATACAGGAC 3'
L7663	(Sense primer) 5' CGCCCTATAATCATTTCCTT 3'
H7939	(Anti-sense primer) 5' GAAGATTAGTCCCGTAGTCG 3'
L7882	(Sense primer) 5' AATTGGCCACCAATGGTACTGA 3'
H8185	(Anti-sense primer) 5' ACAGATTTAGAGCATTGACCGT 3'
L8133	(Sense primer) 5' CTTTACCCTACACGACCG 3'
8411	(Anti-sense primer) 5' TGGGGTAATTATGGTGGGC 3'
L8359	(Sense primer) 5' CAGTGAAATGCCCAACTAAATAC 3'
H8619	(Anti-sense primer) 5' GATCAATAGAGGGGAAATAGAATG 3'
L8563	(Sense primer) 5' ACAATCTAGGCCTACCCG 3'
H8868	(Anti-sense primer) 5' AATCACTGTGCCGCTCATAA 3'
L8822	(Sense primer) 5' CTATAAACCTAGCCATGGCCATC 3'
H9106	(Anti-sense primer) 5' TGAAGATGATAAGTGTAGAGGGAAGG 3'
L9053	(Sense primer) 5' GCGCCACCCTAGCAATATCA 3'

H9335	(Anti-sense primer) 5' GAGGAGCGTTATGGAGTGAAG 3'
L9275	(Sense primer) 5' AGCCCTCCTAATGACCTCG 3'
H9583	(Anti-sense primer) 5' GGATTTAGCGGGTGATGC 3'
L9522	(Sense primer) 5' CTAGCCCTACCCCAATT 3'
H9827	(Anti-sense primer) 5' GTGAAGCCGTGGAAGCTG 3'
L9774	(Sense primer) 5' GACGGCATCTACGGCTCAAC 3'
H9985	(Anti-sense primer) 5' CCTCATCAATAGATGGAGACATACAGA 3'
L9918	(Sense primer) 5' GCCGCTGATACTGGCATT 3'
H10219	(Anti-sense primer) 5' TTTATGGAGAAAGGGACGCG 3'
L10170	(Sense primer) 5' GAGTGGGCTTCGACCCTAT 3'
H10407	(Anti-sense primer) 5' CCAATTCGGTTCAGTCTAATCCTT 3'
L10379	(Sense primer) 5' AAAAAAGGATTAGACTGAACCGAA 3'
H10673	(Anti-sense primer) 5' GGCGCAAAGACTAGTATGGC 3'
L10621	(Sense primer) 5' CCCACTCCCTCTTAGCCAATATT 3'
H10947	(Anti-sense primer) 5' GTTGTAGGGGGTCGGAGGA 3'
L10919	(Sense primer) 5' CCAACCTTTCTCCGACCC 3'
H11180	(Anti-sense primer) 5' CTGGCTGGTTCCTCATCG 3'
L11130	(Sense primer) 5' CCACACTATCCACCTTGC 3'
H11428	(Anti-sense primer) 5' GGCTTCGACATGGGCTTAGG 3'
L11381	(Sense primer) 5' CCTCTTACGGACTCCACTTATGAC 3'
H11679	(Anti-sense primer) 5' CAGGGGTTTGGATGAGAATG 3'
L11631	(Sense primer) 5' TCAGCCACATGCCCTCGTAG 3'
H11938	(Anti-sense primer) 5' GAGAGTGATATTTGATCAGGAGAACG 3'
L11881	(Sense primer) 5' CCTACTGGGAGAACTCTCTGTGCT 3'
H12135	(Anti-sense primer) 5' GAGGAAAACCCGGTAATGATGTC 3'
L12315	(Sense primer) 5' GGTGCAACTCAAATAAAAGTAATAAC 3'
H12622	(Anti-sense primer) 5' CGAACAATGCTACAGGGATGAA 3'
L12537	(Sense primer) 5' CTGAGCCACAACCAACAAC 3'
H12854	(Anti-sense primer) 5' AGGATTGCTGAATGGCTGC 3'
L12806	(Sense primer) 5' GATGATACGCCGAGCAGAT
H13129	(Anti-sense primer) 5' GGTGGAAGCGGATGAGTAAGAAG 3'
L13288	(Sense primer) 5' GGCATCAACCAACACCT 3'
H13574	(Anti-sense primer) 5' AGAGTAATAGATAGGGCTCAGGCG 3'
L13516	(Sense primer) 5' CACATCATCGAAACCGCAAAC 3'
H13822	(Anti-sense primer) 5' GGAAAGTGACAGCGAGGGC 3'
L13770	(Sense primer) 5' CCAAACAACAATCCCCTCTAC 3'
H14072	(Anti-sense primer) 5' GTTGAGGTGATGATGGAGGTGG 3'
L14022	(Sense primer) 5' ACCTAAAACAATTTACAGCACCA 3'
H14286	(Anti-sense primer) 5' GAGGGTCAGGGTTGATTG 3'
L14222	(Sense primer) 5' CAACGCCATAATCATACAAAGC 3'
H14465	(Anti-sense primer) 5' CTACAGCGATGGCTATTGAGGAG 3'
L14404	(Sense primer) 5' CACCAAGACCTCAACCCCTG 3'
H14698	(Anti-sense primer) 5' CGTGGTTGTAGTCCGTGCG 3'

L14680	(Sense primer) 5' CGCACGGACTACAACCACG 3'
H14998	(Anti-sense primer) 5' GGC GTGAAGGTAGCGGATG 3'
L14940	(Sense primer) 5' CAATCGCCACATCACTCG 3'
H15212	(Anti-sense primer) 5' TGTATGGGATGGCGGATAGTAAG 3'
L15155	(Sense primer) 5' CAAATATCATTCTGAGGGGCCA 3'
H15455	(Anti-sense primer) 5' GAAGGAAGAGAAGTAAGCCGAGG 3'
L15386	(Sense primer) 5' CATTCCGATAAAATCACCTCCAC 3'
H15702	(Anti-sense primer) 5' GGGCGAAATATTATGCTTTGTTG 3'
L15612	(Sense primer) 5' GAGGCGTCCTTGCCTATTAC 3'
H15969	(Anti-sense primer) 5' GACTTTTTCTCTGATTTGCCTTGG 3'
L15913	(Sense primer) 5' CAGTCTTGTAACCGGAGATGAAA 3'
H16234	(Anti-sense primer) 5' GTGATAGTTGAGGGTTGATTGCTG 3'
L16185	(Sense primer) 5' CCCCTCCCATGCTTACAAG 3'
H75	(Anti-sense primer) 5' CATACCCCCAGACGAAAATAC 3'
L16519	(Sense primer) 5' TCATAAAGCCTAAATAGCCACAC 3'
H152	(Anti-sense primer) 5' AGGATGAGGCAGGAATCAAAGA 3'