



Departamento de Microbiología y Parasitología

**VALORACION Y MEJORA DE LA EXTRACCION DEL GENOMA DEL
VIH USANDO NANOPARTICULAS MAGNETICAS**

**Maria Carmen Grussu
Santiago de Compostela, 2012**



**VALORACION Y MEJORA DE LA EXTRACCION DEL GENOMA DEL
VIH USANDO NANOPARTICULAS MAGNETICAS**

TESIS DOCTORAL

Maria Carmen Grussu

2012

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Microbiología y Parasitología

**BENITO JOSÉ REGUEIRO GARCÍA, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

CERTIFICA: Que la presente Tesis titulada: “Valoración y mejora de la extracción del genoma del VIH usando nanopartículas magnéticas” ha sido realizada, bajo mi dirección, por Dña Maria Carmen Grussu en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela y, estimado que se encuentra finalizada, solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Santiago de Compostela, 2012

Fdo: Prof. Dr. Benito Regueiro García

Este trabajo fue financiado por el *Ministerio de Ciencia e Innovación* (MAT2008-06503) de España y por el programa Master and Back de la “Regione Autonoma della Sardegna”.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Benito Regueiro Garcia que me dio la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, y me siguió en cada paso del mismo con mucho cariño;

A los Doctores Antonio Aguilera y Eduardo Varela que me acogieron en el laboratorio desde el primer día;

A mis compañeros de laboratorio, en particular a Javier que, me enseñó las técnicas del trabajo y me ayudó en su realización, a Sandra, Luz, Lucía, Carlos, Gema y Miguel, que fueron siempre muy amables conmigo, y a todos los compañeros del Clínico;

A Ramonita, Elvira, Lorena, Pilar y Sonia que siempre me apoyaron;

Al Prof. Eugenio y a la Prof. Lourdes por la amistad y el cariño demostrado desde cuando llegué a Santiago.

Al Prof. Gianni Podda, que me dio la oportunidad de realizar mi primera estancia y la Tesina en Santiago, y a la Dott.sa Giovanna Delogu que prestó mucha atención a mi trabajo;

A mi madre y mi hermana que siempre estuvieron a mi lado, aún sin estar aquí, en Santiago;

A mi padre, que seguramente estaría muy feliz;

A mi abuela;

A Santi que me ayudó siempre en todo;

A Fina, Santiago María José y Jose, que me acogieron como una hija;

A todos mis amigos, en particular: Zini, Luisa, Fra, Simo, Ale, Edu, Bea, María João, Jose, Calili, Ana, Tati, Rosa, Riky, Oana, Nef, David, Jacobo, Yago, Maria...Muchísimas gracias....

ABREVIATURAS

- ADN (o DNA):** Ácido desoxirribonucleico.
- APDMES:** Aminopropildimetoxisilano.
- APS:** Aminopropilsilano.
- APTES:** (3-aminopropil) trietoxisilano.
- ARN (o RNA):** Ácido ribonucleico.
- ARNm (o RNAm):** ARN mensajero.
- ATP:** Adenosín trifosfato.
- BSA:** Albúmina de suero bovino.
- °C:** grado centígrado.
- CD4:** Linfocito T auxiliar.
- CI₅₀:** Concentración inhibitoria del 50%.
- CTAB:** bromuro de cetiltrimetilamonio.
- CTL:** Linfocitos T citotóxicos.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.
- ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
- ER (o RE):** Retículo endoplasmático.
- g:** Velocidad de centrifugación.
- g:** gramo.
- g/ml:** gramo por mililitro.
- gp:** Glicoproteína.
- HCl:** Ácido Clorhídrico.
- Kb:** Kilo bases (1000 pb).
- KCl:** Cloruro de Potasio.
- kD:** Kilodalton.
- KDS:** Dodecilsulfato de Potasio.
- KV:** Kilovoltio.
- LB:** Luria Bertani.
- LTRs:** Repeticiones terminales largas.
- mg/ml:** Miligramo por mililitro.
- ml:** Mililitro.
- M:** Molar.
- mA:** miliamperio.

mM: Milimolar.

MNPs: Nanopartículas magnéticas.

3-MPTS: (3 -mercaptopropil) trimetoxisilano.

NaOH: Hidróxido de Sodio.

NF- κ B: Factor nuclear kappa beta.

nm: Nanómetro.

PAA: Ácido poliacrílico.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

PEG: Polietilen-glicol.

PLGA: Ácido poli (láctico-co-glicólico).

PVP: Polivinilpirrolidona.

Rpm: Revoluciones por minuto.

s: segundo.

SI: Sistema Internacional de Unidades.

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida.

SDS: Dodecil sulfato de Sodio.

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple.

SPM: Superparamagnético.

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TE: Tris-EDTA Buffer.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

TEOS: Tetraetilortosilicato.

TMAOH: Hidróxido de tetrametilamonio.

V: Voltio.

Vif: Factor de infectividad viral.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Vpr: Proteína viral R.

Vpu: Proteína viral U.

%wt/wt: %p/p (Concentración porcentual en peso).

μ g: microgramo.

μ g/ml: microgramo por mililitro.

μ l: microlitro.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	- 1 -
1.1.Resumen general.....	- 3 -
1.2.Antecedentes y estado actual del tema.....	- 4 -
1.3.Los Plásmidos	- 5 -
1.3.1.Clonaje de DNA.....	- 5 -
1.3.2.Transformación de <i>Escherichia coli</i> con un plásmido recombinante... ..	- 6 -
1.3.3.Mutagénesis dirigida	- 8 -
1.3.4.Purificación y análisis de los vectores recombinantes	- 9 -
1.4.El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	- 10 -
1.4.1.Antecedentes históricos del VIH	- 10 -
1.4.2.Epidemiología	- 10 -
1.4.3.Taxonomía y clasificación.....	- 11 -
1.4.4.Morfología del virión maduro del VIH-1	- 12 -
1.4.5.El genoma viral	- 14 -
1.4.5.1.Genes estructurales	- 17 -
1.4.5.1.1.El gen Gag	- 17 -
1.4.5.1.2.El gen pol.....	- 18 -
1.4.5.1.3.El gen env.....	- 20 -
1.4.5.2.Genes reguladores	- 22 -
1.4.5.2.1.Tat (Transactivador transcripcional)	- 22 -
1.4.5.2.2.Rev (Regulador de la expresión viral).....	- 23 -
1.4.5.3.Genes accesorios	- 23 -
1.4.5.3.1.Nef (factor negativo, negative factor).....	- 23 -
1.4.5.3.2.Vif (Factor de infectividad viral, viral infectivity factor).....	- 23 -
1.4.5.3.3.Vpr.....	- 23 -
1.4.5.3.4.Vpu.....	- 24 -
1.5.Detección de resistencias	- 24 -
1.5.1.Técnicas genotípicas.....	- 25 -
1.5.1.1.Interpretación del genotipo.....	- 25 -
1.5.2.Técnicas fenotípicas.....	- 25 -
1.6.Extracción de ácidos nucleicos	- 26 -
1.6.1.Métodos cromatográficos	- 27 -
1.6.1.1.Extracción de ácidos nucleicos con una fase estacionaria solida... ..	- 27 -
1.6.1.1.1.Cromatografía de intercambio iónico	- 28 -
1.6.1.1.2.Cromatografía de adsorción (membranas de sílica gel)	- 30 -
1.6.2.Bolas magnéticas	- 32 -
1.7.Nanopartículas magnéticas	- 32 -
1.8.Magnetismo	- 33 -
1.8.1.Propiedades magnéticas de las nanopartículas de oxido de hierro	- 33 -
1.9.Nanopartículas magnéticas de oxido de hierro recubiertas con sílica... ..	- 37 -
1.10.Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica.....	- 38 -
1.11.La microemulsión inversa	- 39 -
1.12.Los polímeros sintéticos.....	- 41 -
1.12.1.El PAA	- 41 -
1.13.Funcionalización de nanopartículas	- 42 -
1.13.1.Los organosilanos y la silanización de superficies.....	- 42 -
2. OBJETIVOS.....	- 47 -

3. MATERIALES	- 51 -
3.1. Aspectos generales.....	- 53 -
3.2. El pNL4.3	- 54 -
3.3. Mutaciones del pNL4.3.....	- 55 -
3.3.1. Mutación p4254	- 55 -
3.3.2. Mutación p4411	- 56 -
3.3.3. Mutación p4696	- 56 -
3.3.4. Mutación p4634	- 57 -
3.4. Enzimas de restricción	- 57 -
3.5. Soluciones	- 59 -
3.5.1. Medios de cultivo	- 60 -
3.6. Partículas Magnéticas.....	- 61 -
3.6.1. Partículas FeO-2202-W	- 61 -
3.6.2. Partículas TEOS-07B	- 62 -
3.6.3. Partículas TEOS-07.....	- 63 -
3.6.4. Partículas FeO-2204-W	- 63 -
3.6.5. Partículas FeO-2207-APS	- 64 -
3.6.6. Partículas FeO-2206-W 5 mg/ml	- 65 -
3.6.7. Partículas FeO-2206-APS	- 66 -
3.6.8. Partículas FeO-2206 10 mg/ml	- 66 -
3.6.9. Aspectos generales de las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens)	- 67 -
4. MÉTODOS	- 69 -
4.1. Mutagénesis <i>in vitro</i> del gen pol	- 71 -
4.2. Generación de secuencias de restricción que no afecten la secuencia de aminoácidos de POL	- 73 -
4.2.1. Secuencia <i>Cla</i> I	- 74 -
4.2.1.1. Mutación p4254	- 74 -
4.2.1.2. Mutación p4696	- 74 -
4.2.2. Secuencia <i>Xma</i> I	- 75 -
4.2.2.1. Mutación p4411	- 75 -
4.3. Preparación de Soluciones.....	- 76 -
4.3.1. Ampicilina (100 mg/ml).....	- 76 -
4.3.2. Etanol al 70%.....	- 76 -
4.3.3. TAE 50x.....	- 76 -
4.3.4. TAE 1x.....	- 76 -
4.3.5. T.E.....	- 77 -
4.4. Logro del objetivo 1	- 77 -
4.4.1. Construcción del estándar de plásmidos	- 77 -
4.4.2. Obtención de los plásmidos	- 77 -
4.4.2.1. Fase a medio solido para miniprep	- 77 -
4.4.2.2. Sembrar las Placas de Petri	- 78 -
4.4.2.3. Fase a medio liquido para miniprep y plasmiprep.....	- 78 -
4.4.2.4. Miniprep	- 78 -
4.4.2.5. Cortes con enzimas de restricción.....	- 79 -
4.4.2.6. Gel de agarosa	- 80 -
4.4.2.7. Plasmiprep	- 82 -
4.4.3. Valoración basal de la extracción.....	- 82 -

4.5.Capacidad de recuperación de especies minoritarias.....	- 83 -
4.5.1.Análisis de integridad.....	- 83 -
4.5.1.1.Secuencias de los primers usados en la pirosecuenciación.....	- 84 -
4.5.1.2.Resultados de la pirosecuenciación.....	- 84 -
4.6.Logro del objetivo 2.....	- 86 -
4.6.1.Síntesis de las nanopartículas (MNPs).....	- 86 -
4.6.2.Revestimientos de las nanopartículas: (C@S NPs).....	- 87 -
5. RESULTADOS.....	- 89 -
5.1.Aspectos generales.....	- 91 -
5.2.Evaluación de la extracción en el Ampliprep™ (Roche).....	- 91 -
5.3.Comparación de la extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp™ (QIAGEN).....	- 96 -
5.3.1.Comparación de extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp™ (QIAGEN) tras corte con la enzima Apa I.....	- 96 -
5.3.2.Comparación de la extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp® (QIAGEN) sin corte con la enzima Apa I.....	- 99 -
5.4.Pruebas de Reproducibilidad.....	- 104 -
5.4.1.QIAGEN.....	- 104 -
5.4.2.Hamilton.....	- 106 -
5.4.3.Ampliprep.....	- 108 -
5.5.Pruebas con las nanopartículas magnéticas de Nanogap.....	- 110 -
5.5.1.Prueba con las partículas FeO-2202-W.....	- 110 -
5.5.2.Nueva prueba con las partículas FeO-2202-W.....	- 112 -
5.5.3.Prueba con las partículas TEOS-07B.....	- 114 -
5.5.4.Nueva prueba con las partículas TEOS 07 B.....	- 115 -
5.5.5.Prueba con las partículas TEOS-07B y BSA.....	- 116 -
5.5.6.Prueba con las partículas TEOS-07B y el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (1:4).....	- 118 -
5.5.7.Prueba con las partículas TEOS 07.....	- 119 -
5.5.8.Prueba con las partículas TEOS-07 y BSA.....	- 121 -
5.5.9.Prueba con partículas TEOS-07 y el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (1: 3).....	- 122 -
5.5.10.Prueba con las partículas TEOS 07 y TEOS 07 B (1:1) en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens).....	- 124 -
5.5.11.Prueba con las partículas TEOS 07 y TEOS 07 B originales mezcladas 1:1.....	- 126 -
5.5.12.Prueba con las partículas TEOS-07 y las partículas paramagnéticas comerciales,Siemens (1:1).....	- 127 -
5.5.13.Prueba con las partículas TEOS 07 y las partículas del MagNa Pure (1:1).....	- 129 -
5.5.14.Prueba con las partículas TEOS 07 y las partículas del MagNa Pure (1:1) en el MagNa Pure.....	- 130 -
5.5.15.Nueva extracción con las partículas TEOS-07 B.....	- 133 -
5.5.16.Extracción con las partículas TEOS-07 a pH=10.....	- 134 -
5.5.17.Prueba con las partículas FeO-2204-W.....	- 137 -
5.5.18.Segunda prueba con las partículas FeO-2204-W.....	- 138 -
5.5.19.Prueba con las partículas FeO-2207-APS.....	- 140 -
5.5.20.Prueba con las partículas FeO2206 5mg/ml.....	- 141 -
5.5.21.Segunda prueba con las partículas FeO2206 5mg/ml.....	- 143 -

5.5.22. Prueba con las partículas FeO-2206 5mg/ml y las partículas paramagnéticas comerciales, Siemens (1:1)	- 146 -
5.5.23. Segunda prueba con las partículas FeO-2206 5mg/ml y las partículas paramagnéticas comerciales, Siemens (1:1)	- 148 -
5.5.24. Prueba con las partículas FeO-2206-APS	- 150 -
5.5.25. Prueba con las partículas FeO-2206 10 mg/ml	- 153 -
5.5.26. Segunda prueba con las partículas FeO-2206 10 mg/ml	- 154 -
6. DISCUSIÓN	- 157 -
6.1. Nanopartículas magnéticas	- 160 -
6.2. La microemulsión inversa	- 161 -
6.3. Síntesis de partículas por la separación de ácidos nucleicos	- 162 -
6.3.1. Partículas de óxido de hierro	- 162 -
6.3.2. Tipos de revestimientos	- 163 -
6.3.2.1. Revestimientos inorgánicos	- 164 -
6.3.2.1.1. Revestimientos de sílica	- 164 -
6.3.2.2. Revestimientos orgánicos	- 165 -
6.3.2.2.1. Polímeros sintéticos: el PAA	- 165 -
6.3.3. Funcionalización de nanopartículas	- 166 -
6.3.3.1. Silanos Organofuncionales	- 167 -
6.4. Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados	- 169 -
6.5. Perspectivas futuras	- 169 -
6.6. Posibilidad de que la investigación propuesta conduzca a patentes y otros resultados explotables comercialmente	- 169 -
7. CONCLUSIONES	- 171 -
8. ANEXOS	
8.1. ANEXO I	I
Fluorometría Qubit	I
8.2. ANEXO II	IV
Cobas Ampliprep® (CAP, Roche)	IV
MagNa Pure Compact (Roche)	VI
Hamilton (Versant® kPCR, Siemens)	VII
8.3. ANEXO III	IX
Pirosecuenciación	IX
8.4. ANEXO IV	XI
Protocolo Miniprep	XI
8.5. ANEXO V	XIV
Protocolo Plasmiprep	XIV
8.6. ANEXO VI	XVI
Protocolo de la extracción manual de ácidos nucleicos (QIAGEN®)	XVI
9. BIBLIOGRAFIA	I

1. INTRODUCCION

1.1. Resumen general

El proceso de extracción de los ácidos nucleicos es un paso preliminar en todo el proceso diagnóstico molecular, en el trabajo clínico con el VIH; dicho proceso condiciona el flujo de trabajo y la respuesta de los distintos sistemas y plataformas que se usan con el virus.

Nuestro trabajo consistirá en establecer los parámetros de funcionamiento de los sistemas automáticos de extracción más frecuentemente utilizados. Para ello utilizaremos un estándar, constituido por varias construcciones alternativas, generadas por mutaciones dirigidas sobre el plásmido pNL4.3, que tienen como base la estructura genómica del VIH-1. De esta forma podremos estudiar el proceso de extracción, y valorar las concentraciones, la pureza y la integridad de los ácidos nucleicos extraídos con los distintos sistemas y químicas empleados.

La mayor parte de los sistemas automáticos en uso utilizan nanopartículas magnéticas y absorción inespecífica.

Nuestra intención es desarrollar nanopartículas alternativas y estudiar sus propiedades de magnetismo. Para ello las recubriremos con materiales inorgánicos u orgánicos que puedan mejorar sus rendimientos y mantener la integridad de las hebras obtenidas; también las funcionalizaremos para mejorar sus condiciones de estabilidad, absorción y protección frente a las nucleasas. De esta forma podremos conseguir lotes de partículas estándar, que eviten variabilidad en nuestro trabajo con el VIH.

1.2. Antecedentes y estado actual del tema

Los métodos de diagnóstico del SIDA se basan en la amplificación de regiones relevantes del genoma del VIH; la sensibilidad de estos métodos depende del paso preliminar de extracción del ácido nucleico del virus, de tal forma que es importante evaluar los distintos sistemas disponibles para este fin, y generar posibles mejoras de su rendimiento y diseño.

Nuestra mayor experiencia hasta 1993, se centraba en la producción de monoclonales y en el uso de técnicas de citometría de flujo. Tenemos experiencia en el trabajo con proteínas, acoplamiento de marcadores, etc.

La Estancia del Investigador principal en el laboratorio del Prof. B. Roizman (Universidad de Chicago), durante un año sabático (1993), aprendiendo técnicas de construcción de virus recombinantes, y los proyectos concedidos desde 1993, nos han permitido familiarizarnos con la manipulación genética y conseguir las dotaciones para el trabajo en dos modelos virales: herpes simplex y VIH. En los últimos años hemos trabajado en condiciones de bioseguridad BP-3, en infección con VIH recombinantes, desarrollando nuevas herramientas y vectores para el análisis de resistencias fenotípica y "fitness de VIH".

En anteriores proyectos: FIPSE 3074/99, en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III (Dr. Alcami Pertejo), y FIPSE 36272/02, nuestro laboratorio ha desarrollado diversos reactivos de utilidad para el análisis de la infección por VIH.

Hemos colaborado con varios grupos de trabajo tanto en la Red RIS o La Marató, como con industrias VIRCO. En el año 2007 iniciamos una colaboración estable con el grupo "Nanomag" (www.nanomag.org) de la Universidad de Santiago, con el que previamente habíamos colaborado en el proyecto: Obtención, caracterización y estudio de micropartículas Nd-Fe-B y su aplicación en la separación de moléculas y poblaciones celulares.

En el 2008 empezamos nuestra colaboración con Nanogap (www.nanogap.es), que hemos utilizado como recurso para la obtención de las nanopartículas magnéticas utilizadas en este trabajo de investigación.

1.3. Los Plásmidos

El genoma bacteriano se organiza en un único cromosoma circular con un sólo origen de replicación. Aunque el cromosoma bacteriano contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y reproducción de la célula, virtualmente todos los tipos de bacteria contienen moléculas de DNA adicionales conocidas como plásmidos. Al igual que el cromosoma bacteriano son circulares y autorreplicantes¹.

Son elementos extracromosómicos bacterianos circulares de ADN, con un número variable de pares de bases (de 1.500 a 400.000)².

1.3.1. Clonaje de DNA

Una de las contribuciones más importantes de la ingeniería genética de bacterias, es su uso para desarrollar vectores o vehículos que permitan el clonado de cualquier secuencia de ADN. Los vectores más usados con este fin son los plásmidos bacterianos. Clonar implica introducir un fragmento de ADN en un vector³, y la posterior introducción de la molécula recombinante en la célula huésped (generalmente la bacteria *Escherichia Coli*), donde podrá avanzar un número elevado de copias conocidas como “clones”⁴.

Mediante el cultivo de la bacteria hospedadora se obtiene gran

¹ Curtis H y cols., 2006.

² Murray PR y cols., 2009.

³ Betancor L y cols., 2008.

⁴ Cultek S.L.U., 2006.

cantidad de replicón recombinante⁵.

Para ser utilizado como vector de clonación, un *plásmido ideal* debe poseer al menos tres características:

- 1) Debe tener su propio origen de replicación, y por lo tanto la capacidad de replicación autónoma independiente del genoma del hospedador;
- 2) Debe tener sitios de clonación múltiple que permitan abrir el DNA con enzimas de restricción, y hacer posible la clonación de insertos de DNA en la forma y orientación determinada;
- 3) Debe poseer marcadores genéticos seleccionables, que permitan aislar las células hospedadoras que contengan el vector.

La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones. Por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de *plásmidos artificiales*, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles, procedentes de los plásmidos naturales.

La presencia, en el plásmido, del gen de resistencia a la ampicilina permite seleccionar las bacterias que llevan estos plásmidos, gracias a su capacidad de crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una beta lactamasa, enzima que degrada la ampicilina).

En nuestro trabajo hemos aprovechado esta característica porque los plásmidos con que hemos trabajado llevaban el gen de resistencia a dicho antibiótico.

1.3.2. Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante

Es la introducción, en la bacteria hospedadora, del DNA recombinante obtenido mediante ligación⁵ (proceso de unión covalente del inserto y el vector, por medio de la formación de nuevos enlaces entre los grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo libres).

⁵ Soriano V y cols., 2006.

Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras.

La capacidad de captar el ADN exógeno, conservarlo en forma estable e interactuar con él, se denomina competencia. Este fenómeno depende de la presencia de un sistema de captación de ADN específico asociado a la membrana³.

Aunque la mayoría de las bacterias no presentan capacidad natural para captar ADN, es posible inducir en el laboratorio la competencia, generando por distintos medios distorsiones en la membrana celular; por ejemplo con pulsos eléctricos (electroporación a 3-24 kV /cm⁴) o con cambios osmóticos y térmicos. Estos procedimientos son muy usados para introducir experimentalmente ADN extraño, por ejemplo un plásmido, en una bacteria y así transformarla.

La transformación en el laboratorio es una técnica rutinaria de enorme utilidad, que nos permite introducir prácticamente cualquier plásmido en su forma circular o superenrollada en casi cualquier tipo de bacteria.

Uno de los huéspedes más utilizados es la cepa de laboratorio K12 de E.coli. Esta y otras cepas de E.coli se utilizan como huésped ya que están bien caracterizadas genéticamente y pueden aceptar un amplio espectro de vectores, incluyendo los plásmidos⁴.

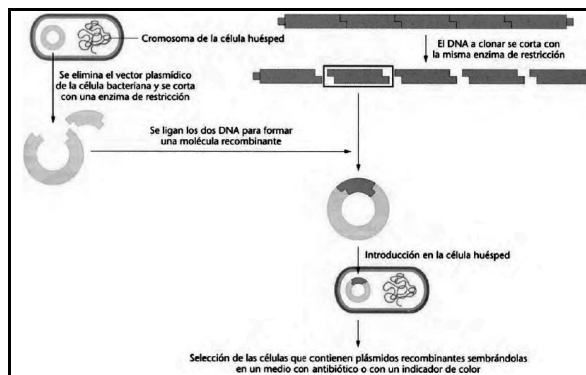


Figura 1: Clonación de un vector plasmídico (Cultek S.L.U., 2006).

Introducción

En particular, la cepa de *Escherichia coli* DH5 α está modificada genéticamente, de manera que es posible inducir en laboratorio la competencia de las células⁶, así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

1.3.3. Mutagénesis dirigida

Los avances en las técnicas de síntesis de DNA han acelerado los progresos experimentados en el estudio de las funciones de las proteínas y de la expresión génica⁴. Una de las formas más efectiva de estudiar la relación entre la estructura y la función proteicas consiste en alterar una porción determinada de la proteína y observar los cambios funcionales que se producen. Hasta hace unos años, esto se realizaba mediante la modificación química de aminoácidos individuales o mediante inducción de mutaciones en el gen que codifica la proteína objeto de estudio. Sin embargo, la modificación química de una proteína no siempre es específica, ya que pueden verse alterados varios aminoácidos y no sólo el que se desea alterar; por otro lado, hasta hace unos años no siempre era posible producir la mutación adecuada en la localización del gen que se deseaba.

Estas dificultades han sido superadas en los últimos años gracias a la técnica de la mutagénesis dirigida; en ella se sintetiza un oligonucleótido de unas 20 bases que contiene el cambio de secuencia deseado. Posteriormente se permite que dicho oligonucleótido alterado con la mutación objeto de estudio hibride con una copia monocatenaria del gen salvaje original completo; posteriormente se amplifica el complejo mediante PCR, con lo que la polimerasa extiende el oligonucleótido y copia el resto del gen diana para producir una nueva copia del gen con la mutación deseada.

⁶ Wickramarachchi DC, 2007.

1.3.4. Purificación y análisis de los vectores recombinantes

La preparación del DNA plasmídico (denominada también “minipreparación” o *miniprep*) consiste en la purificación de los plásmidos (en nuestro caso, los recombinantes) presentes en el lisado bacteriano. Para ello, un número representativo de colonias blancas se inoculan en otros tantos tubos de minicultivo líquido (1-2 ml), donde se produce un crecimiento de cada clon seleccionado.

Cuando los cultivos han alcanzado la densidad óptica deseada se realiza la lisis bacteriana.

En la actualidad se utilizan *kits*, en los que se aprovecha la capacidad de las matrices de sílica de unirse específicamente al DNA, de forma que la eliminación de proteínas se lleva a cabo mediante lavado, tras un corto periodo de adsorción. Por último, generalmente los plásmidos recombinantes se concentran por precipitación con etanol o isopropanol en presencia de sales estabilizantes.

El análisis de los fragmentos de DNA clonados en el vector puede realizarse mediante secuenciación⁵.

1.4. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

1.4.1. Antecedentes históricos del VIH

En París (en el Instituto Pasteur)⁷, en 1983 Luc Montagnier y sus colaboradores aislaron el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), a partir de cultivos de linfocitos T activados, provenientes de una biopsia de un nódulo linfático de un paciente con poliadenopatías. Ellos lo denominaron virus asociado a la linfadenopatía (LAV). El año siguiente R. Gallo y su equipo aislaron otro virus, el virus linfotrópico humano de células T tipo III (HTLV-3), para distinguirlo de los dos anteriormente aislados por su laboratorio (HTLV 1 y HTLV 2).

Posteriormente se secuenciaron los dos virus y se demostró que se trataba del mismo. En 1986, por recomendación del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV), la actual denominación de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), se admitió internacionalmente por ser el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)^{8,9}.

1.4.2. Epidemiología

Actualmente se estima que hay unos 35 millones de personas vivas infectadas por el VIH, un 75% de ellas en África subsahariana⁷. Según UNAIDS en el 2008, la prevalencia de VIH en adultos, superaba un 20% en los estados Subsaharianos de Botsuana, Lesoto y Suazilandia, pero se quedaba debajo del 5% en la mayoría de los Estados del África occidental¹⁰. (Ver Figura 2¹¹).

⁷ Soriano V y cols., 2009.

⁸ Usdin S, 2004.

⁹ Levy JA, 2008.

¹⁰ Bingenheimer JB y cols., 2009.

¹¹ Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2009.

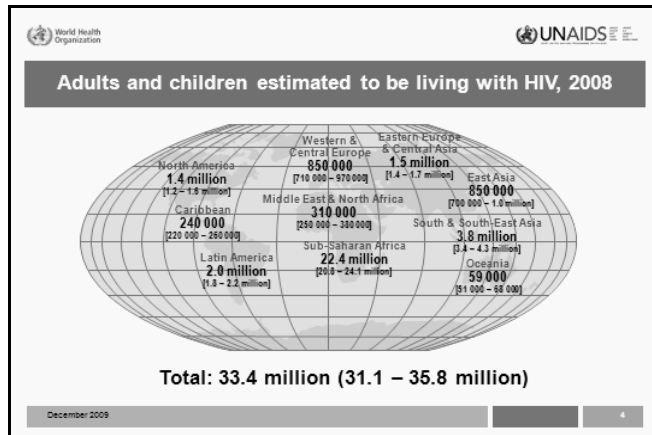


Figura 2: Estimación de adultos y niños afectados por VIH en el 2008 (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2009).

1.4.3. Taxonomía y clasificación

El VIH es un virus que pertenece a la familia *Retroviridae*¹². Dentro de esta se ubica en la subfamilia *Lentivirinae*^{12, 13} (el nombre alude al largo período de incubación que transcurre entre la infección y la enfermedad clínica, que puede incluso superar los 10 años).

El término retro significa hacia atrás, y el nombre hace referencia a que estos virus tienen un modo inverso de replicar el ácido nucleico^{14, 15}.

El análisis filogenético del VIH-1 ha revelado la existencia de tres grandes grupos: M, N, O. Los virus pertenecientes al grupo M son los responsables de la mayoría de casos¹⁶. Este grupo se ha dividido en tipos que se denominan por letras y estos, a su vez en subtipos que se clasifican por números⁷. Los Subtipos A1, A2, A3,

¹² Levy JA, 1993.

¹³ Dudek RW, 2006.

¹⁴ Coffin JM y cols., 1997.

¹⁵ Campbell MK y cols., 2012.

¹⁶ Kramer A y cols., 2010.

Introducción

A4, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K son los que actualmente están reconocidos.

Los subtipos del VIH-1 están unidos geográfica y epidemiológicamente. (Ver Figura 3¹⁷).

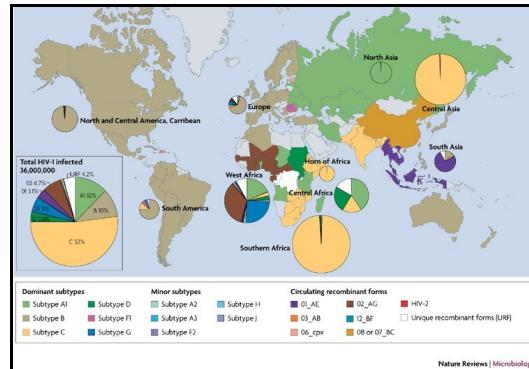


Figura 3: Distribución mundial de los subtipos del VIH. (Ariën KK y cols., 2007).

1.4.4. Morfología del virión maduro del VIH-1

Los viriones maduros de VIH tienen una forma esférica de diámetro de 100-120 nm, con espículas de 8 nm. Consisten de una membrana de doble capa de natura lipídica, dentro de la cual se encuentra la cápside (core), a forma de cono truncado, que contiene el RNA genómico, la proteasa viral (PR), la transcriptasa inversa (TR), la integrasa (IN), Vpu, Vif, Vpr y Vef, y algunos factores celulares¹⁸. (Ver Figura 4¹⁹).

¹⁷ Ariën KK y cols., 2007.

¹⁸ Sierra S y cols., 2005.

¹⁹ Freed EO, 2001.

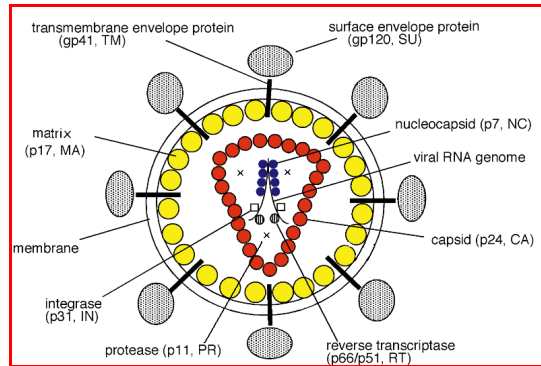


Figura 4: Representación esquemática del virión maduro del VIH-1. (Freed EO, 2001, modificada).

Desde el exterior hacia el interior observamos la envoltura lipídica, la matriz y la cápside.

En la envoltura lipídica están integrados 72 complejos glicoproteicos (o espículas). Cada uno está compuesto por trímeros de una glicoproteína transmembranal de menor peso molecular (TM, gp41), implicada en los procesos de fusión de membranas durante la penetración viral. Esta interactúa, no-covalentemente, con una glicoproteína de superficie de mayor peso molecular (SU, gp120), responsable de la interacción del virión con su receptor celular (el CD4)^{19, 20, 21} y un correceptor^{19, 20}. (Véase también pág.-20 -). La unión entre gp120 y gp41 es débil y puede deshacerse de manera espontánea en el ambiente local.

Inmediatamente por debajo de la envoltura se encuentra una estructura amorfa, de naturaleza proteica, denominada matriz, que comprende aproximadamente 2000 copias de una proteína no glicosilada de 17 kD (MA, p17).

Por debajo de esta capa, en la zona central del virus, se encuentra la cápside, formada por aproximadamente 2000 copias de una proteína de 24 kD (CA, p24).

En su interior están 2 moléculas idénticas de ARN de 9,2 Kb, en íntima asociación con una proteína de bajo peso molecular, denominada nucleocápside (NC, p7), que lo estabiliza (hay

²⁰ Weissenhorn W y cols., 1997.

²¹ Sattentau QJ y cols., 1995.

Introducción

aproximadamente 2000 copias de NC). El ARN es de polaridad positiva²², pero se replica a través de un DNA intermediario, DNA de doble banda, que puede integrarse en el DNA genómico de la célula huésped.

Además en el interior de la cápside se encuentran dos moléculas de retrotranscriptasa (RT, p66/p51), necesarias para la replicación (cataliza el paso de RNA monocatenario a DNA bicatenario), la proteasa (PR, p11), y la integrasa (IN, p31).

1.4.5. El genoma viral

El genoma del VIH está constituido por tres genes/proteínas estructurales, al igual que todos los retrovirus: *gag*, *pol* y *env*²³ (**gag** significa antígeno de grupo, **pol** representa la polimerasa y **env** se refiere a la envoltura). Además presenta otros seis genes accesorios/reguladores: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*, que codifican para proteínas no estructurales. *Tat* y *rev* codifican para las proteínas reguladoras que reciben el mismo nombre, y los genes *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef*, codifican para las proteínas accesorias, que también tienen el mismo nombre^{24, 25}. Nef, Vif y Vpr están incluidas en el virión maduro, mientras Rev, Tat y Vpu, que funcionan en la célula huésped, no están incluidas; vendrán sintetizadas en la fase tardía del ciclo de replicación del VIH²⁶. (Las funciones de todos los genes están resumidas en la Tabla 1²⁷).

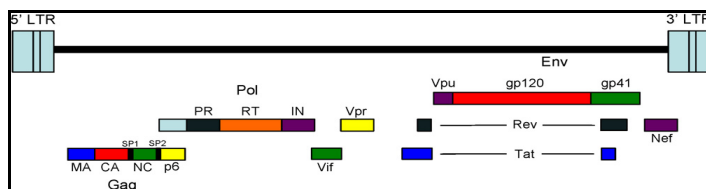


Figura 5: Organización del genoma del VIH-1. (Adamson CS,y cols., 2010.)

²² Lázaro Lázaro E y cols., 2002.

²³ Varmus H, 1988.

²⁴ Úsuga X y cols., 2009.

²⁵ Adamson CS y cols., 2010.

²⁶ Turner BG y cols., 1999.

²⁷ Alcamí J, 2004.

En el genoma del VIH-1 encontramos también las LTRs (*Repeticiones Terminales Largas*), que como en otros Retrovirus, están compuestas por 3 regiones: U3, R y U5, que van del extremo 5' al 3'²⁸. Estas regiones:

- son esenciales para la integración del ADN vírico en el ADN de la célula huésped;
- contienen zonas de unión para las proteínas reguladoras que participan en la replicación del virus²⁹.

²⁸ Mandell GL y cols., 2006.

²⁹ Passarge E, 2007.

Introducción

Gen	Proteína	Función
Env	gp 160	Poliproteína precursora
	SU/gp120	Proteína de la envuelta viral; Interacción con el receptor CD4 y correceptores.
	TM/gp41	Fusión de membranas
Gag	p55	Poliproteína precursora
	CA/p24	Proteína de la cápside
	MA/p17	Proteína de la matriz
	NC/p7	Proteína de la nucleocápside
	p6	Ribonucleoproteína, esencial para la encapsidación viral
Pol	Transcriptasa inversa	Retrotranscripción
	Integrasa	Integración
	Proteasa	Procesamiento postraduccional de las poliproteínas <i>gag</i> y <i>gag-pol</i>
Tat	Tat	Elongador del ARNm; Transactivador; Inducción de apoptosis.
Rev	Rev	Regulador del transporte y procesamiento del ARNm
Nef	Nef	Aumento de la infectividad viral; Incremento de la retrotranscripción; Regulación negativa de CD4; Inducción de apoptosis en CTL.
Vif	Vif	Aumenta la infectividad viral; Interacción y neutralización de factores celulares antivirales: APOBEC.
Vpr	Vpr	Transactivador viral; Transporte del complejo de preintegración al núcleo; Parada del ciclo celular. Inducción de Apoptosis.
Vpu	Vpu	Secuestro de CD4 en el retículo endoplásmico; Aumenta la generación de viriones.

Tabla 1: Genes del VIH y propiedades de las proteínas que codifican. (Alcami J, 2004, modificada).

1.4.5.1. Genes estructurales

1.4.5.1.1. El gen Gag

La proteína *gag* es inicialmente sintetizada en forma de poliproteína precursora, que por su peso molecular ha sido llamada Pr55^{gag}, suficiente para producir partículas virales no infecciosas en ausencia de otras proteínas virales o ARN viral³⁰. La poliproteína se sintetiza en los ribosomas a partir de un ARNm inmaduro²⁶.

Durante o inmediatamente después de la salida de las vesículas, desde la membrana de la célula huésped, sufre un proceso proteolítico mediado por la proteasa (PR), codificada por el gen *pol*³¹, y da origen a las proteínas maduras de Gag, que contribuyen a la formación del virión: la proteína de la matriz (**MA, p17**), la proteína de la cápside (**CA, p24**), el péptido espaciador 1" (**SP1**), la nucleocápside (**NC, p7**), el "péptido espaciador 2" (**SP2**), y **p6**^{25, 32}. Aproximativamente desde 1200 hasta 2000 copias de *gag* contribuyen a la formación del virión inmaduro del VIH²⁶.

La producción de partículas infecciosas requiere la co-expresión de Gag, con la glicoproteína *env*, y los enzimas codificados por *pol*: PR, RT, IN.

Todavía no ha sido aprobado ningún medicamento capaz de inhibir Gag o alguna etapa del ensamblaje viral. Pero, como los conocimientos sobre el ensamblaje viral están creciendo, están aumentando también las posibles dianas de nuevas terapias antivirales²⁵.

³⁰ Freed EO, 1998.

³¹ Chen SW y cols., 2004.

³² Checkley MA y cols., 2010.

1.4.5.1.2. El gen *pol*

El gen *pol* codifica las enzimas víricas proteasa (**PR, p11**), retrotranscriptasa (**RT, p66/p51**), e integrasa (**IN, p31**).

El precursor Gag-Pol (Pr160^{gag-pol}) sufre un proceso proteolítico mediado por la proteasa (PR), para generar las proteínas de Gag (MA, CA, NC, p6) y las enzimas de *pol*³³.

La secuencia del gen *pol*, que carece del codón de inicio³⁴, solapa parcialmente la secuencia codificante por el gen *gag*. Durante la traducción de Gag ocurre un cambio en el patrón de lectura ribosomial (con una frecuencia del 5-10 %), que termina en la traducción de *pol* en una poliproteína Pr160^{gag-pol} (31).

Como consecuencia, *pol* es sintetizado únicamente como una parte de la proteína Gag-Pol³⁴.

- La proteasa ha sido la primera proteína del VIH-1 que ha sido caracterizada²⁶. Es indispensable para la maduración y capacidad infectiva del virión, y tiene utilidad como diana de los antirretrovirales³⁵. Su función en el virión inmaduro es escindir la poliproteína viral durante el ciclo replicativo. Sin su acción las partículas víricas resultantes no resultan infectivas⁷.

El sitio activo de esta enzima está localizado en la unión de sus dos subunidades, recubierto de subdominios plegados¹⁸.

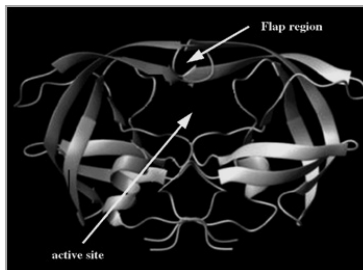


Figura 6: Estructura cristalográfica de un homodimero de la proteasa del VIH-1. (Serra S y cols., 2005).

³³ Freed EO, 2004.

³⁴ Hill M y cols., 2005.

³⁵ Barrie KA y cols., 1996.

- La **RT** es una DNA polimerasa dependiente de RNA (lo que dio origen a la palabra retrovirus³⁶), responsable de convertir el RNA monocatenario de los retrovirus en DNA de doble cadena (dsDNA)³⁷. Esta enzima, por lo tanto es capaz de hacer que el flujo de la información genética vaya en el sentido RNA→DNA, contrariamente a lo que sucede en el flujo normal de la información genética en las células (DNA→RNA)²².

En su forma activa es un heterodímero de dos subunidades: la más grande, p66, tiene 560 aminoácidos (está compuesta por dos dominios: polimerasa y RNasa H), y la más pequeña, p51, contiene los primeros 440 residuos de la p66³⁷ (corresponde al dominio polimerasa de la subunidad p66³⁸). La RT actúa como diana de muchos medicamentos anti VIH-1, que la inhiben³⁷.

Los dominios p66 y p51 de la polimerasa, contienen cada uno 4 subunidades: “fingers”, “palm”, “thumb”, y “connection”³⁸ (que une el dominio de la polimerasa al RNasa H). Fue descrito por Kohlstaedt y sus colaboradores en 1992, en un estudio de cristalografía a rayos X, a 3.5 Å.

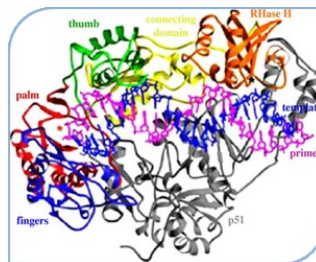


Figura 7: Estructura cristalográfica de la RT del VIH-1. (Serra S y cols., 2005).

- La **integrasa** es esencial para la integración del DNA viral en el cromosoma de la célula huésped; reconoce las LTRs en los extremos 5' y 3' del DNA viral de doble cadena recién sintetizado, y corta dos, y a veces tres bases, desde el extremo 3' terminal;

³⁶ Temin, HM y cols., 1970.

³⁷ Peletskaya EN y cols., 2001.

³⁸ Jacobo-Molina A y cols., 1993.

Introducción

posteriormente une el extremo 3' terminal al DNA de la célula huésped²⁶. En el 2007 ha sido aprobado un nuevo medicamento antirretroviral (el raltegravir), que la inhibe. (Los inhibidores de RT y PR son los más numerosos y eficaces, y la combinación de los dos se suele utilizar en la fase inicial del tratamiento)²⁵.

Estudios de cristalografía localizaron el sitio catalítico de la enzima en los residuos 50-212, y después del 288. La forma activa de la enzima se piensa sea un tetrámero, con el sitio activo localizado en la zona central¹⁸.

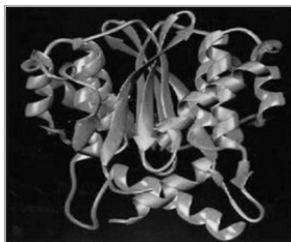


Figura 8: Estructura cristalográfica de un homodímero de la integrasa del VIH-1. (Serra S y cols., 2005.).

1.4.5.1.3. El gen *env*

El gen **env** (envoltura) deriva de una poliproteína precursora (gp160) sintetizada en retículo endoplasmático (RE) utilizando el ARNm de *env*.

Es postraduccionalmente modificada en el RE y aparato del Golgi y proteolíticamente (por acción de proteasas celulares durante su camino hacia la membrana plasmática³⁹), produce un complejo glicoproteico trimérico, (TM-SU)₃, que viene posteriormente transportado a la membrana celular por el ensamblaje del virus²⁶. El complejo está compuesto por una glicoproteína externa (de superficie) gp120 (SU, surface glycoprotein), que está unida no covalentemente al dominio transmembrana gp41 (TM, transmembran protein), organizado en una simetría triangular¹⁸.

³⁹ Murakami T y cols., 2004.

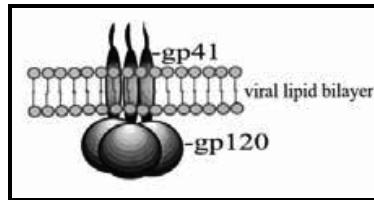


Figura 9: Representación del complejo gp120/gp41 de *Env*. (Freed EO, 2002, modificada).

En la superficie de las células infectadas *env* es un trímero compuesto por tres protómeros homodiméricos de gp120/gp41⁴⁰, como se puede observar en la Figura 9.

- La gp 120 está organizada en 5 regiones constantes (C1-C5) y 5 dominios variables (V1-V5)¹⁹.

La región V3 es el principal determinante de la especificidad de los receptores de quimiocinas (tropismo del VIH-1). Consiste en 35 aminoácidos (entre 31 y 39), y no solo es crítica para la unión con el correceptor, pero determina también cual correceptor⁴¹ (un receptor específico de quimiocinas⁴⁰: CXCR4 o CCR5) será utilizado para la entrada del virus⁴¹.

El maraviroc actúa como un antagonista de CCR5 y, actualmente es el único antirretroviral aprobado que tiene como diana un factor de la célula huésped²⁵.

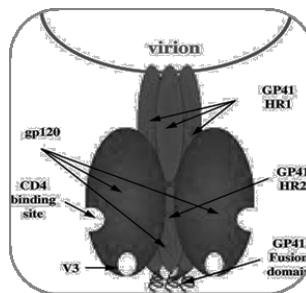


Figura 10: Glicoproteína *env* del VIH-1. (Serra S y cols., 2005, modificada).

- Gp41 está compuesta por tres dominios principales: extracelular, transmembranal y citoplasmático⁴².

⁴⁰ Salzwedel K y cols., 2009.

⁴¹ Huang CC y cols., 2005.

⁴² He Y y cols., 2008.

Introducción

El dominio extracelular (ectodominio) contiene principalmente cuatro regiones funcionales: una hidrofóbica, con un péptido de fusión rico en glicina (FP), una N-terminal (NHR o HR1-heptad repeat-), una C-terminal (CHR o HR2-heptad repeat), y una región rica en triptófano.

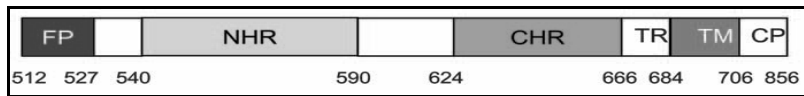


Figura 11: Esquema de las principales regiones funcionales de gp41. (He Y y cols., 2008).

La glicoproteína *env* media la entrada del virus⁴⁰; en el virión maduro Gp120 y gp41 actúan juntas para catalizar la fusión entre la partícula viral y la célula diana, obteniendo como resultado la introducción del core viral en el citoplasma de la célula huésped³⁹. El enfuvirtide bloquea la fusión celular teniendo como diana gp41²⁵.

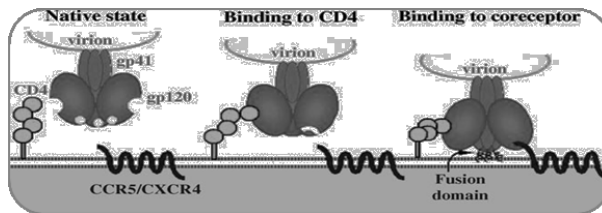


Figura 12: Esquema de la entrada y unión del virión. (Serra S y cols., 2005, modificada).

1.4.5.2. Genes reguladores

1.4.5.2.1. Tat (Transactivador transcripcional)

Tat es una proteína de aproximadamente 14 kD⁴³, que regula la expresión génica del VIH-1. A diferencia de otros factores transcripcionales, que suelen interactuar con el ADN, tat se une al ARN²⁴, permitiendo así la estimulación de la transcripción del provirus. Participa en la iniciación y elongación transcripcional, respectivamente.

⁴³ Castaño ME y cols., Urcuqui S. 2004.

1.4.5.2.2. Rev (Regulador de la expresión viral)

La proteína rev es un pequeño (116 aminoácidos) activador post-transcripcional de la expresión de mRNAs incompletos. Es un factor crucial en la replicación del VIH⁴⁴.

1.4.5.3. Genes accesorios

1.4.5.3.1. Nef (factor negativo, negative factor)

Nef es una fosfoproteína de membrana de 27 kD, localizada en la superficie citoplasmática de las membranas celulares⁴⁵.

Contribuye a una alteración de la respuesta inmune y a la evasión de la respuesta mediada por los linfocitos T citotóxicos²⁴.

1.4.5.3.2. Vif (Factor de infectividad viral, viral infectivity factor)

Vif es una proteína accesoria de 23 kD, crítica por la replicación en vivo del VIH-1⁴⁶. En su ausencia, las proteínas APOBEC son encapsidadas en las partículas virales nacientes e interfieren en el proceso de retrotranscripción en célula infectada, frenando el proceso de propagación del VIH²⁷. La función principal de Vif es prevenir la encapsidación de estas proteínas.

1.4.5.3.3. Vpr

Vpr es una pequeña proteína de 14 kD⁴⁷. Bloquea el ciclo celular, el que proporciona el tiempo necesario para la síntesis de proteínas virales y el ensamblaje del virión²⁴.

⁴⁴ Kramer-Hämmerle S y cols., 2005.

⁴⁵ Rhee SS y cols., 1994.

⁴⁶ Goila-Gaur R y cols., 2008.

⁴⁷ Arokium H y cols., 2009.

1.4.5.3.4. Vpu

La Vpu es una fosfoproteína integral de membrana de 16 kD, compuesta por 81 aminoácidos⁴⁸.

Aunque su función no es estrictamente necesaria para la replicación viral, tiene algunas funciones importantes que aumentan la producción del VIH-1.

Es importante sobre todo para favorecer la liberación de partículas virales.

1.5. Detección de resistencias

Las pruebas para la detección de resistencias a antirretrovirales pueden clasificarse en dos tipos: **genotípicas** y **fenotípicas**.

Las resistencias **genotípicas** se basan en el análisis de la estructura genética viral⁴⁹ y, por lo tanto determinan las mutaciones en la secuencia primaria de nucleótidos de la transcriptasa inversa (TI), de la proteasa (PR) y, recientemente, de la envoltura, comparándola con la secuencia de una cepa patrón o cepa salvaje⁵⁰.

Las resistencias **fenotípicas** se expresan en términos de concentración de droga necesaria para inhibir la replicación vírica en cultivo celular. En general, se expresan en términos de CI₅₀ (que indica la concentración de fármaco necesaria para reducir al 50% la producción viral *in vitro*). La interpretación de estos valores es diferente en función del fármaco implicado.

⁴⁸ Douglas JL y cols., 2009.

⁴⁹ Gutiérrez C, 2007.

⁵⁰ López-Bernaldo de Quirós JC y cols., 2007.

1.5.1. Técnicas genotípicas

Existen tres pruebas genotípicas comerciales: la secuenciación y dos técnicas basadas en la hibridación: LIPA y GeneChip⁴⁹.

- El método más extendido de estas técnicas consiste en la amplificación mediante PCR del fragmento del genoma viral que se quiere estudiar (normalmente el gen de la transcriptasa inversa o de la proteasa), para, a continuación, **secuenciar** y analizar la posible presencia de mutaciones asociadas con resistencia a los distintos antirretrovirales⁵⁰.

1.5.1.1. Interpretación del genotipo

Los ensayos genotípicos se suelen acompañar de una interpretación de las mutaciones encontradas: para ellos, existen varios sistemas de interpretación clínica de las mutaciones obtenidas⁵⁰.

Dos de los más utilizados están disponibles en Internet; son la página de la Sociedad Internacional de Sida (<http://www.iasusa.org/>) y la base de datos para secuencias de proteasa y transcriptasa inversa de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>). Todos son fácilmente accesibles y presentan sistemas de interpretación sencillos para todos los fármacos disponibles.

1.5.2. Técnicas fenotípicas

Los estudios fenotípicos tienen la ventaja de evaluar con mayor fidelidad la sensibilidad del virus frente a cada fármaco, y según este grado de sensibilidad se podría valorar en un futuro la posibilidad de superar la resistencia aumentando las concentraciones plasmáticas del fármaco⁵⁰.

Introducción

Sin embargo, los estudios fenotípicos deben considerarse por el momento poco viables, principalmente por la complejidad, laboriosidad de la técnica, y el tiempo necesario para la emisión de resultados.

La interpretación de los análisis fenotípicos es limitada debido a la escasa información sobre la correlación entre el grado de resistencia *in vitro* y la actividad de ciertas drogas *in vivo*.

1.6. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de biomoléculas como DNA, RNA y proteínas, es el método más decisivo utilizado en biología molecular. Pueden ser aislados de todo tipo de material biológico como tejidos vivos o conservados, células, partículas virales, u otros tipos de muestras con fines analíticos o preparativos⁵¹.

Generalmente, la purificación de ácidos nucleicos necesita cuatro pasos principales:

- 1- Lisis celular o de los tejidos;
- 2- Denaturación de los complejos nucleoproteícos;
- 3- Inactivación de las nucleasas (RNasa por la extracción de RNA, y DNasa por la extracción de DNA);
- 4- Eliminación de las contaminaciones, como proteínas, carbohidratos, lípidos u otros ácidos nucleicos (DNA sin RNA o RNA sin DNA).

Actualmente existen varios métodos de extracción de DNA, RNA y proteínas. Generalmente se pueden distinguir dos tipos de protocolos:

- 1- basados en soluciones (método del fenol cloroformo y del guanidina tiocianato);
- 2- basados en columnas cromatográficas.

⁵¹ Tan SC y cols., 2009.

Describimos los métodos cromatográficos que son los que hemos utilizado en el laboratorio.

1.6.1. Métodos cromatográficos

1.6.1.1. Extracción de ácidos nucleicos con una fase estacionaria solida

La purificación de los ácidos nucleicos con una fase estacionaria solida puede ser encontrada en muchos *kits* comerciales del mercado⁵¹.

Este método permite una purificación rápida y eficaz, comparado con los métodos tradicionales. Pueden ser evitados muchos problemas asociados con la extracción liquido-liquido, como por ejemplo la incompleta separación de las fases.

Los sistemas de extracción en fase solida, adsorben los ácidos nucleicos en el proceso de extracción, dependiendo de las condiciones de pH y contenidos salinos del Buffer.

Como fase solida para la extracción, han sido utilizadas matrices de sílica, polvos de vidrio e intercambiadores aniónicos.

Los principales procesos de adsorción se basan en:

- 1- **interacciones hidrogeno** y unión con la matriz hidrofílica en condiciones caotrópicas (cromatografía de adsorción);
- 2- **intercambio iónico** en condiciones acuosas (es decir, con un intercambiador aniónico, *cromatografía de intercambio iónico*);

En general, también en la extracción en fase solida hay 4 pasos principales:

- 1- lisis celular;
- 2- adsorción de los ácidos nucleicos según las distintas químicas;
- 3- lavado;
- 4- elución.

1.6.1.1.1. Cromatografía de intercambio iónico

Actualmente es la tecnología más utilizada para la separación de ácidos nucleicos⁵².

El mecanismo básico es el intercambio reversible de los iones en solución con los grupos funcionales unidos covalentemente a una fase estacionaria insoluble llamada resina.

Por ejemplo, un ácido nucleico con carga negativa a pH 7,0 se unirá a un intercambiador iónico con grupos cargados positivamente, pero eluirá de la columna al cambiar el pH del tampón (tampón de elución). Los iones del tampón de elución interaccionan con los grupos cargados del ácido nucleico o del intercambiador iónico, respectivamente; primero eluirán de la columna las moléculas cargadas positivamente, que no se unen a la fase estacionaria, posteriormente, al añadir el tampón de elución, eluirán las moléculas con poca carga negativa neta, y luego las de mayor carga negativa neta.

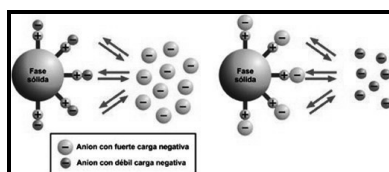


Figura 13: Mecanismo del intercambio reversible entre la resina y el ácido nucleico. (<http://www.cultek.com>).

Actualmente se utilizan dos tipos de intercambiadores aniónicos en los kits comerciales: el metilaminoetanol (MAE) o el dietilaminoetil (DEAE). La unión del ADN depende principalmente del componente estérico de los grupos funcionales y de la afinidad del intercambiador aniónico por el respectivo ácido nucleico. El grupo MAE es menos voluminoso y más hidrofílico que el DEAE, y por lo tanto, la unión de los ácidos nucleicos a los primeros es más efectiva que a los segundos.

⁵² Cultek S.L.U. http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=tecnicas

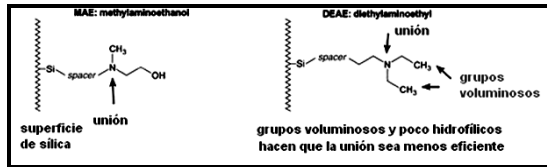


Figura 14: Ejemplos de intercambiadores aniónico. (<http://www. Cultek. com/aplicaciones,> modificada).

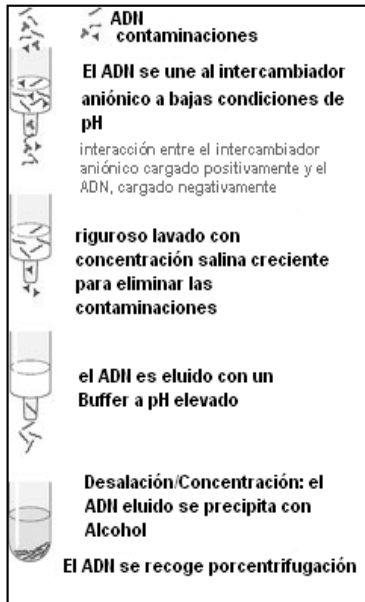


Figura 15: Pasos de la extracción, en la cromatografía a intercambio iónico. (<http://www. Cultek. com/aplicaciones,> modificada).

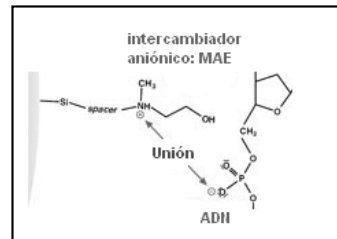


Figura 16: Mecanismo de unión.(www. Cultek. com/aplicaciones, modificada).

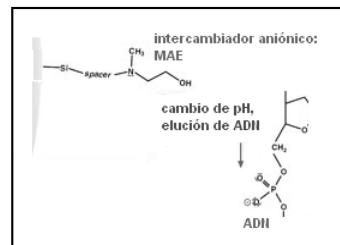


Figura 17: Mecanismo de elución. (<http://www. Cultek. com/aplicaciones,> modificada).

Una modificación de este método es la extracción en fase sólida, en la que se utiliza una matriz intercambiadora de aniones, empaquetada en columnas de polipropileno. La unión de los ácidos nucleicos se produce en condiciones de baja salinidad. Durante los pasos de lavado se va incrementando la concentración de sales en los tampones correspondientes, por lo que las impurezas se eliminan debido a su diferente capacidad de unión. De esta forma se obtienen una purificación de los ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) rápida y eficiente. Al final los ácidos nucleicos se eluyen con un tampón de máxima salinidad; por último, se precipita con isopropanol, para lavar y eliminar todos los restos de impurezas y,

finalmente, se reconstituye el ADN de elevada pureza en un tampón de baja salinidad, para su posterior utilización o almacenamiento (Buffer TE, pH 8.0 o 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).

Debido a la elevada pureza del ADN obtenido con esta tecnología, la principal aplicación de este tipo de cromatografía es la purificación de ADN plasmídico. En nuestro trabajo utilizamos la cromatografía a intercambio iónico en las plasmipreps usando el protocolo de QIAGEN por el QIAGEN plasmid maxi kit. (Véase también, **ANEXO V**).

1.6.1.1.2. Cromatografía de adsorción (membranas de sílica gel)

La mayoría de los productos comerciales relacionados con la purificación de los ácidos nucleicos se basan en la capacidad que tienen las matrices de sílica de unirse al DNA⁵².

Estas matrices se preparan con reflujo de dióxido de silicón en hidróxido de sodio o de potasio en proporción entre 2:1 y 10:1, por al menos 48 horas. Luego se pueden usar para purificar el DNA.

El principio de la purificación se basa en la elevada afinidad de las moléculas de DNA, hacia las partículas de sílica⁵¹.

Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua que mantienen la solubilidad del DNA en soluciones acuosas. Con la adición de iones caotrópicos, se destruye esta ordenada estructura de moléculas de agua (las sales caotrópicas atraen las moléculas de agua, lo cual permite que membrana de sílica y ADN interactúen por medio de diferentes mecanismos), por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del DNA⁵².

El sodio de la matriz, en forma de catión (Na^+), hace de puente que atrae el oxígeno de los grupos fosfato del DNA, cargados negativamente (PO_3^{2-}).

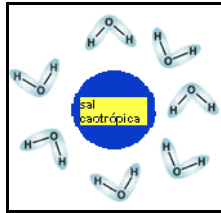


Figura 18: Comportamiento de las sales caotrópicas con el agua. (<http://www.cultek.com/aplicaciones>, modificada).

El DNA, bajo estas condiciones hidrofóbicas⁵², está atrapado fuertemente a la matriz⁵¹ de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, se eliminan de la muestra durante los pasos de lavado⁵².

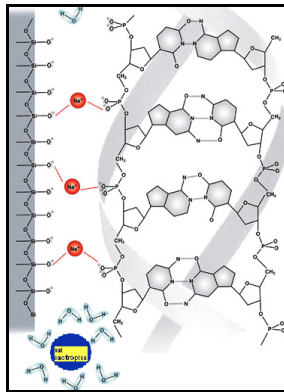


Figura 19: Unión de las matrices de sílica y los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. (<http://www.cultek.com/aplicaciones>, modificada).

Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos), T.E.⁵¹, o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana⁵².

En nuestro trabajo utilizamos la cromatografía de adsorción en las minipreps, usando el protocolo de Macherey-Nagel por el NucleoSpin® plasmid y en la extracción de ADN, usando el protocolo de QIAGEN por el QIAmp® DNA mini (Spin Protocol), por la purificación de ADN desde muestras de sangre. (Véase también, **ANEXO IV** y **ANEXO VI**).

1.6.2. Bolas magnéticas

Los ácidos nucleicos se unen selectivamente a las bolas paramagnéticas en presencia de sales caotrópicas mientras que el resto de los contaminantes son eliminados de la muestra⁵². Las bolas actúan como una fase estacionaria, y por esto no necesitan de centrifugaciones o filtraciones sucesivas. Después de una fase de lisis inicial, se verifica la unión del DNA a las bolas⁵³. Se remueven las partículas, con el ácido nucleico a estas unido, utilizando un imán permanente, y después, se someten a varios lavados para eliminar posteriores contaminantes y sales. Los ácidos nucleicos purificados (unidos a las bolas paramagnéticas) se eluyen de la solución, en condiciones de baja salinidad y están listos para ser utilizados en posteriores aplicaciones⁵². (Ver Figura 20⁵⁴).



Figura 20: Varios pasos de la extracción usando nanopartículas magnéticas. (Berensmeier S, 2006, modificada).

1.7. Nanopartículas magnéticas

La literatura de las nanopartículas de hierro, así como la de las nanopartículas, es un poco confusa por falta de coherencia en definiciones y terminología⁵⁵.

No se está muy de acuerdo sobre lo que califica a una nanopartícula. Ha sido argumentado, basándose en el sistema SI,

⁵³ Cassará F, 2005.

⁵⁴ Berensmeier S, 2006.

⁵⁵ Huber DL, 2005.

que solo partículas entre 1 y 10 nm sean consideradas nanopartículas, o también que cualquier cosa entre 1 y 1000 nm puede ser considerada una nanopartícula.

Estos representan los dos extremos de lo que puede ser considerado “nanopartícula”; sin embargo muchos científicos no sostienen una interpretación tan estricta. De todas formas, todos estarían de acuerdo en que una partícula cuyas dimensiones superen 1000nm, ya no es una nanopartícula.

1.8. Magnetismo

Entre los distintos tipos de magnetismo, se incluyen el **diamagnetismo**, **paramagnetismo** y **ferromagnetismo**; junto a estos el **antiferromagnetismo** y el **ferrimagnetismo** se consideran subclases del ferromagnetismo.

Todos los materiales presentan por lo menos uno de estos tipos de magnetismo y, el comportamiento depende de la respuesta de los dipolos magnéticos atómicos y electrónicos a la aplicación de un campo magnético externo⁵⁶.

1.8.1. Propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro

Las partículas de óxido de hierro se pueden clasificar en base a su respuesta a un campo magnético externo aplicado⁵⁷.

La descripción de la orientación de los momentos magnéticos en una partícula, ayuda a identificar los diferentes tipos de magnetismo presentes en la naturaleza.

✓ Las partículas cuyos espines de los electrones impares se alinean espontáneamente, de manera que el material puede exhibir magnetización sin estar en un campo magnético, exhiben

⁵⁶ Callister WD, 1996.

⁵⁷ Gupta AK y cols., 2005.

ferromagnetismo. Es un fenómeno cooperativo, así que las propiedades ferromagnéticas se presentan cuando un cierto número de átomos se unen. Cuando a las partículas magnéticas se las retira del campo, muestran **magnetización permanente**.

Presentan estas características los metales de transición, como por ejemplo el hierro⁵⁶, pero también el cobalto, el níquel y algunas aleaciones o compuestos, que contienen uno o más de estos elementos.

Lo más frecuente es que, en un material ferromagnético un espín⁵⁸ (movimiento de un electrón alrededor de su propio eje⁵⁹), se alinea en una dirección, la del campo, si la hay, o aleatoria, si no la hay. Este dipolo magnético interacciona suficientemente para que los espines vecinos, se alineen como el primero, formando dominios (grupos de átomos alineados⁶⁰) magnéticos en los que la magnetización neta es no nula.



Ferromagnetismo

✓ El **diamagnetismo** es una forma muy débil y no permanente de magnetismo; persiste solo mientras el campo externo esté presente. Cuando se colocan entre los polos de un fuerte electroimán, los materiales diamagnéticos son atraídos hacia las regiones donde el campo es débil. Se encuentra en todos los materiales; siendo tan débil, puede ser observado solo cuando otros tipos de magnetismo están totalmente ausentes⁵⁶.

✓ Algunas sustancias exhiben las propiedades del **paramagnetismo**, que contrariamente a los materiales ferromagnéticos, no manifiestan magnetización permanente si se retiran del campo magnético.

Puesto que los dipolos, en un sistema paramagnético, no se influyen entre sí en ausencia de un flujo magnético, pueden

⁵⁸ González Viñas W y cols., 2003,

⁵⁹ Vidaurre A y cols., 1996.

⁶⁰ Hewitt PG, 2004.

estar orientados al azar. Si la sustancia se coloca en un flujo magnético, los dipolos intentarían alinearse en la dirección del flujo exterior⁶¹.

✓ Los materiales **ferrimagnéticos** están formados por iones que tienen espines diferentes, sobre todo de dos tipos: $s \neq S$ ⁶².

El ferrimagnetismo es un tipo de magnetización permanente; las características macroscópicas de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos son similares, la diferencia reside en el origen de los momentos magnéticos⁵⁶.

Las sustancias ferrimagnéticas exhiben magnetización espontánea, debida al alineamiento no paralelo de sus momentos atómicos⁶³. Debido a estos alineamientos, tienen fuerza magnética menor que los materiales ferromagnéticos puros, como el hierro.



Ferrimagnetismo

El prototipo de la ferrita es el Fe_3O_4 , el mineral magnetita, a veces denominado piedra imán⁵⁶; es un óxido de hierro común (magnético), con la estructura cúbica de una espinela inversa⁵⁷,^{64, 65}, como se puede observar en la Figura 21⁶⁶.

⁶¹ Collieu AM y cols., 1977.

⁶² Sznajd J, 2006.

⁶³ Wolf WP, 1961.

⁶⁴ Pol VG y cols., 2010.

⁶⁵ Fonin M y cols., 2005.

⁶⁶ Bino A y cols., 1998.

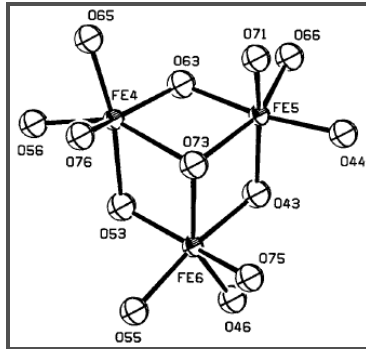


Figura 21: Molécula de Fe₃O₄. (Bino A y cols., 1998).

Los electrones pueden transferirse entre los iones Fe²⁺ y Fe³⁺ en el octaedro⁶⁴, a temperatura ambiente, haciendo de la magnetita una clase importante de materiales semi-metálicos⁶⁵.

La fórmula química general de una ferrita es MO×Fe₂O₃, donde M es un catión de valencia 2 como Zn, Cd, Fe, Ni, Co, Cu o Mg. Para cada uno de los iones Fe²⁺ y Fe³⁺ existe un momento magnético (los iones O²⁻ son magnéticamente neutros). Entre los dos tipos de iones del Fe se producen interacciones de acoplamiento de los espines en las direcciones antiparalelas. Sin embargo se produce un momento ferrimagnético neto, debido a que los momentos de espín no se cancelan completamente.

✓ Si los espines apuntan en direcciones contrarias se obtiene **antiferromagnetismo**; todos los espines son del mismo tipo. Los momentos magnéticos elementales forman dos subconjuntos de valores iguales, orientados en dos direcciones opuestas⁶⁷, por lo que un cuerpo antiferromagnético no tendrá imanación espontánea⁶⁸.



Antiferromagnetismo

✓ Las nanopartículas compuestas por materiales ferromagnéticos o ferrimagnéticos y de un cierto tamaño (menos de 30 nm⁶⁹,

⁶⁷ Lévy E, 2004.

⁶⁸ Hlawiczka P, 1977.

⁶⁹ Chiang CL y cols., 2006.

generalmente entre 10 y 20 nm), manifiestan una forma única de magnetismo llamada **superparamagnetismo**⁵⁵.

La palabra **superparamagnetismo** ha sido elegida porque estas sustancias tienen una magnetización parecida a las paramagnéticas. Este fenómeno está presente solo en las nanopartículas⁵⁵ (que son parte fundamental de nuestro trabajo de investigación), cuyo **tamaño** es inferior a los que normalmente causan las interacciones de espín (están compuestas de un solo dominio)⁷⁰.

Con estos tamaños, algunas partículas son tan pequeñas que el fenómeno cooperativo del ferromagnetismo no se puede observar y, si se retiran del campo magnético no conservan magnetización permanente^{57, 69, 71}. De todas formas aún exhiben fuertes propiedades paramagnéticas⁵⁷.

Las partículas de óxido de hierro se comportan diferentemente en el campo magnético cuando pasan del micrómetro al nanómetro. Por ejemplo entre 6 y 15 nm actúan como superparamagnéticas, mientras cuando el tamaño pasa al rango del micrómetro, actúan como ferromagnéticas.

1.9. Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con sílica

La síntesis de fluidos magnéticos estables, que contengan pequeñas partículas, distribuidas de manera uniforme, con una elevada magnetización es muy importante⁷².

En la práctica, las partículas magnéticas por si solas, no son muy útiles y están sujetas a las siguientes limitaciones:

- ✓ tienden a formar agregados;
- ✓ si no son lo suficientemente estables, su estructura original puede cambiar, causando una alteración de las propiedades

⁷⁰ Kumar CSSR, 2009.

⁷¹ Lu AH y cols., 2007.

⁷² Santra S y cols., 2001.

magnéticas;

- ✓ si se exponen a los sistemas biológicos, pueden sufrir una rápida biodegradación.

Por lo tanto, para prevenir estos fenómenos, es necesario recubrirlas adecuadamente.

Para modificar las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro han sido desarrollados varios métodos, como por ejemplo recubrirlas con oro, polímeros o sílica⁷³. Entre estos, la sílica es el material más importante, porque es químicamente inerte, por lo tanto no afecta a las reacciones redox en la parte superficial del núcleo de magnetita.

Además, a menudo la capa de sílica presenta, en superficie, grupos de silanol, que pueden reaccionar con varios compuestos para unirse covalentemente a ligandos específicos.

Normalmente, una capa inerte de sílica en la superficie de las nanopartículas magnéticas ayuda a ***prevenir su agregación en el estado líquido, mejora su estabilidad química y proporciona una mejor protección frente a su toxicidad***⁷⁴.

1.10. Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica

La síntesis de nanopartículas superparamagnéticas es un proceso complicado a causa de su naturaleza coloidal⁷⁴.

Para sintetizarlas se pueden emplear numerosos métodos químicos.

Para generar nanoesferas magnéticas recubiertas con sílica se han investigado tres métodos principales:

- El primero se basa en el proceso de Stöber, en el cual la sílica se forma *in situ* por hidrólisis y condensación de un precursor sol-gel, como el tetraetilortosilicato (TEOS).

⁷³ Jang JH y cols., 2010.

⁷⁴ Laurent S y cols., 2008.

- El segundo se basa en la precipitación de la sílica desde una solución acida silicilica; varios estudios han demostrado que este último método parece ser más eficiente en los recubrimientos, a elevadas proporciones de magnetita, respecto al método TEOS.
- El tercero se basa en emulsiones, donde se usan micelas para limitar y controlar el recubrimiento de sílica. Este método puede necesitar un esfuerzo más grande para separar el core (las nanopartículas recubiertas) de la grande cantidad de surfactantes asociados a la emulsión. Está basado en microemulsiones w/o (microemulsiones inversas⁷⁵), y ha sido muy utilizado para sintetizar nanopartículas magnéticas recubiertas con polímeros, pero ha sido usado solo raramente por la preparación de microesferas de óxido de hierro/sílica⁷⁶.

Durante los años 1993-2006, muchas revistas importantes y varios autores se han dedicado a estudiar las microemulsiones, como por ejemplo Pileni, Eastoe, López-Quintela, Capeck, Holmberg y Huskokovic^{77, 78}.

1.11. La microemulsión inversa

Las microemulsiones son “nano dispersiones” coloidales de agua en aceite (w/o), o de aceite en agua (o/w), estabilizadas con una capa de surfactante⁷⁹.

En particular, se hace referencia a las primeras (w/o), con el término de **microemulsiones inversas**^{75, 77, 79}.

Una microemulsión inversa se forma cuando el agua (o bien nanogotas de agua⁸⁰) se dispersa en una fase continua basada en hidrocarburos; normalmente se sitúa hacia el ápice del aceite en el diagrama de fase triangular agua/aceite/surfactante⁸¹. (Ver Figura 22).

⁷⁵ Malik MA y cols., en prensa 2010.

⁷⁶ Shao D y cols., 2008.

⁷⁷ Xie L y cols., 2006.

⁷⁸ Ganguli AK y cols., 2010.

⁷⁹ López-Quintela MA, 2003.

⁸⁰ Vidal-Vidal J y cols., 2006.

⁸¹ Eastoe J y cols., 2006.

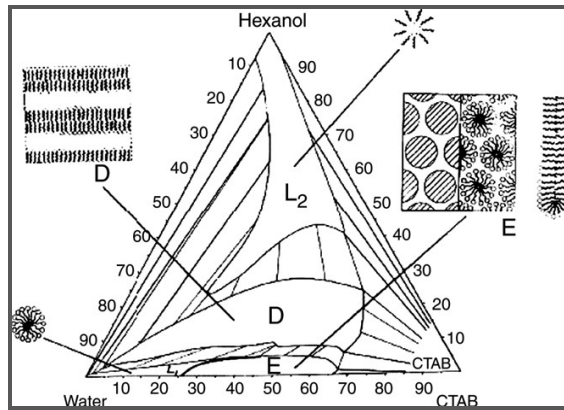


Figura 22: Diagrama de fase por el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)/1-hexanol/agua. (Eastoe J y cols., 2006).

En esta región, el surfactante (termodinámicamente impulsado por el auto ensamblaje) genera agregados conocidos como micelas inversas (fase L2 en la Figura 22).

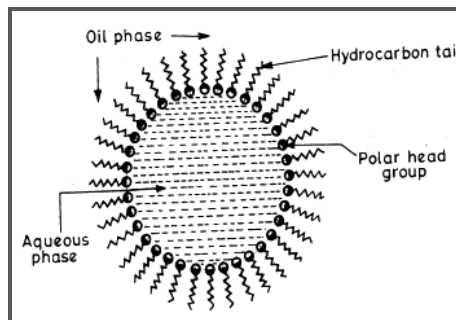


Figura 23: Una estructura típica de una micela inversa en una fase no polar (Ganguli AK.y cols., 2010).

Usando el método de las microemulsiones w/o se han producido partículas muy pequeñas (1-2 nm) y uniformes⁵⁷.

Shao y sus colaboradores han recientemente descrito una modificación de este método para preparar microesferas superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas de sílica, como se puede observar en la Figura 24⁷⁶.

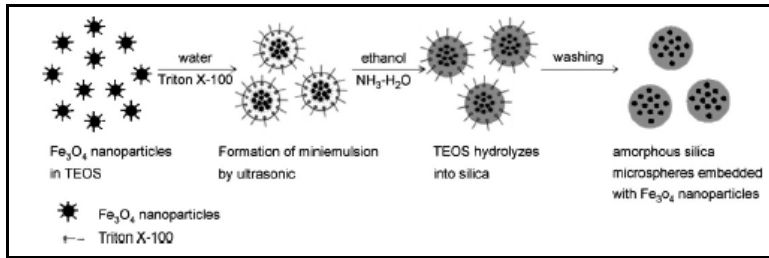


Figura 24: Representación esquemática para producir microsferas magnéticas de Fe₃O₄ recubiertas de sílica. (Shao D y cols., 2008).

En este esquema la superficie de nanopartículas magnéticas está recubierta de una monocapa de ácido oleico (por lo tanto son hidrófobas), y se dispersan en TEOS por ultrasonido. Añadiendo al complejo magnetita-TEOS una mezcla de Triton X-100 y agua desionizada, se forma una miniemulsión por ultrasonido. Basándose en un proceso sol-gel, una mezcla de etanol y amoníaco se añade a la superficie, y después de reacciones de hidrólisis y condensación del TEOS, las nanopartículas resultan recubiertas de sílica⁷⁶.

1.12. Los polímeros sintéticos

1.12.1. El PAA

El ácido poliacrílico (PAA) es un polímero soluble en medio acuoso, con una elevada densidad de grupos funcionales reactivos, que pueden hacerlo muy atractivo en el sector de la biomedicina, debido principalmente a su capacidad de formar complejos poliméricos flexibles, (con cadenas de naturaleza proteica), a través de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o con puentes hidrogeno⁸².

La ausencia de fuerzas coercitivas y de magnetización permanente, previenen las interacciones entre las partículas y la formación de grupos (clusters) de las mismas.

⁸² Piñeiro-Redondo Y y cols., 2011.

Esta combinación de características químicas hace de los complejos coloidales PAA-magnetita unos sistemas que pueden producir buenos resultados en el campo de las bionanotecnologías avanzadas.

1.13. Funcionalización de nanopartículas

La introducción de grupos orgánicos funcionales en la superficie de las partículas recubiertas de sílica ha sido un importante objetivo de la investigación científica⁷³. Las superficies de sílica modificadas pueden ser utilizadas para enlazar biomoléculas como proteínas, péptidos, anticuerpos etc., usando la química convencional del silano.

1.13.1. Los organosilanos y la silanización de superficies

Los Organosilanos son moléculas bifuncionales cuya fórmula general es

$X-(CH_2)_n-SiR_n(OR')_{3-n}$, donde X representa el grupo organofuncional (unido al silicio de manera estable a través de un enlace covalente), $(CH_2)_n$ es un grupo espaciador variable, y $Si(OR)_n$ es el grupo silicofuncional de “anclaje”, a través del cual, (después de la hidrólisis de su grupo alcoxi), pueden unirse a los grupos Si-OH libres, en las superficies⁸³ que se desea funcionalizar.

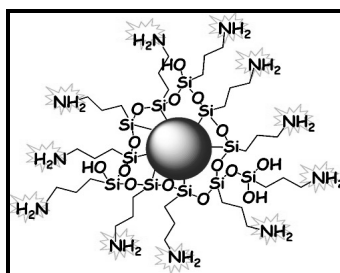


Figura 25: Aminosilanos unidos a una partícula magnética recubierta de sílica. (Bruce IJ y cols., 2005, modificada).

⁸³ Bruce IJ y cols., 2005.

Alcoxisilanos con una variedad de grupos X funcionales están disponibles en el mercado; en cuanto a las aplicaciones biológicas, los grupos amínicos son los más frecuentemente utilizados. (Ver Figura 26⁸⁴).

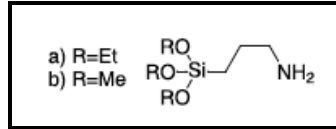


Figura 26: Trialcoxisilanos comunes usados en los procesos de silanización, que promueven la inmovilización covalente del DNA: **a)** 3-aminopropiltrióxido de silano (APTES), **b)** 3-aminopropiltrimetóxido de silano (APTMS). (Luderer F y cols., 2005, modificada).

El grupo amínico puede catalizar la reacción entre el silano y los grupos silanol de superficie⁸⁵ o bien favorecer el enlace entre el DNA y un sustrato sólido (por ej. superficies de vidrio) unido al silano⁸⁶.

La silanización de superficies ha sido largamente documentada en la literatura científica⁸⁷.

En la Figura 27⁸⁸ se puede observar un procedimiento, utilizado por Bagwe y sus colaboradores, para funcionalizar nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica, con silanos organofuncionales.

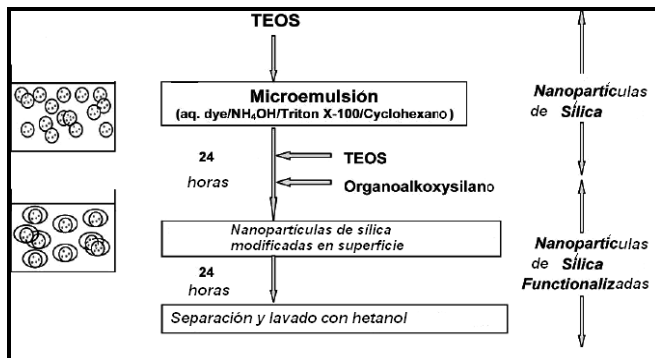


Figura 27: Procedimiento para modificar la superficie de nanopartículas de sílica teñidas, usando la microemulsión w/o. A las 24h, la superficie se funcionaliza con un organosilano. (Bagwe RP y cols., 2006, modificada).

⁸⁴ Luderer F y cols., 2005.

⁸⁵ Smith EA y cols., 2008.

⁸⁶ Carré A y cols., 2003.

⁸⁷ Halliwell CM y cols., 2001.

⁸⁸ Bagwe RP y cols., 2006.

Introducción

Modificar las superficies por silanización es un proceso complejo, influenciado por varios parámetros como el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración del silano y el tipo de grupo funcional⁸⁹.

En un esquema simplificado, este proceso se puede resumir en dos puntos:

- ✓ El organosilano se mete en una solución acuosa en presencia de un ácido, que actúa como catalizador. Se hidroliza, y se verifica una reacción de condensación que produce un polímero del silano.

Los grupos alcóxido (-OC₂H₅) vienen sustituidos por los grupos hidroxilo (-OH), para formar grupos silanol reactivos, que condensan con otros grupos silanol, para formar enlaces siloxánicos (Si-O-Si). Como productos de condensación se producen alcohol (C₂H₅OH) y agua. (Ver Figura 28).

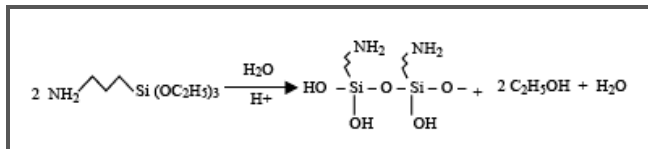


Figura 28: Reacción simplificada de hidrólisis y condensación del APTS, con la formación de un polímero del silano. (Yamaura y cols., 2004).

- ✓ Los polímeros se unen a la magnetita formando enlaces covalentes con los grupos OH. (Ver Figura 29).

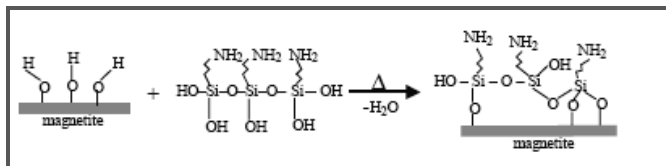


Figura 29: Reacción de silanización simplificada entre el APTES y la superficie de la magnetita. (Yamaura y cols., 2004).

En la Figura 30 se describe el mismo fenómeno, pero utilizando otro trialcóxidosilano: el (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (3-MPTS).

⁸⁹ Yamaura M y cols., 2004.

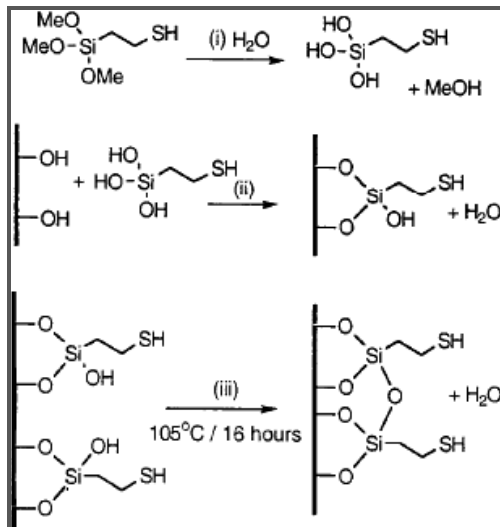


Figura 30: Silanización del vidrio con 3-MPTS. (Halliwell CM y cols., 2001).

2. OBJETIVOS

El uso de partículas magnéticas, basadas en la absorción inespecífica de ácidos nucleicos, en los métodos de extracción de VIH condiciona nuestra capacidad de detección de especies minoritarias, introduciendo sesgos en las técnicas genotípicas, que podemos utilizar para la evaluación de antirretrovirales, p. ejem., análisis del uso de correceptores.

El uso de una población estándar de especies VIH nos permitiría evaluar los diferentes sistemas de extracción, y su tolerancia a la hora de detectar la presencia porcentual de dichas especies. Además podríamos establecer si, tras amplificación, los métodos de extracción disponibles, con sus distintas químicas y calidad de nanopartículas, son o no irrelevantes en su aplicación diagnóstica, como a veces parece desprenderse en la literatura científica⁹⁰.

Al disponer de un sistema que permite comparar los rendimientos en la extracción, es posible tratar de mejorar el diseño de las nanopartículas, mejorar los tiempos y las capacidades de los sistemas actualmente disponibles, que marcan los flujos de trabajo en los laboratorios de diagnóstico clínico.

Por estas razones nos proponemos los siguientes objetivos:

1.- Diseñar un estándar basado en construcciones del plásmido pNL4.3, que tiene la estructura genómica del VIH-1, y que usaremos para valorar los procesos de extracción automática y comparar las concentraciones de los ácidos nucleicos extraídos.

2.- Validación y comparación de nanopartículas magnéticas que puedan mejorar los procesos de extracción de ácidos nucleicos en equipos automáticos en uso.

⁹⁰ Delobel P y cols., 2007.

3. MATERIALES

3.1. Aspectos generales

- Todos los procesos fueron realizados con matraces de vidrio o tubos de plástico estériles.
- Las medidas fueron realizados con pipetas de vidrio de 5 o 10 ml o micropipetas con puntas estériles de 0.1 μ l hasta 1000 μ l.
- Todas las medidas de peso fueron realizadas con la balanza electrónica de precisión de marca *Precisa 620 C*.
- El pH ha sido determinado con un indicador universal de pH (pH-indikatorpapier Universal indikator, pH 1-10), Merck.
- Para la construcción de una población estándar de plásmidos (para conseguir el objetivo 1) se utilizó una mezcla de los siguientes pseudotipos:
NL4.3, NL4.3 4254C, NL4.3 4411X, NL4.3 4634X, NL4.3 4696C, como plásmidos circulares, o linearizados mediante corte con enzimas de restricción.
- La extracción de las mezclas se realizó en los siguientes equipos automáticos basados en nanopartículas magnéticas: Ampliprep™ (Roche), Hamilton (Versant® kPCR, Siemens), MagNa Pure Compact™ (Roche).
- Como control se utilizaron columnas QIAmp™ (QIAGEN), que se basan en cartuchos de filtración.
- Las concentraciones de los ácidos nucleicos fueron determinadas por fluorometría Qubit™ (Invitrogen).
- La centrifuga utilizada para precipitar y recuperar las células, para su posterior utilización en la plasmiprep, fue *Labofuge 400 Heraeus*, a 4000 x g por 15 minutos.
- La centrifuga utilizada en las plasmipreps fue Beckman Coulter Alegria 25 R centrifuge, a ≥ 15000 x g por 30 minutos y por 10 minutos.

3.2. El pNL4.3

El estudio molecular del Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1) ha sido facilitado utilizando clones moleculares. Estos clones son plásmidos que contienen el genoma proviral del VIH-1.

El plásmido pNL4.3 de 14.833 pares de bases, es el vector más utilizado en la manipulación en vitro de las secuencias provirales del VIH-1. Estas secuencias son necesarias en varias aplicaciones en la investigación, como por ejemplo los ensayos fenotípicos utilizados para valorar la susceptibilidad del VIH-1 a los medicamentos⁹¹.

Contiene toda la secuencia viral y el gen de resistencia a la ampicilina para el cultivo y selección en bacterias *E. Coli* DH5 α .

Fue obtenido de “NIH AIDS Research and Reference Reagent Program” (Item no. 114).

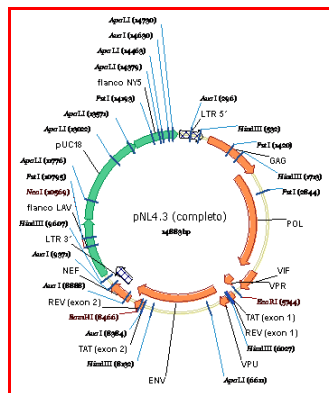


Figura 31: Mapa del pNL4.3.

El enzima Hind III corta el pNL4.3, y genera 5 fragmentos:

- uno de 5758 pb
- uno de 4314 pb
- uno de 2105 pb
- uno de 1475 pb
- uno de 1181 pb.

⁹¹ Abad ML y cols., 2004.

3.3.2. Mutación p4411

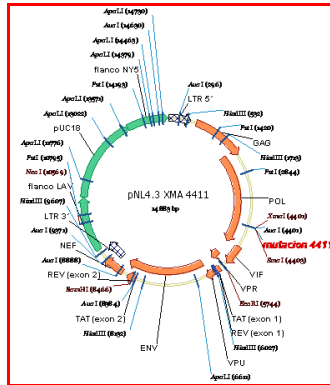


Figura 33: Mutación p4411.

Dicha mutación generó un nuevo y único sitio de restricción para la enzima XMAI.

El fragmento estudiado es APA/XMA de 2405 pb.

3.3.3. Mutación p4696

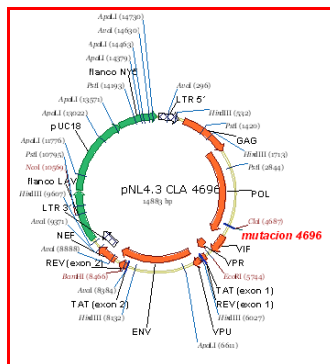


Figura 34: Mutación p4696.

Se generó sólo un nuevo y único punto de restricción para la enzima CLA1.

El fragmento estudiado es APA/CLA de 2690 pb.

3.3.4. Mutación p4634

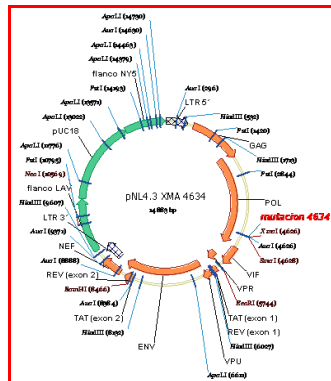


Figura 35: Mutación p4634.

Se genera sólo un nuevo y único punto de restricción para la enzima **ClAI**.

El fragmento estudiado es APA/XMA de 2628 pb.

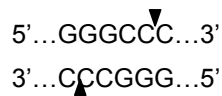
3.4. Enzimas de restricción

Las enzimas que hemos utilizado son:

Enzimas

Punto de corte

Apal (Biolabs)



Clal (Biolabs)



Materiales

Xmal (Biolabs)



Hind III (Roche)



- ✓ **Apal** proviene de una cepa de *E. Coli* que lleva el gen, clonado, *Apal*, proveniente de *Acetobacter pasteurianus sub. Pasteurianus* (ATCC 9432). Está proporcionada en una solución de: 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl a pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 1 mM de ditioneitol, 500 µg/ml de BSA y, 50% de glicerol.
- ✓ **Clal** proviene de una cepa de *E. Coli*, que lleva el gen, clonado, *Clal*, proveniente de *Caryophanon latum L* (ATCC 49862). Está proporcionada en una solución de: 200 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de ditioneitol, 200 µg /ml de BSA y, 50% de glicerol.
- ✓ **Xmal** proviene de una cepa de *E. Coli*, que lleva el gen, clonado, *Xmal*, proveniente de *Xanthomonas malvacearum* (ATCC 9924). Está proporcionada en una solución de: 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de ditioneitol, 200 µg /ml de BSA y, 50% de glicerol.
- ✓ **HindIII** deriva de *Haemophilus influenzae* Rd com- 10. Está proporcionada en una solución de: Tris-HCl, 250 mM de NaCl, 0.1 mM de EDTA, 1mM de dithioerythritol, 0.01 % de polidocanol, 50% de glicerol, con un pH aproximado, a 4°C, de 7.5.

Todas estas enzimas están congeladas a -20°C.

Cuando hicimos el corte con **Apal**, **Clal**, **Xmal**, tuvimos que añadir también el **Buffer NEB 4** y el **BSA-Bovine Serum Albumin**-(que están proporcionados con las enzimas a una concentración de 10x y de 100x respectivamente), mientras cuando trabajamos con la enzima **HindIII** utilizamos el **Buffer B**.

→ El Buffer **NEB 4 1x** (Biolabs) está compuesto por:

- 50 mM de acetato de potasio
- 20 mM de Tris-acetato
- 10 mM de magnesio acetato
- 1 mM de ditioneitol

El pH es 7,9 a 25°C.

→ El **Buffer B 10x** (Biolabs) está compuesto por:

- 10 mM de Tris-HCl
- 100 mM de NaCl
- 5 mM de MgCl₂
- 1 mM de 2- mercaptoetanol

El pH es 8,0 a 37°C.

→ El BSA(Biolabs) está conservado en:

- 20 mM de KPO₄
- 50 mM de NaCl
- 0.1 mM de EDTA
- 5% de glicerol

El pH es 7,0 a 25°C.

También los Buffers y el BSA, están congelados a -20°C.

3.5. Soluciones

Las soluciones, excepto en los casos indicados, las preparamos con agua estéril y apirógena (Grifols[®], C.N. 253054), y las conservamos a temperatura ambiente.

Para otras mezclas, de pequeño volumen, hemos utilizado Agua para inyección (Meinsol[®] 640581.9), suministrada por Fresenius Kabi España, S. A.

Las soluciones más utilizadas en nuestro trabajo de investigación fueron **ampicilina 100 mg/ml, (EtBr) Bromuro de etidio, Etanol absoluto,**

Etanol al 70%, gel de agarosa, TAE 50x, TAE1x, T.E. a pH 8.

- Utilizamos **ampicilina** (Sigma-Aldrich), como sal sódico, conservada en la nevera entre 2°C y 8°C.
- El **bromuro de etidio** (Amresco[®]) lo utilizamos en solución, a una concentración de 0.625 mg/ml.
- El **Etanol absoluto** utilizado fue producido por Merck y conservado a temperatura ambiente.
- La **agarosa** utilizada fue producida por Sigma-Aldrich y conservada a temperatura ambiente.

3.5.1. Medios de cultivo

Hemos utilizado dos tipos de medio de cultivo: **LB Broth, Lennox** (DifcoTM), para la fase a medio líquido para miniprep y plasmiprep, y **LB Agar, Lennox** (DifcoTM), para la fase a medio sólido para miniprep. (Los dos están suministrados por Becton, Dickinson and Company).

A ambos les añadimos 500 µl de ampicilina (obtuvimos así LB-A), de concentración 100 mg/ml; nuestros plásmidos llevan el gen de resistencia a dicho antibiótico y de esta manera pudimos seleccionar el crecimiento de aquellas bacterias que tenían el plásmido incorporado.

➔ La composición de **LB Broth, Lennox** (DifcoTM), por litro de disolución es:

- | | |
|---------------------------|------|
| - Triptona | 10g |
| - Extracto de levadura | 5.0g |
| - Cloruro de Sodio (NaCl) | 5.0g |

El pH final es 7±0.2.

➔ La composición de **LB Agar, Lennox** (DifcoTM), por litro de disolución es:

- | | |
|------------|-----|
| - Triptona | 10g |
|------------|-----|

- Extracto de levadura 5.0g
- Cloruro de Sodio (NaCl) 5.0g
- Agarosa 15g

El pH final es 7 ± 0.2 .

3.6. Partículas Magnéticas

Hemos utilizado varios tipos de partículas magnéticas de tamaños y composiciones diferentes: FeO-2202-W, TEOS-07B, TEOS-07, FeO-2204-W, FeO-2207-APS, FeO-2206-W 5 mg/ml, FeO-2206-APS, FeO-2206-W 10mg/ml, producidas por Nanogap (www.nanogap.es).

Hemos comparado los resultados obtenidos en la extracción manual utilizando columnas QIAmp™ (QIAGEN), con otros sistemas automáticos como el Ampliprep™ (Roche), el Hamilton (Versant® kPCR, Siemens), el MagNa Pure Compact™ (Roche).

3.6.1. Partículas FeO-2202-W

Son nanopartículas de magnetita que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** 17 ± 4 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 13,33 (TMAOH);
- **Concentración:** 1,95% wt/wt;
- **Color:** negro;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1 g/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

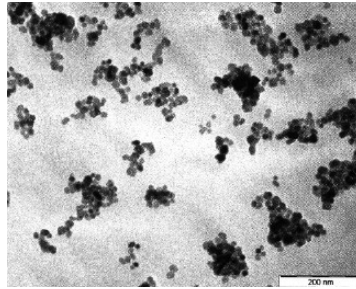


Figura 36: Imágen TEM (transmission electron microscopy) de las partículas FeO-2202-W.

3.6.2. Partículas TEOS-07B

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** 41 ± 6 nm, con un core de 8 ± 2 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 8.4 (NH_4OH);
- **Concentración:** 35 mg/ml (con un 5-6% de óxido de hierro y un 94-95% de sílica);
- **Color:** marrón;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1 g/ml;
- **Densidad de las partículas:** $\approx 1.5 \times 10^{15}$ partíc/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

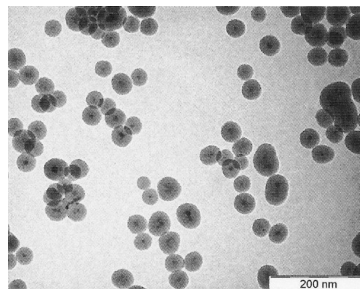
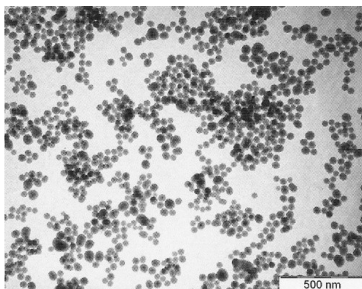


Figura 37 y Figura 38: Imágenes TEM de las partículas TEOS-07B.

3.6.3. Partículas TEOS-07

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** 20 ± 4 nm, con un core de 8 ± 2 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 9.9 (NH_4OH);
- **Concentración:** 10 mg/ml (con un 25-30% de óxido de hierro y un 70-75% de sílica);
- **Color:** marrón oscuro;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1 g/ml;
- **Densidad de las partículas:** $\approx 2.2 \times 10^{15}$ partíc/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

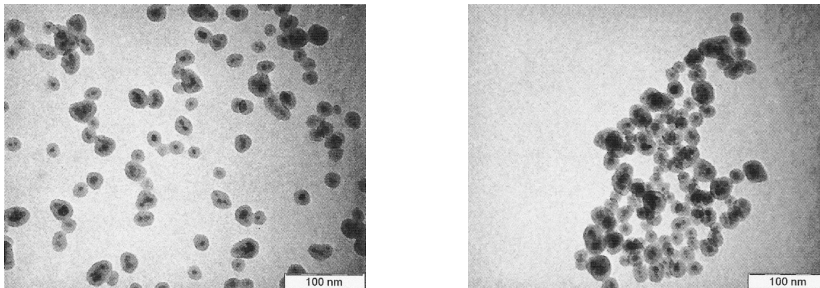


Figura 39 y Figura 40: Imágenes TEM de las partículas TEOS-07.

3.6.4. Partículas FeO-2204-W

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de PAA que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** $10,5 \pm 4$ nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 10;
- **Concentración:** 20,2 mg/ml;
- **Color:** negro;

Materiales

- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1 g/ml;
- **Densidad del las partículas:** $\approx 5,25 \times 10^{18}$ partíc/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

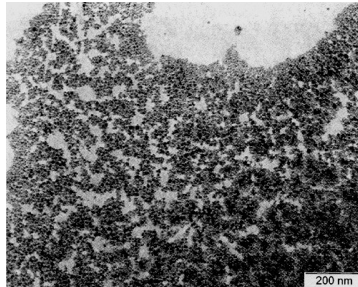


Figura 41: Imagen TEM de las partículas FeO2204-W.

3.6.5. Partículas FeO-2207-APS

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica y funcionalizadas con APS; tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** 47 ± 4 nm, con un core de $10,5 \pm 3$ nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 9.40;
- **Concentración:** 24,86 mg/ml;
- **Color:** marrón;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1,01 g/ml;
- **Densidad del las partículas:** $\approx 1,71 \times 10^{17}$ partíc/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

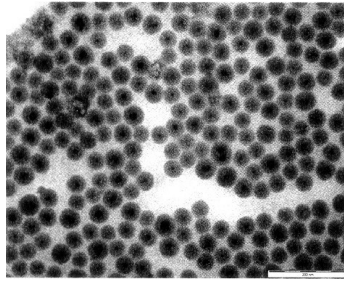


Figura 42: Imagen TEM de las partículas FeO2207-APS.

3.6.6. Partículas FeO-2206-W 5 mg/ml

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** 26 ± 3 nm, con un core de 10 ± 2 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 8,66;
- **Concentración:** 5,25 mg/ml;
- **Color:** marrón oscuro;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 0,99 g/ml;
- **Densidad de las partículas:** $\approx 2,04 \times 10^{17}$ partíc/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

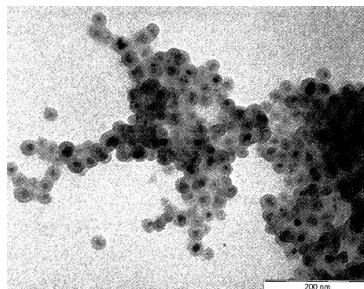


Figura 43: Imagen TEM de las partículas FeO2206 5mg/ml.

3.6.7. Partículas FeO-2206-APS

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** $24,2 \pm 3,4$ nm, con un core de 10 ± 2 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 8,22;
- **Concentración:** 4,99 mg/ml;
- **Color:** marrón oscuro;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1,00 g/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

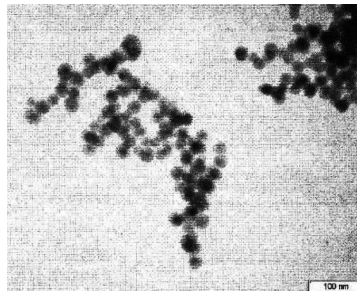


Figura 44: Imagen TEM de las partículas FeO2206-APS.

3.6.8. Partículas FeO-2206 10 mg/ml

Son nanopartículas de magnetita recubiertas de sílica que tienen las siguientes características:

- **Tamaño:** $20,7 \pm 3,1$ nm, con un core de 10 ± 2 nm;
- **Forma del producto:** disperso en agua, pH= 9,08;
- **Concentración:** 10,45 mg/ml;
- **Color:** marrón oscuro;
- **Volumen:** vienen en botes de 5 ml;
- **Densidad del producto:** 1,00 g/ml.

Se guardan a temperatura ambiente.

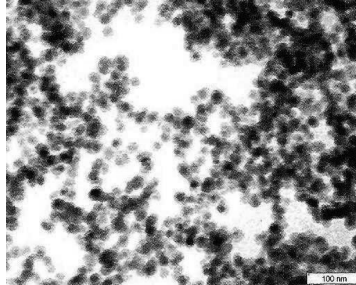


Figura 45: Imagen TEM de las partículas FeO2206 10 mg/ml.

3.6.9. Aspectos generales de las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens)

Son partículas pequeñas ($< 1\mu\text{m}$)⁹² y homogéneas, pero son mucho más grandes que las de Nanogap. Tienen un elevado porcentaje de hierro, un paramagnetismo muy bueno y se pueden guardar quedándose estables.

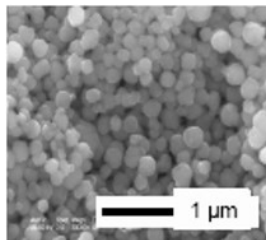


Figura 46: Imagen de las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens).

⁹² Hennig G, 2008.

4. MÉTODOS

4.1. Mutagénesis *in vitro* del gen pol

Se analizó, con el programa Omega, el genoma del pNL4.3 y se comprobó la no existencia de sitios de restricción para varias enzimas:

Ascl, *BstEII*, *BtrI*, ***ClaI***, *Eco47III*, *FseI*, *I-CeuI*, *Dmol*, *I-PpoI*, *I-SceI*, *MluI*, *NotI*, *NruI*, *PacI*, *PI-PspI*, *PI-SceI*, *PI-TliI*, *PmeI*, *RsrII*, *SacII*, *SexAI*, *SfiI*, *SgfI*, *SgrAI*, ***SmaI***, *SnaBI*, *SrfI*, *XbaI*, *XmaIII*.

La secuencia ***ClaI*** reconoce la secuencia **AT/CGAT**, dejando el corte una cola de 2 bases. La secuencia ***XmaI*** (isoquízómero de *SmaI*), reconoce la secuencia **C/CCGGG** y el corte produce una sola cola de 4 bases.

- En el primer ensayo se introdujeron las secuencias ***ClaI*** y ***XmaI*** en el gen pol del pNL4.3.
- Se diseñaron los primers mutagénicos:

Cla4080R: CTGGTTGTGCTTG**ATCGAT**TCCCAATGC

(gcattggga**atcgat**caagcacaaccag)

Xma4636R: TGCTTGATC**CCCGGG**CACCAACAG

(ctgttggtg**cccggg**gatcaagca)

Procedimiento propuesto:

- Obtención del fragmento POL3 (3797 pb) utilizando los primers **1548F/5344R**;
- Introducción en el vector PCRII TOPO, después de la base 336. Se obtienen el plásmido **TOPO-POL3** (7737 pb), y otro con inserto en orientación contraria.

La orientación se determina por digestión con:

<i>EcoRV</i>	5363+2384	(6296+1451)
<i>PstI</i>	4053+2517+1167	(5272+1308+1167)
<i>KpnI</i>	5086+2333+328	(6179+1240+328)
<i>HindIII</i>	7522+225	(4059+3688)

- Se introducen las mutaciones *Cla* y/o *XmaI* con los primers *Cla4080R* y *Xma4636R*. Se obtendrán los plásmidos **TOPO-C** (***ClaI***), **TOPO-X** (***XmaI***) y **TOPO-CX** (***ClaI*** y ***XmaI***);
- Se extrae el cassette ***Apal/PfIMI*** y se reintroduce en el pNL4.3.

Las dos mutaciones, ***Cla*** y ***Xma***, resultaron inconvenientes e infructuosas.

Métodos

Todas las transformaciones se realizaron en la cepa hospedadora **DH5 α MCR/37°C**. Si bien se obtuvieron clones transformantes que llevaban la mutación **Xma**, todos ellos contenían plásmidos recombinados de aproximadamente **6 kb**, que no mostraban el patrón de restricción característico pNL4.3/HindIII. Se obtuvieron también clones que, aunque no llevaban la mutación **Xma**, mostraban deleciones semejantes. Se comprobó, finalmente, que también las transformaciones con el plásmido intacto originaban, muchas veces, estos plásmidos deleccionados.

Se cambió la estrategia de transformación utilizando la cepa *E. Coli* DH5 α (Invitrogen). Esta cepa evita la recombinación en los plásmidos inestables (como los que contienen LTRs). Siempre que porte el plásmido, el crecimiento de la cepa se realizó a 30°C. Se minimizaron así los procesos de recombinación y se evitan las deleciones en el plásmido.

En un primer ensayo de transformación se obtuvieron varios clones que se ensayaron y que llevaban el plásmido pNL4.3, con la mutación **Xmal**.

El plásmido se rebautizó con la denominación **pNL4.3 4634X**.

Si analizamos con detalle la estructura del gen **pol** se puede observar que la mutación **Xma4634** tiene también ciertos inconvenientes: introduce 2 cambios consecutivos de codones en la secuencia de aminoácidos de la poliproteína POL (Trp-Ala -> Cys-Pro).

Los cambios son en el 4625 y en el 4626.

Aminoácidos antiguos (pNL4.3)

aminoácidos nuevos

(mutación.4634)

TGG→ Trp

TGC→Cys

GCG→Ala

CCG→Pro

- Estos cambios pueden modificar la actividad de la RT y la resistencia a los antirretrovirales.
- Hacen el virus aparentemente no infeccioso, por lo tanto no lo podemos utilizar en nuestros estudios de antirretrovirales, sin embargo el que sea defectivo hace que nos valga como control negativo de infección.

4.2. Generación de secuencias de restricción que no afecten la secuencia de aminoácidos de POL

La generación de secuencias únicas de restricción en el gen *pol* del pNL4.3, que permitan la inserción posterior de este gen, extraído de pacientes, se puede realizar siguiendo 2 estrategias:

1-buscar los lugares más idóneos centrándonos exclusivamente en la similitud de bases, de manera que la mutagénesis produzca el menor número de cambios posible en la secuencia de nucleótidos;

2-buscar estos lugares por similitud de los aminoácidos que resultan de la traducción de los tripletes (si es necesario, cambiando más bases, pero sin cambiar los aminoácidos).

La primera estrategia nos permite probablemente elaborar primers mutagénicos y primers para PCR que funcionen mejor. Sin embargo no nos garantiza la conservación de la secuencia de los aminoácidos, siendo muy probable que se produzca algún cambio no deseado en esta secuencia.

La segunda puede resultar más compleja y, dado que algún aminoácido es codificado hasta por 6 tripletes distintos, puede requerir modificaciones mayores en la secuencia de nucleótidos, pero nos garantiza la formación de la proteína original.

Ahora bien, cuantos más cambios de bases introduzcamos, estaremos facilitando, en sucesivas infecciones, la emergencia de nuevos fenotipos víricos originales (si las bases introducidas afectan indirectamente a mutaciones naturales que tengan lugar en otros sitios del genoma).

Veamos cómo se aplica esta estrategia a la generación de secuencias *ClaI* y *XmaI* en el gen *pol*.

4.2.1. Secuencia *Clal*

4.2.1.1. Mutación p4254

Si se lee desde la primera base la secuencia *Clal* (ATC GAT) contiene dos codones: **ATC** y **GAT**, que codifican isoleucina (I), y aspártico (D) respectivamente.

Buscamos la presencia de **ID** en la secuencia de aminoácidos de pol y observamos que es codificada por los tripletes que comienzan en el nucleótido 4242.

4242	ATA G AT	ATC GAT	(1 cambio)
------	-----------------	----------------	------------

En este caso es fácil generar la secuencia *Clal* simplemente cambiando una base sin modificar la secuencia de los aminoácidos ya que los codones ATA y ATC codifican por isoleucina.

El plásmido se rebautizó con la denominación **pNLC 4254**.

Primers propuestos:

Cla4254R	G GGC CTT ATC gAT TCC ATC TAA
----------	--------------------------------------

4.2.1.2. Mutación p4696

Si se lee desde la segunda base, la secuencia *Clal* (ATC GAT) se genera con los tripletes NNA TCG y ATN. El segundo triplete (TCG) codifica por serina (S) y el tercer puede codificar por isoleucina (I) o metionina (M). Buscamos en la secuencia de aminoácidos de pol la presencia de S I o S M. Dichas secuencias aparecen en los tripletes que comienzan en las bases: 2949, 3036, 3684 y 4686:

2949	CCT AGT ATA	CCA TCG ATA	(4 cambios)
3036	TGT AGC ATG	TGA TCG ATG	(codón STOP)
3684	GAA AGC ATA	GAA TCG ATA	(3 cambios)
4686	GAA TCT T ATG	GAA TCG ATG	(1cambio)

En este caso también se generara la secuencia *Clal* cambiando una base sin modificar la secuencia de los aminoácidos ya que los codones TCT y TCG codifican por serina.

El plásmido se rebautizó con la denominación **pNLC 4696**.

Primers propuestos:

Cla4696R TT ATT **CAT cGA** TTC TAT TAC

4.2.2. Secuencia Xmal

4.2.2.1. Mutación p4411

En el caso de la secuencia Xmal (CCCGGG), tanto al comenzar los tripletes por la primera (CCC GGG) como por la segunda base (NNC CCG GGN), los aminoácidos codificados son prolina (P) y glicina (G). Al analizar la secuencia pol encontramos la secuencia P G en el nucleótido 4401: CCA GGA:

4401 AGC CCA **G** GGA ATA AGC **CCG GGA**ATA (1 cambio)

Se generara la secuencia Xmal cambiando una base sin modificar la secuencia de los aminoácidos ya que los codones CCA y CCG codifican por prolina.

Si se lee desde la tercera base, la secuencia Xmal se genera con los codones NCC CGG GNN, es decir, la combinación de los aminoácidos: T, P, A, S, R, E, D, A, G, V. La combinación A R E aparece en el triplete que comienza en la base 2121, y la combinación T R A aparece en el triplete que comienza en 2145. Ambos muy cerca del comienzo del gen **pol**. La combinación S R D, comienza en la base 4917 e implica el siguiente cambio:

4917 **AGC AGA** GAT **TCC CGG** GAT (4 cambios)

El plásmido se rebautizó con la denominación **pNLX 4411**.

Primer propuesto:

Xma4411R CA TAT **TCC cGG** GCT ACA GTC

Para introducir estas secuencias se propuso este procedimiento:

- Mutagénesis en TOPO-POL3. Se obtienen los siguientes vectores:
 - TOPO-C4254
 - TOPO-C4696
 - TOPO-X4411

Métodos

- Se extrae el casete **Apal/PfIMI** y se reintroduce en pNL4.3.
- Se obtendrán los plásmidos **pNLC4254**, **pNLC4696**, **pNLX4411** (o **pNL 4.3 4254C**, **pNL4.3 4696 C**, **pNL4.3 4411X**).

4.3. Preparación de Soluciones

4.3.1. Ampicilina (100 mg/ml)

Para preparar una solución de ampicilina de concentración 100 mg/ml, pesamos 0.60g de Ampicilina (Sigma-Aldrich), y disolvemos en 6 ml de Agua inyectable (Meinsol[®]). De esta manera obtuvimos una cantidad suficiente por 12 alícuotas de 500 µl cada una, que guardamos en tubos Eppendorf y congelado a -20°C.

4.3.2. Etanol al 70%

Hemos utilizado 70 ml de Etanol Absoluto (Merck), y 30 ml de agua destilada (Grifols[®]), y guardado a temperatura ambiente.

4.3.3.TAE 50x

Para preparar un litro de TAE 50x hemos disuelto:

- Tris Acetato (0.4 M) 242 g
- Acido Acético 57.1 ml
- EDTA (0.5 M) 100 ml

y guardado a temperatura ambiente.

4.3.4. TAE 1x

Para preparar un litro de TAE 1x hemos mezclado 980 ml de agua destilada (Grifols[®]) y 20 ml de TAE 50x, y guardado a temperatura ambiente.

4.3.5. T.E.

Para preparar 50 ml de T. E. a pH 8 hemos mezclado:

- Tris-Clorídrico (1 M) 500 µl
- EDTA (0.5 M) 100µl
- Agua destilada (Grifols®) 49.4 ml

y guardado a temperatura ambiente.

4.4. Logro del objetivo 1

4.4.1. Construcción del estándar de plásmidos

Para obtener una población estándar de plásmidos hemos utilizado una mezcla de los cinco plásmidos ya mencionados:

pNL4.3, pNL4.3 4254C, pNL4.3 4411X, pNL4.3 4634X, pNL4.3 4696C.

Esta mezcla de construcciones se pudo obtener como:

- plásmidos circulares (pNL4.3, pNL4.3 4254C, pNL4.3 4411X, pNL4.3 4634X, pNL4.3 4696C);
- plásmidos linearizados (mediante corte común con Apa I);

4.4.2. Obtención de los plásmidos

4.4.2.1. Fase a medio solido para miniprep

El primer paso es preparar la fase a medio solido.

Hemos disuelto 17,5 g de **LB Agar**, Lennox (Difco™) en 500 ml de agua destilada (Grifols®), y sometido a esterilización en autoclave; dejamos atemperar pero sin que se solidifique, y añadimos 500 µl de ampicilina con concentración de 100 mg/ml (así obtuvimos LB Agar-Ampicilina). Antes de que se solidifique, vertemos el medio así preparado en las Placas de Petri y dejamos solidificar a temperatura ambiente. Las conservamos en la nevera ente 2 y 8°C.

4.4.2.2. Sembrar las Placas de Petri

En las Placas Petri sembramos las bacterias, que tienen integrado el respectivo plásmido (en cada placa un plásmido distinto), a partir de stocks en glicerol de estas bacterias que están guardados a -80°C. Las dejamos toda la noche en estufa a 37°C.

4.4.2.3. Fase a medio líquido para miniprep y plasmiprep

Hemos disuelto 10 g de **LB Broth**, Lennox (Difco™), en 500 ml de agua destilada (Grifols®), y sometido a esterilización en autoclave. Dejamos atemperar y añadimos 500 µl de Ampicilina de concentración 100 mg/ml (obtuvimos así LB-A).

4.4.2.4. Miniprep

A este punto pudimos escoger de la Capsula de Petri, una a una, cuatro colonias de cada plásmido y verter, por separado, en tubos que contenían ~4 ml de LB-A. Así, hemos preparado 4 tubos por cada plásmido.

Estos tubos los dejamos toda la noche en agitación en estufa a 37°C. Al día siguiente realizamos la miniprep utilizando el protocolo por la preparación de ADN plasmídico de NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel, Cultek), por el protocolo véase **ANEXO IV**. Con el método NucleoSpin® Plasmid, las bacterias precipitadas por centrifugación se resuspenden (Buffer A1) y el DNA plasmídico se libera desde las células *E. Coli* por lisis SDS/alcalina (Buffer A2)⁹³. El Buffer A3 neutraliza el lisado y crea las condiciones apropiadas para que el DNA se una a la membrana de sílica de la columna NucleoSpin® Plasmid. Las proteínas precipitadas, el DNA genómico y los restos celulares se centrifugan, y el sobrenadante se pone en la columna NucleoSpin® Plasmid.

⁹³ Machery-Nagel, 2009.

Con este tipo de kit, las contaminaciones (sales, metabolitos, componentes celulares macromoleculares) se eliminan con un simple lavado con el Buffer A4, al que se le añadió etanol. El DNA plasmídico puro es eluido bajo fuerzas iónicas débiles con el Buffer alcalino AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

4.4.2.5. Cortes con enzimas de restricción

Para comprobar las minipreps y plasmipreps, hemos utilizado cortes específicos con las enzimas de restricción. Por cada plásmido hemos preparado una mezcla específica.

→ Por el pNL 4.3 hemos utilizado:

- pNL 4.3 10 µl
- Agua (Meinsol[®]) 10 µl
- Buffer B 2.5 µl
- **Hind III** 0.5 µl

→ Por el p4254 hemos utilizado:

- p4254 10 µl
- Agua (Meinsol[®]) 10 µl
- NEB4 2.5 µl
- BSA 2.5 µl
- **Apal** 0.1 µl
- **ClaI** 1 µl

→ Por el p441 hemos utilizado:

- p4411 10 µl
- Agua (Meinsol[®]) 10 µl
- NEB4 2.5 µl

Métodos

- BSA 2.5 μ l
- **Apal** 0.1 μ l
- **Xmal** 1 μ l

→ Por el p4696 hemos utilizado:

- p4696 10 μ l
- Agua (Meinsol[®]) 10 μ l
- NEB4 2.5 μ l
- BSA 2.5 μ l
- **Apal** 0.1 μ l
- **Clal** 1 μ l

→ Por el p4634 hemos utilizado:

- p4634 10 μ l
- Agua (Meinsol[®]) 10 μ l
- NEB4 2.5 μ l
- BSA 2.5 μ l
- **Apal** 0.1 μ l
- **Xmal** 1 μ l

Para que las enzimas actúen dejamos las mezclas en un baño a 37°C, por ~1.30-2h.

4.4.2.6. Gel de agarosa

Para comprobar el corte con las enzimas de restricción, hemos utilizado el gel de agarosa, que preparamos añadiendo 0.5 g de Agarosa (Sigma-Aldrich) a 50 ml de TAE 1x. Este preparado lo pusimos por ~ 2 minutos al microondas para poderlo disolver. Cuando atemperó añadimos una gota

del colorante BrEt (Amresco®) y dejamos solidificar en la nevera, con un peine que nos marca los pocillos donde cargaremos las muestras.

Una vez solidificado, y al pasar ~ 2 horas (tiempo necesario para que los enzimas actúen en el baño 37°C), pusimos el gel en un aparato de electroforesis horizontal y cargamos las muestras en los pocillos.

En nuestros experimentos hemos mezclado 10 µl de muestra con 2.5 µl de tampón de carga (Sample Loading Buffer 5x, Biorad), guardado a temperatura ambiente.

En un solo pocillo hemos cargado 2x2.5 µl de marcador de peso molecular (HyperLadder I 100 lines, Bioline), guardado en la nevera entre 2 y 8°C.

A este punto empezamos la electroforesis a 70 V y 500 mA, por 1.40 h.

Para visualizar el gel hemos utilizado luz ultravioleta en un transiluminador, con el software Quantity One.

El marcador de peso molecular produce 14 bandas distanciadas en un rango entre 200 pb y 10.000 pb. El tamaño de cada banda es un múltiplo exacto de 100 pb.

Las bandas más intensas (y que permiten una muy fácil identificación) son la de 1.000 pb y la de 10.000 pb.

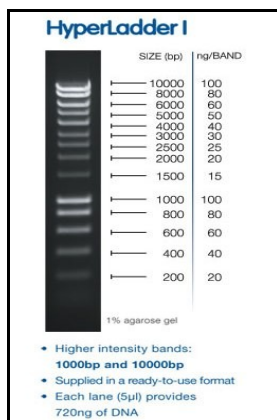


Figura 47: Bandas visualizadas con HiperLadderI.

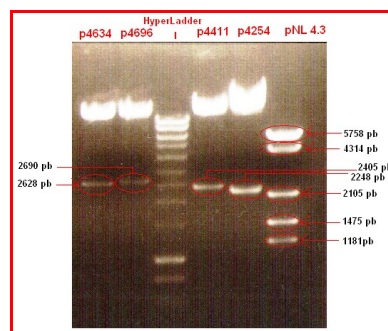


Figura 48: Ilustración de los cinco plásmidos con sus bandas características.

4.4.2.7. Plasmiprep

Después de haber comprobado los resultados de las minipreps (mediante cortes con enzimas de restricción), pudimos proceder a la producción de los plásmidos (pasmiprep), siguiendo el protocolo por la purificación del ADN plasmídico de QIAGEN® (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). (Por el protocolo de la plasmiprep véase, **ANEXO V**). El kit de QIAGEN por la purificación del DNA plasmídico, se basa en una resina patentada por QIAGEN, de elevada selectividad⁹⁴. El principio de la técnica es el intercambio aniónico.

Se verifica primero una lisis alcalina, seguida por la unión del DNA plasmídico a la resina de intercambio aniónico, bajo débiles condiciones salinas y de pH. RNA y proteínas precipitan y las impurezas de bajo peso molecular se eliminan con un lavado de concentración salina intermedia. El DNA plasmídico es eluido con un Buffer a elevada concentración salina y luego desalado por precipitación en isopropanol.

Lavamos con etanol al 70 %, y dejamos secar.

Resuspendemos en 1 ml de TE (pH 8).

También después de la plasmiprep fue importante asegurarnos de haber producido los plásmidos correctos. Volvimos a cortar con las enzimas de restricción, como hicimos después de la miniprep.

4.4.3. Valoración basal de la extracción.

Los plásmidos así producidos y resuspendidos en TE, están listos para ser utilizados.

La extracción de las mezclas las realizamos en los siguientes equipos automáticos, basados en nanopartículas magnéticas: Ampliprep™ (Roche), Hamilton (Siemens), MagNa Pure Compact™ (Roche); como control hemos utilizado columnas QIAmp™ (QIAGEN), que se basan en cartuchos de filtración.

⁹⁴ QIAGEN, 2005.

Para cada caso establecimos condiciones iguales de operación.

El rendimiento en cuanto a concentración lo establecimos por fluorometría Qubit™ (Invitrogen). (Véase **ANEXO I**).

Para los principios de funcionamiento de estos sistemas de extracción véase **ANEXO II**.

4.5. Capacidad de recuperación de especies minoritarias

Cambiando las condiciones de la mezcla de construcciones de NL4.3, diluyendo seriadamente tres de los plásmidos, hemos tratado de ver la tolerancia de los distintos métodos para la recuperación de las cuatro diferentes especies por pirosecuenciación.

4.5.1. Análisis de integridad

El factor que previsiblemente condiciona el proceso de extracción de una forma más evidente es la fragmentación de los ácidos nucleicos por agitación, en los procesos de lavado y cambio de reactivos del proceso automatizado. Para valorar si este es un proceso aleatorio o no y la importancia en la recuperación de las especies minoritarias hemos realizado un análisis de este proceso en tres pasos:

- **Transformación de E. coli DH5α;**
- **Análisis clonal** (seleccionamos al menos 20 minipreps de las colonias transformadas) utilizando cortes con las enzimas de restricción seleccionadas (Apa I, Xma I y Cla I)
- **Pirosecuenciación** (Véase también **ANEXO III**).

Este procedimiento es alternativo y más rápido que el análisis con cortes por enzimas de restricción; lo realizamos en un pirosecuenciador PyroMark™ (ISOGEN).

Las secuencias de los primers diseñados para la caracterización de los SNPs de nuestra población VIH fueron las siguientes:

4.5.1.1. Secuencias de los primers usados en la pirosecuenciación

SET 1:

F1 (biotinilado): ACA AAG GAA TTG GAG GAA ATG AAC

R1: CTC ATG TTC TTC TTG GGC CTT AT

S1 (←): TTC TTC TTG GGC CTT A Secuencia a analizar: TCG/T ATT
CCA TCT AAA AAT AGT ACT TTC C

SET 1.2:

F1 (biotinilado): ATG TCA GCT AAA AGG GGA AGC C

R1: GCT GTT TCT TGC CCT GTC TCT

S1(←): TCT AGC TGC CAT ATT CC

Secuencia a analizar: C/TGG GCT ACA GTC TAC TTG TCC ATG CA

SET 1.3:

F1: TAC AGA CAA TGG CAG CAA TTT CAC

R1 (biotinilado): ATG CCA AAT TCC TGC TTG ATC C

S1 (→): TTA AGG CCG CCT GTT

Secuencia a analizar: GGT G G/C G/C C GGG GAT CAA GCA GGA ATT
TGGC

SET 1.4:

F1: AGC AGA GAC AGG GCA AGA AAC A

R1 (biotinilado): CTG CCA TTT GTA CTG CTG TCT TAA

S1 (→): AGT CAA GGA GTA ATA GAA TC

Secuencia a analizar: T/G ATG AAT AAA GAA TTA AAG AAA ATT A

4.5.1.2. Resultados de la pirosecuenciación

Los resultados de la secuenciación de cada plásmido, por separado y con los distintos juegos de primers, utilizando el pirosecuenciador fueron los siguientes:

pNL 4.3 - S1 TCT ATT CCA TCT AAA

p4411 -S1 TCT ATT CCA TCT AAAAAT A
 p4254 -S1 TCG ATT CCA TCT AAAAAT AG
 p4634 -S1 TCT ATT CCA TCT AAAAAT A
 p4696 -S1 TCT ATT CCA TCT AAAAAT A

pNL 4.3 - S1.2 TGG GCT ACA GTC
 p4411 - S1.2 CGG GCT ACA GTC
 p4254 S1.2 TGG GCT ACA GTC
 p4634 - S1.2 TGG GCT ACA GTC
 p4696 - S1.2 TGG GCT ACA GTC

pNL 4.3 -S1.3 GGT GGG CGG GGA TCA AGC A
 p4411 -S1.3 GGT GGG CGG GGA TCA AGC A
 p4254 -S1.3 GGT GGG CGG GGA TCA AGC A
 p4634 -S1.3 GGT G**CC** CGG GGA TCA AGC A
 p4696 -S1.3 GGT GGG CGG GAT CAA GCA

pNL 4.3 - S1.4 TAT GAA TAA AGA ATT AAA GAA
 p4411 - S1.4 TAT GAA TAA AGA ATT AAA GAA
 p4254 S1.4 TAT GAA TAA AGA ATT AAA GAA
 p4634 - S1.4 TAT GAA TAA AGA ATT AAA GAA A
 p4696 - S1.4 GAT GAA TAA AGA ATT AAA GAA

Se hizo la mezcla de los plásmidos a igual concentración, y se pirosecuenció por SNP. Los resultados preliminares obtenidos al analizar una mezcla de las construcciones y previos al proceso de extracción, analizando por cuantificación (AQ mode), fueron los siguientes:

Mezcla con SET 1:

T=83.2%; **G=16.8%**.

Mezcla con SET 1.2:

T=83.7%; **C=16.3%**.

Mezcla con SET 1.3:

Diseñando un programa que nos informa solo el porcentaje de la segunda mutación: G: 66.7%; C: **33.3%**

Mezcla con SET 1.4:

T:68.2%; **G=31.8%**

Estos resultados indicaron la posibilidad práctica de detectar las mutaciones realizadas en los diferentes VIH utilizados.

4.6. Logro del objetivo 2

Establecidas las condiciones de funcionamiento de los procedimientos de extracción automática magnética, al uso con las técnicas de detección para VIH habituales en los laboratorios de Microbiología, y manteniendo la química convencional de extracción (que se basa en una reacción caotrópica, un proceso de absorción, sucesivos lavados y elución), procedimos a cambiar el proceso de absorción a las nanopartículas magnéticas.

Para la obtención de nanopartículas hemos utilizado como recurso nuestra relación con Nanogap (www.nanogap.es).

4.6.1. Síntesis de las nanopartículas (MNPs)

Fabricamos MNPs de MFe_2O_4 , donde $M = Fe$. Se procuró especialmente obtener una distribución monodispersa en tamaños (dentro del rango de 10 – 50 nm), y formas (esférica).

Todas las partículas (tanto las recubiertas con silica, como las con PAA, como también las funcionalizadas con APTS) que hemos utilizado en este estudio fueron sintetizadas basándose en el método de la microemulsión inversa⁹⁵ (ver Figura 49).

⁹⁵ Yi DK y cols., 2006.

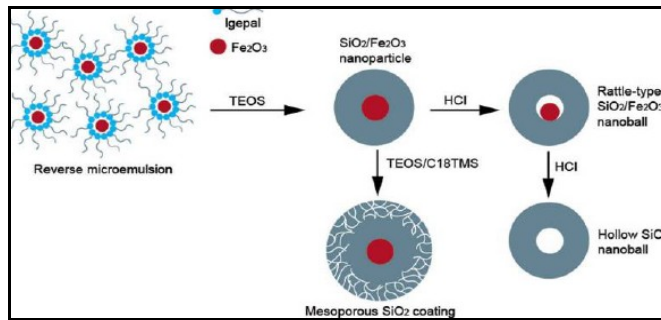


Figura 49: Representación esquemática para producir nanopartículas recubiertas de sílica utilizando el método de la microemulsión inversa (Yi DK y cols., 2006).

4.6.2. Revestimientos de las nanopartículas: (C@S NPs)

Hemos desarrollado diferentes materiales de cobertura sea inorgánicos que orgánicos, como también funcionalizado las nanopartículas.

- Las cubiertas inorgánicas, suelen tener buenas propiedades como la resistencia al calor y química, buena superficie y fuerza mecánica. Además sus dispersiones en medios biológicos son estables y evitan aglomerados. Utilizamos NPs cubiertas con sílica.

-Las cubiertas orgánicas se basan en el uso de polímeros y copolímeros. En este estudio hemos utilizado el ácido poliacrílico (PAA).

-Para funcionalizar las nanopartículas se eligieron silanos organofuncionales; se utilizó el aminopropiltriétoxissilano (APTS).

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos generales

Para la realización de todos los experimentos, hemos trabajado con una solución, compuesta de los cinco plásmidos en partes iguales, que utilizamos como estándar:

pNL4.3, pNL4.3 4254C, pNL4.3 4411X, pNL4.3 4634X, pNL4.3 4696C.

Hemos ajustado la concentración inicial a un valor deseado, utilizando T.E. A partir de este valor hemos efectuado varias diluciones (siempre con T.E), según el tipo de experimento en cuestión.

Como sistemas automáticos de extracción hemos utilizado el Ampliprep™ (Roche), el Hamilton (Siemens), el MagNa Pure Compact™ (Roche); como control utilizamos columnas QIAmp™ (QIAGEN) que se basan en cartuchos de filtración.

5.2. Evaluación de la extracción en el Ampliprep™ (Roche)

Utilizamos como aparato de detección el Ampliprep™; queremos evaluar los rendimientos de la extracción.

Empezamos con una concentración de plásmido de ~ 400 µg/ml para llegar a una concentración de ~ 0,12 µg/ml, con progresivas diluciones 1:2 con T.E.; obtuvimos así 12 muestras (que van de A1 a A12) listas para ser introducidas en este sistema automático.

El Ampliprep™ necesita de un volumen de muestra de ~ 400 µl, pero utiliza solo ~ 210 µl.

El volumen de elución es de ~ 65-70 µl.

Para poder comprobar los rendimientos hicimos varias replicas de este experimento.

Extracción 1:

	[µg /ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 210 µl	µg /ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS EN 70 µl	RENDIMIENTO %
A1	423,33	88,90	6,283	0,4398	0,49
A2	202,00	42,42	5,243	0,3670	0,87
A3	94,57	19,86	5,013	0,3509	1,77
A4	44,67	9,38	3,340	0,2338	2,49
A5	21,33	4,48	1,790	0,1253	2,80
A6	10,47	2,20	0,757	0,0530	2,41
A7	4,88	1,02	0,305	0,0214	2,09
A8	2,52	0,53	0,167	0,0117	2,22
A9	1,27	0,27	0,101	0,0071	2,66
A10	0,57	0,12	0,052	0,0036	3,02
A11	0,25	0,05	0,034	0,0023	4,42
A12	0,11	0,02	0,018	0,0013	5,39

Tabla 2: Extracción automática en el Ampliprep.

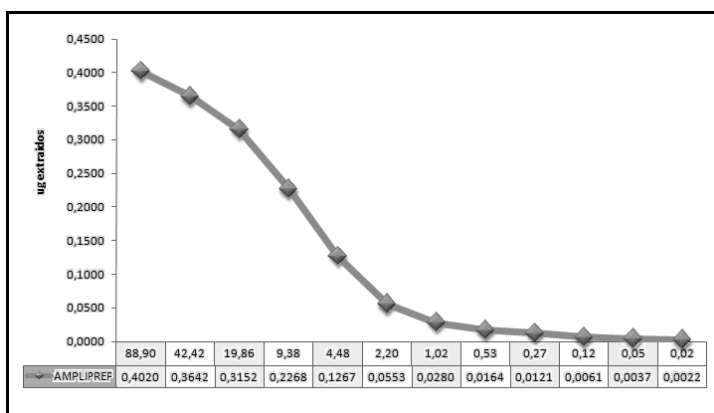


Gráfico 1: Ilustración de la extracción automática en el Ampliprep.

Se puede observar que los rendimientos de la extracción mejoran a bajas concentraciones de muestra.

Extracción 2:

	[µg /ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 210 µl	µg /ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS EN 70 µl	RENDIMIENTO %
A1	423,33	88,90	6,283	0,4398	0,49
A2	202,00	42,42	5,243	0,3670	0,87
A3	94,57	19,86	5,013	0,3509	1,77
A4	44,67	9,38	3,340	0,2338	2,49
A5	21,33	4,48	1,790	0,1253	2,80
A6	10,47	2,20	0,757	0,0530	2,41
A7	4,88	1,02	0,305	0,0214	2,09
A8	2,52	0,53	0,167	0,0117	2,22
A9	1,27	0,27	0,101	0,0071	2,66
A10	0,57	0,12	0,052	0,0036	3,02
A11	0,25	0,05	0,034	0,0023	4,42
A12	0,11	0,02	0,018	0,0013	5,39

Tabla 3: Extracción automática en el Ampliprep.

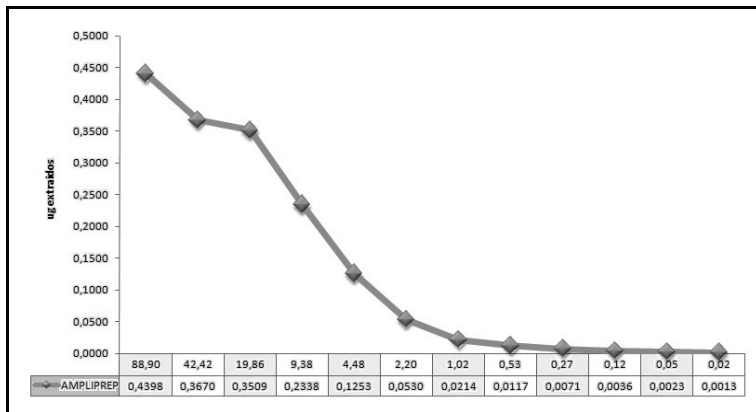


Gráfico 2: Ilustración de la extracción automática en el Ampliprep.

También en este experimento observamos que los rendimientos de la extracción mejoran a bajas concentraciones de muestra.

Extracción 3

	[µg /ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 210 µl	µg /ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS (EN 70 µl)	RENDIMIENTO %
A1	386,67	81,20	9,57	0,670	0,83
A2	164,67	34,58	7,51	0,525	1,52
A3	77,73	16,32	6,44	0,451	2,76
A4	39,13	8,22	3,94	0,276	3,35
A5	17,90	3,76	2,33	0,163	4,34
A6	9,02	1,89	0,99	0,070	3,67
A7	4,29	0,90	0,65	0,046	5,05
A8	2,06	0,43	0,22	0,016	3,59
A9	1,01	0,21	0,16	0,011	5,23
A10	0,48	0,10	0,08	0,006	5,57

Tabla 4: Extracción automática en el Ampliprep.

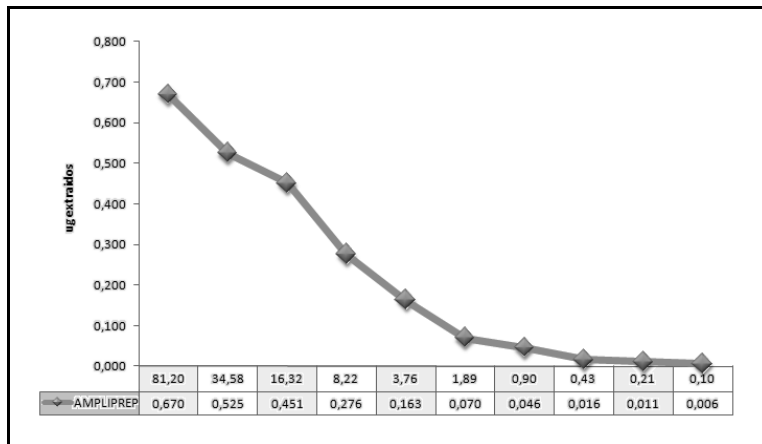


Gráfico 3: Ilustración de la extracción automática en el Ampliprep.

También en este experimento se observa que los rendimientos de la extracción mejoran a bajas concentraciones de muestra.

Extracción 4:

	[$\mu\text{g}/\text{ml}$] DE PARTIDA	μg TOTALES EN 210 μl	$\mu\text{g}/\text{ml}$ TRAS EXTRACCION	μg TOTALES EXTRAIDOS (EN 70 μl)	RENDIMIENTO %
A1	386,67	81,20	9,57	0,670	0,83
A2	164,67	34,58	7,51	0,525	1,52
A3	77,73	16,32	6,44	0,451	2,76
A4	39,13	8,22	3,94	0,276	3,35
A5	17,90	3,76	2,33	0,163	4,34
A6	9,02	1,89	0,99	0,070	3,67
A7	4,29	0,90	0,65	0,046	5,05
A8	2,06	0,43	0,22	0,016	3,59
A9	1,01	0,21	0,16	0,011	5,23
A10	0,48	0,10	0,08	0,006	5,57

Tabla 5: Ilustración de la extracción automática en el Ampliprep.

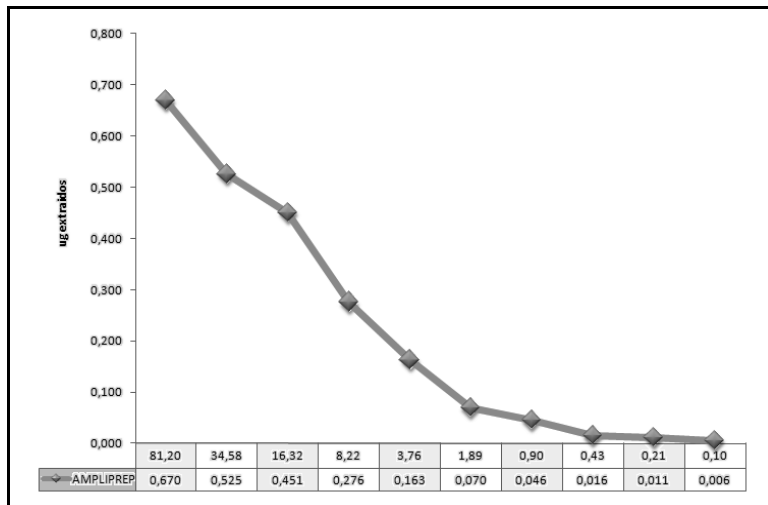


Gráfico 4: Ilustración de la extracción automática en el Ampliprep.

También en este experimento se confirman los datos obtenidos en los experimentos precedentes: los rendimientos de la extracción mejoran a bajas concentraciones de muestra.

5.3. Comparación de la extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp™ (QIAGEN)

En estos experimentos vamos a comparar dos distintos métodos de extracción: el de QIAGEN y el del Hamilton (Siemens).

El primero es un método manual, que se basa en los principios de la cromatografía de adsorción, mientras el segundo es un método automático, que utiliza partículas magnéticas.

5.3.1. Comparación de extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp™ (QIAGEN) tras corte con la enzima Apa I

Vamos a comparar las dos técnicas de extracción (automática y manual respectivamente), cortando los plásmidos con la enzima de restricción **Apa I**, que los lineariza.

- Para trabajar con el Hamilton empezamos con una concentración inicial de plásmido de ~100 µg/ml, que vamos a diluir 1: 2 con T.E. Trabajamos con 8 muestras (que van de H1 a H8), que cortamos con la enzima Apa I.
- Medimos la concentración también después del corte:

MEDIDAS ANTES DEL CORTE CON APA I	MEDIDAS DESPUES DEL CORTE CON APA I
107,33	74,03
46,97	37,47
25,50	19,93
11,13	11,57
5,40	6,53
2,51	6,33
1,10	3,96
0,44	3,74

Tabla 6: Medidas de concentración antes y después del corte con Apa I.

Podemos observar que, después del corte, disminuye la concentración de aquellas muestras que tenían una concentración inicial más elevada ($\sim 100 \mu\text{g/ml}$), mientras que, aquellas que tenían concentraciones más bajas ($\sim 11 \mu\text{g/ml}$), tienen una concentración más elevada.

➤ Tras linearización, se extrajeron las muestras en el Hamilton:

	[$\mu\text{g/ml}$] DE PARTIDA	μg TOTALES EN 600 μl	$\mu\text{g/ml}$ TRAS EXTRACCION	μg TOTALES EXTRAIDOS (EN 60 μl)	RENDIMIENTO %
H1	74,03	44,42	12,80	0,77	1,73
H2	37,47	22,48	10,77	0,65	2,87
H3	19,93	11,96	9,74	0,58	4,89
H4	11,57	6,94	7,00	0,42	6,05
H5	6,53	3,92	0,00	0,00	0,00
H6	6,33	3,80	3,20	0,19	5,06
H7	3,96	2,37	1,94	0,12	4,89
H8	3,74	2,25	1,04	0,06	2,79

Tabla 7: Extracción automática en el HAMILTON, tras corte con la enzima APAI (plásmido linearizado).

Podemos observar que, con el plásmido linearizado los rendimientos no crecen de manera proporcional a la cantidad de muestra introducida. Se verifica un aumento del rendimiento a una concentración intermedia ($\sim 11 \mu\text{g/ml}$), pero vuelve a disminuir a concentraciones inferiores.

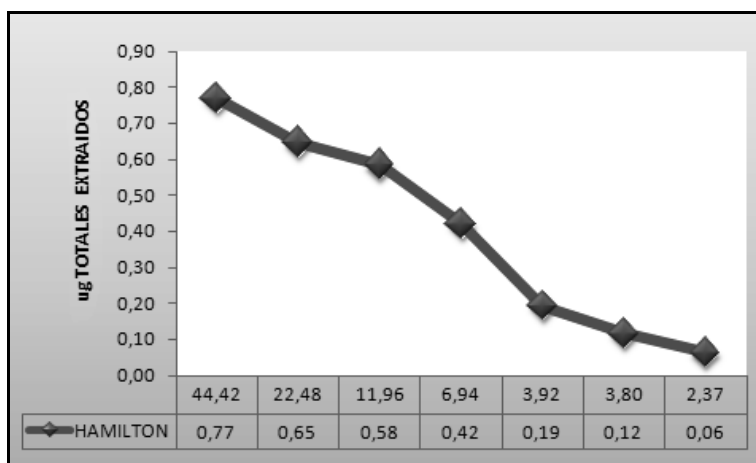


Gráfico 5: Ilustración de la extracción en el Hamilton, tras corte con la enzima APAI (plásmido linearizado).

Resultados

- Para trabajar con QIAGEN empezamos con una concentración de plásmido de ~230 µg/ml que vamos a diluir 1: 2 con T.E. Trabajamos con 8 muestras (que van de Q1 a Q8), que cortamos con la enzima Apa I.
- Medimos la concentración también después del corte:

MEDIDAS ANTES DEL CORTE CON APA I	MEDIDAS DESPUES DEL CORTE CON APA I
333,33	230
141,67	107
64,50	47,70
31,73	24,60
15,40	13,63
7,48	7,48
3,67	3,77
1,98	2,29

Tabla 8: Medidas de concentración antes y después del corte con Apa I.

Se observan también diferencias de concentración entre antes y después del corte, pero parece que a bajas concentraciones sean menores.

- Tras linearización, se extrajeron las muestras con el método manual (QIAGEN):

	[µg /ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 200 µl	µg /ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS (EN 200 µl)	RENDIMIENTO %
Q1	230,00	46,00	103,33	20,67	44,93
Q2	107,00	21,40	70,77	14,15	66,14
Q3	47,70	9,54	37,93	7,59	79,52
Q4	24,60	4,92	18,13	3,63	73,71
Q5	13,63	2,73	9,87	1,97	72,37
Q6	7,48	1,50	4,31	0,86	57,69
Q7	3,77	0,75	2,21	0,44	58,76
Q8	2,29	0,46	1,19	0,24	51,74

Tabla 9: Extracción manual con QIAGEN, tras corte con la enzima APAI (plásmido linearizado).

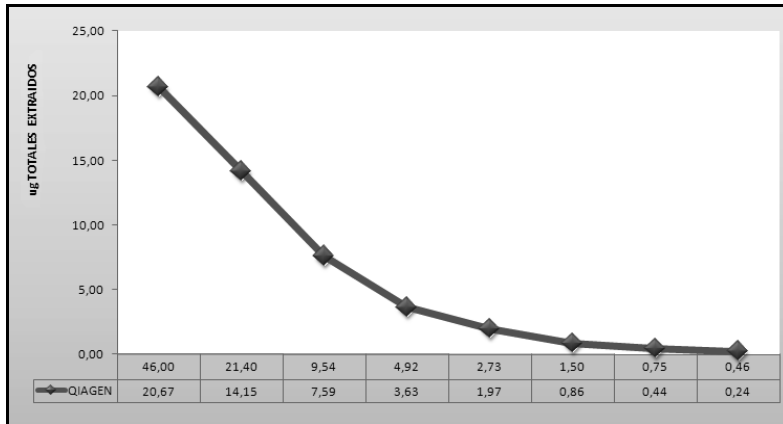


Gráfico 6: Ilustración de la extracción manual con QIAGEN, tras corte con la enzima APAI (plásmido linearizado).

Podemos observar que a concentraciones muy altas (230 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de plásmido no tenemos un rendimiento tan grande en la extracción, como cuando introducimos cantidades menores. Se observa que a partir de una concentración de $\sim 107 \mu\text{g}/\text{ml}$, los rendimientos empiezan a bajar proporcionalmente a las cantidades de muestra introducidas.

5.3.2. Comparación de la extracción entre el Hamilton (Siemens) y QIAmp® (QIAGEN) sin corte con la enzima Apa I

Vamos a comparar las dos técnicas de extracción (automática y manual respectivamente), pero trabajando con los plásmidos circulares (sin cortar con la enzima de restricción **Apa I**).

- Para trabajar con el Hamilton empezamos con una concentración inicial de plásmido de $\sim 400 \mu\text{g}/\text{ml}$, que diluimos 1: 2 con T.E.
- Trabajamos con 11 muestras (que van de H1 a H11), que introducimos en este sistema automático:

Resultados

	[$\mu\text{g/ml}$] DE PARTIDA	μg TOTALES EN 600 μl	$\mu\text{g/ml}$ TRAS EXTRACCION	μg TOTALES EXTRAIDOS (EN 50 μl)	RENDIMIENTO %
H1	356,67	214,00	24,40	1,22	0,57
H2	146,67	88,00	16,80	0,84	0,95
H3	72,87	43,72	16,90	0,85	1,93
H4	33,63	20,18	14,97	0,75	3,71
H5	16,87	10,12	11,93	0,60	5,90
H6	8,14	4,88	8,46	0,42	8,66
H7	3,99	2,40	6,08	0,30	12,69
H8	2,00	1,20	3,50	0,17	14,57
H9	1,07	0,64	1,47	0,07	11,51
H10	0,55	0,33	0,86	0,04	13,10
H11	0,24	0,15	0,46	0,02	15,85

Tabla 10: Extracción automática en el HAMILTON, con el plásmido circular.

Se puede observar que, trabajando con el plásmido circular, los rendimientos de la extracción aumentan de manera proporcional a la menor concentración de muestras introducidas. A bajas concentraciones de muestra (0.24 $\mu\text{g/ml}$), tenemos un rendimiento del 15.85%, pero a elevadas concentraciones (356.67 $\mu\text{g/ml}$), el rendimiento es de solo un 0.57%.

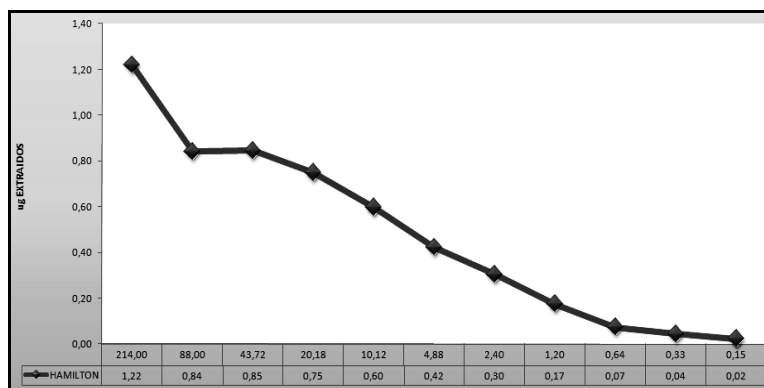


Gráfico 7: Ilustración de la extracción en el Hamilton (plásmido circular).

- También para trabajar con QIAGEN empezamos con una concentración de plásmido de ~400 $\mu\text{g/ml}$, que diluimos 1: 2 con T.E.

- Trabajamos con 12 muestras (que van de Q1 a Q12) que extraemos manualmente:

	[µg/ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 190 µl	ug/ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS (EN 200 µl)	RENDIMIENTO %
Q1	486,67	92,47	98,70	19,74	21,35
Q2	253,33	48,13	110,00	22,00	45,71
Q3	116,00	22,04	67,00	13,40	60,80
Q4	57,27	10,88	37,87	7,57	69,60
Q5	28,70	5,45	22,20	4,44	81,42
Q6	13,77	2,62	10,20	2,04	77,99
Q7	7,38	1,40	5,00	1,00	71,24
Q8	3,59	0,68	2,42	0,48	70,96
Q9	1,88	0,36	1,31	0,26	73,53
Q10	0,99	0,19	0,58	0,12	61,83
Q11	0,52	0,10	0,27	0,05	55,60
Q12	0,24	0,04	0,14	0,03	64,34

Tabla II: Extracción manual con QIAGEN, con el plásmido circular.

En este experimento, también se observa que los rendimientos más elevados se verifican a concentraciones menores, pero de manera menos evidente que con el Hamilton. A la concentración inicial (~400 µg/ml), tenemos un rendimiento de solo el 20 %, pero a partir de ~100 µg/ml de concentración observamos rendimientos del ~60 %, hasta obtener un máximo de 80 % a la concentración de ~30 µg/ml.

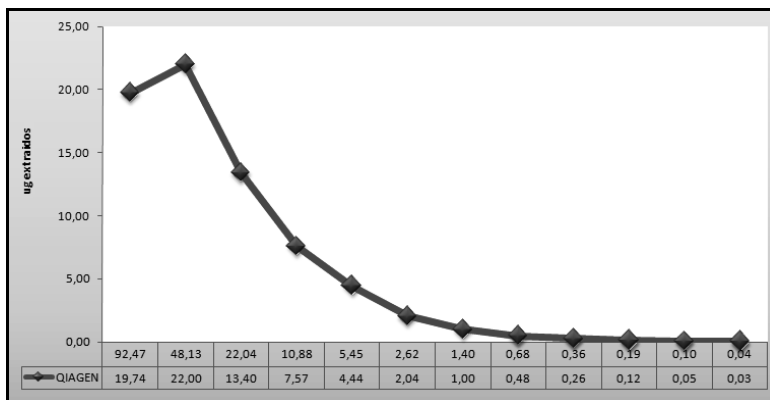


Gráfico 8: Ilustración de la extracción con QIAGEN (plásmido circular).

Resultados

Repetimos los experimentos para consolidar los datos obtenidos:

Extracción automática con el Hamilton.

- Empezamos con una concentración de plásmido de ~400 µg/ml que diluimos 1: 2 con T.E.
- Trabajamos con 11 muestras (que van de H1 a H11), que introducimos en este sistema automático:

	[µg/ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 600 µl	µg /ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS (EN 50 µl)	RENDIMIENTO %
H1	350,00	210,00	50,23	2,51	1,20
H2	142,00	85,20	39,10	1,96	2,29
H3	60,13	36,08	37,67	1,88	5,22
H4	26,83	16,10	25,63	1,28	7,96
H5	11,93	7,16	20,70	1,04	14,46
H6	5,30	3,18	11,30	0,57	17,78
H7	2,36	1,42	6,12	0,31	21,58
H8	1,10	0,66	1,26	0,06	9,60
H9	0,43	0,26	0,68	0,03	13,10
H10	0,19	0,12	0,31	0,02	13,25
H11	0,12	0,07	0,10	0,01	7,17

Tabla 12: Extracción automática en el HAMILTON, con el plásmido circular.

Los resultados son parecidos a los del experimento anterior.

En general se ve que el Hamilton extrae mejor a bajas concentraciones de muestra, como se puede observar también en el Grafico 9.

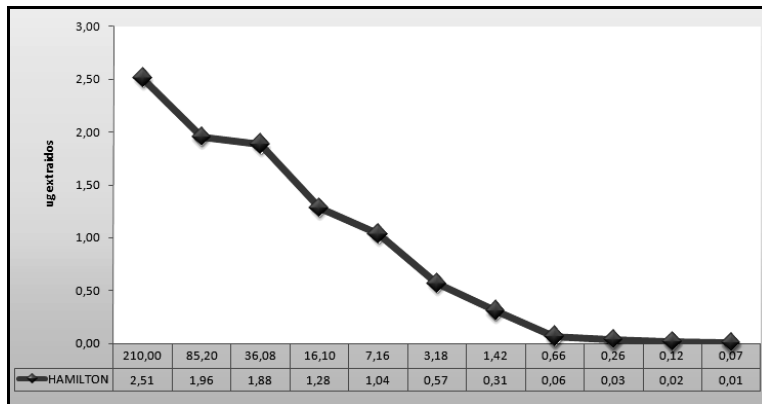


Gráfico 9: Ilustración de la extracción en el Hamilton (plásmido circular).

Extracción manual con QIAGEN:

- Empezamos con una concentración de plásmido entre 300 y 400 µg/ml que diluimos 1: 2 con T.E.
- Trabajamos con 10 muestras (que van de Q1 a Q12).

	[µg/ml] DE PARTIDA	µg TOTALES EN 200 µl	µg/ml TRAS EXTRACCION	µg TOTALES EXTRAIDOS (EN 200 µl)	RENDIMIENTO %
Q1	333,33	66,67	263,33	52,67	79,00
Q2	140,33	28,07	139,67	27,93	99,52
Q3	67,17	13,43	53,00	10,60	78,91
Q4	31,27	6,25	27,07	5,41	86,57
Q5	15,57	3,11	11,40	2,28	73,23
Q6	7,11	1,42	5,52	1,10	77,59
Q7	3,72	0,74	2,59	0,52	69,65
Q8	1,66	0,33	1,37	0,27	82,49
Q9	0,91	0,18	0,57	0,11	62,38
Q10	0,42	0,08	0,25	0,05	59,62

Tabla 13: Extracción manual con QIAGEN, con el plásmido circular.

También se observa que los rendimientos más elevados se verifican a concentraciones menores, pero de manera menos evidente que con el Hamilton. A la concentración inicial (~300 µg/ml), tenemos un rendimiento del 79 % (mucho más alto que en el experimento anterior con QIAGEN). A la concentración de ~100 µg/ml observamos un valor

Resultados

máximo de rendimiento del ~99 %, y un 86% a la concentración de ~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

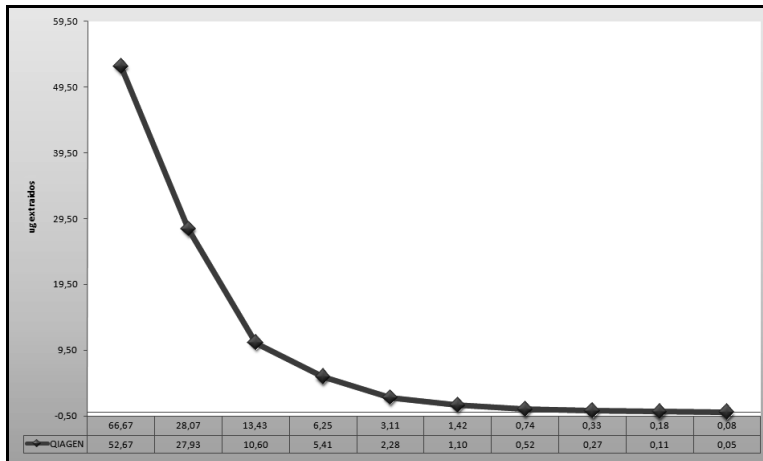


Gráfico 10: Ilustración de la extracción con QIAGEN (plásmido circular).

5.4. Pruebas de Reproducibilidad

5.4.1. QIAGEN

Queremos evaluar la reproducibilidad del método de extracción manual de ácidos nucleicos de QIAGEN.

Utilizamos 12 muestras (que van de Q1 Q8), de concentración inicial parecida (~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y evaluamos la capacidad, que tiene este método de extracción, de operar a las mismas concentraciones de muestra.

	µg/ml TRAS EXTRACCION	µg EN 200 µl DE ELUCION
Q1	142,00	28,40
Q2	136,33	27,27
Q3	123,67	24,73
Q4	146,67	29,33
Q5	141,67	28,33
Q6	147,67	29,53
Q7	121,67	24,33
Q8	120,67	24,13
Q9	128,33	25,67
Q10	105,33	21,07
Q11	144,00	28,80
Q12	132,00	26,40

Tabla 14: Prueba de reproducibilidad de QIAGEN utilizando 12 muestras de concentración parecida.

Se puede observar que en las 12 muestras, los extraídos tienen una concentración bastante constante.

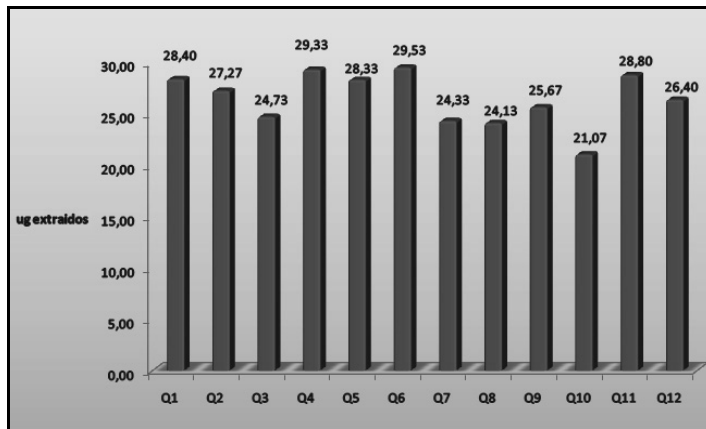


Gráfico 11: Ilustración de la reproducibilidad de QIAGEN, utilizando 12 muestras de concentración parecida.

Basándose en estos datos, se puede concluir que en este tipo de extracción, la reproducibilidad es bastante constante, como se puede también observar en el Gráfico 11.

5.4.2. Hamilton

Para evaluar la reproducibilidad de este aparato introducimos 20 muestras de concentración parecida ($\sim 40 \mu\text{g/ml}$). Escogimos esta concentración porque se observó en los experimentos anteriores, que el Hamilton extrae mejor a bajas concentraciones de muestra.

	$\mu\text{g/ml}$ TRAS EXTRACCION	μg EN 60 μl DE ELUCION
H1	10,87	0,65
H2	10,53	0,63
H3	11,67	0,70
H4	9,78ç	0,59
H5	14,00	0,84
H6	11,77	0,71
H7	12,93	0,78
H8	13,03	0,78
H9	9,56	0,57
H10	9,29	0,56
H11	9,57	0,57
H12	8,67	0,52
H13	11,60	0,70
H14	10,30	0,62
H15	10,53	0,63
H16	11,13	0,67
H17	8,54	0,51
H18	8,48	0,51
H19	7,93	0,48
H20	7,69	0,46

Tabla 15: Prueba de reproducibilidad en el HAMILTON utilizando 20 muestras de concentración parecida.

Se puede observar que en las 12 muestras, los extraídos no tienen una concentración totalmente constante.

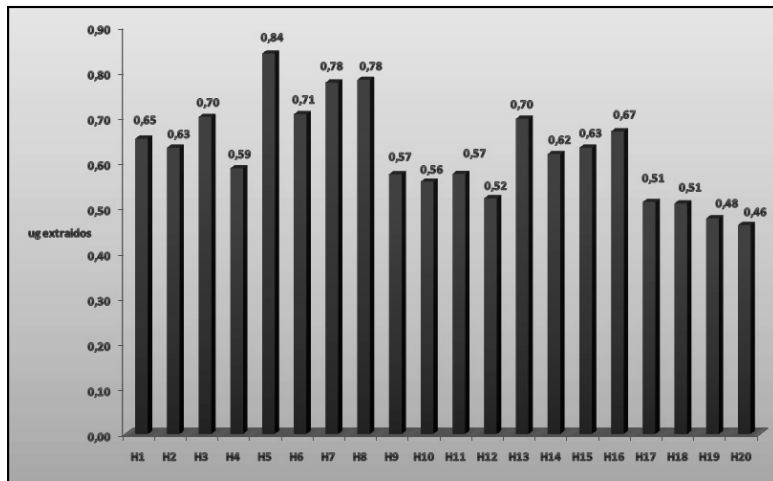


Grafico 12: Ilustración de la reproducibilidad en el HAMILTON utilizando 20 muestras de concentración parecida.

En este aparato automático se observa que, a bajas concentraciones a las cuales hemos trabajado, la reproducibilidad es parecida, pero no es tan constante como en el método de extracción manual (QIAGEN), como se puede observar también en el Grafico 11 y en el Grafico 12.

5.4.3. Ampliprep

En este caso también, para poder evaluar la reproducibilidad de este aparato automático, introducimos 20 muestras de concentración parecida (~150 µg/ml).

	µg/ml TRAS EXTRACCION	µg EN 70 µl DE ELUCION
A1	6,50	0,45
A2	6,08	0,43
A3	6,50	0,46
A4	5,64	0,39
A5	6,56	0,46
A6	6,50	0,45
A7	6,99	0,49
A8	6,16	0,43
A9	6,51	0,46
A10	6,31	0,44
A11	6,65	0,47
A12	6,82	0,48
A13	7,05	0,49
A14	6,19	0,43
A15	6,28	0,44
A16	6,76	0,47
A17	6,44	0,45
A18	6,36	0,45
A19	6,27	0,44
A20	5,54	0,39

Tabla 16: Prueba de reproducibilidad en el AMPLIPREP, utilizando 20 muestras de concentración parecida.

Se puede observar que en las 12 muestras, los extraídos tienen una concentración bastante constante.

Observamos que la reproducibilidad es más o menos constante, como se puede observar también en el Grafico 13.

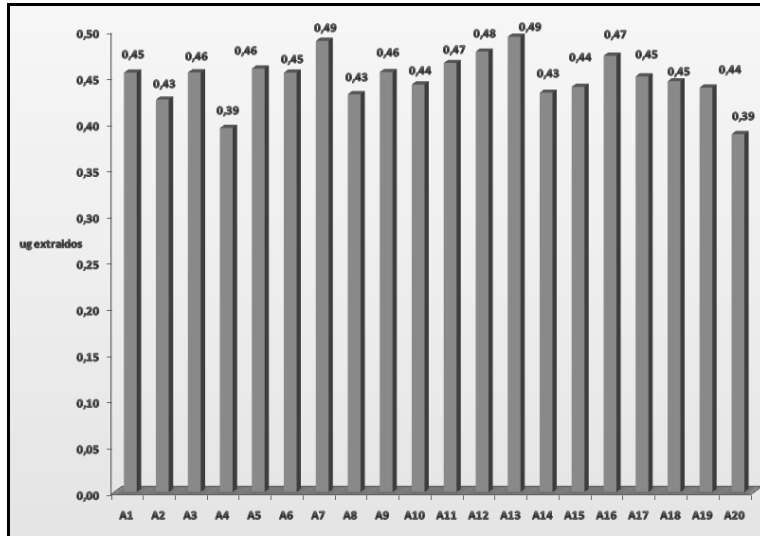


Grafico 13: Ilustración de la reproducibilidad en el AMPLIPREP utilizando 20 muestras de concentración parecida.

5.5. Pruebas con las nanopartículas magnéticas de Nanogap

Tenemos a disposición varios tipos de nanopartículas magnéticas de características y tamaños diferentes: FeO-2202-W (17 nm), TEOS-07 B (41 nm), TEOS-07 (20 nm), FeO-2204- (10,5 nm), FeO-2207-APS (47 nm), FeO-2206-W 5mg/ml (26 nm), FeO-2206-APS (24 nm), FeO-2206 10 mg/ml (20 nm).

Con estas partículas realizamos varios experimentos para evaluar su funcionamiento en los sistemas de extracción de ácidos nucleicos utilizados en la práctica clínica. Como sistema automático se utilizó el Hamilton, y el protocolo fue el número 4. Hemos comprobado que este aparato tiene una reproducibilidad bastante constante y, además es un sistema abierto. Esta es una gran ventaja, que nos permite poder introducir en el sistema las partículas que queremos estudiar.

5.5.1. Prueba con las partículas FeO-2202-W

Utilizamos el protocolo número 4 del Hamilton. Introducimos 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8), de concentración decreciente.

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 200 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 4 µg/ml.

El Hamilton por cada muestra necesita de ~ 500-600 µl.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	220,00	110,00	0,8193	0,04097	0,037
H2	117,33	58,67	0,6033	0,03017	0,051
H3	66,20	33,10	0,6077	0,03038	0,092
H4	39,50	19,75	0,4620	0,02310	0,117
H5	23,70	11,85	0,4170	0,02085	0,176
H6	13,73	6,87	0,3053	0,01527	0,222
H7	8,02	4,01	0,0000	0,00000	0,000
H8	4,67	2,34	0,0000	0,00000	0,000

Tabla 17: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2202-W; medidas efectuadas con el kit BR (Qubit).

Como se puede observar en la Tabla 17, el kit BR (Broad Range) del Qubit no lee todos los extraídos (debido a sus bajas concentraciones). Por esta motivación tuvimos que volver a medir sus concentraciones con el kit HS (High Sensitivity), como se puede observar en la Tabla 18. (Por el Qubit véase también el **ANEXO I**).

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	220,00	110,00	1,1700	0,05850	0,053
H2	117,33	58,67	0,9220	0,04610	0,079
H3	66,20	33,10	0,9640	0,04820	0,146
H4	39,50	19,75	0,7170	0,03585	0,182
H5	23,70	11,85	0,6160	0,03080	0,260
H6	13,73	6,87	0,4633	0,02317	0,337
H7	8,02	4,01	0,2507	0,01253	0,312
H8	4,67	2,34	0,1643	0,00822	0,352

Tabla 18: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2202-W; medidas tras extracción efectuadas con el kit HS (Qubit).

Los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve claramente una buena retención de partículas en todos los pocillos.

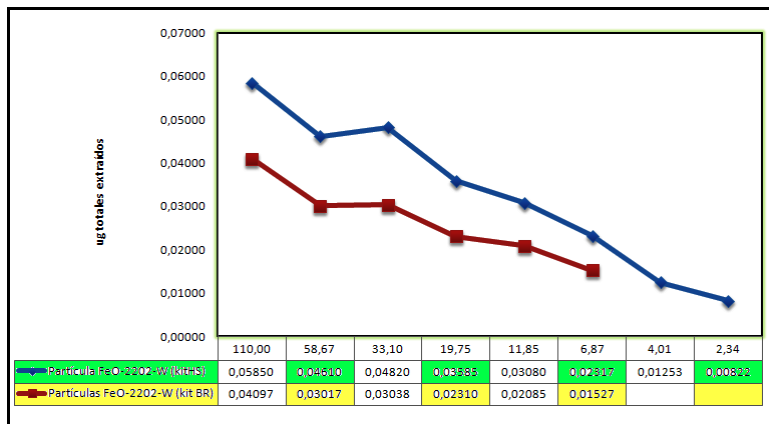


Gráfico 14: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2202-W. Se comparan los datos obtenidos con el kit BR y HS.

Resultados

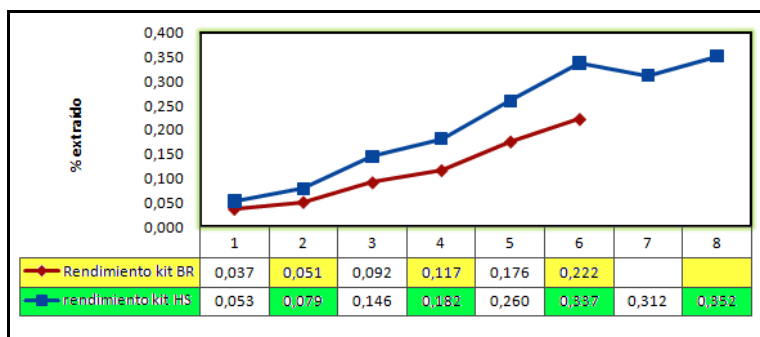


Gráfico 15: En este gráfico se ilustra el rendimiento % de la extracción. Se comparan los datos obtenidos con el kit BR y HS.

Si observamos los datos obtenidos midiendo las concentraciones con el Qubit HS, se nota que los rendimientos son bastante bajos, aunque a concentraciones menores tenemos una pequeña mejora.

5.5.2. Nueva prueba con las partículas FeO-2202-W

Repetimos el experimento anterior, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente. Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~7 µg/ml.

Fuimos capaces de leer todos los extraídos con el kit BR (Broad Range) del Qubit.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	290,00	145,00	0,742	0,037	0,026
H2	155,33	77,67	0,490	0,025	0,032
H3	88,63	44,32	0,464	0,023	0,052
H4	52,73	26,37	0,348	0,017	0,066
H5	30,77	15,38	0,264	0,013	0,086
H6	18,37	9,18	0,220	0,011	0,120
H7	10,93	5,47	0,146	0,007	0,134
H8	6,91	3,46	0,127	0,006	0,184

Tabla 19: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2202-W; medidas efectuadas con el kit BR (Qubit).

Los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve una buena retención de partículas en todos los pocillos.

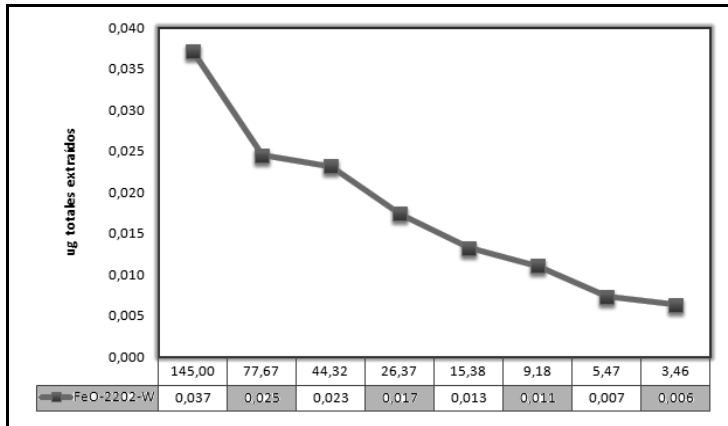


Gráfico 16: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2202-W.

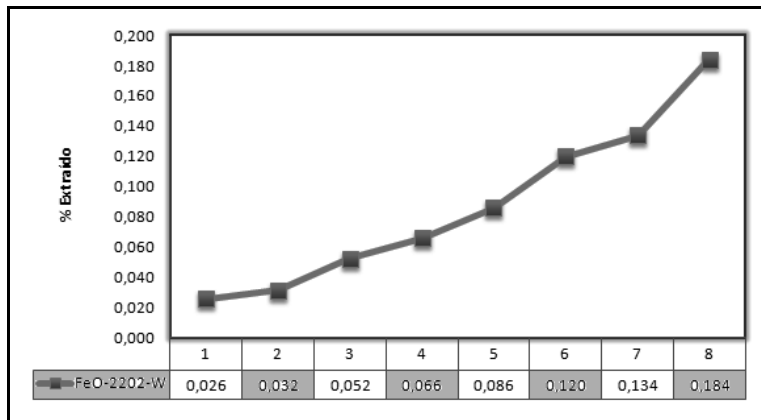


Gráfico 17: En este gráfico se ilustra el rendimiento % de la extracción.

En este caso también, se puede observar que los rendimientos son bastante bajos, aunque a concentraciones menores hay una pequeña mejora.

Probablemente los bajos rendimientos se pueden explicar mirando la composición de las partículas. El hecho de que estén compuestas por sola magnetita, significa que tienen capacidad de adsorber el DNA,

Resultados

pero los agregados que se forman, no ayudan a obtener una buena retención del mismo, porque reducen enormemente la superficie útil por su adsorción, como ha sido precedentemente demostrado en la literatura científica⁵⁴.

La modificación de estas partículas con revestimientos pasivos, puede ayudar a prevenir su agregación⁷⁶.

Continuamos los experimentos, analizando y comparando varias partículas de magnetita, pero recubiertas de sílica.

5.5.3. Prueba con las partículas TEOS-07B

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	128,00	64,00	0,2103	0,01052	0,016
H2	57,93	28,97	0,0092	0,00046	0,002
H3	27,60	13,80	0,0128	0,00064	0,005
H4	14,83	7,42	0,0078	0,00039	0,005
H5	128,00	64,00	0,0516	0,00258	0,004
H6	57,93	28,97	0,0093	0,00047	0,002
H7	27,60	13,80	0,0088	0,00044	0,003
H8	14,83	7,42	0,0079	0,00040	0,005

Tabla 20: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

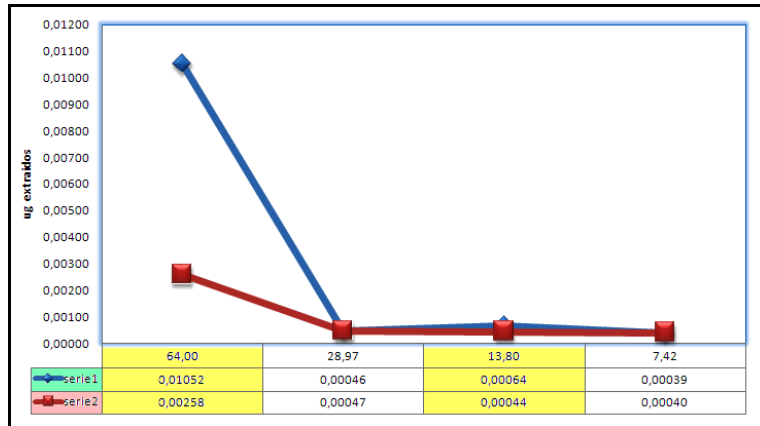


Gráfico 18: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

En general podemos observar rendimientos muy bajos en todo el rango de concentraciones.

5.5.4. Nueva prueba con las partículas TEOS 07 B

Repetimos el experimento anterior, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	120,67	60,33	21,63	1,08	1,79
H2	56,07	28,03	29,17	1,46	5,20
H3	27,27	13,63	65,10	3,26	23,88
H4	13,23	6,62	21,90	1,10	16,55
H5	121,00	60,50	54,60	2,73	4,51
H6	53,93	26,97	66,43	3,32	12,32
H7	26,43	13,22	35,63	1,78	13,48
H8	13,27	6,63	17,57	0,88	13,24

Tabla 21: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

Resultados

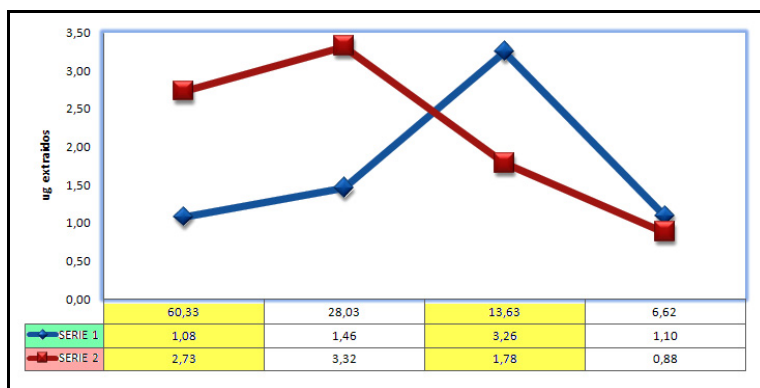


Grafico 19: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

N.B.: salieron muestras turbias con restos de partículas.

En este experimento se puede notar una mejora consistente de los rendimientos en comparación con el primer experimento.

En general observamos que los rendimientos mejoran a concentraciones menores.

5.5.5. Prueba con las partículas TEOS-07B y BSA

En estas pruebas vamos a repetir los experimentos precedentes pero a 4 de las muestras con concentraciones iguales por duplicado les añadimos 60 µl de BSA.

El BSA nos ayuda a crear condiciones parecidas a las muestras de la práctica clínica, (que pueden contener restos de proteínas u otros contaminantes); evaluamos así si el BSA interfiere en la extracción.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8), las muestras que van de H1 a H4 llevan BSA añadido. Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 100 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 15 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	95,40	47,70	1,07	0,054	0,11
H2	47,80	23,90	2,47	0,124	0,52
H3	25,10	12,55	9,99	0,500	3,98
H4	13,23	6,62	0,78	0,039	0,59
H5	93,50	46,75	16,30	0,815	1,74
H6	45,23	22,62	0,99	0,049	0,22
H7	23,57	11,78	0,76	0,038	0,32
H8	11,93	5,97	1,08	0,054	0,91

Tabla 22: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07B. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

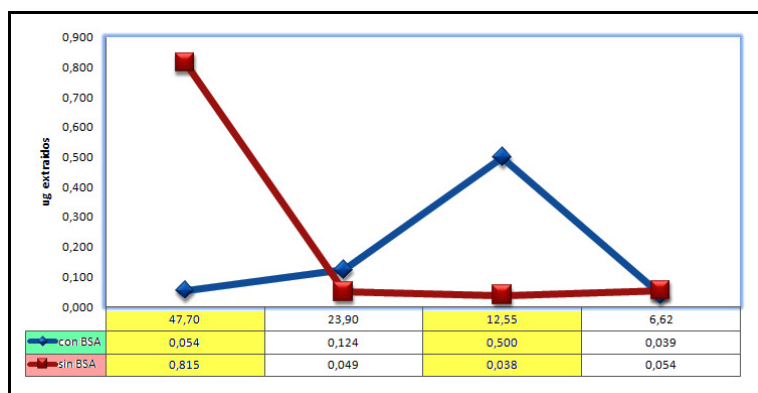


Gráfico 20: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

OBSERVACIONES:

La muestra H5 tras extracción resultó manchada con restos de partículas.

Los rendimientos de la extracción se mantienen bajos y las muestras que llevan el BSA añadido tienen rendimientos aún peores.

5.5.6. Prueba con las partículas TEOS-07B y el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (1:4)

A diferencia de los experimentos anteriores cambiamos el Buffer original, en que están suspendidas las partículas de Nanogap, por el Buffer en que suelen ser proporcionadas las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens).

Trabajamos con 1ml de partículas TEOS 07 B, las centrifugamos para que se separen del Buffer en que están suspendidas y las disolvemos en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (que separamos de la misma forma: por centrifugación).

Notamos que las partículas no se resuspenden fácilmente en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens), y tenemos que añadir 4 ml de este Buffer para lograr esto.

De esta forma tenemos las partículas 4 vez mas diluidas que en su Buffer original (usamos una cantidad de partículas 4 veces menor).

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 100 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 10 µg/ml.

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 µl de BSA.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	94,20	47,10	7,28	0,364	0,77
H2	42,47	21,23	2,71	0,136	0,64
H3	22,93	11,47	7,39	0,369	3,22
H4	12,53	6,27	1,98	0,099	1,58
H5	92,57	46,28	6,43	0,322	0,69
H6	46,77	23,38	5,02	0,251	1,07
H7	20,50	10,25	5,88	0,294	2,87
H8	9,89	4,94	3,13	0,157	3,17

Tabla 23: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07B, en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens). (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

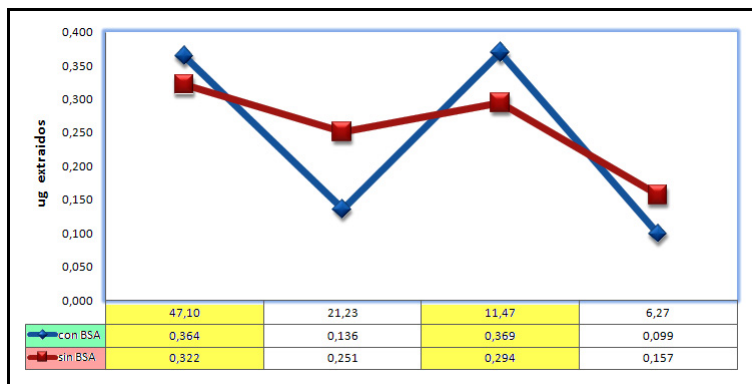


Grafico 21: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B, en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens. (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

En este caso también podemos notar que los rendimientos mejoran a bajas concentraciones y que las muestras que llevan BSA añadido tienen rendimientos aún peores.

Comparando este experimento con el que se hizo utilizando estas mismas partículas, pero en su Buffer original, el de Nanogap, se puede observar que si cambiamos el Buffer por el del Versant® kPCR (Siemens) obtenemos una pequeña mejora.

Además en este último caso trabajamos con una cantidad menor de partículas, que están 4 veces más diluidas que en su Buffer original.

Ahora vamos a evaluar cómo funcionan las partículas TEOS 07 (20 nm), más pequeñas respecto a las TEOS 07B (41 nm).

5.5.7. Prueba con las partículas TEOS 07

Repetimos los experimentos anteriores, pero utilizando las partículas TEOS 07, para evaluar si hay mejoras en la extracción.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la

Resultados

misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	117,67	58,83	5,00	0,25	0,42
H2	56,80	28,40	7,27	0,36	1,28
H3	27,83	13,92	16,33	0,82	5,87
H4	13,70	6,85	10,53	0,53	7,69
H5	119,33	59,67	24,63	1,23	2,06
H6	56,80	28,40	6,68	0,33	1,18
H7	28,60	14,30	15,63	0,78	5,47
H8	13,73	6,87	7,85	0,39	5,72

Tabla 24: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07.

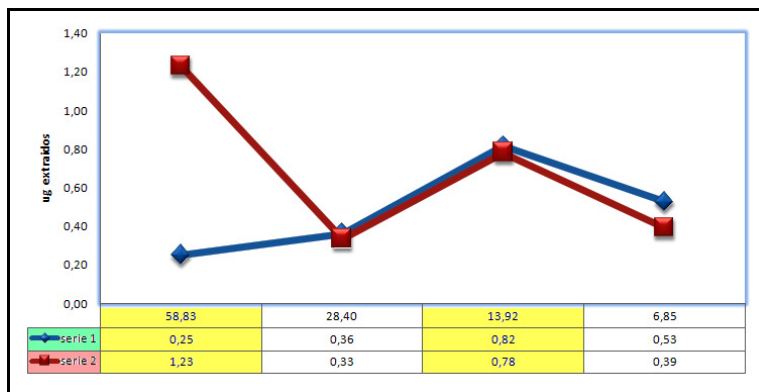


Gráfico 22: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07.

En este experimento también observamos que los rendimientos mejoran a concentraciones menores.

5.5.8. Prueba con las partículas TEOS-07 y BSA

En esta prueba repetimos el experimento numero 5, pero utilizando las partículas TEOS 07.

A 4 de las muestras iguales por duplicado les añadimos 60 μ l de BSA, para crear condiciones parecidas a las muestras de la práctica clínica, y, evaluar así si el BSA interfiere en la extracción.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 μ l de BSA.

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 μ g/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 μ g/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	μ g TOTALES INICIALES EN 500 μ l	MEDIDA TRAS EXTRACCION	μ g TOTALES FINALES EN 50 μ l	RENDIMIENTO %
H1	116,33	58,17	33,10	1,655	2,85
H2	51,80	25,90	13,00	0,650	2,51
H3	28,00	14,00	14,27	0,713	5,10
H4	13,27	6,63	6,40	0,320	4,83
H5	123,00	61,50	25,70	1,285	2,09
H6	57,27	28,63	20,00	1,000	3,49
H7	28,27	14,13	18,90	0,945	6,69
H8	14,07	7,03	2,03	0,102	1,45

Tabla 25: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 (De H1 a H4 llevan 60 μ l de BSA añadido).

Resultados

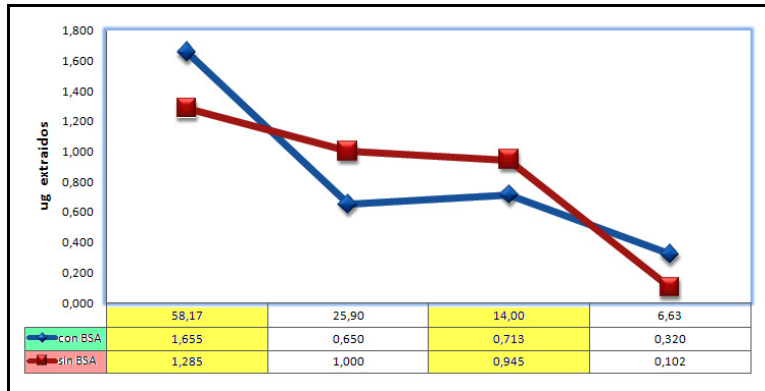


Grafico 23: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07. (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

Los rendimientos entre las muestras que llevan BSA y las que no lo llevan son parecidos y mejoran a una concentración ~30 µg/ml.

5.5.9. Prueba con partículas TEOS-07 y el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (1: 3)

Cambiamos el Buffer original en que están suspendidas las partículas de Nanogap, por el Buffer en que suelen ser proporcionadas las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens).

Trabajamos con 1ml de partículas TEOS 07 originales, las centrifugamos para que se separen del Buffer en que están disueltas y las disolvemos en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (que separamos de la misma forma: por centrifugación).

Tampoco las partículas TEOS 07 se resuspenden fácilmente y tenemos que utilizar 3 ml de este Buffer para lograr esto.

De esta forma las partículas están 3 vez más diluidas que en su Buffer original (usamos una cantidad de partículas 3 veces menor).

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la

misma que H8).

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 µl de BSA.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	123,00	61,50	28,93	1,447	2,35
H2	57,17	28,58	26,73	1,337	4,68
H3	29,97	14,98	24,00	1,200	8,01
H4	15,10	7,55	19,87	0,993	13,16
H5	132,33	66,17	26,17	1,308	1,98
H6	56,10	28,05	21,67	1,083	3,86
H7	28,47	14,23	19,77	0,988	6,94
H8	13,80	6,90	16,67	0,833	12,08

Tabla 26: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07, en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

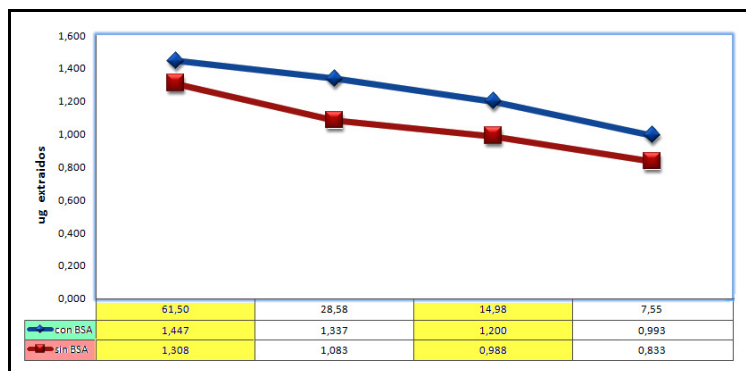


Gráfico 24: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07, en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

Los rendimientos mejoran un poco en las muestras que llevan BSA, y a una concentración de ~ 15 µg/ml.

Comparando el experimento con el que se hizo utilizando estas mismas

Resultados

partículas en el Buffer de Nanogap, se puede observar que la extracción mejora si cambiamos el Buffer por el del Versant® kPCR (Siemens).

Además en este caso trabajamos con una cantidad menor de partículas, que están 3 veces más diluidas que en su Buffer original.

5.5.10. Prueba con las partículas TEOS 07 y TEOS 07 B (1:1) en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens)

Mezclamos en partes iguales (1:1) las partículas TEOS 07 y TEOS 07 B y las resuspendemos en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens).

Trabajamos con 1,5ml de partículas TEOS 07, y 1,5 ml de partículas TEOS 07B por separado; las centrifugamos para que se separen del Buffer en que están suspendidas y las disolvemos en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens (que obtenemos de la misma forma: por centrifugación).

Para resuspenderlas hicieron falta 3 y 4 ml de Buffer, respectivamente.

Una vez resuspendidas las mezclamos en partes iguales.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 µl de BSA.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	142,00	71,00	33,17	1,658	2,34
H2	64,23	32,12	21,87	1,093	3,40
H3	32,43	16,22	18,20	0,910	5,61
H4	16,20	8,10	12,63	0,632	7,80
H5	149,67	74,83	28,50	1,425	1,90
H6	67,77	33,88	21,97	1,098	3,24
H7	34,70	17,35	24,77	1,238	7,14
H8	16,20	8,10	15,77	0,788	9,73

Tabla 27: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con los dos tipos de partículas de Nanogap: TEOS-07 y TEOS-07B, en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

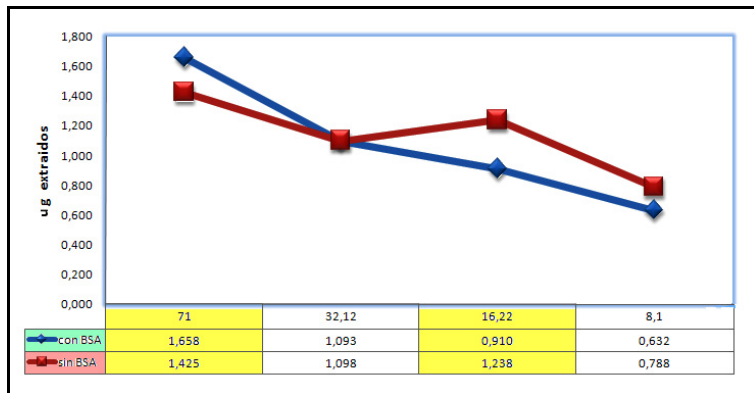


Gráfico 25: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con los dos tipos de partículas de Nanogap: TEOS-07 y TEOS-07B, en el Buffer del Versant® kPCR, Siemens. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

En este caso también observamos mejoras a bajas concentraciones y alrededor de 15 µg/ml, pero no se observan mejoras respecto a los experimentos de las dos partículas por separado.

El BSA parece que no interfiera en la extracción.

5.5.11. Prueba con las partículas TEOS 07 y TEOS 07 B originales mezcladas 1:1

Mezclamos en cantidades iguales (1:1) los dos tipos de partículas; cada una la dejamos en su Buffer original. Usamos 1,5 ml de cada partícula.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 µl de BSA.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	135,00	67,50	6,29	0,315	0,47
H2	64,73	32,37	4,89	0,245	0,76
H3	32,60	16,30	9,87	0,493	3,03
H4	16,43	8,22	3,10	0,155	1,88
H5	149,67	74,83	32,43	1,622	2,17
H6	68,27	34,13	13,97	0,698	2,05
H7	32,90	16,45	4,96	0,248	1,51
H8	16,47	8,23	3,01	0,150	1,83

Tabla 28: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con los dos tipos de partículas de Nanogap: TEOS-07 y TEOS-07B, en su Buffer original. (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

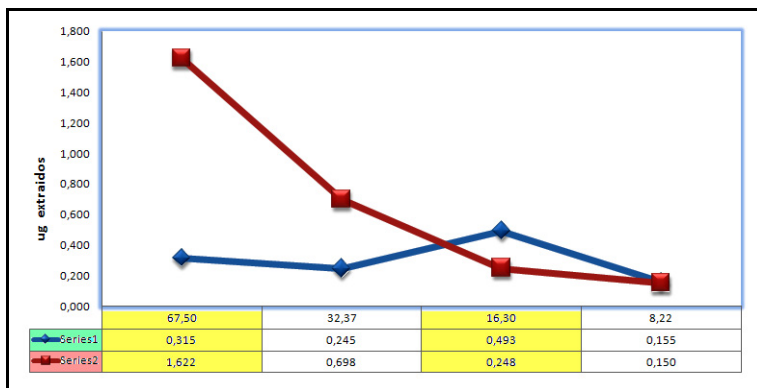


Grafico 26: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con los dos tipos de partículas de Nanogap: TEOS-07 y TEOS-07B, en su Buffer original. (De H1 a H4 le añadimos 60 µl de BSA).

Comparando este experimento con el anterior, en el que estas 2 partículas mezcladas se resuspendían en el Buffer del Versant® kPCR (Siemens), se puede observar que la extracción mejora si cambiamos el Buffer y no trabajamos con el Buffer original.

5.5.12. Prueba con las partículas TEOS-07 y las partículas paramagnéticas comerciales, Siemens (1:1)

Utilizamos las mismas cantidades (1:1) de partículas TEOS 07 y partículas paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original.

Usamos con 1,5 ml de cada partícula.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

A las muestras que van de H1 a H4 les añadimos ~ 60 µl de BSA.

Resultados

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	106,00	53,00	28,53	1,427	2,69
H2	49,00	24,50	24,87	1,243	5,07
H3	24,87	12,43	9,99	0,500	4,02
H4	12,83	6,42	9,94	0,497	7,75
H5	107,33	53,67	33,83	1,692	3,15
H6	48,47	24,23	24,27	1,213	5,01
H7	21,53	10,77	18,53	0,927	8,61
H8	11,77	5,88	8,22	0,411	6,99

Tabla 29: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original. (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

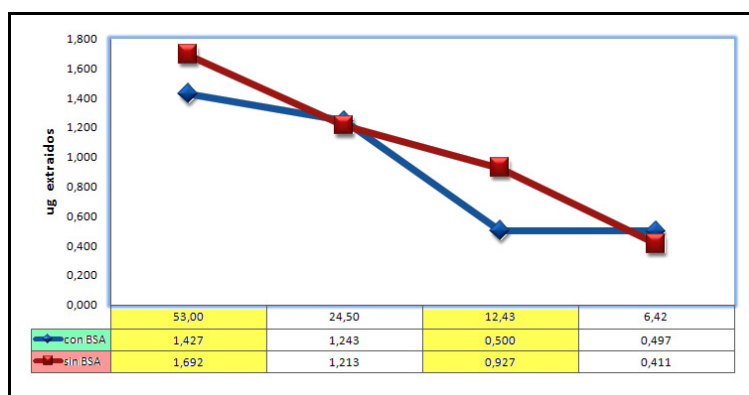


Gráfico 27: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original. (De H1 a H4 llevan 60 µl de BSA añadido).

En los experimentos anteriores se observó que con las partículas TEOS 07 se obtenían rendimientos mayores, pero en esta prueba podemos observar que mezclando estas partículas con las paramagnéticas comerciales (Siemens) no se observan mejoras evidentes.

5.5.13. Prueba con las partículas TEOS 07 y las partículas del MagNa Pure (1:1)

Utilizamos siempre las partículas TEOS 07, pero esta vez mezcladas con las del MagNa Pure.

Trabajamos con las mismas cantidades (1:1) de los dos tipos de partículas, cada una en su Buffer original. Usamos 1,5 ml de cada partícula.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

Las muestras no llevan BSA añadido.

Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	129,00	64,50	5,70	0,285	0,44
H2	48,90	24,45	6,41	0,321	1,31
H3	26,87	13,43	1,79	0,090	0,67
H4	14,50	7,25	1,88	0,094	1,30
H5	109,33	54,67	4,94	0,247	0,45
H6	53,47	26,73	3,36	0,168	0,63
H7	26,70	13,35	2,18	0,109	0,82
H8	12,17	6,08	1,31	0,066	1,08

Tabla 30: Extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 y las del MagNa Pure, cada una en su Buffer original.

Resultados

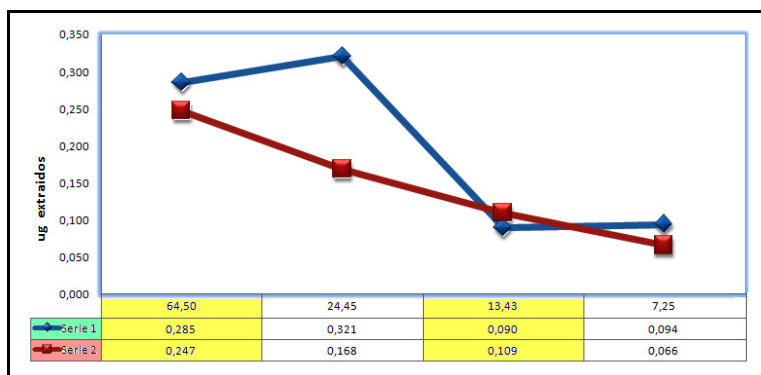


Grafico 28: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 las del MagNa Pure, cada una en su Buffer original.

Mezclando estas partículas con las del MagNa Pure, tampoco se observan mejoras evidentes respecto a los otros experimentos.

5.5.14. Prueba con las partículas TEOS 07 y las partículas del MagNa Pure (1:1) en el MagNa Pure

Mezclamos de nuevo las partículas TEOS 07 y las partículas del MagNa Pure utilizando la misma cantidad de cada una (1:1). Utilizamos 0,250 ml de cada partícula.

La diferencia entre este experimento y el anterior es que como aparato de extracción, en vez que utilizar el Hamilton como en todos los experimentos precedentes, utilizamos el MagNa Pure.

Una de las ventajas del MagNa Pure es que reduce a la mitad el tiempo necesario por la extracción; en el Hamilton necesitamos de ~ una hora y en el MagNa Pure de 35 minutos.

El MagNa Pure utiliza un volumen inicial de ~ 400 µl de muestra; mientras el Hamilton utiliza ~ 500 µl.

También los volúmenes de elución son diferentes:

El MagNa Pure eluye ~ 100 µl y el Hamilton ~ 50 µl.

Utilizamos el protocolo Total NA External Lysis del MagNa Pure y

trabajamos con 8 muestras de plásmido (que van de MP1 a MP8) que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (MP1 tiene la misma concentración que MP5, MP2 la misma que MP6, MP3 la misma que MP7, MP4 la misma que MP8).

En los cartuchos que van de 1 a 4 mezclamos los dos tipos de partículas en igual cantidad (1:1), cada una en su Buffer original;

En los cartuchos que van de 5 a 8 utilizamos solo las partículas TEOS 07 originales.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de $\sim 150 \mu\text{g/ml}$ que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de $\sim 20 \mu\text{g/ml}$.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	μg TOTALES INICIALES EN 500 μl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	μg TOTALES FINALES EN 50 μl	RENDIMIENTO %
MP1	158,00	63,20	0,1227	0,01227	0,019
MP2	71,57	28,63	46,0000	4,60000	16,069
MP3	35,33	14,13	32,3000	3,23000	22,854
MP4	16,57	6,63	22,1000	2,21000	33,350
MP5	163,33	65,33	0,0425	0,00425	0,007
MP6	73,40	29,36	0,0132	0,00132	0,004
MP7	35,07	14,03	0,0160	0,00160	0,011
MP8	16,97	6,79	0,0082	0,00082	0,012

Tabla 31: Extracción con el MagNa Pure utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 y las del MagNa Pure, cada una en su Buffer original. (De MP1 a MP4 utilizamos los dos tipos de partículas mezcladas, mientras de MP5 a MP8 solo las TEOS 07).

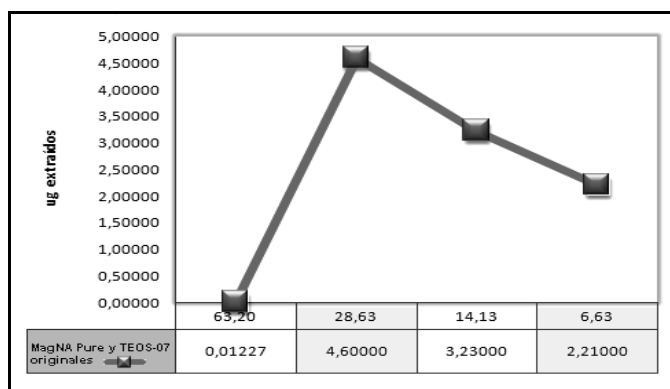


Gráfico 29: Ilustración de la extracción con el MagNa Pure utilizando las partículas de Nanogap: TEOS-07 y las partículas del MagNa Pure mezcladas, cada una en su Buffer original. (De MP1 a MP4).

Resultados

OBSERVACIONES:

MP2, MP3 y MP4 resultaron turbios y con restos de partículas; esto puede haber interferido con las medidas de concentración (las partículas pueden tener restos de DNA). De hecho con el kit BR del Qubit pudimos medir solo las concentraciones de estos tres eluidos (que son los únicos 3 que dan rendimientos altos, como se puede también observar en la Tabla 31 y en el Grafico 29).

Las otras medidas de concentración de los eluidos, solo se pudieron efectuar con el kit HS (que, como se explicó, se utiliza para medir bajos rangos de concentración).

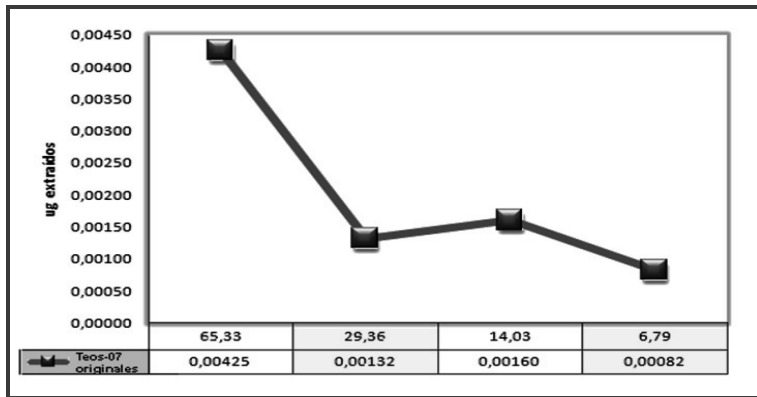


Grafico 30 : Ilustración de la extracción con el MagNa Pure utilizando solo las partículas de Nanogap: TEOS-07 en su Buffer original. (De MP5 a MP8).

Se observan rendimientos mejores cuando se usan las dos partículas mezcladas, pero el hecho que queden restos de las mismas y que los rendimientos sean superiores a todos los experimentos efectuados hasta hora nos hace pensar que esto pueda haber influido a la hora de medir las concentraciones.

5.5.15. Nueva extracción con las partículas TEOS-07 B

Repetimos algunos de los experimentos anteriores para consolidar los datos obtenidos. En la placa de elución del Hamilton quedan restos de partículas, como si el imán no tuviese potencia suficiente para atraerlas.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 150 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 20 µg/ml.

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8), que tienen 4 concentraciones iguales por duplicado (H1 tiene la misma concentración que H5, H2 la misma que H6, H3 la misma que H7, H4 la misma que H8).

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	161,33	80,67	0,1033	0,00517	0,006
H2	72,03	36,02	0,0075	0,00037	0,001
H3	35,87	17,93	0,0154	0,00077	0,004
H4	17,17	8,58		0,00000	0,000
H5	159,00	79,50	0,1340	0,00670	0,008
H6	72,40	36,20	0,1417	0,00708	0,020
H7	35,47	17,73	0,0292	0,00146	0,008
H8	17,10	8,55		0,00000	0,000

Tabla 32: Extracción con el Hamilton utilizando 4 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

Resultados

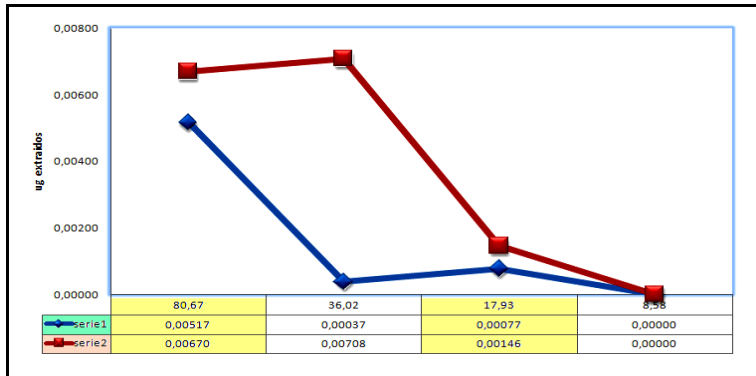


Gráfico 31: Ilustración de la extracción con el Hamilton utilizando solo las partículas de Nanogap: TEOS-07 B.

OBSERVACIONES:

En los eluidos quedan restos de partículas; este dato nos ayuda a reforzar la hipótesis que el imán no tenga potencia suficiente para atraer dichas partículas.

Los eluidos H4 y H8 tienen una concentración tan baja que no se pudo detectar ni con el kit HS del Qubit, como se puede observar también en el Tabla 32.

En todos los experimentos que hicimos con este tipo de partículas, los rendimientos fueron muy bajos.

5.5.16. Extracción con las partículas TEOS-07 a pH=10

Ajustamos el pH de las partículas TEOS-07 a 10, que es el mismo valor de pH de la solución en la cual se encuentran las partículas del Hamilton. (Hasta ahora estas partículas son las que nos dieron mejores resultados, en términos de rendimiento %).

Para obtener este valor de pH añadimos ~ 20 µl de NaOH a 3 ml de partículas.

No cambiamos el Buffer en el en que están suspendidas.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 200 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 1 µg/ml. Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (H1-H8) de concentración decreciente.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	200,00	100,00	11,43	0,57167	0,572
H2	137,33	68,67	10,30	0,51500	0,750
H3	45,73	22,87	8,65	0,43233	1,891
H4	21,73	10,87	6,24	0,31183	2,870
H5	11,77	5,88	1,17	0,05867	0,997
H6	5,00	2,50	0,77	0,03840	1,537
H7	2,73	1,37	1,60	0,07983	5,849
H8	1,26	0,63	0,1753	0,00877	1,395

Tabla 33: Extracción con el Hamilton utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: TEOS-07 a pH 10 (añadimos 20 µl de NaOH).

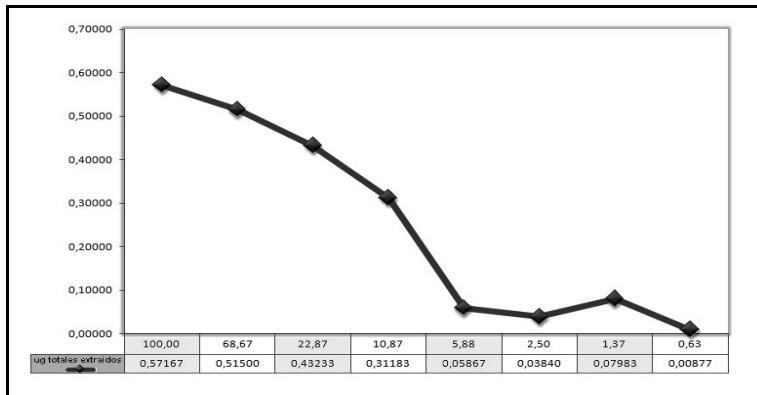


Gráfico 32: Ilustración de la extracción con el Hamilton utilizando solo partículas de Nanogap: TEOS-07 a pH 10.

Resultados

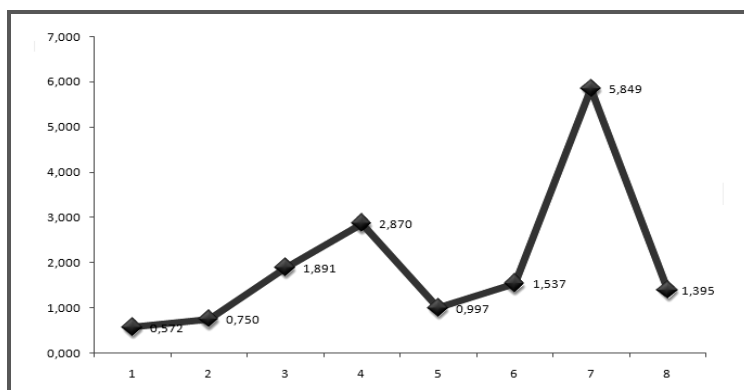


Grafico 33: En este grafico se ilustra el rendimiento % de la extracción.

En este experimento no se observó un grande aumento en el rendimiento % pero no quedaron restos de partículas en los extraídos, que pudieran interferir en las medidas de concentración.

Se puede observar un aumento neto del rendimiento a una concentración $\sim 3 \mu\text{g/ml}$.

Puede ser que trabajando a estos valores de pH podamos llegar a mejoras en los resultados y que esto sea el primer paso para mejorar la extracción.

De todos estos experimentos efectuados con las partículas TEOS-07 y TEOS-07B, podemos concluir que las primeras (de tamaño de 20 nm) son las que muestran los mejores rendimientos, comparadas con las TEOS-07 B (40 nm). Las primeras están compuestas por un mayor porcentaje de oxido de hierro (25-30%) y puede ser que por este motivo el imán las atraiga mejor.

Ahora vamos a evaluar tres tipos de partículas con diferentes revestimientos: unas recubiertas con un polímero orgánico (el PAA), otras funcionalizadas con APTS, y otras compuestas de magnetita recubierta de sílica, de tamaño y pH parecidos a las TEOS 07, pero de concentración inferior al 50%. Las primeras se denominan FeO-2204-W, las segundas FeO-2207-APS, y las terceras FeO-2206 5 mg/ml.

5.5.17. Prueba con las partículas FeO-2204-W

Introducimos en el Hamilton 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8), de concentración decreciente. Queremos trabajar con una concentración inicial de plásmido de ~ 200 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 6 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	230,00	115,00	3,2233	0,16117	0,140
H2	126,33	63,17	1,8433	0,09217	0,146
H3	75,23	37,62	1,3833	0,06917	0,184
H4	44,70	22,35	1,1067	0,05533	0,248
H5	27,13	13,57	0,9417	0,04708	0,347
H6	16,17	8,08	0,9490	0,04745	0,587
H7	9,11	4,56	1,1700	0,05850	1,284
H8	5,60	2,80	1,4950	0,07475	2,671

Tabla 34: Extracción con el Hamilton utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2204-W.

N.B.: los eluidos salen un poco manchados, con un pequeño gradiente de menos a más desde H1 hasta H8, pero sin restos de partículas.

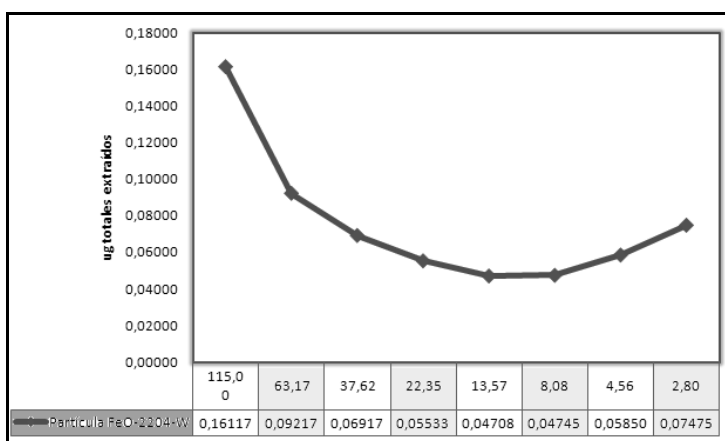


Gráfico 34: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2204-W.

Resultados

Se puede observar que los rendimientos son bastante bajos hasta la muestra H6, pero a concentraciones más bajas, a partir de la muestra H7, tenemos el doble del rendimiento y, a concentraciones aun más bajas, en la muestra H8, se observa el doble del rendimiento respecto a la H7. En la muestra H8 el rendimiento es 5 veces mayor respecto a las otras muestras.

5.5.18. Segunda prueba con las partículas FeO-2204-W

Repetimos el experimento anterior, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Esta vez empezamos con una concentración de plásmido un poco más elevada, ~ 300 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~7 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	286,67	143,33	3,260	0,163	0,114
H2	157,33	78,67	1,897	0,095	0,121
H3	90,40	45,20	1,350	0,068	0,149
H4	53,33	26,67	0,807	0,040	0,151
H5	31,67	15,83	0,872	0,044	0,275
H6	18,77	9,38	0,985	0,049	0,525
H7	11,50	5,75	0,969	0,048	0,843
H8	6,97	3,49	1,367	0,068	1,960

Tabla 35: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2204-W; medidas efectuadas con el kit BR (Qubit).

Medimos todos los extraídos sea con el kit BR (Broad Range) que con el kit HS (High Sensitivity) del Qubit, pero las medidas iniciales (antes de la extracción) se hicieron en ambos casos con el kit BR.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	286,67	143,33	3,003	0,150	0,105
H2	157,33	78,67	1,827	0,091	0,116
H3	90,40	45,20	1,267	0,063	0,140
H4	53,33	26,67	1,053	0,053	0,198
H5	31,67	15,83	0,924	0,046	0,292
H6	18,77	9,38	0,928	0,046	0,495
H7	11,50	5,75	1,013	0,051	0,881
H8	6,97	3,49	1,520	0,076	2,180

Tabla 36: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2204-W; medidas de los extraídos efectuadas con el kit HS (Qubit).

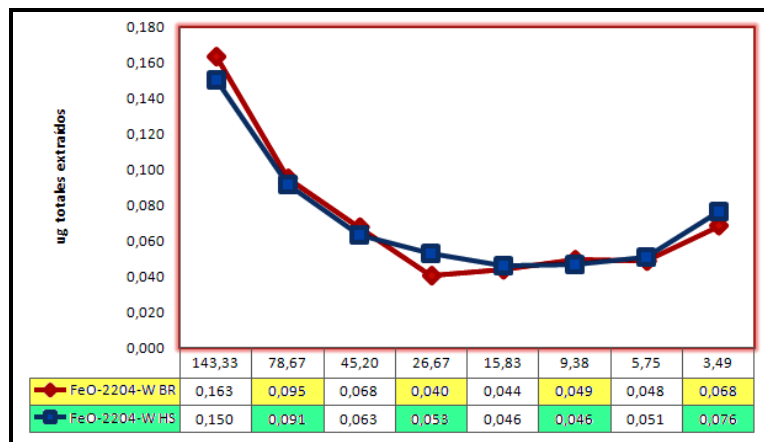


Gráfico 35: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2204-W. Se comparan los resultados obtenidos con los kits BR y HS (Qubit).

Como se puede observar entre los dos tipos de kits no se notan grandes diferencias en los valores de concentración obtenidos.

Los rendimientos de la extracción son bastante bajos, solo en la última muestra, la H8 (de menor concentración inicial) se observa una mejora significativa en el rendimiento.

Precisamente el doble respecto a las de mayor concentración inicial.

5.5.19. Prueba con las partículas FeO-2207-APS

Repetimos el experimento anterior, pero con las partículas FeO-2207-APS, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~8 µg/ml.

El kit BR (Broad Range) del Qubit no es capaz de leer todos los extraídos (debido a sus bajas concentraciones). Por esta motivación tuvimos que volver a medir sus concentraciones con el kit HS (High Sensitivity).

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	302,67	151,33	7,92	0,40	0,26
H2	174,33	87,17	0,60	0,03	0,03
H3	105,67	52,83	0,67	0,03	0,06
H4	59,77	29,88			
H5	35,00	17,50			
H6	22,53	11,27			
H7	13,23	6,62			
H8	8,05	4,02			

Tabla 37: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2207-APS; medidas efectuadas con el kit BR (Qubit).

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	302,67	151,33	2,51	0,13	0,08
H2	174,33	87,17	0,11	0,01	0,01
H3	105,67	52,83	0,21	0,01	0,02
H4	59,77	29,88	0,01	0,00	0,00
H5	35,00	17,50			
H6	22,53	11,27			
H7	13,23	6,62			
H8	8,05	4,02			

Tabla 38: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2207-APS; medidas de los extraídos efectuadas con el kit HS (Qubit).

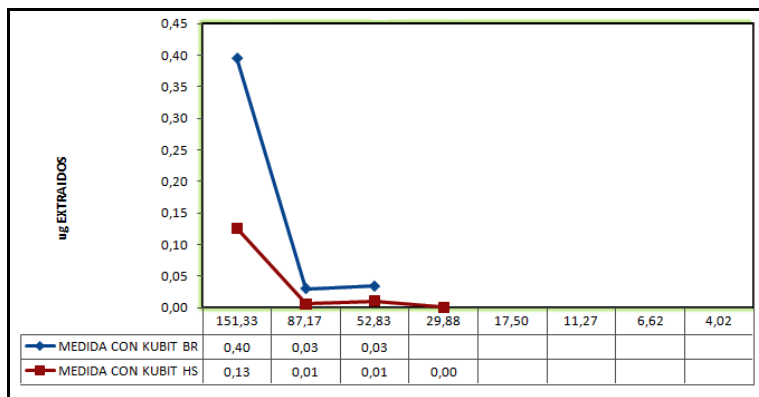


Grafico 36: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2207-APS. Se comparan los resultados obtenidos con los kits BR y HS (Qubit).

Se ve claramente que este tipo de partículas no producen buenos resultados. No somos capaces de detectar la concentración de casi ningún eluido ni con el kit HS. Por esta motivación decidimos de probar otras partículas: las FeO-2206 5 mg/ml, que, como se recordó antes, tienen tamaño y pH parecidos a las TEOS 07, pero su concentración es menor (precisamente la mitad de la TEOS-07).

5.5.20. Prueba con las partículas FeO2206 5mg/ml

Repetimos el experimento anterior, pero con las partículas FeO-2206 5 mg/ml, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 200 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~5 µg/ml.

Resultados

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	213,33	106,67	11,7000	0,58500	0,548
H2	119,33	59,67	0,7307	0,03653	0,061
H3	71,80	35,90	16,4333	0,82167	2,289
H4	40,30	20,15	12,7000	0,63500	3,151
H5	24,23	12,12	12,7000	0,63500	5,241
H6	14,10	7,05	7,4733	0,37367	5,300
H7	8,47	4,23	1,4800	0,07400	1,748
H8	5,15	2,58	1,9600	0,09800	3,803

Tabla 39: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 5mg/ml.

OBSERVACIONES:

Los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve una buena retención de partículas en todos los pocillos menos en el 1 y 2. El dos está totalmente limpio, y en el 1 se ve solo una pequeña turbidez.

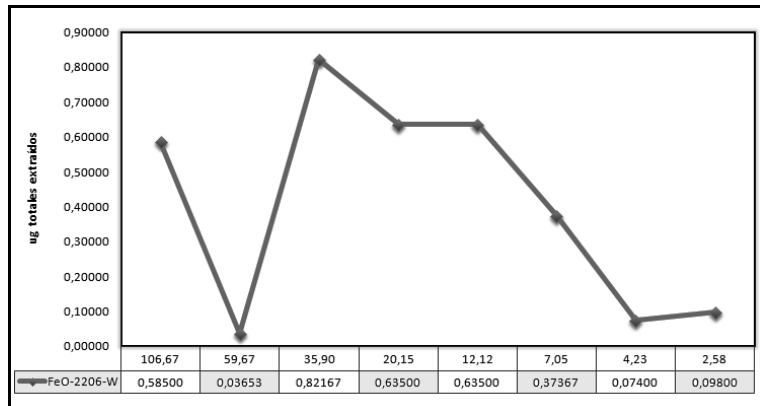


Gráfico 37: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO2206 5mg/ml.

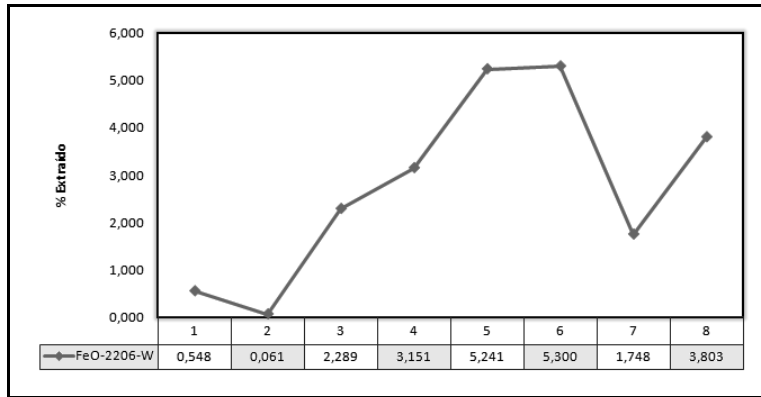


Grafico 38: En este grafico se ilustra el rendimiento % de la extracción.

Utilizando estas partículas se puede observar una mejora significativa en los rendimientos.

5.5.21. Segunda prueba con las partículas FeO2206 5mg/ml

Repetimos el experimento anterior, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente. Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 200 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~5 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	203,33	101,67	33,4667	1,67333	1,646
H2	114,33	57,17	31,8333	1,59167	2,784
H3	64,80	32,40	33,6000	1,68000	5,185
H4	38,70	19,35	32,2000	1,61000	8,320
H5	23,40	11,70	15,6333	0,78167	6,681
H6	14,10	7,05	8,5533	0,42767	6,066
H7	8,17	4,09	7,3167	0,36583	8,956
H8	5,00	2,50	4,1533	0,20767	8,307

Tabla 40: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 5mg/ml.

Resultados

N. B.: los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve buena retención de partículas en todos los pocillos; pero parece ir de menos a más (ligeramente) desde el pocillo 1 al 8.

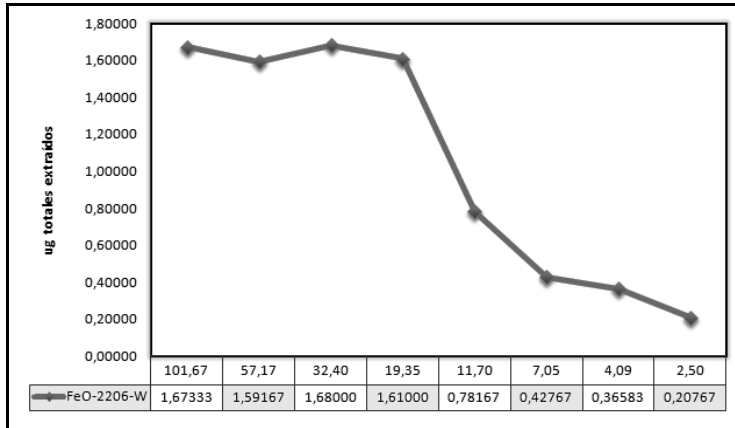


Gráfico 39: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO2206 5mg/ml.

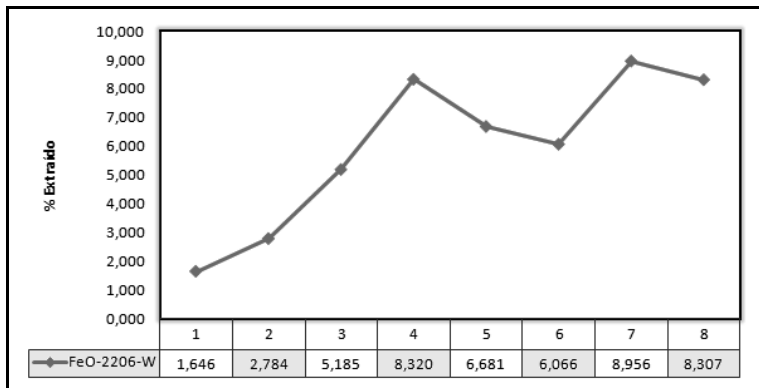


Gráfico 40. En este gráfico se ilustra el rendimiento % de la extracción.

En esta segunda prueba, se puede observar que estas partículas, por si solas, funcionan mucho mejor respecto a las que ya hemos comprobado; incluso los rendimientos obtenidos son parecidos a los que se obtuvieron con las solas partículas paramagnéticas comerciales (Siemens), sobre todo en el rango de 10-20 µg/ml de partida.

Si comparamos las partículas de sola magnetita (FeO-2202-W), con las recubiertas con PAA (FeO-2204-W), y con las FeO-2206 5mg/ml,

recubiertas de sílica, se puede claramente observar que estas últimas funcionan mejor, como también se puede ver en el Grafico 41 y Grafico 42.

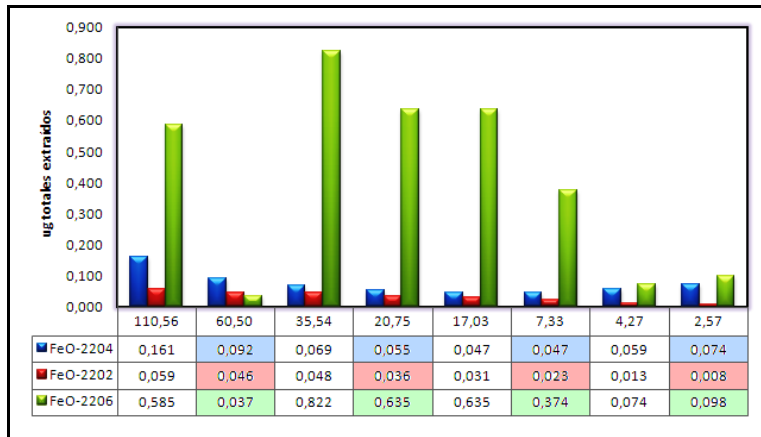


Grafico 41: Resumen de la primera prueba efectuada con cada una de estas partículas.

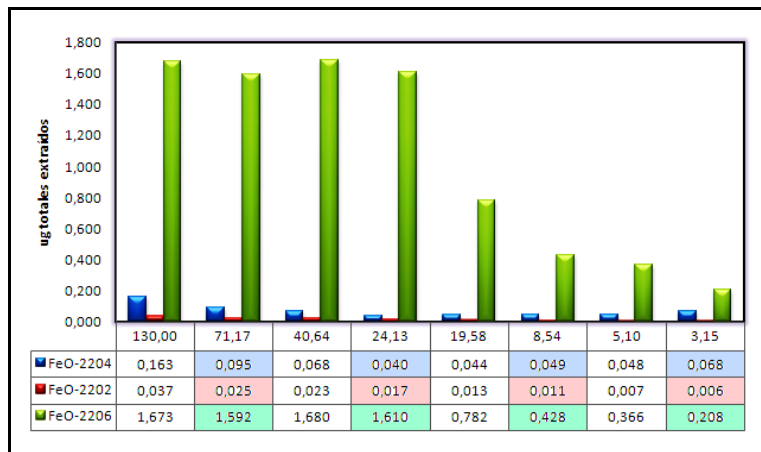


Grafico 42: Resumen de la segunda prueba efectuada con cada una de estas partículas.

Ahora mezclamos las partículas FeO-2206 5 mg/ml con las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens).

5.5.22. Prueba con las partículas FeO-2206 5mg/ml y las partículas paramagnéticas comerciales, Siemens (1:1)

Utilizamos la misma cantidad (1:1) de partículas FeO-2206 5 mg/ml y partículas paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original.

Introducimos 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~7 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	273,33	136,67	31,5333	1,57667	1,154
H2	148,67	74,33	26,6667	1,33333	1,794
H3	87,20	43,60	26,9333	1,34667	3,089
H4	49,33	24,67	12,3333	0,61667	2,500
H5	31,00	15,50	12,3333	0,61667	3,978
H6	17,97	8,98	11,0667	0,55333	6,160
H7	10,77	5,38	6,7267	0,33633	6,248
H8	6,44	3,22	3,5967	0,17983	5,588

Tabla 41: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 5mg/ml y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original (1:1).

N. B.: los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve retención de partículas en todos los pocillos.

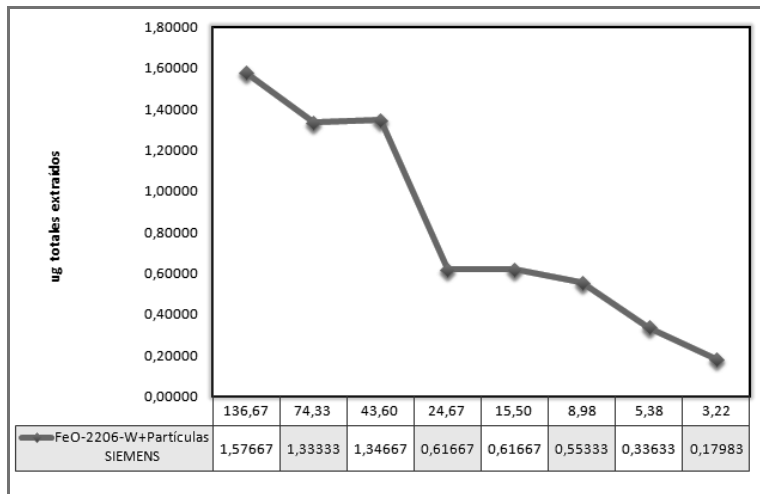


Grafico 43: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO2206 5mg/ml y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original (1:1).

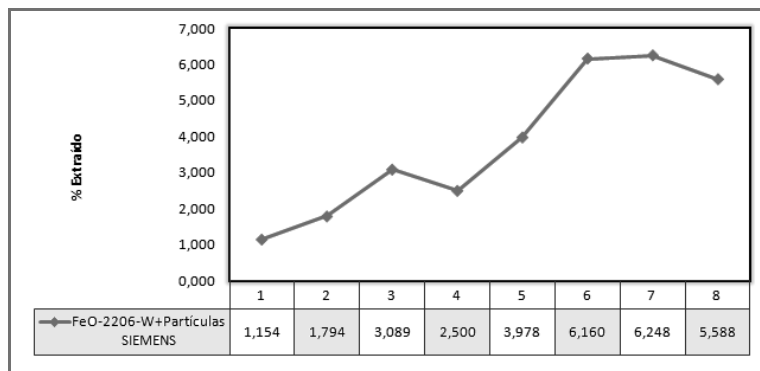


Grafico 44: En este grafico se ilustra el rendimiento % de la extracción.

En los experimentos anteriores se observó que con las partículas FeO-2206 5mg/ml se obtenían rendimientos mayores, pero en esta prueba podemos observar que, mezclando estas partículas con las paramagnéticas comerciales (Siemens), no se observan mejoras evidentes, sobre todo si se compara con la prueba 21.

**5.5.23. Segunda prueba con las partículas FeO-2206
5mg/ml y las partículas paramagnéticas comerciales,
Siemens (1:1)**

Repetimos el experimento anterior por duplicado, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~7 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	290,00	145,00	54,6667	2,73333	1,885
H2	162,00	81,00	47,9333	2,39667	2,959
H3	92,03	46,02	46,4667	2,32333	5,049
H4	54,37	27,18	42,8000	2,14000	7,872
H5	32,63	16,32	43,9000	2,19500	13,453
H6	18,47	9,23	22,6333	1,13167	12,256
H7	11,87	5,93	13,1000	0,65500	11,039
H8	7,09	3,54	6,0000	0,30000	8,467
H9	300,00	150,00	52,00	2,60000	1,733
H10	160,33	80,17	47,10	2,35500	2,938
H11	93,30	46,65	42,53	2,12667	4,559
H12	53,60	26,80	37,50	1,87500	6,996
H13	32,23	16,12	23,43	1,17167	7,270
H14	18,57	9,28	16,83	0,84167	9,066
H15	11,13	5,57	9,23	0,46167	8,293
H816	6,62	3,31	3,24	0,16183	4,889

Tabla 42: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, por duplicado, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 5mg/ml y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original (1:1).

N. B.: Los eluidos de la extracción salen totalmente claros. En la placa de mezcla se ve retención de partículas en todos los pocillos.

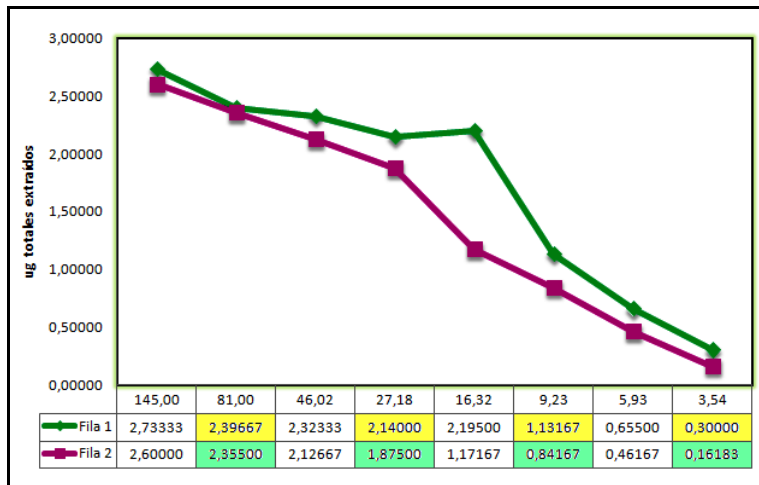


Grafico 45: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO2206 5mg/ml y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original (1:1).

En el Grafico 46 se puede observar el conjunto de los rendimientos en los últimos tres experimentos; considerando que el ultimo se hizo por duplicado, hemos llamado las últimas dos pruebas 2.1 y 2.2.

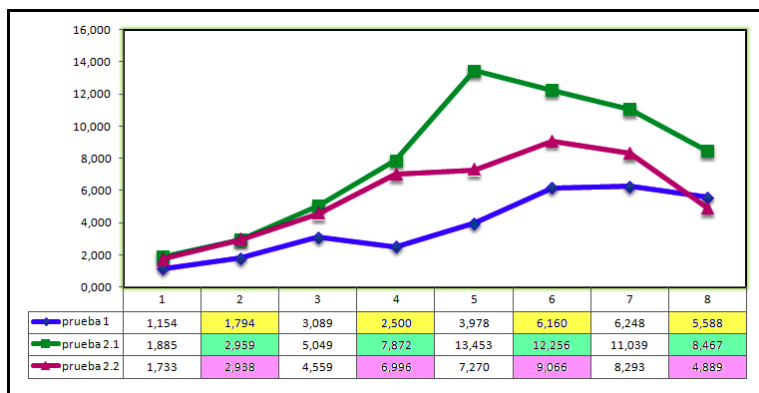


Grafico 46: Resumen de los rendimientos en las últimas tres pruebas que utilizaron 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO2206 5mg/ml y las paramagnéticas comerciales (Siemens), cada una en su Buffer original (1:1).

En los últimos dos experimentos parece ser que mezclando estas partículas con las paramagnéticas comerciales (Siemens), se puede obtener una mejora significativa en los rendimientos, incluso

Resultados

comparado con las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens) por sí solas, sobre todo en el rango de 20 µg/ml de partida.

Introducimos algunos cambios en las partículas y evaluamos si se notan mejoras en la extracción. Las funcionalizamos con APTS (FeO-2206-APS), como también aumentamos su concentración del doble (FeO-2206 10 mg/ml).

5.5.24. Prueba con las partículas FeO-2206-APS

Introducimos 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8), de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~ 7 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	320,00	160,00	0,78	0,04	0,02
H2	175,33	87,67	1,03	0,05	0,06
H3	101,33	50,67	0,65	0,03	0,06
H4	59,30	29,65	0,66	0,03	0,11
H5	34,53	17,27	0,41	0,02	0,12
H6	20,57	10,28			
H7	12,33	6,17			
H8	7,47	3,74			

Tabla 43: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206-APS; medidas efectuadas con el kit BR (Qubit).

El kit BR (Broad Range) del Qubit no es capaz de leer todos los extraídos (debido a sus bajas concentraciones). Por esta motivación tuvimos que volver a medir sus concentraciones con el kit HS (High Sensitivity).

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	320,00	160,00	0,51	0,026	0,02
H2	175,33	87,67	0,44	0,022	0,02
H3	101,33	50,67	0,42	0,021	0,04
H4	59,30	29,65	0,32	0,0161	0,05
H5	34,53	17,27	0,23	0,013	0,07
H6	20,57	10,28	0,07	0,004	0,04
H7	12,33	6,17			
H8	7,47	3,74			

Tabla 44: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206-APS; medidas de los extraídos efectuadas con el kit HS (Qubit).

N. B.: Los eluidos salen claros y las partículas adhieren a la placa de mezcla.

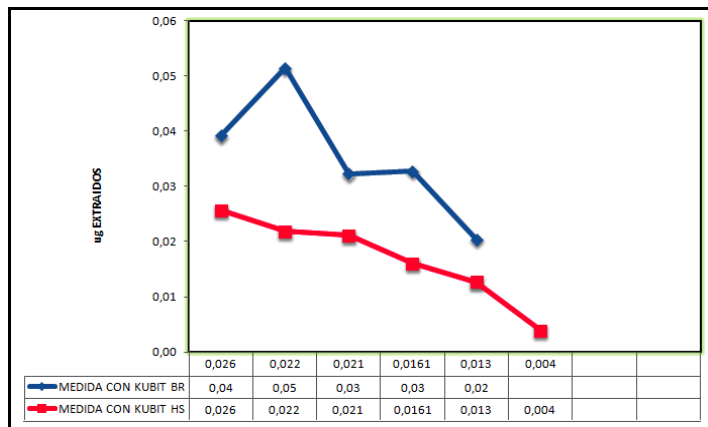


Grafico 47: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206-APS. Se comparan los datos obtenidos con el kit BR y HS.

Resultados

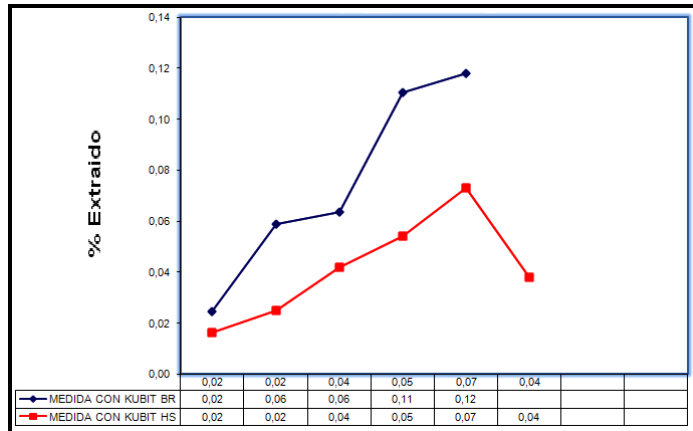


Grafico 48: En este grafico se ilustra el rendimiento % de la extracción. Se comparan los datos obtenidos con el kit BR y HS.

Como se puede observar parece que la funcionalización con APTS no aporta mejoras. Los rendimientos son muy bajos y tampoco con el kit HS del Qubit fuimos capaces de leer todos los extraídos.

Pasamos a analizar otro tipo de partículas, que como ya se explicó, tienen la misma composición de las FeO-2206-W, pero el doble de concentración.

5.5.25. Prueba con las partículas FeO-2206 10 mg/ml

Repetimos el experimento anterior, pero con las partículas FeO-2206 10mg/ml, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente.

Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de ~ 300 µg/ml que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de ~7 µg/ml.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	µg TOTALES INICIALES EN 500 µl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	µg TOTALES FINALES EN 50 µl	RENDIMIENTO %
H1	280,00	140,00	100,0000	5,00000	3,571
H2	153,67	76,83	8,9867	0,44933	0,585
H3	88,67	44,33	7,7933	0,38967	0,879
H4	51,20	25,60	7,4700	0,37350	1,459
H5	31,77	15,88	6,9167	0,34583	2,177
H6	17,77	8,88	3,5533	0,17767	2,000
H7	10,63	5,32	1,6167	0,08083	1,520
H8	6,40	3,20	0,7903	0,03952	1,234

Tabla 45: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 10mg/ml.

Los eluidos salen totalmente claros.

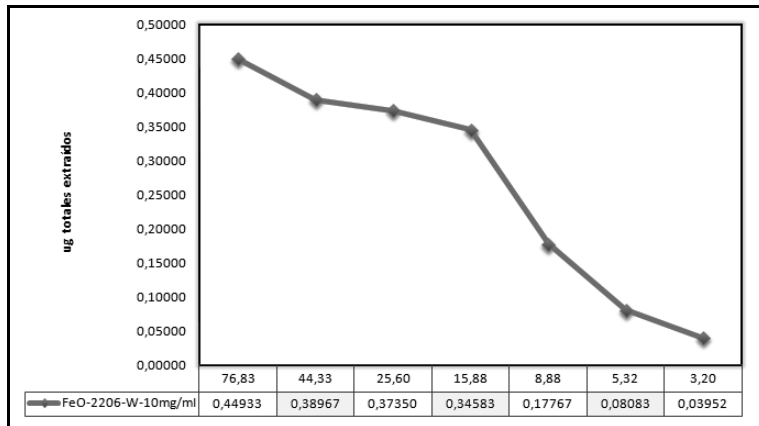


Gráfico 49: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 10 mg/ml. (Se quitó el primer punto: H1, que tenía un rendimiento muy alto).

Resultados

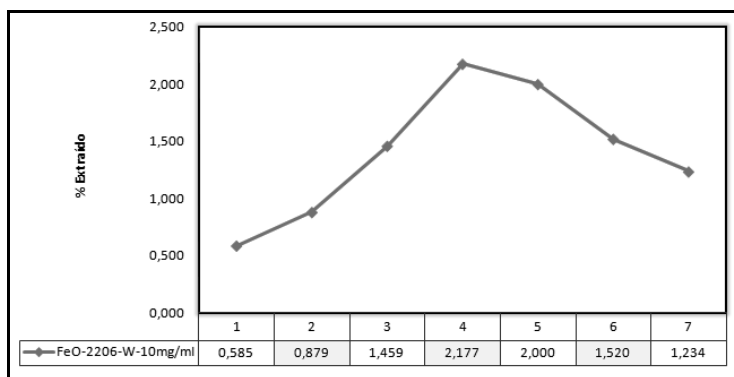


Gráfico 50: En este gráfico se ilustra el rendimiento % de la extracción, sin el primer punto (H1).

Como se puede observar, con este tipo de partículas no tenemos mejoras significativas en términos de rendimiento.

Solo en la primera muestra se observa un insólito rendimiento elevado. Apartando estas muestra, los rendimientos mejores se observaron en el rango entre 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de partida.

5.5.26. Segunda prueba con las partículas FeO-2206 10 mg/ml

Repetimos el experimento anterior, utilizando siempre 8 muestras de plásmido (que van de H1 a H8) de concentración decreciente. Trabajamos con una concentración inicial de plásmido de $\sim 250 \mu\text{g/ml}$, que diluimos 1:2 con T. E. hasta una concentración de $\sim 7 \mu\text{g/ml}$.

	MEDIDA ANTES DE EXTRACCION	μg TOTALES INICIALES EN 500 μl	MEDIDA TRAS EXTRACCION	μg TOTALES FINALES EN 50 μl	RENDIMIENTO %
H1	253,33	126,67	81,6667	4,08333	3,224
H2	136,67	68,33	10,6333	0,53167	0,778
H3	78,03	39,02	23,5667	1,17833	3,020
H4	47,33	23,67	8,7567	0,43783	1,850
H5	37,03	18,52	7,3600	0,36800	1,987
H6	21,77	10,88	5,5033	0,27517	2,528
H7	13,03	6,52	3,0500	0,15250	2,340
H8	7,67	3,84	1,0667	0,05333	1,391

Tabla 46: Extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 10mg/ml.

OBSERVACIONES:

El eluido H1 sale manchado y el H3 un poco oscuro.

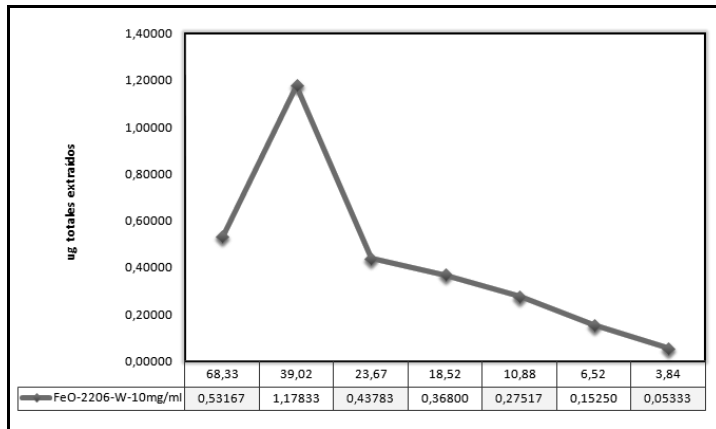


Grafico 51: Ilustración de la extracción con el HAMILTON utilizando 8 muestras, de concentración decreciente, con las partículas de Nanogap: FeO-2206 10 mg/ml. (Se quitó el primer punto: H1, que tenía un rendimiento muy alto).

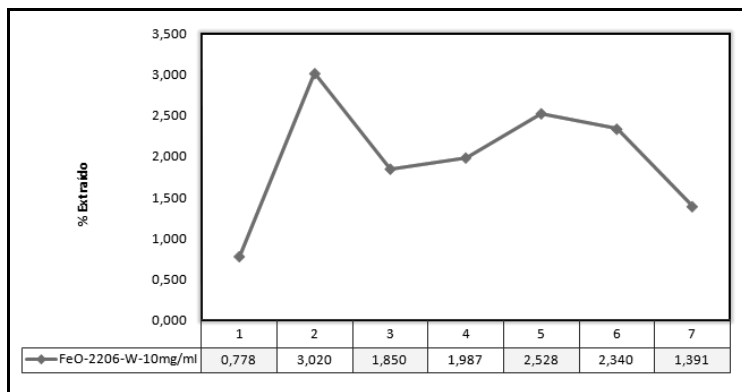


Grafico 52: En este grafico se ilustra el rendimiento % de la extracción, sin el primer punto (H1).

También en esta replica no se notan mejoras significativas. Los rendimientos mejores se observan solo en la muestras H1 y H3, que son las que resultaron manchadas y oscuras. Esto puede ser debido al hecho de que hayan quedado restos de partículas con DNA a estas unidades.

También en este caso, apartando estas dos muestras, los rendimientos mejores se observaron en el rango entre 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de partida.

6. DISCUSIÓN

Las razones que justifican este trabajo son las siguientes:

- La disponibilidad de nuevos antirretrovirales está forzando el análisis de poblaciones minoritarias del virus⁹⁰; dichas poblaciones son reflejo del procedimiento de extracción utilizado.

- El paso de extracción es preliminar al de detección; nuestros flujos de trabajo en el laboratorio hospitalario y la respuesta al clínico están condicionados por el tiempo utilizado en el proceso de extracción. Entre las técnicas automáticas disponibles existen diferencias sustanciales en su duración, desde minutos (MagNa Pure Compact -Roche-) hasta horas (Ampliprep -Roche- y Hamilton - Siemens-).

La mayor parte de los sistemas de extracción automáticos en uso, utilizan nanopartículas magnéticas.

- Las nanopartículas magnéticas utilizan su capacidad de absorción inespecífica como sistema para extraer los ácidos nucleicos y en los diferentes lotes de reactivos presentan capacidades diferentes.

El proceso de extracción en los kits moleculares se basa en un principio “económico” y los diseños han de ser suficientes para obtener una muestra “pura” suficiente para el paso de amplificación, que suele ser la continuación del proceso. El diseño de un método exhaustivo o selectivo es un objetivo todavía difícil de conseguir.

En nuestro trabajo hemos intentado establecer los parámetros de funcionamiento de los sistemas automáticos de extracción más frecuentemente utilizados. Para esto usamos una población estándar de pNL 4.3, que tiene la estructura genómica del VIH-1; la caracterizamos valorando concentraciones, purezas e integridad de los ácidos nucleicos extraídos tras elución desde los distintos métodos.

6.1. Nanopartículas magnéticas

Actualmente hay pocas biotecnologías eficientes para recoger selectivamente los bioanalitos procedentes de matrices biológicas complejas⁹⁶. Gran parte de la investigación se dedica a la utilización de nanomateriales, con el objetivo de mejorar y sobrepasar las técnicas de separación comúnmente usadas en la bioseparación y en la bioanálisis. La síntesis de nanopartículas magnéticas ultrapequeñas y de tamaño uniforme es muy importante por sus numerosas aplicaciones en biología y en medicina⁷².

La separación magnética es una manera muy simple y eficiente que ha sido recientemente utilizada para purificar los ácidos nucleicos⁵¹.

El término “magnético” significa que un material obtiene un momento magnético si puesto en un campo magnético, así que, las partículas que tienen un momento magnético, pueden ser desplazadas fácilmente si se aplica un campo magnético (por ejemplo, usando un imán permanente)⁵⁴.

En los procesos de aislamiento de ácidos nucleicos se prefieren las bolas magnéticas por su grande capacidad de unión⁵¹.

Este tipo de separación, tiene varias ventajas, comparado con las técnicas tradicionales⁵⁴:

⁹⁶ Smith JE y cols., 2006.

- Los ácidos nucleicos pueden ser separados directamente de las muestras, como sangre, tejidos homogenados, medios de cultivo, agua, etc.;
- Las partículas se usan en procesos donde casi nunca hay restricciones respecto al volumen de las muestras;
- Debido a la posibilidad de ajustar las propiedades magnéticas, las partículas pueden ser removidas de manera relativamente fácil y selectiva, incluso de suspensiones viscosas de muestras.

De hecho este tipo de separación es el único método factible para recuperar pequeñas partículas, de diámetro aproximado de 0.05-1 μm , en presencia de restos biológicos u otros materiales de tamaño parecido;

- Por su eficiencia es especialmente idónea para purificaciones en larga escala;
- Sirve como base de varios sistemas automáticos que consiguen ahorrar tiempo y dinero;
- Los pasos de centrifugación pueden ser evitados.

Especialmente idóneas son las partículas superparamagnéticas, que no interaccionan entre ellas en ausencia de un campo magnético. Estas partículas se magnetizan bajo un fuerte campo magnético, pero una vez removidas del campo, no muestran magnetismo permanente⁵⁴.

6.2. La microemulsión inversa

Las microemulsiones inversas pueden ser consideradas como verdaderos nanoreactores, que pueden ser utilizados para llevar a cabo reacciones químicas y para sintetizar nanomateriales^{79, 81}.

Estos nanoreactores proporcionan un ambiente idóneo para controlar la nucleación y el crecimiento. Además, en los últimos pasos del crecimiento, la estabilización estérica proporcionada por la capa de surfactante, previene la agregación de las nanopartículas.

Las microemulsiones son un medio de síntesis transparente, isotrópico y termodinámicamente estable⁸⁰.

En particular, las nanogotas de agua ofrecen un medio limitado de reacción, que controla la forma y la distribución en tamaño de las partículas, que se preparan por precipitación de sales de hierro.

Por otro lado, a pesar de la presencia de surfactantes, normalmente las nanopartículas producidas necesitan varios procesos de lavado y de estabilización, debido a su agregación.

Varios grupos de investigación se han dedicado a estudiar las microemulsiones inversas.

Recientemente, la síntesis de las nanopartículas con el método de la microemulsión, el mecanismo de formación y el crecimiento controlado, se ha vuelto a examinar por Pileni MP y por López-Quintela y sus colaboradores^{77, 78}. Hoy en día, las microemulsiones w/o han sido utilizadas con éxito positivo para producir metales coloidales, materiales superconductores y materiales magnéticos⁷⁷. Nanopartículas con una variedad de nuevas aplicaciones han sido sintetizadas empleando esta técnica⁸¹, que fue también la que se utilizó para sintetizar todas las partículas evaluadas en este trabajo.

6.3. Síntesis de partículas por la separación de ácidos nucleicos

6.3.1. Partículas de oxido de hierro

En la última década la investigación se ha centrado en el uso de muchos tipos de oxido de hierro (sobre todo la maghemita, $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, o la magnetita, Fe_3O_4), procurando obtener tamaños en el orden del nanómetro (5–20 nm de diámetro)⁵⁷.

Entre los dos tipos de oxido, la magnetita puede producir buenos resultados, dado que su biocompatibilidad ha sido anteriormente demostrada.

El solo uso de óxido de hierro (Fe_3O_4) tiene capacidad de adsorber el DNA, pero los agregados que se forman, reducen enormemente la superficie útil por la adsorción⁵⁴.

La estabilización de las partículas de óxido de hierro es crucial para obtener ferrofluidos (dispersiones coloidales de pequeñas partículas magnéticas con dominio único, suspendidas en un fluido⁹⁷) magnéticos coloidales estables frente a la agregación sea en los medios biológicos, que en el campo magnético⁷⁴.

La estabilidad de las suspensiones magnéticas coloidales es el resultado del equilibrio entre las fuerzas atractivas y las repulsivas.

Actuando sobre una o ambas fuerzas repulsivas (la electrostática y la estérica), se puede lograr a estabilizar las partículas magnéticas.

Ha sido demostrado que la formación de revestimientos pasivos con materiales inertes, como polímeros orgánicos o materiales inorgánicos, en la superficie de nanopartículas de óxido de hierro puede ayudar a prevenir sus agregaciones⁷⁶, facilitando las fuerzas repulsivas entre partículas⁹⁸, y mejorar su estabilidad química. Por este motivo es tan importante modificar superficialmente las nanopartículas, como ha sido llevado a cabo en este trabajo.

También el tipo de revestimiento utilizado es muy importante; de hecho su composición, además que actuar sobre la resistencia a la agregación, afecta a muchas propiedades, como por ejemplo, la reactividad, la estabilidad química y la toxicidad (si utilizadas en administración de fármacos).

Modificaciones específicas permiten aislar proteínas o DNA, así como la separación magnética de células⁹⁹.

6.3.2. Tipos de revestimientos

Hasta ahora muchos artículos han analizado la producción de microesferas magnéticas con cubiertas orgánicas (polímeros sintéticos y macromoléculas naturales) y con cubiertas inorgánicas de sílica, oro y

⁹⁷ Lin CL y cols., 2005.

⁹⁸ Golas PL y cols., 2010.

⁹⁹ Xu F y cols., 2011.

gadolinio (III)^{57, 74, 76}.

En este estudio se han evaluado tanto los revestimientos orgánicos (utilizando el PAA), cuanto los revestimientos inorgánicos (utilizando sílica).

6.3.2.1. Revestimientos inorgánicos

Estos revestimientos confieren estabilidad en solución y además ayudan a unirse a varios ligandos biológicos en superficie^{74, 100, 101}.

6.3.2.1.1. Revestimientos de sílica

Durante los últimos años recubrir las partículas magnéticas con sílica se ha convertido en un desarrollo muy prometedor en la mejora de las aplicaciones tecnológicas de dichas partículas magnéticas¹⁰².

Las superficies de las partículas magnéticas, una vez recubiertas de sílica, pasan a ser de hidrofóbicas a hidrofílicas y, se pueden evitar la atracción magnética dipolar entre partículas y su consiguiente agregación¹⁰³.

Comparando los varios tipos de revestimientos pasivos, la sílica posee tres ventajas⁷⁶:

- ✓ posee buena estabilidad y puede ser utilizada en soluciones orgánicas e inorgánicas sin hincharse;
- ✓ es biocompatible y puede ser fácilmente usada en los campos de la ciencias de la vida;
- ✓ los revestimientos poseen grandes cantidades de silanol en las terminaciones, que pueden proporcionar varios grupos funcionales a la superficie de las microesferas magnéticas^{76, 102, 103}. Esto significa, que las superficies de sílica pueden ser fácilmente funcionalizadas, lo que hace que puedan ser empleadas en un amplio número de

¹⁰⁰ Lu Y y cols., 2002.

¹⁰¹ Bonini M y cols., 2006.

¹⁰² Deng YH y cols., 2005.

¹⁰³ Lien YH y cols., 2008.

aplicaciones¹⁰¹.

Estos revestimientos estabilizan las nanopartículas de magnetita de dos maneras diferentes⁷⁴:

- ➔ protegiendo la interacción del dipolo magnético, recubriéndolo con sílica,
- ➔ y están cargadas negativamente.

Debido a su carga negativa, la unión con el DNA, también cargado negativamente a pH 7 a causa de los grupos fosfato, se hace posible bajo condiciones caotrópicas, como ha sido sobradamente demostrado en literatura^{83, 104}.

Fue en base a todos estos factores, por lo que escogimos, entre los inorgánicos, este revestimiento.

6.3.2.2. Revestimientos orgánicos

Para las cubiertas orgánicas se suelen utilizar ligandos o preparados con biopolímeros que muestran afinidad por el ácido nucleico^{51, 54}.

Los polímeros basados en PVP (polivinilpirrolidona), en PLGA [ácido poli (láctico-co-glicólico)], (polietilen-glicol), PAA (ácido poliacrílico) etc. son ejemplos de polímeros sintéticos, mientras los naturales incluyen el uso de gelatina, dextrano, quitosán, etc⁵⁷.

6.3.2.2.1. Polímeros sintéticos: el PAA

El PAA es un polímero soluble en medio acuoso; es muy interesante para el sector de la biomedicina, debido a su elevada densidad de grupos funcionales que pueden formar complejos poliméricos flexibles⁸².

¹⁰⁴ Bruce IJ y cols., 2004.

En las nanopartículas compuestas solo de magnetita, la agregación y la formación de “clusters” (grupos de nanopartículas) ocurren a concentraciones más elevadas, pero a bajas concentraciones aun se pueden observar importantes interacciones dipolares.

Se ha demostrado que los revestimientos con PAA, entre otras características, estabilizan las nanopartículas superparamagnéticas (SPM) en un medio acuoso, mediando las interacciones dipolares entre las mismas.

Por ejemplo Lin y sus colaboradores⁹⁷ prepararon ferrofluidos superparamagnéticos de Fe_3O_4 , y los estabilizaron con PAA.

Nuestros resultados demuestran lo que ha sido publicado previamente: los oligómeros de PAA proporcionan tanto la repulsión electrostática como la estérica, evitando así la agregación entre partículas.

Debido a estas características químicas, los complejos coloidales PAA-magnetita son unos sistemas que pueden proporcionar buenos resultados, en el campo de las bionanotecnologías avanzadas. Por esta motivación escogimos, entre los orgánicos, este revestimiento.

6.3.3. Funcionalización de nanopartículas

También ha sido demostrado que la sílica, por si sola es reactiva, pero propensa a una rápida contaminación⁸⁶.

Como se comentó antes, una de las ventajas de las partículas magnéticas recubiertas de sílica es que pueden ser fácilmente funcionalizadas¹⁰¹ y poseen grandes cantidades de silanol en las terminaciones, que pueden unirse a ligandos específicos en la superficie de las microesferas magnéticas^{76, 102, 103}.

El uso de partículas magnéticas funcionalizadas en los procesos de separación del DNA humano han proporcionado muchas más ventajas respecto a los procesos convencionales que utilizan sílica¹⁰⁵, y han sido utilizadas en un amplio rango de aplicaciones biomédicas: como sistemas de administración de fármacos, en la inmovilización de

¹⁰⁵ Park ME y cols., 2007.

enzimas y proteínas, en diagnósticos, en detección de marcadores biológicos, en la purificación de DNA y RNA.

6.3.3.1. Silanos Organofuncionales

Los Aminopropilalcoxisilanos, vienen desde hace tiempo siendo utilizados para hacer de puente entre dos moléculas, debido a su bifuncionalidad⁸⁵.

La habilidad de los silanos, como el 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), de formar enlaces siloxánicos, reaccionando con los grupos hidroxilo del silanol, los hace útiles en la funcionalización de varias superficies como la sílica¹⁰⁶, el vidrio y los óxidos metálicos. Los hidroxilos de su superficie pueden reaccionar con los grupos químicamente reactivos del silano¹⁰⁷.

El (APTES) y el 3-aminopropildimetiletóxisilano (APDMES) son dos de los aminosilanos comúnmente utilizados⁸⁵.

En este trabajo decidimos utilizar el APTES.

Este último se he usado más, respecto al dialcoxisilano APDMES, por su bajo coste. Tiene tres grupos etoxi y es capaz de polimerizar en presencia de agua, lo cual puede originar varias estructuras superficiales: enlace covalente, autoensamblaje bidimensional (polimerización horizontal), o multicapa (polimerización vertical).

La presencia del grupo amínico funcional ofrece a los aminopropilalcoxisilanos propiedades únicas.

Este grupo puede catalizar, inter o intramolecularmente, la reacción entre las moléculas del silano y los grupos silanol de superficie, para formar enlaces siloxánicos (Si-O-Si).

Por otro lado, es ideal para unir el DNA al sustrato sólido⁸⁶ (superficies de sílica o de vidrio).

¹⁰⁶ Roy S y cols., 2010.

¹⁰⁷ Krasnoslobodtsev AV y cols., 2002.

Discusión

Silanizar sustratos de sílica con un aminosilano proporciona sitios superficiales reactivos que deberían ser adecuados para enlazar covalentemente los oligodesoxirribonucleotidos, originando amino grupos espaciadores (NH₂–(CH₂)₆–) en la posición 5'¹⁰⁸.

Se sabe que tanto las interacciones electrostáticas como las hidrofóbicas son las principales fuerzas que guían la absorción de proteínas en las superficies solidas/liquidadas⁸⁶.

De todas formas, poco se sabe acerca de como estas interacciones afectan al comportamiento interfacial de las moléculas del DNA (de cadena sencilla o de doble cadena).

El pH del medio en el cual están presentes los oligonucleótidos tiene un fuerte impacto sobre la cantidad de material absorbido y retenido en los sustratos amínicos.

Tenemos que recordar que el DNA es una molécula polianionica, cargada negativamente, debido a la presencia de los grupos fosfato, por lo tanto viene convenientemente atrapada en una resina polimérica u otro soporte (metal) inorgánico con grupos funcionales de carga positiva¹⁰⁵.

Ha sido demostrado que los oligonucleótidos de DNA en solución interaccionan con los sustratos tratados con aminopropilsilano a través de interacciones iónicas⁸⁶.

La superficie de nanopartículas, modificadas con APTS, debería estar cargada positivamente a pH 7, y en este caso la absorción del DNA debería verificarse mediante interacciones electrostáticas atractivas entre la superficie y los grupos fosfato cargados negativamente, como ha sido previamente observado también por Bruce y sus colaboradores⁸³.

¹⁰⁸ Balladur V y cols., 1997.

6.4. Aplicabilidad y utilidad práctica de los resultados

Las construcciones derivadas de este proyecto son susceptibles de otros usos potenciales además de los previstos para mejora de la sensibilidad de nuestro método de análisis fenotípico de infección por VIH-1, estos usos incluyen su posible uso como adyuvante terapéutico o la mejora de vectores lentivirales y pseudotipos para terapia génica.

Por otra parte, pensamos que las construcciones pueden ser de interés para otros grupos que trabajan en temas similares.

El estudio de las condiciones de extracción permitirán optimizar los flujos de trabajo en nuestros laboratorios hospitalarios, acortando en muchos casos nuestros tiempos de respuesta.

Las partículas desarrolladas son útiles para mejorar y estandarizar nuestros sistemas de diagnóstico en VIH y podrán servir para diseñar un sistema que combine la extracción con la detección sobre una sola plataforma.

6.5. Perspectivas futuras

Pensamos seguir mejorando los resultados obtenidos cambiando la composición de las partículas (sea con partículas metálicas o bimetálicas) y trabajando directamente con viriones (lo que comporta utilizar RNA en vez de DNA).

6.6. Posibilidad de que la investigación propuesta conduzca a patentes y otros resultados explotables comercialmente

Pensamos que los diseños de nanopartículas serán susceptibles de patentes, pero en los desarrollos actuales y el uso de amplificación isotérmica, el objetivo potencial sería desarrollar el rendimiento y la especificidad en la funcionalización de las nanopartículas diseñadas para la extracción.

7. CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó un estándar basado en construcciones del plásmido pNL4.3 para valorar los procesos de extracción automática y se compararon las concentraciones de los ácidos nucleicos extraídos.
- ✓ Tras comparar varios sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos utilizados en la práctica clínica, decidimos utilizar el Hamilton (Versant® kPCR, Siemens) para evaluar las distintas partículas magnéticas a nuestra disposición.
- ✓ Hemos comprobado que este aparato extrae mejor a bajas concentraciones de muestra, tiene una reproducibilidad bastante constante y, además es un sistema abierto. Esta es una gran ventaja, que nos permite poder introducir en el sistema las partículas que queremos estudiar.
- ✓ Hemos validado y comparado varios tipos de nanopartículas magnéticas de características y tamaños diferentes: FeO-2202-W (17 nm), TEOS-07 B (41 nm), TEOS-07 (20 nm), FeO-2204- (10,5 nm), FeO-2207-APS (47 nm), FeO-2206-W 5mg/ml (26 nm), FeO-2206-APS (24 nm), FeO-2206 10 mg/ml (20 nm).
- ✓ Entre todas las partículas analizadas las que extraen mejor son sin duda las FeO-2206 5mg/ml; fue solo con estas partículas que se obtuvieron rendimientos incluso comparables con los de las partículas paramagnéticas comerciales (Siemens).
- ✓ De esta forma hemos conseguido lotes de partículas estándar, alternativas que pueden evitar variabilidad en nuestro trabajo con el VIH.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I

FLUOROMETRIA QUBIT (Véase también pág.- 83 -).

Los dobles enlaces conjugados de las bases nitrogenadas hacen que los ácidos nucleicos (AN) absorban luz ultravioleta (UV).

Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm y las proteínas a 280 nm¹⁰⁹.

En las preparaciones de los AN, son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobrestimaciones de la concentración de AN.

El cociente de absorbancia a 260/280 se utiliza para valuar la pureza del DNA¹¹⁰ y del RNA. Se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan cociente de 1.7-2 por el DNA, y 2 por el RNA.

Cocientes menores indican la presencia de proteínas en el medio, mientras cocientes mayores indican la presencia de otras sustancias contaminantes, como etanol.

La cuantificación por espectrofotometría UV brinda una herramienta de valor, pero se debe tener en cuenta que el espectrofotómetro mide también los otros componentes presentes en la muestra¹¹¹. Esto suele generar desvíos en la medición y producir graves problemas en las aplicaciones posteriores.

Actualmente, esto puede resolverse de manera fácil, conveniente y rentable utilizando la Plataforma de Cuantificación **Qubit** (*Invitrogen*), que se basa en la fluorometría.

¹⁰⁹ Voet D y cols., 2006.

¹¹⁰ Jiménez Escrig A, 2003.

¹¹¹ Invitrogen Argentina S.A., 2007.



Figura 50: Qubit (Invitrogen Argentina S.A., 2007.).

La fluorimetría provee **selectividad**.

La Plataforma de Cuantificación Qubit de hecho consiste en un Fluorómetro Qubit y kits de Tecnología Quant-iT.

Dichos kits emplean colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al DNA, RNA o Proteínas (Tabla 47).

Product	Sample selectivity	Applications
Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit, *0.2–100 ng*	dsDNA samples ranging from 10 pg/μl to 100 ng/μl	Genomic DNA Viral dsDNA Rare DNA PCR products
Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit, *2–1000 ng*	dsDNA samples ranging from 100 pg/μl to 1000 ng/μl	Plasmid preps Subcloning fragments DNA for transfections
Quant-iT™ RNA Assay Kit, *5–100 ng*	RNA samples ranging from 250 pg/μl to 100 ng/μl	Microarray samples Real-time PCR samples
Quant-iT™ Protein Assay Kit, *0.25–5 μg*	Protein samples ranging from 12.5 μg/ml to 5 mg/ml	PAGE gels Western blots Activity assays

Tabla 47: kits de Tecnología Quant-iT (Invitrogen Argentina S.A., 2007, modificada).

Los kits que hemos utilizados en nuestro trabajo son el Quant it™ dsDNA BR (Broad Range) y el Quant it™ dsDNA Hs (High Sensitivity) kit.

Estos colorantes son específicos para sus targets y no se acoplan a contaminantes como fenol, sales, cloroformo y/o nucleótidos libres. El resultado es una lectura de fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de producto que el investigador tiene interés en cuantificar (DNA, RNA o Proteínas).

La lectura se obtiene directamente en la pantalla del Instrumento sin

necesidad de graficar curvas, asegurando un mayor éxito de las aplicaciones posteriores.

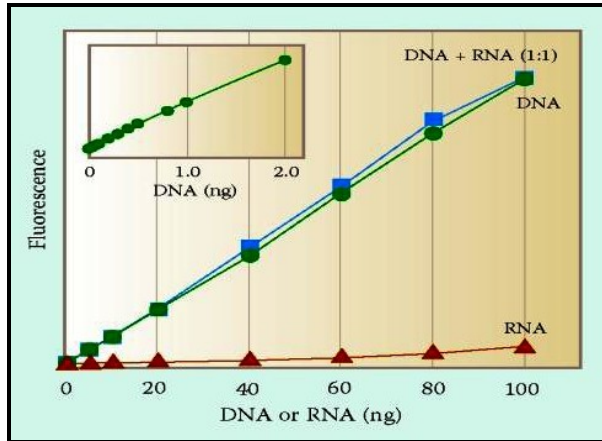


Figura 51: Quant-it™ HS kit (Invitrogen Argentina S.A., 2007).

8.2. ANEXO II

PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS SISTEMAS DE EXTRACCION UTILIZADOS (Véase también pág.- 83 -)

Sistemas automáticos:

- Cobas Ampliprep[®] (CAP, Roche)

Este instrumento permite realizar la extracción del ácido nucleico a partir de la muestra de una forma específica, de modo que el operador sólo tiene que cargar las muestras, los reactivos, programar la lista de trabajo y dar la orden de comienzo¹¹².

El CAP utiliza un tubo de muestra de 2 ml que debe contener entre 250 µl y 1.100 µl de suero o plasma. Esta muestra la dispensa en la cubeta de reacción junto con el estándar de cuantificación (QS), el tampón de lisis y la sonda de captura específica para cada ácido nucleico a extraer. Esta mezcla de reacción se incuba a 60 °C durante 15 minutos. A lo largo de este tiempo se produce la lisis de la cápside viral y por lo tanto la liberación del ácido nucleico del virus (Véase Figura 52).

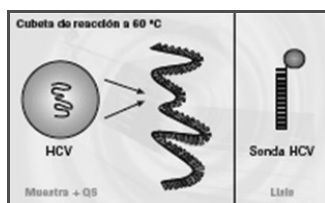


Figura 52: liberación del ácido nucleico (Sanz Uriarte JM, 2001).

A continuación, el brazo de transferencia del CAP coloca la cubeta de reacción en el incubador a 37 °C. El descenso de temperatura induce la hibridación entre el ácido nucleico liberado y la sonda específica de captura, biotilada. Esta sonda, diseñada con la misma secuencia que uno de los cebadores, se encargará de realizar la amplificación del fragmento del ácido nucleico, con lo que se garantiza que solamente el

¹¹² Sanz Uriarte JM, 2001.

ácido nucleico buscado sea pipeteado posteriormente en el tubo de amplificación.

Así se garantiza la máxima especificidad en el proceso.

Una vez alcanzados los 37 °C, el CAP pipetea una dilución de micropartículas magnéticas que llevan fijadas las moléculas de estreptavidina. La cubeta de reacción se incuba a 37 °C para que se produzca la unión de la estreptavidina con la biotina de la sonda de captura. Al final de esta segunda incubación se habrán formado los complejos “micropartícula magnética – estreptavidina – biotina – sonda de captura – ácido nucleico” de micropartículas magnéticas (Véase Figura 53).

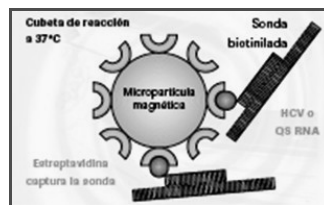


Figura 53: micropartícula magnética – estreptavidina – biotina – sonda de captura del ácido nucleico, de micropartículas magnéticas (Sanz Uriarte JM, 2001).

Formado este complejo y por lo tanto extraído el ácido nucleico, llega el momento de aislarlo y purificarlo. Para ello la cubeta de reacción se coloca en la posición de lavado, donde se conectan unos imanes que fijarán las partículas magnéticas y, con ellas el complejo formado, a la pared de la cubeta de reacción. El Cobas AmpliPrep aspira líquido de la cubeta y dispensa la solución de lavado, tras lo cual aspira todo el líquido dejando la cubeta seca y con los complejos unidos a las micropartículas magnéticas en el fondo del tubo.

El último paso que realiza el CAP es la colocación de la cubeta de reacción en la posición de resuspensión y el pipeteo del diluyente de muestra en la misma, con lo que queda finalizado el proceso.

De este modo, al cabo de una hora, el CAP ha realizado la extracción del ácido nucleico.



Figura 54: Imagen Ampliprep (Sanz Uriarte JM, 2001).

- **MagNa Pure Compact (Roche)**

El MagNAPure Compact es un sistema de extracción de pequeño tamaño basado en el uso de partículas magnéticas que permiten el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos (DNA, RNA)¹¹³.

El ácido nucleico obtenido es altamente puro y puede ser usado en múltiples aplicaciones, tales como PCR, secuenciación etc.

Las muestras y los reactivos se identifican mediante código de barras, lo que permite su seguimiento durante todo el proceso, y garantiza la ausencia de contaminación cruzada mediante filtros HEPA y descontaminación por rayos UV.

El número de muestras es flexible, de 1 a 8, y su extracción, dependiendo del protocolo usado, se completa en un máximo de 30 minutos.

Es posible trabajar con un amplio rango de muestras (sangre total, suero, plasma, tejidos, células en cultivo, etc.), y con volúmenes iniciales de 100 a 1000 µl, que se eluyen en 50-200 µl de tampón de elución.

¹¹³ Roche. es, 2012.



Figura 55: Imagen del Pure Compact¹¹⁴ (The new MagNA Pure Compact System, 2003).

El principio del funcionamiento de este aparato se puede ilustrar en la Figura 56.

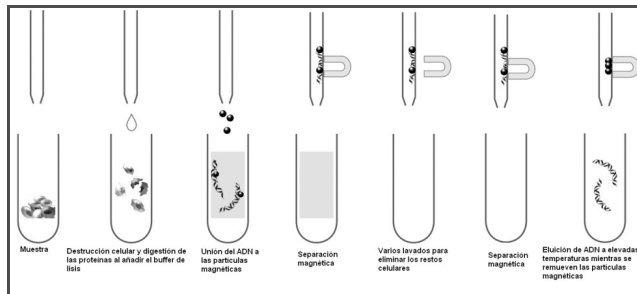


Figura 56: Pasos de la extracción en el MagNa Pure (The new MagNA Pure Compact System, 2003, modificada).

- Hamilton (Versant® kPCR, Siemens)

El Versant® kPCR emplea una propia tecnología de extracción de ácidos nucleicos, que proporciona precisión, máxima productividad y fiabilidad de resultados.

La flexibilidad del sistema en combinación con un amplio menú nos da la posibilidad de realizar una amplia gama de determinaciones cuantitativas y cualitativas en el diagnóstico molecular¹¹⁵.

¹¹⁴ The new MagNA Pure Compact System, 2003.

¹¹⁵ Siemens Healthcare Diagnostics Inc, 2007-2012.



Figura 57: Imagen del Versant® kPCR (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, 2007-2012).

Las características principales se pueden así resumir:

- El protocolo de extracción universal que utiliza para ADN y ARN hace posible el uso de una amplia variedad de tipos de muestra.
- Usa partículas magnéticas recubiertas de sílica que garantizan una mayor eficiencia en la extracción, respecto a sistemas que no las utilizan.
- La tecnología de automatización avanzada y el formato de placa de 96 pocillos permiten un procesamiento más rápido de las muestras.
- Permite el seguimiento de la muestra desde el tubo hasta el resultado durante el tiempo de proceso.
- Un control de contaminación efectivo maximiza la calidad del resultado.

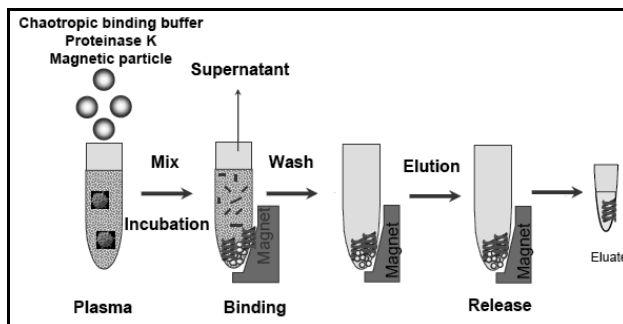


Figura 58: Pasos de la extracción en el Hamilton (Hennig G, 2008, modificada).

8.3. ANEXO III

PIROSECUENCIACION (Véase también pág.- 83 -)

La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación basada en el método de síntesis¹¹⁶. Esta técnica permite la detección en tiempo real usando un sistema de cascada enzimática, que consiste de cuatro enzimas y sustratos específicos, que producen luz cuando un nucleótido forma un par de bases (se une) con el nucleótido complementario en la hebra de ADN.

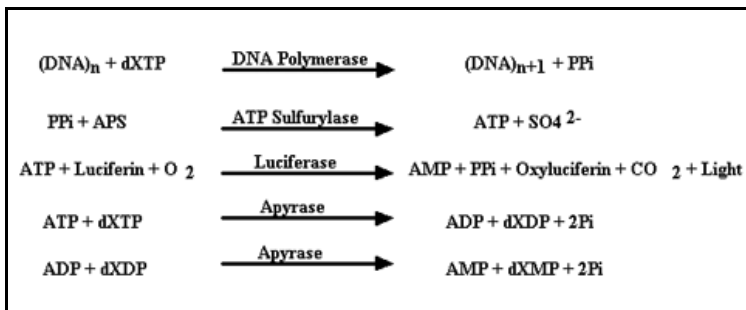


Figura 59: Representación esquemática de las reacciones enzimáticas en la pirosecuenciación (Ronaghi M y cols., 2002, modificada).

Esta técnica se basa en la detección y liberación de pirofosfato inorgánico (PPI) durante la síntesis de ADN¹¹⁷. En la cascada de reacciones enzimáticas, se genera luz visible proporcional al número de nucleótidos incorporados.

La cascada empieza con una reacción de polimerización del ácido nucleico, en la cual se libera pirofosfato inorgánico (PPI), como resultado de la incorporación de un nucleótido por acción de la polimerasa. La ADN polimerasa añade un solo nucleótido a la parte final del cebador de secuenciación¹¹⁸.

Si se añade una base complementaria, la polimerasa extiende el

¹¹⁶ Ronaghi M, 2003.

¹¹⁷ Ronaghi M y cols., 2002.

¹¹⁸ Steinberg KM y cols., 2008.

Anexos

cebador, pero si se encuentra con una base no complementaria, la reacción se interrumpe hasta que se añada la base complementaria correcta.

Luego (en la segunda reacción), el PPI liberado es convertido en ATP por la ATP sulfurilasa que produce la energía necesaria para que la luciferasa pueda oxidar la luciferina y generar luz¹¹⁷ (tercera reacción).

En la cuarta reacción, se utiliza la apirasa para eliminar los nucleótidos que no se han incorporado y ATP.

La eliminación de los nucleótidos por parte de la apirasa, es un paso necesario para secuenciar cíclicamente por síntesis.

La segunda, tercera y cuarta reacción se verifican solo si el nucleótido apropiado es añadido e incorporado a la hebra complementaria.

De momento que se conoce la identidad del nucleótido añadido, la secuencia molde se puede deducir con el análisis del programa.

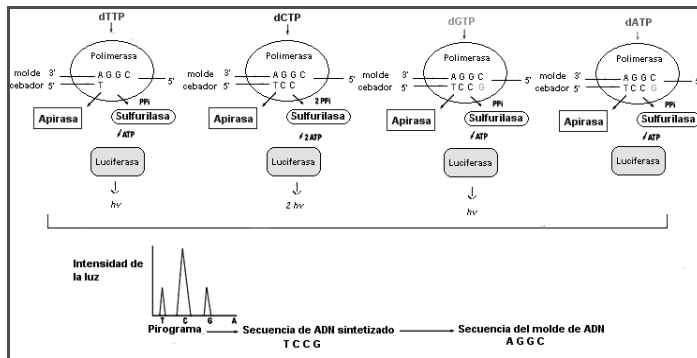


Figura 60: Determinación de un fragmento de secuencia con la pirosecuenciación (Steinberg KM y cols., 2008, modificada).

La pirosecuenciación puede ser utilizada para secuenciar de novo, resecuenciar, genotipado y determinar secuencias de ADN con estructuras secundarias de ADN de difícil interpretación.

Esta técnica es actualmente uno de los métodos más rápidos para secuenciar productos de PCR, a pesar de que lee distancias muy cortas, de unas 100-200 bases.

8.4. ANEXO IV

Protocolo Miniprep (Véase también pág. - 78 -)

El protocolo de Cultek (Machery Nagel) prevé los siguientes pasos⁹³:

- ✓ Utilizar entre 1 y 5 ml del cultivo celular en LB, y centrifugar en una microcentrífuga durante 30 segundos a 11.000 x *g*, para que se forme un pellet;
- ✓ Por la lisis celular:
 - Añadir 250 µl de Buffer A1 y resuspender completamente el pellet, asegurándose de que no queden restos celulares antes de añadir el Buffer A2;
 - Añadir 250 µl de Buffer A2 (asegurarse de que no hayan precipitados blancos en el Buffer, si los hay calentarlo a 30-40°C por algunos minutos antes de usar) e invertir el tubo entre 6 y 8 veces;
 - Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos o hasta que el lisado aparezca claro;
 - Añadir 300 µl de Buffer A3 e invertir el tubo entre 6 y 8 veces. No “vortear” para tener cuidado con el DNA genómico.
- ✓ Por purificar el lisado:
 - Centrifugar a 11.000 x *g* durante 5 minutos. Repetir este paso si el sobrenadante no aparece limpio.
- ✓ Para la unión del DNA:
 - Coger como máximo 750 µl de sobrenadante del paso anterior y poner en una columna NucleoSpin® Plasmid, que hay que colocar dentro de un Tubo de recogida (Collection Tube) de 2 ml y, centrifugar a 11.000 *g* durante 1 minuto;
 - Eliminar el sobrenadante y volver a poner la columna en el tubo; Repetir este paso para recoger el restante lisado.
- ✓ Para lavar la membrana de sílica:
 - Si el DNA se preparó a partir de cepas que contienen elevados niveles de nucleasas (como las series HB101 0 JM) es severamente recomendado efectuar un lavado adicional con 500 µl del Buffer AW precalentado a 50 °C y centrifugar a 11.000 x *g* durante 1 minuto, antes

Anexos

de proceder con el paso siguiente. El Buffer AW está recomendado también porqué incrementa la lectura de los fragmentos de DNA durante las reacciones de secuenciación y los rendimientos de las reacciones enzimáticas críticas;

- Añadir 600 µl de Buffer A4 (al que hay que añadir previamente etanol) y centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto;
- Eliminar el sobrenadante y volver a colocar la columna NucleoSpin® Plasmid en el mismo tubo de recogida ahora vacío.
- ✓ Para secar la membrana de sílica:
 - Centrifugar a 11.000 x g durante 2 minutos y tirar el tubo de recogida;
 - Los residuos de etanol del Buffer de lavado pueden inhibir reacciones enzimáticas.
- ✓ Para eluir el DNA:
 - Colocar la columna NucleoSpin® Plasmid en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (no provisto en el kit) y añadir 50 µl del Buffer AE;
 - Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto;
 - Centrifugar a 11.000 x g durante 1 minuto.

Component	Hazard contents
A2	Sodium hydroxide < 2%
A3	Guanidinium hydrochloride
AW	Guanidinium hydrochloride + isopropanol < 25%
RNase A	RNase A, lyophilized

Tabla 48: Se ilustra la composición de los principales Buffers utilizados (Machery-Nagel, 2009, modificada).








1 Cultivo celular		11,000 x g 30 s
2 Lisis celular		250 µl Buffer A1 250 µl Buffer A2 RT, 5 min 300 µl Buffer A3
3 Purificación del lisado		11,000 x g 5-10 min
4 Unión del DNA		coger el sobrenadante 11,000 x g 1 min
5 Lavar la membrana de sílica		<i>(Optional: 500 µl Buffer AW)</i> 600 µl Buffer A4 11,000 x g 1 min
6 Secar la membrana de sílica		11,000 x g 2 min
7 Elución del DNA		50 µl Buffer AE RT, 1 min 11,000 x g 1 min

Figura 61: Ilustración del protocolo de la miniprep (Machery-Nagel, 2009, modificada).

Antes de empezar el kit añadimos 1 ml de Buffer A1 al vial de RNasa A y “vorteamos”. Luego transferimos esta mezcla en el bote del Buffer A1 y guardamos en la nevera a 4°C. Ahora está listo para ser utilizado.

Al Buffer A4 le añadimos previamente 8 ml de etanol.

8.5. ANEXO V

Protocolo Plasmiprep (véase también pág. - 82 -)

El protocolo de QIAGEN prevé los siguientes pasos⁹⁴:

- ✓ Cultivar las bacterias en medio de cultivo LB a 37°C en agitación durante 12-16h;
- ✓ Centrifugar a 6.000 x g durante 15 minutos a 4°C;
- ✓ Resuspender el pellet así formado en 10 ml de Buffer P1 (Buffer de resuspensión) al que se le añadió previamente RNasa A;
- ✓ Añadir 10 ml de Buffer P2 (Buffer de lisis), mezclar vigorosamente invirtiendo 4 o 6 veces e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos (durante este tiempo preparar la QIAfiler Cartidge y poner dentro de un tubo de medidas adecuadas). Si al Buffer P1 se le añadió el colorante LyseBlue, la solución se colora de azul, el que indica que la lisis ha sido completada;
- ✓ Añadir 10 ml de Buffer P3 (buffer de neutralización), mezclar inmediatamente e invertir 4-6 veces. (Si al Buffer P1 se le añadió el colorante LyseBlue, la solución vuelve a ser blanca, el que indica que se verificó la precipitación en SDS). No incubar y proceder inmediatamente al paso siguiente. (El precipitado que se forma contiene DNA genómico, proteínas, restos celulares y KDS. El lisado puede ser mezclado minuciosamente para asegurarse una precipitación uniforme en KDS);
- ✓ Poner el lisado en la QIAfilter Catridge e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. No agitar;
- ✓ Equilibrar la columna QIAGEN con 10 ml de Buffer QBT (Buffer de equilibración);
- ✓ Remover el tapón desde la QIAfilter Catridge, insertar delicadamente el émbolo y filtrar el lisado en la columna recién equilibrada;
- ✓ Lavar 2 veces con 30 ml de Buffer QC (Buffer de lavado). El primero lavado es suficiente para remover todos los contaminantes de la mayoría de las preparaciones plasmídicas. El segundo lavado es especialmente necesario si se trabaja con grandes volúmenes de cultivos celulares o con cepas bacterianas que producen grandes

- cantidades de carbohidratos;
- ✓ Eluir el DNA con 15 ml de Buffer QF (Buffer de elución);
 - ✓ Precipitar el DNA con 10.5 ml de isopropanol y centrifugar inmediatamente a $\geq 15.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C;
 - ✓ Lavar el pellet de DNA con 5 ml de etanol al 70% y centrifugar inmediatamente a $\geq 15.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C;
 - ✓ Dejar secar al aire durante 5-10 minutos y resuspender en el volumen de Buffer indicado (TE, pH 8.0 o 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).



Figura 62: Ilustración del protocolo de la plasmiprep (QIAGEN, 2005, modificada).

Buffer	Composition	Storage
Buffer P1 (resuspension Buffer)	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	2-8°C, after addition of RNase A
Buffer P2 (lysis Buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)	15-25°C
Buffer P3 (neutralization Buffer)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5	15-25°C or 2-8°C
Buffer QBT (equilibration Buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)	15-25°C
Buffer QC (wash Buffer)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15-25°C
Buffer QF (elution Buffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)	15-25°C
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15-25°C

Tabla 49: Se ilustra la composición de los principales Buffers utilizados (QIAGEN, 2005, modificada)

8.6. ANEXO VI

Protocolo de la extracción manual de ácidos nucleicos (QIAGEN®).

El protocolo de QIAGEN prevé los siguientes pasos¹¹⁹:

- ✓ Pipetear 20 µl de proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Una intensa investigación ha demostrado que la proteasa (provista en el kit) es un óptimo enzima para utilizar con el Buffer de lisis. No tiene actividad de DNasa o RNasa;
- ✓ Añadir 200 µl de muestra (las columnas QIAamp Mini spin purifican RNA y DNA si ambos están presentes; si se necesita DNA sin RNA, hay que añadir 4 µl de RNasa A a la muestra, antes de añadir el Buffer AL);
- ✓ Añadir 200 µl de Buffer AL (Buffer de lisis). Mezclar “vorteando” durante 15 s. Para asegurarse una lisis eficiente es importante mezclar bien la muestra y el Buffer de lisis y obtener una solución homogénea;
- ✓ Incubar a 56°C durante 10 minutos. No incubar el DNA durante más tiempo para no afectar la calidad del DNA purificado;
- ✓ Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa;
- ✓ Añadir 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar “vorteando” durante 15 s y después centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa;
- ✓ Verter con cuidado el contenido en una columna QIAamp Mini spin (puesta en un tubo de recogida de 2 ml) sin bañar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto. Poner la columna QIAamp Mini spin en un tubo de recogida limpio (provisto en el kit) y eliminar el tubo con el filtrado. Si el lisado no pasó completamente en la columna, volver a centrifugar a mayor velocidad, hasta que la columna esté vacía;
- ✓ Abrir con cuidado la columna QIAamp Mini spin y añadir 500 µl de Buffer AW1 (Buffer de lavado1) sin bañar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto. Poner la columna QIAamp Mini spin en un tubo de recogida limpio (provisto en el kit) y eliminar el tubo con el filtrado;

¹¹⁹ QIAGEN, 2010.

- ✓ Abrir con cuidado la columna QIAmp Mini spin y añadir 500 μ l de Buffer AW2 (Buffer de lavado 2) sin bañar los bordes. Cerrar la tapa y centrifugar a 20.000 x *g* (14.000 rpm) durante 3 minutos;
- ✓ Se recomienda poner la columna QIAmp Mini spin en un tubo de recogida limpio (no provisto en el kit) y eliminar el tubo que contiene el filtrado. Centrifugar a la máxima velocidad durante 1 minuto;
- ✓ Poner la columna QIAmp Mini spin en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, limpio (no provisto en el kit) y eliminar el tubo de recogida que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna QIAmp Mini spin y añadir 200 μ l de Buffer AE (Buffer de elución) o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, cerrar la tapa y centrifugar a 6.000 x *g* (8.000 rpm) durante 1 minuto.

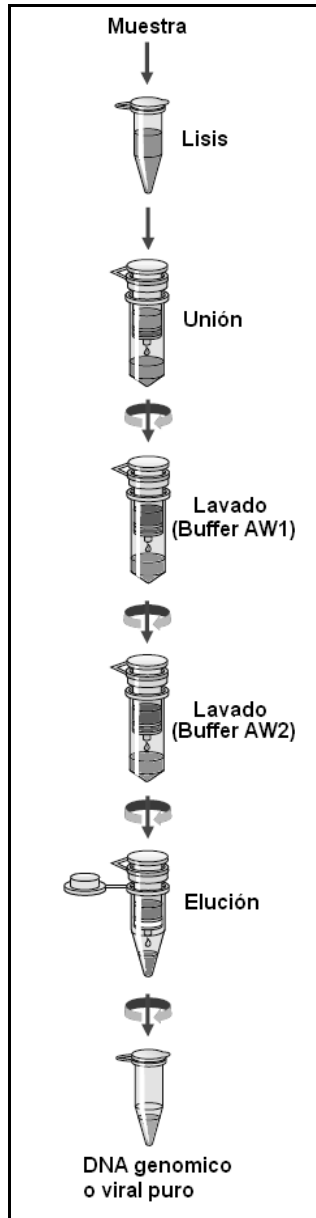


Figura 63: Ilustración del protocolo de la extracción manual (QIAGEN, 2010, modificada).

9. BIBLIOGRAFIA

- 1- Curtis H, Barnes NS, Schek A, Flores G. Invitación a la biología 6th ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 94-194.
- 2- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 6th ed. Barcelona: Elsevier España; 2009. p. 33.
- 3- Betancor L, Gadea M, Flores K. Genética bacteriana [Internet]. Montevideo: Instituto de Higiene-Fac. de Medicina C.E.F.A.; 2008 [consultado el 5 abril de 2012]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GeneticaBacteriana.pdf>
- 4- Cultek S.L.U. Tecnología del DNA recombinante [Internet]. Madrid: cultek.com; 2006 [consultado el 5 de abril de 2012]; (9). Disponible a: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/DNA-recombinante/Tecnica%20DNA%20recombinante.pdf>
- 5- Soriano V, Gonzáles-Lahoz J. VII Curso de Biología Molecular para clínicos. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2006. p.10-2.
- 6- Wickramarachchi DC. Ral interacting protein (Ralbp1): Linking glutathione conjugate transport to oxidative stress defenses and signaling pathways [tesis doctoral]. The University of Texas at Arlington: ProQuest LLC; 2007.
- 7- Soriano V, Gonzáles-Lahoz J. X Curso de Biología Molecular para clínicos. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2009. p. 26-41.
- 8- Usdin S. VIH/SIDA. Barcelona: Intermón Oxfam; 2004. p. 23.
- 9- Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology; 1998. p. 5.
- 10-Bingenheimer JB., Geronimus AT. Behavioral Mechanism in HIV Epidemiology and Prevention: Past, Present, and Future Roles. *Stud Fam Plann.* 2009; 40 (3): 187-204.
- 11-Joint United Nations Programme on HIV/AIDS [Internet]; 2009 [consultado el 31 de marzo de 2012]. Disponible a: www.unaids.org/en/dataanalysis/epidemiology/epidemiologyslides/
- 12-Levy JA. The Retroviridae 2. New York: Plenum Press; 1993. p. 361-400.
- 13-Dudek RW. High-yield cell and molecular biology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 178-80.
- 14-Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. Retroviruses. Cold Spring

Bibliografía

- Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 1-383.
- 15-**Campbell MK, Farrell SO. *Biochemistry*. 7th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole Cengage Learning; 2012. p. 401.
- 16-**Kramer A, Kretzschmar M, Krickeberg K. *Modern infectious disease epidemiology: concepts, methods, mathematical models, and public health*. New York: Springer; 2010. p. 311-15.
- 17-**Ariën KK, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5 (2): 141-51.
- 18-**Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*. 2005; 34 (4): 233–44.
- 19-**Freed EO. HIV-1 Replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001; 26 (1-6): 13-33.
- 20-**Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. 1997; 387 (6631): 426-30.
- 21-**Sattentau QJ, Zolla-Pazner S, Poignard P. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology*. 1995; 206 (1): 713-7.
- 22-**Lázaro Lázaro E, Escarmís Homs C. *Virus Emergentes: la amenaza oculta*. Madrid: Equipo Sirius, S. A.; 2002. p.25.
- 23-**Varmus H. *Retruviruses*. *Science*. 1998; 240 (4858): 1427-35.
- 24-**Úsuga X, Ruiz Y, Montoya CJ, Rugeles MT. Papel de las proteínas reguladoras y accesorias del VIH-1 en la patogénesis de esa infección. Bogotá: *Acta biol. Colomb [revista en Internet]*. 2009 [consultado el 31 de marzo de 2012]; 14 (3): 3-18. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2009000300001&lng=es
- 25-**Adamson CS, Freed EO. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res*. 2010; 85 (1): 119–41.
- 26-**Turner BG, Summers MF. *Structural Biology of HIV*. *J Mol Biol*. 1999; 285 (1): 1-32.
- 27-**Alcamí J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22 (8):486-96.
- 28-**Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades infecciosas*.

- Principios y Práctica. Vol. 2. Madrid: Elsevier España S.A. 2006; p. 2119-30.
- 29**-Passarge E. Color atlas of Genetics. 3rd ed rev. and updated. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2007; p. 106-9.
- 30**-Freed EO. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998; 251 (1): 1–15.
- 31**-Chen SW, Chiu HC, Liao WH, Wang FD, Chen SS, Wang CT. The virus-associated human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol carrying an active protease domain in the matrix region is severely defective both in autoprocessing and in trans processing of gag particles *Virology*. 2004; 318 (2): 534–41.
- 32**-Checkley MA, Luttge BG, Soheilian F, Nagashima K, Freed EO. The capsid-spacer peptide 1 Gag processing intermediate is a dominant-negative inhibitor of HIV-1 maturation. *Virology*. 2010; 400 (1): 137-44.
- 33**-Freed EO. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol*. 2004; 12 (4): 170-7.
- 34**-Hill M, Tachedjian G, Mak J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res*. 2005; 3 (1): 73-85.
- 35**-Barrie KA, Perez EE, Lamers SL, Farmerie WG, Dunn BM, Sleasman JW et al. Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within Gag/Pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 1996; 219 (2): 407-16.
- 36**-Temin HM, Mizutani S. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature*. 1970; 226: 1211-13.
- 37**-Peletskaya EN, Boyer PL, Kogon AA, Clark P, Kroth H, Sayer JM et al. Cross-linking of the fingers subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to template-primer. *J Virol*. 2001; 75 (19): 9435-45.
- 38**-Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clark AD Jr, Lu X, Tantillo C et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse

Bibliografía

- transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90 (13): 6320-24.
- 39-**Murakami T, Ablan S, Freed EO, Tanaka Y. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J Virol*. 2004; 78 (2): 1026-31.
- 40-**Salzwedel K, Berger E A. Complementation of diverse HIV-1 Env defects through cooperative subunit interactions: a general property of the functional trimer. *Retrovirology*. 2009; 6:75.
- 41-**Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL et al. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science*. 2005; 310 (5750): 1025-8.
- 42-**He Y, Cheng J, Li J, Qi Z, Lu H, Dong M et al. Identification of a critical motif for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 core structure: implications for designing novel anti-HIV fusion inhibitors. *J Virol*. 2008; 82 (13): 6349-58.
- 43-**Castaño ME, Urcuqui S. Proteínas celulares cómplices de las proteínas regulatorias y accesorias del VIH-1. Cali: Colombia Médica [revista en Internet]. 2004 [consultado el 31 de febrero de 2012]; 35: 112-20. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=28335210>
- 44-**Kramer-Hämmerle S, Ceccherini-Silberstein F, Bickel C, Wolff H, Vincendeau M, Werner T et al. Identification of a novel Rev-interacting cellular protein. *BMC Cell Biol*. 2005; 6:20.
- 45-**Rhee SS, Marsh JW. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down- modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol*. 1994; 68 (8): 5156-63.
- 46-**Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*. 2008; 5:51.
- 47-**Arokium H, Kamata M, Chen I. Virion-associated Vpr of human immunodeficiency virus type 1 triggers activation of apoptotic events and enhances fas-induced apoptosis in human T cells. *J Virol*. 2009; 83 (21): 11283-97.

- 48-Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Früh K, Moses AV. Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST 2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *J Virol.* 2009; 83 (16): 7931-47.
- 49-Gutiérrez C, Cristina del R. Pruebas analíticas de resistencia a antirretrovirales en pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1). Caracas: Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" [revista en Internet]. 2007 [consultado el 31 de marzo de 2012]; 38 (1): 28-33.
- 50-López-Bernaldo de Quirós JC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Diagnostico microbiologico de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007; 25 (10): 632-8.
- 51- Tan SC, Yap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2009; 2009: 574398.
- 52- Cultek S.L.U. [Internet]. Madrid: cultek.com [consultado el 31 de marzo de 2012] Disponible a: http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_AN_Purificacion&opc=tecnicas
- 53-Cassarà F. Sistemi di estrazione del DNA: metodi a confronto. En: *Le Emoglobinopatie: dal Fenotipo al Genotipo. I Corso teorico-pratico del Centro di Coordinamento per la Rete Regionale Siciliana sulla Talassemia.* Palermo; 2005 (21-25 Novembre).
- 54-Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 73 (3): 495-504.
- 55-Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small.* 2005; 1 (5): 482-501.
- 56-Callister WD, Jr. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. Vol. 2. Barcelona: Editorial Reverté, S.A; 1996 (Reimpresión: julio de 2007). p. 690-696.
- 57-Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26 (18): 3995-4021.
- 58-González Viñas W, Mancini HL. Ciencia de los materiales. Barcelona: Editorial Ariel, S.A; 2003. p. 75-78.

Bibliografía

- 59-**Vidaurre A, Giménez MH, Riera J. Fundamentos Físicos de la Ingeniería II. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, Servicio de Publicaciones; 1996. p. 48.
- 60-**Hewitt PG. Física Conceptual. 9th ed. Naucalpan de Juárez: Pearson Education; 2004. p. 462-74.
- 61-**Collieau AM, Powney DJ. Propiedades mecánicas y térmicas de los materiales. Barcelona: Editorial Reverté, S. A. 1977. p. 105.
- 62-**Sznajd J. Renormalization of ferrimagnetic alternating spin chains. *J Phys Condens Matter*. 2006; 18: 11047–57.
- 63-**Wolf WP. Ferrimagnetism. *Rep Prog Phys*. 1961; 24: 212.
- 64-**Pol VG, Daemen LL, Vogel S, Chertkov G. Solvent-Free Fabrication of Ferromagnetic Fe₃O₄ Octahedra. *Ind Eng Chem Res*. 2010; 49: 920–924.
- 65-**Fonin M, Pentcheva R, Dedkov YS, Sperlich M, Vyalikh DV, Scheffler M et al. Surface electronic structure of the Fe₃O₄ (100): Evidence of a half-metal to metal transition. *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys*. 2005; 72: 104436.
- 66-**Bino A, Shweky I, Cohen S, Bauminger ER, Lippard SJ. 1998. A Novel Nonairon (III) Citrate Complex: A “Ferric Triple-Decker”. *Inorg Chem*. 1998; 37: 5168-72.
- 67-**Lévy É. Diccionario Akal de Física. Madrid: Ediciones Akal, S.A; 2004. p. 337.
- 68-**Hlawiczka P. Introducción a la electrónica cuántica. Barcelona: Editorial Reverté, S.A. 1977; p. 381-3.
- 69-**Chiang CL, Sung CS, Chen CY. Application of silica–magnetite nanocomposites to the isolation of ultrapure plasmid DNA from bacterial cells. *J Magn Magn Mater*. 2006; 305: 483–90.
- 70-**Kumar CSSR. Magnetic nanomaterials. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. p. 80-191.
- 71-**Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46: 1222-44.
- 72-**Santra S, Tapeç R, Theodoropoulou N, Dobson J, Hebard A, Tan W. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide

- nanoparticles in microemulsion: the effect of nonionic surfactants. *Langmuir*. 2001; 17: 2900-2906.
- 73**-Jang JH, Lim HB. Characterization and analytical application of surface modified magnetic nanoparticles. *Microchem J*. 2010; 94: 148-58.
- 74**-Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008; 108 (6): 2064-110.
- 75**-Malik MA, Wani MY, Hashim MA. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. *Arabian Journal of Chemistry*. En prensa 2010.
- 76**-Shao D, Xia A, Hu J, Wang C, Yu W. Monodispersed magnetite/silica composite microspheres: Preparation and application for plasmid DNA purification. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2008; 322: 61-5.
- 77**-Xie L, Ma J, Zhao Z, Tian H, Zhou J, Wang Y et al. A novel method for the preparation of Bi₄Ti₃O₁₂ nanoparticles in w/o microemulsion. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2006; 280: 232-6.
- 78**-Ganguli AK, Ganguly A, Vaidya S. Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chem Soc Rev*. 2010; 39: 474-85.
- 79**-López-Quintela MA. Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2003; 8: 137-44.
- 80**-Vidal-Vidal J, Rivas J, Lopez-Quintela MA. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2006; 288: 44-51.
- 81**-Eastoe J, Hollamby MJ, Hudson L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006; 128-130: 5-15.
- 82**-Piñeiro-Redondo Y, Bañobre-López M, Pardiñas-Blanco I, Goya G, López-Quintela MA, Rivas J. The influence of colloidal parameters on the specific power absorption of PAA-coated magnetite nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2011; 6:383.

Bibliografía

- 83-**Bruce IJ, Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic ioseparations. *Langmuir*. 2005; 21: 7029-35.
- 84-**Luderer F, Walschus U. Immobilization of Oligonucleotides for Biochemical Sensing by Self-Assembled Monolayers: Thiol-Organic Bonding on Gold and Silanization on Silica Surfaces. *Top Curr Chem*. 2005; 260: 37–56.
- 85-**Smith EA, Chen W. How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes. *Langmuir*. 2008. 24: 12405-9.
- 86-**Carré A, Lacarrière V, Birch W. Molecular interactions between DNA and an aminated glass substrate. *J Colloid Interface Sci*. 2003; 260: 49-55.
- 87-**Halliwell CM, Cass AEG. A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal Chem*. 2001; 73: 2476-83.
- 88-**Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. 2006. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*. 2006; 22: 4357-62.
- 89-**Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macêdo MA, Nakamura M, Toma HE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2004; 279: 210-7.
- 90-**Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (5): 1572-80.
- 91-**Abad ML, Verdura T, Vela A, Iglesias MJ, Gutiérrez D, Veiga M et al. Construction and characterization of a minimized version of the HIV-1 pNL4-3 plasmid and its application for pseudotyping HIV-1 vectors. *Mol Biotechnol*. 2004; 28 (2): 87-95.
- 92-** Hennig G. Siemens Magnetic Bead Extraction Technology and Future Molecular Applications. Siemens Healthcare Diagnostics [internet]; 2008 [consultado el 2 de abril de 2012]. Disponible en:

- <http://biospecimens.cancer.gov/meeting/brnsymposium/2009/docs/t/Dr.%20Hennig%20BRN%20presentation%20final.pdf>
- 93-** Machery-Nagel. Plasmid DNA purification, user manual. NucleoSpin® Plasmid, NucleoSpin® Plasmid QuikPure. Rev. 06. 2009. p. 1-26.
- 94-** QIAGEN. QIAGEN® Plasmid purification Handbook. 3th ed. 2005. p. 1-52.
- 95-** Yi DK, Lee SS, Papaefthymiou GC, Ying JY. Nanoparticle Architectures Templated by SiO₂/Fe₂O₃ Nanocomposites. *Chem Mater*. 2006; 18: 614-9.
- 96-** Smith JE, Wang L, Tan W. Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis. *Trends Analyt Chem*. 2006; 25 (9): 848-55.
- 97-** Lin CL, Lee CF, Chiu WY. Preparation and properties of poly (acrylic acid) oligomer stabilized superparamagnetic ferrofluid. *J Colloid Interface Sci*. 2005; 291: 411–20.
- 98-** Golas PL, Louie S, Lowry GV, Matyjaszewski K, Tilton LD. Comparative study of polymeric stabilizers for magnetite nanoparticles using ATRP. *Langmuir*. 2010; 26 (22): 16890-900.
- 99-** Xu F, Geiger GH, Baker GL, Bruening ML. Polymer Brush-Modified Magnetic Nanoparticles for His-Tagged Protein Purification. *Langmuir*. 2011; 27 (6): 3106-12.
- 100-** Lu Y, Yin Y, Mayers BT, Xia Y. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol-gel approach. *Nano Lett*. 2002; 2 (3): 183-6.
- 101-** Bonini M, Wiedenmann A, Baglioni P. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with a uniform silica shell. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2006; 26: 745–50.
- 102-** Deng YH, Wang CC, Hu JH, Yang WL, Fu SK. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2005; 262: 87–93.
- 103-** Lien YH, Wu TM. Preparation and characterization of thermosensitive polymers grafted onto silica-coated iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2008; 326: 517-21.

Bibliografía

- 104-** Bruce IJ, Taylor J, Todd M, Davies MJ, Borioni E, Sangregorio C et al. Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. *J Magn Magn Mater*. 2004; 284: 145-60.
- 105-** Park ME, Chang JH. High throughput human DNA purification with aminosilanes tailored silica-coated magnetic nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2007; 27: 1232-35.
- 106-** Roy S, Dixit CK, Woolley R, MacCraith BD, O'Kennedy R, McDonagh C. Novel multiparametric approach to elucidate the surface amine-silanization reaction profile on fluorescent silica nanoparticles. *Langmuir*. 2010; 26(23): 18125-34.
- 107-** Krasnoslobodtsev AV, Smirnov SN. Effect of Water on Silanization of Silica by Trimethoxysilanes. *Langmuir*. 2002; 18: 3181-84.
- 108-** Ballardur V, Theretz A, Mandrand B. Determination of the main forces driving DNA oligonucleotide adsorption onto aminated silica wafers. *J Colloid Interface Sci*. 1997; 194: 408-18.
- 109-** Voet D, Voet JG. 3th ed. *Bioquímica*. Buenos aires: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. p. 142.
- 110-** Jiménez Escrig A. *Manual de neurogenética*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, S. A.; 2003. p. 25.
- 111-** Invitrogen Argentina S.A. Diagnóstico Bioquímico. Plataforma de Cuantificación QUBIT. Todo lo que Usted necesita para una cuantificación exacta. *Revista de Bioanálisis [revista en Internet]* 2007 marzo-abril [consultado el 5 de abril de 2012]; (14). Disponible en:
http://www.revistabioanalisis.com/ejemplares/ejemplar/notas/index.php?id_edicion=14&id_nota=163
- 112-** Sanz Uriarte JM. El diagnóstico molecular en continua evolución. Roche Diagnostics Informa [revista en Internet] 2001 Junio [consultado el 5 de abril de 2012]; Disponible en:
<http://www.roche.es/portal/synergy/static/file/synergy/alfproxy/download/1414-f27edf94bfaa11de977e85dd53dd3900/last/04ardijunio2001.pdf>
- 113-** Roche. es [Internet]. Madrid: Roche Pharma S. A; 2012 [consultado el 5 de abril de 2012]. Disponible a:

http://www. Roche.es/portal/Roche-spain/productos?siteUuid=re7127001&paf_gear_id=33000033&pageId=re7364116&synergyaction=show&paf_dm=full&nodeId=1415-3ccc13eb10b011df9bc7351a3623dd67&categoryId=re7127001_ct23016

- 114-** The new MagNA Pure Compact System. *Biochemica* [revista en Internet] 2003 [consultado el 5 de abril de 2012]; (4). Disponible en: http://www. Roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/no4_03/PDF/p11_12.pdf
- 115-** Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Sistema de diagnóstico molecular VERSANT® kPCR [Internet]. Barcelona: Siemens Healthcare Diagnostics S.L; 2007-2012 [consultado el 5 de abril de 2012]. Disponible a: http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_catalogId~e_105~a_catTree~e_100001,1015865~a_langId~e_105~a_productId~e_189941~a_storeId~e_10001.htm
- 116-** Ronaghi M. pyrosequencing for SNP genotyping. *Methods Mol Biol.* 2003; 212: 189-95.
- 117-** Ronaghi M, Elahi E. Discovery of single nucleotide polymorphism and mutations by Pyrosequencing. *Comp Funct Genomics.* 2002; 3(1): 51-56.
- 118-** Steinberg KM, Okou DT, Zwick ME. Applying rapid genome sequencing technologies to characterize pathogen genomes. *Anal Chem.* 2008; 80(3): 520-8.
- 119-** QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 3th ed; 2010. p. 1-72.