



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
ESCUELA DE BIOANALISIS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
(LABIOMEX)**



**CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO DE BIOPSIAS INCLUIDAS EN PARAFINA
PARA LA DETECCIÓN/TIPIFICACIÓN DE VPH POR PCR**

Tesista: Br. Glorimar Matheus

Mérida, Octubre del 2023



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
ESCUELA DE BIOANALISIS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
(LABIOMEX)**



CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO DE BIOPSIAS INCLUIDAS EN PARAFINA

PARA LA DETECCIÓN/TIPIFICACIÓN DE VPH POR PCR

Requisito para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

Autores:

Br. Glorimar P. Matheus P.

C.I.23.250.621

Tutora: Dra. Militza Quintero Vega

Mérida, Octubre 2023

DEDICATORIA

Al Señor todopoderoso

A Mis Padres Gloria Peña y Henry Matheus por sus Consejos, apoyo incondicional, Valores, Principios, Dedicación, Enseñanzas, Esfuerzos y culminar esta meta. Los amo

A mis Hermanos Yohaury y Henry Matheus

A mi Abuela Yolanda González

A mis Abuelos Guillermo Peña (+), Rafael Matheus (+) y Carmen González (+).

A mis Tíos Freddy Matheus, Alba González, Reinaldo Peña, Jesús Peña, Josefina Peña.

A mis ahijados José Manuel, Sarai, Neimary que este proyecto les sirva como motivación de que las metas se logran con esfuerzo, sacrificio y paciencia

AGRADECIMIENTOS

Al Señor todopoderoso por ser el guía que cada etapa y permitir culminar un capítulo mas.

A Mis Padres Gloria Peña y Henry Matheus por sus consejos, apoyo incondicional, valores, dedicación, enseñanzas, esfuerzos y brindarme esta oportunidad de culminar esta meta. Los amo

A Mi Abuela Yolanda González por sus consejos, orientaciones, apoyo incondicional, dedicación y regaños. Te adoro

A Mi Abuelo Guillermo Peña por sus enseñanzas, humildad, fortaleza y sencillez, valores y principios. Gracias por ser mi ángel guardián

A mis Hermanos Yohaury y Henry. Los Quiero Mucho

A Mis Tíos Freddy por su apoyo incondicional. Te Quiero Mucho

A Tía Alba González por su fortaleza, apoyo y entrega en cada uno mis retos. Te adoro

A mi Tío Jesús Peña por su apoyo en los momentos más difíciles durante la carrera.

A mis Primas-ahijadas por enseñarme el valor del sacrificio y esfuerzo.

A mis Madrina Ramona Ramírez por sus consejos y apoyo. La Quiero Mucho.

A la Prof. Edelmira y Milagros a que a lo largo de estos los años han apoyado en cada momento a mis padres, a ustedes infinitas gracias por esa amistad que hoy en día es difícil de conseguir, de igual forma por sus consejos. Las quiero mucho

A la Familia Fernández Vielma por acobijarme en el momentos más importantes de mi carrera.

A mis amigos Darwin Santiago, Darwin García, María Antonieta, por compartir conmigo esta travesía en la cual todos hemos podido experimentar diferentes emociones a lo largo de la carrera. Los quiero

A mi Tutora Dra. Milita Quintero Vega por su dedicación, paciencia, enseñanzas, y orientaciones. Dios te pague

A los que hacen vida en LABIOMEX al, Dr. Jhon Cruz, MSc. Marcos Aurelio, Lic. Carlos, Manuel, Lilibeth, Reinaldo, Sra. Dora. Muchísimas Gracias

Al Profesor Juan Puig por apertura las puertas de su gran casa LABIOMEX. Gracias

A mi Tutora experimental MSc. Nol Salcedo y Licda. Danmarys Hernández por su colaboración, paciencia, brindarme su tiempo en cada jornada de trabajo y resolver cualquier inquietud. Infinitas Gracias

A todos aquellos que olvide nombrar

RESUMEN

En la actualidad se observa un incremento constante en los casos de infección por VPH en los países de bajos ingresos; por su parte, los métodos para el diagnóstico de infección han tenido un gran avance mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, en los procesos de fijación de los tejidos de biopsias y la extracción del ADN se presentan dificultades que afectan la integridad de esta molécula lo que a su vez trae como consecuencia problemas en los procesos de amplificación a través de la PCR. Esto se debe principalmente a los efectos de la formalina utilizada en las técnicas de fijación requeridas para la conservación de los tejidos en bloques de parafina, estos efectos causan la degradación del ADN por lo tanto genera cambios en la calidad y cantidad de la molécula que se obtiene durante su extracción.

Objetivo: Comparar la calidad del ADN total extraído de biopsias de lesiones del área genital incluidas en parafina con distintas variaciones en la técnica de extracción, mediante espectrofotometría y PCR para la detección y tipificación de VPH.

Materiales y Método: Se seleccionaron nueve (9) Bloques de tejidos incluidos en parafina fijados en formalina (FFPE) a las cuales se les aplicó cuatro variaciones del primer paso del protocolo de extracción de ADN total para comparar la concentración, calidad e integridad del ADN mediante espectrofotometría y amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR de la región β -globina.

Resultados: Con La variación de desparafinación mediante Xilol se obtuvo un rendimiento de ADN del 93%, mientras la variación con agua caliente para extraer la

parafina produjo un rendimiento del 87%, por su parte, la variación utilizando Tween-20 y calentamiento en microondas produjo un rendimiento del 86%; y la variación Tween-20 y calentamiento en termociclador rindió un 78%. Por PCR y visualización mediante electroforesis en agarosa 1,5% se observó que se obtuvieron amplificadores junto a un *smear* o patrón de “chorreado” lo que implica que el ADN se obtuvo degradado.

Conclusión: El mejor protocolo de extracción de ADN de biopsias incluidas en parafinas es aquel que incluye Xilol como componente de disolución de la parafina, porque produce mayor rendimiento de ADN durante el proceso de extracción, mientras por PCR se encontró que dicha molécula puede tener baja calidad para los procesos de amplificación, que puede estar relacionado con el tiempo que lleva el tejido incluido en parafina.

Palabras Claves: Virus de Papiloma humano (VPH), Bloques de parafina (FFPE), Integridad del ADN, espectrofotometría, PCR, β -globina, Xilol.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	6
INTRODUCCION.....	11
Situación Actual del Problema	12
Justificación de la Investigación	14
Alcances de la investigación	15
Limitantes de la Investigación	15
El problema	15
MARCO TEÓRICO.....	16
Antecedentes de investigación	16
Antecedentes Históricos	20
BASES TEÓRICAS.....	24
La molécula de ADN	24
Transcripción.....	25
Replicación	25
Métodos de Fijación.....	27
Virus de Papiloma Humano	28
Clasificación Taxonómica del VPH	29
Tipos Virales	29
Métodos de Diagnóstico de infección por VPH	31
Importancia de la Detección y Tipificación del VPH	33
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	34
Objetivo General	34
Objetivos Específicos.....	34
MARCO METODOLOGICO.....	35
Tipo de investigación.....	35
Diseño de la Investigación.....	36
Población.....	36

Muestra.....	37
Sistema de Variables	38
Instrumento de recolección de datos.....	39
Procedimientos de la Investigación.....	40
Preparación de las Muestras	40
Remoción de parafina con Xilol.....	41
Remoción de Parafina con Agua calentando en Termomix con agitación.....	41
Remoción de parafina con Tween 20 calentando en microondas.....	42
Remoción de parafina con Tween20 calentando en Termociclador	42
Evaluación de la Calidad del ADN del ADN extraído.....	43
Concentración del ADN:	43
Amplificación por PCR:	45
Electroforesis	45
RESULTADOS	46
Resultados de Pureza del ADN por Espectrofotometría.....	47
Calidad del ADN extraído para la PCR-Beta Globina.....	51
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	53
Pureza del ADN extraído	53
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOHEMERO GRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zonas afectadas por Tumores Malignos. Dentro de estos sitios están: pene, vagina, orofaringe, zona colorectal y anal ⁶	30
Figura 2. <i>Electroforesis en Agarosa 1,5% de la PCR-Beta Globina. Muestras desparafinadas con Xilol.1-7, 8 control positivo y 9 control negativo.</i>	52
Figura 3. Electroforesis en Agarosa 1,5% de la PCR-Beta Globina. Muestras 1-9 desparafinadas con agua caliente y con Tween-20, probando diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 del ADN obtenido	53

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Peso en mg de los tejidos con parafina de las muestras del estudio.	47
TABLA 2. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con Xilol	48
TABLA 3. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con agua caliente	49
TABLA 4. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con Tween/microondas	50
TABLA 5. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con Tween/termociclador.....	50

INTRODUCCION

En la actualidad el proceso de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina puede ser ineficiente en cuanto la integridad de la molécula extraída, esto puede deberse a los múltiples pasos de fijación, los cuales están diseñados para preservar la arquitectura del tejido, más no las moléculas de ADN que sufren daños en su estructura. Uno de los principales factores que afectan la integridad de la molécula de ADN parece ser el tiempo de fijación en formalina antes de la inclusión en parafina¹, que ocasiona daños en la estructura del ADN porque se induce la formación de aductos que impiden posteriormente la amplificación por la técnica de PCR²; por otra parte, la eliminación de la parafina durante la extracción del ADN es otro factor que afecta directamente el rendimiento en la obtención de la molécula³.

Ampliando lo anterior, cuando el tejido se somete a estudios moleculares la cantidad y calidad del ADN puede ser deficiente, debido a esta observación, se han realizado estudios sobre la recuperación del ADN de tejidos fijados con formalina que implementan el uso de enzimas por ejemplo, lo que encarece el proceso. Esto se combina con el uso de distintas soluciones comerciales que se venden como kits para mejorar el rendimiento durante los protocolos de extracción³ y los resultados son satisfactorios, pero costosos.

Debido a los elevados costos de los kits de extracción de ácidos nucleicos se buscan alternativas para mejorar estos protocolos de extracción basándose en variaciones de la técnica y el uso de reactivos de preparación en el laboratorio, lo que resulta más económico.

La implementación de estos protocolos de extracción de ADN requiere de su comprobación previa, para verificar que se obtiene ADN con alta integridad y estado de pureza de la molécula, que permita su amplificación por técnicas moleculares. De esta manera, la extracción de ADN de alta calidad, permitirá hacer la detección y tipificación del Virus de Papiloma Humano (VPH), en muestras que tengan un resultado previo de alteraciones sospechosas de infección por VPH.

Situación Actual del Problema

La extracción de ADN de tejidos incluidos en parafina para la detección molecular de VPH es interesante para los estudios retrospectivos de presencia de VPH en estos tejidos, o para determinar si el virus está presente y corroborar los resultados del estudio anatomopatológico de dichos tejidos^{1,4-6}.

Sin embargo, la calidad del ADN de muestras de tejido incluidos en bloques de parafina en cuanto a la integridad y cantidad de la molécula, se convierte en un reto en el laboratorio debido a los altos costos de los reactivos comerciales diseñados para la extracción óptima de la molécula, los cuales se requieren para mejorar el rendimiento de los procesos de extracción, y debido también al procedimiento que se utiliza para fijar los tejidos.

Al respecto, los procesos de fijación de los tejidos que van a ser incluidos en parafina pueden comprender pasos que causan el deterioro de la molécula de ADN presente en estos tejidos. Por ejemplo, el uso de la formalina en soluciones con pH y

tiempo no controlado para la fijación de los tejidos puede causar la formación de enlaces covalentes no naturales en la molécula de ADN, esto se debe a uno de los componentes de la disolución que es el formaldehído, el cual es el responsable de alterar ciertos enlaces de las bases nitrogenadas del ADN originando la modificación de la estructura, luego en el proceso de replicación *in vitro* durante la PCR, se genera la interrupción de la molécula comprometiendo su integridad, estos procesos afectan el ADN de la célula huésped y el del virus que pudiera estar presente en el tejido; si la interrupción se produce en el sitio que es el blanco o diana de la PCR pues el virus no puede ser detectado, y el diagnóstico se ve afectado⁷.

Con respecto a esto, lo deseable es obtener ADN que pueda ser objeto de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), para la detección y tipificación del ADN de VPH que pudiera estar presente en los tejidos tratados; y que además el proceso no resulte muy costoso.

Por lo anterior, en la presente investigación se buscó optimizar el proceso de extracción de ADN para obtener la molécula en el mejor estado posible, para ello se probaron modificaciones del protocolo de extracción y se utilizaron soluciones preparadas en el laboratorio. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este estudio fue comparar cuatro modificaciones al protocolo clásico de extracción de ADN de tejidos incluidos en parafina con el fin de obtener la molécula de ADN en condiciones adecuadas para su uso posterior en pruebas de diagnóstico molecular.

Justificación de la Investigación

Puesto que el objeto de las pruebas moleculares es la amplificación de la molécula de ADN mediante PCR, se busca mejorar la detección y tipificación del Virus Papiloma Humano de muestras de tejido incluidos en parafina y para ello se deben implementar procesos optimizados en cuanto a costos de los reactivos a utilizar y en cuanto a rendimiento.

Por lo anterior, esta investigación se justifica desde el punto de vista metodológico, pues para la detección del ADN, se buscó mejorar u optimizar el proceso de extracción de la molécula diana para favorecer su integridad.

Por otra parte, la investigación se justifica desde el punto de vista económico, pues se evitó el uso de reactivos comerciales costosos, preparando las disoluciones necesarias para el proceso en el laboratorio, controlando las cantidades y utilizando justo lo necesario.

Por lo anterior, desde el punto de vista científico, la presente investigación hace un aporte a los protocolos de extracción de ADN de tejidos fijados en parafina, optimizando los mismos, por lo cual, ahora se podrían ampliar estudios retrospectivos con este tipo de muestras, que aportarían resultados en el área de epidemiología molecular del virus de papiloma humano.

Esta investigación también se justificó pues en cuanto a la formación personal de la investigadora, pues le permitió formarse en el ámbito de un laboratorio diseñado para estudios moleculares, en las técnicas básicas de la biología molecular, lo cual amplía el perfil profesional, de cara al presente cada vez más avanzado en cuanto a técnicas de diagnóstico.

Alcances de la investigación

Con esta investigación se buscó aportar a la biología molecular del VPH una técnica de extracción de ADN optimizada en cuanto a la calidad y cantidad de la molécula, mejorando el protocolo en a la cantidad de pasos y en el aspecto económico, con lo cual, al implementarla se podrán incluir muestras de tejido embebido en parafina en los procesos de detección u tipificación del VPH.

Limitantes de la Investigación

Dentro los factores limitantes de esta investigación se encontraron los siguientes:

1. Número limitado de muestras, pues los tejidos embebidos en parafina no son enviados con frecuencia al laboratorio para su estudio.
2. La disponibilidad de los reactivos o kits necesarios, ya que debido a la situación actual del país los costos son altos, por lo que se buscó la preparación de los mismos en el laboratorio.

El problema

En función de todo lo planteado, la pregunta de investigación fue la siguiente:
¿Se podrá mejorar la calidad del ADN extraído de biopsias de tejido del área genital embebidas en parafina, mediante la modificación de algunos pasos del protocolo estándar y así lograr obtener una molécula íntegra y en buena cantidad para implementar una PCR de detección y tipificación del VPH?

MARCO TEÓRICO

Antecedentes de investigación

Daigrepoint et al.¹ en 2018 realizaron un estudio para detectar ADN del Virus Papiloma Humano (VPH) en papilomas obtenidos de la cavidad oral fijados en formalina e incluidos en parafina (1). Para ello, dichos autores implementaron la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) y analizaron 35 muestras de biopsias de la cavidad oral incluidas en parafina con previa fijación en formalina; obteniendo como resultado que un 17% (6 papilomas) dieron positivo para el ADN del VPH, de las cuales 4 fueron positivas para VPH6 y 2 dieron positivas para VPH11. Por otro lado, el ADN de β -globina solo se identificó en la mitad de las muestras, alegando que la degradación de dicho ADN afectó significativamente los resultados; los autores concluyeron que dichos resultados representan una estimación del verdadero número de muestras positivas para VPH en este estudio. Las explicaciones de los papilomas escamosos negativos para VPH incluyeron la infección transitoria por VPH, las fallas en el experimento para detectar el Virus, o las posibilidades de que algunas lesiones no sean producto de la Infección por VPH. Este trabajo tiene relación con la presente investigación pues sus resultados muestran que se encuentran problemas al tratar de amplificar el ADN de VPH que se obtiene de tejido fijado con formalina y embebido en parafina.

Por su parte, en el 2018 Tawe et al², desarrollaron un estudio para la detección molecular del Virus del Papiloma Humano (VPH) con una elevada fragmentación del

ADN en biopsias de pacientes con cáncer de cuello uterino aplicando PCR de doble anidamiento, esto con el objetivo de optimizar una metodología de PCR de doble anidamiento altamente sensible junto con una extracción orgánica de ADN para aquellos laboratorios donde sus recursos son limitados; el método propuesto permite la detección de una alta gama de genotipos de VPH y se obtienen las secuencias del amplificado final comprobando la extracción de ADN de manera automatizada en conjunto con una PCR en Tiempo Real. Los resultados arrojaron un 96,3 % de efectividad del método propuesto para detectar VPH en comparación con otros métodos donde se consigue un 100% de efectividad. Los autores concluyeron que el método propuesto proporciona la identificación simultánea de una amplia gama de genotipos de VPH incluyendo VPH 16 y 18 partiendo de una muestra de ADN de biopsias. Por otra parte, es fácil y rentable para los laboratorios con recursos limitados, del mismo modo tiene una amplia aplicación en el área molecular. Con respecto a la pertinencia de este estudio con respecto a la presente investigación, se encuentra que los autores implementan un método que les permite mejorar la detección por PCR desde ADN fragmentado que se obtiene a partir de tejido fijado con formalina y embebido en parafina.

Por su parte, Sarnecka et al.³ en el 2019; implementaron una extracción de ADN de muestras de tejido embebido en parafina con tres kits comerciales distintos, así los autores utilizaron 42 bloques de tejido parafinado y para la extracción utilizaron los siguientes kits: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN), Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Molecular Systems) y Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega). Los autores comprobaron la calidad y cantidad del ADN extraída a través de fluorimetría (Qubit 3.0 Fluorometer, Life Technologies) y los

resultados reflejaron el rendimiento del ADN total, con el kit Maxwell o Cobas obtuvieron una cantidad y calidad más alta a diferencia de lo obtenido con QIAamp ($p < 0,001$) y el por último Maxwell Extraction Kit resultó en una elevada calidad ($p < 0,01$) pero baja cantidad de ADN; con los resultados los autores llegaron a la conclusión que la selección de los kits va de acuerdo al objetivo de cada estudio dependiendo de la cantidad y calidad del ADN extraído que se necesite (3). En cuanto a los aportes del estudio citado, se encuentra que la calidad del ADN extraído de muestras embebidas en parafina va a depender del método de extracción y la formulación de los reactivos utilizados, así se ve que dependiendo de la casa comercial que elabora el kit de extracción se obtiene ADN de distinta calidad para PCR.

Seguidamente, se cita la investigación de, Fujii et al.⁸, quienes en el 2019 establecieron la relación entre los factores histopatológicos y la calidad del ADN, igualmente estandarizaron un método de macrodissección de próxima generación; para ello utilizaron 218 muestras de tejido fijado en formalina y embebido en parafina y tomaron en cuenta 15 factores histopatológicos con la proporción cuantitativa de ADN de doble cadena con respecto a ácidos nucleicos totales y el valor de la calidad del ADN. Los resultados fueron que el almacenamiento de la muestra durante un periodo mayor o igual a 3 años no se asocia con la calidad del ADN; pero las muestras que presentaron acúmulos de moco se asociaron positivamente con la calidad del ADN; mientras que las muestras de tumores metastásicos con periodos de almacenamiento extensos se relacionaron significativamente con valores bajos en el punto de cruce. En conclusión; el método de macrodissección no debe implementarse en muestras que presentan factores histopatológicos debido a que rinden baja calidad de ADN. Con respecto a la pertinencia de este aporte con la investigación se encuentra que la

calidad del ADN extraído de tejidos embebidos en parafina previa fijación en formalina se ve también afectada por las condiciones histológicas del tejido mismo antes de su fijación.

Así mismo, en el 2020, Oba et al⁹, probaron un método para obtener ADN de manera pura de muestras de tejidos embebidos en parafina fijados en formalina mejorando la temperatura y el tiempo de incubación, de igual forma la concentración de un compuesto llamado Tris Hidroximetil Aminometano que actúa en sustitución de la formalina, de esta manera se revierte la reticulación del ADN o formación de aductos. Los resultados generaron tres veces el rendimiento de ADN por cada corte de tejido comparando con un kit comercial para extracción de ADN, en este sentido aumentó el rendimiento de la secuenciación con respecto a la obtenida con el kit comúnmente utilizado y tomaron en cuenta que la secuenciación producida con ADN de FFPE y el método implementado disponía de inserciones mucho más largas. En cuanto al aporte de este estudio, se demuestra que se puede mejorar la calidad del ADN extraído de biopsias embebidas en parafina si se revierte el proceso de reticulación del ADN que genera la formalina.

Por último, en la investigación de Khan et al⁶, realizada en el 2022, se evaluó y comparó varios métodos de extracción de ADN genómico para mejorar la técnica de PCR en tejidos almacenados con fijación en formalina y embebidos en parafina provenientes de pacientes con carcinoma oral de células escamosas; para ello utilizaron 75 muestras de este tejido que fueron seleccionadas del registro histológico y las dividieron en dos grupos; Grupo I: tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina a corto plazo, Grupo II: tejidos embebidos en parafina que fueron

fijados con formalina a largo plazo. Los resultados les permitió demostrar que un 93,3% de las muestras del grupo I lograron una mejor calidad y cantidad de ADN, en comparación con el rendimiento del grupo II que fue del 53,3 % aunque mediante PCR la amplificación del ADN fue mayor, la calidad obtenida fue con degradación, pues se generaron numerosos fragmentos de ADN. Posteriormente el método de extracción de ADN donde obtuvieron mayor cantidad de amplificados fue el convencional con Fenol-Cloroformo con respecto al kit comercial. En este sentido concluyeron que para obtener una integridad adecuada del ADN las muestras deben fijarse en formalina por corto tiempo, una noche y se debe desparafinar el tejido con Xileno para luego exponerlo al protocolo convencional de aislamiento de ADN con fenol – cloroformo. De igual forma, este estudio hace un aporte con respecto a cómo afecta el tiempo de fijación en formalina del tejido obtenido por biopsia el rendimiento del ADN extraído para pruebas de PCR.

Antecedentes Históricos

Por allá en 1869 un científico llamado Friedrich Miescher aisló una sustancia rica en fosfatos, que no contenía azufre y era resistente a proteasas, de igual manera la sustancia no correspondía ni a lípidos ni proteínas. Miescher también se dio cuenta que la molécula estaba presente en todos los núcleos de todas las células, por ende este investigador la llamó “nucleína”. Luego, descubrió que su naturaleza era ácida, dándole el nombre genérico de “ácido nucleico”. Este fue el primer descubrimiento que luego llevó a comprender como se transmiten las características de una generación a otra¹⁰.

Ahora bien, en 1949 el austriaco Erwin Chargaff, fue uno de los primeros científicos en implementar la técnica denominada “cromatografía en papel” con el objetivo de analizar la composición de nucleótidos presentes en el ADN, con sus datos logro comprobar que diferentes nucleótidos estaban en cantidades iguales, de igual manera que las proporciones de los nucleótidos eran exactas y van a variar de una especie a otra. Estos hallazgos le permitió a Chargaff llegar a la conclusión que la organización exacta de los nucleótidos dentro de la molécula de ADN era la que le confiere a está su especificidad genética y que el orden de las proporciones relativas de las cuatro bases no era al azar, sino que la cantidad de residuos de Adenina (A) en todas las muestras de ADN era igual a la de los residuos de Timina (T), que la cantidad de residuos de Guanina (G) era igual a la de los residuos de Citosina (C). Por otro lado, expreso que no importa el origen del ADN, siempre las cantidades de purina y de pirimidinas se van a igualar, es decir la relación es 1:1 (purinas = pirimidinas)¹¹.

Siguiendo la línea del tiempo, en 1953 la química y cristalógrafa británica Rosalind Franklin, el neozelandés Maurice Wilkins, el británico Francis Crick y el estadounidense James Watson, lograron explicar mediante estudios de difracción de rayos X, la estructura molecular de la doble hélice del ADN, con estos resultados en 1962 fueron merecedores del Premio Nobel de Fisiología y Medicina. Según los resultados de estos investigadores, el ADN está constituido por dos hebras complementarias en orientación antiparalela de polinucleótidos enrolladas sobre si mismas hacia la derecha en torno a un eje central imaginario mantenida por enlaces de hidrógeno; de esta manera las bases nitrogenadas se proyectan al interior, y los esqueletos de azúcar-fosfato de la cadena polinucleotídica se ubican hacia el exterior. Los autores también describieron que el proceso de apareamiento de las bases entre

las hebras permite la estabilización de la estructura, al igual que la interacción hidrófoba que existe entre las bases adyacentes¹².

Tres años después, Arthur Kornberg en 1956, logró la síntesis del ADN en extractos bacterianos acelulares, descubriendo que se necesitaba para ello una enzima polimerizante específica que cataliza el enlace de los precursores monoméricos (nucleótidos) del ADN. Este autor aprovechó la información de estudios previos donde se había evidenciado que los nucleótidos precursores del ADN contienen energía (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) que permite la reacción de polimerización, además logró la identificación de un polipéptido individual: la ADN polimerasa I, capaz de catalizar la síntesis de la cadena de ADN nueva y unir los nucleótidos precursores por medio de enlaces fosfodiéster 3' – 5' requiriendo la presencia de una cadena molde o plantilla para poder mantener la secuencia del ADN¹³.

Por otro lado, el médico científico Harald zur Hausen en 1974 demostró que los tipos de VPH difieren en las verrugas plantares y genitales. De igual forma en el año 1976 presentó las hipótesis sobre el VPH como posible causa de Cáncer de Cuello Uterino. Igualmente, el científico Guissmann Lutz en 1980, realizó estudios sobre las secuencias de ADN obtenidas de mediante la aplicación de Sondas de Hibridación, logrando aislar una diversidad de tipos de Virus del Papiloma¹⁴.

Siguiendo con los descubrimientos sobre VPH y su asociación con cáncer, Mahmoudvand et al.¹⁵ en 2015 evaluaron la asociación entre la infección por VPH y el adenocarcinoma de colon y pólipos adenomatosos encontrando ADN de VPH en 2 (2,85%) de 70 tejidos de adenocarcinoma colorrectal y en 4 (5,71%) de 70 tejidos de pólipos adenomatosos colorrectales. Todos los tejidos colorrectales con características

normales fueron negativos para el ADN del VPH siendo VPH16 el genotipo más predominante seguido de VPH18. Asimismo, los análisis estadísticos no indicaron diferencias significativas en las frecuencias de sujetos positivos para el VPH entre las muestras cancerosas y pólipos.

Por último, para destacar la importancia de la detección molecular del VPH en tejidos provenientes de neoplasias embebidos en parafina, se cita a los autores Mahmoodi, Motamedi, Seyfi Abad Shapouri et al.⁴ quienes realizaron la detección y tipificación molecular de VPH en muestras de cuello uterino embebido en parafina de pacientes con displasia/metaplasia cervical y carcinoma de células escamosas (CCE); para ello seleccionaron 72 biopsias archivadas. La detección se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente, las cepas de VPH detectadas se tipificaron por análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los amplificadores de PCR. Finalmente se encontró que 60 de las 72 muestras disponen de los requisitos indispensables para la prueba molecular y el ADN del VPH se detectó en un 43,3% de estas muestras; la mayoría de las muestras positivas para VPH eran de mujeres entre 48 a 63 años. Ahora bien, la infección por VPH entre los pacientes con CCE fue del 48,78% y en las mujeres con displasia/metaplasia fue del 26,66%; mientras que el genotipo de mayor predominio fue VPH16 (100%). Finalmente los autores concluyeron que conocer el tipo de VPH es importante y determinaron que el dominante y frecuente en la población es el VPH16. Esto permite que los futuros programas de detección y tratamiento de esta enfermedad sean más efectivos así como las jornadas de vacunación contra los tipos prevalentes del virus. Mientras tanto, se deben realizar más estudios para determinar los diferentes factores

de riesgo involucrados en el desarrollo de la infección, especialmente los relacionados con los comportamientos sociales y los tradicionales con respecto a diferentes áreas¹⁶.

BASES TEÓRICAS

La molécula de ADN

Nuestro ADN es una molécula de síntesis biológica, la cual contiene la información para poner en funcionamiento la célula, algunos aspectos de su estructura ya fueron mencionados; la molécula está conformada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que van a interactuar para dar origen a una doble hélice enrollada sobre un eje imaginario. Las subunidades que conforman la molécula de ADN se llaman nucleótidos, cada subunidad está formada por un azúcar tipo desoxirribosa, un grupo fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas, Adenina, Guanina, Citosina y Timina, estas bases se disponen en una secuencia determinada en cada cadena, una complementaria de la otra mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los pares Adenina-Timina, y Citosina-guanina de la forma conformacional molecular posible. El ADN tiene la función primordial de transmitir la información genética de generación en generación, a través de sus genes expresa las moléculas proteicas, ribosomales, mensajeras, hormonales y otras necesarias para mantener a la célula viva y cumpliendo su función dentro del tejido¹⁷.

Para complementar la información, se menciona que el ADN es una molécula ubicua, presente en todos los tipos celulares cuya información genética esté contenida en ácido nucleico tipo desorribonucleico, también presente en algunos tipos de virus, como el de VPH. Por eso, al realizar métodos de extracción de ADN de tejidos con

sospecha de infección por este virus, su ADN también formará parte del ADN total extraído, de ahí la importancia de contar con un buen método de extracción¹⁷.

Transcripción

Es un proceso del metabolismo del ADN que conlleva a la síntesis de ARN, de varios tipos, mensajero, ribosomal y traduccional, la molécula de ADN sirve de platilla o molde, para ello las enzimas de ARN polimerasa y ciertos complejos proteicos dirigen la desnaturalización del ADN y exponen ciertas regiones para ser transcritas; de esta forma se produce un ARN monocatenario que cumplirá su función según su secuencia. Para el caso de genes que expresan proteínas, al iniciarse su proceso de transcripción para sintetizar el ARN mensajero, la ARN polimerasa identifica el gen a transcribir, se une a la hebra de ADN correcta en una secuencia promotora del proceso y va dirigiendo la formación de la cadena de ARN en la dirección 5' a 3' utilizando como molde la secuencia de ADN, las subunidades que utiliza también son nucleótidos, con un azúcar tipo ribosa y las bases nitrogenadas además de Adenina, Citosina, Guanina y Uracilo en vez de Timina.

Otro aspecto importante del proceso de transcripción es que, al finalizar, la nueva molécula de ARN puede o no sufrir modificaciones químicas postranscripcionales, dependiendo del tipo celular y de la función de ese ARN¹⁸.

Replicación

Este es un proceso con un nivel de complejidad elevado esto se debe a que se necesita diferentes tipos de proteínas dentro de las que se incluye el ADN polimerasa,

primasa, helicasa y ligasa. Todas estas proteínas deben trabajar en conjunto con la meta de llevar a cabo el proceso, para ello conforman un complejo que además del componente proteico contiene el ácido nucleico a ser replicado desde un punto de origen específico en el cromosoma. El proceso inicia cuando la doble hélice del ADN se desenrolla en ese punto específico llamado *ori* (origen) este desenrollamiento implica rompimiento de los enlaces de hidrógeno, la enzima ADN helicasa introduce un corte en la cadena de ADN en una región rica en pares de A-T cuando todos los componentes del complejo están en la conformación se inicia la formación de la horquilla de replicación la cual va a tener una hebra principal o conductora y una hebra rezagada. Para el inicio del proceso, la enzima ARN primasa inicia la síntesis de cebadores cortos de ARN con el objetivo de generar extremos químicos que sirvan de partida para que la ADN polimerasa empiece a incorporar nucleótidos, de esta manera la enzima puede iniciar la síntesis de la nueva hebra en sentido 5' 3', la hebra rezagada se sintetiza en fragmentos cortos llamados de OKazaki, esto lo va a realizar el complejo de replicación en aparente sentido opuesto a la dirección que sigue el complejo en la cadena conductora. Al finalizar el proceso, los cebadores de ARN se eliminan y son reemplazados por ADN mediante la enzima ADN ligasa, ésta va a unir los fragmentos de OKazaki con enlace covalente tipo fosfodiéster en los sitios donde la cadena se inicia y termina otra, de esta manera se realiza la replicación simultánea de las dos cadenas, obteniendo dos hebras de ADN hijas que son nuevas, una doble hélice que va a contener una hebra original y una hebra recién sintetizada. Posteriormente al finalizar el proceso, la hebra rezagada sintetizada va a hacer más corta con un extremo 3' libre esto se debe a la incapacidad del ADN primasa para agregar un cebador, para complementar, la enzima telomerasa se ubica en estos

extremos de los cromosomas agregando nucleótidos y de esta forma evitar pérdida de información genética durante el proceso de replicado, en caso de ausencia de los telómeros los cromosomas se acortan durante el proceso y la célula sufriría senescencia prematura^{19,20}.

Ahora bien, la fragmentación del ADN consiste en un rompimiento de las hebras mediante cortes en las dos cadenas, lo que puede afectar la replicación, in vivo e in vitro; esta fragmentación se origina por el bloqueo del complejo de replicación en sitios donde el ADN tiene enlaces no naturales, esto se induce en presencia de soluciones fijadores del tejido tipo formalina, una solución con moléculas de formaldehído con elevados niveles de reactividad que afectan las proteínas y las bases del ADN, como resultado se forman aductos en el ADN es decir entrecruzamientos covalentes entre el ADN y las histonas²¹.

www.bdigital.ula.ve

Métodos de Fijación

Los métodos de fijación van a permitir la preservación de tejidos al eliminar el exceso de agua, este proceso puede realizarse a través de métodos físico y químicos. En el caso de los métodos físicos se utiliza el calor; esto favorece la aceleración de otros procesos de fijación. Por ejemplo, la fijación generando calor en horno Microondas fija el tejido con mayor rapidez. En cuanto a la fijación Química donde se utilizan soluciones en estado líquido, es el método más frecuente para el diagnóstico histopatológico. Estos se clasifican en Coagulantes y Los No Coagulantes. Los Fijadores Coagulantes alteran las cargas de las proteínas produciendo insolubilidad de las mismas, permitiendo mantener la histomorfología de los tejidos. Por otro lado,

los Fijadores no Coagulantes generan entrecruzamientos con las proteínas y los ácidos nucleicos. Así mismo se caracterizan por tener:

- Alta efectividad de inserción de diversos tipos de tejidos.
- Apropiados para los diferentes protocolos de laboratorio.
- Permiten obtener morfológicamente buenos resultados.
- Una amplia estabilidad en la vida útil
- La compatibilidad con los distintos procesadores.
- La rapidez de fijación.
- Alta seguridad y accesibilidad^{22,23}.

Virus de Papiloma Humano

En cuanto a la biología del Virus del Papiloma Humano (VPH) se puede mencionar que su material genético es ADN circular de doble cadena, con un tamaño de unos 8000 pb y está contenido en una envoltura proteica estructurada por 72 capsómeros con simetría icosaédrica, llamada cápside. El genoma está dividido funcionalmente en tres regiones; la región de control, la región temprana y la región tardía. La Región de control tiene la finalidad de regular el ciclo de viral y responde a señales proteicas tanto celulares como virales. La Región temprana está compuesta por los genes (E) que van a codificar las proteínas E1 a la E7 responsables de la multiplicación, crecimiento y transformación celular. Por último la región tardía formada por los genes L1 y L2 que codifican las proteínas de la cápside viral.

Por otra parte, cabe destacar, que este virus es epiteliotrófico; es decir, posee la capacidad de infectar tejido de mucosa y epitelio²⁴.

Clasificación Taxonómica del VPH

Este virus se ha secuenciado y caracterizado en más de 200 tipos virales, en este sentido la clasificación taxonómica muestra la relación filogenética en base a las diferencias presentes en la secuencia de cierta región del genoma viral. La Familia Papillomaviridae posee 16 géneros los cuales se van a clasificar con letras griegas los específicos de humano son los siguientes:

- *Alpha Papilomaviridae* (α -PV): Desarrollan cambios a nivel del epitelio cutáneo, el epitelio mucoso del tracto anogenital y oral produciendo verrugas y lesiones neoplásicas. En este grupo encontramos los tipos: 1-3-5-6-8-10-11-12-13 y 14.
- *Beta Papilomaviridae* (β -PV): Son aquellos en la cual generan infecciones latentes y que guardan relación clínica con pacientes inmunocomprometidos, haciendo referencia a los tipos: 8-20-36 y 38.
- *Gamma Papilomaviridae* (γ -PV): Es aquella familia que ocasionan papilomas y verrugas cutáneas. Los tipos que conforman este grupo son: 1-3-8 y 13²⁴.

Tipos Virales

La infección que ocasionan estos virus es uno de los factores que van a influir motivado a su capacidad de estimulación de crecimiento celular descontrolado, esto puede relacionarse a formación de tumores en distintos epitelios, en área genital sería en ano, vulva, vagina, pene o en cavidad oral²⁵ (ver figura 1).

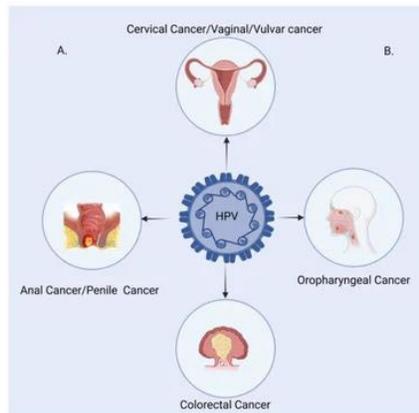


Figura 1. Zonas afectadas por Tumores Malignos. Dentro de estos sitios están: pene, vagina, orofaringe, zona colorrectal y anal⁶.

Hoy en día se han detectado más de 200 genotipos, los mismos se van a dividir de acuerdo a su relación con tumores malignos en bajo y alto riesgo oncogénico^{6,26}.

www.bdigital.ula.ve Bajo Riesgo

Los genotipos de bajo riesgo son aquellos que tienen baja capacidad de causar cáncer. Estos son los responsables de generar verrugas benignas, condilomas acuminados y papilomatosis laríngea. Los genotipos más frecuentes que forman parte de esta división son: 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 83, 84 y 89. En el caso de los tipos 6 y 11 son los más frecuentes en lesiones tipo verrugas genitales y anales, por otro lado los condilomas acuminados suelen aparecer en los genitales, zona anal y en boca y en cuanto a los papilomatosis laríngea que son verrugas que se presentan en la parte superior de la laringe y generan dificultad para respirar¹.

Alto Riesgo

Suelen transmitirse al través del contacto sexual, dentro de los genotipos principales y relacionados con cáncer de cuello uterino, se encuentra los siguientes subtipos:16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Es importante señalar que los tipos 31, 33, 35 y 39 pueden generar cáncer en otras áreas del cuerpo, estas áreas son: vulva, garganta y ano^{27,28}.

Es importante señalar que el cáncer de cuello uterino es una de principales causas de muerte por cáncer de la mujer en el mundo, se desarrolla por la infección persistente de tipos de VPH de alto riesgo, dicho virus se adquiere por contacto sexual, por lo que se recomienda la detección temprana del mismo, para ello se cuenta con métodos de diagnóstico clínico y molecular eficaces²⁶⁻²⁸.

www.bdigital.ula.ve

Métodos de Diagnóstico de infección por VPH

Hoy en día existen múltiples herramientas que están a disposición de los médicos especialistas y son implementadas en la actualidad, esto gracias a los esfuerzos de grandes científicos lo que ha permitido el avance de los métodos de diagnóstico del VPH, dentro de estas herramientas se tienen las siguientes:

- **Citología:** Está prueba permite detectar células anormales que pueden estar presente en el cuello uterino
- **Colposcopia:** Es un procedimiento que se emplea para identificar células anormales, las mismas se pueden encontrar en vulva, vagina o cuello uterino.

• **Inmunohisquímica:** Es una prueba inmuoenzimática, en la cual se utilizan anticuerpos como marcadores, anticuerpos que van unidos a la enzima con el objetivo de detectar cambios celulares en muestras de tejido mamario, vulvares o de cuellos uterino, el resultado de dicha prueba se va a observar por fluorescencia.

Para concluir este apartado, estas técnicas de detección han logrado un diagnóstico rápido y exacto de lesiones causadas por VPH pero no lo detecta directamente. Ahora bien, existen también técnicas de análisis molecular que van a tener una alta sensibilidad, especificidad y una elevada precisión para la detección de este virus dentro ella tenemos:

• **Reacción en Cadena de la Polimerasas (PCR):** Permite la amplificación de un fragmento de ADN específico el cual luego puede visualizarse e identificarse por otros métodos adicionales, como fragmentación con enzimas de restricción y electroforesis.

• **Captura de Híbridos:** es una prueba desarrollada por una casa comercial que permite la detección del ADN viral mediante la hibridación con sondas de ARN con identidad, lo que permite detectar el tipo viral.

• **Southern blot:** técnica de la biología molecular que puede complementar la identificación de los fragmentos de ADN mediante la utilización de sondas de marcaje.

• **Hibridación in situ,** está como la anterior, también permite la identificación de fragmentos de ADN con sondas o fragmentos de ADN más pequeños marcados e identificados molecularmente^{1,2,4,5,19,27,29}.

Importancia de la Detección y Tipificación del VPH

La infección por VPH es una de las enfermedades de transmisión sexual de mayor frecuencia a nivel mundial. Ahora bien, en lo que respecta a las lesiones que el virus genera, son asociadas a diferentes tipos de VPH que van a influir en el desarrollo de lesiones que van a ir desde Benignas hasta malignas en las cuales las lesiones malignas tienen mayor capacidad de progresión y propagación a cáncer de cuello uterino. No obstante hay que destacar que no todas las personas infectadas con VPH van a desarrollar dichas lesiones. Es por esto que la responsabilidad de prevención y protección de la vida sexual es primordial, de igual manera realizarse un chequeo anual que permita conocer las condiciones de salud tanto en hombres como en mujeres, del mismo modo se cuenta hoy en día con vacunas que se pueden aplicar a partir de los 9 años^{27,28}.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica de alta sensibilidad, que se emplea para crear copias de fragmentos de ácidos nucleicos, todo esto se da mediante la desnaturalización y renaturalización de los segmentos cortos de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), implementando una enzima polimerasa Taq. Así mismo, permite detectar y examinar segmentos pequeños de ADN, identificar huellas genéticas, detectar bacterias o virus, y los diagnósticos de enfermedades genéticas^{2,6,27}.

Ventajas de la PCR

- Alta Especificidad
- Alta Sensibilidad para detectar bajas concentraciones de ADN.

Limitaciones de la PCR

- Agotamiento del Reactivo
- Los resultados Falsos Positivos debido a materiales contaminados, muestras de baja calidad, con ADN degradado²⁷.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

www.bdigital.ula.ve

Objetivo General

Comparar la calidad del ADN total extraído de muestras de lesiones en tejidos del área genital incluidos en Parafina mediante PCR, para la detección y tipificación de VPH.

Objetivos Específicos

- Introducir variaciones al método de extracción de ADN de muestras de tejido incluidas en parafina, considerando parámetros de pureza, integridad y funcionalidad de la molécula extraída.
- Probar la integridad y funcionalidad del ADN extraído de muestras de tejido incluidas en parafina mediante la prueba de PCR.

- Probar la calidad del ADN extraído de muestras de tejido incluidas en parafina en cuanto a pureza mediante espectrofotometría.

MARCO METODOLOGICO

Tipo de investigación

La investigación se fundamenta en el descubrimiento y comprensión de cada uno de los elementos de la información, de este modo se elabora la propuesta que está enmarcada en sus componentes. Dentro de este contexto la investigación Según Jacqueline Hurtado³⁰ la expresa como, un proceso continuo y organizado mediante el cual se pretende conocer algún evento (características, proceso, hecho o situación), ya sea con el fin de encontrar leyes generales o simplemente con el propósito de obtener respuestas particulares a una necesidad o inquietud determinada. Mientras tanto, Arias³¹ hace referencia al tipo de investigación como el Indicador del grado de profundidad con que el investigador realiza el estudio. Es por eso que este proyecto se clasifica como una Investigación de Tipo Evaluativa/comparativa que según Jacqueline Hurtado³⁰ lo expresa como la evaluación de los resultados de uno o más programas, que han sido, o están siendo aplicados dentro de un contexto determinado. En relación a esto las investigaciones evaluativas son aquellas que requieren un nivel de investigación detallado, preciso, exacto y a profundidad debido a la naturaleza del proceso, con la meta explicar, conocer y comprender las situaciones presentadas y a partir de aquí crear nuevos caminos.

Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación según Hernández Sampieri et al.³² consiste en un plan o series de acciones que van estar establecidas para lograr la información deseada con la meta de responder a un planteamiento de un problema. Ahora bien, Fidas Arias³¹; lo expresa como las estrategias generales que adopta el investigador para responder al problema planteado. Desde esta perspectiva se puede decir que el diseño de la investigación es importante porque permite la validez de los resultados, por otro lado, son todas las acciones o actividades que se van a plantear con el objetivo de buscar la solución al problema planteado, la respuesta a ese problema debe ser ordenado, coherente, confiable y preciso.

El diseño y cada uno de los aspectos involucrados en este proyecto indican que la misma corresponde a un Diseño de tipo Experimental porque según Hernández Sampieri³²; lo explica como: Un conjunto de estudios de alta estructura que van a determinar los factores o causas de los eventos o fenómenos presentados. Dicho esto, se puede decir que los estudios o diseños experimentales están basados en métodos científicos que van a buscar los factores o elementos de un fenómeno presentado, van a requerir varias técnicas para recolectar la información deseada y por último el análisis de los resultados y la conclusión del estudio.

Población

En cuanto a esto, Ríos³³ expresa que la población, es como el total de casos, objeto o grupo de elementos que se van a investigar. Por otro lado, Hernández

Sampieri et al.³² lo define cómo el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. En algunos casos la población es tan grande o inaccesible que no se puede estudiar toda, entonces el investigador tendrá la posibilidad de seleccionar una muestra. En líneas generales, la población tiene elementos con características comunes que son de interés en un estudio determinado y que se van a evaluar como grupo de individuos, objetos o eventos, así mismo esa población puede ser finita o infinita de acuerdo a los elementos que conforman esa población.

En esta investigación, la población estaría conformada por las muestras de tejido embebido en parafina provenientes del área genital de mujeres con edades comprendidas entre 20 a 35 años del municipio Libertador del estado Mérida, que solicitaron voluntariamente el servicio de diagnóstico molecular del VPH y suministraron dichas muestras por instrucción de sus médicos especialistas tratantes.

Muestra

Hernández Sampieri et al.³² expresa que la muestra es un subgrupo de la población de interés en la que se van a recolectar los datos adecuados y deberán ser representativos de la población. Dentro de este contexto el autor hace referencia que la muestra debe ser representativa, esto significa que se debe elegir ya que la misma refleja las características de la población en estudio, por otra parte, se va a obtener un resultado preciso y confiable, para ello se aplican instrumentos adecuados para la recolección eficaz. En esta investigación se incluyeron apenas siete bloques de parafina con tejido tomado por biopsias de lesiones en el área genital de mujeres que

acudieron con su médico especialista encargado de la toma de estas biopsias según sus criterios, en este sentido, la población y muestra coinciden debido al limitado número de estas que llegan al servicio de diagnóstico molecular del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX.

Sistema de Variables

Ríos³³ reseña que la Variable es la característica posible de variación manifestada de manera cualitativa o cuantitativamente de los grupos, individuos u objetos observados estos a su vez pueden adquirir diferentes valores. Vemos entonces que la variable son todos esos elementos que se pueden medir y que se pueden describir de acuerdo a sus características y su pueden expresar en cantidades, abarcando las respuesta de la investigación.

Variable Dependiente

Hernández Sampieri et al.³²; la expresa como aquella condición que anteceden y al efecto provoca una causa. De igual forma, Ríos³³ lo establece como el efecto que genera el comportamiento de la variable independiente. Está variable va a permitir observar el efecto y manipulación de la variable independiente. En la presente investigación, la variable dependiente es la calidad del ADN extraído del tejido embebido en parafina y es dicotómica, si tiene calidad, o no tiene calidad para la prueba molecular.

Variable Independiente

Hernández Sampieri et al.³² es el conjunto de acciones que se van a considerar cómo causa en una relación entre variables. En el caso de Ríos³³ la expresa como causa del comportamiento o efecto de una o varias variables dependientes. En otros términos, la variable independiente va a representar las causas o factores que incidieron en resultados obtenidos, por lo cual hace que la variable dependiente cambié. En esta investigación la variable independiente es la modificación del método de extracción del ADN, y es de tipo dicotómica, porque puede observarse si genera ADN de calidad, o no genera ADN de calidad, de acuerdo a la modificación al método que se introduzca.

www.bdigital.ula.ve

Instrumento de recolección de datos

Hernández Sampieri et al. hace referencia al instrumento de recolección de datos que consiste en aplicar uno o varios instrumentos de medición con el objetivo de recaudar la información necesaria de las distintas variables presentes en la investigación³². Para reforzar lo expresado la recolección de los datos debe hacer de manera meticulosa y ordenada esto debido a la garantía de los resultados que van a hacer relevantes en el estudio de investigación. En esta investigación el instrumento de recolección de datos se limita a la toma de nota de los resultados observados en un cuaderno o bitácora, que se organizarán en tablas para cada tipo de medida a realizar de cada instrumento o método de laboratorio a implementar, el espectrofotómetro, el resultado de PCR.

Procedimientos de la Investigación

Para el estudio realizado, durante el período 2018-2019, en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (Labiomex) de la Universidad de Los Andes Mérida, Venezuela; se recibieron 16 biopsias incluidas en parafina de muestras del área genital de pacientes Femeninos y Masculinos para la detección y tipificación de VPH, de las cuales se escogieron 9 (nueve), tomando en cuenta cantidad de tejido embebido para poder obtener muestra suficiente para probar las cuatro variaciones al método que se describen a continuación.

Preparación de las Muestras

Se cortaron o rallaron los 9 (nueve) bloques de parafina escogidos obteniendo de 2mg a 14mg del tejido y se almacenó en tubos de microcentrifugación tipo Eppendorf de 1,5 ml. Dichos cortes, fueron sometidos a cuatro variaciones del proceso de desparafinación y luego a extracción del ADN con el método convencional de Fenol-Cloroformo, aclarando que el Método de Extracción de ADN de muestras embebidas en parafina completo sigue básicamente tres pasos: Desparafinación o remoción de la parafina con el alcohol Xileno o Xilol, digestión del tejido por Proteínasa K y purificación con Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell, 2001); es decir, en esta investigación se probaron cuatro variaciones del primer paso, la desparafinación que se describen a continuación.

Remoción de parafina con Xilol

A cada muestra de tejido cortado del bloque de parafina, se agregó 500 ul de Xilol y se llevó a 65°C x 30 min en equipo automático Termomix programado con agitación leve; a continuación se retiró el Xilol y se procedió al lavado con etanol (500ul-800ul) realizando de 4 a 6 lavados, con agitación fuerte en equipo Vortex, y se centrifugó 5 min en equipo microcentrífuga Eppendorf a alta velocidad. Después del último lavado se permitió evaporar el etanol a temperatura ambiente. Al tejido así tratado se le añadió 400ul de Buffer de Lisis (TrisHCL; NaCl; EDTA), 100 ul de Proteinasa K (10mg/ul) y 40 ul de SDS al 10%. Se incubó a 65°C durante toda la noche, hasta que fue digerido el tejido en su totalidad. Se tomó 300 ul del sobrenadante y se llevó a un nuevo tubo; se agregó 200ul de Chelex a 94°C durante 15 min, luego se dejó reposar, se centrifugó brevemente para bajar el pellet y se tomó 400 ul del sobrenadante para luego precipitar el ADN con 2 volúmenes (Vol.) de etanol al 100%, en total, 800ul de etanol y 0.2 Vol de acetato de amonio (80ul) permitiendo precipitación a -20°C toda la noche. Cumplido el tiempo se centrifugó durante 15min a máxima velocidad en la microcentrífuga, se descartó el etanol, permitiendo la evaporación en equipo Campana de flujo laminar y el precipitado se suspendió en TE de 50ul a 100ul y finalmente, se conservó a 4°C hasta su procesamiento.

Remoción de Parafina con Agua calentando en Termomix con agitación.

Al tejido cortado se le colocó 1000ul de agua estéril y se llevó a 70°C con agitación en termomix, 300 rpm por 2min, luego se centrifugó 1 min a 2000rpm en microcentrífuga, se procedió a descartar el agua y repetir el proceso, pero a 95°C.

95°C, 300 rpm por 2min; este último proceso se repitió tres veces, con la finalidad de eliminar la parafina. Luego de la última centrifugación, al sedimento se le continuó el método de extracción de ADN como se describió en el punto anterior.

Remoción de parafina con Tween 20 calentando en microondas

Al tejido cortado se agregó 200ul de una solución Tween 20 al 0,5%, se agitó fuerte o alta velocidad en termomix por 1min. Luego, se procedió a calentar en microondas a 600w por 1 min; se centrifugó a 4000 rpm por 30 seg, para después enfriar en hielo durante 2 min. Se descartó el agua y disco de parafina formado. Se añadió agua nuevamente (1000ul) y se centrifugó a 4000rpm por 30seg, para después descartar el agua.

A pesar del tratamiento se observó restos de parafina en las muestras, los cuales se removieron llevando cada muestra a una cápsula de Petri y lavando con agua destilada, se retiró manualmente con ayuda de una pinza estéril. Por último, el tejido se transfirió a un tubo nuevo. Luego de éste proceso, al sedimento se procedió a la extracción del ADN como se explicó para los dos procesos anteriores.

Remoción de parafina con Tween20 calentando en Termociclador

Se añadieron 200ul de Tween 20 al 0,5% a la sección del tejido y se agitó fuerte en termomix por 1min. Se calentaron las muestras en termociclador a 90°C por 10min, para después dejarse enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4000 rpm por 30seg. Se descartó el agua y disco de parafina formado. Se llenó con agua limpia

(1000ul) y se le aplicó centrifuga a 4000 rpm por 30seg, para después descartar el agua. Luego, se removieron los restos de parafina como se explicó para el proceso anterior, y se procedió a la extracción del ADN como se explicó para los procesos anteriores.

Evaluación de la Calidad del ADN del ADN extraído

El ADN extraído de cada muestra tratada como se explicó fue sometido a evaluación mediante medida de la concentración y pureza por espectrofotometría y amplificación por PCR en equipo termociclador, como se explica a continuación.

Concentración del ADN: A las muestras obtenidas se les midió la concentración de ADN mediante espectrofotometría midiendo los valores de Densidad Óptica (DO) a 260 nm y a 280 nm, para obtener una relación de DO que hablaría de la calidad y cantidad del ADN obtenido.

El método utilizado se resume de la siguiente manera:

1. Para cuantificar correctamente el ADN las muestras deben someterse a digestión con una enzima RNasa, que degrada todo el ARN presente para tener un estimado correcto. Para ello, se diluyó una alícuota de 10 μ L de ADN extraído con RNasa purificada con 90 μ L de TE (dilución 1/10). Se mezcló suavemente con la pipeta. Se esperó que desaparecieran las burbujas. Como segundo paso se añadió tampón TE en la celda de referencia para usarlo como blanco. Como tercer paso se procedió a medir la absorbancia a tres longitudes de onda, 320 nm, 280 nm y 260 nm.
4. En el cuarto caso se procedió a calcular los valores de A_{280} y A_{260} corregidos restando el valor de la absorbancia a 320 nm (A_{320}) de los valores de A_{280} y A_{260} . Como

quinto paso se procedió a calcular la concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$ = A_{260} corregido $\times 10$ (factor de dilución) $\times 50$ (factor de conversión). En el último paso se obtuvo el cociente A_{260}/A_{280} con los valores corregidos. El análisis se realizó por triplicado para cada tipo de muestra y los datos fueron recogidos en una tabla que se muestra en resultados.

Ejemplo:

Supongamos que la absorbancia a 320nm fue $A_{320}= 0.025$, y la absorbancia a 280nm fue $A_{280}= 0.175$, y la absorbancia a 260nm fue $A_{260}= 0.295$

La concentración de ADN de la muestra sin diluir será:

$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [factor de dilución]} \times 50 \text{ [factor de conversión]}$$

$$= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$$

$$= 0.270 \times 10 \times 50$$

$$= 135 \text{ ng}/\mu\text{l} \text{ ó } 135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$$

Para calcular la pureza utilizamos el cociente A_{260}/A_{280} que corregido será:

$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$

$$= (0.296 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$$

$$= 0.270 \div 0.150$$

$$= 1.80$$

Este último valor señala el grado de pureza de la muestra tomando en cuenta que el factor de conversión considera que una absorbancia de 1,0 a 260 nm se corresponde con una concentración de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($50 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) de dsDNA puro.

Amplificación por PCR: El ADN es sometido a esta reacción utilizando los siguientes reactivos: Buffer de reacción 1X, Cloruro de Magnesio 5,5 mM, dNTPS 200uM, 50 picomoles de los Oligonucleótidos iniciadores: GH20 y PC04 que amplifican un fragmento de 268 pares de bases del gen de la Beta globina humana, 2,5 Unidades (U) de Taq Polimerasa (Invitrogen), Agua (grado molecular) en cantidad suficiente para 25 ul de reacción y ADN como blanco de amplificación entre 50 y 100ng.

Como se mencionó, la reacción de PCR permite obtener un amplificado de la región del gen de la Beta globina y se utiliza tradicionalmente para valorar la calidad del ADN extraído, si se obtiene un buen amplificado, entonces se dice que el ADN extraído no contiene contaminantes inhibidores de la reacción y no está fragmentado o degradado en extremo. Para la detección y Tipificación de ADN de VPH se utilizan los mismos reactivos excepto que los oligonucleótidos iniciadores fueron los siguientes: MY09 y MY11.

Electroforesis

Esta técnica consiste en la migración de iones sometidos a un campo eléctrico en una matriz de agarosa o poliacrilamida, se utiliza ampliamente para la separación analítica de moléculas biológicas como el ADN. La electroforesis en gel, es uno de los métodos más poderosos y convenientes para la separación de macromoléculas. Las matrices más utilizadas son geles de poliacrilamida y agarosa que forman una malla con poros de dimensiones moleculares cuyos tamaños pueden especificarse. En la electroforesis en gel de agarosa, las concentraciones del polímero determinan el tamaño del poro y la separación de las moléculas viene dada por el peso molecular relacionado con el tamaño de estas. En esta investigación se utilizaron geles de

agarosa para la separación y visualización de las bandas de ADN obtenidas mediante la amplificación por PCR.

www.bdigital.ula.ve

RESULTADOS

La propuesta de este estudio fue comparar variaciones del primer paso del método de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina, que se conoce que produce ADN en condiciones de fragmentación que no permiten su amplificación por PCR; el uso de solventes como el Xilol para la desparafinación de los tejidos puede

representar un riesgo a la salud del operador, así mismo, el calentamiento de los tejidos y el uso de detergentes pueden introducir agentes que son inhibidores de la PCR. Por lo anterior se probaron cuatro modificaciones del paso de desparafinación del tejido, la primera es el protocolo clásico de utilización de Xilol, luego se probó el con agua caliente, seguidamente se probó con solución de detergente Tween-20 y calentando en dos equipos distintos, en microondas y en el termociclador, este último permite programar con precisión los tiempos de calentamiento y enfriamiento. Los resultados se muestran a continuación.

Resultados de Pureza del ADN por Espectrofotometría

En las siguientes tablas se muestran los resultados de la medición de absorbancia por cantidad de tejido cortado en mg, los datos se promediaron para mejor visualización. Los tejidos obtenidos por rallado o cortado de los bloques de parafina fueron pesados, se utilizaron en total 9 bloques de parafina, de los cuales se obtuvo una cantidad de tejido que fue distribuida equitativamente para las cuatro variaciones del método. En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran los pesos totales de los tejidos embebidos en parafina en miligramos por muestra.

TABLA 1. *Peso en mg de los tejidos con parafina de las muestras del estudio.*

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso en mg	24,1	18,2	42,1	22,2	25,4	34,3	7,6	8,4	51,8

Matheus Peña, G. P y Quintero Vega M (2023) Calidad Del ADN Extraído De Biopsias Incluidas En Parafina Para La Detección/Tipificación De VPH Por PCR. Trabajo de Investigación .Universidad De Los Andes, Mérida

En la tabla 2 se aprecian los resultados de la medición de la pureza del ADN de las primeras siete muestras, para las muestras 8 y 9 no se pudo obtener la medición, por lo tanto, no se muestran.

TABLA 2. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con Xilol

Muestra	DO A₂₆₀	DO A₂₈₀	Concentración ng/ul A₂₆₀	Concentración ng/ul A₂₆₀	Pureza
1	0,0698	0,0744	174,5	186	0,93,81
2	0,1388	0,1324	347	331	1,0483
3	0,1624	0,19	406	475	0,8547
4	0,1277	0,1427	319,25	356,75	0,8948
5	0,0952	0,0933	238	233,25	1,02
6	0,127	0,1298	317,5	324,5	0,9784
7	0,2097	0,2601	524,25	650,25	0,8062
promedio	0,1329	0,1461	323,31	352,09	0,9344

Matheus Peña, G. P y Quintero Vega M (2023) Calidad Del ADN Extraído De Biopsias Incluidas En Parafina Para La Detección/Tipificación De VPH Por PCR. Trabajo de Investigación .Universidad De Los Andes, Mérida

Seguidamente, en la tabla 3 se muestran los datos de la medición de absorbancia y cálculo de la pureza del ADN obtenido de las muestras bajo estudio.

TABLA 3. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFP con agua caliente

Muestra	DO A ₂₆₀	DO A ₂₈₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Pureza
1	0,3072	0,3761	768	940,25	0,816
2	1,1962	1,63	2.990,50	4,075	0,733
3	0,4586	0,545	1146,5	1362,5	0,841
4	0,4093	0,4968	1023,25	1242	0,823
5	0,734	0,7832	1835	1958	0,937
6	1,0571	1,1313	2642,75	2828,25	0,934
7	0,7473	0,8654	1868,25	2163,5	0,863
8	0,6261	0,6469	1565,25	1617,25	0,967
9	0,9361	0,9674	2340,25	2418,5	0,967
Promedio	0,7191	0,8269	1797,75	1614,925	0,875666667

Matheus Peña, G. P y Quintero Vega M (2023) Calidad Del ADN Extraído De Biopsias Incluidas En Parafina Para La Detección/Tipificación De VPH Por PCR. Trabajo de Investigación .Universidad De Los Andes, Mérida

En la tabla 4 que se muestra a continuación se presentan los datos respectivos de absorbancia y cálculo de pureza para la variación del método utilizando Tween-20 y calentamiento en microondas.

TABLA 4. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFFF con Tween/microondas

Muestra	DO A ₂₆₀	DO A ₂₈₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Pureza
1	0,0977	0,1242	244,25	310,5	0,786
2	0,0709	0,0884	177,25	221	0,802
3	0,4715	0,5658	1178,75	1414,5	0,8333
4	0,2802	0,3697	700,5	924,25	0,7579
5	0,4262	0,5939	1065,5	1484,75	0,7176
6	0,4253	0,4932	1063,25	1233	0,8623
7	0,864	0,8543	2160	2135,75	1,011
8	0,968	0,9516	2422,25	2379	1,0181
9	1,3416	1,3816	3354	3454	0,971
Promedio	0,549488	0,60252	1373,9722	1506,3055	0,86213333

Matheus Peña, G. P y Quintero Vega M (2023) Calidad Del ADN Extraído De Biopsias Incluidas En Parafina Para La Detección/Tipificación De VPH Por PCR. Trabajo de Investigación .Universidad De Los Andes, Mérida

Por último, en la tabla 5 mostrada a continuación, se presentan los datos de absorbancia y pureza para la variación tween-20 y calentamiento en termociclador.

TABLA 5. Absorbancia y pureza del ADN extraído de tejido EFFF con Tween/termociclador

Muestra	DO A ₂₆₀	DO A ₂₈₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Concentración ng/ul A ₂₆₀	Pureza
---------	---------------------	---------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------

1	0,2313	0,3512	578,25	878	0,6585
2	0,1044	0,1359	261	339,75	0,7682
3	0,1418	0,1694	354,5	423,5	0,837
4	0,4287	0,4337	1071,75	1084,25	0,9887
5	0,2987	0,4271	764,75	1067,75	0,6993
6	0,5098	0,5054	1274,5	1263,5	1,008
7	0,3102	0,4499	780,5	1124,75	0,6939
8	0,1122	0,1668	280,5	417	0,6726
9	0,2908	0,3815	727	953,75	0,7622
Promedio	0,26976	0,3356	676,9722	839,1388	0,7876

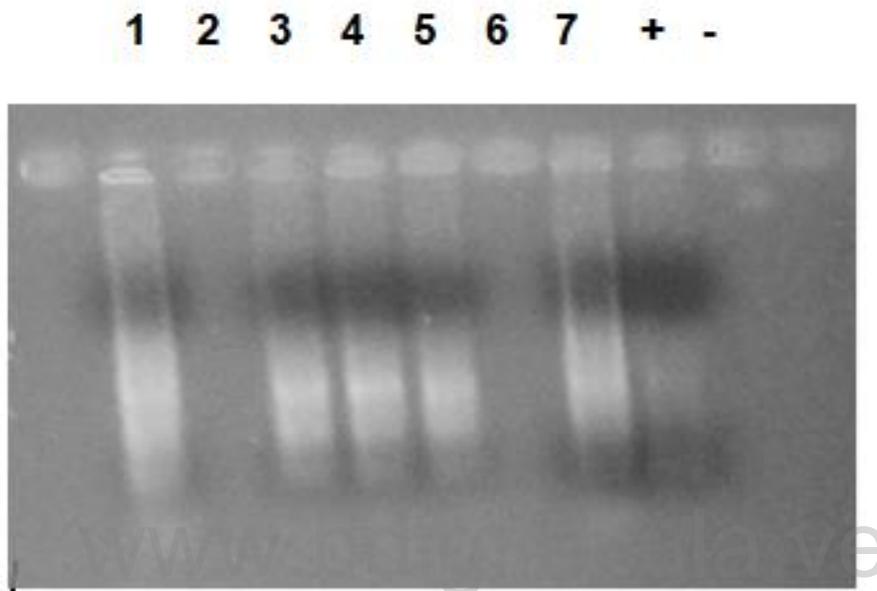
Matheus Peña, G. P y Quintero Vega M (2023) Calidad Del ADN Extraído De Biopsias Incluidas En Parafina Para La Detección/Tipificación De VPH Por PCR. Trabajo de Investigación .Universidad De Los Andes, Mérida

Calidad del ADN extraído para la PCR-Beta Globina

Para probar la calidad en cuanto a integridad de la molécula, es decir, que no se obtenga de forma fragmentada al extraerla del tejido y someterla a amplificación, se implementó una PCR para amplificar una fracción del gen de la Beta-globina humana, ya que es una prueba de PCR que se utiliza siempre en todos los métodos de diagnóstico por PCR en humanos, y si se logra obtener amplificados entonces el ADN probado se considera que tiene la calidad suficiente para soportar un proceso de Amplificación por PCR. El protocolo de la PCR se explicó en la sección de metodología, y a continuación se presenta la figura 1 donde se muestra el resultado

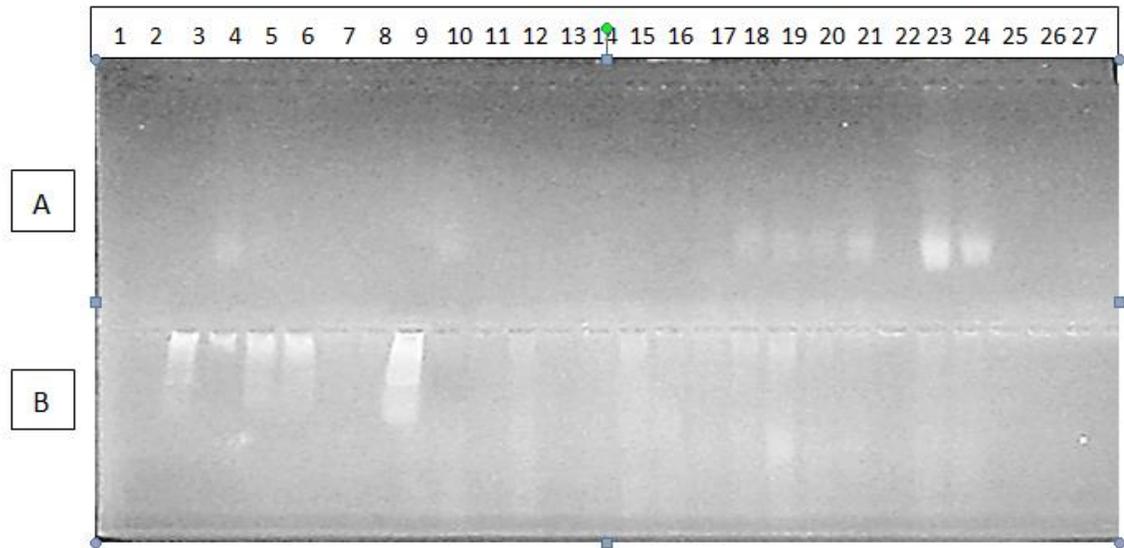
de la amplificación de las siete primeras muestras de ADN obtenidas por la variación del método de desparafinación con Xilol.

Figura 2. Electroforesis en Agarosa 1,5% de la PCR-Beta Globina. Muestras desparafinadas con Xilol. 1-7, 8 control positivo y 9 control negativo.



La PCR Beta globina se repitió dos veces para probar estas primeras muestras de ADN obtenidas con Xilol, para visualizar un mejor amplificado con las muestras obtenidas mediante las otras variaciones del método se procedió a probar diluciones de las muestras 1/10, 1/100 y /1000 para las otras variaciones; los resultados de la electroforesis de uno de los geles de agarosa se presentan en la Figura 1 a continuación.

Figura 3. Electroforesis en Agarosa 1,5% de la PCR-Beta Globina. Muestras 1-9 desparafinadas con agua caliente y con Tween-20, probando diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 del ADN obtenido



Nota: A Con agua caliente: 1-9 dilución 1/10, 10-18 dilución 1/100, 19-27 dilución 1/1000. B Con Tween20 calentado en Microonda, mismo orden de las muestras que en parte A.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Pureza del ADN extraído

De acuerdo a las variaciones en el primer paso del método de extracción de ADN de muestras de tejido embebido en parafina se logró determinar que según los datos de pureza y rendimiento del ADN la utilización de Xilol para disolver la parafina fue la que produjo los mejores resultados. En cuanto a esto, los resultados encontrados están de acuerdo con lo citado en la literatura consultada, así, Sarnecka et al.³ y Utako

et al.⁹ utilizaron kits comerciales que incluyen el paso de disolución de parafina con Xilol, lograron obtener ADN de calidad para las respectivas PCR que utilizaron, de acuerdo a esto, es imprescindible utilizar este reactivo en la extracción del ADN de muestras de tejido que hayan sido incluidas en parafina, pues permite la remoción completa de esta parafina y que el tejido luego pueda ser digerido por la proteinasa K y rinda más cantidad de ADN.

En cuanto a los resultados de la PCR, puede decirse que el ADN, aunque se obtenga en cantidad puede tener una baja calidad que se refleja en problemas durante la amplificación de PCR donde se generan muchos pequeños fragmentos que no son lo esperado esto se visualizó mediante la electroforesis en geles de agarosa, los barridos o *smears* observados, indican que el ADN se encontraba degradado. Por su parte, los resultados de la PCR para las muestras extraídas con las otras variaciones del método, con agua caliente, con tween-20 calentado mediante microondas o termociclador, definitivamente demostraron que no producen amplificadas esperados, lo que corrobora que el paso de desparafinación con Xilol es totalmente necesario para lograr obtener amplificadas, esto estaría indicando que los restos de parafina incluidos en el tejido aunque no interfieren mucho con la extracción como tal, si pueden ser inhibidores de la reacción de amplificación.

CONCLUSIONES

1. La calidad del ADN total extraído de muestras de tejidos embebidos en parafina puede estar afectada por el mismo proceso de preparación del tejido, lo que afecta negativamente la posibilidad de obtener amplificadas mediante PCR específicas para medir esta calidad.
2. El paso de desparafinación de los tejidos incluidos en parafina es crucial para poder obtener ADN que permita su amplificación por PCR, por esto, incluir el Xilol para disolver la parafina es la mejor opción.
3. El ADN obtenido de tejido incluido en Parafina puede estar degradado, aun cuando se utilice un método de extracción que incluya Xilol para disolver la parafina.

RECOMENDACIONES

- Recomendar a los profesionales que realizan la inclusión de los tejidos en parafina, que recorten el tiempo de exposición a la formalina como fijador para poder obtener tejido que contenga ADN de calidad para las pruebas moleculares por PCR.
- El método de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina siempre debe incluir como paso previo la disolución de la parafina mediante el alcohol Xilol.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMERO GRÁFICAS

1. Daigrepoint J, Cameron JE, Wright KL, Cordell KG, Rosebush MS. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded squamous papillomas of the oral cavity. *J Clin Exp Dent*. 2018 Oct 1; 10(10):e979-e983. doi: [10.4317/jced.55187](https://doi.org/10.4317/jced.55187)
2. Tawe L, Grover S, Narasimhamurthy M, Moyo S, Gaseitsiwe S, Kasvosve I, Paganotti GM. Molecular detection of human papillomavirus (HPV) in highly fragmented DNA from cervical cancer biopsies using double-nested PCR. *MethodsX*. 2018 May 31; 5:569-578. doi: [10.1016/j.mex.2018.05.018](https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.018)
3. Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligęza J, Swadźba J, Wójcik P. DNA extraction from FFPE tissue samples - a comparison of three procedures. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2019; 23(1):52-58. doi: [10.5114/wo.2019.83875](https://doi.org/10.5114/wo.2019.83875)
4. Mahmoodi P, Motamedi H, Seyfi Abad Shapouri MR, Bahrami Shehni M, Kargar M. Molecular Detection and Typing of Human Papillomaviruses in Paraffin-Embedded Cervical Cancer and Pre-Cancer Tissue Specimens. *Iran J Cancer Prev*. 2016 Feb 22; 9(1):e3752. doi: [10.17795/ijcp-3752](https://doi.org/10.17795/ijcp-3752)
5. Castro FA, Koshiol J, Quint W, Wheeler CM, Gillison ML, Vaughan LM, Kleter B, van Doorn LJ, Chaturvedi AK, Hildesheim A, Schiffman M, Wang SS, Zuna RE, Walker JL, Dunn ST, Wentzensen N. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. *BMC Infect Dis*. 2015 Nov 25; 15:544. doi: [10.1186/s12879-015-1281-5](https://doi.org/10.1186/s12879-015-1281-5)
6. Khan SS, Tijare M, Kasetty S, Jain M, Alamoudi A, Bahammam HA, Bahammam SA, Bahammam MA, Varadarajan S, Raj AT, Patil S. Evaluation and Comparison of Genomic DNA Extraction Methods and PCR Optimization on Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues of Oral Squamous Cell

- Carcinoma. *Diagnostics* (Basel). 2022 May 12; 12(5):1219. doi: [10.3390/diagnostics12051219](https://doi.org/10.3390/diagnostics12051219)
7. Zoeller V. Estudio de la degradación del formaldehído de muestras biológicas [Tesis de maestría. Universidad de Cádiz]. Repositorio Académico de la Universidad de Cádiz; 2021. URI: <http://hdl.handle.net/10498/19207>
 8. Fujii S, Yoshino T, Yamazaki K, Muro K, Yamaguchi K, Nishina T, Yuki S, Shinozaki E, Shitara K, Bando H, Mimaki S, Nakai C, Matsushima K, Suzuki Y, Akagi K, Yamanaka T, Nomura S, Esumi H, Sugiyama M, Nishida N, Mizokami M, Koh Y, Abe Y, Ohtsu A, Tsuchihara K. Histopathological factors affecting the extraction of high quality genomic DNA from tissue sections for next-generation sequencing. *Biomed Rep.* 2019 Oct;11(4):171-180. doi: [10.3892/br.2019.1235](https://doi.org/10.3892/br.2019.1235)
 9. Oba U, Kohashi K, Sangatsuda Y, Oda Y, Sonoda KH, Ohga S, Yoshimoto K, Arai Y, Yachida S, Shibata T, Ito T, Miura F. An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Biol Methods Protoc.* 2022 Jul 26; 7(1):bpac014. doi: [10.1093/biomethods/bpac014](https://doi.org/10.1093/biomethods/bpac014)
 10. Catanesi CI, Villegas Castagnasso EE. Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. 2021. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/129625/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 11. Piceno Martínez JA. Estudio de diferentes conformaciones para fragmentos simples del ADN, desoxirribosa y nucleósidos, por métodos de mecánica molecular [Tesis de Licenciatura]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2021. uri: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16058>

12. Álvarez A Juan P. Rosalind Franklin y el descubrimiento de la estructura del ADN. Rev. Méd. Clín. Condes; 2015; 544-549. doi: [10.1016/j.rmclc.2015.07.007](https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.07.007)
13. Lacadena-Calero JR. Historia “nobelada” de la genética (1900-2016): concepto y método. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2016. Disponible en: https://bibliotecavirtual.ranf.com/es/catalogo_imagenes/grupo.do?path=6025051
14. Herrera YA, Piña-Sánchez P. Historia de la evolución de las pruebas de tamizaje en el cáncer cervicouterino. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015;53(6):670-677. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/im156b.pdf>
15. Mahmoudvand S, Safaei A, Erfani N, Sarvari J. Presence of Human Papillomavirus DNA in Colorectal Cancer Tissues in Shiraz, Southwest Iran. Asian Pac J Cancer Prev. 2015; 16(17):7883-7. doi: [10.7314/apjcp.2015.16.17.7883](https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.17.7883)
16. Vivero Mendoza WA, Mendoza Robles JL. Virus del Papiloma Humano y su relación con el cáncer orofaríngeo. Revista San Gregorio, 2021; 1(48), 123-148. Doi: [10.36097/rsan.v0i48.1771](https://doi.org/10.36097/rsan.v0i48.1771)
17. Bermúdez GP. Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones. Bogotá: Editorial El Manual Moderno; 2022.
18. Prieto SJG, Gómez M. Estructura de la molécula del DNA. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2006.

19. Samperio Calderón JE, Salazar Campos A. Eficacia de las pruebas diagnósticas del Cáncer Cervicouterino y Virus del Papiloma Humano. *Journal of Negative and No Positive Results*, 2019; 4(5):551-566. doi: [10.19230/jonnpr.2953](https://doi.org/10.19230/jonnpr.2953)
20. Khan I, Harshithkumar R, More A, Mukherjee A. Human Papilloma Virus: An Unraveled Enigma of Universal Burden of Malignancies. *Pathogens*. 2023 Apr 6; 12(4):564. doi: [10.3390/pathogens12040564](https://doi.org/10.3390/pathogens12040564)
21. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. *Genética médica*. 6ª ed. Barcelona; Elsevier; 2020.
22. Hoyos Santos, LB. Alternativas al formol como fijador y conservador de estructuras y tejidos en los laboratorios de patología; 2022. Disponible en: [https://repositorio.autonoma.edu.co/jspui/bitstream/11182/1287/1/Alternativas Formol Fijador Conservador Estructuras.pdf](https://repositorio.autonoma.edu.co/jspui/bitstream/11182/1287/1/Alternativas%20Formol%20Fijador%20Conservador%20Estructuras.pdf)
23. Meza G, Ulloa JC, Uribe AM, Gutiérrez MF. Técnica no convencional de extracción de ADN a partir de tejido embebido en parafina para uso en la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 2013; 16(1):35-41. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262013000100005&script=sci_arttext
24. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015; 53(S2):166-171. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152h.pdf>

25. Hernández D. Biología del Virus del Papiloma Humano y su relación con el cáncer. Revista Venezolana de Oncología. 2017; 29(4), 295-303. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/3756/375652706012/html/>
26. Domínguez Bauta SR, Trujillo Perdomo T, Aguilar Fabr  K, Hernández Menéndez M. Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. Rev Cubana Obstet Ginecol. 2018; 44(1):1-13. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-600X2018000100017&script=sci_arttext
27. Quintero Vega M, Cruz Gómez JF, Bastidas M, Márquez L, Puig Pons J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. Obstetricia y Ginecología. 2008; 68(1):25-31. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322008000100006
28. Ramírez-Pineda AT, González MI, Castañeda-Vanegas KM, Agudelo-Fernández MC, López-Ur n C, Sánchez-Vásquez GI. Filogenia y oncogénesis del virus del papiloma humano: una aproximación translacional al descubrimiento de biomarcadores para la detección de lesiones precancerosas de cérvix. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2019; 43(168): 351-365. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0370-39082019000300351&script=sci_arttext
29. di Filippo Iriarte G, Orjuela Vargas JL, Osorio Zambrano W F, Jiménez Camargo LC. Detección de ARNm de oncoproteínas E6/E7 del Virus del Papiloma Humano en cáncer de cuello uterino. Acta bioquímica clínica latinoamericana.

2018; 52(3):361-372. Disponible en:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572018000300012&script=sci_arttext

30. Hurtado de Barrera J. El proyecto de investigación. 7ma ed. Caracas: Ediciones Quirón; 2012.
31. Fidas A. El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica. 5ta. Edición. Caracas, Venezuela: Episteme; 2006.
32. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio M. Metodología de la investigación. 5ª Edición. Perú: Editora El Comercio SA; 2010.
33. Ríos Ramírez RR. Metodología para la investigación y redacción. 1ª Edición. Málaga, España: Servicios Académicos Intercontinentales SA ; 2017.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve