

---

## **CAPITULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

**El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Subdirección de Posgrado, del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la UANL, con clave BI03-090, en sesión del 29 de Septiembre de 2003, y se realizó en forma prospectiva, transversal, descriptiva y observacional de Septiembre de 2003 a Julio de 2004.**

#### **4.1 Área Física**

**El trabajo se realizó en el laboratorio de Infectología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Servicio de Infectología del Hospital Universitario.**

#### **4.2 Sujetos Incluidos en el Estudio**

##### **4.2.1 Sujetos Controles**

**Para este proyecto se estableció un grupo de sujetos sanos que aceptaron participar en el estudio y que fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:**



**Inclusión: ambos géneros, mayores de edad, que aceptaron participar, que fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra VIH-1 y VHC.**

**Exclusión: sujetos menores de edad, pacientes con alteración de la coagulación, que estuvieran en estado agónico, que se negaran a participar, o que tuvieran algún factor de riesgo para la infección por VIH-1 y/o VHC.**

#### **4.2.2 Sujetos infectados con VIH-1 y/o VHC**

El grupo de estudio se conformó de sujetos infectados con VIH-1. Además se incluyó un grupo de sujetos positivos para el VHC como control. Estos pacientes fueron reclutados como voluntarios y asistían a consulta a los Servicios de Infectología, Gastroenterología y Patología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

**Inclusión: ambos géneros, mayores de edad, con diagnóstico, antecedentes o factores de riesgo de infección por VIH-1 y/o VHC, que aceptaron participar.**

**Exclusión: sujetos menores de edad, que se negaron a participar.**

---



### **4.3 Número de Pacientes, Base de Datos y Confidencialidad**

A partir de la información recabada de cada uno de los pacientes se generó una base de datos que se utilizó para realizar estudios epidemiológicos y de asociación de las características clínicas y los hallazgos experimentales. La identificación de cada uno de los pacientes fue a través de la asignación de una clave confidencial y se ha mantenido en el anonimato y la confidencialidad en todo momento. Los datos de nombres y claves confidenciales están restringidos para todos los participantes, solo tiene acceso a esta información el responsable del proyecto. El número de pacientes que se incluyó se estableció en función de la proporción del número de pacientes con infección por VIH-1 que eran atendidos y se les llevaba un seguimiento en dicho centro hospitalario, respecto al total de pacientes que asistieron a este hospital regional. El número que se estimó de pacientes VIH-1 para este estudio fue de 60. Sin embargo se incluyeron todos los pacientes que aceptaron participar y que de forma consecutiva acudieron a una consulta programada durante el período comprendido de Septiembre de 2003 a Julio de 2004.

### **4.4 Material Biológico**

A cada uno de los sujetos incluidos en este estudio se les tomó una muestra de sangre periférica, obtenida por punción venosa en una única ocasión, empleando tubos vacutainer con EDTA, así como material desechable estéril. La cantidad de muestra que se obtuvo fue de 10 ml.

---

Inmediatamente después de tomada la muestra, ésta se colocó en hielo y fué transportada al Laboratorio de Infectología Molecular, en donde se centrifugó para separar el plasma y el paquete leucocitario.

Del plasma se hicieron diferentes alícuotas, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf, etiquetadas y conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A partir del paquete de leucocitos se extrajo el ADN, el cual fue conservado en tubos eppendorf a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , también debidamente etiquetados.

#### **4.5 Reactivos**

Los reactivos y el material empleado fueron los siguientes:

Para las reacciones de PCR se empleo la enzima TaqDNA plimerasa, el  $\text{MgCl}_2$  y buffer de PCR de Promega Corporation (Madison, WI, EUA). Los dNTPs fueron adquiridos de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

La enzima de restricción que se empleo (*Hha I*) para digerir los productos amplificados fue adquirida de New England Biolabs Inc (Beverly, MA, EUA).

Para las reacciones de RT-PCR se utilizó la enzima SuperScript™ II RNasa H- Transcriptasa Reversa ó bien MMLV, Random primers, Buffer First-Strand 5X, DTT y RNaseOUT inhibidor de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

---

Los geles fueron preparados con agarosa grado analítico adquirida de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

El ácido bórico y Trizma® base de SIGMA CHEMICAL CO (St. Louis, MO, EUA) y el EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA) fueron utilizados para preparar el buffer de corrida TBE. Entre otros reactivos que fueron necesarios para preparar las soluciones requeridas se encuentran SDS y NaCl, también de SIGMA CHEMICAL CO (St. Louis, MO, EUA).

Los solventes orgánicos utilizados como cloroformo y etanol, fueron de grado analítico y provenían de la casa comercial Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA).

El trizol se adquirió de GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA).

El material de plástico que se utilizó fueron tubos eppendorf (0.5, 1.5 y 2.0 ml) y puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de BIOMOL SA de CV, Monterrey NL, Méx. Los tubos falcón de 15 ml y los guantes de látex utilizados eran de la marca Cel Associates, Houston, TX, EUA.

---

## **4.6 Equipo**

**Se utilizó una microcentrífuga eppendorf modelo 5415 C; balanza digital Sartorius modelo 1206 MP; balanza analítica OHAUS modelo APL1; incubadora SHEL-LAB y horno de microondas Gold star. La cámara de electroforesis horizontal que se utilizó, incluyendo su fuente de poder, son de marca BIO-RAD Life Science Research Products. El termociclador utilizado para las reacciones de PCR es de la casa comercial Eppendorf.**

## **4.7 Programas de Análisis Computacional**

**El procesamiento de datos se llevó a cabo en una computadora personal TOSHIBA.**

**Se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Documentation\_System 1000, BIO-RAD).**

**El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word 2000 y Microsoft® Power Point 2000 de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation), los programas SPSS, RXC y Epi info™ 2002.**

---

Los programas utilizados por vía internet fueron: Entrez [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], Centres for Disease Control (CDC). El navegador de Internet que se uso fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation).

## **4.8 Métodos**

### **4.8.1 Datos Demográficos e Historia Clínica**

Los datos demográficos y la historia clínica fue captada por el Médico durante la consulta. Esta información fue integrada en la base de datos confidencial mencionada con anterioridad.

### **4.8.2 Estudios Serológicos**

Para conocer la prevalencia de la co-infección con VIH-1 y VHC en la población de estudio se realizó un estudio de corte transversal. Para ello se llevó a cabo el análisis serológico y molecular de todos los sujetos que reunieron los criterios de inclusión antes descritos. (Figura 10.)

La muestra sanguínea tomada a cada uno de los sujetos se utilizó para:

- 1) Estudios bioquímicos: determinación de perfil hepático (bilirubinas, TP, GGT, AST y ALT).

- 2) **Estudios serológicos:** determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 utilizando los estuches comerciales de Abbot de 3ª generación y siguiendo los protocolos del proveedor.
- 3) **Estudios moleculares:** identificación cualitativa del genoma viral por PCR y PCR anidado (VIH-1 y VHC). Identificación de los polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E y del gen que codifica para el correceptor CCR5.

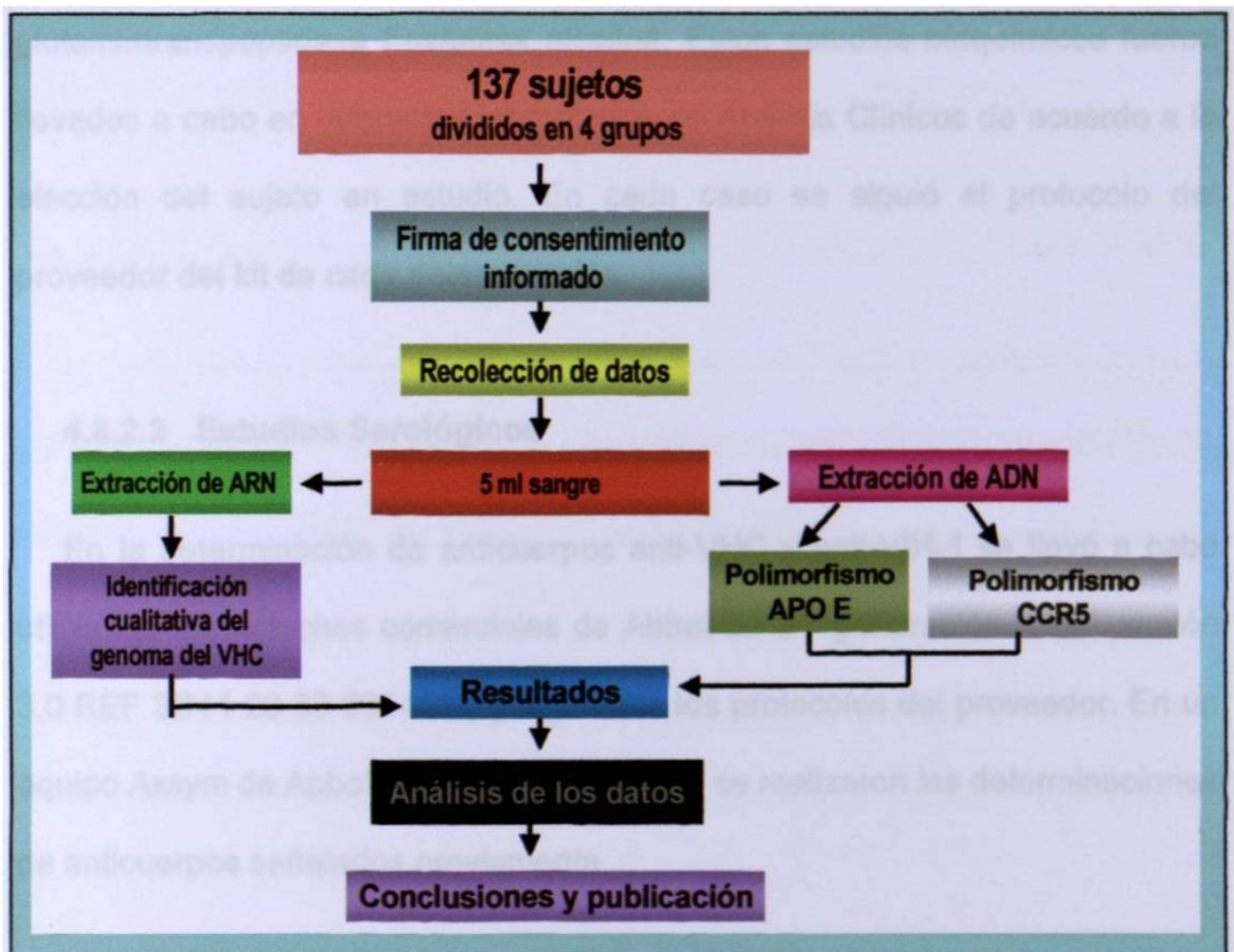


Figura 10. Esquema simplificado del proceso que se siguió en la determinación de la frecuencia de los polimorfismos del gen que codifica para el correceptor CCR5 y del gen que codifica para la Apo E, así como para la identificación cualitativa del genoma del VHC.



---

**Por ser metodologías desarrolladas dentro de protocolos de investigación previamente publicados han sido completamente validados de acuerdo a los métodos previamente reportados por otros grupos de investigación.**

#### **4.8.2.1 Estudios Bioquímicos**

**Los parámetros bioquímicos que fueron considerados son: Bilirubinas, Aspartato aminotransferas, Alanin aminotransferasa, Gama glutamintranspeptidasa Fosfatasa alcalina. Estos estudios bioquímicos fueron llevados a cabo en diferentes laboratorios de Análisis Clínicos de acuerdo a la elección del sujeto en estudio. En cada caso se siguió el protocolo del proveedor del kit de cada determinación.**

#### **4.8.2.2 Estudios Serológicos**

**En la determinación de anticuerpos anti-VHC y anti-VIH-1 se llevó a cabo utilizando los estuches comerciales de Abbot de 3ª generación (VHC versión 3.0 REF 3B44-20 33-0314/R5) y siguiendo los protocolos del proveedor. En un equipo AxSYM de Abbott (Abbott Park, IL, EU) se realizaron las determinaciones de anticuerpos señalados previamente.**

---

### **4.8.3 Estudios Moleculares**

#### **4.8.3.1 Análisis Cualitativo del VHC**

Para la identificación de la presencia de VHC en los pacientes VIH-1 positivos, se aisló el ARN viral del VHC a partir del plasma del paciente mediante la técnica de Chomczynski-Sacchi, se obtuvo el cADN, posteriormente se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar una secuencia altamente conservada del VHC, y se evaluaron los amplicones por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Para llevar a cabo el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen:

##### **4.8.3.1.1 Extracción de ARN Viral por la Técnica de Chomczynski-Sacchi.**

A partir del plasma separado de la muestra de sangre periférica de cada paciente se realizó la extracción de ARN para identificar la presencia del genoma del VHC utilizando el siguiente procedimiento:<sup>73</sup>

Se colocaron 400  $\mu$ l de plasma en un tubo eppendorf y se les añadió 600  $\mu$ l de trizol; fueron mezclados perfectamente y colocados en hielo por 5 minutos. A esta mezcla se le añadió 200  $\mu$ l de cloroformo grado analítico; nuevamente todo fue mezclado y colocado en hielo por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm por 5 minutos a 4 °C.

---

La fase acuosa fue recuperada en otro tubo eppendorf y se le añadió 600  $\mu$ l de isopropanol grado analítico. Se mezcló todo nuevamente y se dejó reposar por 1 hora a  $-20$   $^{\circ}$ C.

Completado este tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm por 20 minutos a 4  $^{\circ}$ C. Se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos.

El sedimento fue resuspendido en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O con DEPC estéril, y luego se le añadieron 150  $\mu$ l de etanol 100 %.

Se procedió a centrifugar la mezcla anterior a 14,000 rpm por 20 minutos a 4  $^{\circ}$ C. Al terminar de centrifugar se decantó y el residuo se dejó secar por 10 minutos. Este residuo fue resuspendido en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O con DEPC estéril y lo utilizamos inmediatamente. Cuando no fue posible utilizarlo inmediatamente se almacenó a  $-70$   $^{\circ}$ C.

#### **4.8.3.1.2 Reacción de Retrotranscripción Asociada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

Este método se utilizó para sintetizar a partir del ARN viral una hebra complementaria, para posteriormente amplificarla por PCR y de esta manera detectarla fácilmente por métodos de electroforesis.

---

**Fundamento:**

Es una amplificación de ARN a través de la síntesis de su cADN (ADN complementario al ARN), que después se amplifica por PCR. Es decir, no se obtienen copias del ARN de partida, sino de ADN, aunque se conserva obviamente la secuencia complementaria de aquél. Para esta reacción se emplean los siguientes componentes: muestra de ARN, transcriptasa inversa, buffers para cada una de las enzimas, dNTPs, cebadores y TaqDNA polimerasa.<sup>74</sup>

**Condiciones de la reacción de RT-PCR para amplificar el VHC**

Las reacciones de RT-PCR se prepararon de acuerdo con los siguientes parámetros:

En un tubo eppendorf estéril de 200  $\mu$ l se preparó la siguiente mezcla:

ARN total	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ DEPC	6 $\mu$ l (5) <sup>*</sup>

Esta mezcla se incubó a 72 °C por 10 minutos, posteriormente se mantuvo en HIELO por 5 minutos, y se preparó la siguiente mezcla maestra:

Buffer 5X	4 $\mu$ l
DTT	2 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	2 $\mu$ l
Random Primers	1 $\mu$ l

<b>ARNs inhibidor</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>ARN / H<sub>2</sub>O miliQ DEPC</b>	<b>9 <math>\mu</math>l (8)*</b>
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>19 <math>\mu</math>l (18)*</b>

De la mezcla maestra antes mencionada se tomaron 10  $\mu$ l para cada muestra y se le añadió a cada tubo 1  $\mu$ l de la enzima Superscript o 2  $\mu$ l \* de la enzima MMLV. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos con las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador para que se llevara a cabo el programa de amplificación de la hebra complementaria del ARN del VHC, que consistía en incubar la muestra a 37 °C por una hora y posteriormente a 95 °C por cinco minutos. (Tabla II)

**Tabla II** Programa de amplificación aplicado en la RT-PCR para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.

<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
1. 37 °C	1 hora
2. 95 °C	5 min
El cADN obtenido se conserva a -20 °C	

Una vez obtenido el producto amplificado del cADN del ARN del VHC, se procedió a la identificación del VHC mediante el uso de una PCR que amplificara un segmento específico y altamente conservado del genoma viral.

Para esta reacción se usaron oligonucleótidos<sup>77</sup> que ya han sido validados y que son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla III):

**Tabla III** Información general de los Primers empleados en la primera amplificación para la identificación cualitativa del VHC.

Primers usados en la primera PCR para la identificación cualitativa del VHC					
Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Tamaño pb	Gen	Referencia
UHCV1	CTGTGAGGAACTACTGTCTTC	-297 a -277	223	VHC	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.
DHCV2	CAACTACTCGGCTAGCAGT	-96 a -76	223	VHC	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.

La mezcla maestra para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa fué:

Buffer 10X	5 µl
Oligo HCV1-U 10 µM	2 µl
Oligo HCV2-D 10 µM	2 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 µl
TaqDNA polimerasa 5U/µl	0.5 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	35 µl
ADNc	2 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>50 µl</b>

Y las condiciones de amplificación para esta Reacción en Cadena de la Polimerasa son las que se señalan en la Tabla IV.

**Tabla IV Programa de amplificación para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis.**

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 94 °C	5 min
2. 94 °C	1 min
3. 58 °C	1 min
4. 72 °C	1 min
5. 72 °C	10 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 35 ciclos  
El producto de amplificación que se obtuvo fue de 223 pb

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección del VHC, se llevó a cabo una PCR ANIDADA, utilizando la mezcla maestra que se describe a continuación:

Buffer 10X	5 µl
Oligo HCV3-U 10 µM	2 µl
Oligo HCV4-D 10 µM	2 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 µl
TaqDNA polimerasa 5U/µl	0.25 µl



H <sub>2</sub> O miliQ	36.25 µl
Producto amplificado de la primera PCR	1 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>50 µl</b>

Los oligonucleotidos<sup>77</sup> empleados como cebadores en esta PCR ANIDADA también ya han sido validados y son empleados rutinariamente en el Laboratorio de Infectología Molecular/Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla V):

**Tabla V** Información general de los Primers empleados en la segunda amplificación para la identificación cualitativa del VHC.

Primers usados en la PCR ANIDADA para la identificación cualitativa del HCV					
Primer	Secuencia 5'-3'	Localización	Tamaño pb	Gen	Referencia
UHCV3 N	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT	-276 a -255	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.
DHCV4 N	ACTCGGCTAGCAGTCTTGCGG	-102 a -84	194	HCV	Yamada M. DigDisSci. 1994;2:234-239.

Y las condiciones del programa del termociclador para realizar esta segunda amplificación son las que se señalan en la Tabla VI.



**Tabla VI** Programa de amplificación aplicado en la PCR ANIDADA para la determinación cualitativa del Virus de la Hepatitis C.

TEMPERATURA	TIEMPO
1. 94 °C	5 min
2. 94 °C	1 min
3. 58 °C	1 min
4. 72 °C	1 min
5. 72 °C	10 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 35 ciclos  
El producto de amplificación esperado es de 194 pb

#### **4.8.3.2 Análisis de Polimorfismos de los Genes que Codifican para el Correcceptor CCR5 y la Apolipoproteína E.**

Para el análisis de polimorfismos de los receptores CCR5 y genotipos de Apo E, se extrajo ADN genómico a partir de los leucocitos de la sangre periférica que se tomó de los sujetos incluidos en el estudio (10 ml). Posteriormente se amplificaron las secuencias específicas de ADN que codifican para estas proteínas mediante PCR, utilizando iniciadores específicos. Para la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para la Apolipoproteína E se realizó el análisis de fragmentos polimórficos con enzimas de restricción (RFLPs), en donde se usó la enzima *Hha I*. Con el fin de realizar el proceso antes descrito se siguieron las técnicas que a continuación se describen:

---

#### **4.8.3.2.1 Extracción de ADN genómico por la técnica de TSNT**

De las muestras de sangre periférica se hizo la separación del paquete leucocitario, a partir del cual se realizó la extracción de ADN genómico mediante el siguiente protocolo:<sup>73</sup>

En un tubo eppendorf de 2 ml se colocan 500  $\mu$ l de paquete globular leucocitario y se le añadieron 200  $\mu$ l de buffer de lisis TSNT (Tritón 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM) y se mezclaron por inversión por unos segundos para lograr una lisis total.

Posteriormente, a este lisado se le añadieron 500  $\mu$ l de fenol pH 8.0 y se mezcló ligeramente. Esta mezcla se colocó en hielo por 3 minutos.

Transcurrido este tiempo fueron añadidos 100  $\mu$ l de solución sevag [cloroformo:alcohol isoamílico (49:1)] y se mezcló por 5 minutos en vortex. Luego se le añadió 100  $\mu$ l de TE 1X, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 3 minutos.

Se procedió a centrifugar esta mezcla a 10,000 rpm por 8 minutos. Una vez separadas las fracciones, la fase acuosa se paso a otro tubo y se le añadieron 2.5 partes de etanol 100 %, además, se le adicionó 100  $\mu$ l de acetato de sodio y se dejó reposar por 3 minutos en hielo.

Después de este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se separaron las fases por decantación y la pastilla que se formó se dejó secar al aire (no mas de 2 horas).

---

Finalmente esta pastilla fue resuspendida en agua milliQ estéril (50 µl).

Las muestras de ADN obtenidas por este procedimiento fueron conservadas a -20 °C.

El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría, determinando la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. La pureza del ADN fue evaluada con la relación entre el valor de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, considerándose una pureza adecuada cuando ésta relación fuese mayor a 1.75. Dado que un valor de absorbancia de 1 densidad óptica (DO) corresponde a 50 µg/ml de AND genómico, se calculó la concentración en cada muestra según la siguiente fórmula:<sup>73</sup>

$$\text{Concentración de ADN} = (\text{Absorbancia a 260 nm}) (50) (\text{dil})$$

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

Es una técnica que permite amplificar rápidamente *in vitro* un fragmento específico de ADN, consiguiendo millones de copias del segmento de interés.

Fundamento:

Esta técnica analítica resulta de la aplicación de las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión de forma cíclica, empleando los siguientes elementos para la amplificación del ADN: dNTPs, oligonucleótidos

complementarios a la secuencia blanco específica, y TaqDNA polimerasa. Las regiones amplificadas varían entre 130 y 1,000 pb de longitud.<sup>74</sup>

### Oligonucleótidos utilizados.

Los oligonucleótidos que utilizamos para la amplificación de los genes que codifican para el correceptor CCR5<sup>54</sup> y para la Apolipoproteína E<sup>70</sup>, ya están validados y son empleados en el Laboratorio de Infectología Molecular/ Diagnóstico Molecular Sección Infectología, siendo los que se señalan a continuación (Tabla VII):

**Tabla VII** Características principales de los oligonucleótidos empleados en la determinación de los polimorfismos del gen que codifica para CCR5 y el gen que codifica para la Apolipoproteína E.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño pb	Gen	Referencia
<b>Apolipoproteína E</b>				
U-ApoE	TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA	227	Apo E	Wenham PR. Lancet 1991;337:1158-1159
D-ApoE	ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACTGCCA	227	Apo E	Wenham PR. Lancet 1991;337:1158-1159
<b>Correceptor CCR5</b>				
U-CCR5	CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC	189 wt / 157 Δ 32	CCR5	Woitars RP, Gastroenterol 2002;122:1721-1728
D-CCR5	CCTGTGCCTCTTCTTCTCATTTTCG	189 wt / 157 Δ 32	CCR5	Woitars RP, Gastroenterol 2002;122:1721-1728

Para la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E fue empleada la siguiente mezcla maestra:

<b>Buffer 10X</b>	<b>5 <math>\mu</math>l</b>
<b>Oligo UApoE 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>Oligo DApoE 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>dNTPs 10 mM</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	<b>3 <math>\mu</math>l</b>
<b>Tritón 2 %</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>DMSO 100 %</b>	<b>2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>TaqDNA polimerasa 5U/<math>\mu</math>l</b>	<b>0.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	<b>28.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>ADN</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

Y las condiciones para la amplificación que fueron usadas en el termociclador son las que se señalan en la Tabla VIII.

**Tabla VIII** Programa para la amplificación del gen que codifica para la Apolipoproteína E.

<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
1. 95 °C	3 min
2. 95 °C	20 seg
3. 60 °C	30 seg
4. 72 °C	20 seg
5. 72 °C	5 min

Los pasos del 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos

---

**El producto de amplificación esperado fue de 227 pb.**

**Con respecto a la amplificación del gen que codifica para el correceptor CCR5, fue utilizada una mezcla maestra cuyos componentes son los siguientes:**

<b>Buffer 10X</b>	<b>5 <math>\mu</math>l</b>
<b>Oligo UCCR5 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>Oligo DCCR5 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>DNTPs 10 mM</b>	<b>1 <math>\mu</math>l</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	<b>3 <math>\mu</math>l</b>
<b>TaqDNA polimerasa 5U/<math>\mu</math>l</b>	<b>0.25 <math>\mu</math>l</b>
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	<b>36.75 <math>\mu</math>l</b>
<b>ADN</b>	<b>2 <math>\mu</math>l</b>
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

**Y las condiciones programadas en el termociclador para una apropiada amplificación del gen que codifica para el correceptor CCR5 son las que se indican en la Tabla IX.**

**El producto de amplificación que obtuvimos fue de 189 pb para el wibe tape (WT) y de 157 pb para la delección  $\Delta$ 32.**