

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



“APLICACIÓN DE PARTÍCULAS DE QUITOSANO EN EL
 AISLAMIENTO IN VITRO DE ADN EN ORINA”

Alejandra Pando Cacicano

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Lima-Perú

2016

Asesor:

Dr. Holger Mayta Malpartida

Jurado calificador:

Presidente: Dra. Patricia Herrera Velit

Secretario: Dra. Jasmín Hurtado Custodio

Vocal: Dra. Vanessa Adui Sicheri

DEDICATORIA

*A mis padres y hermana, por ser los motivos para ser mejor cada día
y ejemplos a seguir.*

*A mi abuela Hilaria, quien desde el cielo me cuida
y fue el impulso para terminar la tesis.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana, por el apoyo incondicional durante todo el tiempo de duración de la tesis.

Al Doctor Holger Mayta, más que mi asesor, un amigo, quien me brindó su apoyo intelectual y emocional, impulsándome a continuar a pesar de los obstáculos en el camino.

A la Blga. Helena Jahaira, por brindarme su apoyo intelectual y emocional, y, ayudarme a mejorar mis defectos.

Al laboratorio de Biopolímeros y Metalofármacos de la Universidad Nacional de Ingeniería a cargo de la Doctora Ana Cecilia Valderrama, por la elaboración de las micropartículas utilizadas en la investigación.

A las Doctoras Manuela Verástegui, Maritza Calderón y Patricia Sheen, quienes me permitieron utilizar sus instalaciones y/o equipos durante el desarrollo de la investigación.

A mis amigos biólogos: Arianna Basto, Fabiana Málaga, Macarena Vittet, Mayra Ochoa, Karen Neyra, Giuliana Oyola, Gerardo Sánchez, Jorge Fernández, y Luis Eduardo Herrera, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante todo el proceso de la tesis e hicieron más fácil de llevar con sus bromas y consejos.

Financiamiento

La presente tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) de acuerdo al contrato 118-PNICP-PIAP-2015.

Prefacio

La presente tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Virología Molecular y Nanotecnología de la unidad de Laboratorios de Investigación y desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo la supervisión del Doctor Holger Mayta Malpartida, la MSc. Martha Helena Jahuiria Arias, con el apoyo del grupo de investigación de Biopolímero y Metalofármacos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería dirigido por la Doctora Ana Cecilia Valderrama Negrón.

La investigación consistió en la aplicación del biopolímero quitosano, modificado mediante el entrecruzamiento de las cadenas, para el aislamiento de ADN en muestras de orina, para ello, en la etapa inicial, se estableció un protocolo de aislamiento con el polímero modificado en un medio acuoso mediante la evaluación de los parámetros que afectaban la unión y separación de este y el ADN, y, en la etapa final, se realizaron pruebas con muestras de orina bajo el protocolo previamente establecido.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
Antecedentes.....	4
1.1. Quitosano: generalidades del polímero y mecanismos de interacción con el ADN.....	4
1.2. ADN trans-renal y su aplicación en el diagnóstico de enfermedades.....	5
1.3. ADN en orina: ventajas y desventajas para su aplicación en pruebas moleculares.....	6
1.4. Quitosano modificado para su aplicación en el reparto de genes y drogas.....	7
CAPÍTULO II.....	9
Hipótesis y objetivos.....	9
2.1. Hipótesis.....	9
2.2. Objetivos.....	9
CAPÍTULO III.....	10
Materiales y métodos.....	10
3.1. Obtención del ADN plasmídico.....	10
3.2. Construcción de la curva estándar con el plásmido pZErO-2.....	10
3.3. Obtención de las micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído.....	10
3.4. Procedimiento general para la evaluación de la adsorción - desorción de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado.....	11
3.5. Parámetros evaluados para la adsorción en medio acuoso.....	12
3.6. Métodos evaluados para la desorción en medio acuoso.....	12
3.7. Colección y procesamiento de muestras de orina.....	13

3.8.	Métodos evaluados para la desorción en muestras de orina.....	13
3.9.	Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN.....	14
3.10.	Evaluación de la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina.....	14
3.11.	Amplificación de una secuencia de la acuaporina TIP 5:1 de <i>Arabidopsis Thaliana</i> mediante la técnica de qPCR.....	15
3.12.	Análisis estadísticos.....	15
3.13.	Aspectos éticos.....	16
CAPÍTULO IV.....		17
Resultados.....		17
4.1.	Curva estándar de ADN y límite de detección.....	17
4.2.	Determinación del pH del medio que favorece la mayor adsorción de ADN.....	17
4.3.	Determinación de la cantidad de micropartículas de quitosano entrecruzado que permite la adsorción de más ADN.....	17
4.4.	Determinación de las micropartículas de quitosano entrecruzado con mayor capacidad de adsorción de ADN.....	18
4.5.	Determinación del tiempo de contacto óptimo entre las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% y el ADN.....	18
4.6.	Determinación del volumen de muestra para la formación de los complejos quitosano entrecruzado al 1%-ADN.....	18
4.7.	Determinación del método de desorción del ADN en medio acuoso (PBS, pH 6.9).....	19
4.8.	Determinación del método de desorción del ADN en orina.....	19
4.9.	Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.....	19

4.10. Protocolo estandarizado de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, en muestras de orina.....	20
4.11. Evaluación de la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina.....	20
CAPÍTULO V.....	22
Discusión.....	22
Conclusiones.....	31
Recomendaciones.....	32
Anexos.....	33
Referencias.....	56

Índice de tablas

1. Tabla 1. Parámetros y valores evaluados para la adsorción de ADN en medio acuoso.....41
2. Tabla 2. Métodos y valores evaluados para la desorción de ADN en medio acuoso.....42

Índice de figuras

1. Figura 1. Estructura química de la quitina y el quitosano.....	36
2. Figura 2. Origen del ADN trans-renal o extracelular en orina.....	37
3. Figura 3. Proceso de entrecruzamiento del quitosano tratado con glutaraldehído.....	38
4. Figura 4. Estructura del plásmido pZErO-2.....	39
5. Figura 5. Esquema general de trabajo para el establecimiento del protocolo de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado....	40
6. Figura 6. Curva estándar construida con el número de copias de plásmido y valores de C _q correspondientes.....	43
7. Figura 7. Efecto del pH del medio sobre la cantidad de ADN capturado.....	44
8. Figura 8. Efecto del pH del medio sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante.....	45
9. Figura 9. Efecto de la cantidad de partículas sobre la cantidad de ADN capturado.....	46
10. Figura 10. Efecto de la cantidad de partículas sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante.....	47
11. Figura 11. Efecto del grado de entrecruzamiento sobre la cantidad de ADN capturado.....	48
12. Figura 12. Efecto del grado de entrecruzamiento sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante.....	49
13. Figura 13. Efecto del tiempo de contacto entre las micropartículas y el ADN sobre la cantidad de ADN capturado.....	50
14. Figura 14. Efecto del volumen de muestra sobre la cantidad de ADN capturado.....	51
15. Figura 15. Determinación del método de desorción del ADN en PBS.....	52

16. Figura 16. Determinación del método de desorción del ADN en orina.....	53
17. Figura 17. Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.....	54
18. Figura 18. Evaluación de la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina.....	55

Lista de abreviaciones

°C: grados centígrados

ADN: ácido desoxirribonucleico

Cq: ciclo umbral

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FCA: fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

FINCyt: Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología

G: gravedades

KDa: Kilo daltons

M: molar

Mg: miligramos

Ng: nanogramos

PBS: tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)

QPCR: PCR Cuantitativo en Tiempo Real

SDS: dodecil sulfato sódico

Tris: tris aminometano

Glosario

Cq o ciclo umbral: Número de ciclo del qPCR en el cual la intensidad de emisión del reportero marcado se incrementa sobre el ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN en la muestra.

Adsorción: proceso por el cual átomos, iones o moléculas son retenidos en la superficie de una matriz.

Desorción: proceso inverso a la adsorción.

Adsorción química iónica: adsorción ocasionada por enlaces iónicos.

Adsorción química covalente: adsorción ocasionada por enlaces covalentes.

Adsorción física: adsorción ocasionada por fuerza atractivas débiles, generalmente, de Van der Waals.

Enlace iónico: unión de átomos con cargas eléctricas opuestas.

Enlace covalente: unión entre átomos mediante la compartición de electrones.

Fuerzas de Van der Waals: fuerzas atractivas o repulsivas entre moléculas.

Reparto de genes o drogas: “delivery” o distribución de moléculas como genes o drogas a células o patógenos con fines de tratamiento de enfermedades o anomalías genéticas.

Resumen

Introducción: Las desventajas que conlleva la obtención invasiva de muestras biológicas para fines de diagnóstico, hace necesario apuntar hacia el uso de muestras no invasivas como la orina, de fácil obtención y manipulación. No obstante, la baja concentración de ADN y la presencia de sustancias contaminantes limitan el desarrollo de las técnicas de aislamiento convencionales. El quitosano, biopolímero catiónico obtenido por desacetilación de la quitina es capaz de establecer interacciones con moléculas aniónicas como el ADN. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el uso de micropartículas de quitosano entrecruzado para el aislamiento de ADN a partir de muestras de orina contaminadas artificialmente.

Métodos: Se evaluó la capacidad del quitosano, con diferentes grados de entrecruzamiento (1; 5, y 10%), para adsorber ADN; igualmente se evaluaron los factores que influyen la absorción tales como el pH, tiempo de contacto, cantidad de partículas, la concentración de ADN y los diferentes métodos de desorción del ADN del quitosano. Esta evaluación se realizó mediante la prueba de qPCR empleando como ADN blanco un plásmido conteniendo un inserto el gen de la proteína acuaporina TIP 5:1 de *Arabidopsis thaliana*.

Resultados: El mayor grado de adsorción de ADN se observó a un pH igual a 6.9 en los tres tipos de quitosano entrecruzado evaluados. Las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% mostraron la mayor capacidad de adsorción. Los tiempos de contacto (30-120 min) no influyeron sobre esta capacidad de adsorción. La modificación del pH de la orina hacia un pH aproximado de 6.9 favoreció la adsorción de ADN por las micropartículas. El método de desorción con mejores resultados consistió en pretratar las micropartículas con EDTA-SDS y someterlas a ebullición antes de la extracción con fenol-cloroformo. Las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% fueron las únicas capaces de concentrar el ADN añadido a la muestra de orina.

Conclusión: Las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% poseen la mejor capacidad de adsorción y concentración de ADN a partir de muestras de orina. La extracción con fenol: cloroformo fue el único método que permitió la desorción del ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado.

Palabras clave: quitosano, aislamiento, ADN, orina.

Abstract

Introduction: The disadvantages of invasive techniques for diagnostic purposes, point toward the necessity of using non-invasive, easy obtaining and handling samples such as urine. However, the low concentration of genetic material and the presence of contaminants in the urine limit the development of conventional isolation techniques. Chitosan, a cationic biopolymer, obtained from the deacetylation of chitin can interact with anionic molecules like DNA. The present study aimed to evaluate the use of crosslinked chitosan microparticles for the isolation of DNA from urine samples artificially infected with spiked plasmid.

Methods: The ability of chitosan, with different degrees of crosslinking, for the adsorption of DNA; the factors that influence the adsorption such as pH, time of contact, amount of particles and DNA concentration; and also the different methods for DNA desorption of chitosan were evaluated by qPCR using as target an *Arabidopsis thaliana* gene inserted in a plasmid.

Results: The highest degree of adsorption was observed at a pH of 6.9 in all the types of crosslinked chitosan evaluated. The 1% crosslinked chitosan microparticles showed the highest DNA adsorption capacity. The contact time (30 – 120 min) did not influence the DNA adsorption capacity. In contrast, the DNA adsorption capacity of crosslinked chitosan was influenced by the sample volume (0.5 – 50 ml). Modification of the urine pH improved the DNA adsorption capacity of the crosslinked chitosan microparticles. Pretreating the microparticles with EDTA-SDS buffer plus boiling before the phenol-chloroform extraction was the best DNA desorption method. Only the 1% crosslinked chitosan microparticles had the capacity to adsorb and concentrate the plasmid added to the urine sample.

Conclusion: The crosslinked 1% chitosan microparticles showed the best DNA adsorption capacity at pH 6.9. These microparticles were the only ones able to concentrate the DNA added to a urine sample. The DNA desorption was achieved only using the phenol: chloroform extraction technique.

Key words: chitosan, isolation, DNA, urine.

INTRODUCCIÓN

La extracción de material genético a partir de muestras biológicas crudas constituye el punto de inicio para el desarrollo de técnicas bioquímicas y de diagnóstico (Gathak, Muthukumaran & Nachimuthu, 2013). Los métodos de extracción de ácidos nucleicos han sido clasificados de manera general en dos categorías, protocolos convencionales y basados en soportes sólidos (Tan & Yiap, 2009). Dentro de los métodos convencionales, basados en soluciones, se encuentra el método de extracción alcalina, de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y detergentes catiónicos (Tan & Yiap, 2009). Por otro lado, los métodos basados en soportes sólidos involucran el uso de matrices de sílice, partículas de vidrio y perlas magnéticas, siendo las primeras las más comunes (Tan & Yiap, 2009). Si bien su aplicación permite la purificación rápida y eficiente de ADN, las sales caotrópicas y etanol que dirigen su adsorción a la sílice inhiben la reacción de amplificación (Hourfar *et al.*, 2005). Por otro lado, los métodos convencionales consumen un amplio intervalo de tiempo y los reactivos empleados, específicamente, en el caso de la extracción con solventes orgánicos, son tóxicos (Javadi *et al.*, 2014).

El aislamiento de ADN puede realizarse a partir de cualquier muestra biológica cruda, no obstante la toma de muestras invasivas puede constituir un riesgo debido a la transmisión de enfermedades por prácticas no apropiadas y complicaciones asociadas al procedimiento. La presencia de material genómico en orina permite utilizar dicho espécimen como fuente para su aislamiento y posterior desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular (Silva *et al.*, 2014). Fragmentos cortos provenientes de la circulación, además de fragmentos largos atribuidos a células del tracto urinario, han sido hallados en la orina (Su *et al.*, 2004 b). Debido a su origen, los fragmentos cortos, han sido denominados como ADN trans-renal o extracelular (Umansky & Tomei, 2006). La presencia de ADN trans-renal ha permitido el diagnóstico de enfermedades asociadas a mutaciones u ocasionadas por patógenos (Su *et al.*, 2004 a). Sin embargo, la baja concentración de material genómico en orina y la presencia de sustancias contaminantes limita el uso de los métodos de aislamiento.

La aplicación de polímeros catiónicos para el aislamiento de moléculas aniónicas como el ADN, podría constituir una alternativa a los métodos convencionales y basados en soportes sólidos. Dentro de los polímeros catiónicos presentes en la naturaleza, la quitina es uno de los más abundantes después de la celulosa (Tharanathana & Kittur, 2003). La desacetilación de la quitina en medio alcalino a elevadas temperaturas permite la obtención de quitosano, polisacárido lineal conformado por residuos distribuidos al azar de 2-N-acetil-2-deoxi-glucosa (N-acetil-glucosamina) y 2-amino-2-deoxi-glucosa (glucosamina) unidos por enlaces de tipo $\beta - 1,4$ (Lárez, 2003) . Este polímero también se encuentra en la naturaleza en la pared celular de hongos de la clase de los zigomicetos, en el alga verde *Chlorella spp.*, en levaduras y protozoos así como en la cutícula de insectos (Raafat & Sahl, 2009). La presencia de grupos amino funcionales ha hecho del quitosano un material versátil por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones con el objetivo de impartir propiedades deseadas y singulares funciones biológicas, incluyendo la solubilidad (Lárez, 2003). La naturaleza catiónica del biopolímero en medios ácidos, ha permitido la formación de quitosano-ADN regidos por interacciones electrostáticas, principalmente entre las unidades de glucosamina protonadas del biopolímero y el esqueleto de fosfato negativamente cargado del ADN (Bravo-Anaya, Soltero & Rinaudo, 2016).

La modificación química del polímero mejora sus propiedades, permitiendo que sea aplicado como vector para la entrega de drogas y genes (Bowman & Leong, 2006). Las modificaciones químicas más comunes abarcan la trimetilación del grupo amino y el entrecruzamiento de las cadenas de quitosano (Berger *et al.*, 2004). El entrecruzamiento de las cadenas de quitosano permite la formación de estructuras estables o sensibles al pH, dependiendo del agente entrecruzante (Berger *et al.*, 2004). El desarrollo de superficies de quitosano entrecruzado iónicamente, ha sido documentado para el reparto ("delivery") de genes en modelos celulares *in vitro*, mientras que el desarrollo de superficies de quitosano entrecruzado covalentemente, ha captado la atención para la carga y posterior liberación de drogas, por la estabilidad que le brinda este tipo de entrecruzamiento durante un amplio

intervalo de tiempo, tanto en medios ácidos como básicos (Csaba, Köping-Höggård & Alonso, 2009; Jameela & Jayakrishnan, 1995). Debido a que la principal característica que rige la adsorción de moléculas en ambos tipos de entrecruzamiento es la porosidad, el entrecruzamiento covalente también podría permitir la adsorción de ADN (Berger *et al.*, 2004).

En el presente estudio se emplearon micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído, de 3 grados de entrecruzamiento distintos, para el aislamiento de ADN en muestras de orina. Inicialmente, se estableció el protocolo de aislamiento con estas matrices en un medio acuoso, diferente a la orina, contaminado artificialmente con plásmido. Una vez establecido, este protocolo fue aplicado en muestras de orina contaminadas con este mismo ADN. El protocolo se dividió en dos etapas: (i) adsorción del ADN a las micropartículas de quitosano entrecruzado, y, (ii) desorción del ADN de las micropartículas.

En la etapa de adsorción, se determinó que factores afectaban este proceso: pH del medio, cantidad de micropartículas, tiempo de contacto entre éstas y el ADN, y, el volumen del medio que contenía a ambos. Adicionalmente, se determinó que tipo de micropartículas poseían la mayor capacidad de adsorción de ADN. Por otro lado, en la etapa de desorción, se evaluaron diversos métodos de separación del ADN tanto en el medio acuoso en el cual se estableció el protocolo de aislamiento con micropartículas de quitosano como en muestras de orina: aplicación de temperatura, sonicación, alcalinización del medio, adición de soluciones basadas en detergentes, entre otros métodos. Adicionalmente, se determinó si la modificación del pH de la orina influía en la adsorción de ADN por el quitosano entrecruzado, y, si el pH que favorecía la mayor adsorción de ADN en tampón fosfato salino era el mismo en orina, cuando el pH era calibrado. Finalmente, se evaluó la capacidad de concentración de ADN del quitosano entrecruzado en estas muestras.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Quitosano: generalidades del polímero y mecanismos de interacción con el ADN

La quitina o poli (β -(1 \rightarrow 4)- N-acetil-D-glucosamina) es un biopolímero sintetizado por una enorme cantidad de organismos vivos y está posicionado dentro de los polímeros naturales más abundantes, después de la celulosa (Tharanathana & Kittur, 2003). La quitina fue descubierta por Henri Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos (Lárez, 2003). Se encuentra principalmente en la concha de los crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas (Lárez, 2003). Este polisacárido es insoluble en agua o medio ácido (Lárez, 2003). En 1859, Rouget observó que al tratar la quitina con hidróxido de potasio obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos (Lárez, 2003). Más tarde, en el año 1894, Hoppe-Seyler lo denominó “quitosano” (Lárez, 2003). El quitosano es un polisacárido lineal obtenido principalmente mediante un proceso de desacetilación parcial de la quitina en medio alcalino a temperaturas elevadas (Figura 1) (Lárez, 2003). El término quitosano es utilizado para describir un conjunto de polímeros con diferentes pesos moleculares, viscosidades y grados de desacetilación (Lárez, 2003). Este polímero es también encontrado en la naturaleza, en la pared celular de hongos de la clase de los zigomicetos, en el alga verde *Chlorella spp.*, en levaduras y protozoos así como en la cutícula de insectos (Raafat & Sahl, 2009). En contraste con otros polisacáridos como la celulosa, agarosa, pectina, ácido alginico, dextrano y carragenanos, que son de naturaleza neutral o ácida, el quitosano es altamente básico, con un contenido de nitrógeno que varía entre 5% y 8%, dependiendo del grado de desacetilación (Raafat & Sahl, 2009). La biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad del polímero, han permitido que sea empleado para el reparto de genes y drogas en modelos

celulares *in vitro* (Riva *et al.*, 2011). El quitosano es soluble en ácidos orgánicos comunes, y puede ser disuelto en agua después de la protonación de sus grupos amino, bajo condiciones ácidas (Lárez, 2003). La naturaleza catiónica del polímero en medios ácidos permite la interacción con moléculas cargadas negativamente como el ADN (Bravo-Anaya, Soltero & Rinaudo, 2016). La formación de complejos entre ambos se da principalmente a través de interacciones electrostáticas entre las unidades de glucosamina y el esqueleto de fosfato de ADN (Bravo-Anaya, Soltero & Rinaudo, 2016). En el año 2006, Cao y colaboradores establecieron un método de captura de ADN con quitosano, en un sistema acuoso, basándose en la carga dependiente del pH del polímero (Cao, Easley, Ferrance & Landers, 2006). Por otro lado, en el año 2015, Pandit y colaboradores, lograron capturar ADN con micropartículas magnéticas de quitosano para posteriormente realizar una amplificación directa del mismo (Pandit, Nanayakkara, Cao & Raghavan, 2015).

1.2. ADN trans-renal y su aplicación en el diagnóstico de enfermedades

La existencia de ADN en orina se atribuye comúnmente a la presencia de células, parásitos, virus y bacterias (Umansky & Tomei, 2006). La mayoría de fragmentos de material genómico aislados son de alto peso molecular, sin embargo, también se han hallado fragmentos de bajo peso molecular de entre 150 y 250 pares de bases (Su *et al.*, 2004 b). Estos fragmentos son parte del ADN trans-renal o extracelular; el cual se origina de la apoptosis celular en la circulación y atraviesa la barrera del riñón debido a su corta longitud (Su *et al.*, 2004 b) (Figura 2). Por otro lado, los fragmentos de alto peso molecular se asocian a las células que se desprenden del tracto urinario (Su *et al.*, 2004 b). El material genético trans-renal o extracelular ha sido de utilidad para el diagnóstico de patógenos, anomalías genéticas y desarrollo de pruebas forenses (Su *et al.*, 2004 a). La detección de secuencias de material genómico en orina se ha empleado para el diagnóstico de cáncer, tuberculosis, malaria y enfermedades ocasionadas por virus como Citomegalovirus y Papilomavirus (Su *et al.*, 2008; Kawai *et al.*, 2014; Lazzarotto *et al.*, 1998; Brinkman *et al.*, 2002). Por otro lado, la detección de secuencias de ADN de donantes de

órganos, tejidos o células en la orina del receptor, ha servido para monitorear episodios de rechazo a trasplantes (Zhang *et al.*, 1999). En adición, la determinación del sexo del feto en gestantes podría darse mediante la detección de secuencias del mismo en la orina de la madre (Illanes *et al.*, 2006). En general, las aplicaciones de pruebas moleculares en orina abarcan la detección de mutaciones genéticas, el monitoreo de episodios de rechazo después del trasplante de órganos, tejidos o células, la detección y monitoreo del desarrollo de tumores, la eficacia de tratamientos con drogas u otros métodos y la determinación prenatal del sexo.

1.3. ADN en orina: ventajas y desventajas para su aplicación en pruebas moleculares

La transmisión de enfermedades por prácticas antiéticas y posteriores complicaciones de salud asociadas al procedimiento de toma de muestras clínicas, son las principales desventajas de las muestras invasivas, lo cual hace necesario dirigir la atención hacia muestras no invasivas como la orina (Bhardwaj *et al.*, 2014; Cavallotti *et al.*, 2004). No obstante, la baja concentración de ácidos nucleicos en comparación con otras muestras, limita su empleo como fuente para el aislamiento de moléculas biológicas y posterior desarrollo de pruebas moleculares. Se ha sugerido la existencia de entre 40 y 200 ng de ADN por ml de orina, sin considerar el estado de salud del sujeto donante (Su *et al.*, 2004 b; Umansky & Tomei, 2006). La baja concentración de ADN en orina se debería a la dificultad de fragmentos de ADN de alto peso molecular para atravesar la barrera del riñón, además de la presencia de enzimas DNAsas en esta muestra. La DNAsa I es la principal nucleasa encontrada en la orina, una nucleasa dependiente de calcio y magnesio, cuyo pH óptimo es de 6.5 (Ito, Minamiura & Yamamoto, 1984).

En adición a la baja concentración de ADN en orina, el principal soluto encontrado en esta muestra, la urea, es capaz de inhibir el PCR (Khan, Kangro, Coates & Heath, 1991).

La purificación de ADN mediante los diversos métodos que existen permite la eliminación de RNA, proteínas y moléculas que pueden interferir con el

desarrollo de pruebas inmunológicas y moleculares, sin embargo, en el caso de las muestras de orina, la cantidad de moléculas contaminantes es mayor por ser un fluido biológico de desecho, lo cual también limita su empleo como fuente para el aislamiento de ADN y la aplicación de las técnicas de aislamiento comunes, en particular, cuando los reactivos empleados pueden agregar más moléculas contaminantes a la muestra (Tan & Yiap, 2009; Hourfar *et al.*, 2005; El Bali, Diman, Bernard, Roosens & De Keersmaecker, 2014). Con el objetivo de mejorar el uso de la orina como fuente para el diagnóstico de enfermedades, sería necesario establecer un método que permita concentrar y purificar simultáneamente la poca cantidad de ADN presente en estas muestras.

1.4. Quitosano modificado para su aplicación en el reparto de genes y drogas

La modificación del grupo amino del quitosano ha permitido el desarrollo de una variedad de superficies útiles como geles, películas, fibras y partículas (Lárez, 2003). La reacción con aniones multivalentes como el tripolifosfato resulta en el entrecruzamiento de las cadenas a través de interacciones electrostáticas (Berger *et al.*, 2004). El entrecruzamiento iónico permite la formación de redes semi-permanentes que han sido aplicadas para el reparto de genes y drogas (Csaba, Köping-Höggård & Alonso, 2009; Shu & Zhu, 2002). En el 2010, Buranachai y colaboradores, utilizaron perlas de quitosano/poli etilenglicol entrecruzado con tripolifosfato y glutaraldehído para el reparto de diclofenaco de sodio en fluidos gástricos y duodenales simulados (Buranachai, Praphairaksit & Muangsin, 2010). Por otro lado, en el año 2013, Vimal y colaboradores, confeccionaron y emplearon nanopartículas de quitosano entrecruzado con tripolifosfato para el reparto del gen VP28 en el camarón *Penaeus monodon* (Vimal *et al.*, 2013).

Por su parte, el entrecruzamiento covalente de las cadenas de quitosano permite la formación de una red permanente, estable en medios ácidos y básicos (Berger *et al.*, 2004). Tal entrecruzamiento se logra mediante el uso,

generalmente, de aldehídos para formar uniones tipo base de Schiff (Berger *et al.*, 2004) (Figura 3). Superficies de quitosano entrecruzado covalentemente han sido aplicadas para el reparto de drogas *in vitro*, sin embargo, la toxicidad de los agentes entrecruzantes limitan su aplicación *in vivo* (Takigawa & Endo, 2006). En el año 2009, Navak y colaboradores utilizaron microesferas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído para la liberación del fármaco anti-retroviral Zidovudina (Nayak *et al.*, 2009), por otro lado, en el 2012, Ofokansi y colaboradores utilizaron partículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído para el reparto del fármaco Ibuprofeno (Ofokansi, Kenekwku, Isah & Okigbo, 2013). En adición, se han desarrollado y aplicado microesferas de quitosano para la liberación controlada del fármaco Centcromano (Gupta & Jabrail, 2006).

La trimetilación de los grupos amino es otra modificación común en la cadena polimérica (Mourya & Inamdar, 2009). Esta modificación permite que el polímero sea soluble sobre un amplio rango de pH y le confiere un carácter catiónico controlado. Quitosanos trimetilados ha sido utilizados para el reparto de ADN a las líneas celulares COS-7 y MCF-7 (Kean, Roth & Thanou, 2005). En adición, se ha estudiado la capacidad de sorción del quitosano trimetilado y el quitosano trimetilado entrecruzado de aniones metálicos como el oro y cromo (Díaz, Jacinto, Medina & Navarro, 2013; Navarro *et al.*, 2010).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las micropartículas de quitosano entrecruzado permiten la captura y concentración de ADN plasmídico presente en muestras de orina contaminadas artificialmente con este ADN plasmídico.

2.2 Objetivos

Generales

Evaluar el uso de micropartículas de quitosano entrecruzado para la captura y aislamiento de ADN a partir de muestras de orina.

Específicos

1. Evaluar los parámetros que afectan la adsorción del ADN a las micropartículas.
2. Evaluar la capacidad de adsorción de las micropartículas de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento.
3. Determinar el método de desorción de ADN a partir de quitosano entrecruzado. Evaluar la capacidad de adsorción – desorción de ADN del quitosano entrecruzado en muestras de orina artificialmente contaminadas.
4. Determinar el número mínimo de copias de ADN que pueden recuperarse, a partir de muestras de orina artificialmente contaminadas, empleando micropartículas de quitosano entrecruzadas.
5. Evaluar la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzadas a partir de muestras de orina artificialmente contaminadas.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de ADN plasmídico

El plásmido pZErO-2 conteniendo el inserto correspondiente a la secuencia de la proteína acuaporina TIP 5: 1 de *Arabidopsis thaliana* fue donado por el Doctor Alejandro Gabriel Schijman (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” –CONICET Buenos Aires, Argentina). La estructura de pZErO -2 con los sitios de corte de enzimas de restricción se muestra en la Figura 4.

3.2. Construcción de la curva estándar con el plásmido pZErO-2

La concentración de plásmido se determinó por espectrofotometría empleando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Estados Unidos). El plásmido fue posteriormente diluido hasta una concentración igual a 50 ng/ul, que equivale a un número de 10447243350 (10^{10}) copias/ul. La curva estándar se construyó llevando el plásmido a una concentración inicial de 10^5 copias/ul a partir del cual se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración igual a 1 copia/ul. Estas diluciones fueron amplificadas mediante qPCR en tres repeticiones independientes y los valores de C_q (ciclo umbral) fueron empleados para construir la curva de calibración.

3.3. Obtención de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído.

Se disolvieron 2 gramos de quitosano de peso molecular medio (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en 150 ml de ácido acético al 2% (Merck, Alemania). El entrecruzamiento se logró agregando una determinada concentración de glutaraldehído (Sigma Aldrich, Estados Unidos); en este caso se establecieron 3 concentraciones del agente entrecruzante: 1%, 5% y 10% (% volumen/volumen). La mezcla se mantuvo bajo agitación constante hasta que se observó un gel. Posteriormente, se realizaron lavados con agua ultra pura

(Milipore, Estados Unidos). El gel fue secado en una incubadora a 60°C (Fisher Scientific, Estados Unidos), para luego ser molido con un mortero. Finalmente, el producto molido fue tamizado con una malla de 150 micrómetros (W.S.Tyler, Alemania).

El laboratorio de Biopolímero y Metalofármacos de la Universidad Nacional de Ingeniería, a cargo de la Dra. Ana Cecilia Valderrama, fue el encargado del proceso de obtención de las micropartículas de quitosano entrecruzado, así como de la determinación del grado de desacetilación y peso molecular del quitosano nativo. El quitosano utilizado para la elaboración de las partículas tuvo un grado de desacetilación de 72,49 % y peso molecular igual a 455.93 KDa.

3.4. Procedimiento general para la evaluación de la adsorción – desorción de ADN con quitosano entrecruzado.

El esquema de trabajo para el establecimiento del protocolo de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado se muestra en la Figura 5. Se pesó una cantidad de partículas de quitosano entrecruzado y se añadió a un volumen de un tampón u orina según el ensayo. A esta suspensión se añadieron 50 ng de plásmido, luego la suspensión fue homogenizada empleando un homogenizador rotatorio de tubos durante máximo 120 minutos. Las micropartículas fueron luego separadas mediante centrifugación a 20 000 g durante 30 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y guardado a -20 °C hasta su posterior evaluación mediante qPCR.

Durante la etapa de evaluación de los parámetros para la adsorción, el ADN fue separado de la partícula mediante la técnica de extracción de fenol: cloroformo, según el protocolo descrito en el Anexo 1. Antes del tratamiento con solventes orgánicos se le añadieron 500 ul de PBS al sedimento de micropartículas en el fondo del tubo. El sobrenadante (de la incubación del quitosano con el DNA, guardado a -20 °C) y ADN extraído fueron analizados mediante la prueba de qPCR.

3.5. Parámetros evaluados para la adsorción en medio acuoso (PBS pH 6.9)

Se evaluaron los parámetros pH del medio, cantidad de micropartículas, tiempo de interacción entre las micropartículas y el ADN, y, volumen de muestra (inicialmente tampón fosfato salino) para la interacción entre las micropartículas y el ADN (ver Tabla 1), empleándose 50 ng de plásmido para todos los ensayos.

Para obtener los pH 5.0 y 6.0 se empleó tampón MES a una concentración igual a 10 mM (Sigma Aldrich, Estados Unidos), mientras que para el pH de 6.9 se empleó tampón fosfato salino (PBS) (Life Technologies, Estados Unidos).

Los sobrenadantes almacenados a – 20 °C y las muestras de ADN extraídos, desde las micropartículas de quitosano, fueron analizados mediante qPCR.

3.6. Métodos evaluados para la desorción en medio acuoso (PBS pH 6.9).

Inicialmente se evaluó el uso de un tampón comercial de elución (QA). El pellet de partículas conteniendo el ADN adsorbido fue resuspendido en 500 ul de buffer elución (Qiagen, Alemania), luego sonicado a 40 kHz por 5; 10 y 15 min. La suspensión fue centrifugada a 20000 g por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue conservado a -20°C hasta su uso. Las micropartículas fueron sometidas a extracción con fenol cloroformo.

Se empleó un procedimiento similar para la evaluación de la temperatura como método de desorción, la suspensión de micropartículas en buffer de elución fue sometida a 60°, 80° y 100°C durante 15 minutos, luego se procedió de la misma forma que para el tratamiento con sonicación.

A fin de evaluar el uso de otras sustancias para la desorción del ADN, se incubaron las micropartículas conteniendo el ADN durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante con los tampones Tris-KCl a distintos pH, tampón CTAB, tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen, Alemania);

igualmente se evaluó el uso de Chelex 100 como agente de desorción, para lo cual el pellet fue resuspendido en 500 ul de Chellex al 10% en buffer TE y luego hervido por 10 minutos. Luego de los procesos de incubación o hervido se procedió de la misma forma que lo descrito para método de desorción empleando sonicación (ver tabla 2).

Los sobrenadantes y las muestras de ADN extraídos de las micropartículas fueron evaluadas mediante qPCR como se describe más adelante.

3.7. Colección y procesamiento de las muestras de orina.

Se colectaron muestras de orina de sujetos sanos en frascos estériles de 100 ml (Samplix, Perú). Las muestras fueron utilizadas inmediatamente después de la colección. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación de la orina a 20 000 g por 30 min fue contaminado artificialmente con ADN plasmídico y utilizado para la evaluación de la capacidad de adsorción de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado. Antes de la contaminación, se midió el pH con tiras reactivas de la compañía Macherey – Nagel (Alemania), determinando que este se encontraba en el rango de 6.0 - 7.0.

3.8. Método evaluados para la desorción en muestras de orina.

Se evaluó el uso de tampón fosfato salino, EDTA 0.5 M pH 8, EDTA 0.5 M y SDS al 10%, tampón Tris-EDTA (1X) pH 8 y SDS al 10%, y, agua, para lavar las micropartículas antes de la extracción con fenol-cloroformo. El pellet de partículas conteniendo el ADN adsorbido fue resuspendido en las sustancias mencionadas e incubado a temperatura de ambiente en agitación constante durante media hora. Las micropartículas fueron sometidas a extracción fenol-cloroformo para la desorción del ADN.

Igualmente, se evaluó hervir el pellet de micropartículas resuspendido en las sustancias mencionadas por media hora, antes de la extracción con fenol-cloroformo.

Las muestras de ADN extraídas con fenol-cloroformo fueron analizadas mediante qPCR.

3.9. Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

Se realizaron 3 alícuotas de 15 ml del sobrenadante obtenido después de la centrifugación de una muestra de orina con pH neutro (7.0). El pH de las alícuotas fue calibrado a 5.0; 6.0 ó 6.9 empleando ácido clorhídrico concentrado y un pH metro (Mettler Toledo, Estados Unidos). Se transfirieron 500 ul de cada una de las alícuotas a tubos de 2 ml y se contaminaron con 50 ng de plásmido. Adicionalmente, se realizaron alícuotas de 500 ul de tampón MES pH 5.0, MES pH 6.0 y PBS pH 6.9, las cuales fueron contaminadas con la misma cantidad de plásmido. A cada una de estas alícuotas contaminadas se le agregó 3 mg de quitosano entrecruzado al 1%. El ADN adsorbido a las micropartículas fue separado empleando el método establecido en orina y PBS, respectivamente.

3.10. Evaluación de la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina.

Se realizaron alícuotas de 500 ul del sobrenadante obtenido después de la centrifugación de la orina, las cuales fueron contaminadas con una determinada cantidad de copias de plásmido, desde 10^0 hasta 10^5 , por triplicado. A cada una de estas alícuotas se le agregó 3 mg de las diferentes micropartículas de quitosano. Para la desorción del ADN se empleó el método previamente establecido en orina.

Adicionalmente, se añadieron las mismas cantidades de plásmido a tubos con orina, sin micropartículas, con el objetivo de evaluar la capacidad de concentración de las micropartículas. El ADN fue extraído a partir de estos tubos empleando el método de fenol-cloroformo.

3.11. Amplificación de una secuencia de la acuaporina TIP 5:1 de *Arabidopsis Thaliana* mediante la técnica de qPCR.

El ADN empleado para la evaluación de la adsorción – desorción en las micropartículas tuvo como blanco de reacción una secuencia de la acuaporina TIP5-1 de *Arabidopsis thaliana*. Para la amplificación se utilizaron los cebadores IAC Fw e IAC Rv cuyas secuencias corresponden a 5' ACCGTCATGGAACAGCACGTA 3' y 5' CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3' (Invitrogen, Estados Unidos), respectivamente, y la sonda taqman IAC Tq cuya secuencia corresponde a 5' AGCATCTGTTCTTGAAGGT 3' marcada en el extremo 5' y 3' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y un ligando de unión al surco menor del ADN (MGB) (Invitrogen, Estados Unidos), respectivamente.

El master mix para la amplificación consistió de 1X FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche, Suiza), 10 uM de cada primer, 5 uM de sonda y 5 ul de muestra de ADN (sobrenadante o ADN extraído mediante fenol-cloroformo). La amplificación se realizó empleando un termociclador Light Cycler 96 ® (Roche, Suiza) empleando el siguiente perfil de amplificación: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos cada uno consistente de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 58°C (Schijman *et al.*, 2011).

3.12. Análisis estadísticos

Se empleó la prueba de Kruskal - Wallis para determinar si había un efecto significativo de los factores evaluados en la adsorción del ADN como se indica en la Tabla 1. Igualmente, se empleó esta prueba para determinar si había diferencias significativas entre los métodos de desorción evaluados en PBS y orina. Adicionalmente, la misma prueba fue empleada para determinar si habían diferencias significativas entre las muestras de orina y tampones calibrados a pH 5.0; 6.0 y 6.9, y, a la vez, determinar si el pH óptimo para la adsorción de ADN en PBS era el mismo en orina.

Los análisis y Figuras fueron realizados empleando el paquete estadístico STATA 12.0.

3.13. Aspectos éticos

Un total de 10 voluntarios sanos donaron muestras de orina para el desarrollo de la presente investigación. El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el código de inscripción 64093.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Curva estándar de ADN y límite de detección

El límite de detección fue de 10 copias, correspondiente a un Cq igual a 37.14 (ver Figura 6), concentraciones inferiores no presentaron amplificación (Cq mayor a 40). Por tanto para el presente estudio se asumió que las amplificaciones con resultados de Cq por encima de este valor sean consideradas como negativas para posteriores análisis.

4.2. Determinación del pH del medio que favorece la mayor adsorción de ADN

El factor pH tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de ADN adsorbido por el polímero (Kruskal - Wallis, $p = 0.0005$). El grupo correspondiente al pH 6.9 fue diferente de los otros, y, obtuvo la menor mediana (Figura 7). No hubo liberación de ADN en el sobrenadante bajo ninguno de los pH evaluados (Cq menores a 37.16). Además, la prueba estadística empleada mostró que el factor no tuvo un efecto sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante. (Kruskal - Wallis, $p = 0.4587$) (Figura 8).

El pH del medio se estableció en 6.9 para ensayos posteriores por ser el valor que permitió la adsorción de una mayor cantidad de ADN.

4.3. Determinación de la cantidad de micropartículas de quitosano entrecruzado que permite la adsorción de más ADN

El factor cantidad de micropartículas de quitosano entrecruzado no tuvo un efecto significativo para la cantidad de ADN empleado en los experimentos de adsorción (Kruskal - Wallis, $p=0.9075$) (Figura 9). Únicamente hubo liberación de ADN en el sobrenadante con la menor cantidad de quitosano entrecruzado evaluada (Cq menor a 37.16). Sin embargo, la prueba estadística empleada mostró que el factor no tuvo efecto sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante (Kruskal - Wallis, $p= 0.3022$) (Figura 10). La cantidad de partículas se estableció en 3 mg para ensayos posteriores por ser el valor con más facilidad para pesar.

4.4. Determinación de las micropartículas de quitosano entrecruzado con mayor capacidad de adsorción de ADN

El grado de entrecruzamiento del quitosano en la micropartícula tuvo un efecto significativo en la cantidad de ADN adsorbido (Kruskal - Wallis, $p = 0.0001$). Los resultados de C_q obtenidos para los grupos fueron diferentes entre sí; sin embargo, el grado de entrecruzamiento 1% presentó la mediana de C_q más inferior, lo que indica que esta micropartícula es la que posee mejor capacidad de adsorción del ADN (Figura 11). En ninguno de los casos se observó presencia de ADN en el sobrenadante (C_q mayores a 37.16). (Figura 12). Además, la prueba estadística empleada mostró que el grado de entrecruzamiento del quitosano no tuvo efecto sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante (Kruskal - Wallis, $p = 0.0641$).

4.5. Determinación del tiempo de contacto óptimo entre las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% y el ADN

El factor tiempo de contacto no tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de ADN adsorbido por las micropartículas de quitosano entrecruzado (Kruskal - Wallis, $p = 0.7325$) (Figura 13). El tiempo de contacto se estableció en 30 minutos con el objetivo de acortar la duración del procedimiento.

4.6. Determinación del volumen de muestra para la formación de los complejos quitosano entrecruzado al 1%-ADN

El factor volumen de muestra tuvo efecto significativo sobre la cantidad de ADN adsorbido por las micropartículas de quitosano entrecruzado (Kruskal- Wallis, $p = 0.042$). El grupo correspondiente al mayor volumen evaluado (50 ml) fue diferente de los otros, y, presentó la mediana de C_q más alta, lo que indica que la capacidad de adsorción de las micropartículas de quitosano entrecruzado es menor cuando se emplean 50 ml de medio acuoso conteniendo el ADN para la adsorción (Figura 14). No se observaron diferencias significativas entre el resto de volúmenes evaluados (0.5; 5.0; y 10.0 ml) (Figura 14), por lo que se continuó empleando 0.5 ml.

4.7. Determinación del método de desorción del ADN en medio acuoso (PBS, pH 6.9).

La cantidad de ADN obtenida después del proceso de desorción fue diferente para cada uno de los métodos de desorción evaluados (Kruskal-Wallis, $p = 0.0325$). El sobrenadante de los diferentes tratamientos no mostró amplificación alguna, lo que nos indica que el pellet retuvo el ADN hasta el momento de la extracción con fenol cloroformo. Sin embargo, la cantidad de ADN eluído de las micropartículas varió de acuerdo con el tratamiento de desorción previamente empleado; así, el grupo correspondiente al tampón CTAB fue el que presentó el menor Cq (menor mediana). Debido a estos resultados se estableció que antes de la purificación del ADN con fenol-cloroformo se realizaría un pretratamiento con tampón conteniendo CTAB (Figura 15).

4.8. Determinación del método de desorción del ADN en orina

La cantidad de ADN obtenida después del proceso de desorción fue diferente para cada uno de los métodos de desorción evaluados (Kruskal-Wallis, $p = 0.01$). Los sobrenadantes obtenidos luego de los diferentes tratamientos de desorción de las micropartículas, no mostraron amplificación por qPCR. Sin embargo la cantidad de ADN eluído de las micropartículas varió de acuerdo con el tratamiento de desorción previamente empleado; así, el grupo correspondiente a la solución de EDTA y SDS fue el que presentó el menor Cq (menor mediana) (Figura 16). Debido a estos resultados se estableció que antes de purificación del ADN con fenol-cloroformo el pellet de micropartículas se herviría junto con la solución de EDTA y SDS.

4.9. Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

Hubo diferencias significativas entre el grupo de orinas con pH modificado y tampón fosfato salino (Kruskal - Wallis, $p = 0.0007$). Los grupos correspondientes a las muestras de orina presentaron medianas de Cq más bajas que los grupos correspondientes al medio artificial (tampón fosfato salino) (Ver Figura 17), lo cual indica que la capacidad de adsorción de las

micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% es mayor en orina con pH modificado.

Por otro lado, el factor pH tuvo un efecto significativo sobre la capacidad de adsorción de las micropartículas de quitosano entrecruzado 1% (Kruskal – Wallis, $p = 0.0183$). El grupo correspondiente al pH 5.0 fue diferente de los demás y obtuvo la mediana de C_q más alta (ver Figura 17). No hubo diferencias significativas entre los grupos correspondientes al pH 6.0 y 6.9, por lo que se continuó considerando como pH óptimo para la adsorción de ADN, el pH que favorecía la mayor adsorción de ADN en PBS (6.9).

4.10. Protocolo estandarizado de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído al 1%, en muestras de orina.

El protocolo final consistió en agregar 3 miligramos del quitosano entrecruzado al 1% a 0.5 ml de orina. La suspensión se incubó a temperatura de ambiente en un homogenizador rotatorio de tubos durante media hora a 50 rpm. Las micropartículas se separaron mediante centrifugación a 20 000 g durante 30 min. El sobrenadante se descartó y las micropartículas fueron suspendidas en una solución de EDTA 0.5 M pH 8 – SDS al 10% y hervidas por 30 min. Finalmente, el ADN fue liberado de las micropartículas mediante el método de purificación con fenol-cloroformo.

4.11. Evaluación de la capacidad de concentración de ADN de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina

La capacidad de adsorción de las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% permitió la captura de hasta 10^4 copias de plásmido, mientras que, la capacidad de las micropartículas de quitosano entrecruzado al 5%, hasta 10^5 copias (ver Figura 18). No se observó amplificación con ninguna de las cantidades de copias de plásmido evaluadas con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 10%.

La mediana de C_q del grupo correspondiente a las micropartículas de quitosano al 1% fue significativamente diferente y menor que la de los controles

sin micropartículas, lo cual indica que el quitosano entrecruzado al 1% es capaz de capturar y concentrar el ADN presente en el medio (ver Figura 18).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El presente estudio permitió establecer un método innovador, de bajo costo y gran efectividad, para la captura y concentración de ADN a partir de muestras de orina que consiste en el empleo de micropartículas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído como superficies para la adsorción del ADN, y, que tiene como principal objetivo en un futuro ser aplicado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a partir de muestras no invasivas como es la orina.

El quitosano es un polímero de naturaleza pH-dependiente, de fácil obtención y bajo costo de producción, que ha sido empleado para el reparto de genes y drogas por su biocompatibilidad y biodegradabilidad (Choi, Nam & Nah, 2016). En adición, el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas permite la formación de una red porosa estable en un amplio rango de pH's, como el observado en muestras de orina (Berger *et al.*, 2004). En este estudio las atractivas cualidades del polímero natural y modificado fueron aprovechadas para la creación de un método de aislamiento de ADN con quitosano entrecruzado en un medio acuoso artificial, con el principal objetivo de ser empleado para muestras de orina. La elección de la orina como medio para la evaluación de las micropartículas de quitosano entrecruzado se debió a que esta es una muestra bastante atractiva en el campo del diagnóstico molecular de enfermedades ya que no es invasiva, y es fácil de obtener y manipular. No obstante, la baja concentración de ADN y la presencia de moléculas de desecho capaces de inhibir el PCR limitan su empleo como fuente para el aislamiento de ADN (Su *et al.*, 2004 b; Khan, Kangro, Coates & Heath, 1991), lo cual hace necesaria la implementación de un método que permitiera capturar y concentrar el ADN presente en esta muestra, como se logró en el presente estudio con el quitosano entrecruzado al 1%.

Si bien el objetivo principal del estudio era emplear quitosano entrecruzado para el aislamiento de ADN a partir de muestras de orina, la estandarización

del método se realizó inicialmente en un medio acuoso artificial (tampón fosfato salino) libre de moléculas contaminantes y DNAsas, con el propósito de diferenciar entre la inhibición del qPCR y la falta de amplificación a consecuencia de la degradación del ADN o la falta de desorción del ADN. El uso de una secuencia blanco de ADN humano para la evaluación de la capacidad de adsorción del quitosano es muy problemático debido a que la carga de ADN humano en la orina es muy variable; la mejor alternativa para realizar esta evaluación por tanto fue el uso de una secuencia completamente ajena al ADN humano, la cual en este caso estuvo dada por la secuencia del gen de *Arabidopsis thaliana* insertada en un plásmido. El uso del plásmido tiene muchas ventajas, una de ellas es la capacidad de producir copias idénticas en cantidades adecuadas para el uso en este tipo de estudios. Finalmente la secuencia blanco (de *A. thaliana*) permitió evaluar en forma directa la capacidad de adsorción/desorción del ADN sin la interferencia del ADN presente en la orina.

Durante la evaluación del pH y grado de entrecruzamiento del quitosano, no hubo amplificación en los sobrenadantes obtenidos después de la interacción del ADN con el quitosano entrecruzado, lo cual sugeriría que las micropartículas de quitosano entrecruzado capturan todo el ADN presente en el medio, y ,a la vez, que no hay diferencias con respecto a la capacidad de adsorción entre los pH's y quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento evaluados; sin embargo, los resultados obtenidos con el ADN extraído mediante fenol-cloroformo a partir de las micropartículas adsorbidas mostraron que sí hay diferencias entre los pH's y grados de entrecruzamiento evaluados. Lo que nos indica que la desorción del ADN de las micropartículas no es completa y depende del grado de entrecruzamiento. Además, durante la evaluación de métodos de desorción del ADN, se observó una mayor liberación de ADN a partir de las micropartículas pretratadas con soluciones basadas en detergentes y agentes quelantes antes de la purificación con fenol-cloroformo en comparación con las micropartículas tratadas directamente con fenol-cloroformo (ver Figuras 15 y 16), lo cual respalda la teoría planteada.

La capacidad de adsorción del quitosano es influenciada por diversos factores, el más influyente sobre la adsorción de moléculas biológicas, drogas o aniones, es el pH del medio circundante, ya que éste define la carga del polímero (Sato, Ishii & Yoshio, 2001; Zhao *et al*, 2006). Como se ha señalado, a un pH por debajo del pKa de las aminos primarias del quitosano (aproximadamente 6.5) posee carga positiva y puede establecer interacciones electrostáticas con el esqueleto de fosfato del ADN (Riva *et al.*, 2011; Chang & Goldsby, 2012). Debido a que la mayor adsorción de ADN por las micropartículas de quitosano entrecruzado se observó a un pH casi neutro (6.9), se puede sugerir que las principales interacciones que dirigen la adsorción no son electrostáticas. Sin embargo, se han reportado investigaciones en las que la formación de complejos quitosano-ADN se ve favorecida en medios casi neutros, específicamente 6.9, tal como se observó en este estudio (Sato, Ishii & Yoshio, 2001; Nimesh, Thibault, Lavertu & Buschmann, 2010; Zhao *et al*, 2006). Estos estudios señalan que el quitosano podía tener carga positiva aún por encima del pKa de las aminos primarias, cuando la longitud de la cadena y el grado de desacetilación del quitosano eran suficientemente altos.

Adicionalmente, fue necesario evaluar si la modificación del pH de la orina, afectaba la capacidad de adsorción del quitosano entrecruzado al 1%, hallándose que influía en la adsorción de ADN por las micropartículas, favoreciendo su captura, lo cual podría sugerir que la adición de hidrogeniones mediante la acidificación del medio puede potenciar la capacidad de adsorción del quitosano entrecruzado al 1% observada en tampón fosfato, a través de la protonación de un mayor número de aminos primarias en la cadena de quitosano para su interacción con el esqueleto de fosfato del ADN. No obstante, la acidificación del medio hasta pH 5 contribuye a una menor adsorción de ADN. Esto sugiere que el balance entre el porcentaje de aminos primarias protonadas y no protonadas en el medio a pH 5 podría afectar la capacidad de adsorción del quitosano entrecruzado. Por otro lado, se creyó conveniente evaluar si el pH óptimo para la adsorción de ADN era el mismo que en tampón fosfato salino debido a que si la acidificación del medio influía en la capacidad de adsorción del quitosano entrecruzado, el valor de pH que

favorecía la mayor adsorción de ADN en medio artificial podía ser diferente en orina. A diferencia de lo observado en tampón fosfato salino, no hubo un pH óptimo para la adsorción de ADN. Sin embargo, el pH que favorecía la mayor adsorción de ADN en tampón fosfato salino estaba dentro de los valores de pH en los que se observó una mayor adsorción de ADN en orina, por lo cual se continuó empleando muestras de orina con pH's cercanos a la neutralidad.

El efecto del pH sobre la capacidad de adsorción del quitosano se da a través del grado de desacetilación y peso molecular. Como se ha sugerido, la capacidad de adsorción del quitosano se incrementa con el grado de desacetilación y peso molecular del polímero (Lavertu, Méthot, Tran-Khanh & Buschmann, 2006). Generalmente, la formación de complejos quitosano-ADN para el reparto de genes se desarrolla con quitosanos de un grado de desacetilación por encima del 80% y peso molecular entre 10 y 50 kDa idealmente (Akbuga, Ozbas-Turan & Ekentok, 2016; Sato, Ishii & Yoshio, 2001). Si bien el grado de desacetilación y peso molecular del quitosano utilizado para la obtención de las micropartículas empleadas en este estudio estuvo fuera de los valores ideales para el reparto de genes, la combinación de ambos permitió mayor adsorción de ADN a un pH casi neutro, lo cual sugiere que las interacciones electrostáticas contribuyen en la formación de los complejos quitosano entrecruzado-ADN, no obstante, no son las principales. Además, la modificación del quitosano mediante el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, adiciona un factor con efecto sobre la capacidad de adsorción del quitosano entrecruzado a través de la densidad de carga del quitosano y el tamaño de los poros de la red: el grado de entrecruzamiento (Mahaninia & Wilson, 2015). Durante el entrecruzamiento covalente de las cadenas poliméricas, las aminas primarias en las unidades de glucosamina del quitosano son imposibilitadas para protonarse en medios ácidos (Berger *et al.*, 2004); sin embargo, las aminas de los quitosanos que no se entrecruzaron pueden interactuar iónicamente con los grupos fosfato del ADN. A partir de lo mencionado, se puede deducir que cuanto mayor es el grado de entrecruzamiento la densidad de grupos cargados que pueden formar este tipo de enlaces con el ADN es menor, por lo tanto, es de esperarse que el

quitosano con menor grado de entrecruzamiento posea la mayor capacidad de adsorción, tal como se observó en este estudio con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% (ver Figura 12). Adicionalmente, un menor grado de entrecruzamiento permite la formación de poros más grandes que facilitan la difusión del ADN (Mahaninia & Wilson, 2015). No obstante, en estudios en los que se ha empleado quitosano entrecruzado para la captura de aniones fosfato, se sugirió que las principales fuerzas que dirigen la adsorción de ADN son físicas (Berger *et al.*, 2004). El mecanismo mediante el cual el quitosano entrecruzado empleado en este estudio captura el ADN es desconocido, sin embargo, se postula que podría actuar a través de adsorción iónica, física y difusión, simultáneamente. En adición, la dificultad para liberar el ADN capturado por las micropartículas de quitosano entrecruzado, podría sugerir que el ADN queda atrapado dentro de las partículas luego de su difusión a través de los poros de la red de quitosano entrecruzado, y, que por variaciones en el pH del medio, el diámetro de los poros se acorta, dificultando la salida del ADN, o, que los complejos ADN-quitosano entrecruzado se forman principalmente a través de enlaces muy difíciles de romper como los covalentes (Chang & Goldsby, 2012).

No existen publicaciones previas en las que se evalúe el efecto del grado de entrecruzamiento del quitosano sobre la adsorción de ácidos nucleicos; sin embargo, existen publicaciones que indican que el grado de entrecruzamiento es importante para la carga de drogas y moléculas aniónicas, siendo mayor la densidad de moléculas cargadas, cuanto menor es el grado de entrecruzamiento (Nayak *et al.*, 2009; Ofokansi, Kenechukwu, Isah & Okigbo, 2013; Gupta & Jabrail, 2006; Mahaninia & Wilson, 2015). En el 2015, por ejemplo, Mahaninia & Wilson, documentaron que la adsorción de di-aniones fosfato fue mayor con quitosanos con un grado de entrecruzamiento de 2.5% en comparación con 5% (Mahaninia & Wilson, 2015). Es importante mencionar que los resultados observados con quitosano de diferentes grados de entrecruzamiento empleados en este estudio sólo sugieren que un mayor grado de entrecruzamiento disminuye la capacidad de adsorción del ADN, sin embargo no se observa una relación inversamente proporcional (ver Figura 12).

Además del pH y grado de entrecruzamiento, se evaluaron factores adicionales que no habían sido reportados en investigaciones similares, como la cantidad de quitosano entrecruzado, el tiempo de contacto entre el quitosano entrecruzado y el ADN, y el volumen de orina (inicialmente, PBS) para la formación de los complejos quitosano entrecruzado-ADN. Con respecto a la cantidad de micropartículas, se empleó la más alta ya que esta era la más fácil de pesar. Por otro lado, se observó presencia de ADN en los sobrenadantes únicamente con la menor cantidad de micropartículas evaluada, lo cual indica que la densidad de micropartículas de quitosano entrecruzado presentes en esta cantidad no posee la suficiente fuerza de adsorción para captar todo el ADN presente en el medio.

Otro de los factores que no tuvo efecto sobre la cantidad de ADN adsorbido por las micropartículas de quitosano entrecruzado fue el tiempo de contacto, por lo cual éste se estableció en el menor tiempo evaluado con el propósito de acortar la duración del procedimiento. No se han evidenciado publicaciones previas en las que se evalúe este factor sobre la adsorción de ADN por matrices de quitosano entrecruzado. Sin embargo, como reportaron Pandit *et al.*, la interacción entre el quitosano entrecruzado con glutaraldehído y el ADN es inmediata, por lo cual se pudieron haber evaluado tiempos de interacción menores a 30 minutos o incluso simplemente agitar la suspensión de micropartículas conteniendo el ADN durante algunos segundos (Pandit, Nanayakkara, Cao & Raghavan, 2015).

Debido a que uno de los futuros objetivos del estudio es implementar este método para el aislamiento de ADN a partir de muestras de orina para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, hubiese sido recomendable emplear un volumen de medio lo más semejante al de una muestra de orina común (aproximadamente 50 ml), sin embargo, los resultados mostraron que la capacidad de adsorción de las micropartículas de quitosano entrecruzado disminuye en un volumen igual a 50 ml. No obstante, estos podrían estar influenciados por el proceso de centrifugación, ya que la velocidad no permitió la separación de todo el quitosano entrecruzado

conteniendo el ADN, quedando restos en las paredes del envase. Por otro lado, no se observaron diferencias con respecto a la capacidad de adsorción con 0.5; 5 y 10 ml, por lo cual se continuó empleando el volumen inicial (0.5 ml).

Un paso fundamental una vez que las micropartículas logran adsorber el ADN del medio es que éste pueda ser liberado nuevamente en un medio adecuado para su detección mediante técnicas moleculares. La idea principal era liberar el ADN después de concentrar las micropartículas por centrifugación, empleando un método simple, así se evaluaron temperatura y sonicación empleando como tampón de desorción un tampón comercial (buffer de elución de QIAgen). Debido a la ausencia de desorción se probaron tampones alcalinos de Tris - KCl a una concentración de 10mM y pH de 8; 9 y 10, para la neutralización de las aminos cargadas en el quitosano. Seguidamente se evaluó la adición de una solución de lisis de células sanguíneas, el detergente catiónico CTAB y el agente quelante Chelex. Debido a que no hubo amplificación en los sobrenadantes obtenidos después de la aplicación de los diferentes métodos, se empleó fenol-cloroformo para purificar el ADN liberado. Estos resultados sugieren que las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% establecen interacciones de diversa naturaleza con el ADN, de tal forma que este último puede ser liberado de la micropartícula solo a través de una extracción con fenol-cloroformo.

Los resultados obtenidos con las muestras de ADN extraídos a partir de las micropartículas pretratadas con los diferentes métodos propuestos, mostraron que el pretratamiento con CTAB incrementa la capacidad de desorción de las micropartículas de quitosano entrecruzado. El CTAB es un detergente catiónico empleado para el aislamiento de ADN a partir de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos como plantas o algunas bacterias Gram-negativas, por su capacidad para solubilizar la membrana celular y formar un complejo con el ADN, permitiendo la precipitación selectiva del mismo mediante una disminución de la concentración de sales por debajo de 0.5 M (Sambrook & Russell, 2001). Probablemente en nuestro caso tenga una función similar incrementando así la cantidad de ADN recuperado.

La posibilidad de que la interacción ADN-quitosano entrecruzado al 1% no es principalmente de tipo iónico se ve corroborada por el hecho de que la desorción del ADN no se ve afectada por los diferentes grados de alcalinidad de los tampones de desorción. De forma similar, la estabilidad del ADN después de someter las micropartículas conteniendo ADN a ebullición, sugiere que las micropartículas forman porosidades que albergan el ADN protegiéndolo del efecto de la temperatura como sugieren estudios previos en el que se sometieron las matrices de quitosano para reparto de genes a temperaturas extremas (Karni *et al*, 2013; Pandit, Nanayakkara, Cao & Raghavan, 2015).

Después de establecer las condiciones para la adsorción y el método de desorción del ADN en medio artificial, se realizaron ensayos con muestras de orina. El método de desorción establecido en tampón fosfato salino, no permitió la amplificación cuando se empleó orina como medio para la contaminación con plásmido. Este resultado se atribuyó a la inhibición del qPCR por sustancias contaminantes presentes en la orina, por lo que se optó por lavar las micropartículas con soluciones basadas en detergentes, agentes quelantes, tampón fosfato salino o agua, antes de la purificación del ADN con fenol-cloroformo. Sin embargo, este paso tampoco permitió la amplificación del ADN, por lo que se optó por hervir las micropartículas en las soluciones de lavado, observándose amplificación cuando las micropartículas eran pretratadas únicamente con agua, EDTA, o solución EDTA-SDS. Adicionalmente, se observó que la capacidad de desorción era mayor cuando las micropartículas eran pretratadas con la solución EDTA-SDS. Este resultado puede atribuirse a la acción de la temperatura conjuntamente con el EDTA y SDS, mas no a la acción individual de la temperatura sobre las interacciones ya que no se observó amplificación con dos de los métodos de desorción (ver Figura 16).

Tanto el EDTA como el SDS son empleados para la lisis celular durante el aislamiento de ácidos nucleicos. El EDTA es un agente quelante, con habilidad para capturar cationes divalentes (por ejemplo, Mg +2), inhibiendo la actividad de nucleasas, mientras que el SDS es un detergente aniónico utilizado con frecuencia para la ruptura de la membrana celular, por su capacidad para desnaturalizar proteínas. (Khosravinia & Ramesha, 2007) (Brown & Audet,

2008; Lodish *et al.*, 2000). El pretratamiento de las micropartículas con EDTA y SDS permitió la liberación de una mayor cantidad de ADN, lo cual sugiere que no sólo eliminan moléculas presentes en la orina capaces de inhibir en PCR sino que también afectan la interacción entre el quitosano entrecruzado y el ADN, por mecanismos aún no descritos para la interacción ADN-quitosano.

El pretratamiento de las micropartículas resuspendidas en orina con temperatura y una solución de lavado, permitió evadir la inhibición del qPCR por sustancias contaminantes presentes en estas muestras, uno de los principales problemas para su empleo como fuente biológica para el aislamiento de ADN. Sin embargo, el empleo de la orina para este propósito no tiene como única limitante la inhibición del qPCR sino también la baja concentración de ADN presente, por lo cual se evaluó la capacidad de adsorción y concentración del quitosano con distintos grados de entrecruzamiento, hallándose que sólo las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% son capaces de adsorber y concentrar el ADN presente en el medio (ver Figura 18).

Junto con la evaluación de la capacidad de concentración, fue importante determinar si las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% lograban capturar las cantidades de ADN presentes en una muestra de orina independientemente de la salud del sujeto donante (40-200 ng/ml), con el objetivo de que sean empleadas para el aislamiento de ADN a partir de esta muestra (Su *et al.*, 2004 b). Así se halló que estas micropartículas tienen como límite de captura 10^4 copias de plásmido (ver Figura 18). Considerando que en el volumen de orina empleado para la estandarización del método de captura de ADN con quitosano entrecruzado el rango teórico de plásmido en este volumen sería de 10^6 a 10^7 copias (Thermo Fisher Scientific, s.f.), las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% son capaces de capturar cantidades inferiores al rango de concentraciones de ADN en orina. Si bien el quitosano entrecruzado al 5% también puede capturar cantidades de ADN inferiores al rango de concentraciones mencionado, no es capaz de concentrar el ADN presente en el medio, por lo cual no sería de utilidad para ser empleado en muestras de orina (ver Figura 18).

CONCLUSIONES

1. Las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% poseen la habilidad de concentrar ADN plasmídico en muestras de orina.
2. La mayor adsorción de ADN por las micropartículas de quitosano entrecruzado se observa a pH 6.9.
3. La modificación del pH de la orina hacia un pH cercano al de 6.9 influye en la capacidad de adsorción de ADN plasmídico, favoreciendo su captura.
4. Las micropartículas de quitosano con menor grado de entrecruzamiento (1%) poseen la mayor capacidad de adsorción/desorción de ADN plasmídico.
5. El tratamiento de las micropartículas conteniendo el ADN adsorbido con fenol-cloroformo permitió la desorción del ADN tanto en medio artificial como en orina.
6. Las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% pueden capturar un número mínimo de copias de plásmido igual a 10^4 en muestras de orina.

RECOMENDACIONES

1. Hallar un medio para suspender las micropartículas de quitosano entrecruzado, con el propósito de evaluar concentraciones de quitosano entrecruzado en medio acuoso mediante diluciones seriadas desde un stock alto y evitar la dificultad e inexactitud del pesaje.
2. Evaluar tiempos de contacto menores con el objetivo de acortar el procedimiento de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado.
3. Estandarizar el método con un volumen de orina lo más parecido al de una muestra común (aproximadamente 50 ml).
4. Evaluar métodos de desorción de menor duración y mayor simplicidad con el propósito de hacer más atractivo el método de aislamiento con ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado.
5. Evaluar métodos de desorción para las micropartículas de quitosano entrecruzado al 5 y 10%, al igual que como se realizó con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.
6. Evaluar la capacidad de adsorción de ADN genómico de las micropartículas de quitosano entrecruzado.
7. Considerar el uso del plásmido pZErO - 2 como control interno de la extracción de ADN cuando se aplique esta técnica con micropartículas de quitosano en el diagnóstico en muestras de orina.
8. Evaluar el uso de tampón de alta concentración a fin de asegurar que todas las muestras de orina alcancen un pH equivalente a 6.9.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

- 1) Se añadieron 500 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) a 500 ul de las micropartículas en PBS.
- 2) Se mezcló con un agitador tipo vórtex y se realizó un paso de centrifugación a 20 000 g durante 5 minutos.
- 3) Un total de 400 ul de la fase superior fueron transferidos a un tubo con 400 ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- 4) Se mezcló manualmente y se realizó otro paso de centrifugación a 20 000 g durante 5 minutos.
- 5) Se transfirieron 300 ul de la fase superior a un tubo con 30 ul de acetato de sodio (3 M) y 1 ml de etanol absoluto, para la precipitación del ADN.
- 6) Se colocó a – 70 °C durante 1 hora.
- 7) Se realizó un paso de centrifugación a 20 000 durante media hora.
- 8) El sobrenadante fue eliminado manualmente.
- 9) Se agregó 1 ml de etanol al 70% para lavar el ADN que precipitó en el fondo del tubo.
- 10) Se realizó un paso de centrifugación a 20 000 durante 5 minutos.
- 11) Los pasos 8-10 fueron repetidos 3 veces.
- 12) El sobrenadante fue eliminado manualmente.
- 13) El ADN fue resuspendido en 100 ul de tampón AE (Qiagen, Alemania).

Anexo 2

Constancia de aprobación del Comité Institucional de Ética



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 149-08-16

El Miembro del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : **"Aplicación de partículas de quitosano para el aislamiento in vitro de ADN en orina."**

Código de inscripción : **64093**

Investigador principal : **Pando Caciano, Alejandra**

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 31 de marzo del 2016.
2. **Consentimiento informado**, versión recibida en fecha 31 de marzo del 2016.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **05 de abril del 2017**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 06 de abril del 2016.




Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación

/spd

Anexo 3

Consentimiento informado para la obtención de muestras de orina

Consentimiento para participar en un estudio de investigación - ADULTOS -

Instituciones : Universidad Cayetano Heredia-UPCH
Investigadores : Alejandra Pando, Helana Jahuirra, Holger Mayta
Título : Aplicación de partículas de quitosano para el aislamiento *in vitro* de ADN en orina.

Propósito del Estudio:

Lo estamos invitando a participar en un estudio llamado: "Aplicación de partículas de quitosano para el aislamiento *in vitro* de ADN en orina". Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia que tiene como objetivo diseñar un novedoso método de aislamiento de ADN en orina. Su participación abarcará únicamente lo que dure la toma de las muestras que se pidan a continuación.

Procedimientos:

Si usted acepta participar en este estudio se le hará el siguiente examen:

- El participante donará una muestra de orina equivalente a aproximadamente una taza. Para este propósito el participante recibirá un frasco de 50 mililitros.

Riesgos:

La recolección de una muestra de orina no posee riesgo alguno.

Beneficios:

No existen beneficios para el participante. Sin embargo, el estudio permitirá desarrollar una novedosa técnica molecular.

Costos e incentivos

Usted no deberá pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole.

Confidencialidad:

Se colocará un número a la muestra únicamente para diferenciar que pertenece a un participante distinto. Se realizarán pruebas moleculares a partir de ADN foráneo agregado a la orina, más no a partir de ADN humano encontrado en la orina.

Uso futuro de la información obtenida:

Las muestras no serán utilizadas en futuras investigaciones. Una vez utilizadas las muestras serán desechadas.

Derechos del participante:

Si usted decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin perjuicio alguno.

Si usted tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, teléfono 01- 319000 anexo 2271, Presidente: Doctora Frine Samalvides, o, al investigador principal, Alejandra Pando, teléfono 955364055.

CONSENTIMIENTO

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que cosas me van a pasar si participo en el proyecto, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno.

Participante

Nombre:
DNI:

Fecha

Investigador

Nombre:
DNI:

Fecha



APROBADO

F. APROBACIÓN: 06/04/2016

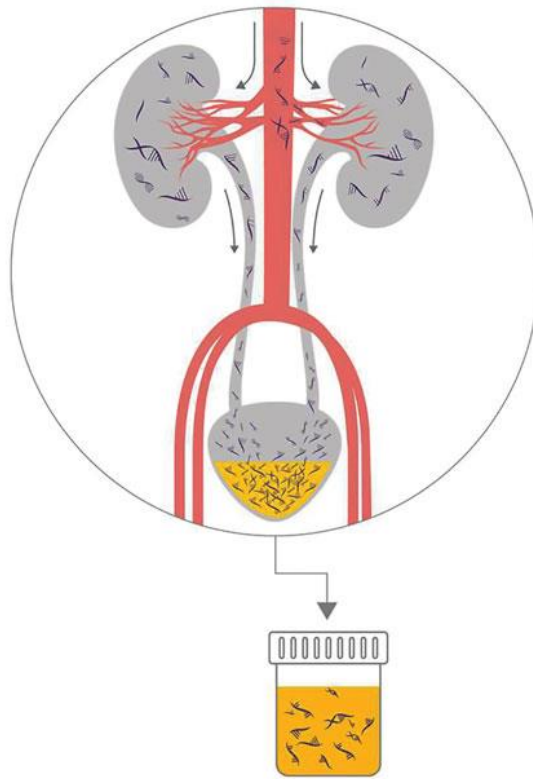


Figura 2. Origen del ADN trans-renal o extracelular en orina.

En rojo: la circulación; en plomo: el sistema urinario; en amarillo: la orina. Las flechas indican el recorrido de las secuencias de ADN, representadas por líneas negras.

Quitosano

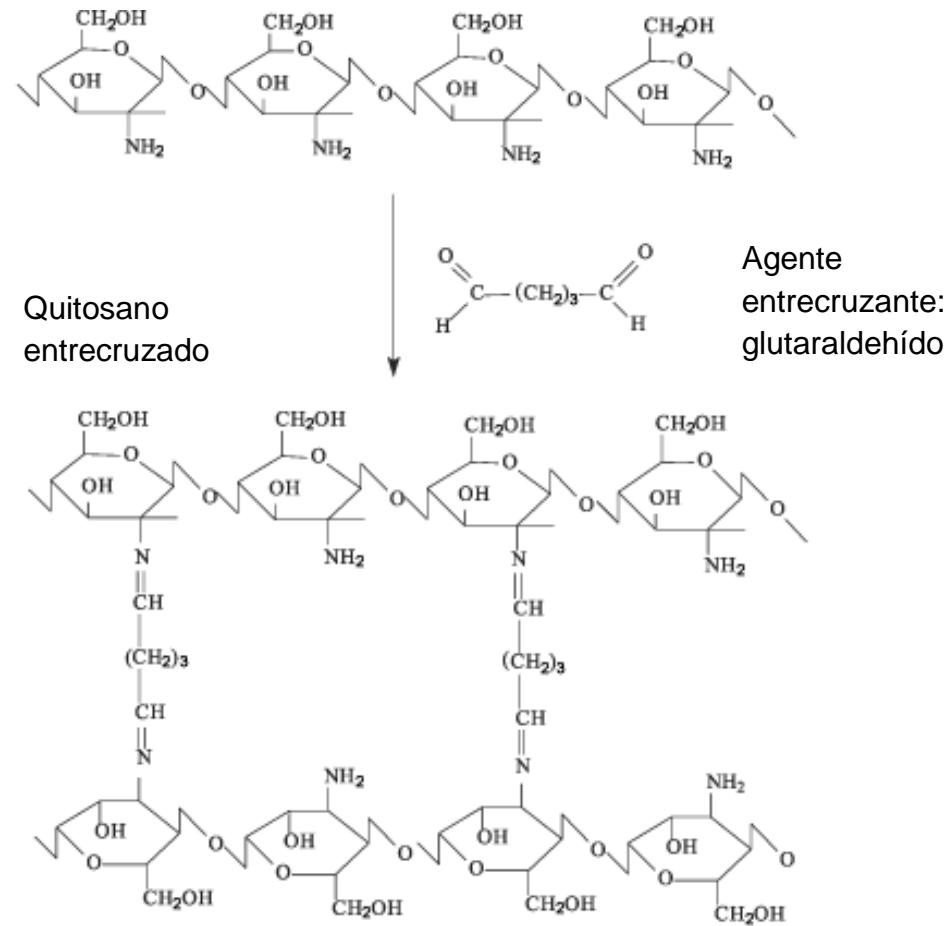


Figura 3. Proceso de entrecruzamiento del quitosano tratado con glutaraldehído. La flecha indica que el quitosano (arriba) va a ser tratado con glutaraldehído. El entrecruzamiento de las cadenas resulta en la formación de una red de quitosano



Figura 4. Estructura del plásmido pZErO-2.

La flecha indica el sitio donde se insertó la secuencia de la proteína TIP 5: 1 de *A.thaliana*.

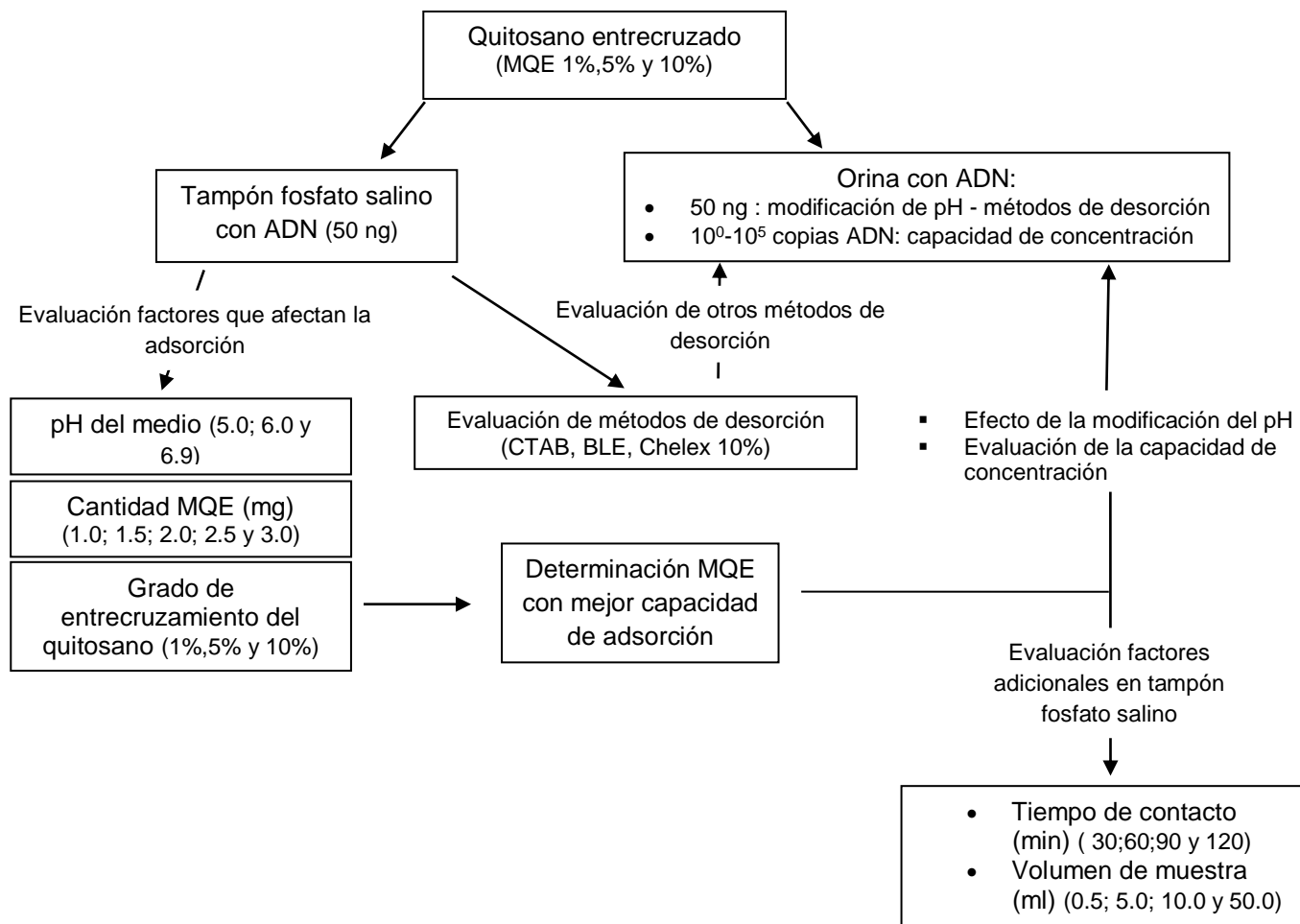


Figura 5. Esquema general de trabajo para el establecimiento del protocolo de aislamiento de ADN con micropartículas de quitosano entrecruzado.

Tabla 1. Parámetros y valores evaluados para la adsorción de ADN en medio acuoso

<i>Parámetros evaluados</i>	<i>Valores evaluados</i>
pH del medio	5.0; 6.0 y 6.9.
Cantidad de micropartículas (mg)	1.0; 1.5; 2.0; 2.5 y 3.
Tiempo de contacto (min)	30; 60; 90 y 120.
Volumen de muestra (ml)	0.5; 5.0; 10 y 50.

Tabla 2. Métodos evaluados para la desorción de ADN en medio acuoso

<i>Método</i>	<i>Valores o agentes evaluados</i>
Sonicación	5; 10 y 15 min.
Temperatura	60; 80 y 100 °C
Adición de tampones alcalinos	Tampones Tris-KCl pH 8; 9 y 10.
Otros tampones	Tampón CTAB (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB al 2%, PVP40 al 2%, β-mercaptoetanol al 0.2%)
	Tampón de lisis de eritrocitos – 10% SDS (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, $MgCl_2$ 5 mM, NaCl 10 mM, 10% SDS).
Chelex	Chelex al 10% en tampón Tris 10 mM- EDTA 1 mM.

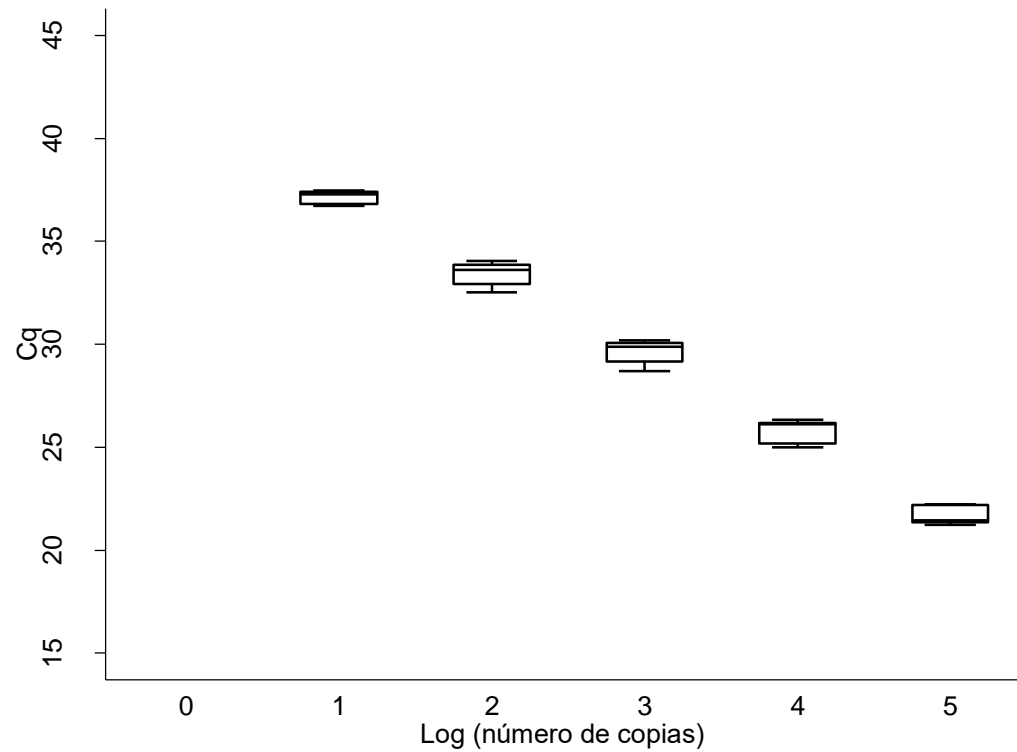


Figura 6. Curva estándar construida con el número de copias de plásmido y valores de Cq correspondientes.

El límite de detección de la curva estándar fue de 10 copias de plásmido. No se observó amplificación debajo de 1 copia de plásmido.

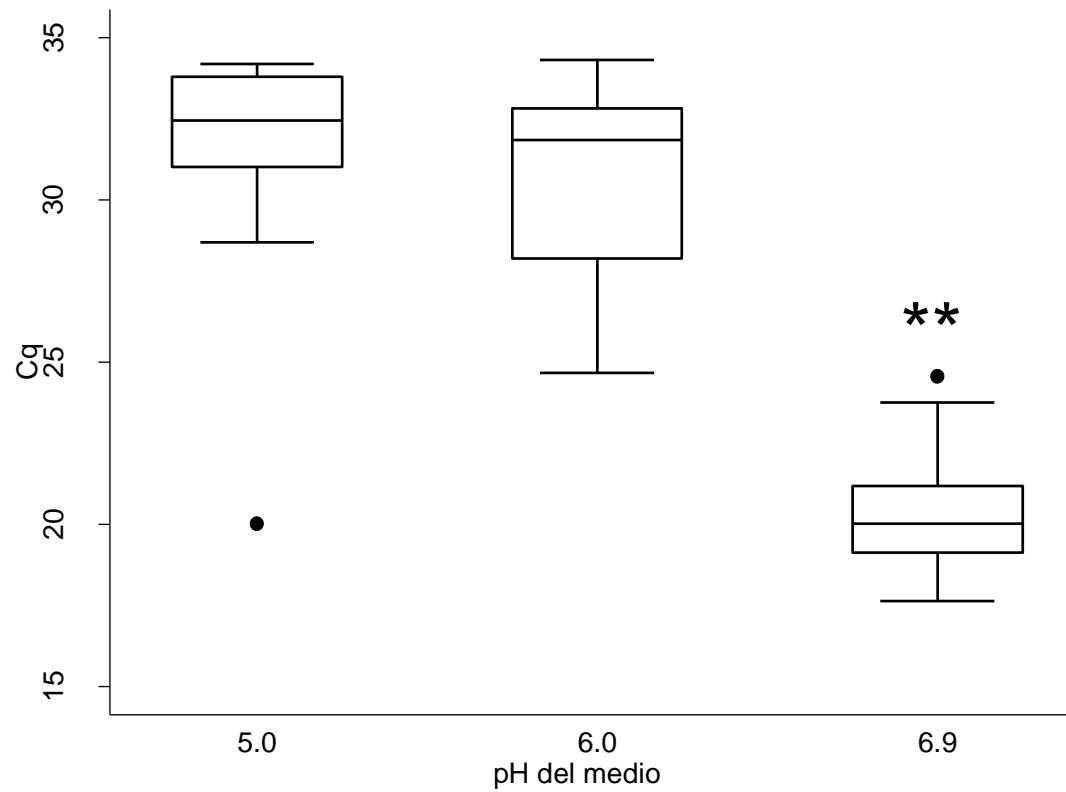


Figura 7. Efecto del pH del medio sobre la cantidad de ADN capturado.
**: Kruskal-Wallis entre pares de grupos 5.0 y 6.9 ($p = 0.0017$); y grupos 6.0 y 6.9 ($p=0.0003$)

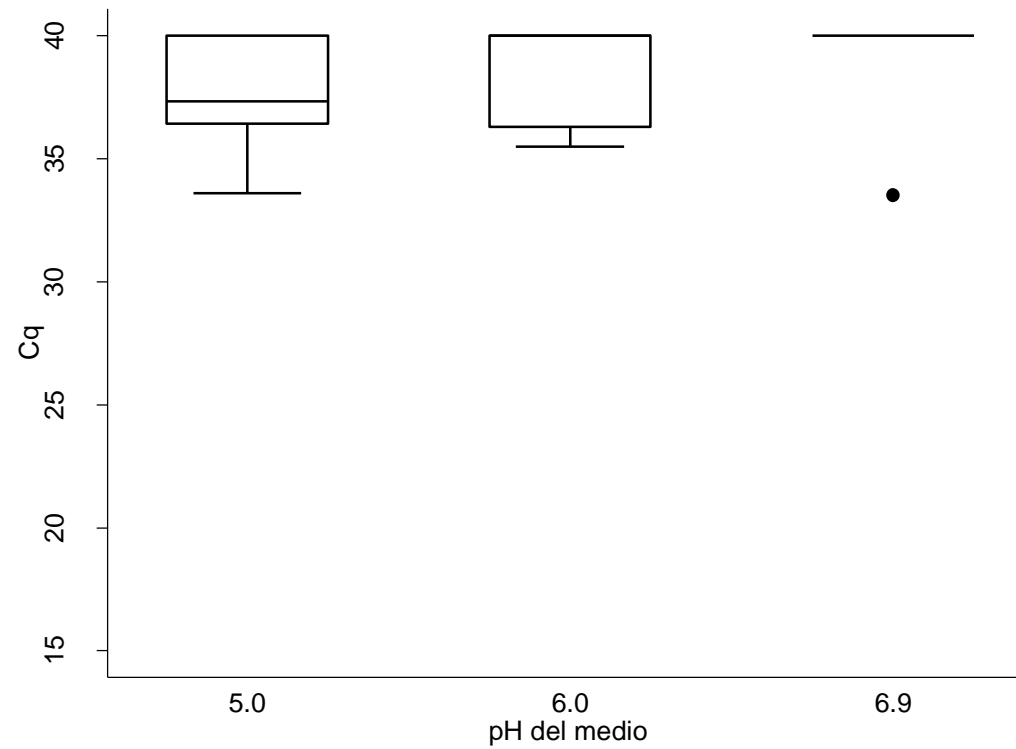


Figura 8. Efecto del pH del medio sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante.
No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal- Wallis, $p = 0.4587$).

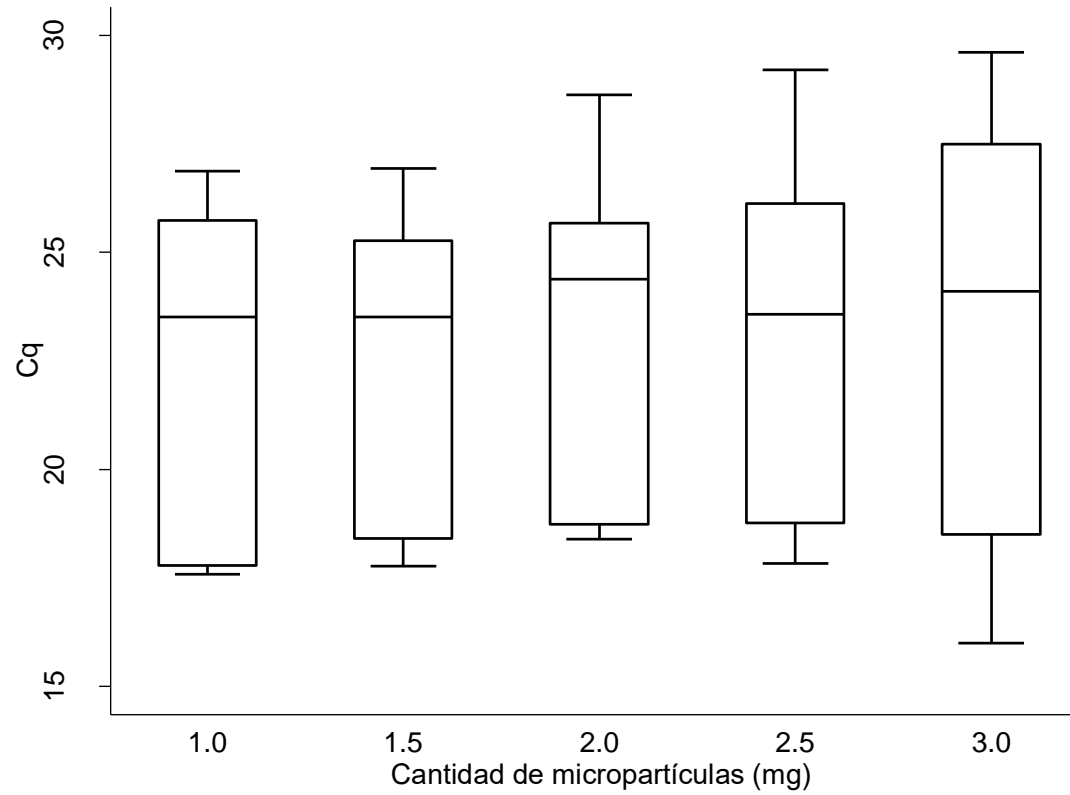


Figura 9. Efecto de la cantidad de micropartículas sobre la cantidad de ADN capturado.
No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p = 0.9075$).

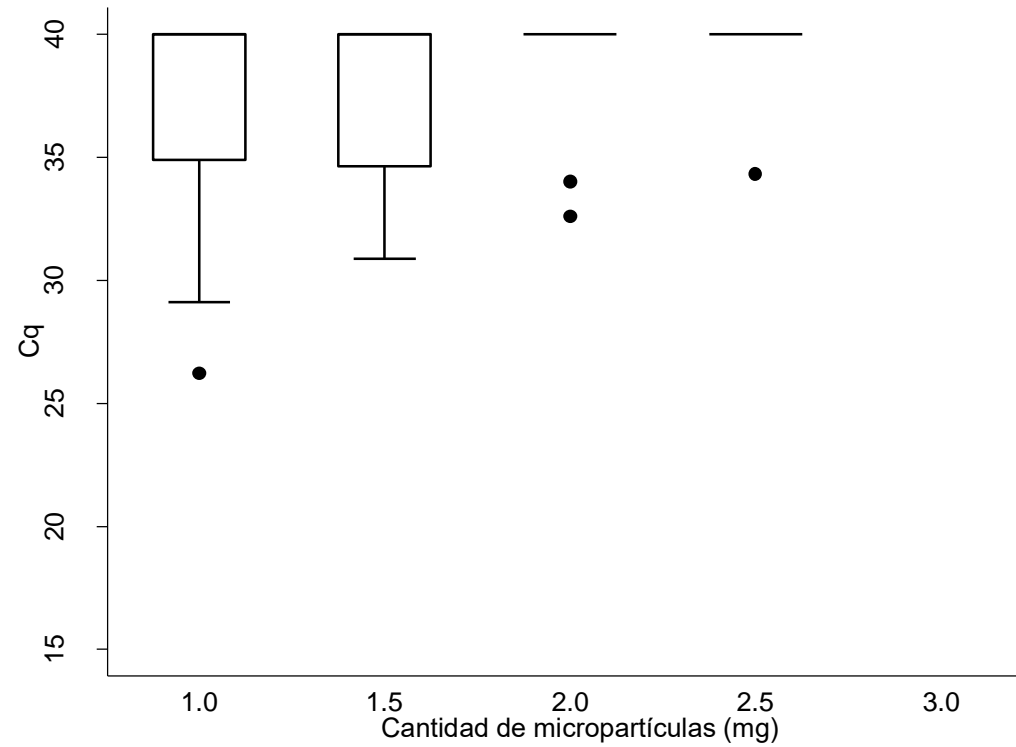


Figura 10. Efecto de la cantidad de micropartículas sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante. No hubo amplificación con 3 mg. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal- Wallis, $p = 0.3022$).

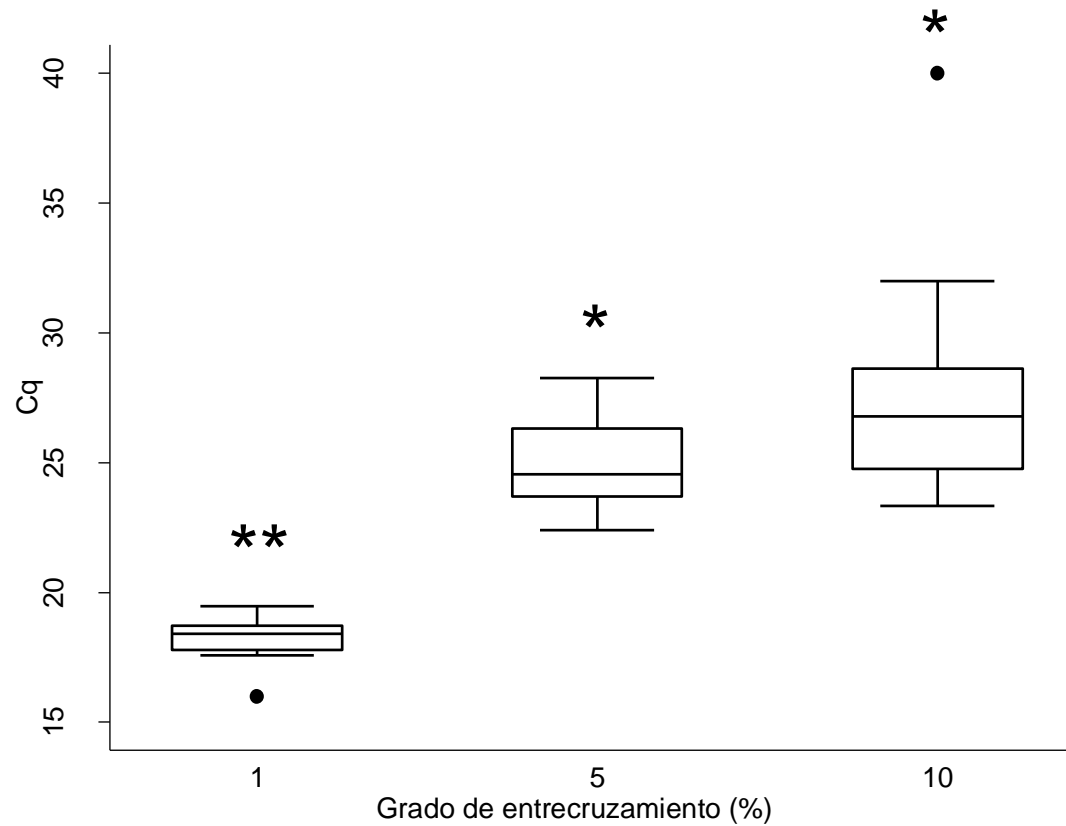


Figura 11. Efecto del grado de entrecruzamiento sobre la cantidad de ADN capturado.
 **: Kruskal-Wallis entre pares de grupos 1% y 5% ($p = 0.0001$); grupos 1% y 10% ($p=0.0001$);
 y grupos 5% y 10% ($p = 0.01$)

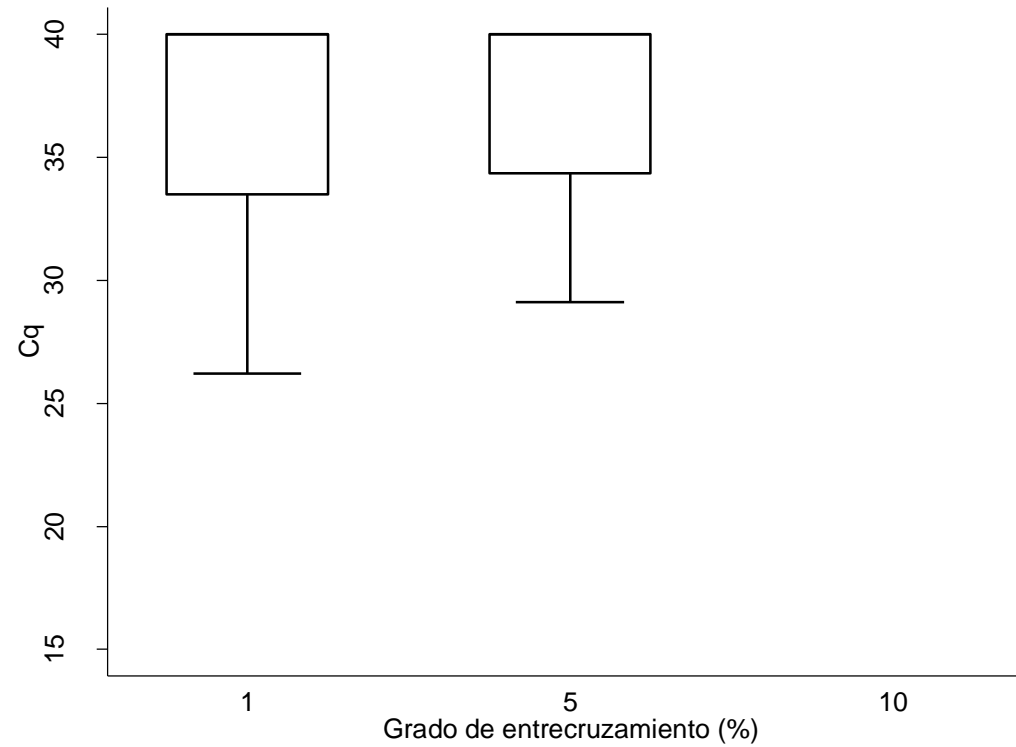


Figura 12. Efecto del grado de entrecruzamiento del quitosano sobre la cantidad de ADN liberado en el sobrenadante.

No hubo amplificación con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 10%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal- Wallis, $p = 0.0641$).

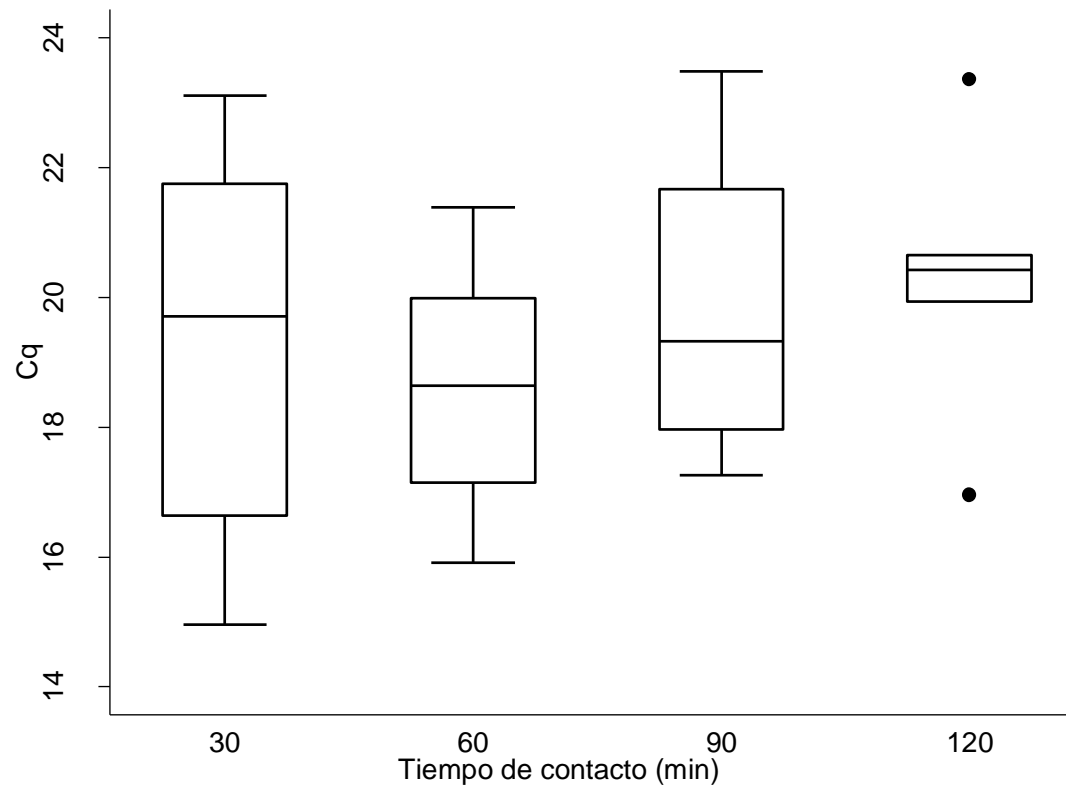


Figura 13. Efecto del tiempo de contacto entre la micropartícula de quitosano entrecruzado al 1% y el ADN sobre la cantidad de ADN capturado.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p=0.7325$)

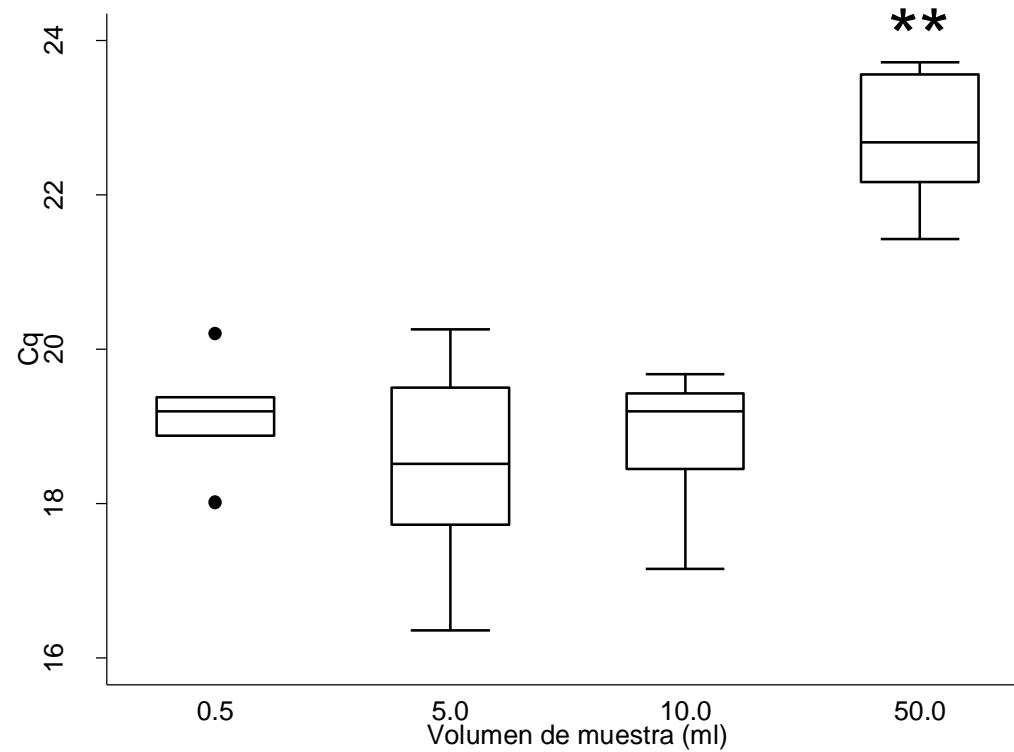


Figura 14. Efecto del volumen de muestra sobre la cantidad de ADN capturado.

******: Kruskal-Wallis entre pares de grupos 0.5 y 50.0 ($p = 0.0039$); grupos 5.0 y 50.0 ($p=0.0039$); y grupos 10.0 y 50.0 ($p = 0.039$).

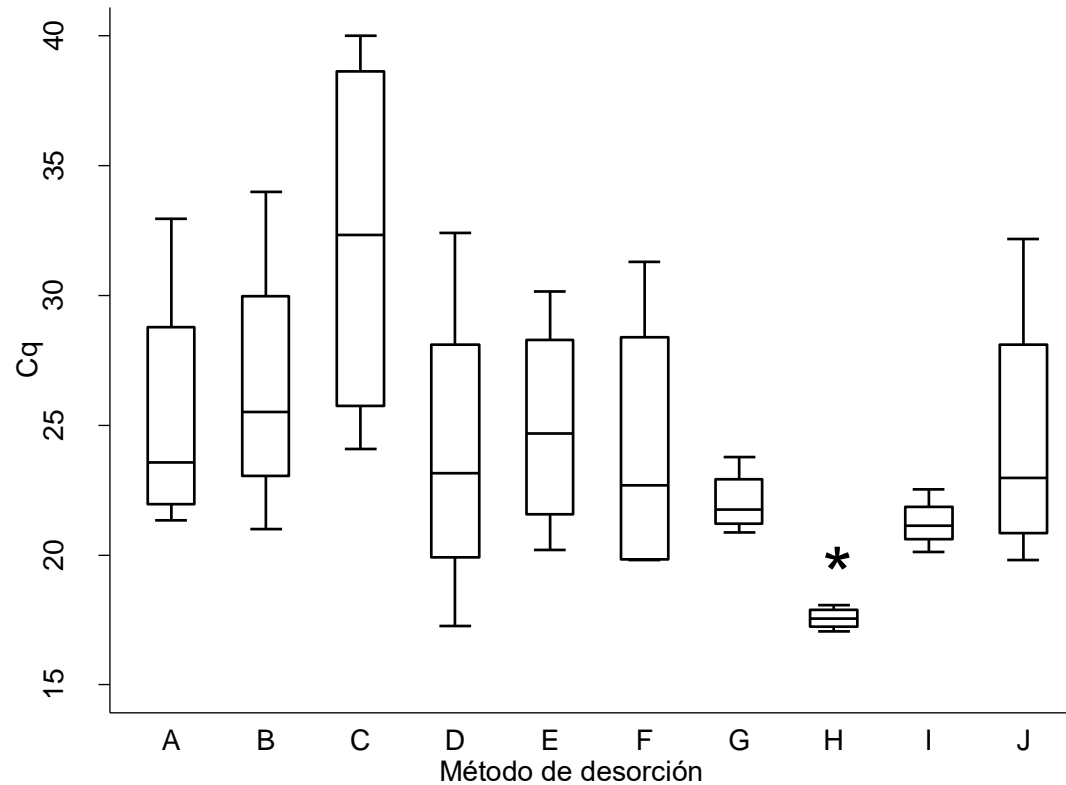


Figura 15. Determinación del método de desorción del ADN en PBS.

A = 60 °C de temperatura; B = 80°C de temperatura; C=100°C de temperatura; D= 5 min de sonicación.; E= 10 min de sonicación.; F= 15 min de sonicación.; G= Tampón de lisis más SDS al 10%; G= Tampón CTAB; I= Chelex al 10%; J= Fenol-cloroformo (tubo control). **: Kruskal-Wallis entre pares de grupos: A y H ($p=0.02$); B y H ($p=0.02$); C y H ($p=0.02$); D y H ($p=0.1489$); E y H ($p=0.02$); F y H ($p=0.02$); G y H ($p=0.02$); I y H ($p=0.02$); J y H ($p=0.02$).

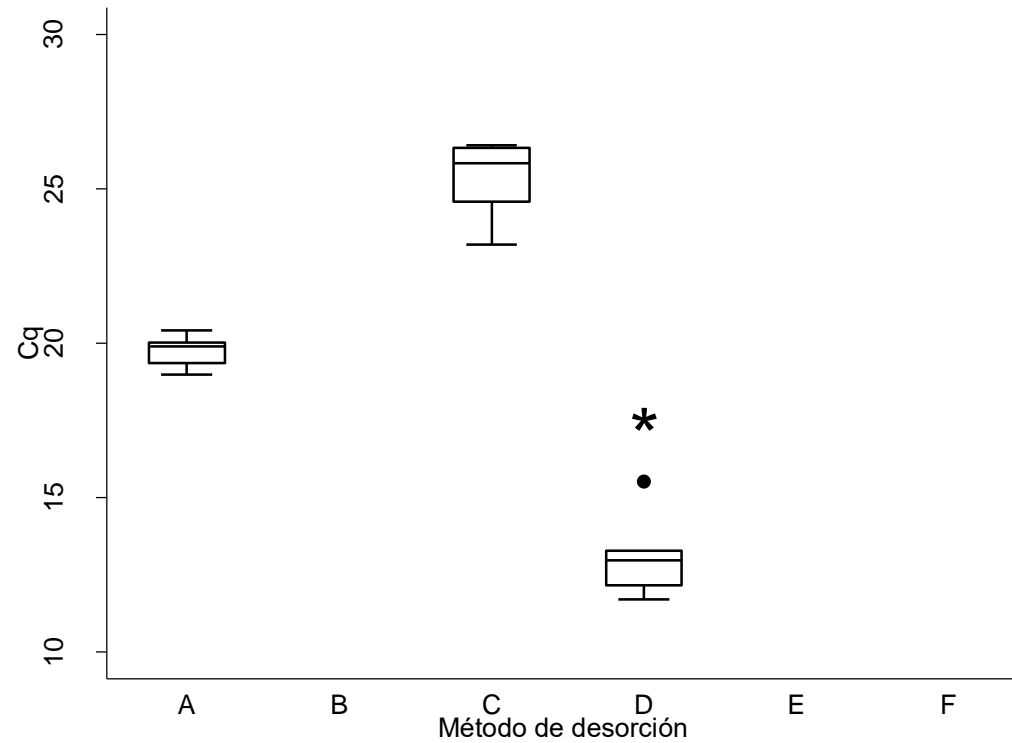


Figura 16. Determinación del método de desorción del ADN en orina.

A= agua; B= PBS; C=EDTA; D= EDTA - SDS; E= TE - SDS; F= Fenol-cloroformo (tubo control). Después de la adición del agua, PBS, EDTA, EDTA - SDS y TE - SDS, se hirvieron las micropartículas con el ADN, y finalmente, este fue purificado con fenol-cloroformo. * : Kruskal-Wallis entre pares de grupos: D y A ($p = 0.0495$); grupos D y B ($p = 0.0495$); D y C ($p = 0.0495$); grupos D y E ($p = 0.0495$); D y F ($p = 0.0495$).

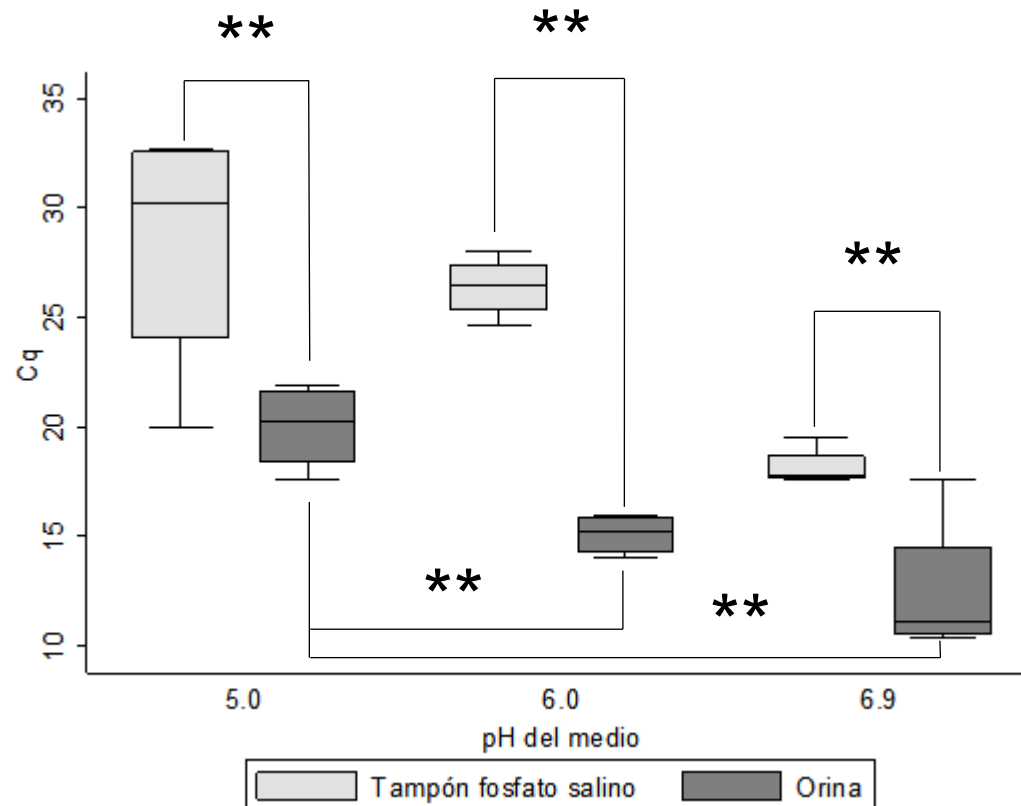


Figura 17. Efecto de la modificación del pH de la orina sobre la adsorción de ADN por micropartículas de quitosano entrecruzado al 1%.

*Orina ** : Kruskal – Wallis entre pares de grupos 5.0 y 6.0 ($p = 0.0209$); 5.0 y 6.9 ($p = 0.0209$). pH 5.0 ** Kruskal – Wallis entre pares de grupos PBS y orina ($p = 0.0833$) ; pH 6.0 ** Kruskal – Wallis entre pares de grupos PBS y orina ($p = 0.0209$) ; pH 6.9 ** Kruskal – Wallis entre pares de grupos PBS y orina ($p = 0.0209$).*

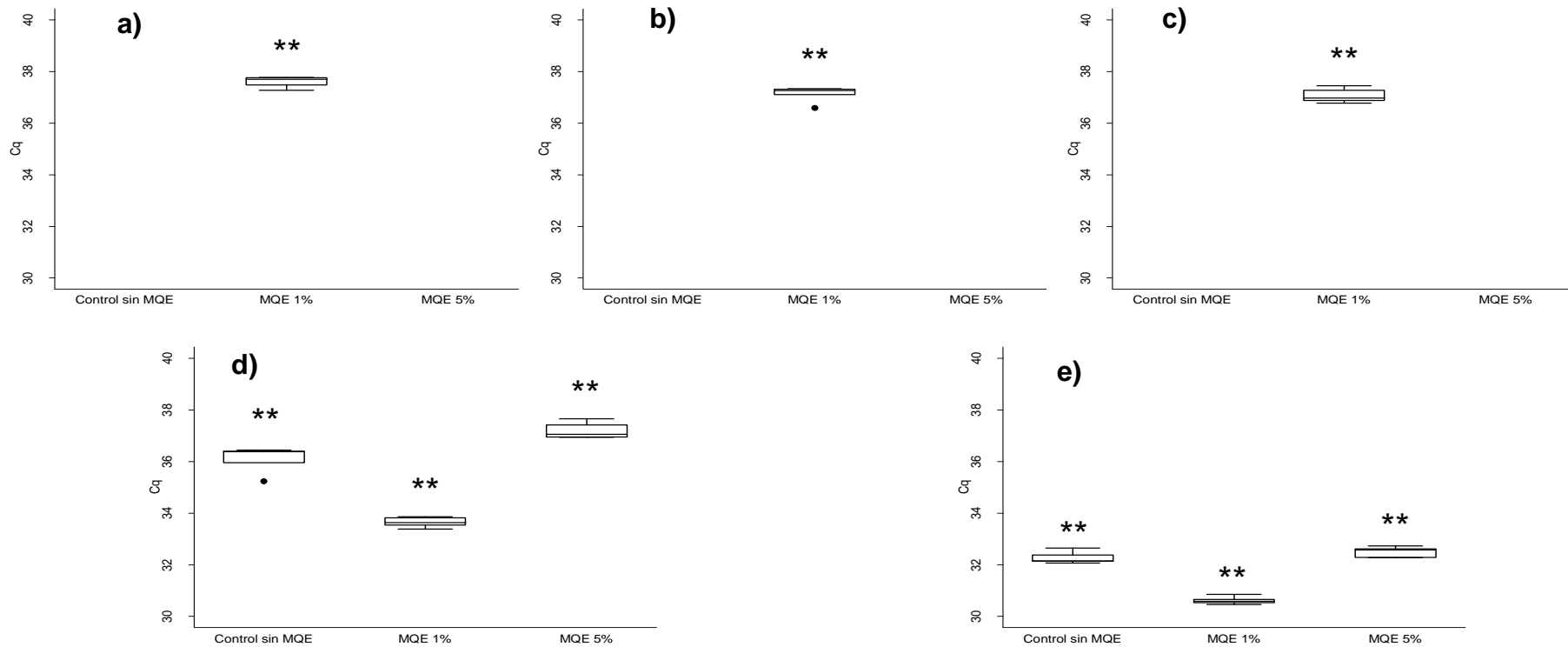


Figura 18. Evaluación de la capacidad de concentración de las micropartículas de quitosano entrecruzado en orina.

Número de copias de plásmido añadidas a la orina: a) 1; b) 2; c) 3; d) 4 y e) 5. MQE: Micropartículas de quitosano entrecruzado; MQE 1%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 1% y MQE 5%: Micropartículas de quitosano entrecruzado al 5%. No se observó amplificación en a, b y c con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 5% y los tubos controles sin micropartículas (Cq's > 40). No se muestran los resultados obtenidos con las micropartículas de quitosano entrecruzado al 10% ya que no se observó amplificación con ninguna de las cantidades de plásmido añadidos (Cq's > 40). **: Kruskal Wallis entre pares de grupos, a) MQE 1% y control sin MQE ($p = 0.0547$), MQE1% y MQE5% ($p=0.0547$); b) MQE 1% y control sin MQE ($p = 0.039$), MQE1% y MQE5% ($p=0.039$); c) MQE 1% y control sin MQE ($p = 0.039$), MQE1% y MQE5% ($p=0.039$); d) MQE 1% y control sin MQE ($p = 0.039$), MQE 5% y control sin MQE ($p=0.039$), MQE1% y MQE5% ($p=0.039$); e) MQE 1% y control sin MQE ($p = 0.039$), MQE 5% y control sin MQE ($p=0.039$), MQE1% y MQE5% ($p=0.039$).

Referencias

- Akbuga, J., Ozbas-Turan, S. & Ekentok. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers*. New York: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
- Aryeetey, I. A., Essien-Baidoo, S., Larbe, I. A., Ahmed, K., Amoah, A. S., Obeng, B. B., Van Lieshout, Lisette., Yazdanbakhsh, Maria., Boakye, Daniel A., Verweij, J. J. Molecular diagnosis of schistosoma infections in urine samples of school children in Ghana. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene*. 2013; 88(6): 1028-1031.
- Bal, A., Gravekamp, C., Hartskeerl, R., De Meza-Brewster, J., Korver, H. & Terpstra, W. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32(8): 1894-1898.
- Behzad-Behbahani, A., Klapper, P., Vallely, P., Cleator, G. & Khoo, S. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *Journal of Clinical Virology*. 2004; 29(4): 224-229.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O., Peppas, N. & Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004; 57(1): 19-34.
- Bhardwaj, A., Sivapathasundaram, N., Yusof, M., Minghat, A., Swe, K. & Sinha, N. The prevalence of accidental needle stick injury and their reporting among healthcare workers in orthopaedic wards in General Hospital Melaka, Malaysia. *Malaysia Orthopaedic Journal*. 2014; 8(2): 6-13.
- Bowman, K. & Leong, K. W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(2): 117-128.
- Bravo-Anaya, L. M., Soltero, J. A. & Rinaudo, M. DNA/chitosan electrostatic complex. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016; 88: 345-353.
- Brinkman, J. A., Jones, W. E., Gaffga, A. M., Sanders, J. A., Chaturvedi, A. K., Slavinsky III, J., Clayton, J.L., Dumestre, J., Hagensee, M. E. Detection of Human Papillomavirus DNA in urine specimens from Human Immunodeficiency Virus-positive women. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(9): 3155-3161.
- Brown, R. B. & Audet, J. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*. 2008; 5(Suppl 2): S131-S138.
- Buppan, P., Putaporntip, C., Pattanawong, U., Seethamchai, S. & Jongwutiwes, S. Comparative detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. *Malaria Journal*. 2010; 9: 72.

- Buranachai, T., Praphairaksit, N. & Muangsin, N. Chitosan/polyethylene glycol beads crosslinked with tripolyphosphate and glutaraldehyde for gastrointestinal drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2010; 11(3): 1128-1137.
- Cannas, A., Goletti, D., Girardi, E., Chiacchio, T., Calvo, L., Cuzzi, G., Piacentini, M., Melkonyan, H., Umansky, S. R., Lauria, F. N., Ippolito G., Tomei, L. D. Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2008; 12(2): 146-151.
- Cao, W., Easley, C. J., Ferrance, J. P. & Landers, J. P. Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system. *Analytical Chemistry*. 2006; 78(20): 7222-7228.
- Cavallotti, D., Casilla, G., Piantelli, G., Verrotti, C., Fieni, S. & Gramellini, D. Early complications of prenatal invasive diagnostics: perspective analysis. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*. 2004; 75(Suppl 1): 23-6.
- Chang, R. & Goldsby, K. A. *Chemistry*. New York: McGraw Hill Education; 2012.
- Choi, C., Nam, J.-P., & Nah, J.-W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016; 33: 1-10.
- Csaba, N., Köping-Höggård, M. & Alonso, M. J. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009; 382(1-2): 205-214.
- Díaz, C., Jacinto, C., Medina, R. & Navarro, A. Estudio de la biosorción de cromo (VI) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas . *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2013; 79(4): 304-318.
- Echavarria, M., Forman, M., Ticehurst, J., Dumler, J. S. & Charache, P. PCR method for detection of Adenovirus in urine of healthy and Human Immunodeficiency Virus-infected Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(11): 3323-3326.
- El Bali, L., Diman, A., Bernard, A., Roosens, N. H. & De Keersmaecker, S. C. Comparative study of seven commercial kits for human DNA extraction from urine samples suitable for DNA biomarker-based public health studies. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2014; 25(4): 96-110.
- Enders, G., Bäder, U., Lindemann, L., Schalasta, G. & Daiminger, A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenatal diagnosis*. 2001; 21(5): 362-77.
- Fisa, R., Riera, C., López-Chejade, P., Molina, I., Gállego, M., Falcó, V., Ribera, E., Portús, M. Leishmania infantum DNA detection in urine from patients with visceral leishmaniasis and after treatment control. *The American Journal of Tropical Medicine*. 2008; 78(5): 741-744.
- Fischbach, F. & Dunning III, M. B. *Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.

- Gathak, S., Muthukumaran, R. B. & Nachimuthu, S. K. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2013; 24(4): 224-231.
- Ghayour, N. Z., Oormazdi, H., Akhlaghi, L., Meamar, A., Raeisi, A., Rampisheh, Z., Nateghpour, M., Razmjou, E. Mitochondrial PCR-based malaria detection in saliva and urine of symptomatic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014; 108(6): 358-62.
- Green, C., Huggett, J. F., Talbot, E., Mwaba, P., Reither, K. & Zumla, A. I. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009; 9(8): 505-511.
- Gupta, K. & Jabrail, F. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydrate Research*. 2006; 341(6): 744-756.
- Heydari, A. A., Danesh, M. R. & Ghazvini, K. Urine PCR evaluation to diagnose pulmonary tuberculosis. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014; 7(3): e9311.
- Holman, C. J., van Burik, J.-A. H., Hinrichs, S. H., & Balfour Jr, H. H. Specific detection of Human BK Polyomavirus in urine samples of immunocompromised patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2003; 10(1): 66-69.
- Hourfar, M. K., Michelsen, U., Schmidt, M., Berger, A., Seifried, E. & Roth, W. High-throughput purification of viral RNA based on novel aqueous chemistry for nucleic acid isolation. *Clinical Chemistry*. 2005; 51(7): 1217-1222.
- Il'ina, A. & Varlamov, V. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005; 41(1): 9-16.
- Illanes, S., Denbow, M. L., Smith, R. P., Overton, T., Soothill, P. & Finning, K. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. *Prenatal diagnosis*. 2006; 26(13): 1216-8.
- Ishihara, M., Obara, K., Nakamura, S., Fujita, M., Masuoka, K., Kanatani, Y., Takase, B., Hattori, H., Morimoto, Y., Ishihara, M., Maehara, T., Kikuchi, M. Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *Journal of Artificial Organs*. 2006; 9(1): 8-16.
- Ito, K., Minamiura, N. & Yamamoto, T. Human urine DNase I: immunological identity with human pancreatic DNase I, and enzymic and proteochemical properties of the enzyme. *Journal of Biochemistry*. 1984; 95(5): 1399-1406.
- Jameela, S. & Jayakrishnan, A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*. 1995; 16(10): 769-775.
- Javadi A., Shamaei, M., Ziazi, L. M., Pourabedollah, M., Dorudinia, A., Seyedmehdi, S. M. & Karimi, S. Qualification study of two genomic DNA extraction methods in

- different clinical samples. *Tanaffos: Journal of Respiratory Disease, Thoracic Surgery, Intensive Care and Tuberculosis*. 2014; 13(4): 41-47.
- Kawai, S., Sato, M., Kato-Hayashi, N., Kishi, H., Huffman, M. A., Maeno, Y., Culleton, R., Nakazawa, S. Detection of Plasmodium knowlesi DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malaria Journal*. 2014; 13: 373.
- Karni, M., Zidon, D., Polak, P., Zalevsky, Z., Shefi, O. Thermal degradation of DNA. *DNA and Cell Biology*. 2013; 32(6): 298-301.
- Kean, T., Roth, S. & Thanou, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 2005; 103(3): 643-653.
- Khan, G., Kangro, H. O., Coates, P. J. & Heath, R. B. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*. 1991; 44(5): 360-365.
- Khosravinia, H. & Ramesha, K. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology*. 2007; 6(3): 184-187.
- Lárez, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2003; 4(2): 91-109.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N. & Buschmann, M. D. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*. 2006; 27(27): 4815-4824.
- Lazzarotto, T., Guerra, B., Spezzacatena, P., Varani, S., Gabrielli, L., Pradelli, P., Rumpianesi, F., Banzi, C., Bovicelli, L., Landini, M. P. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 21(5): 3540-3544.
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Santl-Temkiv, T. & Jorgensen, B. B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 476.
- Levett, P. N., Morey, R. E., Galloway, R. L., Turner, D. E., Steigerwalt, A. G. & Mayer, L. W. Detection of pathogenic leptospire by real time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54(Pt 1): 45-49.
- Liu, W., Sun, S., Cao, Z., Zhang, X., Yao, K., Lu, W. W. & Luk, K. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. *Biomaterials*. 2005; 26(15): 2705-2711.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. New York: Editorial Médica Panamericana; 2000.

- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M. & Buschmann, M. D. New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. *Biomacromolecules*. 2009; 10(6): 1490-1499.
- Mahaninia, M. H. & Wilson, L. D. Cross-linked chitosan beads for phosphate removal from aqueous solution. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015; 133(5): 42949-42958.
- Mharakurwa, S., Simoloka, C., Thuma, P. E., Shiff, C. J. & Sullivan, D. J. PCR detection of plasmodium falciparum in human urine and saliva samples. *Malaria Journal*. 2006; 5: 103.
- Minagawa, T., Okamura, Y., Shigemasa, Y., Minami, S. & Okamoto, Y. Effect of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 2007; 67(4): 640-644.
- Mourya, V. K. & Inamdar, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009; 20(5): 1057.
- Navarro, A. E., Manrique, Á., Iparraguirre, E., Díaz, C., Jacinto, C., Cuizano, N. & Llanos, B. P. Síntesis y caracterización de quitosano cuaternario nativo y reticulado en polvo para su aplicación en la adsorción de aniones metálicos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2010; 76(4): 313-321.
- Nayak, U. Y., Gopal, S., Mutalik, S., Ranjith, A. K., Reddy, M. S., Gupta, P. & Udupa, N. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. *Journal of Microencapsulation*. 2009; 26(3): 214-222.
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M. & Buschmann, M. D. Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular Biotechnology*. 2010; 46(2): 182-196.
- Ofokansi, K., Kenechukwu, F., Isah, A. & Okigbo, E. Formulation and evaluation of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microparticles for the delivery of ibuprofen. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013; 12(1): 19-25.
- Pandit, K. R., Nanayakkara, I. A., Cao, W. & Raghavan, S. R. Capture and direct amplification of DNA on chitosan microparticles in a single PCR-optimal solution. *Analytical Chemistry*. 2015; 87(21): 11022-11029.
- Peter, J., Green, C., Hoelscher, M., Mwaba, P., Zumla, A. & Dheda, K. Urine for the diagnosis of tuberculosis: current approaches, clinical applicability, and new development. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2010; 16(3): 262-270.
- Putaporntip, C., Buppan, P. & Jongwutiwes, S. Improved performance with saliva and urine as alternative DNA sources for malaria diagnosis by mitochondrial DNA-based PCR assays. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17(10): 1484-1491.
- Raafat, D., & Sahl, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential: a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*. 2009; 2(2): 186-201.

- Riva, R., Ragelle, H., des Rieux, A., Duhem, N., Jérôme, C. & Prétat, V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. *Advances in Polymer Science*. 2011; 244: 19-44.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sato, T., Ishii, T. & Yoshio, O. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*. 2001; 22(15): 2075-2080.
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hajar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., Monje Rumi, M., Levi, J. E., Ramirez, J. D., Zorrilla, P., Flores, M., Jercic, M. I., Crisante, G., Añez, N., De Castro, A. M., Gonzalez, C. I., Acosta Viana, K., Yachelini, P., Torrico, F., Robello, C., Diosque, P., Triana Chavez, O., Aznar, C., Russomando, G., Büscher, P., Assal, A., Guhl, F., Sosa Estani, S., DaSilva, A., Britto, C., Luquetti, A., Ladzins, J. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5(1): e931.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012; 113(5): 1014-1026.
- Shu, X. & Zhu, K. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 233(1-2): 217-225.
- Silva, M. A., Medeiros, Z., Soares, C. R., Silva, E. D., Miranda-Filho, D. B. & Melo, F. L. A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014; 47(2): 193-7.
- Smith, M., Nazario, B., Bhargava, H. & Cassoobhoy, A [Página principal en internet]. WebMD [página 1]. Obtenido de: <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/urine-test?page=3>
- Su, Y.-H., Wang, M., Block, T. M., Landt, O., Botezatu, I., Serdyuk, O., Lichtenstein, A., Melkonyan, H., Tomei, L. D., Umansky, S. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 a; 1022: 81-89.
- Su, Y.-H., Wang, M., Brenner, D. E., Ng, A., Melkonyan, H., Umansky, S., Syngal, S., Block, T. M. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2004 b; 6(2): 101-107.
- Su, Y.-H., Wang, M., Brenner, D. E., Norton, P. A. & Block, T. M. Detection of mutated K-ras DNA in urine, plasma, and serum of patients with colorectal carcinoma or

- adenomatous polyps. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137: 197-206.
- Takigawa, T. & Endo, Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *Journal of Occupational Health*. 2006; 48(2): 75-87.
- Tan, S. C. & Yiap, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009; (1110-7243): 574398.
- Tharanathana, R. N. & Kittur, F. S. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*. 2003; 43(1): 61-87.
- Thermo Fisher Scientific [Página principal en internet]. DNA Copy number and dilution calculator [página 1]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>
- Umansky, S. R. & Tomei, L. D. Transrenal DNA testing: progress and perspectives. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2006; 6(2): 153-163.
- Vimal, S., Majeed, S. A., Taju, G., Nambi, K., Raj, N. S., Madan, N., Farook, M. A., Rajkumar, T., Gopinath, D., Sahul Hameed, A. S. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: Preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. *Acta Tropica*. 2013; 128(3): 486-493.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 2013; 54(3): 134-139.
- Yang, L., Wang, K., Li, H., Denstedt, J. & Cadieux, P. The influence of urinary pH on antibiotic efficacy against bacterial uropathogens. *Urology*. 2012; 84(3): 731.
- Yogendra, N. U., Shavi, G., Mutalik, S., Ranjith, A. K., Reddy, M. S., Gupta, P. & Udupa, N. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. *Journal of Microencapsulation*. 2009; 26(3): 214-222.
- Zhang, J., Tong, K.-L., Li, P. K., Chan, A. Y., Yeung, C.-K., Pang, C. C., Wong, T. Y., Lee, K. C., Lo, Y. D. Presence of donor- and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism. *Clinical Chemistry*. 1999; 45(10): 1741-1746.
- Zhao, X., Yu, S.-B., Wu, F.-L., Mao, Z.-B. & Yu, C.-L. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2006; 112(2): 223-228.