

Estandarización de un sistema PCR multiplex para la determinación molecular de infertilidad masculina idiopática

Licda. Lisbeth Rojas¹, Mg Scs. Militza Quintero¹, Dr. Jhon Cruz¹, Licda. Natasha Blanco¹, Mg Scs. Marisé Solórzano¹, Mg Scs. Marco Bastidas¹, Dr. Juan Puig¹.

RESUMEN

Objetivo: Diseñar y optimizar sistemas de reacción en cadena de polimerasa individuales y multiplex para la detección de microdeleciones de genes asociados a infertilidad masculina en el cromosoma Y.

Métodos: Se estandarizaron sistemas de reacción en cadena de polimerasa multiplex utilizando oligonucleótidos STS (Sequence Target Site) específicos asociados a infertilidad masculina, con previa estandarización de cada par de oligos en reacciones individuales.

Resultados: Se logró estandarizar 7 sistemas individuales y 2 sistemas multiplex de alta sensibilidad y especificidad que pueden indicar la presencia o ausencia de un gen, en este caso, son utilizados para indicar la mutación por microdelección de algún fragmento específico de Yq que conlleva a la inactivación de un gen.

Conclusiones: Se pudo realizar la estandarización de dos sistemas multiplex para el análisis de microdeleciones del cromosoma Y asociados a infertilidad masculina como una herramienta molecular para el diagnóstico rápido y preciso de esta patología. El amplificado del marcador RBM1 no pudo ser incluido en ninguna de los dos multiplex estandarizados, no obstante, se sugiere el estudio de otros marcadores de infertilidad masculina que puedan ser incluidos en la estandarización de nuevos multiplex.

Palabras clave: Infertilidad Masculina. Microdeleciones. Cromosoma Y. Reacción en cadena de polimerasa. Sequence Target Site.

SUMMARY

Objective: To design and optimize individual systems and multiplex polymerase chain reaction for detection of microdeletions of male infertility associated genes on the Y chromosome.

Methods: multiplex polymerase chain reaction systems were standardized using oligonucleotides STS (Sequence Target Site) specific to male infertility associated with prior standardization of each pair of oligos in individual reactions.

Results: It was possible to standardize 7 individual systems and two multiplex systems high sensitivity and specificity that may indicate the presence or absence of a gene, in this case, are used to indicate the mutation microdeletion of a specific fragment Yq leading to the inactivation of a gene.

Conclusions: standardization could make two multiplex systems for the analysis of microdeletions of the Y chromosome associated with male infertility as a molecular tool for rapid and accurate diagnosis of this disease. The amplified RBM1 marker could not be included in either standard multiplex, despite the studies of other markers of male infertility is suggested to be included in new in the standardization of new multiplexes.

Keywords: Male Infertility, Microdeletions, Y, Chromosome, PCR, STS.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la infertilidad se ha convertido en un grave problema de salud pública a escala mundial, que ha aumentado de manera alarmante durante las

décadas recientes (1). En el pasado, todos los esfuerzos se centraban en el estudio y tratamiento de la mujer, aproximadamente el 25 % de los casos de infertilidad de la pareja se deben exclusivamente a un problema femenino, un 30 % a una combinación de factores masculinos y femeninos y un 45 % al factor masculino (2), destacando que han cobrado gran relevancia los problemas de fertilidad principalmente en hombres. Esta patología está relacionada con la disminución del

¹LABIOMEX, Laboratorio de Biología y Medicina Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

número de espermatozoides viables por eyaculación, lo cual trae como consecuencia una alteración de la capacidad de fecundación (3).

El cromosoma Y es el cromosoma más pequeño del genoma humano y surge en la evolución con bastante posterioridad (4) gracias a una mutación que provocó la pérdida de uno de los segmentos del cromosoma X que dio lugar a la forma estructural del cromosoma Y (5). Este cromosoma se encuentra constituido básicamente por el centrómero que divide al cromosoma en un brazo corto o brazo p (Yp) y un brazo largo o brazo q (Yq) (6). En el brazo largo (Yq) se encuentran los genes que están asociados a infertilidad masculina en donde ocurren mutaciones por microdeleciones que conducen a alteraciones en los mecanismos de espermatogénesis y por lo tanto a infertilidad. Las microdeleciones en el cromosoma Y suponen la causa genética molecular más importante de infertilidad masculina (7). Los factores genéticos juegan un papel crucial en aproximadamente el 10 % de los casos de infertilidad masculina debido a que el espermatozoides humano es producido a través de un proceso complejo de espermatogénesis que involucran la expresión e interacción de muchos genes (8). El análisis de las secuencias de genes específicos en el cromosoma Y permite establecer los tipos de alteraciones del ADN que conllevan al desarrollo de patologías relacionadas con la infertilidad, para ello es necesario el diseño de técnicas moleculares para la detección de mutaciones en el cromosoma Y (9).

Tiepolo y col. (10), en 1976, fueron los primeros en plantear una correlación entre las deleciones del cromosoma Y y la infertilidad masculina; postularon la existencia de grupos de genes definidos como factores de azoospermia (AZF) en Yq y sugirieron, de esta manera, la existencia de tres regiones no solapantes que podrían ser susceptibles a pérdidas de segmentos o deleciones. Tales loci de espermatogénesis fueron denominados AZFa, AZFb y AZFc (11). En cada una de estas regiones se encuentran genes asociados con infertilidad masculina, por lo que la ausencia o mutación de algunos de ellos, conduce a la manifestación de esta patología. La técnica de referencia para el diagnóstico de microdeleciones en el cromosoma Y consiste en la reacción en cadena de polimerasa (PCR)-Multiplex STS-Específica de alta sensibilidad, especificidad y bajo costo que además permite obtener información de varios loci espermatogénicos en una misma reacción (12). Esta

técnica, basada en el uso de marcadores moleculares específicos de tipo STS (*Sequence Target Site*, por sus siglas en inglés), permite reconocer segmentos de ADN con ubicación identificable en un cromosoma, cuya herencia puede ser rastreada. De hecho, los STS pueden indicar la presencia o ausencia de un gen (13). En este caso, son usados para indicar la microdelección o ausencia de algún fragmento específico en cualquiera de las regiones AZF y de allí, la importancia de estandarizar métodos de detección de mutaciones por microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y que estén asociados a infertilidad masculina idiopática. Es muy importante destacar que este tipo de estudios ha sido muy bien desarrollado en otros países como China, Tailandia, India, Italia, Colombia, Alemania, Singapur, pero son muy pocos los datos publicados en Venezuela (14), lo que justifica la presente investigación puesto que no existen suficientes datos registrados al respecto.

En el presente estudio se llevó a cabo la estandarización de siete sistemas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) individuales que corresponden a siete marcadores STS localizados en Yq. En este caso, se optimizaron las condiciones de reacción y se amplificaron 2 genes por cada región, mediante el uso de oligonucleótidos específicos previamente diseñados por Teng y col. (15). Posteriormente se continuó con la estandarización de dos sistemas multiplex con el fin de permitir la amplificación simultánea de varias regiones en una misma reacción. La estrategia basada en PCR-Multiplex para la determinación de microdeleciones consiste en que un hombre fértil debe presentar la amplificación completa de los marcadores estudiados, mientras que, en un hombre con microdeleciones, se observa la ausencia de uno o varios marcadores (16).

MÉTODOS

Se realizó un estudio de estandarización y optimación de los sistemas PCR para la detección de microdeleciones en el cromosoma Y, asociadas a la infertilidad masculina. Se recolectaron 50 muestras biológicas de voluntarios fértiles para la estandarización de los sistemas de PCR. Se procesaron tres tipos de muestras en ambos casos: cepillado bucal, semen y plasma seminal. Todos los participantes en el estudio dieron su autorización mediante un consentimiento informado, luego de haberseles explicado claramente el motivo y desarrollo de la investigación. Se consideraron como criterios de

inclusión, que la edad estuviese comprendida entre los 18 y 50 años y que tuviesen descendencia comprobada. Las muestras fueron codificadas y cifradas para proteger la identidad de los participantes y procesadas en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida.

Procesamiento de las muestras, extracción de ADN y verificación de calidad. La extracción y purificación de ADN sigue el protocolo descrito por Sambrook y col. (17), ajustados a las condiciones de laboratorio, usando el método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se utilizaron los oligonucleótidos PC04 y GH20 para evaluar la integridad del ADN obtenido y su factibilidad para ser utilizado en posteriores ensayos de PCR mediante la amplificación de un fragmento de 268 pb del gen de β -globina humana (18), tomando como control positivo una muestra ampliamente usada en el laboratorio para afianzar el funcionamiento de la reacción; el control negativo es la misma mezcla de reacción con agua estéril y sin ADN. Para tales fines se realizó la siguiente mezcla de reacción: tampón de amplificación 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,2 mM, 6,25 pmoles de oligonucleótidos, 20-100 ng de ADN molde, 0,5 U de Taq DNA polimerasa y H₂O Milli-Q para un volumen final de 10 μ l, bajo las siguientes condiciones de amplificación: temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 1 min seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 1 min.

Estandarización de Sistemas de PCR individuales. Se adaptaron 7 sistemas individuales incluyendo el gen SRY como control interno de cromosoma Y; los genes restantes están directamente relacionados con infertilidad masculina. En este caso, se amplificaron 2 genes por cada región mediante el uso de oligonucleótidos específicos, los oligonucleótidos utilizados se presentan en la tabla 1. La composición de la mezcla de reacción de amplificación final estandarizada para cada amplificado se presenta en la tabla 2. La amplificación se realizó en un termo-ciclador marca *Eppendorf* modelo *Nexus* con los programas presentados en la tabla 3.

Estandarización de Sistemas de PCR Multiplex. Luego de verificar el correcto funcionamiento de los STS en sistemas individuales, se diseñaron dos sistemas multiplex (Multi-A y Multi-B) con el fin de permitir la amplificación simultánea de varias regiones en una misma reacción. En cada multiplex están contenidos tres marcadores que fueron ubicados según la longitud del fragmento amplificado y la región a la cual pertenecen (Tabla 1). La mezcla de reacción para cada sistema múltiple se muestra en la tabla 2. El programa de amplificación para los sistemas multiplex se presenta en la tabla 3.

Visualización de amplificadas. Los productos de PCR fueron observados por electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida 6% (19). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 15 min, aproximadamente, y visualizados en un trans-iluminador de luz UV acoplado a un procesador de imágenes marca *UVP-Photo Doc-*

Tabla 1
Oligonucleótidos utilizados para la detección de microdeleciones en el cromosoma Y tomados de Teng y col. (15). Se adecuaron dos mezclas de reacción de forma que cada uno de los marcadores genéticos empleados se amplificaron satisfactoriamente.

Región	Forward Primer	Reverse Primer	STS	Posición	Nº Acceso	(pb)
SY14	GAATATTCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	SRY	11-480	G38356	580
AZFa	ATCGACAAAGTAGTGGTTCC	AGATTCAGTTGCCCCACCAG	DBY	67648-68336	AC004474	710
	GCCTACTACCTGGAGGCTTC	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	SY84	19636-19963	AC004810	320
AZFb	ATGCACTTCAGAGATACCGC	CCTCTCTCCACAAAACCAACA	RBM1	605990-606842	NG_004755	870
	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	SY127	58-331	G11998	284
AZFc	GGGTGTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	SY254	7-386	G38349	410
	GGGATTATCACATATTGCGG	ATGATAGTCGCGTCAGCTGG	BPY2	851-1157	AF000980	400

ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA PCR MULTIPLEX PARA LA DETERMINACIÓN MOLECULAR DE INFERTILIDAD MASCULINA IDIOPÁTICA

Tabla 2

Mezclas de reacción para PCR-individuales y multiplex. Estas mezclas fueron estandarizadas y optimizadas en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental

Componentes		Concentración Final		
Tampón de Amplificación		1X		
MgCl ₂		2 mM		
dNTPs		0,16 mM		
Taq Polimerasa		1,5 unidades		
ADN molde		20-100 ng		
		Individual	Multiplex	
OLIGONUCLEÓTIDO	DBY	6,25 μ moles	7,5 μ moles	Multiplex A
	SY127		5,5 μ moles	
	BPY2		2,5 μ moles	
	SY254		1,5 μ moles	
	SRY	2,5 μ moles	2,5 μ moles	Multiplex B
	SY84		2,5 μ moles	
	RBM1		-	
H2O Milli-Q		Vf = 25 μ l	Vf = 25 μ l	

it Imaging System y procesados con el programa de imágenes Gene Tools 4.0. Se consideró como positivo la presencia de una banda, de modo contrario, se consideró como resultado negativo la ausencia de amplificado del tamaño esperado, luego de tres PCR

Tabla 3.

Programas de PCR ajustados a cada marcador y a cada multiplex, utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Etapas de PCR				
	Des. Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ext. Final
	35 Ciclos				
DBY	94°C 4 min	94°C 30 seg.	62°C 40 seg.	72°C 40 seg.	72°C 2 min
RBM1					
SY254					
SRY					
SY127					
Multiplex A					72°C 4 min
	30 Ciclos				
BPY2	94°C 4 min.	94°C 30 seg.	64°C 20 seg.	72°C 30 seg.	72°C 20 seg.
SY84			64°C 40 seg.		72°C 2 min.
Multiplex B					

consecutivas. Para todos los sistemas estandarizados, se realizaron controles negativos, los cuales no se muestran en las fotografías de los amplificados. En la figura 1 se presenta una composición de las fotografías de los geles de las reacciones individuales, en la figura 2 se presenta una composición de los geles de las dos multiplex estandarizadas.

RESULTADOS

Sistema PCR β -globina: mediante este sistema de amplificación se pudo verificar la calidad del ADN purificado. Para todas las muestras se obtuvo un producto de PCR de 268 pb, lo que indica que dicho ADN es viable e íntegro para ser utilizado en ensayos de PCR posteriores (18).

Optimización de sistemas de PCR individuales: se estandarizaron siete (7) sistemas individuales correspondientes a los marcadores SY84, DBY, BPY2, SY127, SRY, SY254 y RBM1 que a su vez se encuentran en la región AZF del brazo largo del cromosoma Y, asociados directamente con infertilidad masculina. La figura 1 muestra claramente que se amplificaron correctamente cada uno de los marcadores para cada tipo de muestra biológica (cepillados bucales, semen y plasma seminal) bajo las condiciones ya mencionadas. Todas las muestras arrojaron resultados positivos para este ensayo sin inespecíficos que sugirieran artefactos o inhibidores de reacción.

Optimización de sistemas de PCR Multiplex: una vez estandarizadas las reacciones individuales para cada marcador, se procedió a la distribución de todos los STS en dos (2) sistemas multiplex de acuerdo a la ubicación según la región del cromosoma y longitud de los fragmentos, logrando de esta manera la amplificación simultánea de varios marcadores en una misma reacción. En la figura 2 se puede apreciar que ambos sistemas produjeron los amplificados para cada tipo de muestra (cepillados bucales, semen y plasma seminal). Cada sistema multiplex se corresponde

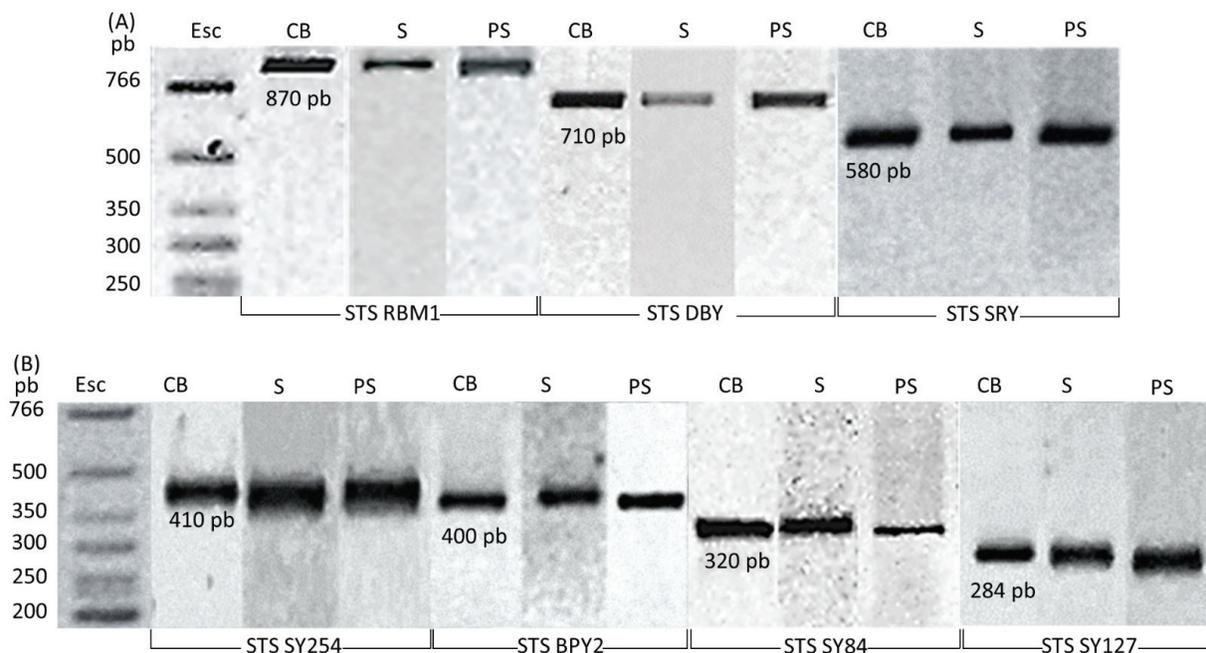


Figura 1.

Amplificación y estandarización individual de siete (7) marcadores moleculares tipo STS localizables en las regiones AZFa, AZFb y AZFc del brazo largo del cromosoma Y a partir de ADN extraído y purificado de muestras de cepillados bucales (CB), semen (S) y plasma seminal (PS) de participantes masculinos voluntarios fértiles. A: Amplificación de los STS RBM1 (870 pb), DBY (710 pb), SRY (580 pb), B: amplificados de los STS de SY254 (410 pb), BPY2 (400 pb), SY84 (320 pb) y SY127 (284 pb). La escalera utilizada es de 50 pb de New England BioLabs. La figura es una composición de varios geles de poliacrilamida corridos en el sistema de electroforesis horizontal (19).

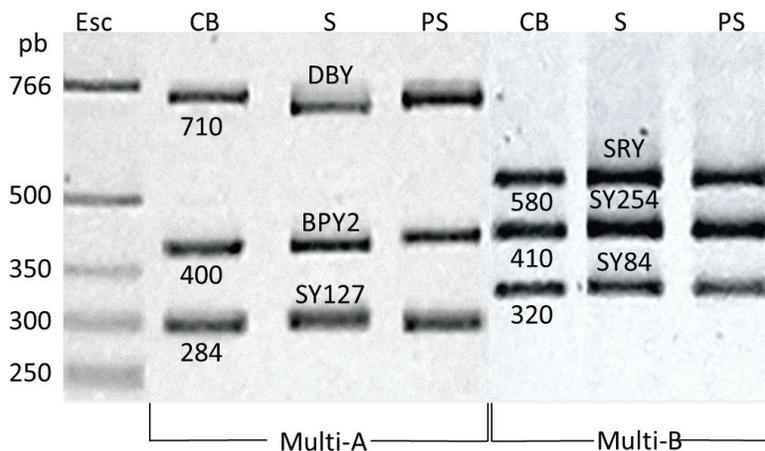


Figura 2.

Estandarización de dos (2) sistemas de PCR Multiplex STS-Específica (Multi-A y Multi-B) a partir de ADN extraído y purificado de muestras de cepillados bucales, semen y plasma seminal de participantes masculinos voluntarios fértiles. La escalera utilizada es de 50 pb de New England BioLabs. La figura es una composición de dos geles de poliacrilamida corridos en el sistema de electroforesis horizontal (19).

exactamente con los productos de amplificación individual, lo que demuestra efectivamente que las reacciones multiplex funcionan en conjunto. El sistema Multi-A contiene los marcadores DBY, BPY2 y SY127. Por su parte, el sistema Multi-B contiene los marcadores SRY, SY254 y SY84. El marcador RBM1 no pudo ser incluido en ninguno de los dos multiplex estandarizados.

DISCUSIÓN

Todas las muestras arrojaron resultados positivos para el ensayo de marcadores individuales sin inespecíficos que sugirieran artefactos o inhibidores de reacción, de esta manera se confirma que cuando se obtengan PCRs con ausencia de bandas durante la detección de mutaciones por microdeleciones, se confirmaría con certeza que es por la ausencia de algún marcador de tipo STS (*Sequence Target Site*) y no un falso negativo.

En la figura 1 se muestran los resultados de la estandarización y optimización de sistemas de PCR individuales para cada marcador STS. En ellos se puede visualizar que fue posible la modificación y ajuste de las condiciones de reacción y amplificación de los marcadores con el uso de oligonucleótidos específicos adaptados de Teng y col. (15). La finalidad de los sistemas individuales constituye la garantía del funcionamiento de los oligonucleótidos por separado, de modo que se asegure el siguiente paso para la combinación de los mismos en una misma mezcla de reacción. Cabe destacar que se seleccionaron dos STS por cada región (Tabla 1) Todas las pruebas moleculares resultaron positivas para cada tipo de muestra tal y como se esperaba, lo que permitió entonces dar el siguiente paso hacia la estandarización de sistemas multiplex. En la figura 2 se evidencia la estandarización de dos sistemas multiplex STS-específicos cuya distribución se realizó con base en la región AZF en la cual se localiza cada marcador y a la longitud del fragmento amplificado. Estos sistemas múltiples se denominaron Multiplex A y Multiplex B, en ellos se observa el funcionamiento adecuado del método establecido. Es importante resaltar que el marcador RBM1 perteneciente a la región AZFb no pudo ser amplificado en ningún sistema multiplex, se presume que esto ocurrió debido a la secuencia de los oligonucleótidos que determinan la sensibilidad y especificidad de la reacción, razón por la cual se optó por dejar a este marcador como una prueba individual, al menos hasta la incorporación de otros marcadores que

también estén relacionados con infertilidad masculina.

Por todo lo anteriormente expuesto, queda demostrado que estos sistemas de PCR pueden ser usados para el diagnóstico molecular de infertilidad masculina idiopática puesto que las microdeleciones en el cromosoma Y suponen la causa genética más importante de esta patología. Adicionalmente, sobre la base del trabajo de Oliva (16), se podrá fácilmente evidenciar que todo hombre fértil mostrará una amplificación completa de todos los marcadores, mientras que en aquel que porte una microdelección, habrá ausencia de uno o varios amplificados. Esto no quiere decir que esta prueba molecular sea más importante que la valoración inicial de la pareja que acude a consulta por problemas de fertilidad (evaluación física, dedicando especial atención al examen de los genitales, pruebas sanguíneas y hormonales dirigidas a la búsqueda de cualquier alteración), a pesar de esto, el análisis del semen sigue siendo un examen imprescindible en el estudio de la fertilidad masculina. Lo que se quiere proyectar es que este tipo de prueba molecular puede ser complementario y constituye una herramienta muy importante, tanto para el médico tratante como para la pareja afectada, debido a que representa una prueba contundente que demuestra la falla en los genes involucrados y que determinan la razón por la cual se presenta la infertilidad; de esta manera, ya no sería más una patología idiopática sino que se establece una causa verdadera de esta condición. Con todo ello se refleja el cumplimiento cabal de los objetivos propuestos para esta investigación, pues se logró el diseño de un instrumento de gran utilidad en la medicina reproductiva debido a la alta sensibilidad, especificidad, rapidez y rentabilidad de los sistemas de diseñados.

Los autores expresan su agradecimiento a todo el personal de LABIOMEX-ULA, a todos los padres que colaboraron voluntariamente con el suministro de muestras biológicas y a todos los médicos que contribuyeron con esta investigación, en especial al Dr. Jesús Alfonso Osuna y la Licda. Ibis Cruz.

REFERENCIAS

1. World Health Organization, WHO. Manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. 2000. WHO. Cambridge: University Press.

2. Nap AW, Van Golde RJ, Tuerlings JH, De Sutter P, Pieters MH, Giltay JC, et al. Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: the role of genetic counseling. *Hum Reprod.* 1999; 14 (8): 2166- 2169.
3. Solari A. *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina.* Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2004.
4. Harris P, Boyd E, Young BD, Ferguson-Smith MA. Determination of DNA content of human chromosomes by flow cytometry. *Cytogenet Cell Genet.* 1986; 41: 14-21.
5. Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human Y-chromosome. *Gene.* 2002; 283 (1-2): 1-10.
6. Ali S, Hasnain SE. Genomics of the human Y-chromosome. 1. Association with male infertility. *Gene.* 2003; 321: 25-37.
7. McElreavey K, Krausz C, Bishop CE. The human Y chromosome and male infertility. *Results Probl Cell Differ.* 2000; 28: 211- 232.
8. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kieseewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996; 5 (7): 933- 943.
9. Silber SJ, Repping S. Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod Update.* 2002; 8 (3): 217-229.
10. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in non- fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genet.* 1976; 34 (2): 119-124.
11. Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lau YF, et al. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. Heidelberg, Germany, April 13-16, 1997. *Cytogenet Cell Genet.* 1997; 79 (1-2): 1-20.
12. Kozina V, Cappallo-Obermann H, Gromoll J, Spiess AN. A one-step real-time multiplex PCR for screening Y-chromosomal microdeletions without downstream amplicon size analysis. *PLoS One.* 2011; 6 (8): e23174.
13. Lledó B, Galán FM, Ten J, Bernabeu R. Microdeleciones en el cromosoma Y e implicaciones en la esterilidad masculina. *Rev. Iberoam. Fert Rep Hum.* 2004; 21(4): 227-235.
14. Fernández-Salgado E, Álvarez-Nava F, Borjas-Fajardo L, Osuna J, Gómez R, Zabala W, et al. Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática. *Invest Clin.* 2006; 47 (4): 395- 403.
15. Teng YN, Lin YH, Tsai YC, Hsu CC, Kuo PL, Lin YM. A simplified gene-specific screen for Y chromosome deletions in infertile men. *Fertil Steril.* 2007; 87(6): 1291-1300.
16. Oliva R. Genes del cromosoma Y. Significado clínico. [Internet] Barcelona: Sabadell Universitat; 2003. [Citado 2016] Disponible en [http://www.sabadelluniversitat.org/SBD%20Universitat%20\(Cat\)/d/ROliva-S8.pdf](http://www.sabadelluniversitat.org/SBD%20Universitat%20(Cat)/d/ROliva-S8.pdf)
17. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2da Edición. CSH, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
18. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn G, Elrich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230 (4732): 1350- 1354.
19. Cruz J, Quintero M, Bastidas M, Quintero W, Hernández D, Duque C, et al. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida en la detección y tipificación del virus de papiloma humano. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2015; 75(3):172-176.