

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico

Jonathan J Magaña^{1,2,a}, María de la Luz Arenas-Sordo^{1,b}, Rocío Gómez^{1,3,c}.

Capillary electrophoresis, a new diagnostic tool

Capillary electrophoresis (CE) may replace many conventional clinical laboratory methods, such as electrophoresis, Southern blotting, sequencing and HPLC (High-performance liquid chromatography). It is an ideal technique due to analytical speed, the possibility of handling great amount of samples, its capacity to separate small molecules according to their size, charge, hydrophobicity and stereo-specificity, its good reproducibility, the use of small amounts of sample and reagents, its low costs and easy handling. The diagnosis of hereditary diseases or the predisposition to polygenic diseases related to specific mutations or polymorphisms, can be carried out with this method. In clinical laboratories, this technique is being used for the analysis of several substrates present in urine or serum and for the diagnosis of some infectious agents. It is also a firsthand tool in forensic medicine for human identification and anthropology (Rev Méd Chile 2009; 137: 946-56).

(Key words: *Electrophoresis, capillary; Forensic medicine; Molecular diagnostic techniques*)

Recibido el 16 de junio, 2008. Aceptado el 6 de octubre, 2008.

¹Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, México D.F. ²Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México D.F. ³Departamento de Variación Genética y Evolución, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

^aQuímico Farmacéutico Biólogo, Doctor en Ciencias con especialidad en Genética y Biología Molecular

^bMédico especialista en Genética, Maestra en Ciencias con especialidad en Genética

^cQuímica Farmacéutica Bióloga, Doctora en Ciencias con especialidad en Biología Celular

La electroforesis capilar (EC) es una herramienta de separación de biomoléculas, que en los últimos años ha tenido gran importancia en

medicina; presenta la versatilidad de poder separar aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, tioles, contaminantes alimenticios, material genético y algunos fármacos importantes en el estudio de diferentes ramas en el área de la salud (diagnósticos molecular y de laboratorio clínico)^{1,2}. Usualmente el análisis de los diferentes analitos puede realizarse en unos minutos; se requiere de pequeñas cantidades de muestra, en el rango de nanolitros, con

Correspondencia a: D. en C. María del Rocío Gómez Ortega. Departamento de Genética. Calzada México Xochimilco. N° 289, Colonia Arenal Guadalupe. C.P.14389 México D.F. Teléfono: (52-55) 59 99 1000 ext.19403 Fax: (5255) 5645 5603. E mail: ro712005@gmail.com

una alta reproducibilidad, y con un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5%.

En los últimos años, a través de los avances en las técnicas de biología molecular y genética humana, se han desarrollado métodos diagnósticos más sencillos, rápidos y sensibles en el análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico). La EC ha contribuido al fortalecimiento de la ciencia y la medicina moderna, permitiendo conocer la secuencia completa del genoma humano³. Debido a las ventajas de la EC, la secuenciación del ADN ha podido automatizarse, lo que permite en la actualidad el conocimiento de las secuencias genómicas del hombre y otras especies con una mayor velocidad y especificidad (15 mil millones de nucleótidos de secuencia en menos de un año)³. En la presente era postgenómica, la velocidad para mejorar el conocimiento de las enfermedades humanas (especialmente las enfermedades multifactoriales), ha aumentado en forma considerable. La información acumulada gracias a la EC comienza a vislumbrar las causas genéticas de muchas enfermedades, fortaleciendo el diagnóstico y reemplazando muchas de las metodologías clásicas para el estudio de la medicina genómica⁴.

FUNDAMENTO

La EC constituye una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro. El interior del capilar se encuentra formado por grupos silanol (Si-OH), los cuales al ser desprotonados (Si-O⁻), elevan considerablemente el potencial de hidrógeno (pH) y favorecen la presencia de analitos específicos⁵. Como en toda electroforesis, los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva, pero la inducción del alto potencial eléctrico permite que: 1) la separación sea más sensible entre las diferentes moléculas (resolución) y 2) el tiempo de análisis sea más corto. Para el caso del ADN, los fragmentos de análisis se encuentran unidos a marcas fluorescentes que son detectadas por un láser de argón (Ar), que las excita a diferentes longitudes de onda (λ), permitiendo el análisis de

múltiples fragmentos al mismo tiempo, que se mueven por la aplicación del campo eléctrico hacia el polo positivo y se separan de acuerdo con la longitud del mismo, de tal forma que los de menor peso molecular viajan más rápido a través del capilar, mientras que los de mayor peso lo hacen más lentamente. Estas características hacen de la EC un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, razones suficientes para ser la herramienta de elección en el análisis bioquímico⁶.

EC EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

Con la secuencia completa de nuestro genoma, la medicina tiene en sus manos una compleja tarea, diversificada en varias áreas con el fin de entender la complejidad de los millones de bases que conforman la genética humana. Una de estas áreas tiene el fin de explorar las causas genéticas de las enfermedades y la susceptibilidad de los individuos a padecerlas⁷. Aunado a este punto, las pruebas diagnósticas genéticas emplean el uso de un gran número de marcadores polimórficos (variaciones específicas en la secuencia del genoma) como son los «microsatélites o STR» (del inglés *Short Tandem Repeat*), los «minisatélites o VNTR» (del inglés *Variable Number of Tandem Repeat*), y los SNP (por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), además de la determinación de mutaciones las cuales están asociadas al desarrollo de muchas enfermedades (Figura 1). Los seres humanos presentan una similitud de 99,9% del genoma, por lo que sólo 0,1% del genoma es altamente variable y hace la diferencia entre un individuo y otro, confiriéndole identidad dentro de la misma especie³. Estas diferencias no son sólo para rasgos físicos, sino también para características genéticas particulares, por las que un individuo puede ser susceptible a desarrollar una enfermedad.

El uso habitual de marcadores polimórficos y mutacionales para el diagnóstico requiere de tecnología automatizada, ya que las técnicas como la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida consumen más tiempo y recursos, son

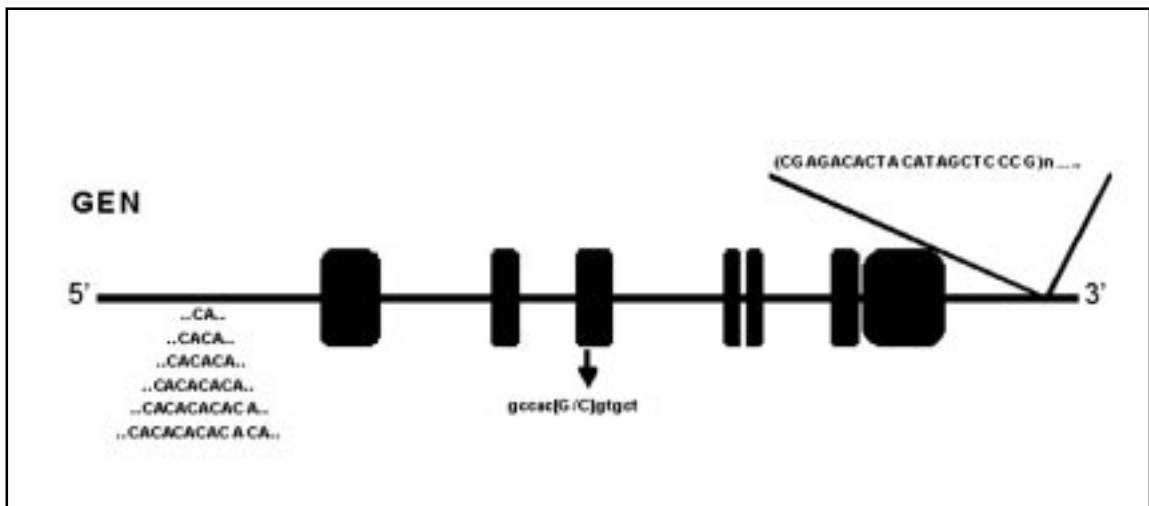


Figura 1. Esquema de la estructura de un gen. Las cajas negras simbolizan los exones que codifican para una proteína. En la región 5' del gen cercana al promotor se esquematiza un marcador tipo microsatélite dinucleótido (CA: citosina-adenina) el cual varía en el número de repeticiones. En el exón 3 se observa un polimorfismo tipo SNP el cual es el cambio de un solo nucleótido: una guanina (G) por una citosina (C). En la región 3' del gen se muestra un polimorfismo tipo minisatélite el cual varía en su número de repeticiones. Los marcadores microsatélites pueden estar conformados por repeticiones de 1 a 6 nucleótidos, mientras los minisatélites por repeticiones de 10 a 65 nucleótidos.

menos específicas y reproducibles, y generalmente requieren mayor cantidad de muestra, por lo que actualmente se encuentran casi en desuso. La EC de forma automatizada contribuye principalmente en dos áreas del diagnóstico genético, una de ellas es a través de la secuenciación y la otra es por medio del análisis de fragmentos en los cuales es posible determinar la dosis génica de forma cuantitativa, limitación presente en los geles de agarosa y poliacrilamida³.

ANÁLISIS DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Aumento en la longitud por número de repeticiones. La EC permite el análisis de la expansión de repeticiones de nucleótidos en el genoma (STRs), constituyéndose como la herramienta ideal para el diagnóstico de algunas enfermedades hereditarias (Tabla 1), en las que la diferencia de una sola repetición puede jugar un papel fundamental en el diagnóstico y transmisión de la enfermedad⁸. La EC determina el número de repeticiones que identifica a los individuos normales y a los que portan la

premutación o la mutación⁹. Por otro lado, permite la realización de pruebas prenatales diagnósticas (duplicaciones, inserciones, deleciones, trisomías y monosomías), en las que resulta imprescindible acortar el tiempo de los resultados^{10,11} (Tabla 2), a través de la determinación de la dosis génica, manteniendo constante la concentración de material genético en la amplificación por PCR, determinando de forma cuantitativa la intensidad de fluorescencia (IF) y el área bajo la curva, sin embargo las pruebas citogenéticas continúan siendo el estándar de oro¹².

Variación de secuencia. El cambio de un nucleótido en el genoma puede ser indicativo de alguna patología. Se sabe que existen muchas mutaciones puntuales implicadas en el desarrollo de enfermedades (Tabla 3); y una forma de identificarlas es a través de la secuenciación del ADN mediante el método de Sanger, el cual ha sido adaptado a la EC, usando dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente, de tal manera que, una secuencia aproximadamente de 300 bases puede ser descifrada en 30 a 45 min, reduciendo hasta 10 veces el tiempo para obtener el resultado^{3,24}.

Tabla 1. Padecimientos debidos a expansiones de nucléotidos analizados más comúnmente por electroforesis capilar

Padecimiento	Gen afectado	STR en expansión	Rango		Referencia
			Normal	Patología	
Corea de Huntington (HD)	IT15	(CAG)n	11-33	40-75	13
Ataxia espinocerebelar (SCA)					
Tipo 1, (SCA 1)	Ataxina 1	(CAG)n	19-38	40-81	8
Tipo 2, (SCA 2)	Ataxina 2	(CAG)n	15-24	35-59	8
Tipo 3, (SCA 3)	Ataxina 3	(CAG)n	14-37	68-84	8
Tipo 6, (SCA 6)	CACNA1A	(CAG)n	5-20	21-25	8
Tipo 7, (SCA 7)	Ataxina 7	(CAG)n	7-17	18-130	8
Tipo 8, (SCA 8)	KLHL1AS	(CTG)n	15-34	89-155	14
Tipo 10, (SCA 10)	Ataxina 10	(ATTCT)n	10-29	400-4.500	15
Tipo 12, (SCA 12)	PPP2R2B	(CAG)n	4-32	51-78	16
Tipo 17, (SCA 17)	TBP	(CAG)n	25-42	>43	17
Ataxia Friedreich	FRDA	(GAA)n	7-22	200-900	18
Atrofia dentorubral-palidolusiana	DRPLA	(CAG)n	7-23	53-88	19
Distrofia miotónica 1 (DM)	DMPK	(CTG)n	5-30	50-2.000	20
Síndrome X frágil	FMR1	(CGG)n	5-35	50-80	21

Tabla 2. Padecimientos debidos a duplicaciones o deleciones de sitios génicos determinados por dosis génica mediante electroforesis capilar

Padecimiento	Regiones genómicas	Tipo de mutación	Referencia
Charcot-Marie-Tooth (CMT1A)	PMP22	Duplicación de 1.4Mb (cromosoma 17)	12, 22
Síndrome de Down	Cromosoma 21	Trisomía cromosómica	11
Síndrome de Patau	Cromosoma 13	Trisomía cromosómica	11
Síndrome de Edwards	Cromosoma 18	Trisomía cromosómica	11
Síndrome de Turner	Cromosoma X	Monosomía cromosómica	23
Síndrome de Klinefelter	Cromosoma X	X Supernumerario	23

ESTUDIO DE ENFERMEDADES POLIGÉNICAS

En la actualidad, la mayoría de las enfermedades que se consideran como problemas de salud pública a nivel mundial, están catalogadas como enfermedades multifactoriales y poligénicas; entre

éstas podemos mencionar a la mayoría de los cánceres, la diabetes mellitus, la hipertensión, la osteoporosis, la degeneración discal intervertebral, la artritis, la obesidad, la demencia y algunas enfermedades cardiovasculares y psiquiátricas, entre otras²⁶. En este tipo de enfermedades, nume-

Tabla 3. Padecimientos debidos a variaciones de secuencia diagnosticados por electroforesis capilar

Padecimiento	Características	Gen afectado	Mutación de diagnóstico	Tipo de análisis	Referencia
Hemocromatosis hereditaria	↑ Absorción de hierro, daño tisular	HFE (6p)	Cys282Tyr (codones 63 y 282)	Secuenciación	24
Fibrosis quística (FC)	Glándulas exocrinas	CFTR	31 mutaciones en CFTR	Secuenciación	7
Talasemia	↑ Homocisteína	MTHFR	C677T	RFLP*	7
QT largo (LQTS)	Cardiomiopatía hipertrófica	LDL	KCNQ1	SSCP	7
Atrofia espino muscular	↓ Fuerza muscular central	SMN1	Deleción en varios exones	Dosis génica cuantitativa	8
Síndrome de Prader-Willi	Deleción de FGFR2, KRIT1 y SNRPN	FGFR2, KRIT1, SNRPN	FGFR2, KRIT1, SNRPN	RFLP*, Dosis génica	12
Fenilcetonuria	Retraso mental metabólico	Del. exones	STR en PAH, mutaciones en PTPS	Análisis de fragmentos	25
Distrofia muscular Duchenne-Becker	↓ Fuerza muscular progresiva	Distrofina	Deleciones en el gen DMD, STR	Análisis de fragmentos	20

*RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*)

rosos genes están implicados en la presencia de la patología, por lo que mutaciones o polimorfismos en estos genes pueden asociarse de manera directa o indirecta con la enfermedad²⁷⁻²⁹.

Entre las aplicaciones más frecuentes en el diagnóstico clínico molecular se encuentra la determinación de mutaciones puntuales (por secuenciación) en genes de predisposición a cáncer, como sucede en el desarrollo de cáncer de mama, próstata y ovario, relacionados con los genes BRCA1 y BRCA2, p53, Rb, y Bcr-Abl, entre otros^{30,31}. Así como la pérdida de heterocigocidad (LOH) por marcadores STR cercanos a un gen o región cromosómica de interés, característico de numerosos tipos de cáncer³². Las pruebas de hemato-oncología molecular para la identificación de poblaciones clonales de células B y T son importantes para la detección de cáncer; en estos

casos, la EC además de su alta resolución, proporciona datos numéricos usando la altura y el área bajo la curva, facilitando con ello la interpretación y proporcionando un tamaño específico de pares de bases para el rearreglo monoclonal³³.

En la actualidad, se encuentran disponibles *kits* comerciales que usan un ensayo múltiple, para la determinación de duplicaciones o deleciones con los que se pueden caracterizar diversos tipos de cáncer a través de la EC³⁴.

La EC puede también ayudar a la diferenciación de varios tipos de linfomas y leucemias a través del uso de ensayos de translocación, como en los linfomas no Hodgkin³⁵ (de las células del manto) asociados con la traslocación (t) 11:14 del linfoma de células B (Bclt (11:14)), los foliculares con Bcl2t (14:18)³⁶ y la leucemia mieloide crónica con Bcr/Abl t (9:22).

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Generalmente, la identificación de muchos microorganismos como bacterias¹, virus³⁷ y hongos es complicada debido al riesgo de infección y a la dificultad de desarrollar el crecimiento de cultivos permisibles. La respuesta a estas dificultades puede ser sustentada por medio del análisis a través de métodos de biología molecular, principalmente por EC (Tabla 4).

HERRAMIENTAS EN MEDICINA FORENSE

El ADN genómico nuclear es una entidad extremadamente variable, lo que nos permite nacer con un código genético único e híbrido transmitido de los padres a los hijos, ya que 50% de nuestra información genética proviene de nuestra madre (25% abuela materna y 25% abuelo materno), mientras que el otro 50% proviene del padre (25% abuela paterna y 25% abuelo paterno). La elevada cantidad de *loci* polimórficos que se encuentran en el ADN no codificante junto con la falta de trascendencia funcional de sus alteraciones (que permite que se perpetúe libremente en sucesivas generaciones), hace que este material altamente variable sea el que más difiera entre los individuos y por ello confiere exclusividad del perfil genético individual, cuyo análisis permite detectar a un individuo en billones de individuos (porque, a excepción de los gemelos idénticos, no hay nadie genéticamente igual) con una confiabilidad de 99,99%. Por lo anterior, el perfil genético constituye la herramienta de elección en la identi-

ficación humana, siendo el único método aceptado legalmente⁴³. Estas pruebas de ADN permiten establecer relaciones biológicas con elevada precisión empleando para ello cálculos de probabilidad de coincidencia al azar (PCA), lo que nos permite conocer la probabilidad de que dos personas tomadas al azar de una población presenten genotipos exactamente iguales⁴⁴. La EC puede llevar a cabo el análisis de 15 marcadores genéticos tipo microsatélite marcados con fluorescencia, garantizando la máxima precisión y fiabilidad en pruebas de identificación humana (Figura 2), aun a partir de muestras degradadas o con poco ADN⁴⁵. Estos marcadores, según las pautas de la Agencia de Investigación Federal de los Estados Unidos de Norteamérica (FBI), constituye el conjunto de secuencias de ADN denominado CODIS (del inglés, *Combined DNA Index System*) que permite identificar singularmente a una persona de otra en aproximadamente 5 h, requiriendo una cantidad mínima de material genético (0,125 ng)⁴⁶.

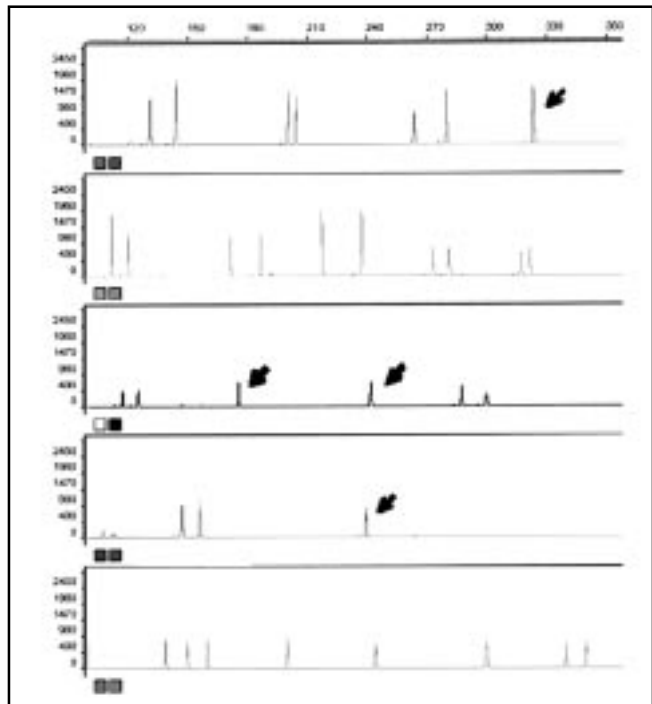
Estas pruebas son empleadas en medicina forense para la identificación de agresores sexuales, asesinos, restos humanos encontrados en accidentes como incendios, desastres naturales y guerras⁴⁷; la identificación de la relación biológica entre personas perdidas con el fin de demostrar parentesco (empleo que actualmente ha tomado auge entre los migrantes latinos en Estados Unidos de Norteamérica) y pruebas de paternidad, la demostración de linajes reales, así como en los análisis antropológicos y de migraciones⁴⁸.

Más aún, la EC tiene otras aplicaciones relacionadas a la toxicología forense, dejando de lado

Tabla 4. Agentes infecciosos diagnosticados por electroforesis capilar

Agente infeccioso	Método empleado para la determinación	Referencia
Virus hepatitis C (VHC)	Genotipificación basada en EC a partir de cADN (secuenciación)	37
Virus herpes simplex	Análisis cuantitativo para monitoreo enzimático	37
Virus inmunodeficiencia humana	Genotipificación de subtipos basada en secuenciación	38
Virus papiloma humano (VPH)	Genotipificación de subtipos basada en secuenciación	39
Género <i>Mycobacterium</i>	Análisis de fragmentos (RFLP)	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Secuenciación de 16S rARN	41
<i>Schizophyllum</i> comunes	Análisis de fragmentos (RFLP)	40
<i>Candida dubliniensis</i>	16S rARN, secuenciación	42

Figura 2. Identificación humana. Se muestra un electroferograma que presenta el análisis de los 15 marcadores polimórficos tipo microsatélite, utilizados en los ensayos de identificación humana. En los primeros cuatro paneles se muestran 11 marcadores que presentan genotipos heterocigotos y 4 marcadores señalados con una flecha que presentan genotipos homocigotos. El quinto panel muestra el marcador de peso molecular.



técnicas como los inmunoensayos, HPLC y cromatografía que presentaban baja especificidad y sensibilidad, así como la incapacidad de detección⁴⁹. Entre estas utilidades destacan, el análisis de la orina para la identificación de sustancias ilícitas (opiáceos, barbitúricos, benzodiazepinas, anfetaminas y morfina)⁵⁰, y en acoplamiento con la quimioluminiscencia (ECL) para la detección de fármacos psicotrópicos (amitriptilina, doxepin, clorpromacina) en los tratamientos psiquiátricos, además de la detección de venenos y toxinas en fluidos y tejidos humanos^{45,51}. Asimismo, se han desarrollado otros protocolos para el análisis de la psilocibina, cocaína, cannabinoides (marihuana y hashish), y diferentes isómeros de la metanfetamina; y la separación de 16 drogas básicas de interés forense en 15 min⁵².

No obstante, las aplicaciones de la EC en la medicina forense no cesan, pues en combinación con la espectrometría de masas (EC-SM) y la EC de zona (ECZ), se han desarrollado protocolos para la detección de residuos de explosivos orgánicos e inorgánicos (aun parcialmente quemados), así como de trazas de pólvora por el empleo de armas de fuego, sin el factor limitante del tiempo⁵³.

ANÁLISIS CLÍNICO

Debido a la versatilidad de la EC, diferentes biomoléculas se pueden monitorear desde su identificación hasta su cuantificación en el análisis del laboratorio clínico⁵⁴. La EC permite la separación de proteínas con polímeros de diverso tamaño de partícula, muy parecido a los geles de dodecil sulfato de sodio (SDS), logrando separaciones más rápidas y reproducibles y mejorando los ensayos de inmunoblot. Estas ventajas son consecuencia del análisis de algunas proteínas por EC, tales como las proteínas séricas cuyos cambios presentan un interés clínico para la evaluación de pacientes con enfermedades linfoproliferativas, como mieloma múltiple, enfermedad de Waldenström, leucemia, linfoma, amiloidosis, gammopatía de significancia indeterminada^{54,55}.

La proteinuria es una de las anomalías más comunes observadas en el laboratorio clínico, causada por una variedad de problemas patológicos que afectan al riñón y al tracto urinario. Recientemente, se han logrado pequeñas modificaciones de la EC con el fin de realizar este estudio por medio de esta técnica, constituyendo la herra-

mienta de elección, por su sensibilidad, especificidad y rapidez además de que mediante amortiguadores de elevada fuerza iónica y alto pH se logra la disociación de las cadenas proteicas⁵⁵⁻⁵⁷. El empleo de la ECZ ha permitido realizar análisis no invasivos determinando gran cantidad de marcadores biológicos de interés clínico⁵³.

Otra aplicación de la EC es la asociada a la detección de las isoformas de transferrina (Tf), asociadas con variantes atípicas del desorden congénito de glucosilación (DCG), enfermedad autosómica recesiva caracterizada por desarrollo tardío, anomalías clínicas y neurológicas, cuyo diagnóstico es difícil, por la carencia de efectividad de otras técnicas⁵⁸.

Tiene utilidad en la determinación de testosterona en fluidos corporales para aplicaciones clínicas, así como para control de dopaje; más aún la EC a través de la técnica de SSCP (análisis de la conformación polimórfica en ADN de cadena sencilla) ha sido empleada en la detección de LOH, fenómeno asociado al cáncer^{59,60}.

OTROS TIPOS DE EC Y SUS APLICACIONES MÉDICAS

En esta era postgenómica, los métodos diagnósticos exigen la búsqueda de mutaciones específicas, niveles de expresión, además del monitoreo farmacéutico de alta sensibilidad que permita efectuar análisis de los pacientes, y de sus características individuales de forma rápida, precisa y con mínima invasión. Las técnicas analíticas convencionales y la nanotecnología se han fusionado para crear un análisis miniaturizado que emplea poca muestra (microfluidos), permitiendo realizar en poco tiempo el diagnóstico de varios padecimientos de forma precisa, simultánea y automatizada^{49,59}. Entre los principales se encuentran:

La electroforesis capilar de afinidad (ECA). Estudia las interacciones biomoleculares no covalentes y determina constantes de asociación y de disociación (entre fármacos y proteínas) permitiendo aislar compuestos de mezclas complejas, cuantificar y caracterizar simultáneamente varios analitos, y detectar biomarcadores de baja abundancia⁴⁵. Una variante de la ECA, es la EC de inmunofinidad (ECIA) que contribuye notablemente al diagnóstico clínico y biomédico colocándose por encima de

técnicas como el RIA (radio inmuno análisis) y ELISA (ensayo inmuno enzimático)^{45,49}. Entre sus aplicaciones se encuentran la detección de enfermedades infecciosas (enfermedad de Chagas, tuberculosis, lepra, el virus del Nilo y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otras)⁶¹, así como la determinación de metabolitos farmacéuticos (que pueden inducir daño orgánico, por ejemplo en riñón), de fármacos (metanfetaminas) y esteroides (testosterona) en orina a través de anticuerpos, elevando la sensibilidad, además de permitir un diagnóstico fino y un monitoreo eficaz de los agentes terapéuticos^{4,59}.

La electroforesis capilar en microchip (μ EC). Determina en forma precisa el diámetro y concentración de cada fragmento a través de la fluorescencia inducida por láser (LIF), lo que además le permite detectar fragmentos muy débiles superpuestos a otros muy gruesos, consumiendo 1 μ L de muestra. Para ello emplea un chip de 4 cm que permite analizar con elevada resolución y reproducibilidad muestras de suero así como productos de PCR^{62,63}.

Entre sus principales aplicaciones en el área clínica se encuentran: a) La determinación de electrolitos en suero, consumiendo un tiempo máximo de 20 s⁶⁴. b) La detección de mediadores de la inflamación, invirtiendo cerca de 2 min para detectar 12 marcadores diferentes⁶¹. c) El monitoreo de bilirrubina libre en neonatos⁶⁵. d) La detección de interacciones entre proteínas y fármacos (en una fusión entre la μ EC con la espectrometría de masas).

Su principal empleo en el diagnóstico molecular tiene que ver con la detección de mutaciones en individuos heterocigotos de los genes p53 y BRCA1 y 2 (relacionados con cáncer), interpretación que resultaba difícil por métodos convencionales de EC^{60,62}. La rapidez del análisis, conjugada con la automatización, la coloca como una herramienta indispensable en el área diagnóstica.

En conclusión, la EC es una técnica sensible y altamente versátil que se encuentra involucrada en investigación genómica y farmacéutica, pero que además se expande constantemente en el diagnóstico molecular y clínico con resultados asombrosos sin contar con las aplicaciones forenses que de alguna forma la hicieron saltar a la fama en sus inicios. Sin embargo su aceptación no ha sido la que se esperaba, pero lentamente y de forma contundente se encuentra siendo utilizada

en el análisis clínico de Europa y Japón como una vía alternativa de la electroforesis convencional, ya que la aparición reciente de *kits* de diagnóstico ha hecho que la industria clínica comience a tener

mayor interés en las pruebas que ofrece, en la sensibilidad de las mismas, en el ahorro en el consumo de tiempo y más aún, en el bajo costo por prueba que ofrece esta metodología.

REFERENCIAS

1. GARCÍA-CANAS V, CIFUENTES A. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis* 2007; 28: 4013-30.
2. MARTÍNEZ-GÓMEZ MA, CARRIL-AVILÉS MM, SAGRADO S, VILLANUEVA-CAMANAS RM, MEDINA-HERNÁNDEZ MJ. Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2007; 1147: 261-9.
3. VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW, LI PW, MURAL RJ, SUTTON GG ET AL. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
4. LIU X, DAHDOUN F, SALGADO M, GÓMEZ FA. Recent advances in affinity capillary electrophoresis (2007). *J Pharm Sci* 2009; 98: 394-410.
5. WALLINGFORD RA, EWING AG. Capillary electrophoresis. *Adv Chromatogr* 1989; 29: 1-76.
6. KOSTAL V, KATZENMEYER J, ARRIAGA EA. Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Chem* 2008; 80: 4533-50.
7. GODDE R, AKKAD DA, ARNING L, DEKOMIEN G, HERCHENBACH J, KUNSTMANN E ET AL. Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* 2006; 27: 939-46.
8. DORSCHNER MO, BARDEN D, STEPHENS K. Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 2002; 4: 108-13.
9. KIBA Y, BABA Y. Analysis of triplet-repeat DNA by capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2001; 163: 221-9.
10. ASHTON EJ, YAU SC, DEANS ZC, ABBS SJ. Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the *dmd* gene. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 53-61.
11. GELFI C, COSSU G, CARTA P, SERRA M, RIGHETTI PG. Gene dosage in capillary electrophoresis: Pre-natal diagnosis of Down's syndrome. *J Chromatogr A* 1995; 718: 405-12.
12. HERNÁNDEZ-ZAMORA E, ARENAS-SORDO M, MALDONADO-RODRÍGUEZ R. Capillary electrophoresis for the detection of *pmp22* gene duplication: Study in Mexican patients. *Electrophoresis* 2008; 29: 1582-4.
13. ZUHLKE C, RIESS O, BOCKEL B, LANGE H, THIES U. Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2063-7.
14. IKEDA Y, SHIZUKA M, WATANABE M, OKAMOTO K, SHOJI M. Molecular and clinical analyses of spinocerebellar ataxia type 8 in Japan. *Neurology* 2000; 54: 950-5.
15. ALONSO I, JARDIM LB, ARTIGALAS O, SARAIVA-PEREIRA ML, MATSUURA T, ASHIZAWA T ET AL. Reduced penetrance of intermediate size alleles in spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology* 2006; 66: 1602-4.
16. FUJIGASAKI H, VERMA IC, CAMUZAT A, MARGOLIS RL, ZANDER C, LEBRE AS ET AL. Sca12 is a rare locus for autosomal dominant cerebellar ataxia: A study of an Indian family. *Ann Neurol* 2001; 49: 117-21.
17. KOIDE R, KOBAYASHI S, SHIMOHATA T, IKEUCHI T, MARUYAMA M, SAITO M ET AL. A neurological disease caused by an expanded cag trinucleotide repeat in the *tata-binding protein* gene: A new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2047-53.
18. CAMPUZANO V, MONTERMINI L, MOLTO MD, PIANESE L, COSSEE M, CAVALCANTI F ET AL. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic *gaa* triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423-7.
19. SHIMOJO Y, OSAWA Y, FUKUMIZU M, HANAOKA S, TANAKA H, OGATA F ET AL. Severe infantile dentatorubral pallidoluysian atrophy with extreme expansion of *cag* repeats. *Neurology* 2001; 56: 277-8.
20. BUXTON J, SHELBORNE P, DAVIES J, JONES C, VAN TONGEREN T, ASLANIDIS C ET AL. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 1992; 355: 547-8.
21. KREMER E J, PRITCHARD M, LYNCH M, YU S, HOLMAN K, BAKER E ET AL. Mapping of DNA instability at the fragile x to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 1991; 252: 1711-4.
22. HERNÁNDEZ-ZAMORA E, ARENAS-SORDO M DE L, ESCOBAR-CEDILLO R E, GONZÁLEZ-HUERTA N C, LEYVA-GARCÍA N, MALDONADO-RODRÍGUEZ R. [Strategies for clinical and molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth 1a among Mexican patients]. *Gac Med Mex* 2007; 143: 383-9.
23. HINSELWOOD DC, WARREN DJ, EKSTROM PO. High-throughput gender determination using automated denaturant gel capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; 26: 2562-6.
24. GÓMEZ-LLORENTE C, ANTÚNEZ A, BLANCO S, SUÁREZ A, GÓMEZ-CAPILLA JA, FÁREZ-VIDAL ME. Multiplex analysis of the most common mutations related to hereditary haemochromatosis: Two methods combining specific amplification with capillary electrophoresis. *Eur J Haematol* 2004; 72: 121-9.

25. SHAWKY RM, EL-ALEEM KA, RIFAAT MM, EL-NAGGAR RL, MARZOUK GM. Rapid carrier screening using short tandem repeats in the phenylalanine hydroxylase gene. *East Mediterr Health J* 2002; 8: 49-54.
26. GÓMEZ R, MAGANA JJ, CISNEROS B, PÉREZ-SALAZAR E, FAUGERON S, VÉLIZ D ET AL. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population. *Clin Genet* 2007; 72: 574-81.
27. MAGANA JJ, GÓMEZ R, CISNEROS B, CASAS L, VALDÉS-FLORES M. Association of interleukin-6 gene polymorphisms with bone mineral density in Mexican women. *Arch Med Res* 2008; 39: 618-24.
28. MAGANA JJ, GÓMEZ R, CISNEROS B, CASAS L, CASTORENA F, MIRANDA A ET AL. Association of the ct gene (CA) polymorphism with bmd in osteoporotic Mexican women. *Clin Genet* 2006; 70: 402-8.
29. SZANTAI E, RONAI Z, SZILAGYI A, SASVARI-SZEKELY M, GUTTMAN A. Haplotyping by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2005; 1079: 41-9.
30. VELASCO E, INFANTE M, DURÁN M, ESTEBAN-CARDENOSA E, LASTRA E, GARCÍA-GIRÓN C ET AL. Rapid mutation detection in complex genes by heteroduplex analysis with capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; 26: 2539-52.
31. EKSTROM PO, BJORGE T, DORUM A, LONGVA AS, HEINTZ KM, WARREN DJ ET AL. Determination of hereditary mutations in the brca1 gene using archived serum samples and capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2004; 76: 4406-9.
32. MONTENEGRO Y, RAMÍREZ-CASTRO JL, ISAZA LF, BEDOYA G, MUNETON-PENA CM. [Microsatellite instability among patients with colorectal cancer]. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 1221-9.
33. YAKIREVICH E, JACKSON CL, MEITNER PA, MACKENZIE D, TAVARES R, ROBINSON-BOSTOM L ET AL. Analysis of t-cell clonality using laser capture microdissection and high-resolution microcapillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 490-7.
34. SHI X, LI J, LI A, LV S, XU G. Simultaneous analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity by capillary electrophoresis with a homemade kit. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 834: 122-7.
35. DONISI PM, DI LORENZO N, PAPARELLA A, RICCARDI M, STRACCA-PANSA V. Molecular diagnosis of non-Hodgkin b lymphomas by capillary electrophoresis and genescan analysis: A molecular pathology laboratory experience. *Pathologica* 2006; 98: 139-46.
36. PALDI-HARIS P, RACZ G, NEMETH K, FOLDI J. Single-tube multiplex pcr and capillary electrophoresis for the detection of bcl2-igh chimeras. *Haematologia (Budap)* 2002; 31: 313-7.
37. KREMSEK L, BILEK G, BLAAS D, KENNEDLER E. Capillary electrophoresis of viruses, subviral particles and virus complexes. *J Sep Sci* 2007; 30: 1704-13.
38. BEZY V, CHAIMBAULT P, MORIN P, UNGER S E, BERNARD M C, AGROFOGLIO LA. Analysis and validation of the phosphorylated metabolites of two anti-human immunodeficiency virus nucleotides (stavudine and didanosine) by pressure-assisted ce-esi-ms/ms in cell extracts: Sensitivity enhancement by the use of perfluorinated acids and alcohols as coaxial sheath-liquid make-up constituents. *Electrophoresis* 2006; 27: 2464-76.
39. NISHIWAKI M, YAMAMOTO T, TONE S, MURAI T, OHKAWARA T, MATSUNAMI T ET AL. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex pcr and clinical applications. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1161-8.
40. CHANG PL, HSIEH WS, CHIANG CL, TUOHY MJ, HALL GS, PROCOP GW ET AL. The hsp65 gene patterns of less common mycobacterium and nocardia spp. By polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis with capillary electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 315-23.
41. LIU HM, ZHANG XH, HUANG XQ, CAO CX, XU YQ. Rapid quantitative analysis of phenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxyphenazine from fermentation culture of pseudomonas chlororaphis gp72 by capillary zone electrophoresis. *Talanta* 2008; 76: 276-81.
42. HORKA M, RUZICKA F, HOLA V, SLAIS K. Ce separation of proteins and yeasts dynamically modified by peg pyrenebutanoate with fluorescence detection. *Electrophoresis* 2007; 28: 2300-7.
43. BUTLER JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007; 43: ii-v.
44. BRENNER CH. Some mathematical problems in the DNA identification of victims in the 2004 tsunami and similar mass fatalities. *Forensic Sci Int* 2006; 157: 172-80.
45. THORMANN W, LURIE IS, MCCORD B, MARTI U, CENNI B, MALIK N. Advances of capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis (1999-2000). *Electrophoresis* 2001; 22: 4216-43.
46. MORETTI TR, BAUMSTARK AL, DEFENBAUGH DA, KEYS KM, SMERICK JB, BUDOWLE B. Validation of short tandem repeats (strs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex str systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci* 2001; 46: 647-60.
47. DEFINIS GOJANOVIC M, SUTLOVIC D. Skeletal remains from world war II mass grave: From discovery to identification. *Croat Med J* 2007; 48: 520-7.
48. PENA JA, GARCÍA-OBREGÓN S, PÉREZ-MIRANDA AM, DE PANCORBO MM, ALFONSO-SÁNCHEZ MA. Gene flow in the Iberian peninsula determined from y-chromosome str loci. *Am J Hum Biol* 2006; 18: 532-9.
49. TAGLIARO F, BORTOLOTTI F, PASCALI JP. Current role of capillary electrophoretic/electrokinetic techniques in forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388: 1359-64.

50. AURORA PRADO MS, STEPPE M, TAVARES MF, KEDOR-HACKMANN ER, SANTORO MI. Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase liquid chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37: 273-9.
51. LI J, ZHAO F, JU H. Simultaneous determination of psychotropic drugs in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* 2006; 575: 57-61.
52. HYOTYLAINEN T, SIREN H, RIEKKOLA ML. Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *J Chromatogr A* 1996; 735: 439-47.
53. IADAROLA P, CETTA G, LUISETTI M, ANNOVAZZI L, CASADO B, BARANIUK J ET AL. Micellar electrokinetic chromatographic and capillary zone electrophoretic methods for screening urinary biomarkers of human disorders: A critical review of the state-of-the-art. *Electrophoresis* 2005; 26: 752-66.
54. SNIHOTTA M, SCHIFFER E, ZURBIG P, NOVAK J, MISCHAK H. CE - a multifunctional application for clinical diagnosis. *Electrophoresis* 2007; 28: 1407-17.
55. SHIHABI ZK. Clinical applications of capillary electrophoresis. *Ann Clin Lab Sci* 1992; 22: 398-405.
56. KOLIOS G, BAIRAKTARI E, TSOLAS O, SEFERIADIS K. Routine differential diagnosis of proteinurias by capillary electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 784-8.
57. FRIEDBERG MA, SHIHABI ZK. Urine protein analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18: 1836-41.
58. MARKLOVA E, ALBAHRI Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clin Chim Acta* 2007; 385: 6-20.
59. AMUNDSEN LK, NEVANEN TK, TAKKINEN K, ROVIO S, SIREN H. Microscale immunoaffinity spe and mekc in fast determination of testosterone in male urine. *Electrophoresis* 2007; 28: 3232-41.
60. OZAWA S, SUGANO K, SONEHARA T, FUKUZONO S, ICHIKAWA A, FUKAYAMA N ET AL. High resolution for single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Anal Chem* 2004; 76: 6122-9.
61. GUZMÁN N A, BLANC T, PHILLIPS TM. Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices. *Electrophoresis* 2008; 29: 3259-78.
62. HESTEKIN CN, JAKUPCIAK JP, CHIESL TN, KAN CW, O'CONNELL CD, BARRON AE. An optimized microchip electrophoresis system for mutation detection by tandem sscp and heteroduplex analysis for p53 gene exons 5-9. *Electrophoresis* 2006; 27: 3823-35.
63. AKASHI S, SUZUKI K, ARAI A, YAMADA N, SUZUKI E, HIRAYAMA K ET AL. Top-down analysis of basic proteins by microchip capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 1932-8.
64. VROUWE EX, GYSLER J, TIADEN UR, VAN DER GREEF J. Chip-based capillary electrophoresis with an electrodeless nanospray interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 1682-8.
65. NIE Z, FUNG YS. Microchip capillary electrophoresis for frontal analysis of free bilirubin and study of its interaction with human serum albumin. *Electrophoresis* 2008; 29: 1924-31.