



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“APLICACIONES Y DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE  
FUSIÓN DEL DNA DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM) PARA  
LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO  
NUCLEÓTIDO (SNP)”**

**T E S I N A**

Trabajo escrito vía Cursos de Educación Continua

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**OMAR HERNÁNDEZ REYES**

**MÉXICO, D. F. 04 DE NOVIEMBRE DE 2013.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto**  
**VOCAL:**                         **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**  
**SECRETARIO:**               **Profesor: Luis Tonatiuh Sánchez Linares**  
**1er. SUPLENTE:**           **Profesor: Laura Carmona Salazar**  
**2° SUPLENTE:**              **Profesor: Jorge Rafael Martínez Peniche**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: Francisco Javier Plasencia de la Parra** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: OMAR HERNÁNDEZ REYES** \_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

<b>1.Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>2.Introducción</b>	<b>7</b>
<b>3.Objetivos</b>	
<b>4.Marco Teórico</b>	
<b>4.1.Antecedentes</b>	
4.1.1.Genotipo y Fenotipo	<b>8</b>
4.1.2.Polimorfismos y variaciones genéticas	<b>9</b>
4.1.3.Polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP)	<b>10</b>
4.1.4.Métodos de genotipificación	<b>14</b>
<b>4.2.Fusión del DNA de alta resolución aplicada a SNPs</b>	
4.2.1.Desnaturalización del DNA	<b>24</b>
4.2.2.Fusión del DNA de alta resolución (HRM)	<b>25</b>
4.2.3.Genotipificación de SNPs por HRM	<b>27</b>
4.2.3.1.Amplicones Cortos	<b>28</b>
4.2.3.2.Sondas no marcadas	<b>31</b>
4.2.4.Agentes intercalantes fluorescentes para HRM	<b>33</b>
4.2.5.Instrumentación requerida para HRM	<b>37</b>
4.2.6.Análisis de datos	<b>39</b>
4.2.7.Recomendaciones técnicas para HRM	<b>43</b>
4.2.8.Ventajas y desventajas de la técnica	<b>46</b>
<b>4.3.Aplicaciones de la genotipificación de SNPs por HRM</b>	
4.3.1.Farmacogenética	<b>48</b>
4.3.2.Diagnóstico basado en HRM	<b>50</b>
4.4.3.Genotipificación de poblaciones	<b>54</b>
<b>5.Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>6.Bibliografía</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Clases de variantes genéticas humanas.	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Clasificación de SNPs de acuerdo a su localización en el gen.	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Construcción de un mapa de haplotipos.	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b> Emisión de señal de una sonda TaqMan.	<b>16</b>
<b>Figura 5.</b> Emisión de señal de un “faro molecular”.	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Gel de electroforesis en gradiente desnaturizante	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Polimorfismo de conformación de cadena sencilla	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b> Genotipificación por DHPLC	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> RFLP. Polimorfismo por tamaño del fragmento de restricción.	<b>21</b>
<b>Figura 10.</b> Hibridación de sondas fluorescentes.	<b>22</b>
<b>Figura 11.</b> Genotipificación por extensión de oligonucleótidos.	<b>23</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto hipercrómico por desnaturización del DNA.	<b>24</b>
<b>Figura 13.</b> Fusión del DNA de alta resolución.	<b>26</b>
<b>Figura 14.</b> Utilización de amplicones cortos para escaneo de SNPs.	<b>30</b>
<b>Figura 15.</b> HRM para genotipificación con sondas no marcadas.	<b>31</b>
<b>Figura 16.</b> Estructura básica de agentes intercalantes de tercera generación.	<b>33</b>
<b>Figura 17.</b> Distribución de los agentes intercalantes durante la fusión del DNA.	<b>34</b>
<b>Figura 18.</b> Programa de HRM acoplado con la PCR para el LightCycler 480.	<b>37</b>
<b>Figura 19.</b> Datos crudos de curvas de fusión del DNA.	<b>39</b>
<b>Figura 20.</b> Análisis de datos de HRM.	<b>40</b>
<b>Figura 21.</b> Análisis de HRM mediante sondas no marcadas.	<b>42</b>
<b>Figura 22.</b> HRM aplicado a farmacogenómica.	<b>48</b>
<b>Figura 23.</b> Curvas de HRM para SNPs de relevancia clínica.	<b>50</b>
<b>Figura 24.</b> SNPs de interés clínico	<b>51</b>
<b>Figura 25.</b> Genotipificación de poblaciones salvajes mediante HRM con amplicones cortos.	<b>53</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de SNPs, de acuerdo con Venter, 2001.	<b>27</b>
<b>Tabla 2.</b> Agentes intercalantes fluorescentes usados en HRM	<b>35</b>

## **1.ABREVIATURAS**

**cDNA**- ácido desoxirribonucleico complementario

**DGGE**- electroforesis de gradiente en gel desnaturizante

**DHPLC**- cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante

**DNA**- ácido desoxirribonucleico

**FRET** – transmisión de energía de resonancia de Fröster

**HPLC**- cromatografía líquida de alta resolución

**HRM**- fusión del DNA de alta resolución

**PCR**- reacción en cadena de la polimerasa

**RFLP** –polimorfismo por tamaño de los fragmentos de restricción

**RT-PCR**- reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**SNP**- polimorfismo de un solo nucleótido

**SSCP**- polimorfismo de conformación de cadena sencilla

## 2.INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del genoma de dos individuos diferentes está conservada, por lo que el 0.1% restante contiene las variaciones que explican las diferencias fenotípicas encontradas entre ellos. A este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de DNA (Caratachea, 2007). El polimorfismo más sencillo que existe es el resultado del cambio en una sola base, en donde se sustituye un nucleótido por otro y recibe el nombre de SNP (*single nucleotide polymorphism*) (Scork et. al, 2000). Los SNPs se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, incluyendo regiones promotoras, exones e intrones. Sin embargo, su distribución no es homogénea ya que la mayoría de ellos se ubican en regiones no codificantes. Los SNPs son responsables de cerca del 90% de todas las variantes del DNA humano y tienen un papel muy importante en la evolución, así como en la diversidad fenotípica que se puede expresar, por ejemplo, como sensibilidad a fármacos y susceptibilidad a enfermedades (Calabrese et al. 2009).

El estudio de estas variaciones tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina así como en el desarrollo de investigaciones biológicas y de evolución. El análisis de SNPs también puede ayudar a personalizar los medicamentos y los regímenes terapéuticos a los genotipos particulares, lo que constituye el principio subyacente de la farmacogenómica. Dado el impacto potencial del análisis de los SNPs en la asistencia sanitaria, la industria de la biotecnología ha tenido como prioridad el desarrollo de métodos de alto rendimiento para la genotipificación y análisis de SNPs (Twyman, 2005).

En la actualidad, el análisis de la curva de la fusión del DNA de alta resolución (HRM) se ha convertido en un método robusto para realizar la genotipificación y proporciona una detección sensible de mutaciones, incluyendo SNPs (Twyman, 2005).

### **3.OBJETIVOS**

- Comparación de la fusión del DNA de alta resolución (HRM) con otros métodos de genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).
- Descripción de la técnica de fusión del DNA de alta resolución (HRM), enfocada en la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).
- Revisión de las principales aplicaciones de la fusión del DNA de alta resolución (HRM) enfocada en la genotipificación de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs).

### **4.MARCO TEÓRICO**

#### **4.1.ANTECEDENTES**

##### **4.1.1.GENOTIPO Y FENOTIPO**

El término fenotipo se utiliza para describir las características observables de un organismo, mientras que genotipo denota su composición genética. Dada la indudable complejidad de las muchas interacciones de los miles de genes que componen el genoma humano, tanto entre ellos mismos y como con el medio ambiente, una de las cuestiones centrales para la Biología humana y las ciencias médicas en el futuro inmediato,, es hasta qué punto será posible relacionar la estructura y función de un solo gen a un fenotipo particular; o en el caso de la genética médica, su relación con el patrón, incidencia o susceptibilidad a una enfermedad. Este problema se extenderá a todos los aspectos de la investigación y la práctica médica en el futuro. Muchas enfermedades debidas a un solo gen defectuoso muestran gran variabilidad clínica, resultado de la interacción de una serie de otros genes modificadores y los efectos del medio ambiente. La complejidad de este tipo de sistema genético recién está empezando a ser

apreciado (Weatherhall, 2001). En Genética y Biología poblacional, el genotipo es la constitución genética de un organismo (según lo especificado por sus alelos). El fenotipo de un agente, por el contrario, es una expresión característica del genotipo del agente teniendo en cuenta su entorno (Guerra & Yu, 2005).

#### **4.1.2.POLIMORFISMOS Y VARIACIONES GENÉTICAS**

Las variantes genéticas humanas que denotan la frecuencia de su alelo menos común en la población humana están típicamente referidas como poco comunes o raras,. Las variantes comunes son sinónimos con polimorfismos, estos definidos como variaciones genéticas con una menor frecuencia alélica de al menos 1% de la población; mientras que las variaciones que tienen una frecuencia alélica menor al 1% se consideran mutaciones. Por otro lado, las variantes genéticas también pueden ser descritas en términos de la composición de los nucleótidos.

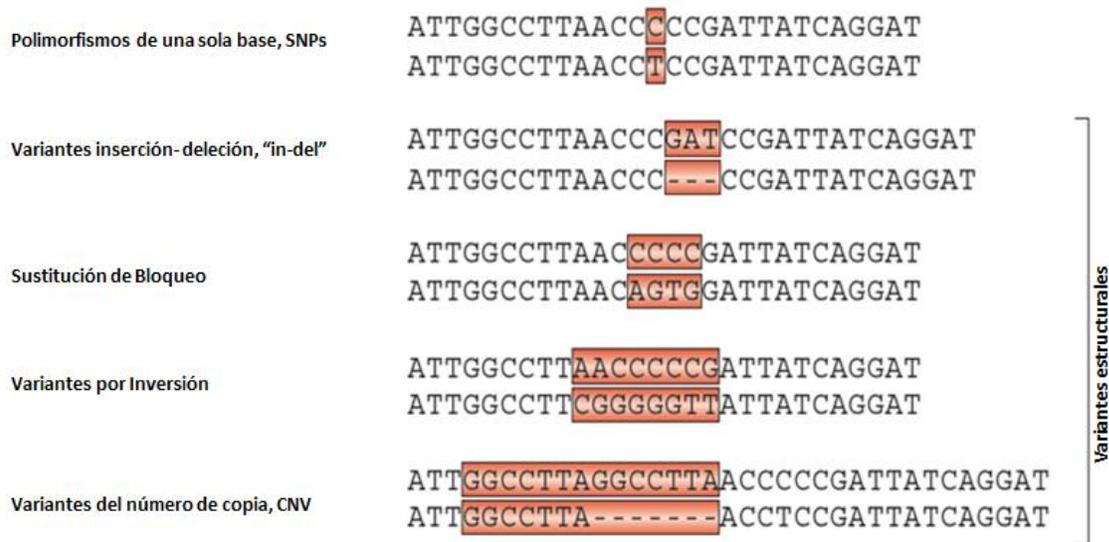
En un sentido amplio, las variantes del genoma humano pueden ser divididas en dos grandes clases: variantes de un solo nucleótido (SNPs) y variantes estructurales: las SNPs son aquellas en las que un solo nucleótido (A,T,G o C) es alterado, mientras que las estructurales pueden ser de cuatro tipos y se ilustran en la Figura 1.

1) Variantes de **inserción-delección** (in-del). Ocurren cuando una o más pares de bases están presentes en algunos genomas, pero ausentes en otros. Generalmente están compuestas por algunas pares de bases pero pueden ser tan grandes como 80 kb de longitud.

2) **Sustitución de bloqueo**. Describe casos en los que un grupo de nucleótidos adyacentes varían entre dos genomas.

3) **Variante de inversión**. Es aquella en la que el orden de las pares de bases está invertido en una sección definida de un cromosoma.

4) **Variantes del número de copia.** Ocurren cuando un fragmento idéntico, o casi idéntico se encuentra repetido en algunos cromosomas, pero no en otros (Frazer et al. 2009).



**Figura 1. Clases de variantes genéticas humanas.** La nomenclatura utilizada para describir los varios tipo de variantes estructurales aún no está bien definida. (Modificado de Frazer et al. 2009).

#### 4.1.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Son la clase más prevalente de variación genética en los individuos, se estima que el genoma humano contiene al menos 11 millones de SNPs, donde cerca de 7 millones de estos ocurren con una frecuencia alélica de al menos 5%, y el resto de ellos con una frecuencia alélica de entre 1 al 5 %. Además, hay otros SNPs cuya frecuencia es extremadamente baja pues están presentes únicamente en una familia o en un individuo. De hecho, cualquier cambio en un par de bases que se genere y no tenga efecto fenotípico grave puede ocurrir en un individuo (Frazer et al. 2009). Actualmente, en el "dbSNP" (data baseSNP) se han catalogado más de

9 millones de variantes en la secuencia de DNA. Se ha estimado que los SNP's se presentan en promedio uno cada 200 pares de bases en el genoma humano (Frazer et al. 2009).

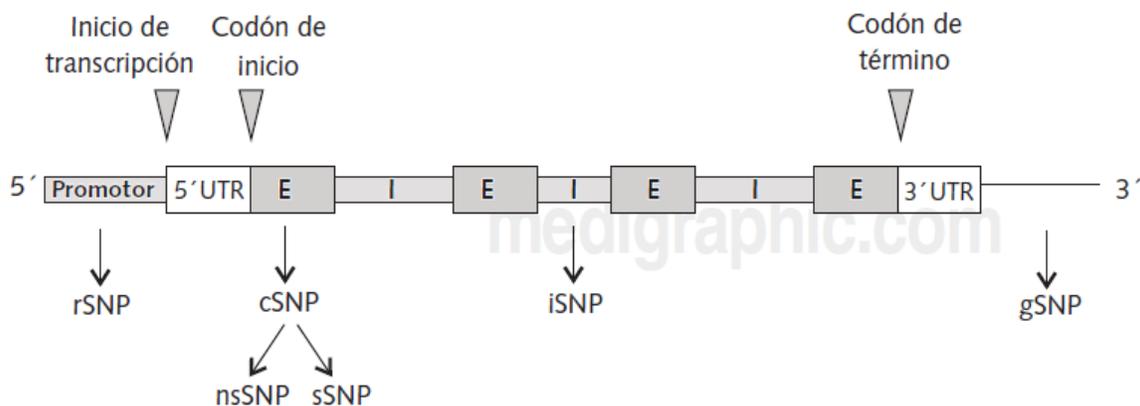
Dado que los humanos son organismos diploides, cada SNP está definido por dos alelos, por ejemplo, A o G, en una ubicación específica de los correspondientes cromosomas homólogos. Cada individuo podrá entonces tener uno de tres genotipos; AA, AG, GG. Siendo AA y GG homocigotos y AG heterocigoto. Es importante recordar que el DNA es de doble cadena y por lo tanto la complementariedad del DNA indicaría que si se tienen las bases A y G, estas se aparearán con T y C respectivamente en la hebra complementaria. Cuando se define un polimorfismo se toma en cuenta únicamente una de las secuencias, dependiendo de la dirección de la lectura del gen o secuencia (Brooks 1999).

Asimismo, entre estas posibles variaciones existen algunas que pueden tener efectos funcionales que pueden, por ejemplo, producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta; estas variaciones pueden estar localizados en la región promotora del gen, afectando así la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), pueden también estar localizadas en intrones (modulando la estabilidad del RNA mensajero heteronuclear), en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre el procesamiento de intrones y unión de exones) o en regiones intergénicas (Shorck et al. 2000).

Cuando los SNPs ocurren en regiones codificantes, en la primera o segunda posición de un codón, pueden provocar un cambio de aminoácido en la secuencia de la cadena polipeptídica. Debido a esto, se les denomina SNPs "no sinónimos". Debido que este tipo de SNPs puede afectar la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones. Si el SNP ocurre en la tercera posición del codón, podría no afectar la secuencia de aminoácidos y a este cambio se les llama "sinónimos" o silenciosos. Sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos

pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (Cargill et al. 1999).

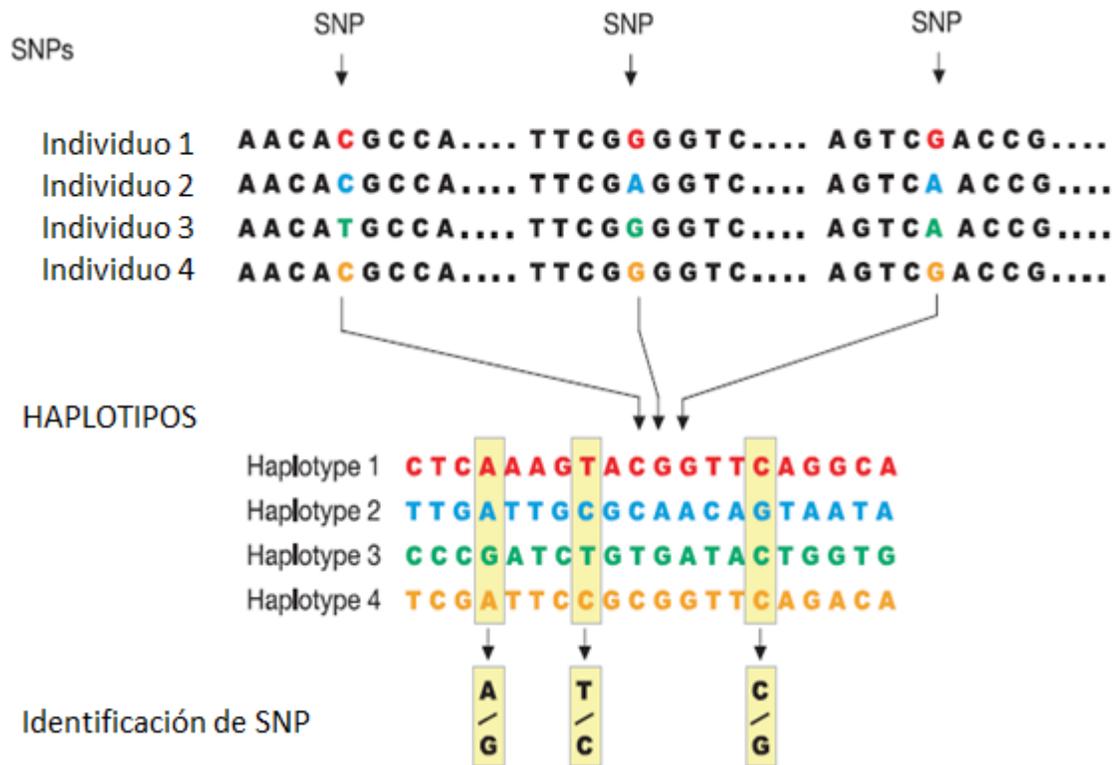
Según su localización en el genoma, los SNP's se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (figura 2) (Caratachea, 2007).



**Figura 2. Clasificación de SNPs de acuerdo a su localización en el genoma.** De acuerdo con su localización en el genoma los SNP reciben su nombre. E=Exones, I=Intrones, UTR=Regiones NO Codificantes. Cuando los SNPs se encuentran en regiones codificantes se puede presentar o no la alteración del gen, alterando posteriormente la traducción de la proteína y causando enfermedades (Caratachea, 2007).

Un dato interesante de los SNP's es que, a diferencia de otro tipo de marcadores como los microsatélites, presentan una tasa menor de mutación por lo que son de gran ayuda en estudios de genética de poblaciones. Los microsatélites son elementos repetitivos de dos a cuatro nucleótidos, utilizados como marcadores que se encuentran distribuidos a lo largo del genoma y tienen la característica de ser altamente polimórficos, razón por la cual se utilizan como una herramienta para el diseño de pruebas para identificación de individuos (Salazar et al. 2004).

Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por un conjunto de SNP's a lo largo de un mismo cromosoma que son heredados como una unidad. La diferencia fundamental entre un haplotipo y los SNP's individuales, es que los alelos en los haplotipos son asignados a un cromosoma. Prácticamente cada individuo tendrá dos haplotipos para un fragmento del genoma, representados por los cromosomas homólogos, paterno y materno. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación, la cual es el intercambio físico del DNA durante la meiosis. La información obtenida de los mapas de haplotipos es importante ya que permite localizar mutaciones que pueden ser causantes de alguna enfermedad mediante métodos de análisis de ligamiento, además de tener un profundo efecto sobre la extensión de asociaciones estadísticas entre la presencia de dos SNP's en el genoma. Esto se conoce como desequilibrio de ligamiento (una propiedad de los estudios de asociación entre el genoma humano). Este desequilibrio de ligamiento puede ser entendido como una asociación entre los SNP's; es decir, el conocimiento del genotipo en un SNP puede predecir el genotipo de otro SNP si la asociación (desequilibrio de ligamiento) es alta entre estos dos SNP's (Caratachea, 2007). La figura 3 muestra la forma en como se construye un mapa de haplotipos.



**Figura 3. Construcción de un mapa de haplotipos.** Para hacer un mapa de haplotipos se selecciona una región especial de un cromosoma en diferentes individuos- en la imagen se muestra el mismo cromosoma para 4 diferentes individuos-, donde la mayoría de la secuencia es idéntica. Un haplotipo se hace con la combinación particular de los SNPs cercanos entre sí. La imagen muestra los genotipos para 20 SNPs (bases coloreadas) que se distribuyen en un promedio de 6000 bases. (Modificado de Gibbs et al. 2003).

#### 4.1.4.MÉTODOS DE GENOTIIFICACIÓN

Para la identificación de polimorfismos, es decir, genotipificación, se emplean diversas metodologías que pueden dividirse en dos; las que buscan nuevos polimorfismos y las que identifican polimorfismos ya conocidos. Aunque la secuenciación del DNA es el estándar de oro para la detección de nuevos polimorfismos, aún hoy día resulta muy costosa y difícilmente se puede justificar su uso para estudios de poblaciones muy grandes. Debido a esto se han desarrollado diferentes métodos de escrutinio; los cuales, en su mayor parte, implican la síntesis *in vitro* de un fragmento de DNA para ser analizado posteriormente (Caratachea, 2007). Por esto se hará primero una descripción de las técnicas de amplificación de DNA por PCR.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR emula *in vitro* el proceso de síntesis de DNA que tiene lugar en la naturaleza amplificando fragmentos de ácidos nucleicos de forma exponencial en reacciones que duran entre 1 y 2 h. El proceso se lleva a cabo de forma cíclica en un termociclador y cada uno de los ciclos consta de tres fases. En la primera fase o fase de desnaturalización, el DNA extraído de la muestra biológica, se calienta a 95-98° C durante 30-90 segundos de tal modo que debido a la sensibilidad del DNA a temperaturas elevadas se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras del DNA y éstas consecuentemente se separan. A continuación, en la fase de acoplamiento, los cebadores que son moléculas de DNA de una sola cadena previamente diseñadas para ser complementarias a los extremos, se unen a su sitio complementario correspondiente de la hebra del DNA diana previamente desnaturalizado. Esta fase tiene lugar a una temperatura entre 45 y 65° C durante 30-90 segundos y precisa de los cebadores puesto que todas las DNA polimerasas necesitan un fragmento de cadena doble de DNA que les indique dónde comenzar a incorporar nucleótidos. En la tercera fase, o fase de extensión se emplea una DNA polimerasa termoestable (obtenida de *Thermus aquaticus*), a una temperatura de 72°C durante 20 segundos. Una vez terminada la serie de ciclos es preciso detectar e identificar el DNA producto de la reacción, lo cual se logra por medio de diversas técnicas (Diazaraque et al. 2002).

La amplia versatilidad de la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) permitió la rápida incorporación de esta técnica al estudio de SNPs como se describirá más adelante.

## PCR EN TIEMPO REAL

PCR en tiempo real es idéntica a la PCR punto final descrita arriba, excepto que el progreso de la reacción se realiza en presencia de fluoróforos que permiten el análisis en "tiempo real" de la reacción; es decir, conforme se sintetizan los fragmentos de DNA. Esta técnica permite cuantificar la cantidad original de DNA a partir del seguimiento del número de moléculas sintetizadas por ciclo, y el producto final también puede ser analizado. Hay una serie de formatos disponibles para monitorear la amplificación del DNA en tiempo real durante una PCR que dependen del marcador fluorescente utilizado. Los métodos más utilizados son a través de fluoróforos intercalantes o sondas fluorescentes.

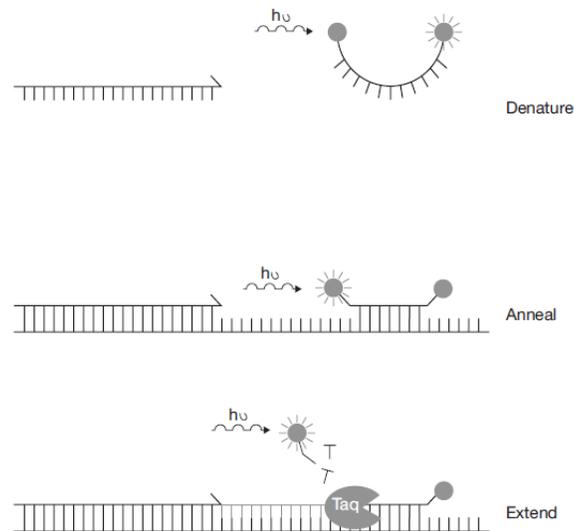
### Los fluoróforos intercalantes

Los fluoróforos intercalantes (por ejemplo SYBR Green) son la forma más simple y barata de monitorear una PCR en tiempo real. Estos compuestos emiten fluorescencia solamente cuando se unen al DNA de doble cadena. Así, cuando el número de copias de DNA aumenta durante la reacción la cantidad de fluorescencia emitida aumenta. La principal desventaja de la utilización de un fluoróforo intercalante tal como estos es la falta de especificidad ya que reportan la amplificación de cualquier DNA de doble cadena, no sólo del gen de interés.

### Las sondas fluorescentes

Las sondas fluorescentes son fragmentos de DNA complementarios a una región del DNA que se amplifica y están unidos covalentemente a un colorante fluorescente. El tipo más simple y más comúnmente utilizado es el de las sondas de hidrólisis, o tipo Taqman (Fig. 4). Estas sondas se marcan con una molécula indicadora fluorescente en un extremo y en el otro con una molécula extinguidora (capaz de "apagar" la fluorescencia del reportero). Por lo tanto antes de la reacción, la emisión fluorescente de la sonda es baja y durante la PCR la sonda se

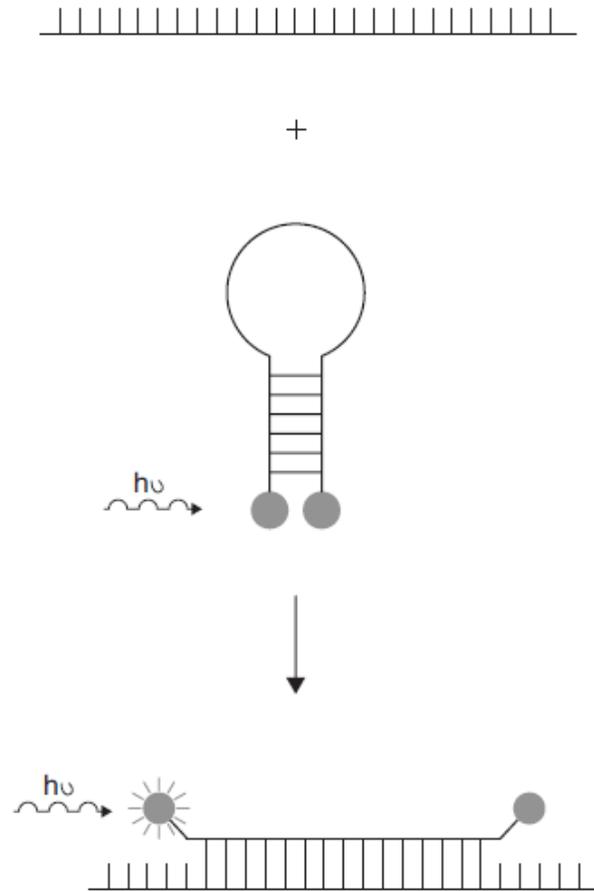
une a la región de interés que se sintetiza y la actividad de exonucleasa de la DNA polimerasa libera al fluoróforo. Por lo tanto el indicador e inactivador están físicamente separados y la fluorescencia aumenta (figura 4) (Dorak, 2006; Applied Biosystems, 2007).



**Figura 4. Emisión de señal de una sonda TaqMan.** Cuando la sonda se encuentra en solución, el reportero fluorescente es apagado por una segunda molécula por el fenómeno de FRET. Debido a que la reacción enfría para a fase de alineamiento, la sonda se une a la secuencia complementaria del templado a una temperatura mayor a lo que lo hacen los primers en la misma cadena. Durante la extensión de los primers por la polimerasa, la sonda es desplazada y degradada por la actividad 5' -> 3' exonucleasa de la DNA polimerasa, liberando al reportero de la sonda y alejándole del apagador, permitiendo la emisión de la señal para que esta sea detectada. (Dorak, 2006)

Otro tipo comúnmente usado de la sonda son los llamados faros moleculares ("molecular beacon"). Éstos son fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla, marcado con un fluoróforo reportero y una molécula apagadora en los extremos opuestos, y tiene una secuencia complementaria a una región del gen de interés. Estas sondas están diseñadas para formar una estructura de horquilla (Fig. 5) de tal manera que el reportero y el extintor tengan una mayor cercanía, por lo que minimiza la emisión fluorescente. Sin embargo, cuando la sonda se une a la región

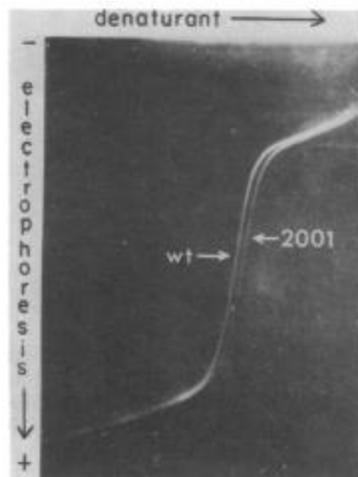
de interés, la sonda toma una conformación lineal y el fluoróforo emisor se aleja del apagador. Esto da como resultado el aumento en la fluorescencia.



**Figura 5. Emisión de señal de un “faro molecular”.** El diseño de secuencias complementarias de 4 a 6 bases de longitud en los extremos 5’ y 3’ mantienen al reportero y al apagador (quencher) en proximidad, conduciendo a una baja o nula señal por el fenómeno de FRET. Posteriormente con la fusión del templado y la sonda, ésta se alinea por complementariedad al templado cuando baja la temperatura en la fase de alineamiento. En este momento, la “molecular beacon” se encuentra completamente lineal en el templado, teniendo completamente separados al reportero y al apagador resultando en la producción de señal. A diferencia de las sondas TaqMan, las “molecular beacon” no requieren hidrólisis para la generación de señal (Dorak,2006; (Applied Biosystems, 2007).

## ELECTROFORESIS DE GRADIENTE EN GEL DESNATURALIZANTE (DGGE).

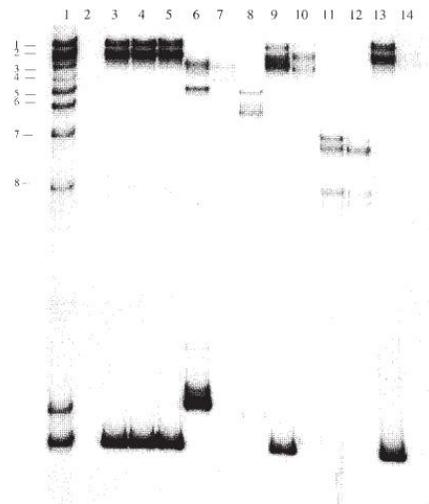
En esta técnica un fragmento de DNA, producto de una reacción de PCR se corre en un gel con un gradiente creciente de un agente desnaturalizante, por ejemplo urea, que va del 15% al 90%. A medida que migra el DNA, hay un punto en el que este comienza a desnaturalizarse y a formar zonas de cadena sencilla que frenan su migración. El punto de desnaturalización de cada fragmento de DNA depende del tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y de la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de Guanina (G) y Citosina (C), aumentando la probabilidad en el incremento de secuencias que lleven consecutivamente G o C. De esta manera se puede analizar el polimorfismo a través de la estabilidad, a distintas condiciones desnaturalizantes o a diferentes temperaturas del DNA amplificado, utilizando geles, como lo muestra la figura 6. La principal limitación de esta técnica reside en las dificultades para mantener estables las condiciones experimentales de tal manera que se obtengan resultados robustos (Fischer & Lerman, 1983)



**Figura 6. Gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante, DGGE.** La técnica permite hacer tipificación de SNPs, con poca resolución y sensibilidad, además de las dificultades técnicas propias del procedimiento (Fischer & Lerman, 1983).

## POLIMORFISMO DE CONFORMACIONES DE CADENA SENCILLA (SSCP-PCR)

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA de cadena sencilla. Las distintas conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturizante, como se esquematiza en la figura 7. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de DNA de gran tamaño, o bien bandas de tamaño muy parecido; puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos (Hayashi, 1991).

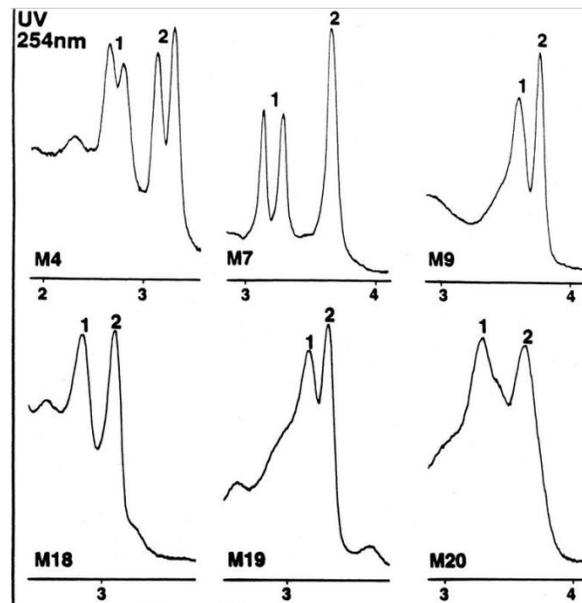


**Figura 7. Polimorfismo de conformaciones de cadena sencilla.** Se basa en la migración de una cadena sencilla, provocada por las conformaciones secundarias que la cadena pueda adquirir. Se utilizan usualmente cebadores degenerados, tal como lo reportado en Xie et al. 2002 para el análisis de genes de acuaporinas.

## CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DESNATURALIZANTE (DHPLC)

Esta técnica ha sido descrita recientemente como un método para el escaneo de SNPs y mutaciones en muestras de DNA. La técnica involucra el corrimiento de los productos de la PCR en una cromatografía líquida de par iónico en una

columna empacada con partículas alquiladas no porosas, eluyendo la columna con un gradiente de acetonitrilo, bajo condiciones de desnaturalización, donde los heterodúplex presentan alguna variación presentan un tiempo de retención menor en las columna en comparación con los homodúplex, siendo fácil de identificar los perfiles para cada muestra (Figura 8). Una de las principales ventajas del método es la utilización de equipo automatizado y la velocidad de análisis, de cerca de 5 minutos por muestra (Underhill et al. 1997).



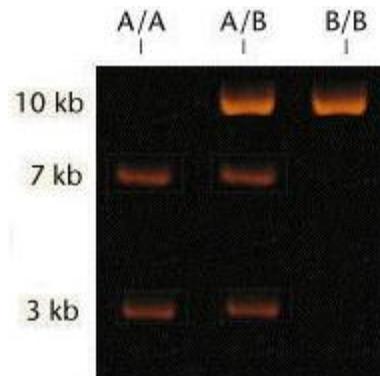
**Figura 8. Separación de DNA por HPLC.** Cromatogramas que representan la resolución de heteroduplex (picos con número 1) y homodúplex (picos con número 2). Se muestran los polimorfismos M4, M7, M9, M18, M19 y M20 respectivamente del cromosoma Y. Los amplicones de PCR fueron introducidos directamente al equipo de cromatografía (Underhill et al. 1997)

Para el caso de polimorfismos ya descritos (discriminación alélica), los métodos más comunes son:

### **POLIMORFISMO POR TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).**

El producto de amplificación de una reacción de PCR es digerido con enzimas de restricción y los fragmentos son separados en un gel de agarosa. Dada la especificidad de las enzimas de restricción se pueden distinguir cambios de una sola base pues entonces se genera o se pierde la secuencia blanco para esa

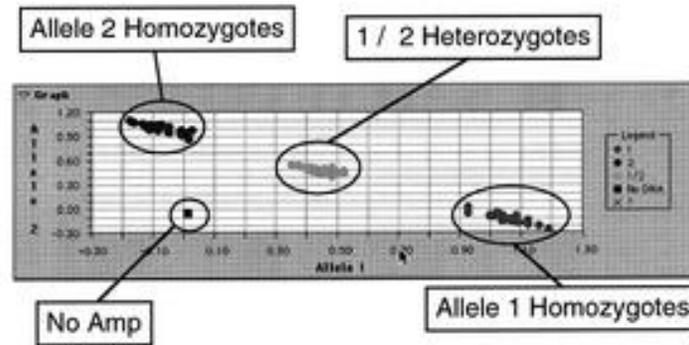
enzima de restricción y el patrón de bandas observado será distinto (Figura 9) (Caratachea, 2007).



**Figura 9. PCR-RFLP; polimorfismo por tamaño de fragmentos de restricción.** Los productos de PCR son digeridos por una enzima y posteriormente corridos en un gel de electroforesis. Muy útil para la detección de homocigotos y heterocigotos (Modificado de Klugg & Cummings, 1996).

## HIBRIDACIÓN

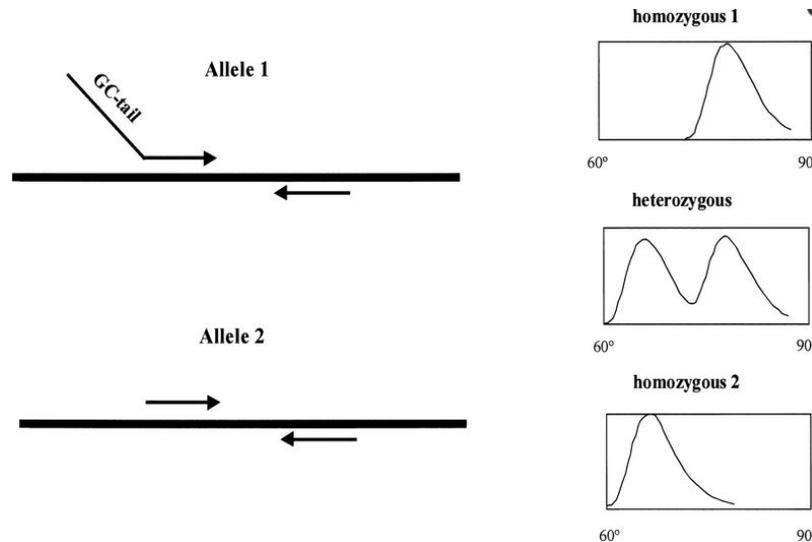
Una sonda fluorogénica, que consiste en un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y un apagador, es incluida en una PCR convencional. La amplificación de los productos específicos se aparean por complementariedad a la sonda y se genera fluorescencia. Mediante el uso de diferentes fluoróforos, varias sondas alelo-específicas pueden ser utilizadas en la misma reacción de PCR. Los ensayos son desarrollados utilizando un amortiguador simple de reacción y un protocolo sencillo de PCR (Figura 10). Aplicaciones de este ensayo incluyen la genotipificación de polimorfismos en genes involucrados con el metabolismo de fármacos (Livak, 1999).



**Figura 10. Hibridación con sondas fluorescentes.** Fluorescencia medida en una reacción de PCR en tiempo real. Software y equipo ABI 7700, Life Technologies. Se utilizan sondas marcadas con fluoróforos en el extremo 5', por lo que es necesario un equipo capaz de detectar varios fluoróforos (Livak, 1999).

## EXTENSIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMER EXTENSION).

En una reacción con dos cebadores alelo-específicos y un cebador reverso común, el DNA muestra será amplificado por cada uno, o por ambos. Del cebador delantero (forward) depende que tipo de SNP se presentará. Las muestras homocigotas para uno de los alelos serán amplificadas con un primer con una cola-GC y que resulta en una curva de fusión con una temperatura más alta, Las muestras homocigotas para el otro alelo serán amplificadas con el oligonucleótido corto y darán una curva de fusión con una menor temperatura. Las muestras de heterocigotos serán amplificadas con ambos cebadores delanteros y la curva de fusión presentará dos picos, tal como lo muestra la figura 11. El ensayo está limitado a termocicladores capaces de detectar fluorescencia, y pueden utilizarse fluoróforos como SYBR Green (Germer et al, 1999).



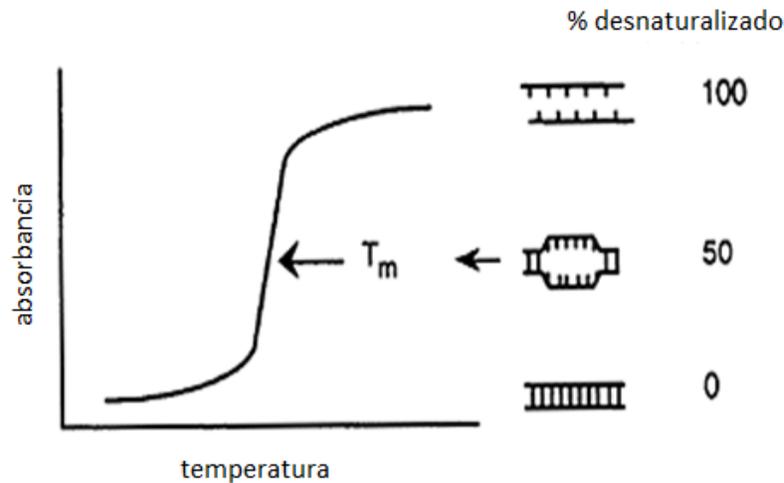
**Figura 11. Genotipificación por extensión de oligonucleótidos.** A un oligonucleótido delantero correspondiente a un alelo se le agrega una cola-GC, lo que hará que la temperatura de fusión del producto amplificado sea mayor que el otro. El perfil heterocigoto amplificará ambos alelos y la curva presentará dos picos (Germer et al. 1999)

## 4.2.FUSIÓN DEL DNA DE ALTA RESOLUCIÓN APLICADA A SNPs

### 4.2.1.DESNATURALIZACIÓN DEL DNA

La desnaturalización del DNA se refiere a la separación de la doble cadena para generar dos cadenas sencillas. Esto involucra la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases de la doble hélice. La desnaturalización del DNA por aumento de la temperatura puede ser monitoreada con un espectrofotómetro. Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción muy característica en el espectro ultravioleta cerca de 260nm y un mínimo cerca de 230nm. Se descubrió en 1950 que el espectro del DNA nativo es mucho menor que el espectro de cada uno de los nucleótidos constituyentes. La absorbancia aumenta considerablemente cuando ocurre la desnaturalización debido a una mayor exposición de las bases y a este fenómeno se le llama efecto hipercrómico (Fig 12). Para el análisis cuantitativo de este fenómeno se definió la temperatura media de fusión ó Tm que

es la temperatura a la cual el 50% del DNA dúplex está desnaturalizado (Thomas, 1993).



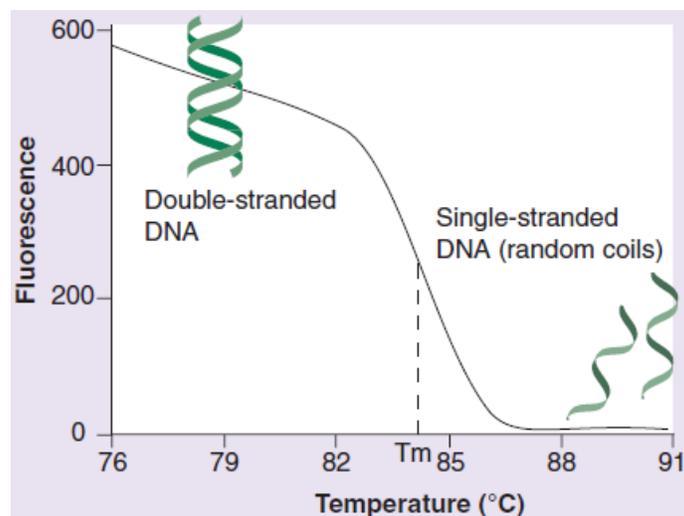
**Figura 12. Efecto hipercrómico por la desnaturalización del DNA.** A una longitud de onda de 260nm las cadenas separadas del DNA presentan mayor absorbanza que el dúplex, debido a que el espectro nativo del DNA es menor que el espectro de cada uno de sus componentes (extraído de <http://www.nbs.csudh.edu/chemistry/faculty/nsturm/CHEMXL153/NucleotidesCompandStruc.htm>).

#### 4.2.2.FUSIÓN DEL DNA DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM)

Históricamente, los métodos de fusión del DNA se basaban en la medición de la absorbanza para monitorear la separación de los dúplex, en un proceso que podía llevar horas en espectrofotómetros convencionales. Desde la década pasada, las técnicas de fluorescencia han sido introducidas para el monitoreo de la fusión de un producto de PCR a través de equipos de tiempo real.

El fundamento de la técnica HRM, es el monitoreo de la fluorescencia en tiempo real. Esto se logra mediante el uso de un fluoróforo que se intercala al DNA, cuando el fluoróforo y el DNA de doble cadena están unidos emiten fluorescencia a cierta longitud de onda. Así que en el comienzo del análisis de fusión del DNA

de alta resolución hay un alto nivel de fluorescencia en la muestra debido al número de copias del producto de PCR. Pero a medida que la muestra se calienta, las dos hebras del DNA empiezan a separarse y al final ya no hay presente ningún DNA de doble cadena y de este modo la fluorescencia se reduce. El equipo para HRM tiene un detector que monitorea este proceso mediante la medición de la fluorescencia. El equipo simplemente coteja estos datos en un gráfico conocido como una curva de fusión que muestra el nivel de fluorescencia en función de la temperatura (figura 13) (Norambuena et al. 2009). El análisis de fusión del DNA de alta resolución (HRM) es altamente sensible que permite la discriminación entre homocigotos y la detección sensible de heterocigotos (Montgomery et al. 2007).



**Figura 13. Fusión del DNA de alta resolución, HRM.** Se monitorea la disminución de la fluorescencia producida por un intercalante del dúplex. La fluorescencia disminuye cuando las cadenas se encuentran separadas (Reed et al. 2007).

### **4.2.3.GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs POR HRM**

Hace algunos años, la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido se llevaba a cabo en dos pasos. Primero, la amplificación de una región de DNA de aproximadamente 200 pares de bases en todo el SNP por medio de una PCR seguido de la secuenciación de este fragmento o bien su digestión con una enzima de restricción y análisis por electroforesis. El desarrollo de RT-PCR facilita el análisis y la cuantificación porque a partir de secuencias de DNA blanco, la genotipificación puede ser posible en un único ciclo de PCR. Además de la mayor velocidad de los instrumentos de PCR - en particular menos de una hora para un ciclo completo de PCR - el riesgo de contaminación se minimiza porque el producto de PCR permanece en el equipo para la genotipificación. Por otra parte, el proceso de amplificación se puede supervisar en tiempo real (Reuter et al. 2005).

El análisis HRM se ha convertido en un método robusto para la genotipificación, incluyendo SNPs. Los pares de nucleótidos C-G tienen una tolerancia de temperatura de fusión más alto que en los pares A-T, y este último tiene una mayor tolerancia de las deleciones. Si un alelo tiene una mayor proporción de pares de C-G que otro alelo, el alelo presenta una temperatura de fusión superior (Palais et al. 2005).

Los SNPs se han clasificado de acuerdo al cambio en las bases, como se describe en la tabla 1. Existen 4 tipos de cambios y cada uno contribuye en mayor o menor escala a la curva de fusión. Por ejemplo, los SNPs clase 1 se presentan cuando el cambio de base es C/T o G/A, produciendo perfiles de fusión con una diferencia en la  $T_m$  mayor a  $0.5^{\circ}\text{C}$  (Erali & Wittwer, 2010).

Clase de SNP	Cambio de base	Desplazamiento típico de la Tm	Frecuencia en el Genoma Humano
1	C/T y G/A	>0.5°C	64%
2	C/A y G/T	>0.5°C	20%
3	C/G	0.2 – 0.5°C	9%
4	A/T	<0.2°C	7%

**Tabla 1. Clasificación de los SNPs, de acuerdo a la clasificación de Venter en 2001.** Cambios de bases relacionados y frecuencia en el genoma humano. El cambio en los perfiles de fusión es mayor en los SNPs clase 1 y 2, a diferencia de los de clases 3 y 4 donde las variaciones de las curvas de fusión son poco perceptibles.

Específicamente, los genotipos de variantes de una sola base, homocigotos de clase 3 y clase 4, también conocido como “pares de bases neutrales”, son difíciles de distinguir por Tm. En el genoma humano, cerca del 85% de las variantes de una sola base son de clase 1 o 2 con homocigotos y diferencias de Tm alrededor de 1°C que son fáciles de diferenciar. Las variantes de Clase 3 y Clase 4 tienen diferencias de Tm alrededor de 0,25°C. 16% de las variantes humanas de una sola base. Incluso en las mejores condiciones y con los mejores instrumentos, algunos loci no pueden genotipificarse por fusión de simple de un amplicón (Erali & Wittwer, 2010).

Existen dos formas para la genotipificación de SNPs por medio de HRM; una es utilizando amplicones cortos y la otra es mediante el uso de sondas no marcadas. Ambas variantes se describen a continuación.

#### **4.2.3.1.AMPLICONES CORTOS**

La genotipificación de SNPs humanos por fusión de alta resolución es posible en más de 90% de los casos utilizando los productos de PCR cortos, llamados amplicones (Palais et al. 2005). HRM ha sido adaptada para análisis de SNPs polimórficos a través de la amplificación por PCR de pequeños amplicones debido

a que el acortamiento del amplicón resulta en la diferencia entre los perfiles de fusión y aumenta la sensibilidad de la técnica. De esta manera podría entonces ser utilizada no sólo para la exploración, sino también para la genotipificación precisa, lo cual implica el conocimiento de la secuencia exacta. Por lo tanto, las diferencias de secuencia entre homocigotos silvestres, y heterocigotos son más aparentes. Muchas de las variantes por una sola base o SNPs, pueden ser genotipificadas por fusión de alta resolución porque muchos homocigotos difieren en su  $T_m$ . Sin embargo, los homocigotos de algunas variantes de una sola base y muchas inserciones y deleciones tienen  $T_m$  similares o idénticas y por lo tanto no pueden diferenciarse (Erali & Wittwer, 2010).

Aunque se han genotipificado SNPs dentro de amplicones de hasta 544 pb de longitud, el uso de un amplicón corto es deseable. El uso de amplicones pequeños de cerca de 50 pb permite también un ciclo térmico rápido (Reuter et al. 2005 ); asimismo, la amplificación se completa en 12 a 15 min y es seguida por un análisis de fusión de alta resolución, que dura alrededor de 2 min (Liew et al. 2004).

Si la región dúplex es corta, como para la mayoría de las sondas sintetizadas, la fusión se produce en un solo paso sin estados intermedios y la temperatura de fusión ( $T_m$ ) se define como la temperatura a la cual la mitad de los dúplex se han dissociado. La  $T_m$  de los dúplex cortos generalmente puede ser estimada dentro de un intervalo de  $\pm 2^\circ\text{C}$ , considerando la termodinámica de las bases vecinas. En contraste, los productos de la PCR más largos se pueden desnaturalizar en múltiples etapas o "dominios", con regiones ricas en AT que funden a temperaturas más bajas que las regiones ricas en GC. Típicamente, el rango para hacer este análisis va desde 50 a 500 pb (Norambuena et al. 2009).

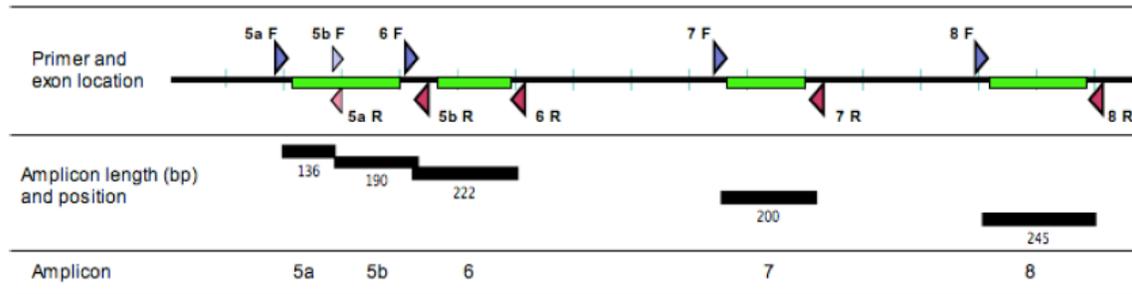
Para lograr mejores resultados, la secuencia de los cebadores se seleccionan tan cerca de la SNP como sea posible. Las diferencias entre las  $T_m$  de los genotipos aumentan a medida que disminuye el tamaño de amplificación, permitiendo una mejor diferenciación. Con amplicones cortos el tiempo de los ciclos se puede

minimizar porque las temperaturas de fusión de estos permiten la desnaturalización a bajas temperaturas durante los ciclos, además de un aumento de especificidad.

Otra ventaja de la síntesis de amplicones cortos es que no se requiere mantener la temperatura de extensión (72°C) por mucho tiempo. Sin embargo, las posibles desventajas de amplicones pequeños son: una menor flexibilidad en la elección de cebadores y dificultades para distinguir entre dímeros de cebadores y de productos deseados de amplificación en geles o durante análisis en tiempo real.

Existen protocolos disponibles comercialmente que hacen el ciclo completo de PCR en tiempo real en 12 minutos como son LightCycler™ o instrumentos de bajo costo como RapidCycler II™. La detección de heteroduplex de amplicones pequeños es favorecida por el rápido enfriamiento antes de la fusión, calentamiento rápido durante la fusión, y concentraciones bajas de Mg<sup>2+</sup>. Aunque en tiempo real convencional los instrumentos pueden ser utilizados para la fusión, su resolución es limitada. Pequeñas diferencias entre las T<sub>m</sub> de homocigotos no se distinguen en instrumentos convencionales, debido a la adquisición de los datos del equipo y el rampeo de las temperaturas (Liew et al. 2004).

Debido a las características ventajosas de HRM a través de pequeños amplicones, esta técnica está siendo introducida rápidamente en los laboratorios de diagnóstico para la determinación del genotipo de las enfermedades asociadas a genes (Norambuena et al. 2009). La figura 14 muestra la utilización de amplicones cortos, de menos de 200 pb, para la detección de variantes bien localizadas dentro de un gen asociado con cáncer (Krypuy et al. 2007).

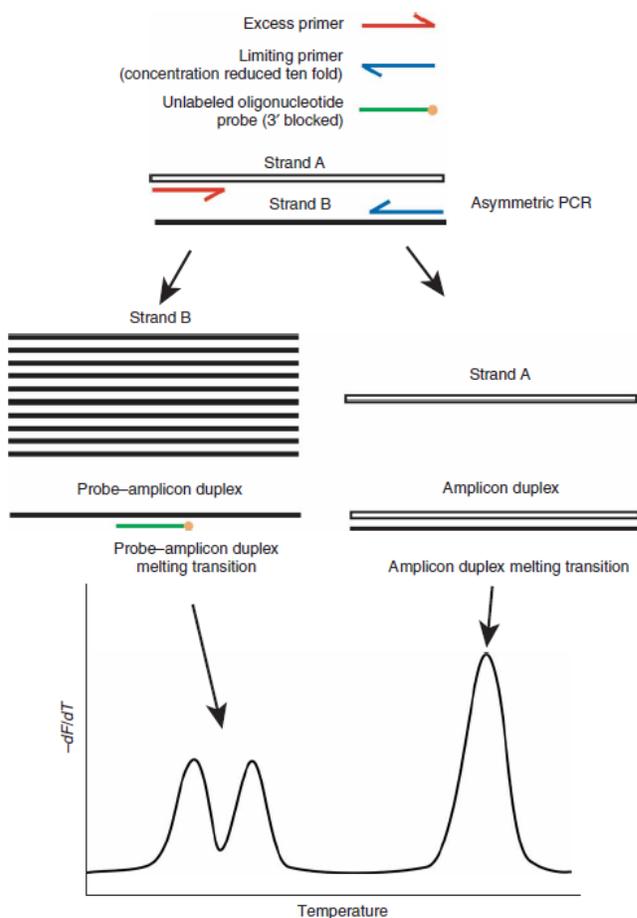


**Figura 14. Utilización de amplicones cortos para el escaneo de SNPs.** Representación de la utilización de amplicones cortos para el escaneo de variantes dentro de un mismo gen. Se utilizaron 4 amplicones de menos de 200 pb para la búsqueda de variantes bien localizadas en los exones 5 al 8 del gen p53, asociado con cáncer. En color negro los amplicones de PCR, amplificados por los primers con flechas azules y rojas (Krypuy et al. 2007)

#### 4.2.3.2.SONDAS NO MARCADAS

Una variación interesante de la genotipificación con fluoróforos saturantes es la de incluir una sonda no marcada. En adición a la amplificación por PCR, la sonda produce datos adicionales de la fusión enfocados en la región a la que se asocia. Concentraciones diferentes de primers son utilizados para generar una hebra de DNA en exceso. Algunas de las hebras en exceso hibridan con la sonda no marcada por complementariedad. Tanto los dúplex de la sonda como el amplicón son saturados con el colorante fluorescente, dando como resultado regiones de fusión para ambos. Cada región por separado produce datos ambiguos, los cuales considerados juntos proveen un nivel de confianza adicional. Cuando únicamente se considera la región de la sonda no marcada, las curvas de fusión son usualmente trazadas como derivadas. Los datos obtenidos por la genotipificación usando sondas no marcadas son muy similares a los obtenidos en genotipificación con amplicones cortos. Cuando se utilizan sondas no marcadas los gráficos de fusión se expresan como derivadas negativas, de la diferencia de la fluorescencia con respecto al tiempo ( $-dF/dT$  vs  $T$ ), lo anterior debido a que lo que se mide es la caída de la fluorescencia (De Silva & Blackett, 2007).

La genotipificación de SNPs con sondas no marcadas fue descrita por primera vez en 2004. Para prevenir la extensión de la polimerasa, las sondas son bloqueadas en su extremo 3' a menudo por un grupo fosfato, aunque presentan mayor estabilidad con otros bloqueadores. La fusión de alta resolución mejora la calidad de las curvas y permite que mayores variaciones sean distinguidas. La genotipificación con sondas no marcadas puede ser desarrollada en instrumentos de baja resolución, dependiendo del software utilizado. Las sondas son usualmente adicionadas durante la PCR, aunque pueden ser añadidas después de la amplificación sin romper el ambiente de tubo cerrado (Reed et al. 2007). La figura 15 muestra el procedimiento para la genotipificación con sondas no marcadas, que es recomendada para regiones altamente polimórficas y la representación gráfica de los mismos.



**Figura 15. HRM para la genotipificación de SNPs con sondas no marcadas.** La clave para el éxito en el método con sondas no marcadas es el uso de una PCR asimétrica, donde se utiliza un cebador en exceso, dando como resultado la sobreproducción de la cadena diana reconocido por la sonda y el uso de LCGreen Plus como colorante, que es capaz de producir una fuerte señal fluorescente procedente de la interacción sonda-diana (Montgomery et al. 2007).

Algunos de los blancos que se han estudiado para genotipificar usando sondas no marcadas incluyen los genes del factor V, fibrosis cística, antígenos humanos de plaquetas, el proto-onco gen RET, lactasa y talangiectasia hemorrágica hereditaria (Reed et al. 2007).

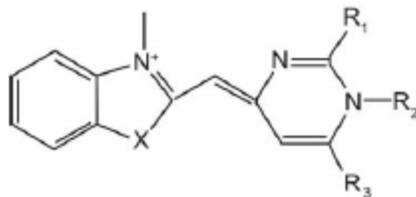
La genotipificación por fusión con sondas no marcadas y amplicones han sido recientemente comparados. La genotipificación con sondas es exitosa en la gran mayoría de los casos. Por el contrario, el éxito de la genotipificación por amplicones cortos depende de la diferencia entre  $T_m$  de los homocigotos y de la resolución del equipo. La precisión de la genotipificación es mejor con amplicones de menor tamaño ya que las diferencias entre las  $T_m$  son atenuadas y las posibilidades de variaciones entre los cebadores es menor. Muchas de las variantes pueden ser directamente genotipificadas por fusión de amplicones, pero una pequeña minoría requiere la mezcla con un genotipo conocido. Controles internos de temperatura pueden ser utilizados para mejorar la precisión de la genotipificación, especialmente en instrumentos con baja resolución (Reed et al. 2007).

#### **4.2.4.AGENTES INTERCALANTES FLUORESCENTES PARA HRM**

El fundamento de la técnica HRM es el monitoreo de la fluorescencia en tiempo real. Esto se logra mediante el uso de un fluoróforo que se intercala al DNA cuando están unidos emiten fluorescencia a cierta longitud de onda. Así que en el comienzo del análisis de fusión del DNA de alta resolución hay un alto nivel de fluorescencia en la muestra debido a los miles de millones de copias del amplicón. Pero a medida que la muestra se calienta, las dos hebras del DNA empiezan a separarse y al final ya no hay DNA de doble cadena y de este modo la fluorescencia se reduce. El equipo para HRM tiene un detector que monitorea este proceso mediante la medición de la fluorescencia. El equipo simplemente coteja estos datos en un gráfico conocido como una curva de fusión, que muestra el nivel

de fluorescencia en función de la temperatura (<http://www.gene-quantification.de/hrm-dyes.html>).

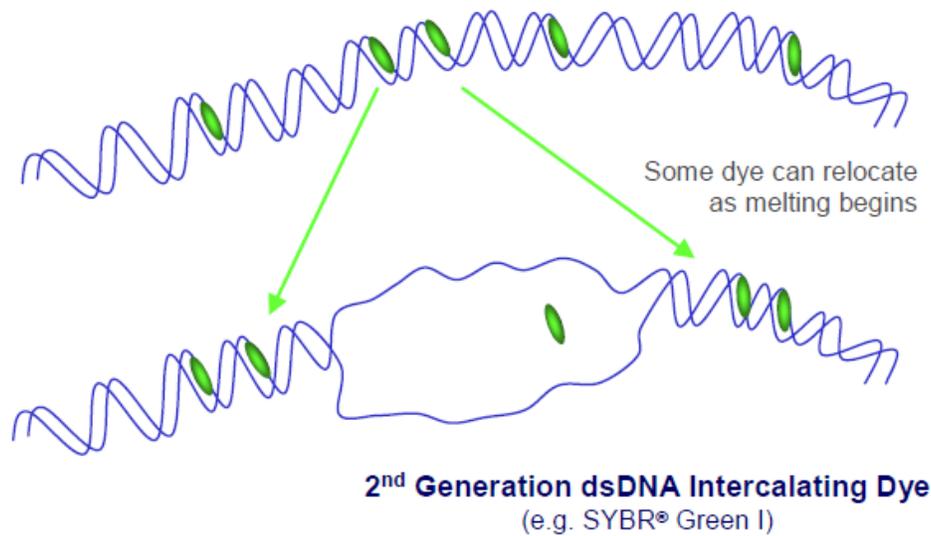
Los resultados obtenidos con SYBR Green I han sido cuestionados ya que con este fluoróforo es difícil garantizar la saturación del producto de la PCR, únicamente en concentraciones limitadas, antes de que se inhiba la PCR (Reed et al. 2007). Los agentes intercalantes de tercera generación tales como SYTO 9 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), LC Green (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT) y Eva Green (Biotium Inc., Hayward, CA) han sido utilizados con éxito para el análisis de HRM en el Rotor-Gene 6000 (Reja y Bassam). La figura 16 muestra la estructura básica de los agentes de tercera generación que han sido desarrollados para la técnica de HRM



**Figura 16. Estructura básica de los intercalantes de tercera generación.** La mayoría conocidos como LCGreen, donde X es usualmente azufre u oxígeno. Las cadenas R1-R3 son generalmente hidrógenos, o moléculas alifáticas o aromáticas. (Dorak, 2007)

Estos fluoróforos no inhiben la reacción de amplificación por lo que se pueden utilizar en concentraciones más altas para una mayor saturación de la muestra de DNA de doble cadena. Una mayor saturación significa medir señales fluorescentes que tienen una mayor fidelidad, aparentemente porque hay menos redistribución dinámica del colorante a regiones no desnaturalizadas durante la fusión. Además, la presencia de los intercalantes no aumenta la temperatura de fusión de los amplicones. La combinación de estas características ofrece una mayor resolución en la determinación de la T<sub>m</sub>, sensibilidad y perfiles de fusión más alto (Corbett Life Science, 2006). La figura 17 esquematiza la distribución de los agentes

saturantes en el DNA, siendo los de tercera generación los mejor recomendados para aplicaciones en HRM por permitir una mayor sensibilidad y resolución, entre otras ventajas.



**Figura 17. Distribución de los agentes intercalantes durante la fusión del DNA.** La reducción en la toxicidad de los agentes de tercera generación significa que estos pueden utilizarse en mayor concentración, además de que no inhiben la PCR. La saturación de los colorantes fluorescentes de tercera generación ha sido desarrollada para evitar su redistribución en la fusión del DNA, lo cual incrementa la resolución del análisis de HRM (Corbett, 2006).

Algunas características de los colorantes fluorescentes de saturación que se utilizan actualmente para seguir la desnaturalización de los amplicones de DNA de la muestra, con el fin de realizar el análisis de HRM se enlistan en la tabla 2.

Agente intercalante	Fabricante	Características
LC Green Dyes	BioChem	LC Green, están diseñados específicamente para el análisis de fusión de alta resolución para detectar las variantes de secuencia de DNA. La adición de estos colorantes aumenta la temperatura de fusión de DNA por 1 a 3 ° C y puede requerir el ajuste de parámetros de los ciclos.
Syto Dye	Invitrogen	Muestran una gran mejora en la fluorescencia una vez que se unen a secuencias de doble hebra de ácido nucleico. Estos colorantes están disponibles comercialmente como tintes fluorescentes azul, verde, naranja o rojo
Eva Green	Biotium Inc.	EvaGreen es un colorante fluorescente verde de ácidos nucleicos ampliamente utilizado para análisis de fusión de alta resolución. El colorante no es fluorescente por sí mismo, pero se convierte en altamente fluorescente tras la unión a DNA de doble hebra. Es no mutagénico y no citotóxico y es completamente impermeable a las membranas celulares.
ResoLight	Roche	Agente intercalante fluorescente diseñado para HRM en el instrumento LightCycler 480. Fluoresce fuertemente únicamente cuando se asocia a DNA de doble cadena

**Tabla 2. Agentes intercalantes fluorescentes usados para HRM..** ( Modificado de [:http://www.gene-quantification.de/hrm.html](http://www.gene-quantification.de/hrm.html))

#### **4.2.5. INSTRUMENTACIÓN REQUERIDA PARA HRM**

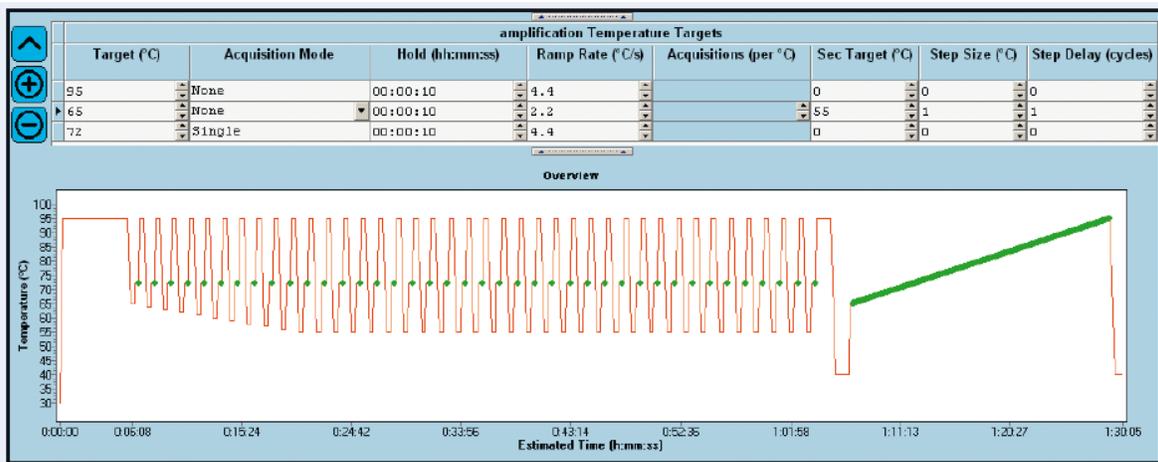
Idaho Technology, en colaboración con la Universidad de Utah, fue el primero en comercializar en el año del 2002 un instrumento fabricado específicamente para realizar análisis de la curva de fusión (Reed et al. 2007). Este equipo, el HR-1, permitió explorar el potencial de la HRM y ha sido el punto de referencia de rendimiento para la adquisición de una curva de fusión individual. Sin embargo, el HR-1 no es un termociclador y sólo se podía analizar una muestra individual de 10  $\mu$ L dentro de un capilar de vidrio diseñado para el LightCycler de Roche (Gundry et al. 2003).

Otros instrumentos de mayor utilidad práctica se introdujeron en el mercado muy pronto después del HR-1. Los primeros instrumentos de pozos múltiples para HRM fueron el Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) y el LightScanner (Idaho Technology). Estos dos instrumentos se introdujeron aproximadamente al mismo tiempo, pero emplean fundamentalmente innovaciones técnicas diferentes para lograr HRM. El LightScanner utiliza una versión modificada basada en placas disponibles en versiones de 96 y 384 pozos. A pesar de la ingeniería avanzada, todavía presenta variaciones térmicas y ópticas entre muestras y no puede igualar el punto de referencia establecido por el desempeño del instrumento original HR-1. Al igual que el HR-1, la LightScanner es un fluorómetro que no es capaz de hacer PCR.

El Rotor-Gene 6000 fue el primero de los instrumentos de pozos múltiples capaces de realizar ciclos térmicos y HRM. Esta capacidad dual permite la síntesis del amplicón por PCR, seguida del análisis HRM. Una ventaja importante de esto es que las gráficas de amplificación se pueden utilizar para ayudar a interpretar los resultados de HRM. De esta manera, los perfiles de amplificación aberrantes también producirán curvas incorrectas y las muestras comprometidas pueden ser fácilmente identificadas y eliminadas para el análisis de HRM. La principal ventaja de la Rotor-Gene para HRM se deriva de su diseño giratorio, en el que las

muestras giran bajo fuerza centrífuga por lo que pasan por un detector óptico común. Así, la variación térmica y óptica entre las muestras es insignificante, lo que mejora el análisis HRM. El resultado es que el rendimiento del Rotor-Gene se asemeja al de referencia (HR-1) con el compromiso de que las muestras no están dispuestas en un formato de matriz convencional (como lo son en los instrumentos basados en bloques), sino que están dispuestas alrededor del perímetro de un rotor (<http://www.gene-quantification.de/hrm.html>).

Los instrumentos de PCR-tiempo real en formato de placa no diseñados específicamente para HRM tienen un rendimiento pobre en comparación con el HR-1 y el LightScanner (Herrman et al. 2006). Una excepción es el LightCycler 480 de Roche (Dorak, 2007). Este equipo es capaz de realizar ensayos de PCR y HRM en los formatos de 96 y 384 muestras. La figura 18 muestra la programación del LightCycler 480, en donde el paso de HRM es inmediatamente posterior a los ciclos térmicos.



**Figura 18 Programación de HRM acoplada con la PCR para el equipo LightCycler 480.** La técnica se convierte en un proceso de un solo paso, en donde la fusión de los amplicones de PCR se realiza inmediatamente después de la amplificación, reduciendo el tiempo de la corrida y la posible contaminación de los productos de PCR (Roche Applied Science, 2008).

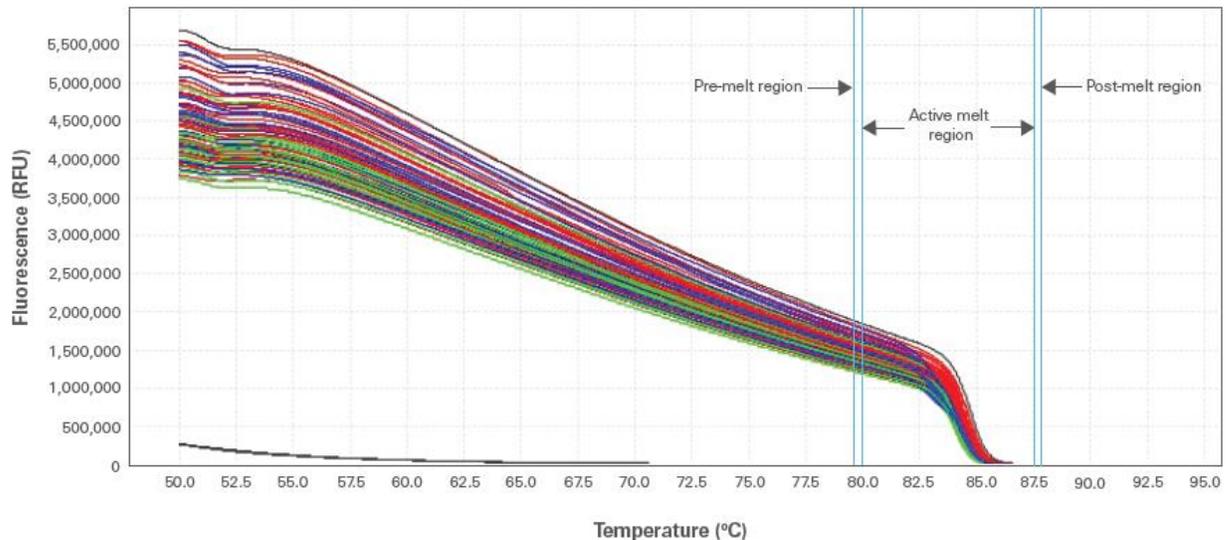
Dadas las ventajas que representa el análisis HRM, los fabricantes de termocicladores han introducido esta capacidad en sus nuevos diseños o bien, se están planeando lanzar actualizaciones de software para apoyar el análisis de

HRM. Sin embargo, los instrumentos no diseñados específicamente para HRM se desvían mucho de la referencia de rendimiento HR-1, por lo que deberá hacerse una cuidadosa investigación antes de aceptar esos instrumentos que hagan HRM (<http://www.gene-quantification.de/hrm.html>).

#### **4.2.6. ANALISIS DE DATOS**

Los experimentos de HRM generan perfiles de fusión del DNA que son a la vez específicos y suficientemente sensibles para distinguir especies de ácidos nucleicos basadas en diferencias discretas de secuencia, lo que permite la genotipificación. El análisis HRM es un método no destructivo, para posterior caracterización por ejemplo, mediante electroforesis en gel o secuenciación.

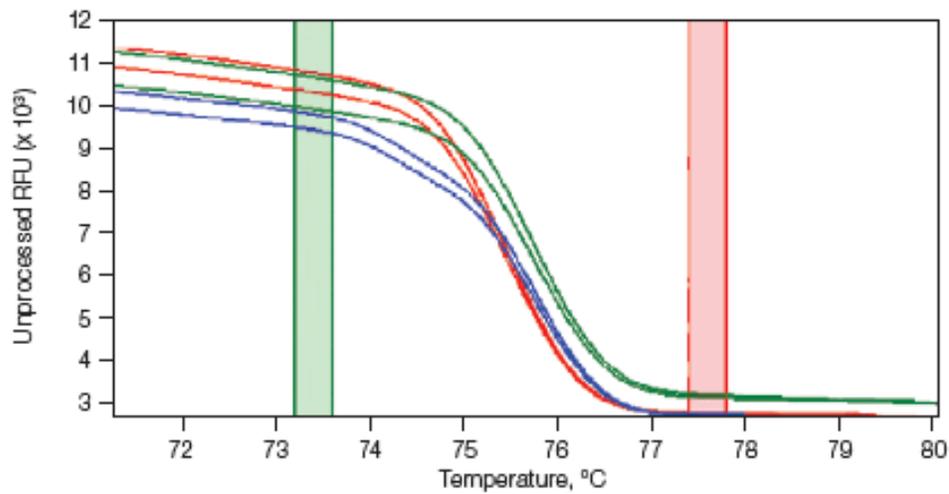
Las curvas de fusión son rutinariamente utilizadas en experimentos de qPCR para asegurar la especificidad de los primers, con datos recogidos típicamente en un rango de temperatura de 65-95°C en incrementos de 0.5°C. Para los experimentos de HRM, los datos se capturan de manera general a incrementos de temperatura más estrechos que para los protocolos estándar de la curva de fusión, comúnmente en incrementos de 0.2°C. La velocidad del incremento de la temperatura resulta crucial para el éxito de la técnica. Dependiendo de cada templado y de las condiciones experimentales, el aumento de la densidad de puntos de datos capturados pueden ayudar en la generación de perfil de fusión y la discriminación subsecuente de datos (Garritano et al. 2009). La figura 19 muestra la obtención de los datos crudos de HRM, sin ningún tratamiento.



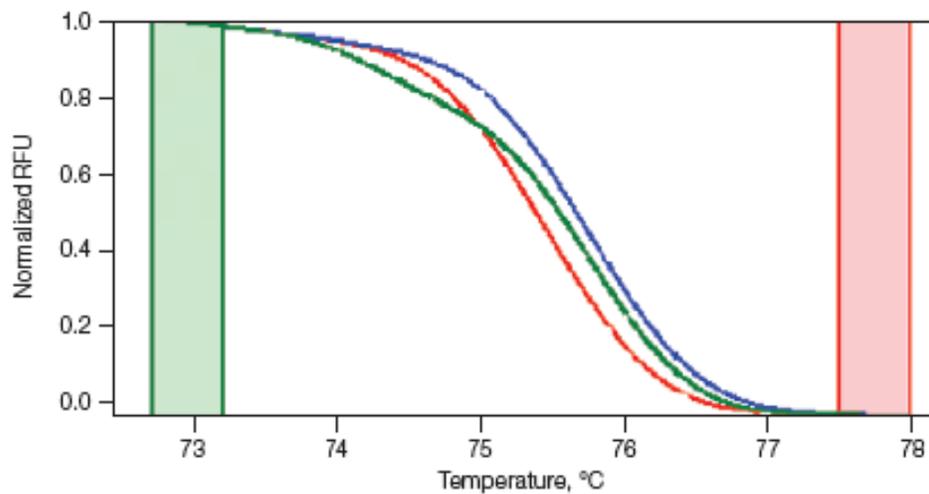
**Figura 19. Datos crudos de curvas de fusión del DNA.** Los datos obtenidos en un ensayo de fusión del alta resolución exhiben un intervalo amplio de lecturas iniciales de fluorescencia, haciendo difícil la discriminación para muestras individuales. La región activa de fusión es delimitada por regiones pre y post-melting para el alineamiento de los datos. (Life Technologies, 2009)

El Software de análisis HRM se utiliza entonces para identificar áreas de intensidad de fluorescencia estables pre-y post-fusión a partir de la curva HRM (Figura 20A). Estas señales son entonces automáticamente normalizadas a valores relativos entre 0 y 1 respectivamente (Figura 20B), eliminando las diferencias en la fluorescencia de fondo y aumentando la capacidad de detectar diferencias sutiles en los perfiles de fusión. Ambos cambios de temperatura de fusión y forma de la curva se puede utilizar para identificar diferencias en la secuencia. Variantes homocigotos de secuencia se caracterizan típicamente por cambio de la temperatura (eje x) observado en una curva HRM. (Figura 20B, rojo y azul). Por otro lado, los heterocigotos se caracterizan generalmente por un cambio en la forma de la curva de fusión generada a partir de apareamiento de bases desajustadas (Figura 20B, línea verde) como resultado del heterodúplex desestabilizado alineado entre algunas de las hebras de tipo salvaje y la variante. Los datos de HRM a menudo se representan visualmente como curvas de fusión para amplificar diferencias entre los perfiles de fusión de grupos diferentes dentro del mismo genotipo (Bio Rad Laboratories Inc, 2010).

### A. Melt Curve

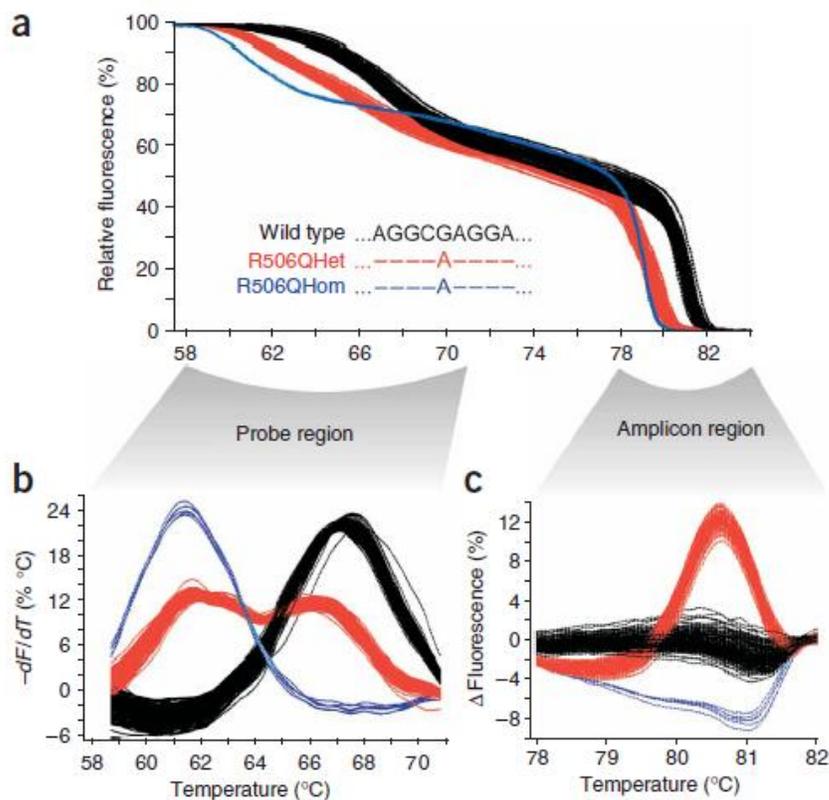


### B. Normalized Melt Curve



**Figuras 20A y 20B. Análisis datos de HRM para genotipificación de SNPs.** Figura A. El análisis se hace tomando en cuenta valores constantes para las fases de pre y post-melting, con el objetivo de disminuir las diferencias entre muestras. Posteriormente se normalizan las curvas. Figura B. Las señales son normalizadas para valores de entre 0 y 1. Las curvas normalizadas permiten la discriminación de la mayoría de SNPs. (Bio Rad Laboratories, 2010)

El análisis con sondas permite una discriminación más fina de las variantes por debajo de la sonda. Las sondas pueden ser diseñadas para cubrir varios tipos de variantes. Múltiples sondas no marcadas pueden aplicarse para diferentes regiones amplificadas, por ejemplo, dos sondas son estratégicamente posicionadas en el exón 10 de la fibrosis cística para genotipificar seis diferentes variantes. La utilización de sondas no marcadas es útil cuando la fusión de amplicones cortos no provee mayores detalles en regiones altamente polimórficas. La genotipificación con sondas no marcadas también puede ser combinada con el escaneo de variantes desconocidas. Cualquier variación de secuencia entre las regiones de los primers afectará la fusión del amplicón, mientras que las variaciones en la región por debajo de la sonda afectarán únicamente la fusión de dicha región (Reed et al. 2007). La figura 21 refleja el análisis de datos para la genotipificación de SNPs por HRM con el uso de sondas no marcadas estudiando el SNP de Factor V de Leiden (R506Q).



**Figura 21. Análisis de HRM mediante sondas no marcadas.** a) Curvas de fusión normalizadas. b) Información por debajo de la sonda no marcada, se distinguen los 3 genotipos con la derivada negativa de la Fluorescencia con respecto al tiempo (-dF/dT). c) Información del amplicón ( $\Delta F$ ).

#### 4.2.7.RECOMENDACIONES TÉCNICAS PARA HRM

Aunque por lo general la técnica de HRM es altamente eficaz, el éxito en el análisis depende en gran medida de la secuencia particular bajo investigación. Ciertos motivos de secuencia, tales como bucles en horquilla u otras estructuras secundarias; así como también regiones localizadas de secuencias inusualmente con alto o bajo contenido de GC, o repeticiones múltiples, pueden afectar el resultado de manera impredecible.

Sin embargo, las siguientes son algunas pautas sencillas para ayudar a mejorar la obtención y análisis de los datos:

### 1. Analizar pequeños fragmentos de DNA

Analizar fragmentos no mayor de aproximadamente 250 pb. Productos más largos pueden ser analizados con éxito pero por lo general con una menor resolución. Esto es simplemente porque una variación de una sola base afecta el comportamiento de la curva de fusión en un amplicón de 100 pb más que un amplicón de 500 pb, por ejemplo.

### 2. Analizar un solo producto puro

Muestras contaminadas con artefactos posteriores a la amplificación, tales como dímeros de cebadores o productos no específicos pueden hacer que los resultados de HRM sean difíciles de interpretar.

### 3. Usar suficiente templado para la PCR

La captura y el análisis de los datos de amplificación en tiempo real pueden ser muy útiles para la solución de problemas en el análisis de HRM. Las gráficas de amplificación deben tener un CT (ciclo umbral) de no más de 30 ciclos. Los productos que se amplifican usando más ciclos se deben a una cantidad muy pequeña de templado o bien por los efectos de degradación de éste, y se caracterizan por producir resultados variables debido a la amplificación de artefactos.

### 4. Comprobación de gráficas de amplificación aberrantes

Antes de ejecutar HRM, examinar cuidadosamente datos en tiempo real de curvas anormales de amplificación. Curvas que presenten una fase log-lineal que no sea pronunciada, que sea irregular, o bien que tenga una meseta con baja señal en comparación con otras reacciones de amplificación puede indicar una señal de fluorescencia demasiado baja para su futura detección por HRM. Las reacciones pobres puede ser causada por inhibidores de la DNA polimerasa, baja concentración de colorantes, configuración incorrecta de la reacción, etc. Los datos arrojados de estas muestras pueden no ser concluyentes o de menor resolución.

#### 5. Mantener concentraciones similares posteriores a la amplificación

La concentración de un fragmento de DNA afecta a su temperatura de fusión ( $T_m$ ), debido a que altas concentraciones de DNA favorecen la formación de dúplex; a medida que aumenta la concentración aumentará la  $T_m$ . Por esta razón las concentraciones de la muestra de DNA deben ser lo más similares posible. Al analizar los productos de amplificación, asegurar que cada reacción ha amplificado a la fase de meseta. En la meseta, todas las reacciones se han amplificado en un grado similar independientemente de su cantidad inicial. Es importante tener en cuenta que las reacciones “pobres” podrían no alcanzar la meseta con la misma cantidad amplificado debido, por ejemplo, a configuraciones inconsistentes del ensayo (por ejemplo, la concentración de cebadores es muy baja).

#### 6. Uniformidad de las muestras

Todas las muestras deben ser de igual volumen y deben contener la misma concentración de colorante. El comportamiento de la fusión del DNA se ve afectada por las sales en la mezcla de reacción, por lo que es importante que la concentración de amortiguadores, sales de  $Mg^{2+}$  y otros sean tan uniformes como sea posible en todas las muestras. Del mismo modo, es necesario usar solamente tubos de reacción del mismo fabricante para evitar variaciones debidas al grosor de plástico y propiedades de autofluorescencia.

#### 7. Permitir la recopilación de datos suficientes para las fases de pre y post fusión.

Capturar los datos del HRM en una ventana de  $10^\circ C$  (o superior), centrada en torno a la  $T_m$  observada. Esto proporciona suficientes puntos de referencia para la eficaz normalización de los datos, lo cual dará lugar a la interpretación más estricta (Corbett, 2006).

#### **4.2.8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA TÉCNICA**

La técnica de fusión del DNA de alta resolución es un nuevo método para análisis del DNA, y constituye el método más simple para genotipificación y análisis de secuencias, aún se encuentra en constante desarrollo, con potencial como una herramienta rápida y precisa en genotipificación y diagnóstico. No requiere separaciones o procesamiento adicional de las muestras, a diferencia de muchas de las técnicas anteriormente utilizadas para genotipificación. Posterior a una amplificación por PCR, las curvas de fusión son generadas monitoreando la fluorescencia de un agente intercalante-saturante (Reed et al. 2007).

La fusión del DNA de alta resolución es el método de elección para la detección de genes de varios exones basados en la simplicidad de la técnica, costos, la sensibilidad y especificidad (Erali & Wittwer, 2010).

Estudios de genética de poblaciones dirigidas a la detección de SNPs han empleado una variedad de métodos de genotipificación (revisado en Kwok 2003), afectado por una o más de las siguientes deficiencias asociadas principalmente con la manipulación posterior a la PCR:

Falsos negativos (por ejemplo, falta de actividad endonucleasa), consume mucho tiempo con numerosos pasos y plataformas (por ejemplo, geles, las reacciones enzimáticas y procedimientos de limpieza), y costosos (por ejemplo, sondas marcadas fluorescentemente). Además, el análisis de SNPs informativo puede no coincidir con el sitio de reconocimiento de una endonucleasa, o un polimorfismo de longitud de alelos puede no existir dentro de un amplicón, como es el caso que se presenta en la técnica de RFLP. HRM sortea más de estas limitaciones.

Una preocupación es que con HRM la fuerza iónica y concentración de la reacción podrían alterar la temperatura de fusión del amplicón. Esto se puede explicar por

qué ha sido HRM limitado a estudios clínicos o de diagnóstico, donde la uniformidad en la calidad y cantidad de DNA molde es generalmente más alto que las muestras recogidas en el campo (Smith et al. 2009).

Algunas de las ventajas considerables para implementar HRM son las siguientes:

### **1. Rentable**

El análisis de fusión del DNA de alta resolución es más barato que las tecnologías de genotipificación de SNPs tales como la secuenciación y tipificación Taqman. Esto lo hace ideal para grandes proyectos de genotipificación.

### **2. Trabajo sencillo y flujo rápido**

Después de realizar la amplificación por PCR de la secuencia blanco, no se requiere instrumentación adicional para el análisis de HRM, ya que el mismo instrumento acopla la PCR con la fusión del DNA.

### **3. Rápido y potente**

El análisis HRM es rápido y potente, debido a que es capaz de determinar el genotipo de un gran número de muestras en un corto tiempo, con un alto nivel de precisión a diferencia de los geles, que son poco precisos y muchas veces con protocolos lentos.

### **4. Bajo consumo de reactivos**

El análisis de fusión de alta resolución requiere únicamente el volumen de reacción para la reacción de PCR para el análisis de cada muestra, eliminando la necesidad de disolventes grado HPLC o electroforesis en gel desnaturizante de gradiente (DGGE). ([http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP\\_Hi-Res%20Melting.html](http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html))

De esta manera, el alto rendimiento, bajo costo y alta resolución para discriminar alelos hacen que HRM sea una herramienta ¿ideal? para el estudio de determinación del genotipo en poblaciones (Smith et al. 2009). La fusión del DNA

de alta resolución es el método de elección para la detección de genes de varios exones basados en la simplicidad de la técnica, costos, la sensibilidad y especificidad (Erali & Wittwer, 2010).

### **4.3.APLICACIONES DEL ANALISIS DE HRM EN LA GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs**

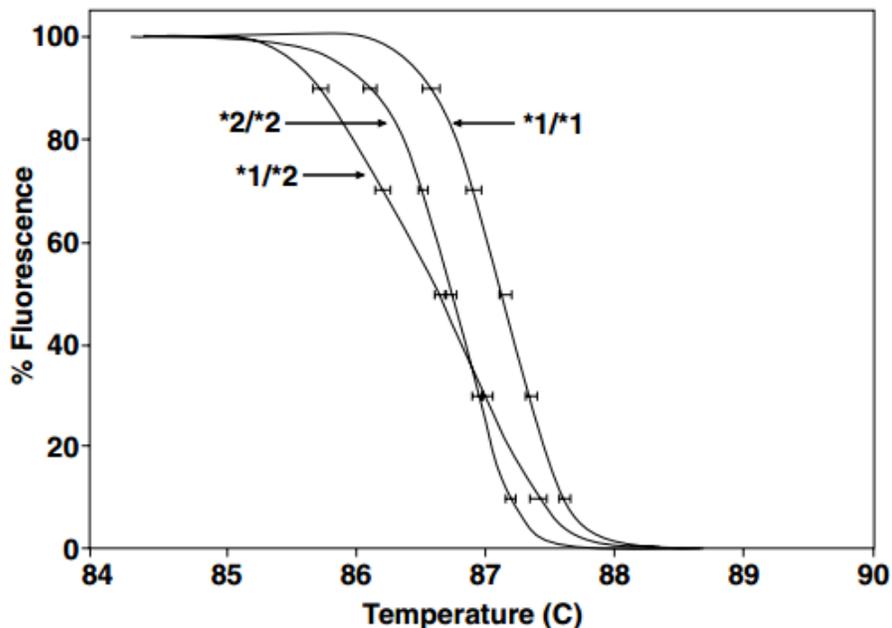
#### **4.3.1.FARMACOGENÓMICA**

La farmacogenómica estudia la correlación entre la genética de un paciente individual (genotipo) y su respuesta al tratamiento farmacológico. Algunos medicamentos funcionan bien en algunas poblaciones de pacientes y no tan bien en otros, e incluso hay variaciones importantes entre individuos de una misma población. El estudio de la base genética de la respuesta del paciente a la terapia permite el desarrollo de tratamientos más efectivos. Todos los aspectos de la farmacogenómica requieren datos exactos y precisos del genotipo de una población que será objetivo de un medicamento, o de la población de personas que reaccionan mal con alguna droga. Además, este tipo de investigación puede conducir a tratamientos específicos para las poblaciones. El alto costo de los medicamentos retirados han constituido una iniciativa para el diseño de fármacos diana avanzado que implica estudios de validación, así como estudios para predecir eventos adversos y la falta de eficacia (Smith, 2002).

Cuando se combina un ciclo rápido de PCR, la técnica de fusión del DNA de alta resolución es una solución ideal para un diagnóstico personalizado. Por ejemplo; la warfarina es comúnmente utilizada como anticoagulante con una estrecha ventana de acción terapéutica. Si la dosis no es la adecuada, pueden presentarse problemas de hemorragias o coágulos. La dosis de warfarina debe ser modificada por la secuencia de las variantes en los genes que afectan el metabolismo, principalmente el polimorfismo del gen *VCORK1* (-1639G>A), que codifica una

enzima involucrada en el metabolismo de la vitamina K (vitamina K, epóxido reductasa) y que se relaciona con resistencia a warfarina. La genotipificación rápida para determinar la dosis apropiada puede ser crítica en cirugías de emergencia. Una reacción rápida de PCR (<15min), seguida por la fusión del DNA de alta resolución (>2min) significan una solución (Reed et al. 2007).

Múltiples SNPs han sido identificados en el gen *CYP2C9*, que codifica para una enzima relacionada con el metabolismo de varios fármacos, entre ellos la warfarina. El alelo más común se designa como \*1 y es considerado el alelo silvestre. El alelo \*2 es resultado de un SNP (430C>T), ambos localizados en el exón 3. Los alelos \*3 (1075A>C), \*4 (1076T>C) y \*5 (1080C>G) resultan de SNPs localizados en el exón 7. En adición, una delección en la posición 818 es el alelo \*6. De manera general, los alelos \*2 y \*3 están relacionados con un pobre metabolismo de la warfarina. Así entonces, los pacientes con alelos \*2 y \*3 tienen un riesgo elevado de anticoagulación y hemorragias. La figura 22 muestra las curvas de fusión para el exón 3 del gen *CYP2C9*, en donde se distinguen las diferencias de las curvas del alelo silvestre el polimorfismo correspondiente (Hill et al. 2006).



**Figura 22. HRM aplicado a farmacogenómica.** Curvas de fusión para un amplicón del exón 3 del gen CYP2C9, involucrado con la respuesta a tratamientos con warfarina. El alelo silvestre *\*1/\*1*, heterocigoto *\*1/\*2* y homocigoto mutante *\*2/\*2*. El alelo *\*2* está relacionado con un metabolismo pobre de la warfarina (Hill et al. 2006).

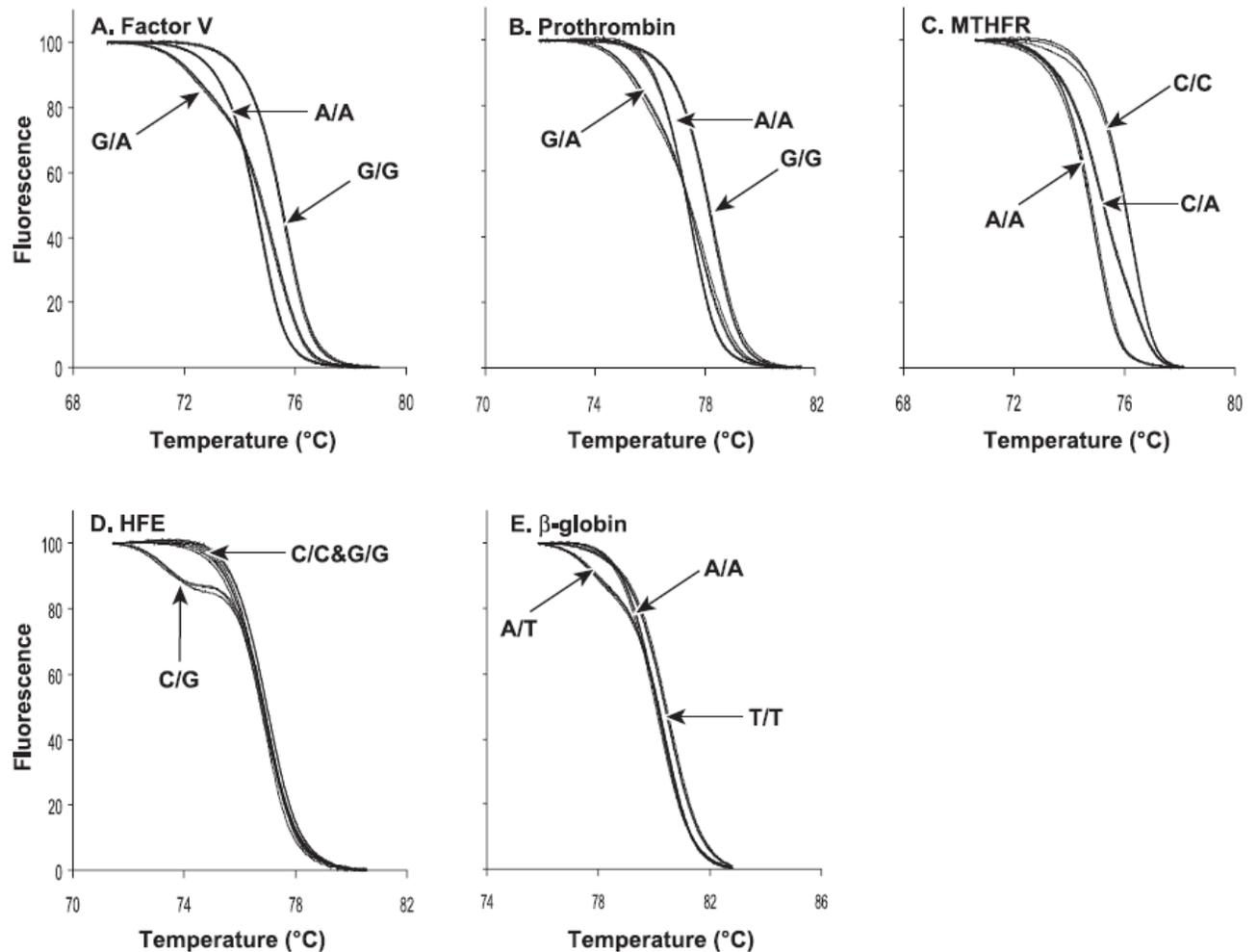
#### 4.3.2. DIAGNÓSTICO BASADO EN HRM

Más de 60 genes han sido analizados por este método, y se han publicado numerosos artículos sobre *BRCA1*. El gen *BRCA1* codifica para una proteína reparadora del DNA y por lo tanto supresora de tumores, llamada proteína de susceptibilidad al cáncer de seno tipo 1. En cada paso, los distintos procedimientos y/o instrumentos son posibles con la salvedad de que los resultados de exploración de genes dependen fuertemente del colorante, aparato y del software utilizado (Erali & Wittwer, 2010).

La fusión de alta resolución de amplicones de tamaño corto ha sido utilizada para genotipificación en humanos y microorganismos. Blancos humanos incluyen variantes asociadas a enfermedades, tales como  $\beta$ -globina, fibrosis quística, factor

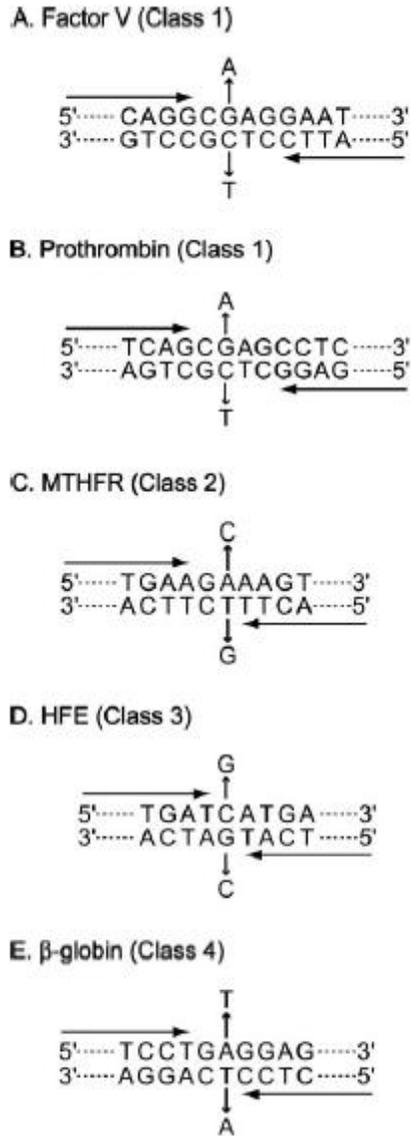
V, protrombina, 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa y proteínas relacionadas con hemacromatosis, antígenos de plaqueta, lactasa, etc (Reed et al. 2007). En la figura 23 se describen los perfiles de fusión para cada polimorfismo. Para los casos en donde se presentan SNPs clases 1 o 2 (Factor V, protrombina, MTHFR), los homocigotos silvestres y homocigotos mutantes fueron claramente distinguidos unos de otro por el desplazamiento de la  $T_m$ . Por otro lado, las diferencias en la  $T_m$  entre los genotipos homocigotos para SNPs clases 3 y 4 son menores que las de los tipos 1 y 2. El homocigoto HbS (17A>T; clase 4) puede ser distinguido del tipo silvestre por una diferencia de  $0.2^\circ\text{C}$ , pero el homocigoto mutante HFE (187C>G; clase 3) no puede ser distinguido del alelo silvestre. En casos como éste, suelen utilizarse sondas no marcadas que permiten una mejor resolución de las curvas de fusión.

Para todos los casos existen tres posibles genotipos; el silvestre, heterocigoto y el homocigoto mutante. Para el caso particular de la fibrosis quística, se estudia el polimorfismo de clase 2 en el gen MTHFR (1298A\_C). Siendo el alelo silvestre el que presenta la Adenina en la posición 1298. El genotipo que presenta la variante con Citocina, está directamente relacionado con la expresión nula del canal transportador de cloro, una proteína involucrada con el desarrollo de la enfermedad (Liew et al. 2004).



**FIGURA 23. Curvas de HRM para SNPs de relevancia clínica.** Factor V de Leiden 1691G\_A (SNP Clase 1, A); protrombina 20210G\_A (SNP Clase 1; figura B); MTHFR 1298A\_C (SBO clase 2; figura C); HFE 187C\_G (SNP Clase 3; figura D); y beta-globina 17A\_T (SNP clase 4; E). Los datos fueron analizados individualmente para cada SNP. (Liew et al. 2004)

La figura 24 muestra la posición de cada uno de los SNPs del ejemplo anterior, la dirección de los oligonucleótidos utilizados y las variantes que se presentan para cada caso. Las secuencias completas son las correspondientes al alelo silvestre y se presenta el polimorfismo que ocurre para cada caso.

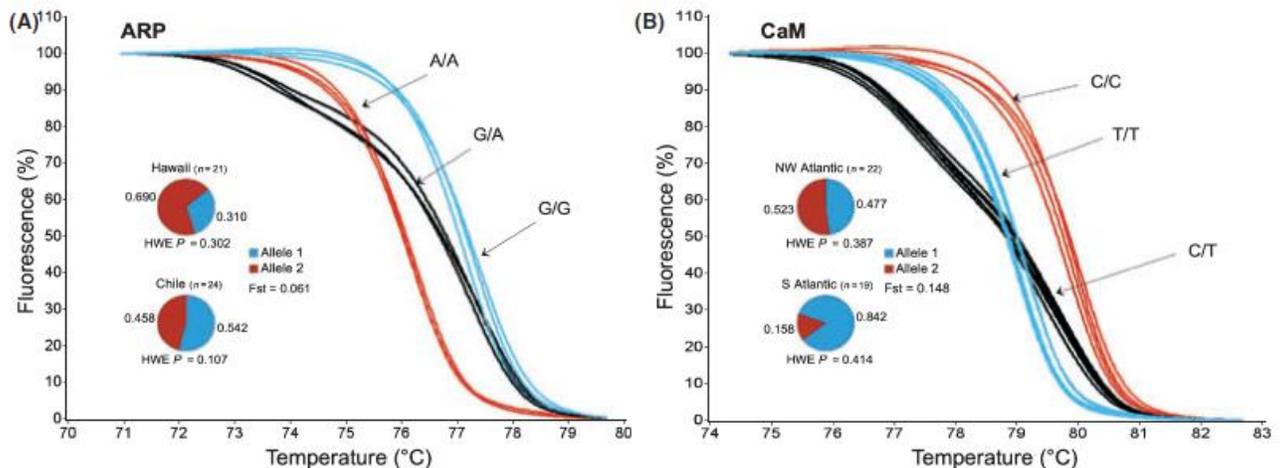


**Figura 24. SNPs de interés clínico.** Se presenta la secuencia de los alelos silvestres así como el polimorfismo que ocurre para cada caso y la clasificación del mismo, de variaciones con interés clínico. Modificado de Liew et al. 2004.

El análisis del material genético de un individuo entre los efectos de las pruebas genéticas podría ser la de reunir información sobre la predisposición genética de un individuo a determinado estado de salud, o confirmar un diagnóstico de enfermedades genéticas. El genotipo de un individuo se puede determinar y luego ser analizado por comparación con un mapa de haplotipos para determinar el riesgo de la enfermedad del paciente o su posible respuesta a diferentes tratamientos (Smith, 2002).

### 4.3.3.GENOTIPIFICACIÓN DE POBLACIONES

Además de la aplicación clínica, esta técnica también se ha utilizado en la determinación de genotipos en estudios ecológicos. Amplicones cortos y sondas no marcadas fueron utilizados para la genotipificación de genes relacionados con la expresión de proteínas como la lactato-deshidrogenasa A (ldh-A), la cadena ligera- 2 de la miosina (mlc-2), la fosfoproteína ácida ribosomal (ARP) y la calmodulina (CaM); todas en una muestras de poblaciones de peces espada de diferentes partes del mundo (Smith et. al 2009). El objetivo del estudio fue el de demostrar que HRM es una alternativa útil para el estudio de poblaciones salvajes y muestras grandes de individuos, ya que los genotipos involucrados en el protocolo no están relacionados con condiciones patológicas o enfermedades de la población de estudio. La figura 25 muestra algunos resultados obtenidos de genotipos de ARP y CaM, para diversas poblaciones de pez espada, mediante el uso de amplicones cortos (Smith et al. 2009).



**Figura 25. Genotipificación de poblaciones salvajes mediante HRM con amplicones cortos.** Cada gráfica muestra los perfiles de fusión para locus correspondientes. En las curvas normalizadas de ARP (A) Y CaM (B), utilizando la técnica de HRMA con amplicones cortos, los genotipos homocigotos son distinguidos por la Tm, mientras los individuos heterocigotos por la forma de la curva (Smith et al. 2009)

## 5.CONCLUSIONES

- **HRM permite la reducción de costos y tiempos, mayor exactitud y precisión en comparación con otras metodologías de genotipificación de SNPs.**

En comparación con otras técnicas de genotipificación, HRM presenta varias ventajas, tales como la disminución considerable del tiempo de trabajo, la disminución de la contaminación posterior a la PCR -por ser una técnica de tubo cerrado-, la posibilidad de correr múltiples muestras simultáneamente (en equipos multi-pozos), y la disminución en los costos de los insumos. Las técnicas tradicionales que incluyen PCR en punto final, suelen ser menos sensibles y con flujos de trabajo extensos, que además utilizan insumos tóxicos en altas cantidades. Desde la introducción del tiempo real, la detección de SNPs por esta técnica ha mejorado en cuanto a la sensibilidad y especificidad, resulta la mejor alternativa cuando se trabajan grandes volúmenes de muestras. Comparada con otras técnicas de última generación es mucho menos costosa, aunque se recomienda en algunos protocolos complementar HRM con técnicas como secuenciación. Actualmente las técnicas de secuenciación siguen con precios muy elevados lo que dificulta el acceso a ellas.

- **El mejoramiento en la química, instrumentación y software son las claves del éxito de HRM.**

El desarrollo de los agentes intercalantes de tercera generación ha permitido el monitoreo en tiempo real de la fusión del DNA, donde la utilización de amplicones cortos y sondas no marcadas permite la genotipificación precisa de las muestras. El mejoramiento de los sistemas de calentamiento y adquisición de los datos son fundamentales, permitiendo la lectura de un gran número de muestras.

- **La naturaleza de la técnica de HRM le permite abarcar una amplia gama de aplicaciones.**

En el campo de la farmacogenómica, HRM permite la detección de SNPs relacionados con el funcionamiento de las enzimas metabolizadoras de fármacos. La detección rápida y oportuna de estos SNPs es crucial para el tratamiento de algunas enfermedades en donde se prescriben fármacos como la warfarina, en donde la respuesta al fármaco depende del funcionamiento de algunas enzimas. Muchas de las enzimas de la superfamilia CYP 450 están relacionadas con el metabolismo de fármacos y pueden genotiparse por HRM. Los genotipos de estas enzimas pueden obtenerse en menos de 30 minutos.

Otra de las aplicaciones importantes de HRM es el diagnóstico. Actualmente se utiliza la técnica para la genotipificación de genes tales como los involucrados con la fibrosis quística o con el factor V de la coagulación, entre otros. Nuevamente, con la ventaja de ser ensayos muy rápidos, poco costosos y sobre todo con alta eficiencia y sensibilidad.

Finalmente, dadas las características propias de la técnica, es posible utilizarla tanto en investigación como en diagnóstico, cuando se trabaja con números elevados de muestras y se evalúan varios genes. Debido que las técnicas de tiempo real se han expandido considerablemente, HRM significa una útil herramienta al alcance de gran número de laboratorios.

## 6.BIBLIOGRAFIA

- Applied Bioystems. **PrimerDesign Ltd beginners guide to Real-Time PCR.** 2007. Life Technologies.
- Brookes, A. **The essence of SNPs.** 1999. Gene 234:177-186.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. **A practical Guide to High Resolution Melt Analysis. Genotyping.** 2010. Tech note 6004.
- Caratachea, Marco Antonio. **Polimorfismos genéticos y aplicaciones. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.** 2007. Revista interna. 20: 213-221.
- Cargill, M. Altshuler, D. Ireland, J. **Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.** 1999. Nat. Genet. 22: 231-238
- Charles, E. Hill, M. Alexander, D. Diane, W. Frederick S. Nolte, M. **Detection and Identification of Cytochrome P-450 2C9 Alleles \*1, \*2, and \*3 by High-Resolution Melting Curve, Analysis of PCR Amplicons.** 2006. Clin. Pathol. 125:584-591.
- Chen, J. Iannone, M. Li, M. **A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension.** 2000. Genome Res. 10:549-557.
- Corbett Life Science. **HRM Assay and Analysis.** 2006. CorProtocol 6000-1.
- deSilva, D. Blackett, J. **Assay: High-resolution melting and unlabeled probes.** 2007. Gen. Eng. Biotech News. 27:3.
- Diazaraque, R. Pacheco, R. Roiz, J. **Reacción en cadena de la polimerasa. Fundamentos y aplicación en Medicina Interna.** 2002. Rev. Clin. Esp. 202: 272-274.
- Dorak, M. Tevfik (Ed). Dujols, V. Kusukawa, N. McKinney, J. Dobrowolsky, S. Wittwer, C. **Real-time PCR. High.-resolution melting analysis for scanning and genotyping.** 2006. Taylor & Francis group. 155-167.
- Erali, M. Wittwer, C. **High Resolution melting analysis for gene scanning.** 2010. Methods. 50: 250-261.

- Fischer, S. Lerman, L. **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory.** 1983. Proc. Nat. Acad. Sci. 80:1579-1583.
- Frazer, K. Murray, S. Schork, N. Topol, E.. **Human genetic variations and its contribution to complex traits.** 2009. Nature Reviews. Genetics. 10: 241-251.
- Gibbs et al. **The international HapMap project.** 2003. Nature 426: 789-796.
- Guerra, R. Yu, Z.. **Single Nucleotide Polymorphisms and their applications.** 2005. Computational Genomics. 12: 309-348.
- Gundry, C. Vanderstreen, J. Reed, G. Pryor, R. Chen, J. Wittwer, C. **Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes.** 2003. Clinical Chemistry 49 : 396-406.
- Hayashi K. **PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA.** 1991. PCR Methods Appl 1:34-38.
- Krypuy, M. Ashor, A. Etemadmoaghdam, D. Hyland, S. DeFazio, A. Fox, A. Brenton, J. Bowtell, D. Dobrovic, A. **High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5–8.** 2007. BMC Cancer. 7:168.
- Liew, M. Pryor, R. Palais, R. Meadows, C. Erali, M. Lyon, E. Wittwer, C. **Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons.** 2004. Clinical Chemistry. 50:1156-1164.
- Life Technologies Corporation. **A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis.** 2009.
- Livak, K. **Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay.** 1999. Genet Anal. 14:143-149.
- Montgomery, J. Wittwer, C. Palais, R. Zhou, L. **Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis.** 2007. Nature. Vol. 2. No.1. 59-66.

- Nery, J. Busser, K. Padmabandu, G. **Gene Scanning by High-resolution Melt (HRM) on a LightCycler 480 Real-Time PCR System Using EXPRESS SYBR GreenER q PCR SuperMix.** 2008. Invitrogen Corporation. Gene Expression Profiling Group. Application Note.
- Norambuena, P. Copeland, J. Krenková P. Stambergová, A. Macek, M. **Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene.** 2009. *Clinical Biochemistry*. 42: 1308-1327.
- Palais, R. Liew, M. Wittwer, C. **Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping.** 2005. *Analytical Biochemistry*. 346:167-175.
- Pastinen, T. Raitio, M. Lindroos, K. Tainola, P. Peltonen, L. Syvänen, A. **A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays.** 2000. *Genome Res*10:1031-1042.
- Reed, G. Kent, J. Wittwer, C. **High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.** 2007. *Pharmacogenomics*. 6:697-608.
- Reuter, M. Küpper, Y. Schmitz, A. Breuer, P. Wend, U. Hennig, J. **Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR.** 2005. *Journal of Genetics*. 84: 341-345.
- Roche Applied Science. **High Resolution Melting; Optimization Strategies.** 2008. Technical Note No. 1.
- Salazar, E. González, M. del Bosque, A. Reséndez. D. Barrera, A. Sifuentes, A. **Evaluación de microsatélites para la verificación de paternidad de las razas Beefmaster y Charolais en el norteste de México.** 2004. *Tec. Pecu. Méx.* 42 (3): 429-435
- Smith, B. Lu, C. Alvarado, R. **High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies.** 2009. *Molecular Ecology Resources*. 10(1):193-6.

Smith, K. **Genetic Polymorphism and SNPs Genotyping, Haplotype Assembly Problem, Haplotype Map, Functional Genomics and Proteomics.** 2002.

Schork N, J. Fallin, D. Lanchbury, S. **Single nucleotide polymorphisms and the future of the genetic epidemiology.** 2004. Clinical Genetics. 58: 250-254.

Twyman, R. **Single Nucleotide Polimorfism (SNP) Genotyping Techniques – An Overview.** 2005. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. 1202-1207.

Underhill, P. Jin, L. Lin, A. **Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography.** 1997. Genome Res. 7:996-1005.

Venter, J. Adams, M. Myers, E. **The sequence of the human genome.** 2001. Science 291:1304-1351.

Weatherhall, D. **Genotype-Phenotype Relationships.** Encyclopedia of life sciences. 2001. 2:245–255

Xie, J. Wehner, T. Conkling, M. **PCR-based Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis to Clone Nine Aquaporin Genes in Cucumber.** 2002. J. AMER. SOC. HORT. SCI. 127(6):925–930.

Páginas consultadas

[www.highresolutionmelt.co.uk](http://www.highresolutionmelt.co.uk)

[http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP\\_Hi-Res%20Melting.html](http://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html)

<http://www.gene-quantification.de/hrm.html>

