

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
SICLEMIA MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN POR
OVERLAP-PCR BIDIRECCIONAL ALELO ESPECÍFICO

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

RICARDO RAÚL CEVALLOS GUERRA

SANGOLQUÍ, 2 de Octubre del 2007

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Ricardo Raúl Cevallos Guerra

COORDINADOR DE LA CARRERA

MSc. Alma Koch

Sangolquí, 2 de Octubre de 2007

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. Ricardo Raúl Cevallos Guerra como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

2 de Octubre de 2007

Marcelo Grijalva, M.D. PhD.

Ángel Guevara, MSc. PhD.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi padre, a mi madre y a mi hermano, quienes han sido los pilares más importantes para la formación de lo que ahora se puede percibir de mi existencia.

A mi mejor amiga Verónica, por recordarme siempre quien soy y darme los momentos de alegría más importantes de mi vida.

A todos mis amigos y compañeros, por haber compartido nuestras vidas durante tantos años y ser testigos de lo que se ha mejorado en nuestro interior.

Ricardo Raúl Cevallos Guerra

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Marcelo Grijalva, director del presente proyecto, por haberme guiado con su conocimiento y experiencia por el camino correcto a la realización de mis metas y por permitirme con entusiasmo el desarrollo de mis ideas.

Al Dr. Ángel Guevara, codirector del presente proyecto, por darme el impulso para incursionar en el campo de la Biología Molecular.

A la Lic. Marcia Racines, investigadora del Centro de Biomedicina de la Universidad Central, por ayudarme a desarrollar mi experiencia en el campo de la biomedicina.

Al Ing. Andrés Izquierdo, quien confió siempre en mí y me ayudó a llegar donde ahora estoy.

A Alba Santos, Rosalba Montaña, Irma Bautista, Victoria Bautista, Ing. José Hidrovo, Lic. Hugo Hernández, Dr. Carlos Quespaz, Dr. Edmundo Estévez, Dr. Manuel Palacios y a todos quienes de una u otra forma ayudaron a hacer posible la realización de este proyecto.

Ricardo Raúl Cevallos Guerra

INDICE DE CONTENIDO

Hoja de legalización.....	ii
Certificación.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Índice de contenido.....	vi
Lista de tablas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de anexos.....	xiv
Nomenclatura.....	xv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xvii
1er Capítulo: Introducción.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos del proyecto.....	2
1.3.1 Objetivo general.....	2
1.3.2 Objetivos específicos.....	2
1.4 Marco Teórico.....	3
1.4.1 Principios básicos sobre el diagnóstico molecular	3
1.4.1.1 Mutaciones, polimorfismos y su detección molecular alelo específica.....	3
1.4.1.2 Rastreo de mutaciones mediado por la amplificación alelo específica.....	5
1.4.2 La PCR Bidireccional Alelo Específica en el diagnóstico molecular	18
1.4.3 La siclemia y su detección alelo específica.....	26

1.4.4	Propuestas para la optimización de BIPASA en el diagnóstico de siclemia	33
2do Capítulo: Materiales y Métodos.....		37
2.1	Participantes del proyecto.....	37
2.2	Zona de estudio.....	37
2.3	Periodo de experimentación.....	37
2.4	Procedimientos.....	38
2.4.1	Obtención de muestras y análisis convencional.....	38
2.4.2	Preparación de muestras para los ensayos moleculares.....	41
2.4.3	Diseño del <i>set</i> de <i>primers</i> para la amplificación por BIPASA.....	43
2.4.4	Estandarización de la amplificación por PCR bidireccional	48
2.4.5	Estandarización de la concentración de los componentes de reacción.....	52
2.4.6	Ensayo de la estabilidad de la técnica BIPASA estandarizada.....	53
2.4.7	Ensayo de campo del sistema optimizado.....	53
3er Capítulo: Resultados.....		54
3.1	Análisis de muestras control mediante electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa.....	54
3.2	Extracción y cuantificación de DNA.....	55
3.2.1	Cuantificación de DNA por espectrofotometría.....	55
3.3	Diseño del <i>set</i> de <i>primers</i>	55
3.3.1	Diseño de los <i>primers</i> internos A, S, TA y TS.....	55
3.3.2	Diseño de los <i>primers</i> externos P y Q.....	57
3.3.3	Temperatura de <i>annealing</i> óptima para los <i>primers</i> internos.....	58
3.4	Estandarización del protocolo de amplificación.....	59
3.4.1	Amplificación de fenotipos por BIPASA tradicional.....	59
3.4.2	Análisis de competitividad de los <i>primers</i> internos.....	59
3.4.3	Análisis de la generación de PQ, PS y AQ a distinta <i>Ta</i>	60
3.4.4	Estandarización del programa de amplificación para <i>Overlap</i> -BIPASA	61

3.5 Estandarización de la concentración de los componentes de reacción.....	63
3.6 Estabilidad de la técnica.....	64
3.7 Ensayo de campo con el sistema optimizado.....	64
4to Capítulo: Discusión.....	66
4.1 Obtención de controles de hemoglobina por medio de análisis electroforético.....	66
4.2 Protocolo estandarizado de extracción de DNA de sangre periférica.....	66
4.3 Análisis preliminar sobre la técnica BIPASA tradicional.....	67
4.4 Análisis de competitividad de los <i>primers</i> internos.....	68
4.5 Estandarización y optimización de BIPASA	69
4.5.1 Rendimiento y capacidad refractaria a diferentes temperaturas de <i>annealing</i>	69
4.5.2 Sistema de amplificación estandarizado.....	70
4.5.3 Concentración de los componentes de reacción.....	71
4.6 Estabilidad y especificidad alélica de la técnica.....	72
4.7 Ensayo de campo.....	73
4.8 Discusión general y consideraciones finales sobre el sistema optimizado.....	74
5to Capítulo: Conclusiones.....	76
6to Capítulo: Recomendaciones.....	79
7mo Capítulo: Bibliografía.....	81
Glosario de términos.....	86
Anexos.....	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Concentraciones y volúmenes utilizados para los reactivos que componen al master mix. [Stock] corresponde a las concentraciones en las soluciones stock. [Rxn] corresponde a las concentraciones por reacción. El volumen final utilizado por cada reacción es de 25 μ l.....	48
Tabla 2.2. Programa de amplificación basado en las condiciones óptimas calculadas mediante el programa FastPCR 4.0.....	49
Tabla 2.3. Programa de amplificación para la estandarización de la temperatura óptima de annealing en los ciclos de reacción.....	50
Tabla 2.4. Programa de amplificación para la estandarización de la temperatura óptima de annealing en los ciclos de reacción.....	51
Tabla 2.5. Programa de amplificación mediante el sistema bifásico.....	51
Tabla 2.6. Programa de amplificación mediante el sistema trifásico y bifásico en dos etapas.	51
Tabla 3.1. Resultados de la cuantificación de DNA genómico de las muestras control mediante el Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit. Las lecturas fueron realizadas por duplicado. El cálculo de la concentración fue realizado según lo descrito en el Anexo C.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema del proceso de amplificación de DNA por PCR.9
- Figura 1.2.** Representación de la amplificación alelo específica sobre el sitio de annealing y extensión del primer alelo específico. La secuencia del DNA blanco se ilustra en color índigo. La secuencia del primer específico se ilustra en azul. Los alelos divergentes se muestran con diferente sombreado. A) Representación de la extensión efectiva de la cadena durante la PCR al existir un pareamiento específico completo del primer en el extremo 3'. B) Representación de la falta de extensión durante la PCR al existir un mismatch con el extremo 3' del primer. C) Simulación del análisis electroforético de las anteriores representaciones de A (Pos) y de B (Neg); se denota como M al marcador de peso molecular.....16
- Figura 1.3.** Representación esquemática del proceso molecular de la tetra-primer PCR. Se indica con una cruz la posición de los alelos amplificados por los primers específicos 3 y 4.19
- Figura 1.4.** Fenómeno de megapriming entre los productos de una PCR bidireccional exentos de regiones 5' no complementarias.20
- Figura 1.5.** Representación de los fundamentos de la Overlap-PCR bidireccional. Los GC-clamps no complementarios de los primers internos se muestran con líneas sinusoideas. Por convención los primers externos se denotan como P y Q, y los primers internos como A y B.....22
- Figura 1.6.** Representación esquemática sobre las bases moleculares de la Tetra primer ARMS, aplicado sobre la transición A→G (308) en el gen TNF. El extra-mismatch es representado con un asterisco.....23
- Figura 1.7.** Análisis electroforético de los productos de amplificación del gen TNF mediante la técnica Tetra-primer ARMS. El par alélico correspondiente está indicado en la parte inferior del carril.....24
- Figura 1.8.** Frotis sanguíneo de un paciente con siclemia. En la ilustración se señalan con flechas los eritrocitos afectados por la precipitación de la hemoglobina S. La forma aplanada y de media luna de los eritrocitos afectados es característica en la siclemia.....26

Figura 1.9. Secuencia del gen de la cadena β dentro del cluster de la beta globina en el cromosoma 11. La secuencia transcrita se muestra en negrilla. Se encuentran subrayados las siguientes secuencias: Caja CACCC, Caja ATAAAA, iniciador, secuencia de Kozak (codón de inicio), codón de terminación, y sitio señal poli-A. Se encuentra sombreado el sitio de la mutación responsable de la siclemia por hemoglobina S.....	29
Figura 1.10. Ensayo de electroforesis de hemoglobina a pH alcalino teñido con colorante AmidoBlack. En los carriles “Control” se puede observar el patrón de bandas para cada tipo de hemoglobina. En el control Hb ASC se puede apreciar el retraso en la migración de las hemoglobinas disfuncionales frente a la hemoglobina normal (Hb A). La hemoglobina S se ubica en la región central, entre la banda Hb C y Hb A, y se corresponde con el patrón de banda del paciente del carril 1.....	31
Figura 1.11. Análisis electroforético del sistema diagnóstico molecular de siclemia mediante PCR bidireccional. En la parte superior se indica el fenotipo correspondiente a las bandas mostradas en el gel. A ambos lados se ubica el marcador de peso molecular de 100 pares de bases; la banda inferior inicia en 200 pares de bases.	33
Figura 1.12. Esquema del proceso de amplificación mediante los clamped-primers internos. Los alelos mutante (S) y tipo salvaje (A) se muestran en naranja y azul respectivamente. Al final de la figura se indica el análisis electroforético virtual de la amplificación con el patrón de bandas esperado. Se denota con una M al marcador de peso molecular; a la derecha se indican los amplicones a los que corresponden las bandas reveladas en el gel de electroforesis.	35
Figura 2.1. Electroforesis horizontal en soporte de acetato de celulosa (Cellogel) para la caracterización de hemoglobinas. A) Equipo básico para el ensayo de electroforesis de hemoglobina. B) Aplicación de muestras en el cellogel mediante un dispositivo aplicador.....	35
Figura 2.2. Fluorómetro para cuantificación de DNA Qubit™ (Invitrogen).	40
Figura 2.3. Pantalla de trabajo del programa FastPCR.	43
Figura 2.4. Alternativas para el diseño de los primers internos A y S. El alelo normal se muestra con sombreado amarillo y el alelo mutante con sombreado rojo. Se encuentra enmarcado el codón de inicio ATG como referencia para la ubicación del codón 6.....	45

Figura 2.5. Diseño del mejor primer para un primer fijo mediante FastPCR. La herramienta de trabajo utilizada es Running PCR, y se ingresó la opción “fixed primer”. En la figura se ilustra la secuencia del gen de la beta globina ingresada y, sobre ésta, se ubica el primer fijado. En la figura se observa el ensayo en el que se ha fijando al primer A.....	46
Figura 3.1. Ensayo de electroforesis de hemoglobina para las muestras control. A) Electroforesis de los controles AS y AA, en contraste con el control de heterocigoto AC. B) Electroforesis de los controles AA, AS y SS. El sentido de la migración se representa con una flecha.....	47
Figura 3.2. Selección de la secuencia de los primers internos mediante la opción Primer Test en FastPCR. Las características de los primers se muestran bajo su secuencia. El rango de Ta óptimo se muestra en azul.....	54
Figura 3.3. Diseño de la secuencia del CG-clamp para los primers TA y TS, mediante la opción Primer Test en FastPCR. Es notable el incremento del Tm en 10°C respecto al Tm de los primers exentos del CG-clamp. Igualmente es apreciable que el Tm10 no varía.....	56
Figura 3.4. Características de los primers P y Q mediante la herramienta primer test en FastPCR. Se puede apreciar que ambos primers poseen un Tm similar aunque su longitud es distinta.....	57
Figura 3.5. Resultados del cálculo de la Ta óptima en FastPCR para los primers A, S, TA y TS en la amplificación de los productos específicos con P y Q.....	57
Figura 3.6. Amplificación de los fenotipos AA, AS y SS mediante BIPASA tradicional utilizando los primers P, Q, A y S. Se indican con flechas las posiciones esperadas de los amplicones PQ, PS y AQ. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases; C= control negativo.....	58
Figura 3.7. Análisis de competitividad entre distintas combinaciones de primers internos utilizando el fenotipo heterocigoto AS. Bajo la numeración de cada carril se encuentra la combinación de primers internos utilizada. A la derecha se indica la posición esperada del amplicón correspondiente. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases; C= control negativo.....	59

Figura 3.8. Generación de los amplicones PQ, PS y AQ a temperaturas de annealing de 62°C (carril 1), 66°C (carril 2) y 70°C (carril 3). M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	60
Figura 3.9. Evaluación de las capacidades refractarias sobre los 3 fenotipos, utilizando tres temperaturas de annealing: A) 64°C, B) 66°C y C) 68°C. Se indica con una flecha la aparición de bandas inespecíficas. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	61
Figura 3.10. Evaluación de 3 programas de amplificación sobre el fenotipo heterocigoto AS. A) sistema trifásico a una Ta de 68°C; B) sistema bifásico a 68°C; y, C) sistema trifásico y bifásico en dos etapas a una Ta de 66 y 68°C. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	62
Figura 3.11. Análisis de rendimiento bajo diferentes relaciones de concentración de primers P:TS:TA:Q. Se observa un mejor rendimiento al aplicar relaciones no equimolares entre P y Q o TS y TA. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	62
Figura 3.12. Análisis electroforético del ensayo de estabilidad del sistema estandarizado Overlap-BIPASA. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	63
Figura 3.13. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de las amplificaciones de muestras clínicas para el ensayo de campo. Las muestras 1, 3, 6, 15, 16, 17, 18 y 20 corresponden a muestras positivas para la prueba de bisulfito de sodio. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.	64
Figura A1. Electroforesis de las muestras control de DNA proveniente de sangre periférica. En el primer carril se muestra el marcador de cuantificación (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen); en el segundo carril (T) se muestra la solución de DNA total; y en los carriles subsiguientes se ubican las diferentes diluciones de T. En el carril final (C) se ubica un control negativo.....	92
Figura A2. Análisis electroforético del ensayo para determinar la Ta óptima de los primers internos A y S. Se indican con una flecha las posiciones de los amplicones PS y AQ. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.....	95

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Determinación del volumen final de dilución del DNA genómico extraído de sangre periférica.....	91
Anexo B. Protocolo de preparación de solución buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X.....	92
Anexo C. Cálculo de la concentración de DNA mediante el fluorómetro Qubit™.....	93
Anexo D. Cálculo del volumen de dilución para la preparación de <i>stocks</i> de <i>primers</i>	94
Anexo E. Determinación de las condiciones óptimas de amplificación para los <i>primers</i> A y S utilizados en la evaluación de BIPASA tradicional.	95

NOMENCLATURA

%GC: porcentaje de guanina y citosina

A: adenina

A: *primer* específico para el alelo normal (hemoglobina A)

AA: homocigoto para el alelo de hemoglobina A (normal)

AC: heterocigoto para los alelos de hemoglobinas A y C.

AQ: amplicón generado por los *primers A y Q*

AS: heterocigoto para los alelos de hemoglobinas A y S.

BIPASA: Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles

C: citosina.

dNTPs: desoxirribonucleótidos

G: guanina.

Hb A: hemoglobina A

Hb C: hemoglobina C

Hb S: hemoglobina S

Kb: número de kilobases

P: *primer* externo derecho

pb: número de pares de bases

PS: amplicón generado por los *primers P y S*

PQ: amplicón generado por los *primers P y Q*

Q: *primer* externo izquierdo

S: *primer* específico para el alelo mutante (hemoglobina S)

SS: homocigoto para el fenotipo de hemoglobina S

T: timina

Ta: temperatura de *annealing*

Tm: temperatura de *melting*

Tm10: *Tm* del extremo 3' terminal que incluye las 10 primeras bases del *primer*.

V: voltios

RESUMEN

La siclemia es una de las enfermedades genéticas más conocidas a nivel molecular, sin embargo, sigue siendo un problema de salud pública en países desarrollados y subdesarrollados. Para el diagnóstico prenatal de la siclemia se ha recurrido a técnicas moleculares como la *PCR-alelo específica* y la *PCR bidireccional*. La amplificación alelo específica mediante PCR bidireccional (BIPASA) es una técnica molecular de diagnóstico de mutaciones ampliamente difundida en el campo biomédico. Al igual que la mayoría de técnicas de diagnóstico molecular, BIPASA posee ciertas limitaciones que impiden su aplicación sobre todas las mutaciones existentes. Estas limitaciones tienen que ver con la baja capacidad refractaria que ofrecen ciertos *mismatches*, permitiendo el *annealing* de *primers* específicos con alelos distintos. La mutación responsable de la siclemia es un ejemplo de mutación poco refractaria, por lo que generalmente su diagnóstico mediante BIPASA no ha sido muy exitoso.

La aplicación de *primers* específicos con regiones 5' no complementarias ricas en nucleótidos guanina y citosina ha sido propuesta en el presente trabajo como la solución para mejorar la discriminación alélica en el diagnóstico molecular de la siclemia. Otros objetivos propuestos al aplicar esta técnica fueron la reducción en la competencia de los *primers* por regiones homólogas y el aumento en el rendimiento al mejorar la capacidad de hibridación a altas temperaturas de *annealing*. Utilizando este método, los resultados obtenidos fueron significativamente mejores al compararlos con los obtenidos con la técnica tradicional de PCR bidireccional. El diseño especializado de los *primers*, con énfasis en el aumento del diferencial de entalpía entre los extremos 3' y 5', demostró ser una estrategia eficaz para mejorar la especificidad alélica tanto como para aumentar el rendimiento neto del proceso de amplificación bidireccional alelo específico.

ABSTRACT

Sickle cell disease is a genetic disease with a well known molecular basis. Nevertheless, sickle cell disease is a public health issue in several developed and developing countries. Several molecular techniques have been applied for the diagnosis of sickle cell disease, such as allele specific PCR and bidirectional PCR. *Bidirectional PCR amplification of specific alleles* (BIPASA) is a molecular mutation detection technique with broad application in biomedicine. Like most molecular techniques, BIPASA has limitations that reduce its applicability on all nucleotide variants. These limitations are associated with low refractory properties of certain mismatches which allow the annealing of primers to different alleles. The mutation causing sickle cell disease is an example of a low refractory mismatch. This fact explains why the diagnosis of sickle cell disease by BIPASA has not been successful.

The application of specific primers with a 5' non-complementary region rich in guanine and cytosine is proposed in the present work. This strategy could improve allelic discrimination for sickle cell diagnosis. Other proposed goals of the application of this method were to lower primer competition for homologous regions and to increase the yield by improving the hybridization ability under high annealing temperatures. Results obtained were significantly better when compared with those obtained with traditional bidirectional PCR. The specialized design of the primers, focusing on enthalpy difference between 3' and 5' terminal regions, proved to be an effective strategy to improve allelic specificity as well as the overall yield of the bidirectional amplification process.

1 er. Capítulo: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Las técnicas de diagnóstico molecular tienen como finalidad la detección precisa y confiable de secuencias o variaciones de secuencias de *DNA* a lo largo del *genoma*, que se encuentran involucradas en una determinada patología o en un rasgo fenotípico determinado. Dentro de estas técnicas existen las de tipo *alelo* específico, las cuales permiten la identificación directa de una variante específica en un locus determinado. La técnica alelo específica más robusta actualmente utilizada como sistema diagnóstico es la PCR bidireccional alelo específica (BIPASA) la cual tiene como ventajas principales el bajo consumo de recursos y su fácil ensamblaje y adaptación. Sin embargo, han existido problemas respecto al método utilizado para la aplicación de BIPASA. El método tradicionalmente utilizado, que no incluye secuencias no complementarias en el extremo 5' de los *primers* específicos, no ha tenido buenos resultados para un determinado número de mutaciones debido al bajo rendimiento, la competencia entre los *primers* y la baja especificidad alélica para identificar fielmente la presencia o no de una variación de secuencia. Gracias a estudios posteriores se pudo determinar que si se alargaba la secuencia de los *primers* específicos utilizando secuencias 5' no complementarias ricas en guanina y citosina (*GC-clamps*), se modificaban sustancialmente las propiedades de dichos *primers* con el fin de resolver los problemas existentes con el método anterior. Al utilizar este método, teóricamente el sistema se vuelve no competitivo, sin embargo, aún existen inconvenientes respecto al rendimiento y a la especificidad alélica. En el presente proyecto se hará énfasis en estos dos problemas de crucial importancia para el diseño de sistemas diagnósticos basados en BIPASA y se optimizará la técnica para el diagnóstico molecular de siclemia.

1.2 Justificación del problema

El presente proyecto está dirigido a la optimización de la PCR bidireccional alelo específica aplicada al diagnóstico molecular de la siclemia, una patología de alta incidencia dentro de grupos afroamericanos. Tanto la técnica BIPASA como la patología

en cuestión, tienen una relevancia de gran peso en el campo de la biomedicina. Por su parte, la siclemia, también denominada anemia de células falciformes, es una enfermedad genética que compromete al *gen* de la beta *globina* y que provoca cuadros clínicos de anemia crónica generalmente fatales a edades tempranas. A pesar de ser una de las enfermedades más conocidas a nivel molecular, sigue siendo un problema de salud pública en muchos países desarrollados y subdesarrollados. Por otro lado, la mutación responsable de la siclemia es comúnmente utilizada como modelo para el ensayo de técnicas moleculares debido a su fácil rastreo por métodos convencionales. Adicionalmente, los métodos moleculares permiten la realización de diagnóstico prenatal, el cual es prácticamente imposible de realizarlo mediante sistemas convencionales. BIPASA es la técnica de diagnóstico molecular alelo específica más robusta, económica y versátil, frente a otras técnicas como los RFLPs, la hibridación alelo específica y la secuenciación directa. El diseñar un sistema optimizado en base a la PCR bidireccional, aplicado al diagnóstico prenatal de siclemia, que pueda ser reproducible en otras mutaciones y otras aplicaciones, tiene gran relevancia en el campo de la biomedicina y de la investigación genómica.

1.3 Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general

Optimizar la técnica de PCR Bidireccional Alelo Específica (BIPASA) aplicada sobre la mutación responsable de la siclemia, como modelo para el rastreo alelo específico de mutaciones.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener controles de siclemia, rasgo drepanocítico y hemoglobina normal por medio de su evaluación por electroforesis alcalina de hemoglobina para comprobar su fenotipo.
- Estandarizar un sistema de extracción de DNA de sangre periférica adecuado para su diagnóstico molecular mediante PCR bidireccional alelo específica.

- Diseñar *clamped primers* internos que permitan individualizar los productos específicos y reduzcan el nivel de competencia por secuencias homólogas.
- Estandarizar las condiciones de reacción para mejorar el rendimiento y especificidad del sistema de PCR bidireccional alelo específica.
- Evaluar el sistema optimizado de PCR bidireccional mediante un ensayo de campo en una población afroecuatoriana.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Principios básicos sobre el diagnóstico molecular

1.4.1.1 Mutaciones, polimorfismos y su detección molecular alelo específica

El genoma de los organismos vivos tiene una complejidad funcional que está relacionada en cierta medida con la complejidad total de dicho organismo. Sin embargo, no se ha encontrado relación entre la complejidad y el contenido celular de DNA, ya que no necesariamente un organismo con mayor cantidad de pares de bases por célula *haploide* es en realidad más complejo. Sin embargo, la secuencia nucleotídica de su genoma le proporciona al organismo su identidad, tanto en su *genotipo* como en su *fenotipo*, siendo muy conservada dentro de organismos de una misma especie. A pesar de que estos organismos comparten los mismos genes y sus funciones, cada uno tiene un cierto grado de individualidad genotípica, lo cual está evidenciado por las pequeñas variaciones presentes en cada genoma. Estas variaciones son en realidad muy comunes entre organismos de una misma especie y forman parte del fenómeno evolutivo (Lodish *et al.*, 2002).

Las variaciones de secuencia dentro del genoma son denominadas mutaciones, si éstas se presentan como un evento raro dentro de una población. Por otro lado, si una variación se presenta en más del 1% de la población, ésta toma el nombre de polimorfismo. Los polimorfismos pueden consistir en variaciones de secuencia o también pueden ser repeticiones de una misma unidad de secuencia, pero todos pueden ser utilizados como marcadores genéticos. Los *tandem repeats* o repeticiones en tándem son polimorfismos muy comúnmente utilizados como marcadores genéticos de poblaciones o

de individuos. Sin embargo, los *polimorfismos de nucleótido simple* o SNPs tienen una especial importancia a nivel genético ya que son las variaciones de secuencia más comunes en la mayoría de organismos. Un SNP es un polimorfismo que involucra el cambio de un solo *nucleótido* para ser reemplazado por otro distinto. En el genoma humano se estima la presencia de un SNP por cada 100 a 300 pares de bases a lo largo de los 3 billones de pares de bases del genoma y 2 de cada 3 de estos SNPs involucran la transición de citosina por timina (U.S. Department of Energy, 2007).

Aunque la mayoría de los SNPs hallados en el genoma humano no afectan las funciones génicas, existe un cierto número de éstos que son capaces de modificar ciertos rasgos fenotípicos o predisponer al individuo a padecer ciertas patologías. Estos SNPs se encuentran generalmente en regiones codificadoras, pero no están involucradas directamente con el padecimiento de una determinada enfermedad a diferencia de las mutaciones. De todas maneras, este concepto no puede ser aplicado de forma rigurosa ya que un *alelo* mutante para una población puede ser considerado polimórfico para otra. Este es el caso de la anemia de células falciformes (Twyman, 2003).

La siclemia o anemia de células falciformes, la patología genética de mayor prevalencia en individuos de ascendencia africana, fue una de las primeras en ser identificadas como producto de una variación de secuencia. Aunque a nivel de población mundial es considerada como producto de una mutación puntual, dentro de poblaciones de ascendencia africana puede considerarse como un polimorfismo de nucleótido simple ya que está presente en más del 1% de estas poblaciones y además confiere resistencia al padecimiento de la malaria (Frenette *et al.*, 2007). La siclemia fue la primera enfermedad genética en ser analizada a nivel molecular y ha sido utilizada como modelo para el ensayo de algunos sistemas diagnósticos que permitan la detección de SNPs a lo largo del genoma (Ingram, 2004).

Los sistemas para la detección específica de mutaciones y SNPs incluyen técnicas moleculares como la secuenciación directa, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), PCR Alelo Específica (AS-PCR), *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS), Hibridación Alelo Específica, PCR Bidireccional Alelo Específica (BIPASA), y otras técnicas derivadas. Existen además técnicas que son alelo

inespecíficas y que generalmente permiten el rastreo al azar de polimorfismos a lo largo de una secuencia dada con fines diagnósticos o investigativos.

La secuenciación ha sido la técnica básica con la que se ha podido detectar la mayoría de polimorfismos y mutaciones de una manera directa y efectiva. Sin embargo, debido a su costo y la necesidad de equipo especializado para su análisis, este método es utilizado más como un sistema confirmatorio al descubrimiento de polimorfismos mediante métodos inespecíficos. Por ejemplo, la detección de una variación de secuencia en las curvas de *denaturación* revelado mediante DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) o por medio de un *termociclador* en tiempo real, es de tipo inespecífico ya que no identifica la posición exacta del polimorfismo ni su secuencia. Para esto, es necesario secuenciar la región de DNA previamente analizada mediante las técnicas inespecíficas y así determinar el tipo de mutación y su secuencia. Una vez obtenida esta información es posible implementar un sistema diagnóstico específico con el que se garantice el rastreo únicamente de la variante genética en estudio. Por este motivo, la mayoría de sistemas diagnósticos moleculares incluyen técnicas de tipo alelo específico.

1.4.1.2 Rastreo de mutaciones mediado por la amplificación alelo específica

La amplificación alelo específica o PCR alelo específica se basa en la amplificación enzimática de una secuencia de DNA que posee una característica alélica determinada que se quiere buscar. Esta técnica alelo específica permite la discriminación de alelos que poseen un determinado polimorfismo, de aquellos que no lo poseen, dentro de una muestra de *DNA genómico*. A continuación se describirá con mayor detalle las bases técnicas que involucran la detección de mutaciones y polimorfismos mediante amplificación de DNA.

1.4.1.2.1 Principios básicos sobre la amplificación de DNA

La amplificación de DNA es un proceso de síntesis enzimática de una secuencia específica dentro de un genoma o fragmento de DNA. La técnica para la

amplificación de DNA fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis y colaboradores, quienes la denominaron *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis *et al.*, 1986). La amplificación de una secuencia de DNA por PCR requiere de sustratos y componentes *cofactores* que permiten la síntesis de DNA *in vitro* por la enzima *DNA polimerasa*. Los reactivos o componentes principales para la PCR son fundamentalmente los siguientes:

- Tris-HCl, que permite mantener la solución de reacción a pH 8.3 correspondiente al pH óptimo para la actividad enzimática de la DNA polimerasa.
- KCl, que mantiene la fuerza iónica necesaria para la estabilidad enzimática y de la estructura del DNA. Generalmente se mantiene su concentración en 50 mM, aunque puede ser variada para alterar ciertas propiedades del DNA en la reacción.
- $MgCl_2$, que aporta con iones Mg^{2+} , es el principal cofactor de la DNA polimerasa y estabilizador de los nucleótidos en solución. Su concentración puede variar desde 1 mM hasta 10 mM, dependiendo de las demandas de la reacción. Sin embargo en la práctica, aumentar la concentración de este cofactor enzimático puede elevar de forma negativa la actividad enzimática de la DNA polimerasa.
- Los desoxirribonucleótidos o dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), que representan al sustrato de la reacción enzimática. Su concentración puede variar desde los 100 μM hasta 800 μM de cada dNTP, dependiendo de las demandas de la reacción. Como es conocido según la cinética de Michaelis-Menten, un aumento en la concentración de sustrato generalmente aumenta la velocidad de reacción enzimática hasta un punto de saturación; sin embargo, los dNTPs atrapan magnesio para estabilizarse en solución, reduciendo la concentración de iones Mg^{2+} libres y disponibles para la actividad de la DNA polimerasa. El equilibrio óptimo entre la concentración de dNTPs y $MgCl_2$ constituye un factor crítico determinante para ciertas reacciones exigentes de amplificación de DNA (Dieffenbach *et al.*, 2003).

- Los **oligonucleótidos** cebadores o *primers*, que constituyen los iniciadores de la síntesis de DNA por la polimerasa desde un punto específico del DNA genómico. Estos aportan con los grupos hidroxilo en su extremo 3' terminal, necesarios para la iniciación de la síntesis enzimática y deben hallarse generalmente en exceso en relación al DNA blanco. Las secuencias de estos *primers* deben ser complementarias a los extremos del fragmento de amplificación. Su concentración puede variar en un amplio rango dependiendo de las necesidades y requerimientos de la experimentación, aunque de forma estándar se suele ensayar con una concentración media saturante de 0.2 μ M.
- La DNA polimerasa termoestable, que es la responsable de la síntesis de DNA desde los extremos 3' de los *primers*. Existen algunas DNA polimerasas termoestables de origen bacteriano, cuya actividad polimerásica es muy similar. Generalmente es utilizada la DNA polimerasa del **hipertermófilo** *Thermus aquaticus*, denominada *Taq* polimerasa. El requerimiento de su termoestabilidad radica en la necesidad de elevar la temperatura hasta niveles que resultan inhibitorios para la mayoría de enzimas. Esta elevación a más de 90°C es fundamental para la separación no enzimática de las cadenas de DNA durante los ciclos de reacción.
- El DNA genómico o DNA blanco, el cual contiene la secuencia a amplificar. Tan solo una molécula de DNA genómico es susceptible de ser amplificada por PCR bajo condiciones óptimas. Por lo tanto, la concentración de DNA blanco en la reacción dependen de los requerimientos de la técnica. Generalmente se suelen utilizar rangos entre 0.1 y 100 ng de DNA por reacción. Hay que tomar en cuenta que cuando se intenta amplificar varias regiones o alelos en un mismo genoma es recomendable que la concentración de DNA blanco sea mayor con el fin de satisfacer su demanda en el proceso.

Los componentes antes mencionados son mezclados para formar la solución de reacción y sus concentraciones deben ser estandarizadas según la técnica y sus requerimientos. A la mezcla de estos componentes exentos de DNA y ensamblados para

un determinado número de reacciones se le denomina *master mix*. Cada tubo de reacción será sometido a varios ciclos de temperatura que se repiten un número determinado de veces gracias a un equipo especial denominado termociclador. En cada uno de los ciclos, la solución es calentada de 90 a 95°C para permitir la denaturación del DNA, luego la temperatura es bajada hasta 50-70°C para permitir la **hibridación** o *annealing* de los *primers* y finalmente la temperatura es elevada a 72°C, que corresponde a la temperatura de mayor actividad enzimática de la *Taq* polimerasa. Luego de la denaturación, dado que las hebras complementarias de DNA genómico se encuentran en una concentración demasiado baja para complementarse entre sí en el periodo de hibridación, los *primers* específicos logran hibridar con las secuencias complementarias del DNA genómico al bajar la temperatura, dado que su concentración es relativamente elevada. Entonces, los *primers* hibridados sirven como iniciadores para la síntesis de las cadenas de DNA, que comienzan por la incorporación de dNTPs por la *Taq* polimerasa cuando se aplican los 72°C. Finalizado este ciclo, comienza uno nuevo con las mismas características de forma sucesiva (Figura 1.1). El número de ciclos generalmente aplicado en una PCR tradicional es de 30, aunque pueden aplicarse más ciclos dependiendo de las necesidades de la técnica. En una PCR tradicional en general no son necesarios más de 30 ciclos para obtener un buen rendimiento de producto o **amplificación**, ya que la actividad enzimática de la DNA polimerasa va disminuyendo por efecto del estrés térmico al que ha sido sometida en el proceso (Lodish *et al.*, 2002). El tiempo y temperatura aplicados en cada uno de los tres pasos de cada ciclo es un factor de importancia en el posterior diseño y optimización del programa de amplificación, ya que de esto dependerá la optimización del consumo de tiempo y recursos requeridos para un buen rendimiento de producto. En cada ciclo, la denaturación, *annealing* y extensión deben tener una temperatura óptima aplicada durante un tiempo suficiente con el fin de mejorar las condiciones del proceso.

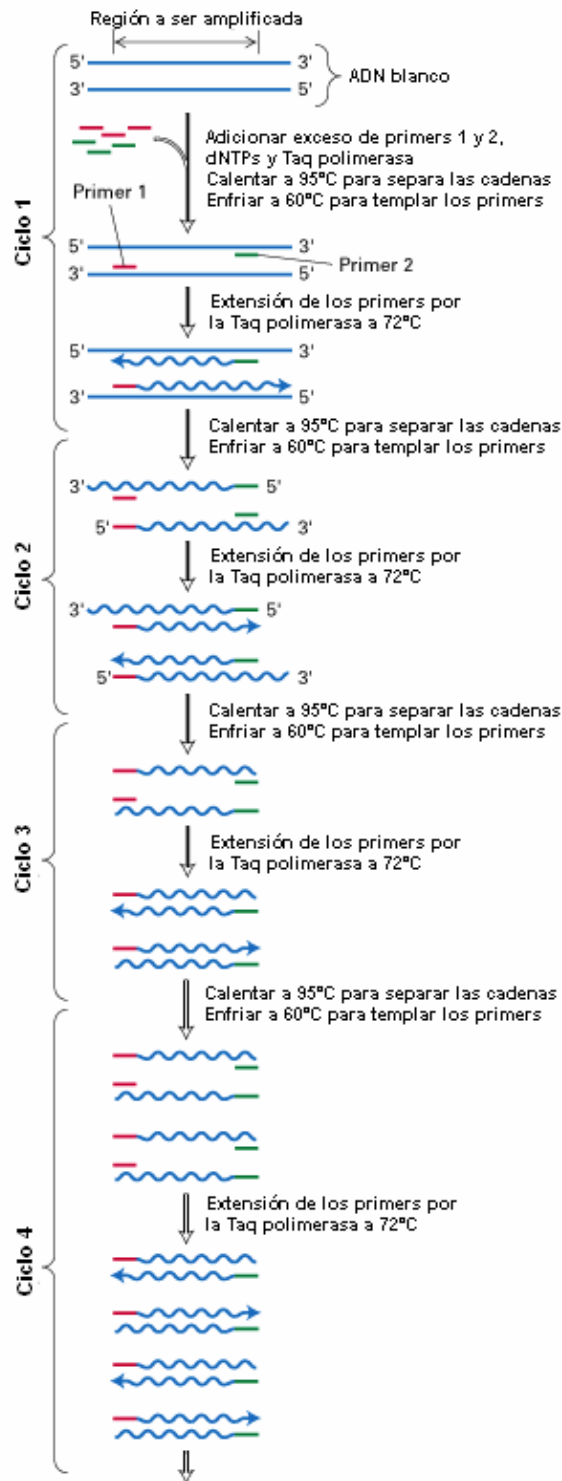


Figura 1.1. Esquema del proceso de amplificación de DNA por PCR. Tomado de: Lodish *et.al.* (2002) *Biología Celular y Molecular*. E. M. Pan. New York. pp 247.

El tiempo de denaturación aplicado está relacionado generalmente con la longitud y porcentaje de Guanina (G) y Citosina (C) del amplicón. Según esto, el tiempo de denaturación puede variar desde los 10 a los 60 segundos a una temperatura de 94°C. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que un mayor tiempo de exposición de la *Taq* polimerasa a temperaturas de 94°C puede inhibir su actividad con mayor facilidad. Por este motivo se recomienda que para amplicones de menos de 1 kb se apliquen tiempos de denaturación de hasta 30 segundos; un tiempo mayor sería innecesario. En algunos casos también se recomienda bajar la temperatura y tiempo de denaturación con el fin de mejorar la especificidad de la apertura de cadenas sobre el amplicón generado inicialmente. Amplicones menores a 1 kb con un contenido de GC promedio no requieren más de 90°C para su completa denaturación (Henegariu *et al.*, 1997).

Para la mayoría de *primers*, el tiempo de *annealing* que se recomienda regularmente no supera los 50 segundos. Por otro lado, la temperatura de *annealing* aplicada puede variar de una forma muy amplia dependiendo de las características de los *primers*. Una temperatura de *annealing* de 54°C es considerada por algunos autores como el límite inferior aceptable para la mayoría de *primers*. Desde este punto, la temperatura de *annealing* puede elevarse con el fin de reducir la estabilidad de los *primers* y evitar su hibridación con secuencias inespecíficas o regiones diferentes a la secuencia blanco. Este aspecto será discutido con mayor detalle en la siguiente sección.

Según la experimentación, se ha establecido que el tiempo de extensión a 72°C debe ser de 1 minuto por cada kb de longitud del amplicón. Para amplicones menores a 1 kb este tiempo puede ser reducido con el fin de hacer más eficiente el proceso de amplificación. También es necesario tomar en cuenta que la actividad enzimática de la *Taq* polimerasa tiene también un rango de temperatura más o menos flexible. Teóricamente, la enzima puede ser activa a temperatura ambiente, por lo tanto, no es raro observar un rendimiento aceptable para ciertos amplicones al aplicar temperaturas de extensión de 65°C. Según esto, es posible diseñar sistemas de amplificación en los que se aplica un paso de *annealing* y extensión simultáneamente, técnica denominada *two-step PCR*.

1.4.1.2.2 Consideraciones sobre el diseño de primers

Tal como sucede *in vivo*, la enzima *Taq* polimerasa requiere de un oligonucleótido que exponga su grupo hidroxilo 3' terminal con el fin de iniciar la adición de dNTPs desde un punto especificado por dicho oligonucleótido. *In-vitro*, esto es únicamente posible utilizando oligonucleótidos sintéticos de cadena simple denominados *primers*. Los *primers* serán entonces las secuencias 5' terminales de todo amplicón y determinarán su longitud final. Los *primers* generalmente deben tener una longitud de entre 10 y 30 pares de bases y sus propiedades termodinámicas deben ser tales que permitan una correcta complementación de su secuencia en el DNA genómico. En todo oligonucleótido iniciador de la PCR hay la posibilidad de que exista complementariedad incompleta en su extremo 3', lo cual permite la amplificación de regiones distintas a la secuencia blanco dentro del genoma. Esta amplificación es denominada amplificación inespecífica y es considerada como uno de los principales factores que reducen el rendimiento en técnicas de amplificación exigentes.

La característica termodinámica fundamental en la que se basa el diseño de los *primers*, es la temperatura de *melting* o *T_m*. El valor de *T_m* de un *primer* representa la temperatura media a la cual el 50% del oligonucleótido se encuentra como doble hélice y el 50% restante se encuentra en disposición randómica. El cálculo más acertado del *T_m* se basa en la relación de la suma de *entalpías* y *entropías* existentes entre los pares de nucleótidos del *primer*, basado en el modelo termodinámico unificado *Nearest Neighbour* propuesto por SantaLucia (1998). La *T_m* es una temperatura que permite una elevada estabilidad al *primer* para su hibridación tanto con el DNA blanco como consigo mismo. Este nivel de estabilidad no es adecuado para el proceso de amplificación ya que es demasiado permisivo y de poca especificidad con la secuencia blanco. El cálculo de *T_m* es esencial para determinar la temperatura óptima teórica de hibridación, denominada también temperatura de *annealing* o *T_a*. La fórmula básica para el cálculo de la *T_m*, corregida para la concentración de sal (NaCl o KCl), se ilustra en la siguiente ecuación:

$$T_m^{primer} (^{\circ}C) = \frac{\sum \Delta H_d + \Delta H_i}{\sum \Delta S_d + \Delta S_i + \Delta S_{syn} + R \cdot \ln(c/b)} + 16.6 \log_{10} [K^+] - 273.15$$

Ec.1

La sumatoria de entalpías (ΔH_d) y entropías (ΔS_d) son calculadas en base a los valores de las dupletas nucleotídicas (modelo termodinámico Nearest Neighbour) de la secuencia del *primer*. Los valores de ΔH_i y ΔS_i corresponden a las sumas de las entalpías y entropías de iniciación o factores de iniciación de hélice, respectivamente, que representan la estabilidad durante la formación del dúplex de DNA. ΔS_{syn} es una penalidad que se aplica a los oligonucleótidos autocomplementarios, y de no serlo, su valor es cero. Todos estos valores de entalpía y entropía se encuentran en las tablas de los parámetros termodinámicos según el modelo Nearest Neighbour de SantaLucía *et al.* (1996), aunque pueden ser aplicados los parámetros termodinámicos de otros modelos anteriores. El valor de R, constante fundamental de los gases ideales, es generalmente fijada en 1.987 cal/K·mol ya que estas son las unidades en las que se presentan los parámetros termodinámicos. El valor de c corresponde a la concentración molar del oligonucleótido en la solución de reacción y b toma un valor de 1 para los oligonucleótidos autocomplementarios, caso contrario toma un valor de 4. $[K^+]$ corresponde a la concentración molar de sal KCl utilizada para la estabilización de la doble hélice en solución (generalmente se utiliza un valor estándar de 0.005M) (Panjkovich *et al.*, 2005).

Una vez calculado el valor de T_m de los *primers* es necesario también calcular el T_m del producto final de ambos *primers*, con el fin de obtener un valor de T_a óptimo para la hibridación con el DNA blanco en cada ciclo de reacción. Para obtener un valor aproximado del T_m del producto se aplica la fórmula modificada de Marmur–Schildkraut–Doty, la cual está descrita por la siguiente ecuación:

$$T_m^{producto} (^{\circ}C) = 81.5 + 16.6 \log_{10} [K^+] + 0.41(GC\%) - \frac{675}{n} \quad \text{Ec. 2}$$

donde $[K^+]$ es la concentración molar de KCl aplicada en la fórmula anterior, $GC\%$ es el porcentaje de nucleótidos guanina y citosina en la secuencia del producto y n

es el número de unidades nucleotídicas o longitud del producto en número de pares de bases. El valor obtenido de esta fórmula es muy importante cuando se requiere optimizar la temperatura de denaturación necesaria para la separación específica de las cadenas del producto.

Finalmente, para el cálculo de la temperatura de *annealing óptima* (T_a óptima) es generalmente utilizada la fórmula modificada de Rychlik (1990), que incluye a la T_m del *primer* y del producto. Esta fórmula se describe a continuación:

$$T_a^{optima} = 0.7 \cdot T_m^{producto} + T_m^{primer} - 11 \quad \text{Ec. 3}$$

Este valor de T_a óptima puede ser utilizado directamente como temperatura de hibridación dentro de los ciclos de reacción. El valor de la T_a óptima no es un valor estricto, sino más bien es una referencia que indica la temperatura de mayor rendimiento teórico para el par de *primers* utilizados para la amplificación de una determinada secuencia blanco. Por este motivo, para los fines experimentales, el valor de T_a en el programa de amplificación no siempre debe ser igual al calculado como T_a óptima. En algunos casos es posible obtener un mayor rendimiento de producto al aplicar una T_a más baja, ya que las temperaturas bajas de *annealing* promueven una mayor estabilidad de hibridación para el *primer*. Sin embargo y como ya se mencionó anteriormente, una mayor estabilidad en el *primer* puede conllevar a la hibridación de éste con secuencias inespecíficas dentro del genoma.

Así, la T_a óptima se convierte tanto en una referencia de rendimiento como de especificidad. En la práctica, para algunos *primers* es posible elevar la T_a muy por encima de la T_a óptima, con el fin de mejorar la especificidad de la hibridación. La especificidad es de gran importancia en las técnicas de diagnóstico por amplificación alelo específica, no sólo para evitar la hibridación del *primer* con secuencias inespecíficas, sino también para conseguir una buena especificidad alélica.

La especificidad alélica en la amplificación alelo específica se relaciona con la necesidad de que el nucleótido 3' terminal del *primer* se paree efectivamente con su *complementario* en el DNA blanco con el fin de iniciar la adición de nucleótidos por la *Taq* polimerasa. Es decir que cuando el extremo 3' terminal del *primer* no se

complementa con la secuencia blanco, éste no puede servir como iniciador en el proceso de amplificación y por lo tanto no habrá amplificación. Este fenómeno es aprovechado con el fin de verificar la presencia de un determinado alelo polimórfico, diseñando un *primer* específico cuyo nucleótido 3' terminal coincida con dicho alelo. Sin embargo, en algunas ocasiones, la *Taq* polimerasa es capaz de iniciar la amplificación a partir de *primers* no complementados en 3'. Este fenómeno se da debido a que bajo ciertas condiciones, algunas combinaciones de nucleótidos no complementarios tienen interacciones incompletas que los mantienen estables. En este caso se puede decir que no existe una buena especificidad alélica del *primer* utilizado. En la siguiente sección se profundizará sobre la especificidad alélica y su relación con la capacidad refractaria.

Según la experimentación, se ha podido verificar que para determinados *primers* de alta eficiencia para su hibridación, el valor de la *Ta* óptima es muy flexible y no tiene mucha relevancia cuál de los modelos o parámetros termodinámicos han sido utilizados (Kalendar, 2005). Estos *primers* altamente estables generalmente tienen una longitud mayor o igual a 20 pares de bases y tienen un contenido de GC entre el 50 y el 60%. La estabilidad de estos *primers* puede ser tan elevada que pueden hibridar dentro de intervalos de *Ta* hasta 70°C, sin que la reducción del rendimiento neto de la reacción sea considerable. Debido a que a estas temperaturas la enzima *Taq* polimerasa es altamente activa, es usual unir los pasos de *annealing* y extensión de los ciclos de reacción, convirtiendo al proceso de amplificación en una PCR bifásica o *two-step* PCR. Para estos casos, es posible reducir el número de pasos en el proceso de amplificación para cada ciclo, lo cual se traduciría en una reducción en el tiempo de reacción.

1.4.1.2.3 El diseño de primers y la amplificación alelo específica

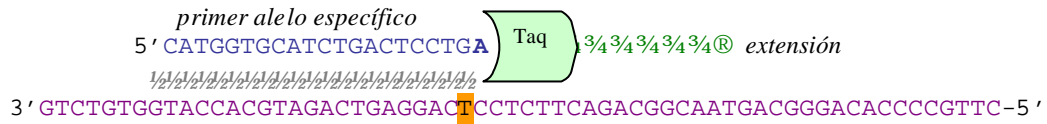
La amplificación alelo específica fue desarrollada en 1989 por varios investigadores de forma independiente. Sin embargo, han sido dos grupos principales de investigadores quienes se han disputado la autoría de esta técnica. Ugozzoli *et al.* (1989) lanzaron su técnica de ***genotipificación*** alelo específica y la denominaron AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction) aplicada sobre la mutación responsable de la siclemia o anemia de células falciformes. C.R. Newton *et al.* (1989)

lanzaron un sistema parecido, pero lo denominaron ARMS (Amplification Refractory Mutation System) y la aplicaron sobre pacientes con deficiencia de α 1-antitripsina. La amplificación alelo específica ha tenido algunas variantes a lo largo del desarrollo de la biología molecular con el fin de detectar SNPs de forma específica. Sin embargo todas se basan en un mismo principio molecular y en base a esto se han planteado nuevas alternativas para su optimización.

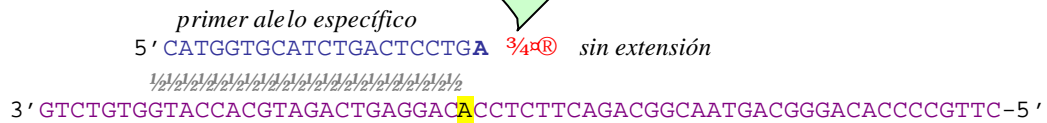
Para la amplificación alelo específica es necesario tomar en cuenta que el nucleótido inicial del extremo 3' del *primer* debe coincidir con el nucleótido del alelo rastreado. Al hallarse este alelo en el DNA blanco, la amplificación se hace efectiva debido al apareamiento completo del extremo 3' del *primer* y en consecuencia se produce la elongación o extensión de la cadena de DNA desde este punto. Por otro lado, en caso de no hallarse dicho alelo, teóricamente la amplificación no se haría efectiva debido a que la DNA polimerasa no tendría un iniciador espacialmente bien ubicado para su unión dentro del sitio activo de la enzima. La presencia o ausencia de amplificación puede ser fácilmente rastreada por medio de *electroforesis* en gel de agarosa o acrilamida. En la figura 1.2 se resume de forma ilustrativa el fundamento básico para la amplificación alelo específica sobre el sitio de inicio de la amplificación de un *forward primer* alelo específico. Es necesario tomar en cuenta que en la cadena complementaria a la secuencia de la figura 1.2 (cadena sentido) deberá hibridar el *reverse primer* a una cierta distancia que determinará el tamaño final del amplicón, tal como se indica en la figura 1.1 en la que se ubica al *primer 2* al extremo derecho de la región a amplificar.

Aunque para la mayoría de *mismatches* el fundamento de la figura 1.2 es correcto, sin embargo, existen *mismatches* con el extremo 3' del *primer* que son capaces de iniciar la amplificación debido a que logran establecer interacciones incompletas que permiten un buen acoplamiento con el sitio activo de la DNA polimerasa. En esto se basa la capacidad refractaria de un determinado *mismatch* en un *primer* alelo específico. Cuando un *primer* específico permite discriminar correctamente la presencia o ausencia de un alelo se dice que este posee una buena capacidad refractaria. Por el contrario, cuando un *primer* específico permite la amplificación de un alelo inexistente en la muestra se dice que este es débilmente refractario.

A) Alelo presente (positivo)



B) Alelo ausente (negativo)



C) Análisis electroforético

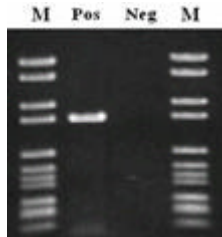


Figura 1.2. Representación de la amplificación alelo específica sobre el sitio de annealing y extensión del primer alelo específico. La secuencia del DNA blanco se ilustra en color índigo. La secuencia del primer específico se ilustra en azul. Los alelos divergentes se muestran con diferente sombreado. A) Representación de la extensión efectiva de la cadena durante la PCR al existir un pareamiento específico completo del primer en el extremo 3'. B) Representación de la falta de extensión durante la PCR al existir un mismatch con el extremo 3' del primer. C) Simulación del análisis electroforético de las anteriores representaciones de A (Pos) y de B (Neg); se denota como M al marcador de peso molecular.¹

Shu Ye, Sahar Dhillon, Xiayi Ke, Andrew Collins y Ian Day, creadores de la técnica alelo específica *tetra-primer* ARMS (2001), clasificaron a los *mismatches* según su capacidad refractaria durante la amplificación alelo específica. Estos investigadores definieron a los *mismatches* G/A o C/T como altamente refractarios, A/A C/C G/G T/T como medianamente refractarios, y C/A o G/T como débilmente refractarios. Sin

¹ La ilustración en C) corresponde a un ensayo molecular mediante PCR específica para la detección de *Oenococcus oeni*, por medio del gen 16S rRNA. Tomado de: Asociación Catalana de Enólogos. (2007). *Ciencia y Tecnología*. www.acenologia.com/figs64_ciencia2.htm.

embargo, los investigadores Qiang Liu, Erik Thorland, John Heit y Steve Sommer (1997), revelaron con anterioridad que en la capacidad refractaria están involucrados otros factores adicionales en los que se incluye al T_m del *primer* alelo específico. El diferencial entre los T_m de los extremos 5' y 3' del *primer* alelo específico podría explicar de alguna forma la variabilidad en su capacidad refractaria cuando se aumentan o disminuyen nucleótidos en su secuencia 5' y al elevar la temperatura de *annealing* por sobre la T_a óptima.

De forma experimental, Liu y sus colaboradores demostraron que mientras mayor es la diferencia entre las T_m de los extremos 5' y 3' (donde en 5' la T_m debe ser mayor que la T_m de 3') mayor será la capacidad refractaria.² Bajo estas condiciones, la capacidad refractaria es un valor absoluto, por lo que es más conveniente hablar de especificidad alélica. La especificidad alélica es la capacidad de discriminación que tiene un *primer* para detectar uno y solo uno de los alelos posibles. De esta forma, bajo la presión de un *mismatch* medianamente refractario por ejemplo, un *primer* puede ser alelo específico bajo ciertas condiciones o no serlo bajo otras condiciones. Así, la capacidad refractaria se convierte en una referencia del limitante existente para obtener la especificidad alélica deseada.

La especificidad alélica no tiene relación con la amplificación inespecífica. Como se ha mencionado anteriormente, la amplificación inespecífica se refiere a la amplificación de regiones diferentes a la especificada por la secuencia de los *primers* utilizados. Está dada por la capacidad que tienen ciertos *primers* para hibridar con regiones del genoma no especificadas, debido a una determinada complementariedad del extremo 3' con estas regiones. Es muy común que un *primer* al cual no se le ha realizado un análisis de alineamiento con todo el genoma pueda tener cierta complementariedad en 3' con regiones no especificadas. Esto también es aplicable a los *primers* alelo específicos dado que no es posible modificar su secuencia en el extremo 3'. Por lo tanto, en todo sistema de amplificación alelo específica es casi imposible evitar tener amplificación inespecífica a menos que se mantengan condiciones de reacción altamente estrictas.

² La T_m de los extremos 5' y 3' terminales representa generalmente la T_m de los 10 nucleótidos proximales a dichos extremos en la secuencia de un *primer*. Su valor sobre el extremo 3' se denota como T_{m10} .

1.4.2 PCR Bidireccional Alelo Específica en el diagnóstico molecular

1.4.2.1 Inicios y fundamentos de la PCR bidireccional

La PCR Alelo Específica (ASA) y la Amplification Refractory Mutation System (ARMS), desarrolladas en 1989, son técnicas basadas en la capacidad de los *primers* para iniciar la amplificación de DNA siempre y cuando su extremo 3' terminal, que coincide intencionalmente con el alelo buscado, logre hibridar efectivamente con su secuencia complementaria en el DNA blanco. En caso de darse una total complementación del extremo 3' del *primer*, la amplificación se posibilita y se hace evidente por la presencia de la banda correspondiente en el gel de electroforesis. Sin embargo, para el análisis de los dos posibles alelos, es decir, para la discriminación simultánea del alelo normal y el alelo mutante, se requiere de dos reacciones paralelas por separado. Esto se traduce en un consumo doble de reactivos para el análisis de una sola muestra, siendo un inconveniente importante en el análisis de grandes volúmenes de muestras. La corrección a este problema se dio mediante el desarrollo de la PCR bidireccional, en la cual se utilizan los fundamentos de la PCR alelo específica para diseñar *primers* internos en posición opuesta o bidireccional. Los *primers* internos amplifican uno de los alelos buscados de forma independiente, pero su bidireccionalidad permite diferenciar dicha amplificación ya que se utilizan *primers* externos ubicados a distancias diferentes, por lo que los amplicones producidos por cada par de *primers* tendrán una longitud diferente y distinguible directamente en el gel de electroforesis. Todo este proceso es realizado en un solo tubo de PCR, por lo cual existe un ahorro considerable de reactivos.

El desarrollo de la PCR bidireccional inicia en 1991 con el diseño de la *tetra primer* PCR por los investigadores Shu Ye, Steve Humphries y Fiona Green. Mediante esta técnica era posible la discriminación alélica con el fin de diferenciar *homocigotos* de *heterocigotos*, utilizando un solo tubo de amplificación, a diferencia de la PCR Alelo Específica y la ARMS, que requieren reacciones independientes en dos tubos para este mismo fin. Como se ilustra en la figura 1.3, la *tetra primer* PCR requiere de cuatro *primers* dispuestos de tal forma que los *primers* internos (3 y 4) inician la amplificación en sentido bidireccional. Los *primers* externos 1 y 2, permiten definir el tamaño final que producirán los *primers* internos, diferenciando al alelo correspondiente por su longitud y

migración en el gel de electroforesis. En este sistema de genotipificación, se utiliza un programa de amplificación en dos fases: una primera fase de 10 ciclos con una *Ta* alta compatible con los *primers* externos, y una segunda fase de 20 ciclos con una *Ta* baja compatible con los *primers* internos. Este sistema permite controlar que la amplificación del producto más pesado, entre los *primers* 1 y 2, se de en los ciclos iniciales, y que los productos de los *primers* 3 y 4 se de a expensas de éste último, en los ciclos subsiguientes. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, la necesidad de bajar la temperatura de *annealing* a valores inferiores a los 56°C para permitir el *annealing* de los *primers* 3 y 4 daba como resultado un aumento en la amplificación inespecífica. Además, los *primers* 3 y 4 eran diseñados de tal forma que el alelo se ubicaba en el interior de su secuencia, lo cual para ciertas mutaciones no era lo suficientemente refractario como para impedir la amplificación de alelos distintos a temperaturas bajas de *annealing*.

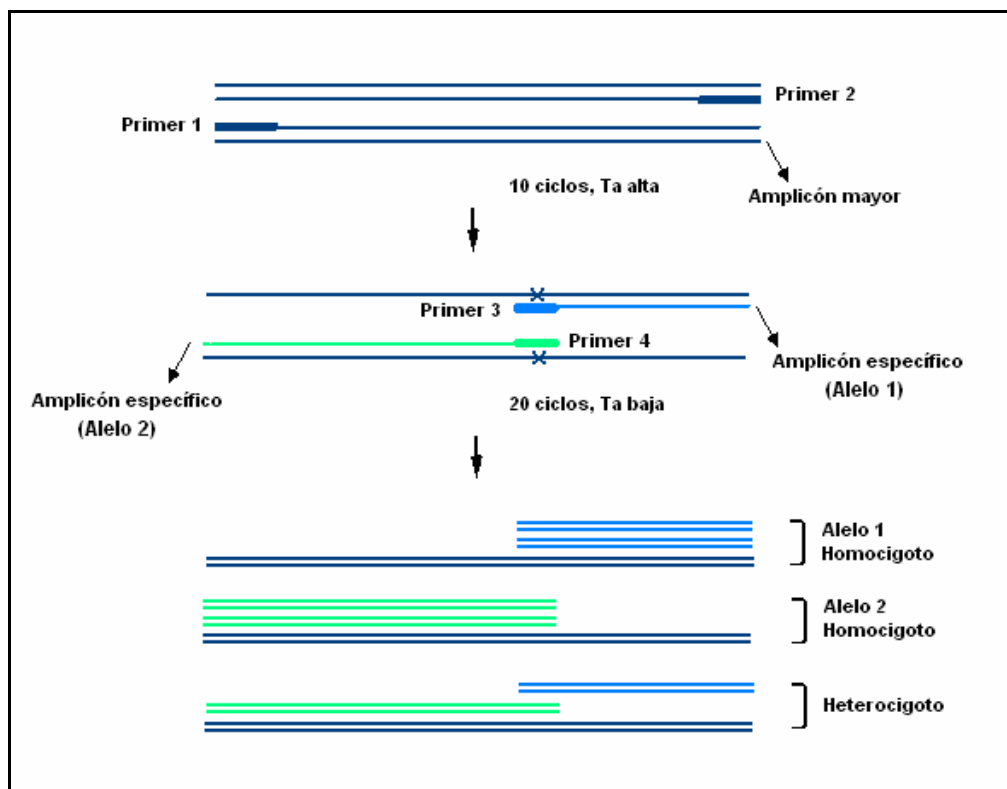


Figura 1.3. Representación esquemática del proceso molecular de la tetra-primero PCR. Se indica con una cruz la posición de los alelos amplificados por los primers específicos 3 y 4. Tomado de: Ye *et.al.* (1991). Allele specific amplification by tetra-primer PCR.

Mediante la *tetra primer* PCR el rendimiento del producto de amplificación mayor (generado por los *primers* 1 y 2) generalmente es mucho más alto que los otros amplicones alelo específicos. Estudios posteriores realizados sobre la *tetra primer* PCR ayudaron a revelar un fenómeno que luego sería denominado *megapriming*. El *megapriming* se produce especialmente en la amplificación bidireccional debido a la complementariedad que existe entre los productos de amplificación menores (amplicones alelo específicos) con el producto de amplificación mayor. Debido a esto, los amplicones menores se vuelven mega-*primers* que se hibridan con el amplicón mayor permitiendo la síntesis de un mayor número de estos amplicones (Fig. 1.4). El resultado era un bajo o nulo rendimiento de los amplicones específicos y un mayor rendimiento del amplicón mayor. La solución para el *megapriming* fue la adición de regiones no complementarias en el extremo 5' de los *primers* específicos. Esta es la base para el diseño del sistema BIPASA que se detallará en la siguiente sección.

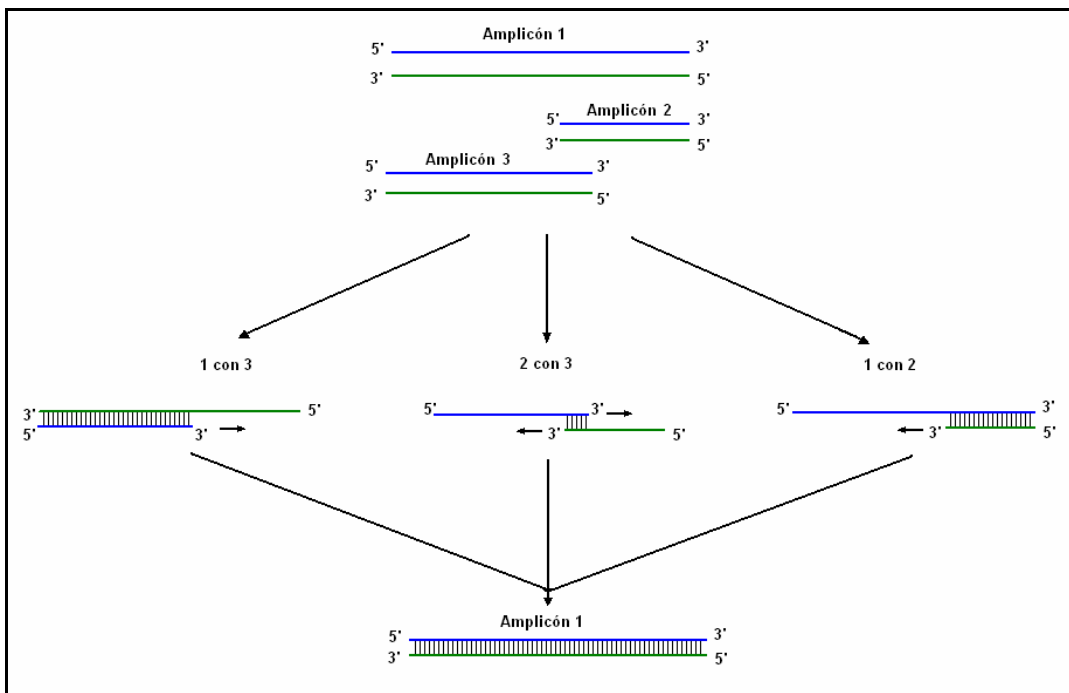


Figura 1.4. Fenómeno de megapriming entre los productos de una PCR bidireccional exentos de regiones 5' no complementarias. Ilustración elaborada por el autor.

1.4.2.2 La PCR bidireccional alelo específica y otros sistemas optimizados

La PCR bidireccional alelo específica fue prácticamente una fusión entre los sistemas de PCR alelo específica y la *tetra primer* PCR, incluyendo la adición de uno o dos nucleótidos no complementarios en los extremos 5' de los *primers* específicos para evitar el *megapriming*. Sin embargo, este sistema trajo consigo algunos inconvenientes como la baja especificidad alélica y el bajo rendimiento de los productos alelo específicos. Esto conllevaba a una baja reproductibilidad del sistema sobre la mayoría de polimorfismos existentes.

Posteriormente, Liu *et al.* (1997) descubrieron que al adicionar nucleótidos guanina y citosina en el extremo 5' de los *primers* específicos se mejoraba sustancialmente el rendimiento y la especificidad alélica. Estas secuencias no complementarias ricas en nucleótidos G y C en los *primers* específicos son generalmente denominadas *GC-clamps*. Según los descubridores de ésta técnica, la razón para la mejora en el rendimiento con la adición de los *GC-clamps* se fundamentaba principalmente en la reducción de la competitividad entre los *primers* al crear amplicones individuales y su elevada *Tm* que permitía aplicar una *Ta* relativamente alta. Según Liu *et al.*, la temperatura óptima para el *annealing* de estos *clamped-primers* internos era de 65°C, por lo que se obtenía una elevada especificidad. Sin embargo, mediante ensayos respecto a la longitud de los *GC-clamps* se pudo verificar que mientras aumentaba el tamaño del *primer* se reducía su especificidad alélica. Por este motivo, este sistema aún debía sufrir un proceso de evaluación con el fin de verificar las mejores condiciones para el diseño de los *primers* específicos y sus secuencias no complementarias o *GC-clamps*.

El efecto que tienen los *clamped-primers* sobre la competitividad es una propiedad importante que tiene como objetivo mejorar la especificidad de la hibridación de los *primers* internos sobre las secuencias propias para cada amplicón específico (fragmentos PB y AQ, Fig. 1.5). Esto conlleva a mejorar el rendimiento de los amplicones específicos. La utilización de *clamped-primers* internos será la técnica básica para la optimización de BIPASA en el presente trabajo. Los fundamentos para la reducción de la competitividad mediante los *clamped-primers* se detallarán al final del capítulo, en la sección 1.4.3.5.

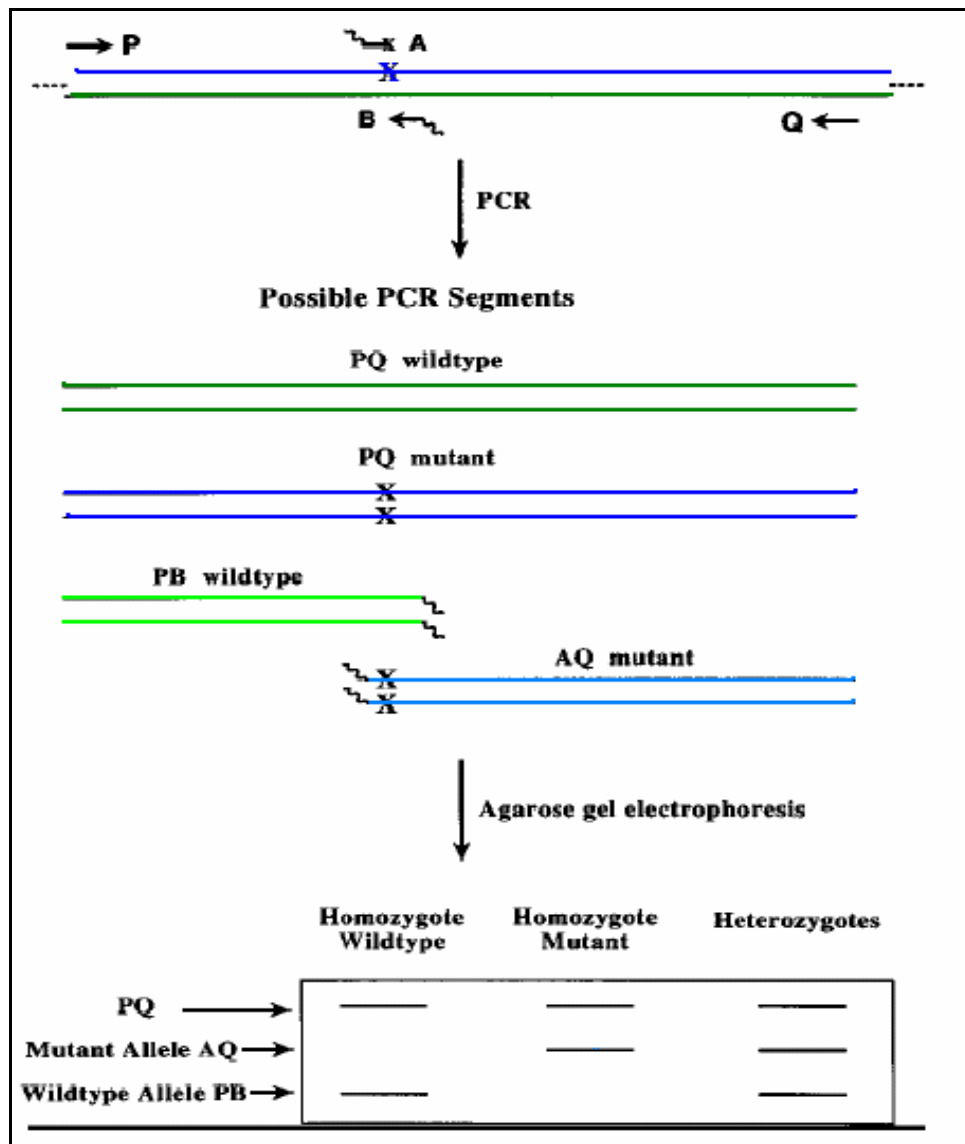


Figura 1.5. Representación de los fundamentos de la *Overlap-PCR bidireccional*. Los GC-clamps no complementarios de los primers internos se muestran con líneas sinusoidales. Por convención los primers externos se denotan como P y Q, y los primers internos como A y B. Tomado de: Liu *et al.* (1997). Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles.

Posteriormente a los estudios de Liu *et al.*, se han realizado otras modificaciones a la técnica *tetra primer* PCR, mejorando el diseño de los *primers* para conseguir reducir la amplificación inespecífica y aumentar la capacidad refractaria a alelos distintos. Una de estas técnicas es la *tetra primer* ARMS, diseñada por los investigadores Shu Ye, Sahar

Dhillon, Xiayi Ke, Andrew Collins, y Ian Day. La mejora se basa en la introducción de un *extra-mismatch* en la posición 2 desde el extremo 3' de los *primers* internos y en aumentar la concentración de los *primers* internos en una relación 10:1 respecto a los *primers* externos (Fig. 1.6). Mediante ésta técnica se lograba mejorar considerablemente la capacidad refractaria de los *primers* internos hacia alelos distintos poco refractarios; sin embargo, la amplificación inespecífica es inevitable y para ciertos alelos el rendimiento es muy bajo (Fig. 1.7).

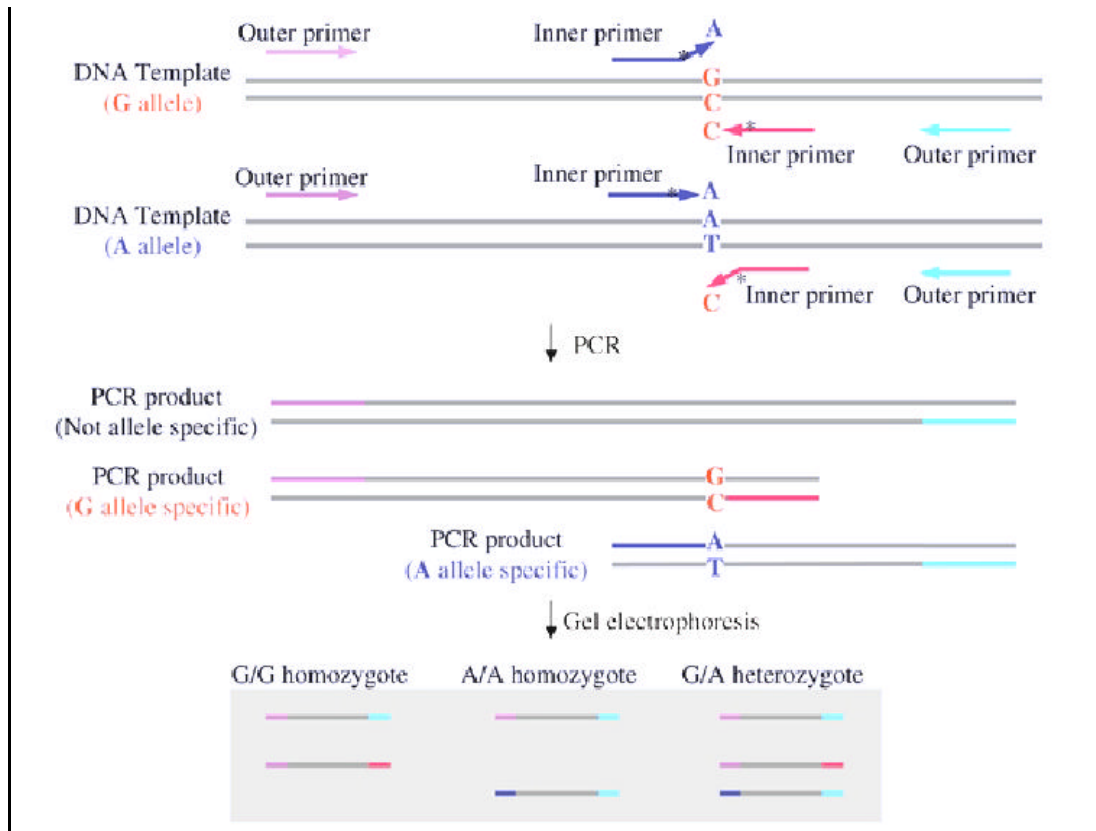


Figura 1.6. Representación esquemática sobre las bases moleculares de la Tetra primer ARMS, aplicado sobre la transición A @ G (308) en el gen TNF. El extra-mismatch es representado con un asterisco. Tomado de: Shu Ye *et al.* (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.

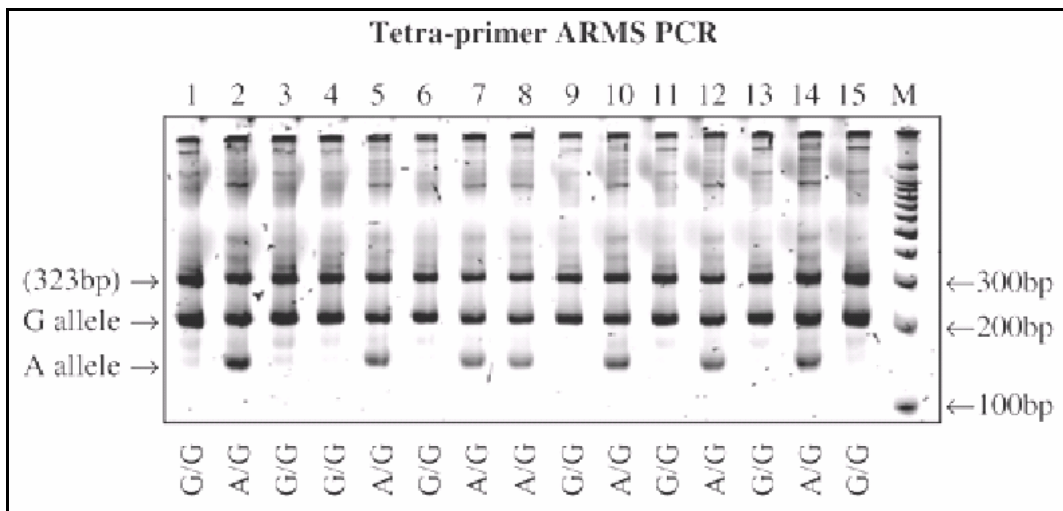


Figura 1.7. Análisis electroforético de los productos de amplificación del gen *TNF* mediante la técnica *Tetra-primer ARMS*. El par alélico correspondiente está indicado en la parte inferior del carril. Tomado de: Ye *et al.* (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms.

Para algunos alelos, la técnica *tetra primer ARMS* resulta muy acertada, sobre todo para aquellos alelos descritos como débilmente refractarios. Según los creadores de la técnica *ARMS*, al introducir un *extra-mismatch* en la posición 2 o 3 desde el extremo 3' se aumenta la capacidad refractaria a alelos distintos, utilizando las mismas temperaturas de *annealing* calculadas para el *primer*. Pero por otra parte, la introducción del *extra-mismatch* debe seguir un proceso de optimización intensivo ya que puede fácilmente producir falsos negativos bajo condiciones de amplificación diferentes a las descritas en la bibliografía. Dichas variaciones en las condiciones térmicas son inevitables cuando se trabaja en termocicladores distintos, por lo que en la mayoría de artículos se menciona una obligatoria adaptación de la técnica a las condiciones térmicas en las cuales se trabaja. Esta necesidad técnica es mucho más intensa al momento de estandarizar un sistema alelo específico y más aún, cuando dicho sistema incluye otra variable termodinámica que involucra un *extra-mismatch*. Por lo tanto, es más práctico utilizar programas de amplificación más estrictos, cuyas características térmicas sean lo más altas posibles para evitar el *annealing* inespecífico.

1.4.2.3 Alternativas para la optimización de BIPASA

En los ensayos realizados sobre las bases técnicas de la BIPASA, se menciona que bajo condiciones térmicas altas, se reducen radicalmente los errores por *annealing* inespecífico en el extremo 3'. En el artículo publicado por Liu *et al.* (1997) sobre la *Overlap-PCR*, se trabaja con un rango de T_a de alrededor de 65°C como temperatura óptima para el *annealing* de *clamped-primers* con un porcentaje de CG mayor al 50%. Los *clamped-primers* han sido una alternativa muy atractiva en el momento de modificar las características termodinámicas de los *primers*, ya que los GC-clamps tienen un fuerte efecto modificador sobre las condiciones termodinámicas de los *primers*. Debido al triple enlace de hidrógeno de los pares GC, el T_m del *primer* se eleva aproximadamente 2°C por cada G o C añadida en el extremo 5'.

Al parecer, la razón principal por la cual existió una mejora sustancial en el rendimiento y especificidad en los ensayos realizados por Liu *et al.* (1997) no es únicamente la reducción en la competencia y la individualización de los amplicones. En sus ensayos también se indica la variabilidad en la especificidad y rendimiento al alterar la longitud de los *GC-clamps* y de la secuencia complementaria. Es muy probable que la diferencia significativa entre la T_m de la secuencia complementaria y el *GC-clamp* sea también un motivo de gran importancia. Por un lado, el extremo 5' rico en nucleótidos CG (*GC-clamp*) posee un elevado T_m debido al triple enlace de estos nucleótidos, lo cual lo hace tolerante a elevadas temperaturas de *annealing*. Por otro lado, el extremo 3' posee el T_m propio de la secuencia complementaria dada y por lo tanto su valor de T_m es relativamente más bajo e intolerante a temperaturas de *annealing* altas. Gracias a este diferencial de T_m es posible jugar con las longitudes de las regiones complementarias y no complementarias del *clamped-primer* y así obtener una secuencia adecuada con la mayor especificidad alélica al aplicar una T_a superior a la T_a óptima.

Para lograr esto sin alterar el rendimiento de producto, se pueden utilizar las bases de la *tetra primer-PCR* en la cual se utiliza un programa de amplificación en 2 fases. En la primera fase se podría aplicar una T_a ligeramente superior a la T_a óptima con el fin de aumentar el número de amplicones iniciales y en la segunda fase se aplicaría una T_a superior a los 65°C para mejorar la especificidad alélica.

1.4.3 La siclemia y su detección alelo específica

1.4.3.1 Etiología de la siclemia

La siclemia o anemia de células falciformes, es una **hemoglobinopatía** de carácter genético, de tipo **autosómico recesivo**, caracterizada por la disminución en el conteo de eritrocitos o anemia crónica (drepanocitosis), infecciones agudas recurrentes, trombosis vascular y esplenomegalia. Sin tratamiento, la mortalidad puede ser alta pocos años después del nacimiento. Como toda anemia, la siclemia es una patología que está directamente relacionada con la funcionalidad de los eritrocitos y más específicamente, sobre la funcionalidad de la hemoglobina. Mediante microscopía de luz, los eritrocitos afectados se encuentran deformados mostrando estructuras parecidas a una media luna, debido a que la hemoglobina disfuncional es insoluble en el medio citoplasmático y se acumula en la membrana celular (Fig. 1.8).

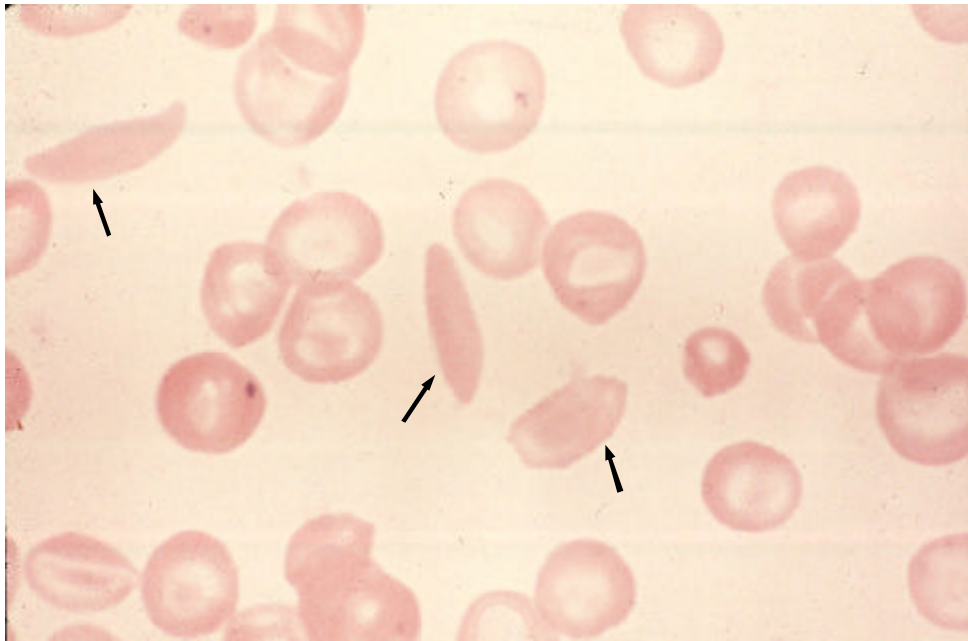


Figura 1.8. Frotis sanguíneo de un paciente con siclemia. En la ilustración se señalan con flechas los eritrocitos afectados por la precipitación de la hemoglobina S. La forma aplanada y de media luna de los eritrocitos afectados es característica en la siclemia. Tomado de: Marist Collage. (2000). Sickle Cell Anemia. <http://www.academic.marist.edu/~jzmz/HematologyI/Description24.html>

Cada molécula de hemoglobina (Hb) está formada por cuatro subunidades denominadas **globinas** y sus cuatro correspondientes grupos **hem**. La naturaleza de las cadenas globínicas determina diferentes tipos de hemoglobinas, siendo la llamada hemoglobina A (HbA) la predominante en el individuo adulto normal. La HbA constituye aproximadamente el 98% de la totalidad del contenido hemoglobínico eritrocitario y está formada por dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha_2\beta_2$) que al unirse entre sí adoptan una configuración espacial globular, necesaria para la realización de la función respiratoria. El 2% restante está constituido por hemoglobina A2 (HbA2), formada por dos cadenas α y dos cadenas δ ($\alpha_2\delta_2$), y hemoglobina fetal (HbF) formada por dos cadenas α y dos cadenas γ ($\alpha_2\gamma_2$). La Hb F representa alrededor del 80% del contenido hemoglobínico de los hematíes del recién nacido, correspondiendo el resto a HbA. El declive en la síntesis de Hb F es rápido en condiciones normales, de tal forma que a los seis meses de vida sólo se detecta un 5% de esta hemoglobina. Sin embargo, su presencia se puede prolongar en los niños afectados por siclemia ya que existe una tendencia a compensar la deficiencia de HbA funcional aumentando la síntesis de HbF. Por este motivo, la siclemia no es de fácil detección por medio de técnicas convencionales durante los primeros 6 meses de vida (Ruano *et al.*, 2004).

Hematológicamente, la hemoglobina disfuncional en la siclemia es denominada hemoglobina S (Hb S) y es fácilmente identificada mediante técnicas de electroforesis de hemoglobina. Existe otra variante involucrada en el padecimiento de la siclemia, denominada hemoglobina C (Hb C), cuya manifestación clínica crónica ocurre cuando se combina con la variante S en un mismo individuo. La siclemia por hemoglobinas SC es una variante patológica cuyos síntomas pueden variar según cada individuo, aunque su gravedad es similar a la siclemia por Hb S. Tanto la hemoglobina S como la hemoglobina C son producto de una variación en la secuencia del gen de la beta globina. Estas variaciones producen una alteración en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína que reduce su solubilidad dentro del medio líquido eritrocitario. La deformación final del eritrocito se debe a la cristalización de la proteína durante su desoxigenación en los capilares sanguíneos y la consecuente acumulación de grupos hem que deterioran la membrana por efecto de la generación de sustancias oxígeno-reactivas (Bellingham, 1974).

La siclemia es una patología prevalente entre individuos de ascendencia africana. La alta migración de poblaciones africanas hacia América ha traído consigo un cierto grado de mestizaje que ha llevado a la aparición de portadores de esta patología en individuos mestizos con ciertos rasgos negroides. Según estudios anteriormente realizados, el Ecuador tiene una prevalencia del 17% de portadores dentro de su población afroamericana (Rodríguez *et al.*, 1998). Al ser una enfermedad autosómica recesiva, una pareja heterocigota para una variante tiene el 25% de probabilidad de que un hijo nazca con siclemia. Hay un 50% de probabilidad de que el hijo sea portador del alelo mutante, perpetuándolo en la descendencia. Si bien un individuo heterocigoto para la variante, o portador, no manifiesta la enfermedad de forma crónica, puede tener problemas leves de tipo agudo bajo condiciones de estrés físico. De hecho, un individuo portador posee un 50% de hemoglobina funcional y el 50% de hemoglobina restante tiene una funcionalidad muy reducida.

La necesidad del diseño de técnicas moleculares para el diagnóstico de la drepanocitosis por Hb S radica en el hecho de que éstas no pueden ser detectadas de forma temprana en el momento del nacimiento y mucho menos durante la gestación, mediante las técnicas convencionales de electroforesis de hemoglobina. Una técnica molecular que permita el diagnóstico de drepanocitosis durante la gestación es un paso adelante para un tratamiento precoz de la enfermedad o una prueba para evaluar una posible interrupción del embarazo.

1.4.3.2 Genética de la siclemia

La cadena α de la hemoglobina consta de 141 *aminoácidos* y las cadenas β , δ , γ , y ϵ constan de 146 aminoácidos, difiriendo ligeramente en la secuencia *polipeptídica*. Los genes que codifican para la cadena α están localizados en el *cromosoma* 16, y los genes que codifican para las cadenas β , γ , y δ se encuentran en el cromosoma 11. Las hemoglobinopatías son alteraciones cualitativas o cuantitativas de la globina, relacionadas con mutaciones genéticas, cuya consecuencia puede ser una modificación estructural (hemoglobinopatías estructurales) o una disminución de la síntesis de una cadena globínica estructuralmente normal (talasemias). Específicamente, la hemoglobina

mutante tipo S, responsable de la siclemia, corresponde a una hemoglobinopatía estructural provocada por una mutación puntual. Esta variante de hemoglobina corresponde a una mutación en la β -globina a la altura del *codón* 6 de la región transcrita, señalada en la figura 1.9. El codón 6 de la β -globina codifica normalmente para el aminoácido glutamato (que posee carga negativa), pero en la hemoglobina S existe una variación en dicho codón, de GAG a GTG (*transversión* A→T), codificando ahora para el aminoácido valina (de grupo radical apolar) (Rodríguez, 1998).

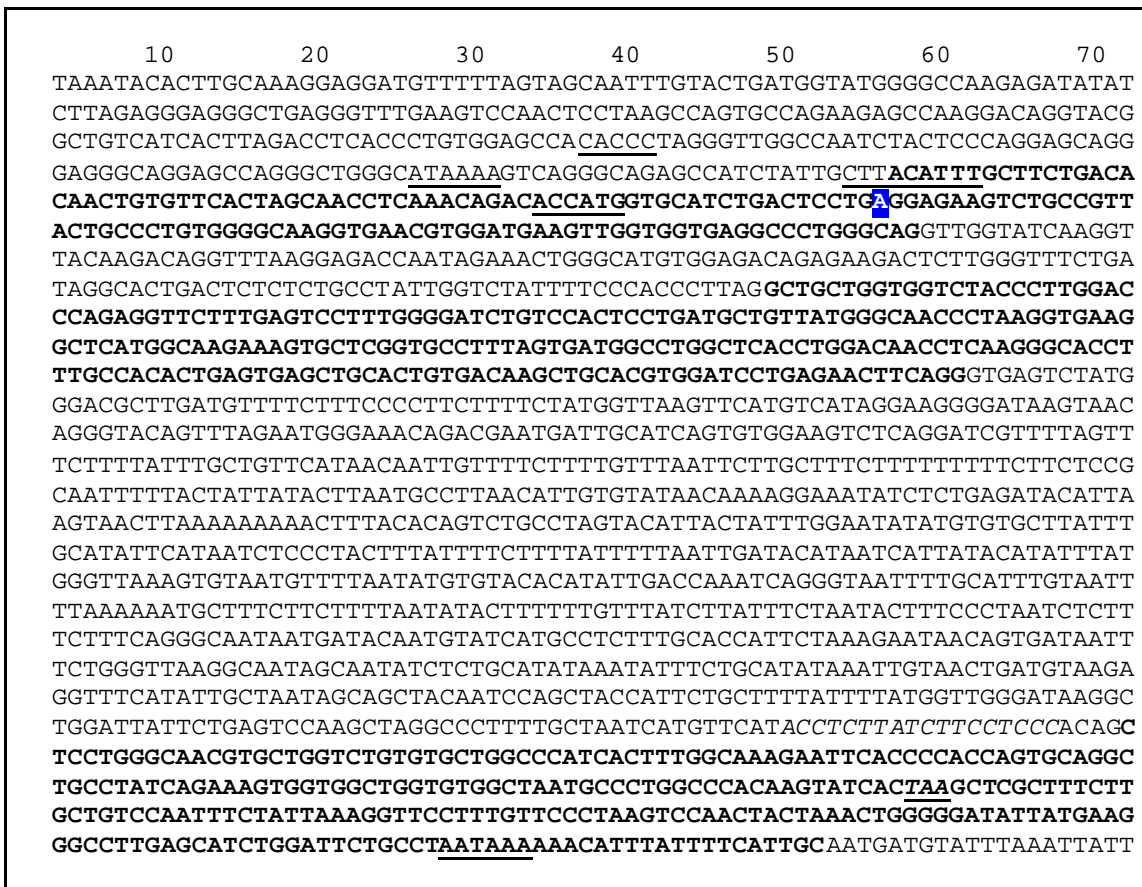


Figura 1.9. Secuencia del gen de la cadena β dentro del cluster de la beta globina en el cromosoma 11. La secuencia transcrita se muestra en negrilla. Se encuentran subrayados las siguientes secuencias: Caja CACCC, Caja ATAAAA, iniciador, secuencia de Kozak (codón de inicio), codón de terminación, y sitio señal poli-A. Se encuentra resaltado de azul el sitio de la mutación responsable de la siclemia por hemoglobina S. Secuencia tomada de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

La consecuencia celular de la transversión A→T sobre el codón 6 es una reducción de la solubilidad de la hemoglobina en el medio intracelular del eritrocito, produciendo un precipitado cristalino de hemoglobina que la hace disfuncional. La consecuencia físico-química es la diferencia en la migración en la electroforesis de hemoglobina por la alteración en la carga. En base a esta particularidad de las hemoglobinas mutantes se realizan las pruebas de diagnóstico convencionales.

Sin embargo, ninguna de las técnicas convencionales es capaz de detectar la patología durante el periodo de gestación, ya que sería imposible obtener muestras de sangre del feto sin causarle daño. Las únicas fuentes celulares del feto son provenientes de muestras de amniocentesis o de vellosidades coriónicas, procedimientos que en la mayoría de los casos son inocuos para el feto. La única posibilidad de analizar estas muestras sería por medio de técnicas moleculares.

1.4.3.3 Diagnóstico convencional de la siclemia

Existen algunos métodos convencionales para el diagnóstico de siclemia. El más sencillo hace uso de técnicas básicas de microscopía y se fundamenta en la precipitación de la Hb S por medio de bisulfito de sodio. Bajo estas condiciones la hemoglobina se encuentra en su forma desoxigenada y la hemoglobina S tiende fácilmente a formar cristales y por ende tienen la capacidad de deformar la membrana celular del eritrocito (ver Fig. 1.8). Debido a que tanto los portadores heterocigotos como los homocigotos resultan positivos en este análisis, es necesario realizar análisis de confirmación, como la electroforesis de hemoglobina.

El método convencional más difundido y utilizado para la caracterización de rutina ha sido la electroforesis de hemoglobina, tanto ácida como alcalina. La electroforesis alcalina, realizada en un rango de pH de 8.5 a 9, permite la diferenciación de una gran variedad de hemoglobinas y es especialmente utilizada para la detección de Hb S y Hb C. Se basa en el diferencial de carga de las proteínas a un pH alcalino, el cual induce a la desprotonación de los grupos radicales y en consecuencia carga

negativamente a las proteínas. Por este motivo, en el ensayo de electroforesis alcalina se espera una migración de la hemoglobina hacia el polo positivo tal y como se indica en la figura 1.10.

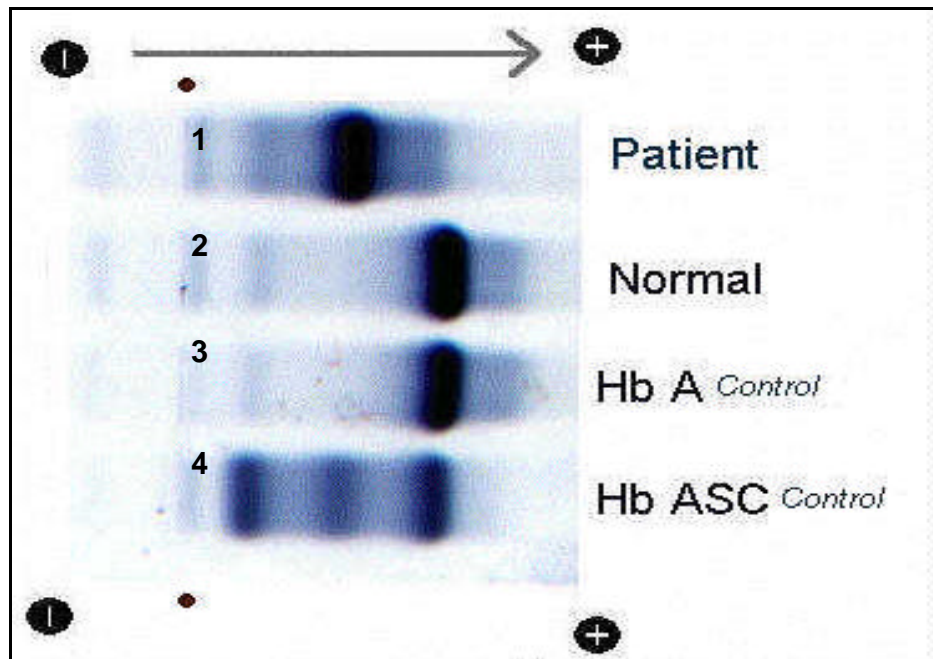


Figura 1.10. Ensayo de electroforesis de hemoglobina a pH alcalino teñido con colorante AmidoBlack. En los carriles “Control” se puede observar el patrón de bandas para cada tipo de hemoglobina. En el control Hb ASC se puede apreciar el retraso en la migración de las hemoglobinas disfuncionales frente a la hemoglobina normal (Hb A). La hemoglobina S se ubica en la región central, entre la banda Hb C y Hb A, y se corresponde con el patrón de banda del paciente del carril 1. Tomado de: University of Stellenbosch. (2001). Haematological Pathology Cases.

Dentro de los sistemas de diagnóstico convencional se encuentran también las técnicas de HPLC y ELISA, sin embargo, debido a su costo y poca practicidad no son utilizados de forma rutinaria para el diagnóstico sino más bien para el área investigativa (Grenett, 1980; Eastman, 1996).

Como se ha mencionado, ninguno de los métodos convencionales que requieren de extractos de hemoglobina del paciente, es capaz de detectar hemoglobinas patológicas durante la gestación ni durante los primeros 4 meses de vida. Este inconveniente de los

métodos convencionales también es aplicable a un gran número de enfermedades genéticas de diversos tipos. Por este motivo, los métodos moleculares han tenido una importancia crucial en el diagnóstico prenatal y en la consejería genética.

1.4.3.4 Diagnóstico molecular de siclemia mediante BIPASA

El método molecular para el diagnóstico prenatal de siclemia fue desarrollado por Waterfall *et al.* (2001) y se encuentra detallado en su artículo titulado "Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis". Este sistema "en un solo tubo" se basa en un modelo de PCR bidireccional tradicional combinado con el método *tetra primer* ARMS aplicado sobre uno de sus *primers* específicos. Los amplicones específicos generados por estos *primers* para los alelos tipo salvaje y mutante son de 517 y 267 pares de bases, respectivamente. Sobre el *primer* específico para el alelo tipo salvaje (WT-AS) se introdujo un *extra-mismatch* en el nucleótido 9 desde el extremo 5' (5'dATGGTGCA \square CTGACTCCTGA), lo cual revela que existen problemas de especificidad alélica para este *primer*. El programa de amplificación que se utiliza para este sistema es el siguiente: denaturación inicial a 95°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos de denaturación a 95°C por 30 segundos, *annealing* a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 35 segundos.

En la figura 1.11 se muestra el análisis electroforético de un *screening* de muestras aleatorias tipo salvaje (WT), heterocigotos (HET) y homocigoto mutante (MUT) utilizando el sistema de Waterfall *et al.* En este análisis es notable el bajo rendimiento del amplicón del alelo tipo salvaje de 517 pb, generado por el *primer* WT-AS, muy probablemente debido a la introducción del *extra-mismatch*. Según el autor, este bajo rendimiento sería compensado con una alta especificidad alélica. Sin embargo, de forma general el rendimiento de los productos específicos es muy poco homogéneo y en algunas ocasiones es muy bajo. Otro aspecto notable es que bajo las condiciones utilizadas no se observa la generación del amplicón mayor (743 pb).

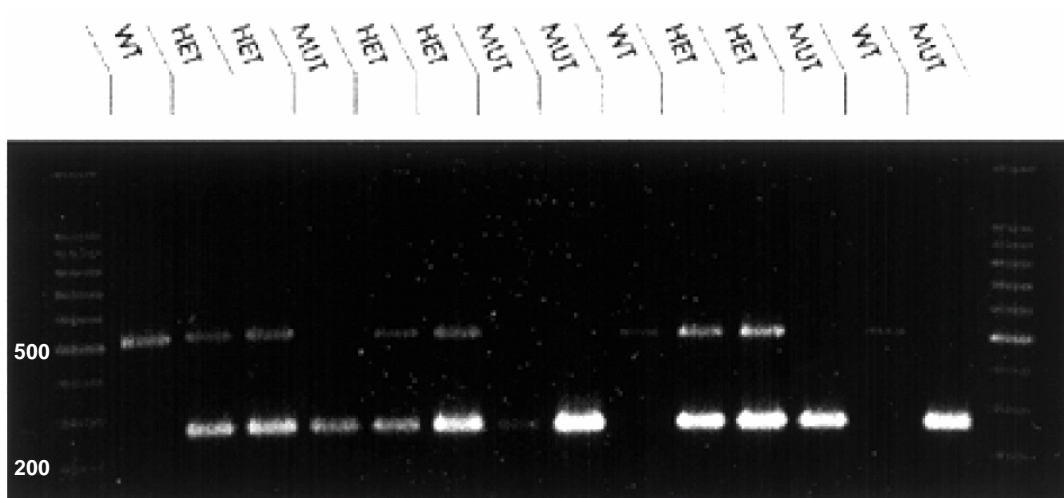


Figura 1.11. Análisis electroforético del sistema diagnóstico molecular de siclemia mediante PCR bidireccional. En la parte superior se indica el fenotipo correspondiente a las bandas mostradas en el gel. A ambos lados se ubica el marcador de peso molecular de 100 pares de bases; la banda inferior inicia en 200 pares de bases. Tomado de: Waterfall *et al.* (2001). Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis .

Los resultados observados en el análisis de la figura 1.11 evidencian la poca capacidad de optimización que poseen los sistemas tradicionales de PCR bidireccional a pesar de utilizar ciertos artificios moleculares. Por otro lado, es notable la ausencia del amplicón mayor aún obviando la introducción de nucleótidos no complementarios en 5'. Tal vez la reducción significativa del tiempo de extensión haya provocado un limitante en la generación de este amplicón.

1.4.4 Propuestas para la optimización de BIPASA en el diagnóstico de siclemia

Para la optimización del diagnóstico molecular de siclemia en base a un sistema de PCR bidireccional es necesario tomar en cuenta los antecedentes técnicos obtenidos de los estudios realizados por Liu *et al.* (1997) sobre la *Overlap-PCR*, así como los resultados del sistema diagnóstico de siclemia elaborado por Waterfall *et al.* (2001). Es necesario tomar en cuenta la importancia del diferencial de T_m entre las secuencias

complementarias y no complementarias de los *tailed-primers* específicos³, la longitud del *GC-clamp* y el diseño de los *primers* externos con una *T_m* menor a los *primers* internos con el fin de limitar hasta cierto punto la generación del amplicón mayor. Luego, según lo mencionado en la sección anterior, es necesario tomar en cuenta que existe un problema en la capacidad refractaria alrededor de la secuencia destinada al diseño del *primer* específico para el alelo tipo salvaje. Por este motivo, para el diseño del *clamped-primer* específico para el alelo tipo salvaje será necesario reducir el tamaño de la región complementaria desde 5' y alargar la secuencia del *GC-clamp*. Esto, a más de aumentar la diferencia en el *T_m* de los extremos 3' y 5', aumentará la tolerancia del *primer* a temperaturas de *annealing* muy elevadas y de alta especificidad.

Como modelo preliminar para la optimización de *BIPASA*, se ilustra en la figura 1.12 el proceso de amplificación propuesto. En la parte superior se observa el fragmento de la región del gen de la beta globina. Los extremos 3' de los *primers* internos alelo específicos coinciden con los alelos mutante (S) y tipo salvaje (A) indicados en la secuencia. Las colas ricas en nucleótidos G y C se indican en color negro en el extremo 5' de los *primers* internos. Se puede ver la disposición de los *primers* P y Q a diferente distancia de los *primers* internos con el fin de diferenciar los alelos amplificados por la migración en el gel de electroforesis. Debido a que los *primers* P y Q serán diseñados con una *T_m* inferior a la de los *primers* internos, el impedimento térmico para éstos será mayor al aplicar temperaturas de *annealing* muy elevadas. Por este motivo se estandarizará un sistema de amplificación que permita hasta cierto punto la generación del amplicón mayor con el fin de mejorar el rendimiento de los amplicones específicos. Para esto se comparará el sistema de amplificación normal utilizando una única temperatura de *annealing* afín a los *primers* internos, con el sistema de amplificación en dos etapas utilizando una *T_a* inicial inferior y una *T_a* subsiguiente superior. Para esto será fundamental el analizar las capacidades refractarias de los *primers* a diferentes temperaturas de *annealing* y su relación con el rendimiento. También se analizará la posibilidad de utilizar un sistema *two-step PCR* dadas las altas temperaturas de *annealing* que se aplican en los ciclos de amplificación. En algunas ocasiones puede beneficiarse el

³ Los *clamped primers* son un tipo de *tailed-primers* cuya "cola" 5' terminal es un *GC-clamp*, por lo tanto en el presente trabajo se mencionará a una u otra denominación, según sea pertinente, para referirse al mismo tipo de oligonucleótido.

rendimiento de la amplificación gracias al rápido recambio de temperaturas ofrecidos por estos sistemas bifásicos, además de ofrecer una alta eficiencia en el proceso.

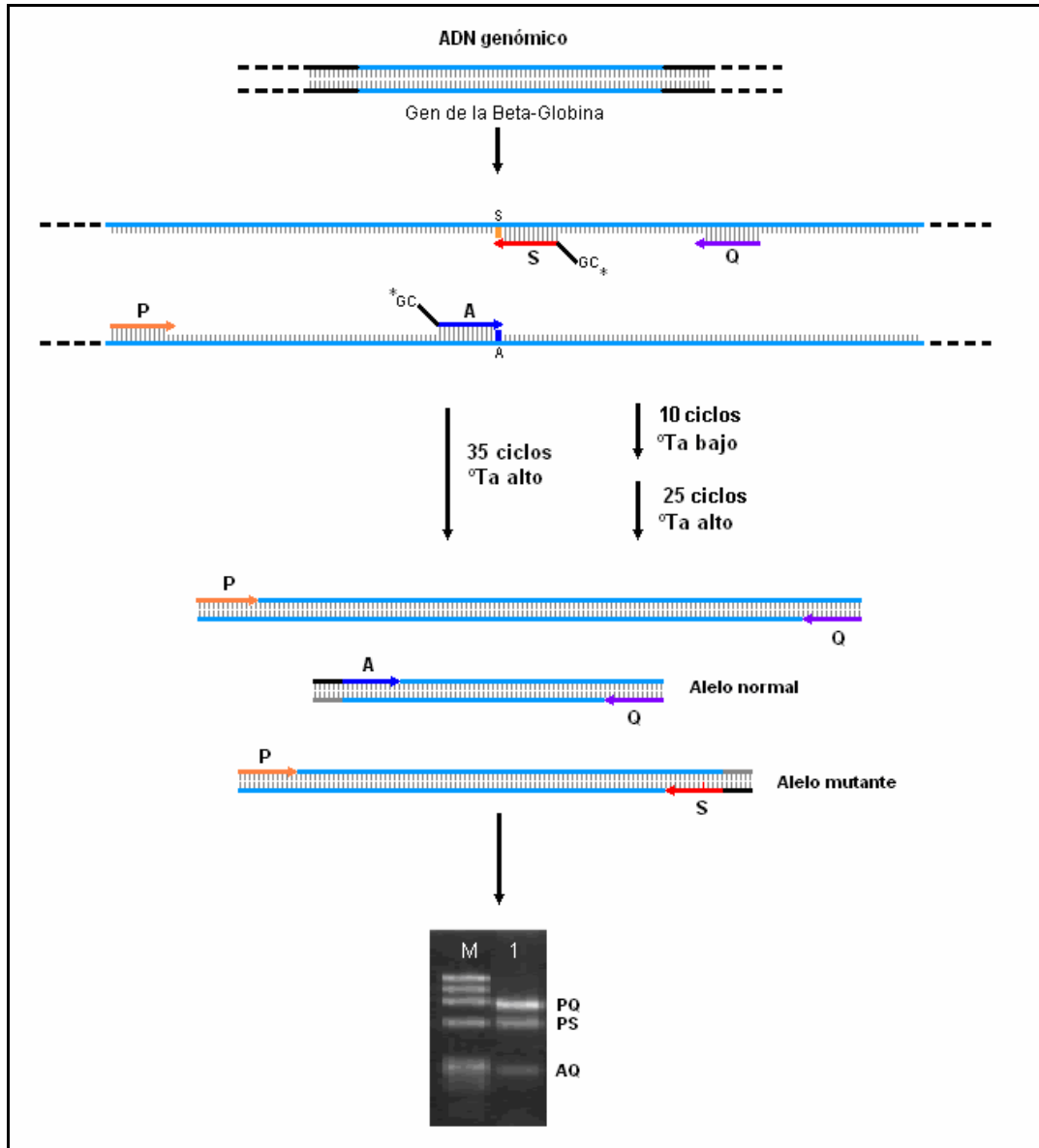


Figura 1.12. Esquema del proceso de amplificación mediante los clamped-primers internos. Los alelos mutante (S) y tipo salvaje (A) se muestran en naranja y azul respectivamente. Al final de la figura se indica el análisis electroforético virtual de la amplificación con el patrón de bandas esperado. Se denota con una M al marcador de peso molecular; a la derecha se indican los amplicones a los que corresponden las bandas reveladas en el gel de electroforesis. Ilustración elaborada por el autor.

En la figura 1.12 es posible visualizar de forma más comprensible los fundamentos del problema de competitividad que existe entre los *primers* internos, y de qué forma los *GC-clamps* pueden reducir este problema. Si se observa la secuencia amplificada por el *primer S* (amplicón PS) la región contigua hacia 3' de la secuencia de dicho *primer* es homóloga a la secuencia del *primer A* (excepto por su *GC-clamp*) y por este motivo el *primer A* es capaz de hibridar de forma efectiva con el amplicón PS. Este mismo problema ocurre entre el *primer S* y el amplicón AQ. Durante la amplificación por PCR el *annealing* es un proceso aleatorio entre secuencias complementarias, por lo tanto, los *primers* internos *A* y *S* en realidad tienen dos secuencias diferentes que pueden ser sujetas a amplificación por los mismos. Se puede observar sin embargo que la hibridación competitiva no posibilita la amplificación debido a la falta de complementación en el nucleótido 3' terminal. Si la amplificación se hiciera efectiva el amplicón producido correspondería a la suma de las longitudes de ambos *primers* internos.

El problema más importante de la competitividad radica en que mientras más amplicones específicos son producidos existe una mayor probabilidad de hibridación competitiva, por lo tanto el rendimiento puede reducirse drásticamente. Este es el motivo por el cual es necesaria la adición de *GC-clamps* en el extremo 5' terminal, ya que así se puede generar nuevas secuencias de hibridación mucho más eficientes que reducen la competitividad por otras secuencias homólogas, siempre y cuando se utilice una temperatura de *annealing* mayor a la T_a óptima para toda la secuencia del *clamped-primer*.

En definitiva, la hibridación competitiva no necesariamente reduce la concentración de *primer* en la solución de amplificación, pero si reduce su disponibilidad durante la reacción. La sub-utilización de *primers* por hibridación competitiva puede ser análoga a la sub-utilización por exceso de formación de *dímeros* entre *primers*. Ambas condiciones conllevan a la disminución en el rendimiento al no haber un número suficiente de *primer* disponible para generar los amplicones específicos.

2 do Capítulo: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes del proyecto

Para el desarrollo del presente proyecto se contó con la participación de la Universidad Central del Ecuador, brindando su apoyo para la realización de análisis clínicos hematológicos. Se contó con la ayuda del Hospital “San Vicente de Paúl” de la ciudad de Ibarra y del Subcentro de Salud “Pusir Grande” de la ciudad de Pusir, en donde se pudo obtener los registros clínicos de los pacientes de cuyas muestras se obtuvieron los respectivos controles para la estandarización y optimización de la técnica, así como para el desarrollo del ensayo de campo.

2.2 Zona de estudio

Todas las muestras utilizadas para el desarrollo del presente proyecto fueron obtenidas de pacientes residentes en las ciudades de Pimampiro y Pusir, provincia de Imbabura. Los datos clínicos de estos pacientes fueron obtenidos en el hospital “San Vicente de Paúl” de la ciudad de Ibarra. Para el análisis convencional de estas muestras se trabajó en el laboratorio de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, Quito. El análisis molecular fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Humana del Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Superior Politécnica del Ejército.

2.3 Periodo de experimentación

El desarrollo de la parte experimental del proyecto fue iniciado el 3 de enero del 2007 y fue finalizado el 22 de junio del 2007.

2.4 Procedimientos

2.4.1 Obtención de muestras y análisis convencional

2.4.1.1 Obtención de muestras control de fenotipos conocidos

Todo sistema diagnóstico requiere de la obtención de muestras caracterizadas que sirvan de controles en base a los cuales los ensayos posteriores puedan ser comparados. Como la siclemia tiene como prueba clínica básica a la electroforesis de hemoglobina, necesariamente tienen que obtenerse muestras de sangre periférica de pacientes caracterizados fenotípicamente mediante esta técnica. Los fenotipos requeridos para evaluar la técnica a nivel molecular son denominados AA, AS y SS. Estos fenotipos fueron obtenidos de pacientes analizados previamente por electroforesis de hemoglobina y por la prueba de bisulfito de sodio en el Hospital “San Vicente de Paúl”.

La obtención de estas muestras control se realizó por medio de extracción de sangre periférica de las venas del pliegue del codo, utilizando tubos al vacío Vacutainer con EDTA. Se recolectaron dos tubos de 3 ml por cada paciente. Las muestras de sangre obtenidas para los ensayos de electroforesis de hemoglobina fueron preservadas a 4°C hasta el momento de la extracción de hemoglobina. Por otro lado, las muestras de sangre para los ensayos moleculares fueron preservadas a -20°C hasta el momento de la extracción de DNA.

2.4.1.2 Análisis de muestras por electroforesis de hemoglobina

Debido a la necesidad de confirmar la presencia o ausencia de la mutación 6Glu→Val (hemoglobina S) en las muestras control AA, AS y SS, se realizó un ensayo de electroforesis alcalina de hemoglobina a pH 8.6 en soporte de acetato de celulosa (*Cellogel*).

Para el ensayo de electroforesis se utilizó sangre periférica de los fenotipos correspondientes. Luego se procedió a realizar una extracción de hemoglobina utilizando un protocolo estandarizado por el autor basado en el protocolo de Blackwell *et al.* (1965) y que se describe a continuación:

1. Aislar los eritrocitos mediante tres lavados de la muestra con solución salina (NaCl 0.9%) en proporción 1:5, por medio de agitación suave y centrifugación a 2000 rpm durante 2 minutos por cada lavado.
2. Adicionar 2 ml de agua destilada estéril y 0.2 ml de tolueno por cada ml de eritrocitos lavados
3. Dejar en agitación suave durante toda la noche.
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.
5. Con una jeringuilla de 3 ml, succionar 2/3 del hemolisado.
6. Distribuir los hemolisados en tubos *Eppendorf* estériles y mantener a 4°C hasta su uso.

Posteriormente, para el ensayo de electroforesis de hemoglobina se realizó electroforesis horizontal en soporte de acetato de celulosa (Fig. 2.1) utilizando los extractos de hemoglobina de los controles AA, AS y SS. Se realizó paralelamente una comparación con el patrón de bandas de la hemoglobina C utilizando un control heterocigoto AC. Para la corrida electroforética se utilizó buffer Tris-Barbital de alta resolución a pH 8.6 como fuente de electrolitos. Las láminas de acetato de celulosa (*Cellogel*) fueron colocadas en un puente para electroforesis y las muestras se aplicaron mediante un dispositivo aplicador adaptable. Los pocillos para la muestra fueron llenados con 12.5 μ l de hemolisado. Inmediatamente después, las muestras fueron aplicadas sobre la lámina de *Cellogel* ubicada en el puente de la cámara. La electroforesis se efectuó a un voltaje de 250 V durante 45 minutos.

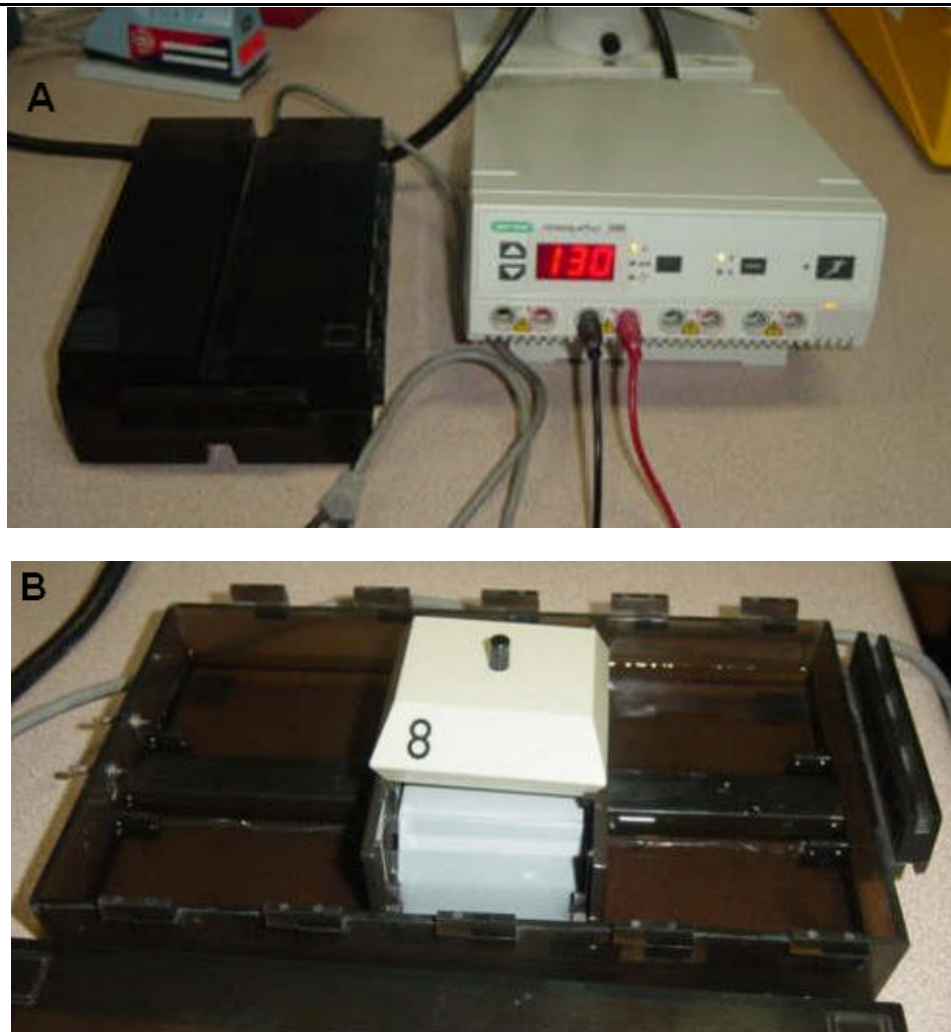


Figura 2.1. Electroforesis horizontal en soporte de acetato de celulosa (Cellologel) para la caracterización de hemoglobinas. A) Equipo básico para el ensayo de electroforesis de hemoglobina. B) Aplicación de muestras en el cellologel mediante un dispositivo aplicador.

Luego de haber realizado la corrida electroforética, se procedió a realizar la tinción de la lámina mediante el colorante rojo *Ponceau*, sumergiéndola en el colorante por 3 minutos. Se reveló luego la placa mediante lavados con ácido acético 5% y un lavado con metanol 30% durante 3 minutos. El *Cellologel* fue transparentado mediante un lavado con una solución decolorante (alcohol diacetona al 5%, metanol al 75% y ácido acético al 20%) durante 5 minutos.

2.4.2 Preparación de muestras para los ensayos moleculares

2.4.2.1 Extracción de DNA de las muestras de sangre periférica

Los ensayos de estandarización de la técnica molecular requieren de una gran cantidad de DNA disponible, lo cual es posible obtener de muestras de sangre periférica. Para el ensayo molecular se utilizaron las muestras analizadas previamente mediante electroforesis de hemoglobina con su patrón fenotípico confirmado. Tanto las muestras positivas (AS o SS) como las negativas (AA) fueron sometidas al mismo protocolo de extracción de DNA. Este protocolo debió seguir un proceso previo de estandarización con el fin de mejorar su rendimiento y determinar el volumen de dilución del DNA adecuado para los ensayos moleculares posteriores (ver Anexo A). El protocolo estandarizado de extracción se resume en los siguientes pasos secuenciales:

1. En 3 tubos *Eppendorf* de 2 ml colocar 0.5 ml de sangre por cada muestra.
2. Congelar los tubos a -80°C por 20 minutos.
3. Sacar del congelador y añadir inmediatamente 1 ml de agua destilada estéril (grado biología molecular).
4. Dejar en agitador orbital por 5 minutos, o hasta comprobar la lisis de eritrocitos (líquido color vino).
5. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C .
6. Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el *pellet* ni la interfase.
7. Resuspender el *pellet* en 0,5 ml de suero fisiológico estéril.
8. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C para lavar el *pellet*, y descartar el sobrenadante.
9. Repetir desde el paso 7 hasta que el *pellet* tenga un color rosado claro.
10. Resuspender el *pellet* en 60 μl de suero fisiológico, 360 μl de A-Fasano y 4 μl de proteinasa K (20 mg/ml).
11. Someter a incubación a 37°C por toda la noche.
12. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
13. Añadir 170 μl de NaCl 5M y mezclar suavemente durante 5 minutos.

14. Añadir 600 μ l de cloroformo y mezclar por 10 minutos en *mixer* orbital a 1200rpm.
15. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C.
16. Sin alterar la interfase, retirar el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo Eppendorf.
17. Añadir 600 μ l de isopropanol, mezclar levemente y dejar en reposo durante 5 minutos.
18. Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C.
19. Lavar el *pellet* con 500 μ l de etanol 100%, centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
20. Repetir el lavado con etanol 70% descartando el sobrenadante.
21. Secar 20 minutos a temperatura ambiente.
22. Resuspender el *pellet* en 100 μ l de dH₂O estéril (grado biología molecular)
23. Incubar a 30°C por 1 hora en *mixer* orbital a 1000 rpm, para homogenizar el DNA.

2.4.2.2 Cuantificación de las extracciones de DNA de las muestras control

Todos los extractos de DNA de las muestras control fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, con el fin de comprobar la presencia de DNA genómico. Para ello, se tomaron 8 μ l de muestra y se mezcló con 2 μ l de Loading Buffer 10X (Invitrogen). Las muestras se sometieron a electroforesis paralelamente con un marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). La corrida electroforética se realizó durante una hora a 100V, en buffer TAE 1X.

Para la cuantificación del DNA se utilizó un fluorómetro (Qubit™ fluorometer, Fig. 2.2) capaz de cuantificar la concentración de DNA según el nivel de saturación de la señal fluorescente que emite el DNA de la muestra al ser mezclada con un *fluorocromo* especial (Quant-iT Assay kit). Para este ensayo, se realizó una dilución 1:199 de las muestras utilizando un *buffer* de cuantificación incluido en el Quant-iT Assay kit. Se siguió el protocolo indicado para el Quant-iT DNA Assay kit, y se realizaron lecturas por

duplicado por cada muestra. Los cálculos para la obtención de la concentración real de DNA de las muestras se realizaron según se indica en el Anexo C.



Figura 2.2. Fluorómetro para cuantificación de DNA Qubit™ (Invitrogen).

Tomado de: <http://probes.invitrogen.com/products/qubit/index.html>.

2.4.3 Diseño del set de primers para la amplificación por BIPASA

Para la optimización de la BIPASA primero hay que obtener un buen grupo de *primers* que permitan cumplir con las exigencias de la técnica. Estas exigencias incluyen una adecuada especificidad de la amplificación para evitar el consumo de recursos de reacción en productos inespecíficos y características termodinámicas especiales que permitan controlar el curso de la amplificación. Es necesario tomar en cuenta que los *primers* internos deben coincidir en su extremo 3' con los alelos A y S de interés, lo cual limita la libertad de diseño para estos *primers*. Por el contrario, los *primers* externos permiten una cierta libertad para su diseño, pero tomando en cuenta que su finalidad es diferenciar los productos por su tamaño. Por convención para la técnica BIPASA usualmente se procura generar amplicones que difieren en aproximadamente 50 pares de

bases como mínimo. Para la realización de este diseño se utilizaron medios bioinformáticos que permiten analizar rápidamente las secuencias de *primers* más adecuadas para lograr obtener las condiciones de amplificación requeridas.

Una consideración importante es la caracterización de la secuencia del gen, analizada previamente en el capítulo anterior (sección 1.3.1). En el gen de la beta globina se conocen más de 420 mutaciones, las más numerosas son los SNPs y las deleciones (Cardiff University, 2006). Para el diseño de los *primers* deberán excluirse regiones polimórficas para los grupos étnicos afroamericanos.

2.4.3.1 Medios bioinformáticos utilizados

Para el diseño de los *primers* se utilizó el programa FastPCR 4.0 (Fig. 2.3) mediante el cual es posible seleccionar las mejores secuencias según sus valores de T_m , el T_m10 , la estabilidad, porcentaje de Citosina y Guanina (%CG) y formación de dímeros. Para el cálculo de T_m , FastPCR 4.0 utiliza el modelo termodinámico unificado con correcciones para concentraciones de KCl y $MgCl_2$, permitiendo obtenerse valores de T_a óptimos (Kalendar, 2006).

Igualmente, mediante FastPCR 4.0 es posible obtener un banco de *primers* óptimos afines a un *primer* específico predeterminado. Esta ventaja fue muy útil para la selección de los *primers* externos.

Todo el diseño se trabaja utilizando herramientas para excluir regiones polimórficas como la caja ATAAA, la cual es polimórfica para los pobladores afroamericanos de Suramérica (Huisman *et al.*, 1997) y se trató de no tomar en cuenta secuencias muy alejadas del extremo 5' de los bordes intrónicos luego del primer *exón*.

Los *primers* externos seleccionados siguieron un análisis de alineamiento con el fin de comprobar su especificidad. Para esto se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) la cual permite rastrear pareamientos de regiones cortas a lo largo del genoma humano (National Center for Biotechnology Information, 2006).

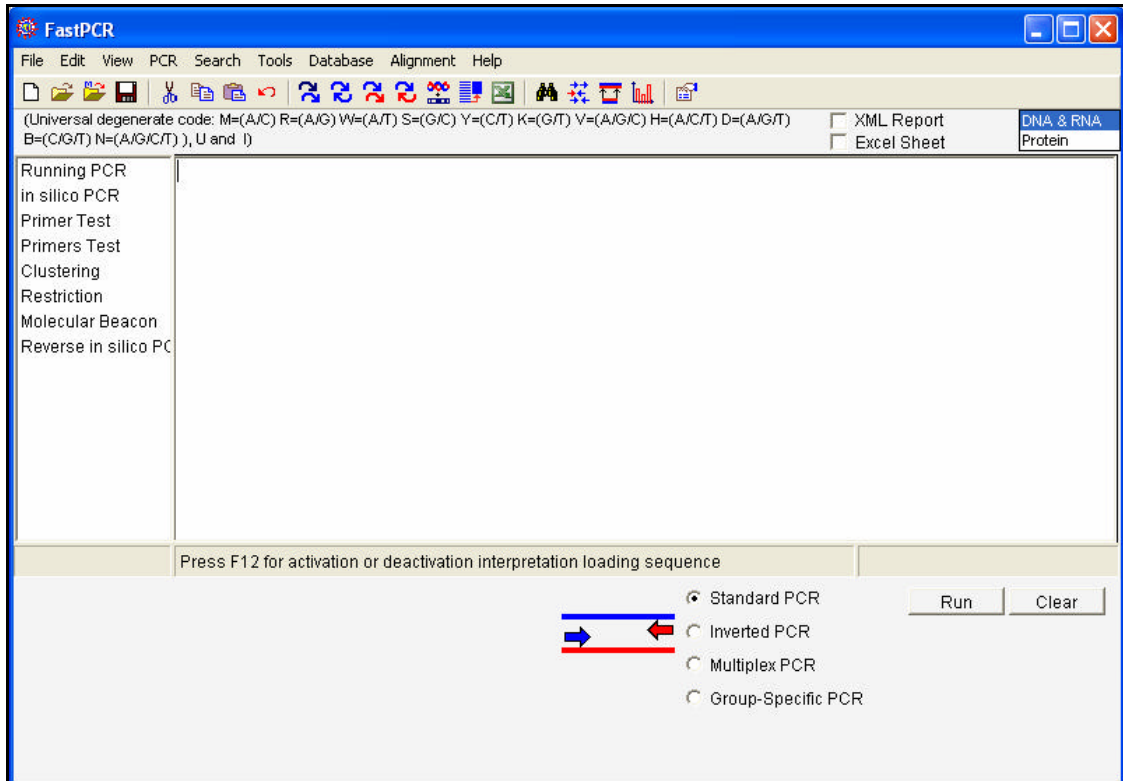


Figura 2.3. Pantalla de trabajo del programa *FastPCR*. Tomado de: *FastPCR4.0*

2.4.3.2 Diseño de los *primers* internos *A*, *S*, *TA* y *TS*.

Los *primers* internos fueron seleccionados según el análisis de la secuencia alrededor de los alelos de interés. Estos *primers* fueron denotados como “*A*”, si su amplificación es específica para el alelo normal, o “*S*”, si su amplificación es específica para el alelo mutante. Para el sistema optimizado se diseñaron *tailed-primers* internos provistos de un *GC-clamp*, denotados como *TA* o *TS* según sea el caso, con el fin de distinguirlos de los *primers A* y *S*. Hay que tomar en cuenta que los *primers* internos deben seleccionarse en sentido opuesto, por lo tanto existen dos alternativas: una en la que el *primer A* es un *forward* y *S* es un *reverse* y otra en la que el *primer S* es un *forward* y *A* es un *reverse*. En la figura 2.4 se ilustran las dos alternativas posibles de diseño.

Para la selección de *P* y *Q* se tomaron en cuenta secuencias de *primers* con una diferencia de *Tm* respecto a *TA* y *TS* no menor a 5°C ni mayor a 10°C. Esto permitirá una mayor preferencia por la amplificación de los amplicones AQ y PS a una *Ta* alta, sin reducir el rendimiento de la reacción. Para el diseño de los *primers P* y *Q* se utilizó el programa FastPCR mediante la herramienta *Running PCR* y la opción *fixed primer*. La opción *fixed primer* permite mostrar la mejor combinación de *primers* con un determinado *primer* “fijo” predeterminado, en este caso, el *primers A* o *S*. Para esto fue necesario ingresar la secuencia del gen de la β-globina y fijar sea al *primer A* o al *S*, dependiendo de si se quiere diseñar a *Q* o a *P* respectivamente (Fig. 2.5). Pulsando el botón RUN se despliega una lista de los posibles *primers* que son compatibles con el *primer* fijo.

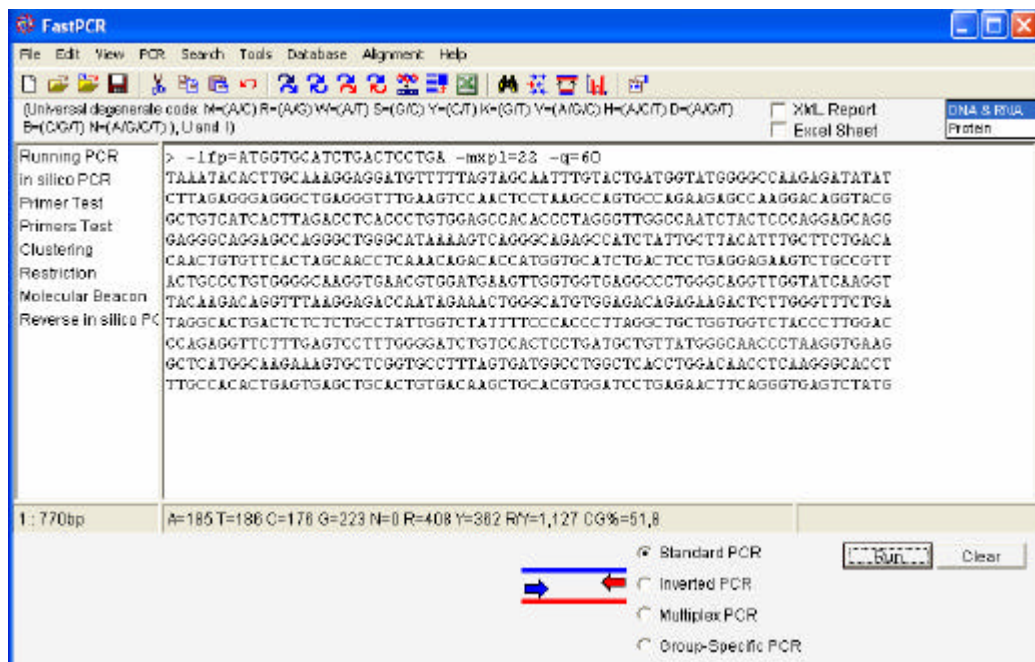


Figura 2.5. Diseño del mejor primer para un primer fijo mediante FastPCR. La herramienta de trabajo utilizada es Running PCR, y se ingresó la opción “fixed primer”. En la figura se ilustra la secuencia del gen de la beta globina ingresada y, sobre ésta, se ubica el primer fijado. En la figura se observa el ensayo en el que se ha fijando al primer A. Tomado de FastPCR©

2.4.4 Estandarización de la amplificación por PCR bidireccional

2.4.4.1 Evaluación de la técnica BIPASA tradicional

Al aplicar los *primers P, Q, A y S* mediante el sistema tradicional de BIPASA es posible determinar el comportamiento de los *primers* y del sistema en general. Debido a que los *primers A y S* no poseen colas no complementarias en 5', se espera que exista una considerable tendencia a priorizar la formación del amplicón mayor PQ consumiendo gran parte de los recursos de la reacción.

Para este ensayo se ensambló un *master mix* para 7 reacciones, dos por cada fenotipo y un control negativo. Se utilizó la siguiente concentración de reactivos: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM de cada *primer*, 200 μM de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen) y 2 ng/μl de DNA genómico. (Para la preparación del *stock* de *primers* ver Anexo D). Para el control negativo se utilizó agua destilada en lugar de DNA genómico. Los detalles de las concentraciones y los volúmenes utilizados para la preparación del *master mix* y de la solución final de reacción se encuentran en la Tabla 2.1. Se aplicó el programa de amplificación descrito en la Tabla 2.2. (El análisis preliminar para determinar la *Ta* óptima de los *primers A y S* se describe en el Anexo E).

Reactivos	Concentraciones		Volumen (ml) para :	
	[Stock]	[Rxn]	1 reacción	7 reacciones
dH ₂ O MBG	-	-	16,45	115,15
PCR Buffer (X)	10	1	2,5	17,5
MgCl ₂ (mM)	50	1,5	0,75	5,3
dNTPs (mM)	40	0,8	0,5	3,5
<i>P</i> primer (uM)	10	0,2	0,5	3,5
<i>Q</i> primer (uM)	10	0,2	0,5	3,5
<i>A</i> primer (uM)	10	0,2	0,5	3,5
<i>S</i> primer (uM)	10	0,2	0,5	3,5
<i>Taq</i> (U/ul)	5	1,5	0,3	2,1
Master Mix			22,5	157,5
DNA (ng/ul)	20	2	2,5	17,5
Volumen final			25	175

Tabla 2.1. Concentraciones y volúmenes utilizados para los reactivos que componen al *master mix*. [Stock] corresponde a las concentraciones en las soluciones stock. [Rxn] corresponde a las concentraciones por reacción. El volumen final utilizado por cada reacción es de 25 ml.

Ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Denaturación inicial	94	2:00
35	Denaturación	94	0:15
	Annealing	61	0:30
	Extensión	72	0:40

Tabla 2.2. Programa de amplificación basado en las condiciones óptimas calculadas mediante el programa FastPCR 4.0.

La amplificación para este ensayo como para todo el proceso de optimización se realizó en un termociclador Techne T-520. Las amplificaciones fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 120 V durante una hora. Para esto se tomaron 18 μ l de la solución de producto de amplificación y se mezclaron con 2 μ l de Loading Buffer 10X (Invitrogen). La mezcla fue homogenizada y cargada en el gel por medio de una micropipeta. Este procedimiento fue realizado para todos los ensayos moleculares subsiguientes, excepto en aquellos en los que se especifica alguna modificación.

2.4.4.2 Análisis de competitividad de los *primers* internos

El análisis de competitividad permite conocer el nivel de interacción que existe entre las secuencias de los *primers* internos, con el fin de evaluar la necesidad de utilizar los *clamped-primers* TA y TS. El análisis de competitividad se realizó utilizando el fenotipo heterocigoto AS, el cual permite evaluar la generación simultánea del alelo normal y mutante. Para esto se prepararon 4 distintas combinaciones de *primers* internos sin *GC-clamp* (A y S) y con *GC-clamp* (TA y TS) en sus correspondientes *master mix*. Las combinaciones se denotaron como A-S, TA-S, A-TS y TA-TS, según sea la utilización del par de *primers* internos correspondiente. Se utilizó la misma concentración de reactivos descrito en la sección 2.4.4.1 y el mismo programa de amplificación descrito en la Tabla 2.2. La concentración de los cuatro *primers* se mantuvo en 0.2 μ M. La amplificación se realizó en un termociclador Techne T-520. Luego de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 120 V durante una hora.

2.4.4.3 Análisis de la generación de PQ, PS y AQ a distinta T_a

Una vez evaluada la competitividad entre los *primers* internos y justificada la utilización de los *clamped-primers*, se procede a analizar la generación de los amplicones individuales a diferentes temperaturas de *annealing* utilizando los *primers TA* y *TS*. Este ensayo permitirá medir el nivel de tolerancia de los *primers* a temperaturas de *annealing* iguales o superiores a la T_a óptima al utilizar un gradiente de temperatura de 62, 66 y 70°C. Para este ensayo se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos descrito en la sección 2.4.4.1 y el programa de amplificación que se describe en la Tabla 2.3.

Ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Denaturación inicial	94	2:00
35	Denaturación	94	0:15
	Annealing	62, 66 y 70	0:30
	Extensión	72	0:40

Tabla 2.3. Programa de amplificación para la estandarización de la temperatura óptima de *annealing* en los ciclos de reacción.

2.4.4.4 Estandarización del programa de amplificación para la optimización de BIPASA

Para la estandarización del programa de amplificación se tomó como variable fundamental a la temperatura de *annealing* en los ciclos. En todos los ensayos realizados para este fin se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos descritas en la sección 2.4.4.1.

En el primer ensayo se evaluaron las capacidades refractarias frente a los 3 fenotipos (AA, AS, SS) a diferentes temperaturas de *annealing* superiores a la T_a óptima de 62°C. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de la sección anterior (ver Capítulo 3, sección 3.4.3) se realizó un gradiente de temperaturas de *annealing* de 64, 66 y 68°C para cada fenotipo. Se utilizó el programa de amplificación descrito en la Tabla 2.4.

Ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Denaturación inicial	94	2:00
35	Denaturación	94	0:15
	Annealing	64, 66 y 68	0:30
	Extensión	72	0:40

Tabla 2.4. Programa de amplificación para la estandarización de la temperatura óptima de annealing en los ciclos de reacción.

Dado que el rendimiento máximo aceptable se verificó a una T_a de 68°C, temperatura a la cual la Taq polimerasa es altamente activa, se procedió a realizar un ensayo de optimización para el proceso de amplificación mediante un sistema bifásico o *two step* que hiciera más eficiente el recambio de temperaturas en los ciclos. Debido a que el fenotipo heterocigoto es considerado como limitante en la técnica, este ensayo será realizado sobre las muestras de fenotipo AS. Para esto se utilizó el programa de amplificación de la Tabla 2.5 y 2.6, y se lo comparó con el sistema básico descrito en la Tabla 2.4 utilizando una T_a de 68°C.

Ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Denaturación inicial	94	2:00
35	Denaturación	94	0:15
	Annealing y Extensión	68	1:20

Tabla 2.5. Programa de amplificación mediante el sistema bifásico.

Ciclos	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Denaturación inicial	94	2:00
10	Denaturación	94	0:15
	Annealing	66	0:30
	Extensión	72	0:40
25	Denaturación	94	0:15
	Annealing y Extensión	68	1:20

Tabla 2.6. Programa de amplificación mediante el sistema trifásico y bifásico en dos etapas.

2.4.5 Estandarización de la concentración de los componentes de reacción

2.4.5.1 Estandarización de la concentración de MgCl₂

Para estandarizar la concentración óptima de MgCl₂ se trabajó con un gradiente de concentración de 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM, manteniendo una concentración de dNTPs de 250 μM cada uno. Las concentraciones de los demás componentes se mantuvieron como se describe en la sección 2.4.4.1. El programa de amplificación utilizado en este ensayo corresponde al sistema estandarizado en la sección 2.4.4.4.

2.4.5.2 Estandarización de la concentración de *primers*

En toda PCR múltiple es necesario estandarizar la concentración de los *primers* individuales, ya que ninguno posee propiedades exactamente iguales, además de que las interacciones que pueden tener entre si es un factor que generalmente afecta el rendimiento del proceso. En la PCR bidireccional la interacción de competitividad que tienen especialmente los *primers* internos puede ser modificada variando las concentraciones en una relación determinada respecto a los *primers* externos. Esto además permitiría priorizar la generación de los productos alelo específicos mejorando la utilización de los recursos de la reacción.

Para este ensayo se realizaron 4 relaciones diferentes entre los *primers*. La relación de concentración para cada *primer* se denota según el orden de hibridación en la secuencia blanco (*P* : *TS* : *TA* : *Q*). Las relaciones ensayadas fueron las siguientes:

- Relación equimolar 1:1:1:1
- Relación 1:2:2:1
- Relación 2:3:3:1
- Relación 1:4:2:1

Las proporciones fueron ajustadas para sumar una concentración total de *primers* de 0.8 μM . La concentración de MgCl_2 y dNTPs se ajusta a lo estandarizado en la sección anterior. La concentración de los demás reactivos fue igual a lo descrito en la sección 2.4.4.1. El programa de amplificación utilizado corresponde al sistema estandarizado en la sección 2.4.4.4.

2.4.6 Ensayo de la estabilidad de la técnica BIPASA estandarizada

Para ensayar la estabilidad de la técnica se realizaron 4 repeticiones por cada fenotipo (AA, AS y SS) utilizando el programa de amplificación y la concentración de reactivos estandarizados en los procesos anteriores. La concentración de DNA genómico por reacción se fijó en 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Al final las amplificaciones fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% durante 1 hora a 120 V.

2.4.7 Ensayo de campo del sistema optimizado

Utilizando el sistema de extracción de sangre periférica detallado en la sección 2.4.1.1, se obtuvieron 20 muestras de pacientes de raza afroecuatoriana residentes en la ciudad de Pusir, Imbabura. Estos pacientes fueron diagnosticados con anemia ferropénica mediante análisis hematológico convencional en el Subcentro de Salud “Pusir Grande”. Ocho de estos pacientes dieron positivo en el análisis con bisulfito de sodio, sin embargo ninguno fue diagnosticado finalmente con siclemia.

Para el análisis molecular de estas muestras se siguió el protocolo estandarizado de extracción de DNA descrito en la sección 2.4.2.1. Para el proceso de amplificación se trabajó con las siguientes concentraciones de reactivos: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 μM *primer P*, 0.1 μM *primer Q*, 0.3 μM *primer TS*, 0.3 μM *primer TA*, 250 μM de cada dNTP, 1.5 U de *Taq* Platinum Polimerasa (Invitrogen) y 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de DNA genómico. Las amplificaciones fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% durante 1 hora a 120 V.

3 er. Capítulo: RESULTADOS

3.1 Análisis de muestras control mediante electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa

Para comprobar el fenotipo de los controles AA, AS y SS se realizaron ensayos de electroforesis de hemoglobina siguiendo los protocolos descritos en la sección 2.4.1.2. En la figura 3.1A se observa el resultado de la comparación entre el patrón de bandas de los fenotipos AA y AS con el control AC. La hemoglobina S migra mucho menos que la hemoglobina C, ubicándose aproximadamente entre la banda C y la banda A (ver Figura 1.8). Por lo tanto, se comprueba la presencia de hemoglobina S en las muestras control positivo AS y su ausencia en las muestras control negativo AA. En la figura 3.1B se observa el patrón de migración de los tres controles utilizados para el presente trabajo, correspondientes a los fenotipos tipo salvaje AA, heterocigoto AS y homocigoto mutante SS.

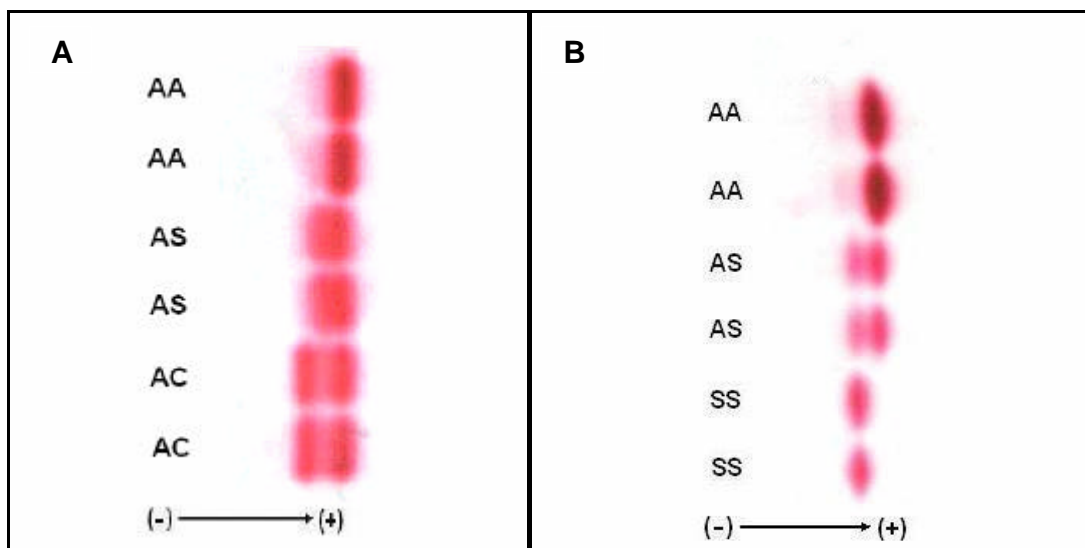


Figura 3.1. Ensayo de electroforesis de hemoglobina para las muestras control. A) Electroforesis de los controles AS y AA, en contraste con el control de heterocigoto AC. B) Electroforesis de los controles AA, AS y SS. El sentido de la migración se representa con una flecha.

3.2 Extracción y cuantificación de DNA

3.2.1 Cuantificación de DNA por espectrofotometría

Utilizando el fluorómetro Qubit y el Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit, y realizando las mediciones según lo descrito en la sección 2.4.2.2, se obtuvieron los siguientes resultados para las 6 muestras control utilizadas:

Muestra	Lectura (QF) ng/ml	ml de muestra	Factor de Dilución	Concentración	
				ng/ml	ng/μl
1	90,2	1	200	18040	18,04
	90,0	1	200	18000	18,00
2	98,9	1	200	19780	19,78
	98,7	1	200	19740	19,74
3	95,1	1	200	19020	19,02
	94,8	1	200	18960	18,96
4	107,3	1	200	21460	21,46
	107,2	1	200	21440	21,44
5	97,0	1	200	19400	19,40
	96,7	1	200	19340	19,34
6	112,1	1	200	22420	22,42
	111,8	1	200	22360	22,36

Tabla 3.1. Resultados de la cuantificación de DNA genómico de las muestras control mediante el Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit. Las lecturas fueron realizadas por duplicado. El cálculo de la concentración fue realizado según lo descrito en el Anexo C.

La concentración de DNA en las muestras luego de la extracción detallada en la Tabla 3.1 muestra un rendimiento promedio de 20 ng/μl al utilizar el protocolo estandarizado.

3.3 Diseño del set de primers

3.3.1 Diseño de los primers internos A, S, TA y TS

Mediante el programa FastPCR se definió al primer A como *forward primer* y a S como *reverse primer*, ya que la estabilidad y especificidad de los primers que inician en 3' con Adenina es superior a la de los primers que inician con Timina.

Se procedió a diseñar la secuencia final de los *primers* A y S mediante la opción *Primer Test* en el programa FastPCR. La secuencia de los *primers* internos A y S seleccionados en base al análisis en FastPCR, fue: 5'dATGGTGCATCTGACTCCTGA (A) y 5'dAGTAACGGCAGACTTCTCCA (S). Las características de estos *primers* pueden verse en la figura 3.2. Se puede verificar que ambos *primers* tienen propiedades termodinámicas muy similares, así como la misma composición de CG y la misma longitud. El rango de *annealing* óptimo para ambos *primers* llega hasta los 63.8°C.

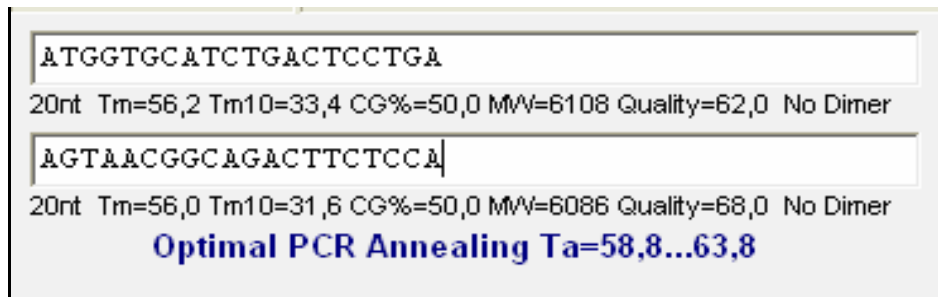


Figura 3.2. Selección de la secuencia de los *primers* internos mediante la opción *Primer Test* en FastPCR. Las características de los *primers* se muestran bajo su secuencia. El rango de *Ta* óptimo se muestra en azul. Tomado de FastPCR©

Para la técnica propuesta, *Overlap-BIPASA*, se diseñaron los *tailed primers* internos con *GC-clamps* denotados como *TA* y *TS*. Debido a que la adición de estas colas de GC aumentan la *Tm*, la temperatura de *annealing* óptima aumentó de forma proporcional a la longitud de la secuencia del *GC-clamp*. Las secuencias finales para estos *clamped-primers* fueron: 5'dCGGGCCGTGCATCTGACTCCTGA (*TA*), y 5'dGGCCGCAGTAACGGCAGACTTCTCCA (*TS*). Como se puede observar en la figura 3.3, la adición de 6 nucleótidos citosina y guanina a ambos *primers* permite que el rango de *Ta* óptimo teórico llegue hasta los 67°C. Pero, si se comparan sus *Tm10* con las *Tm10* de los *primers* originales A y S, se verifica que éstas no han sido alteradas. El *primer TA* fue diseñado con una región complementaria más corta para aumentar el diferencial de *Tm* entre los extremos 3' y 5'. Los programas de amplificación para la *Overlap-BIPASA* serán diseñados posteriormente en base a estas características.

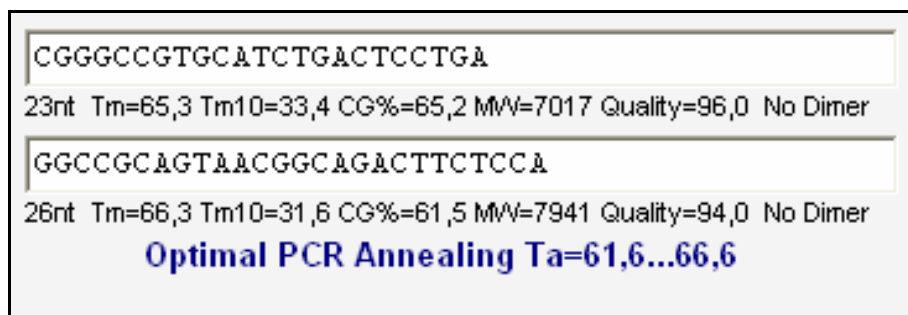


Figura 3.3. Diseño de la secuencia del CG-clamp para los primers TA y TS, mediante la opción Primer Test en FastPCR. Es notable el incremento del Tm en 10°C respecto al Tm de los primers exentos del CG-clamp. Igualmente es apreciable que el Tm10 no varía. Tomado de FastPCR©

3.3.2 Diseño de los primers externos P y Q

Mediante la herramienta *Running PCR* y la opción *fixed primer* en el programa FastPCR se seleccionó a los primers P y Q con las siguientes secuencias: (P) 5' dTCACCCTGTGGAGCCACAC, y (Q) 5' dACCTTGATACCAACCTGCCCA. Las características de estos primers se ilustran en la figura 3.5. El amplicón generado entre los primers P y S es de 106 pb (112 pb con el GC-clamp) y el generado entre los primers A y Q es de 195 pb (201 pb con el GC-clamp). El amplicón PQ generado es por lo tanto de 262 pb. Como se aprecia en la figura 3.4, el rango de evaluación de Ta sugerido por FastPCR debe ser desde los 59.7 a los 64.7°C.

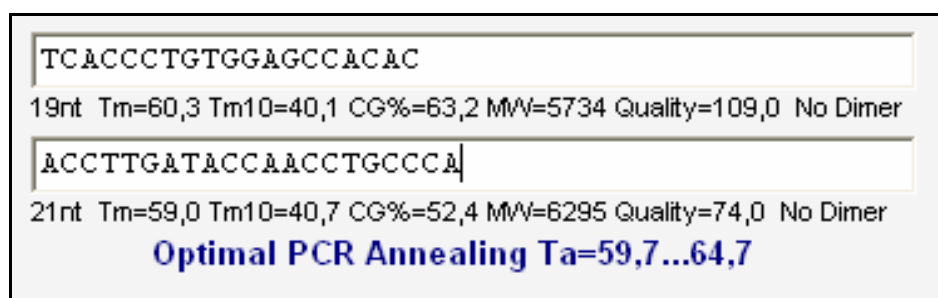


Figura 3.4. Características de los primers P y Q mediante la herramienta primer test en FastPCR. Se puede apreciar que ambos primers poseen un Tm similar aunque su longitud es distinta. Tomado de FastPCR©

3.3.3 Temperatura de *annealing* óptima para los *primers* internos

Utilizando la opción *fixed primer* en el programa FastPCR4.0 se pudo obtener la *Ta* óptima teórica para los *primers* internos A, S, TA y TS. Los *primers* “fijados” fueron los pares P-S, A-Q, P-TS y TA-Q. En la figura 3.5 se muestran los resultados del análisis de *Ta* óptima para los cuatro pares de *primers*.

```
Compatible combination of pair primers = P-S
>1F19_37 Tm=60,3°C Tm(10)=40,1°C CG%=63,2 Mw=5733,8 19 bp: PCR efficiency (quality)=109
5'-tcaccctgtggagccacac

>1R194_213 Tm=56,0°C Tm(10)=31,6°C CG%=50,0 Mw=6086,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=68
5'-agtaacggcagacttctcca

Length of PCR Product= 195
The Optimal Annealing Temperature of PCR = 61,1°C

Compatible combination of pair primers = A-Q
>1F175_194 Tm=56,2°C Tm(10)=33,4°C CG%=50,0 Mw=6108,0 20 bp: PCR efficiency (quality)=62
5'-atggtgcatctgactcctga

>1R260_280 Tm=59,0°C Tm(10)=40,7°C CG%=52,4 Mw=6295,1 21 bp: PCR efficiency (quality)=74
5'-accttgataccaacctgcca

Length of PCR Product= 106
The Optimal Annealing Temperature of PCR = 60,7°C

Compatible combination of pair primers = P-TS
>1F19_37 Tm=60,3°C Tm(10)=40,1°C CG%=63,2 Mw=5733,8 19 bp: PCR efficiency (quality)=109
5'-tcaccctgtggagccacac

>1R194_219 Tm=66,3°C Tm(10)=31,6°C CG%=61,5 Mw=7941,2 26 bp: PCR efficiency (quality)=94
5'-ggccgcagtaacggcagacttctcca

Length of PCR Product= 201
The Optimal Annealing Temperature of PCR = 62,9°C

Compatible combination of pair primers = TA-Q
>1F1_23 Tm=65,3°C Tm(10)=33,4°C CG%=65,2 Mw=7016,6 23 bp: PCR efficiency (quality)=96
5'-cgggccgtgcatctgactcctga

>1R89_109 Tm=59,0°C Tm(10)=40,7°C CG%=52,4 Mw=6295,1 21 bp: PCR efficiency (quality)=74
5'-accttgataccaacctgcca

Length of PCR Product= 109
The Optimal Annealing Temperature of PCR = 61,7°C
```

Figura 3.5. Resultados del cálculo de la *Ta* óptima en FastPCR para los *primers* A, S, TA y TS en la amplificación de los productos específicos con P y Q. Tomado de FastPCR©

Mediante este análisis se podrá diseñar los programas de amplificación tanto para BIPASA tradicional como para la técnica propuesta. Para BIPASA tradicional se utilizará una *Ta* de 61°C la cual ofrecería un buen rendimiento de la amplificación (ver Anexo E). Para la técnica propuesta se utilizará una *Ta* de 62°C como temperatura base para la optimización.

3.4 Estandarización del protocolo de amplificación

3.4.1 Amplificación de los fenotipos control por medio de BIPASA tradicional

En la figura 3.6 se muestra el análisis electroforético de la amplificación mediante BIPASA utilizando los *primers* internos sin colas 5' terminales A y S. El programa de amplificación utilizado incluye a la *Ta* óptima (61°C) calculada previamente para estos *primers*. Es notable que el amplicón PQ sea generado con mayor prioridad que los amplicones PS y AQ. Se debe tomar en cuenta que el fenotipo limitante de mayor importancia es el heterocigoto AS. En el Anexo E, Figura A2, se encuentra el rendimiento esperado en el presente ensayo para los amplicones PS y AQ.

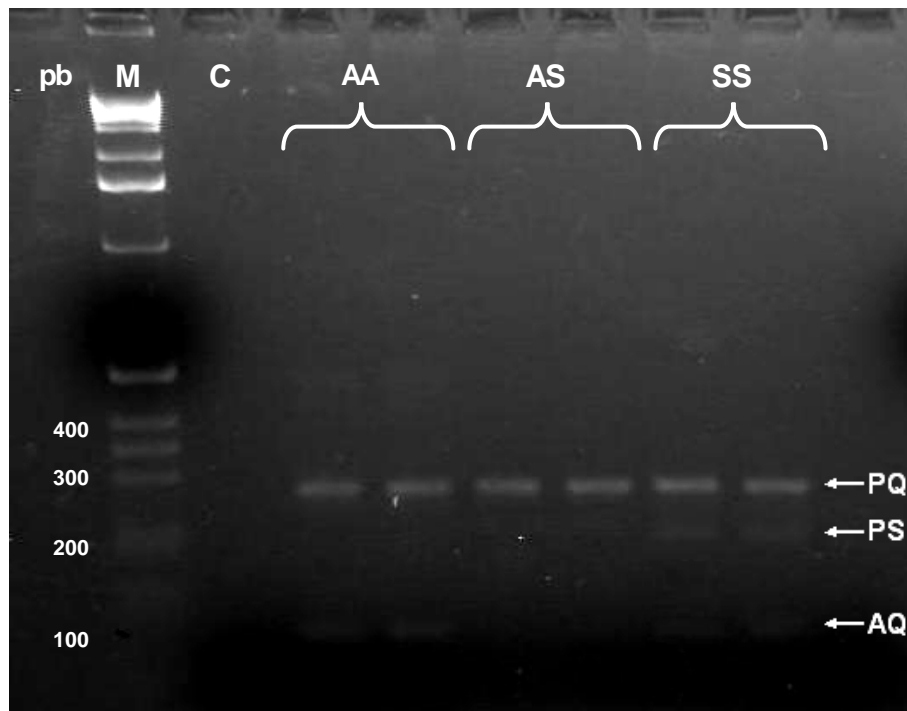


Figura 3.6. Amplificación de los fenotipos AA, AS y SS mediante BIPASA tradicional utilizando los *primers* P, Q, A y S. Se indican con flechas las posiciones esperadas de los amplicones PQ, PS y AQ. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases; C= control negativo.

3.4.2 Análisis de competitividad de los *primers* internos

En la figura 3.7 se ilustra el análisis de competitividad para las distintas combinaciones de *primers* internos A, S, TA y TS. En esta figura es notable la ausencia de

los amplicones específicos al amplificar con la combinación de *primers* internos A-TS y el elevado rendimiento con la combinación TA-TS bajo condiciones óptimas.

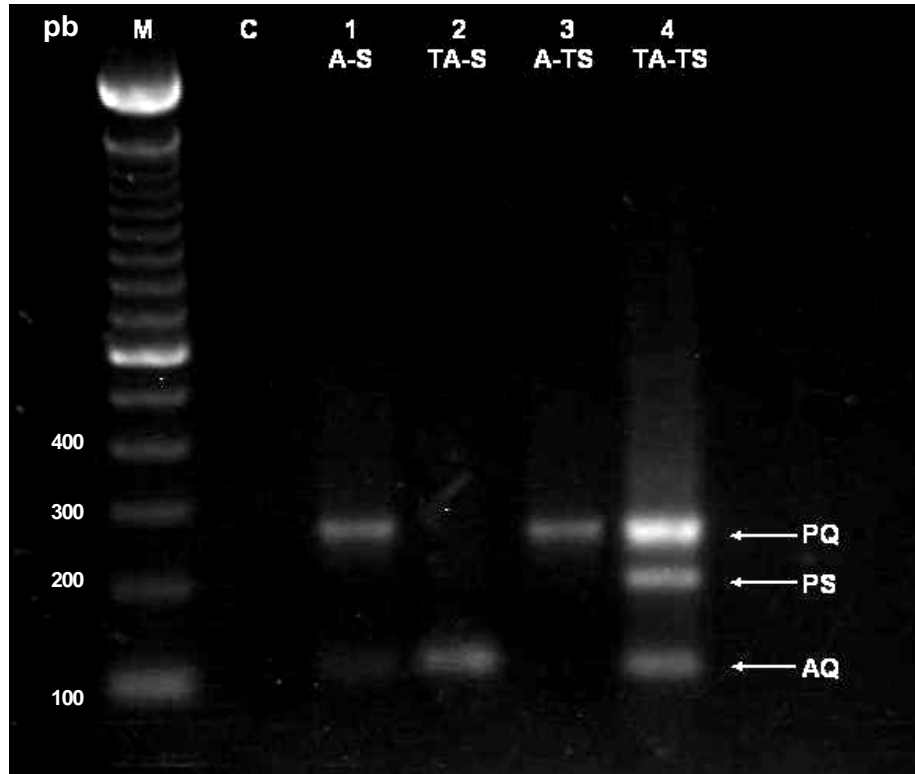


Figura 3.7. Análisis de competitividad entre distintas combinaciones de primers internos utilizando el fenotipo heterocigoto AS. Bajo la numeración de cada carril se encuentra la combinación de primers internos utilizada. A la derecha se indica la posición esperada del amplicón correspondiente. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases; C= control negativo.

3.4.3 Análisis de la generación de PQ, PS y AQ a distinta *Ta*

En la figura 3.8 se puede observar de forma efectiva el nivel de tolerancia de los primers *P*, *Q*, *TA* y *TS* para la generación de los amplicones correspondientes a temperaturas de *annealing* iguales o mayores a la *Ta* óptima de 62°C. Es notable la reducción en el rendimiento de la amplificación de PQ mientras mayor es la *Ta* aplicada. Al aplicar una *Ta* de 70°C la generación de PQ se imposibilita. Se puede apreciar también que existe una buena tolerancia de los primers *TA* y *TS* a temperaturas de *annealing* elevadas.

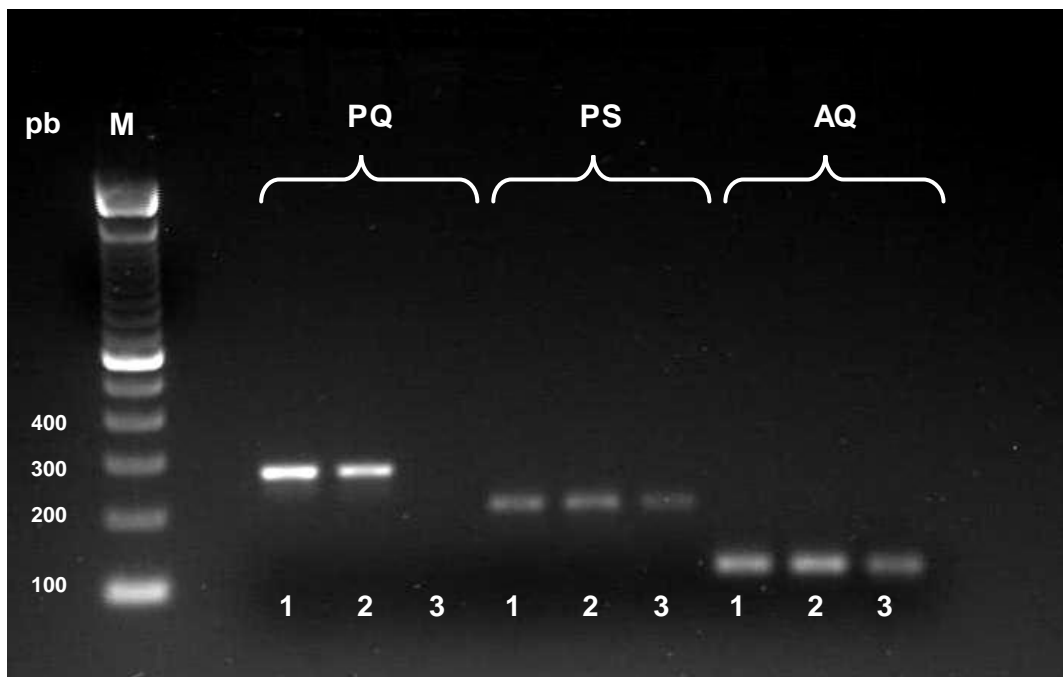


Figura 3.8. Generación de los amplicones PQ, PS y AQ a temperaturas de annealing de 62°C (carril 1), 66°C (carril 2) y 70°C (carril 3). M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

3.4.4 Estandarización del programa de amplificación para *Overlap-BIPASA*

En la figura 3.9 se puede ver el resultado del análisis de las capacidades refractarias a diferentes temperaturas de *annealing* superiores a la T_a óptima. Se puede observar que en ninguna de las temperaturas de *annealing* aplicadas se dio falla en la especificidad alélica. La diferencia en el rendimiento de los amplicones a estas temperaturas tampoco fue significativa. Sin embargo, la presencia de amplificación inespecífica fue mayor a temperaturas de *annealing* menores a los 68°C.

En la figura 3.10 se ilustra la comparación de los 3 programas de amplificación descritos en las tablas 2.4, 2.5 y 2.6. Se puede verificar que existe un mayor rendimiento para el fenotipo heterocigoto al utilizar el programa trifásico y bifásico en dos etapas secuenciales.

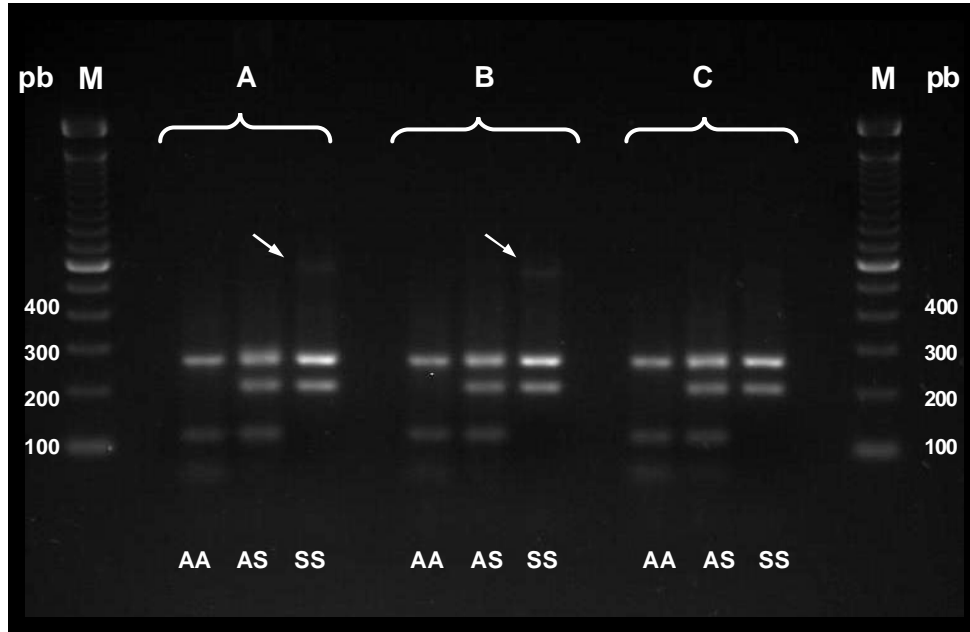


Figura 3.9. Evaluación de las capacidades refractarias sobre los 3 fenotipos, utilizando tres temperaturas de annealing: A) 64°C, B) 66°C y C) 68°C. Se indica con una flecha la aparición de bandas inespecíficas. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

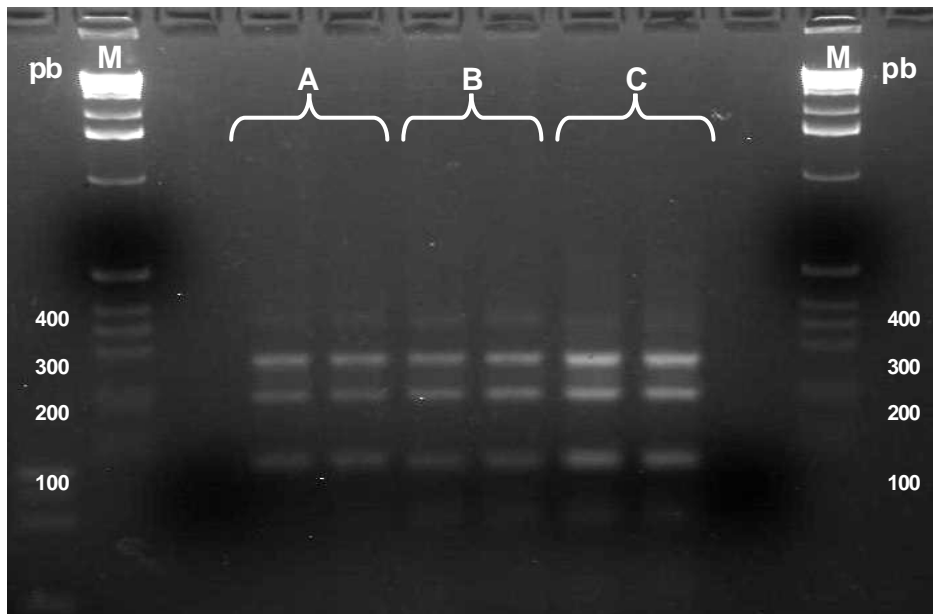


Figura 3.10. Evaluación de 3 programas de amplificación sobre el fenotipo heterocigoto AS. A) sistema trifásico a una Ta de 68°C; B) sistema bifásico a 68°C; y, C) sistema trifásico y bifásico en dos etapas a una Ta de 66 y 68°C. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

3.5 Estandarización de la concentración de los componentes de reacción

La concentración de $MgCl_2$ fue fijada en 1.5 mM y la concentración de dNTPs en 250 μM cada uno. Concentraciones mayores favorecieron la amplificación inespecífica de una forma muy marcada. Bajo estas condiciones fue realizada la selección de la mejor combinación de *primers* internos y externos. Al utilizar relaciones no-equimolares entre los cuatro *primers* se obtuvieron mejores resultados que al utilizar relaciones equimolares. En la figura 3.11 se observa un análisis comparativo entre la relación equimolar (1:1:1:1) y tres diferentes combinaciones no-equimolares de *primers*. Los valores de estas relaciones corresponden a los valores proporcionales de concentración de los *primers* $P : TS : TA : Q$. Durante este análisis se evidenció que el amplicón menor AQ absorbe muchos recursos de reacción cuando los *primers* internos se encuentran en relación equimolar, a menos que se desequilibre la concentración de los *primers* externos (relación 2:3:3:1) o que se desequilibre la concentración de los *primers* internos (relación 1:4:2:1).

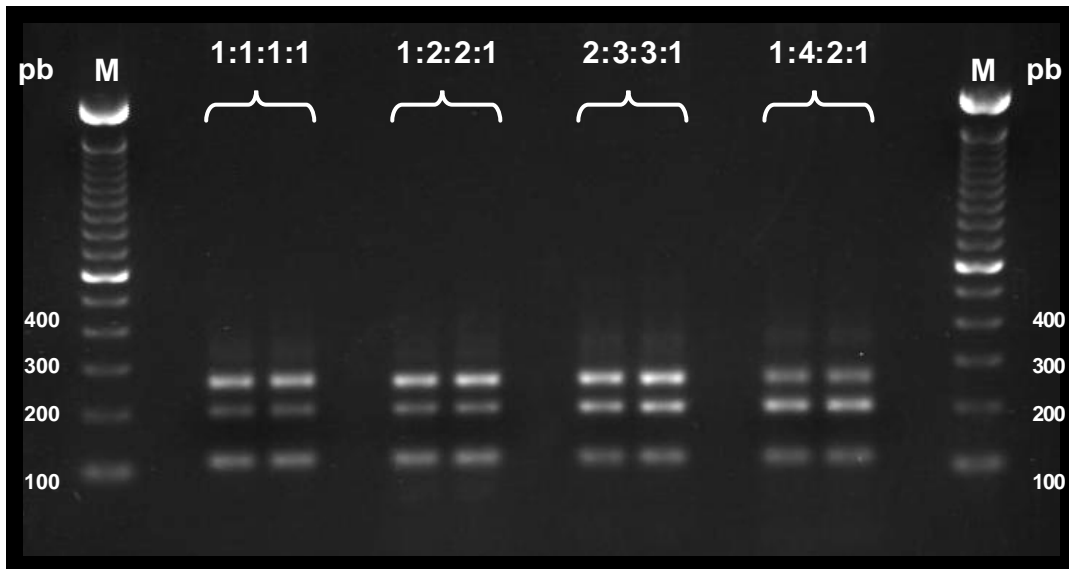


Figura 3.11. Análisis de rendimiento bajo diferentes relaciones de concentración de *primers* $P:TS:TA:Q$. Se observa un mejor rendimiento al aplicar relaciones no equimolares entre P y Q o TS y TA . M =marcador de peso molecular; pb = número de pares de bases.

Según lo observado en la figura anterior, la relación óptima de *primers* que se utilizará finalmente será la relación 23:3:1.

3.6 Resultados sobre la estabilidad de la técnica

Con el fin de evaluar al sistema estandarizado de amplificación se realizó un ensayo de estabilidad para los tres fenotipos AA, AS y SS. En la figura 3.12 se ilustra el análisis electroforético del sistema estandarizado en gel de agarosa al 2.5%.

En la figura 3.12 se puede verificar un alto rendimiento para los tres alelos en los diferentes fenotipos mediante el sistema de amplificación estandarizado. Sin embargo, al realizar este ensayo se observó nuevamente la aparición de amplificación inespecífica en los fenotipos heterocigoto y homocigoto mutante.

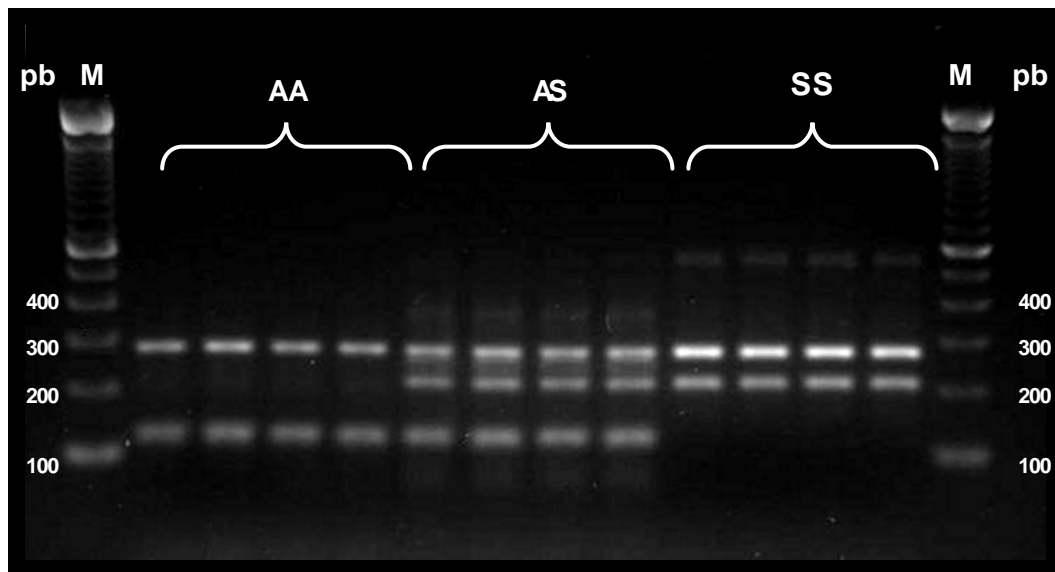


Figura 3.12. Análisis electroforético del ensayo de estabilidad del sistema estandarizado *Overlap-BIPASA*. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

3.7 Resultado del ensayo de campo con el sistema optimizado

En la figura 3.13 se muestra el análisis electroforético del ensayo de campo realizado en la ciudad de Pusir. Las muestras 1, 3, 6, 15, 16, 17, 18 y 20 mostraron rasgo

drepanocítico tal como se identificó clínicamente mediante análisis microscópico con metabisulfito de sodio. Como se esperó, ninguno de éstos mostró carácter homocigoto para hemoglobina S.

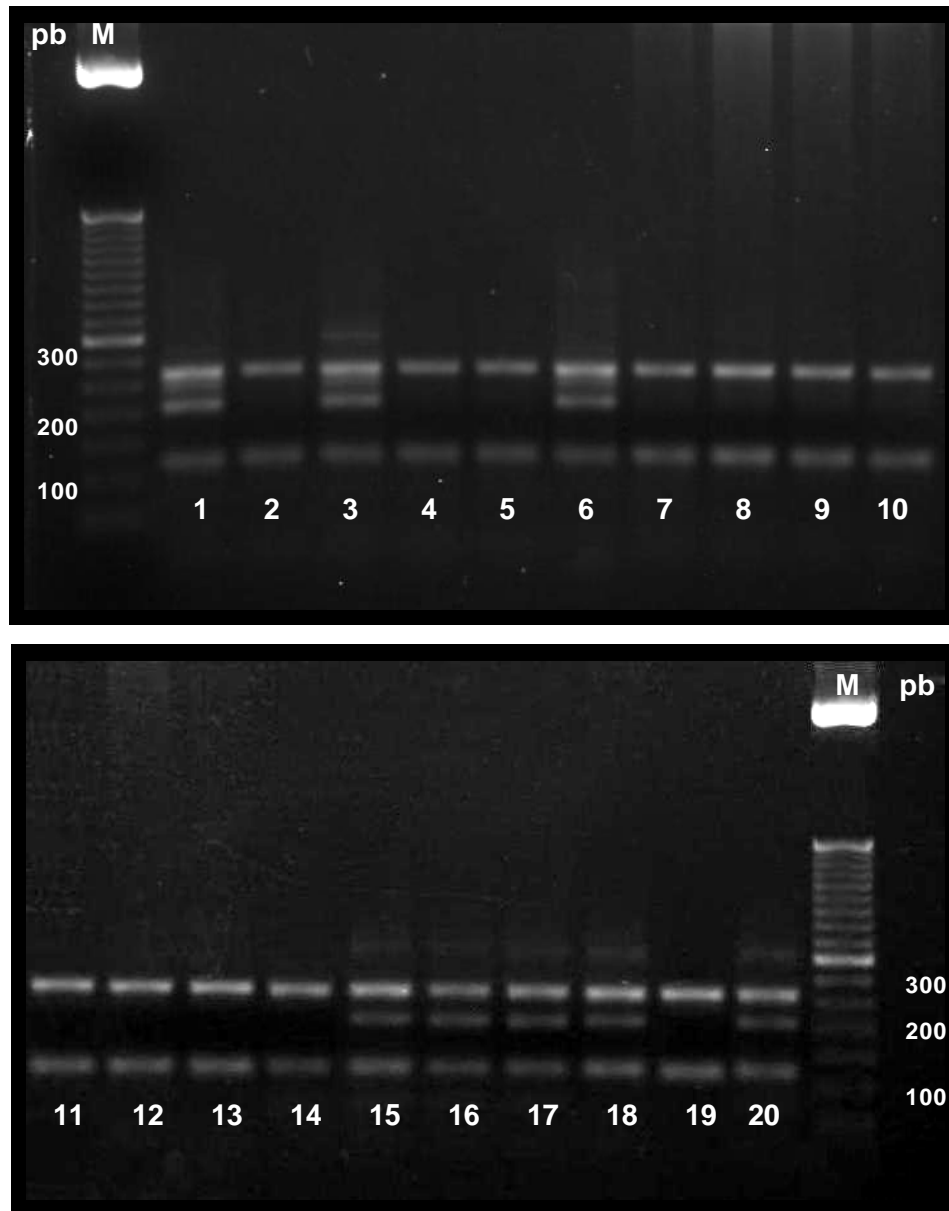


Figura 3.13. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de las amplificaciones de muestras clínicas para el ensayo de campo. Las muestras 1, 3, 6, 15, 16, 17, 18 y 20 corresponden a muestras positivas para la prueba de bisulfito de sodio. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

4 to. Capítulo: DISCUSIÓN

4.1 Obtención de controles de hemoglobina por medio de análisis electroforético

Mediante el proceso de electroforesis de hemoglobina alcalina estandarizado para el análisis de las muestras de sangre periférica se pudieron obtener los tres controles básicos para los fenotipos AA, AS y SS. La presencia de hemoglobina S en las muestras fue comprobado gracias a la comparación con el patrón de migración del control de fenotipo AC. En la figura 3.1A se puede apreciar que la hemoglobina S presenta siempre un retraso electroforético menor que el de la hemoglobina C bajo condición de pH alcalino. En la figura 3.1B se puede verificar que las muestras obtenidas poseen efectivamente el correspondiente patrón de migración característico para los fenotipos AA, AS y SS. De esta manera, estas muestras fueron utilizadas como controles para el ensayo molecular y fueron posteriormente sometidas al proceso de extracción de DNA estandarizado.

4.2 Protocolo estandarizado de extracción de DNA de sangre periférica

Como se observa en la tabla 3.1, el rendimiento de la extracción de DNA de sangre periférica utilizando el protocolo estandarizado que se detalla en la sección 2.4.2.1 es bastante homogéneo entre las diferentes muestras control. Dicho protocolo debió seguir un proceso previo de evaluación utilizando muestras aleatorias y midiendo el rendimiento de DNA por medio de espectrofotometría. En dicho proceso se pudo observar que cuando el *pellet* obtenido inicialmente al someter a congelación a -80°C era luego lavado exhaustivamente con solución salina hasta obtener un precipitado más claro y libre de hemoglobina, el rendimiento de DNA puro era superior. Para lograr esto se realizaron tres lavados secuenciales. De forma especial en el primer lavado no se eliminó el tapón proteico ubicado sobre el *pellet* de leucocitos precipitados. Este tapón proteico, compuesto mayoritariamente por albúmina y otras proteínas solubles e insolubles, contiene inhibidores de la PCR incluyendo la *hemina* (Klein *et al.*, 1997). Sin embargo, también se encuentran atrapadas en él algunas células linfocitarias y otras células inmunitarias alteradas por el proceso de congelación, así como pequeñas cantidades de DNA (Stirling, 2003; Andolfatto *et al.*, 2003). Durante los siguientes dos lavados este

tapón proteico fue retirado con el sobrenadante, tratándose de eliminar la mayor cantidad de inhibidores, DNAsas y hemoglobina presentes. El tratamiento posterior con elevadas concentraciones de NaCl (concentración final 1.4 M) y con la enzima proteolítica denominada Proteinasa K permitió la desnaturalización de cualquier residuo de hemoglobina así como de las proteínas celulares de los leucocitos.

Utilizando este sistema de aislamiento se pudieron obtener concentraciones de DNA más homogéneas y con un rendimiento de alrededor de 50 ng/μl al llevar a una solución de 50 μl (ver Anexo A). Esta concentración resultó muy elevada como para manejarla en el proceso posterior de amplificación, además de que fue difícil su completa dilución. Por lo tanto, se decidió llevar las soluciones de DNA hasta los 100 μl con el fin de reducir la concentración a la mitad y hacer más eficiente el proceso de dilución. La cuantificación fluorométrica de los extractos utilizando este volumen de dilución reveló una concentración final promedio de 20 ng/μl con un índice de error de ± 1.5 ng/μl. Esto comprueba que el protocolo utilizado para la extracción de DNA de sangre periférica rinde efectivamente una concentración homogénea de DNA. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que todas las muestras utilizadas para estos ensayos siguieron un estricto control en las condiciones de su conservación previa.

4.3 Análisis preliminar sobre la técnica BIPASA tradicional

Como parte de la metodología de optimización se realizó un análisis preliminar de la técnica PCR bidireccional alelo específica tradicional para posteriormente poder compararla con la técnica propuesta que incluye *clamped-primers* internos. En la figura 3.6 se pudo observar que el rendimiento de la técnica tradicional es muy bajo, aún utilizando una temperatura de *annealing* óptima de 61°C para la amplificación efectiva de cada amplicón estandarizada en ensayos preliminares (Anexo E). Si se observa en la figura 3.8 en los carriles 1 y 2 del amplicón PQ, correspondientes a las *Ta* de 62 y 66°C, se puede apreciar que el rendimiento es alto a dichas temperaturas. Esto demuestra que al juntar todo el *set* de *primers* existe un impedimento importante para hacer efectivo el proceso de amplificación. Por lo tanto el controlar la temperatura de *annealing* no es suficiente como para permitir una correcta amplificación mediante la técnica tradicional y

este puede ser el motivo por el cual en ensayos como el realizado por Waterfall *et. al.* (2001) el rendimiento sea tan poco homogéneo y que su optimización haya seguido un proceso tan complejo.

Debido al bajo rendimiento de los productos mediante la técnica tradicional, no pudo evidenciarse de forma significativa la baja capacidad refractaria de los *primers A* y *S*. Sin embargo, en el fenotipo SS de la figura 3.6 puede apreciarse ligeramente la amplificación del producto AQ generado por el *primer A*. Esto implica una falta de especificidad alélica por parte de este *primer* interno, tal como fue indicado en la sección 1.4.3.5. Estas bandas inespecíficas podrían evidenciarse mejor utilizando intercaladores de DNA más sensibles.

4.4 Análisis de competitividad de los *primers* internos

La competitividad de los *primers* internos exentos de regiones 5' no complementarias está basado en el solapamiento que existe entre las secuencias de los amplicones específicos. Por este motivo en toda PCR bidireccional existirá la tendencia en un *primer* interno a hibridar con la cadena amplificada por el otro *primer* interno, y viceversa. Este fenómeno de competitividad fue descrito en la sección 1.4.4.

En los resultados ilustrados en la figura 3.7 se puede observar el rendimiento poco homogéneo obtenido para distintas combinaciones de los *primers* internos *A*, *TA*, *S* y *TS* en la amplificación del fenotipo heterocigoto AS. Únicamente al utilizar simultáneamente los *clamped-primers TA* y *TS* se obtiene un rendimiento significativamente superior para los tres productos PQ, PS y AQ. Esto demuestra que la individualización de los productos mediante regiones 5' no complementarias logra aumentar el rendimiento de los amplicones específicos en la PCR bidireccional por reducción de la competitividad de los *primers* por regiones de secuencia homólogas. La competencia por secuencias homólogas que existen entre los *primers* exentos de regiones 5' no complementarias, sumado al fenómeno de *mega-priming* ejerce un fuerte impedimento para la correcta generación de los amplicones específicos. Se puede deducir entonces que al estar constituidas estas regiones 5' no complementarias de nucleótidos G y C se mejora la hibridación del *primer* en una forma de anclaje que aumenta en consecuencia el rendimiento de los amplicones específicos.

4.5 Estandarización y optimización de BIPASA

Para la selección de los *primers* en cualquier técnica alelo específica existe la necesidad de probar un cierto número de secuencias para obtener un *set* óptimo que ofrezca un rendimiento y especificidad aceptables (Vallote *et al.*, 2004). En el presente trabajo se ha estandarizado la técnica BIPASA sobre el diagnóstico de siclemia utilizado un solo *set* de *primers*, de los cuales los *primers* internos *TA* y *TS* se diseñaron con una región 5' no complementaria rica en nucleótidos guanina y citosina (*GC-clamp*). La región complementaria del *primer TA* fue acortada en 4 nucleótidos con el fin de aumentar el diferencial de entalpías entre los extremos 5' y 3', tomando en cuenta los antecedentes descritos en la sección 1.4.4. La utilización de estos *primers* fue justificada previamente mediante el análisis de competitividad discutido en la sección anterior. Dentro del proceso de estandarización se optimizó la temperatura de *annealing*, el sistema de amplificación y la concentración de los componentes de la reacción con énfasis en la concentración de los *primers*. La evaluación de diferentes temperaturas de *annealing* fue especialmente importante para evaluar simultáneamente la capacidad refractaria –y por consiguiente la especificidad alélica– de los *primers TA* y *TS* bajo estas condiciones. Este punto será discutido detalladamente en la siguiente sección.

4.5.1 Rendimiento y capacidad refractaria a diferentes temperaturas de *annealing*

Según los resultados obtenidos al evaluar el rendimiento de la amplificación a las temperaturas de *annealing* de 64, 66 y 68°C se pudo comprobar la elevada capacidad refractaria ofrecida por la técnica BIPASA al utilizar los *primers TA* y *TS*. En la figura 3.9 se puede observar una excelente discriminación de los alelos respectivos a cualquiera de las temperaturas de *annealing* evaluadas, lo cual comprueba que el diferencial de entalpías entre los extremos del *primer* ejerce un efecto positivo sobre su especificidad alélica. Por este motivo, no fue necesario rediseñar la secuencia de los *primers* internos, comprobando la eficiencia de la técnica aplicando un solo *set* de *primers*.

En la figura 3.9 también se puede observar que estos *primers* internos toleran de forma efectiva temperaturas de *annealing* hasta 68°C sin que exista disminución significativa en el rendimiento. La posibilidad de utilizar estas temperaturas altas permite

disminuir la probabilidad de errores de especificidad al aplicar condiciones térmicas diferentes a las utilizadas en este trabajo. Por este motivo se procuró trabajar con temperaturas de *annealing* sobre los 65°C, temperatura que ya sobrepasa en 3°C a la *Ta* óptima teórica calculada (ver Fig. 3.6).

Es importante señalar que bajo concentraciones estándar de MgCl₂ y dNTPs de 1.5 mM y 200 μM respectivamente, la aparición de amplificación inespecífica fue más evidente a temperaturas de *annealing* por debajo de los 68°C. Sin embargo, y como se analizará más adelante, esta amplificación inespecífica no podrá evitarse, aún a estas altas temperaturas, si las concentraciones de los componentes (incluyendo los *primers*) son alteradas en pro de mejorar el rendimiento del proceso.

4.5.2 Sistema de amplificación estandarizado

En el proceso de estandarización del sistema de amplificación y según lo observado en la figura 3.10, se pudo observar que el sistema en dos etapas (Tabla 2.5) es el que ofrece un mayor rendimiento de los productos específicos. Este sistema incluye 10 ciclos de un proceso trifásico a una *Ta* de 66°C y 25 ciclos de un proceso bifásico a una *Ta* de 68°C. El mayor rendimiento observado mediante este sistema demuestra que los 10 ciclos iniciales a menor *Ta* influyen positivamente la generación del amplicón mayor PQ con el fin de que los amplicones específicos PS y AQ se generen con mayor eficiencia a expensas de PQ. De todas maneras, fue siempre necesario reevaluar la utilización de uno u otro sistema de amplificación dependiendo de los resultados obtenidos de los ensayos subsiguientes. En caso de darse un exceso de amplificación inespecífica, se tomarían en cuenta los sistemas de amplificación con una *Ta* única como alternativa para optimizar el proceso.

Es importante tomar en cuenta que la amplificación inespecífica estuvo siempre presente en todos los sistemas evaluados. Esta amplificación inespecífica tomó la forma de *smears* ubicados tras las bandas de amplificación y más intensamente entre los amplicones PQ y PS. Esto indica que mientras mayor es el rendimiento, la amplificación inespecífica se incrementará de forma paralela. Aún así, la amplificación inespecífica no fue tan significativa como para impedir la correcta visualización de los alelos respectivos.

4.5.3 Concentración de los componentes de reacción

Aunque la amplificación obtenida en el ensayo anterior mostró un rendimiento aceptable para el sistema de amplificación elegido, aún existieron problemas de homogeneidad en la amplificación cuando el ensayo era repetido bajo las mismas condiciones. En estas ocasiones el amplicón PS mostró dificultades para ser generado por el *primer TS*, atribuyéndose el problema a interacciones de competitividad. Esta hipótesis podría ser cierta tomando en cuenta que la longitud del *GC-clamp* del *primer TS* es mucho menor respecto a la región complementaria del mismo.

Como alternativa para solucionar este inconveniente, y siguiendo la secuencia básica para la optimización de la técnica, se realizó un análisis de la proporción de *primers* individuales. La concentración de $MgCl_2$ y dNTPs fueron fijados en 1.5 mM y 250 μM cada uno, respectivamente, para evitar hasta cierto punto que la alteración en las proporciones de los *primers* no intensifique la aparición de bandas inespecíficas. Según los resultados mostrados en la figura 3.11, la relación de concentración de *primers* 2:3:3:1 (correspondientes a la relación *P:TA:TS:Q*) mostró un rendimiento más uniforme para los amplicones específicos frente a otras relaciones no equimolares. Esto puede explicar la importancia que pueden tener los *primers* externos en el mejoramiento de la amplificación de los productos específicos.

Hay que tomar en cuenta que al aumentar la concentración del *primer P* existe también un aumento del producto PQ y este aumento posiblemente también favorezca la generación de los productos específicos. Sin embargo, al analizar la relación 1:4:2:1 en la figura 3.11 se puede apreciar que esto no es del todo cierto, ya que en este caso se obtuvo un alto rendimiento de PS aún con un bajo rendimiento de PQ. Este fenómeno parece indicar que existe un fino equilibrio en la proporción de los *primers* bajo condiciones específicas en las que se obtiene un rendimiento alto y homogéneo de los amplicones específicos y dicho equilibrio muy probablemente puede ser fácilmente alterado si las condiciones de la reacción también son ligeramente alteradas. El encontrar el equilibrio exacto entre la concentración del *set* de *primers*, que aumente el rendimiento específico del o de los alelos menos favorecidos, que sea lo más estable posible a las ligeras variaciones de las condiciones de reacción y que además no aumente la amplificación

inespecífica como consecuencia de esto, es un proceso de gran complejidad que puede aliviarse realizando un análisis exhaustivo de las secuencias de los *primers* internos y de la longitud de sus *GC-clamps*, tal como lo describen Liu *et al.* (1997) en su artículo *Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles*.

4.6 Estabilidad y especificidad alélica de la técnica

Una vez estandarizados el sistema de amplificación y las concentraciones de los componentes de reacción, se analizó la estabilidad de la técnica realizando cuatro repeticiones de la amplificación por cada fenotipo. Los resultados observados en la figura 3.12 indicaron que la técnica es muy estable bajo las condiciones evaluadas para las muestras control. Esto también indica que la generación de los amplicones específicos no es producto de un proceso aleatorio, sino que está regido por las condiciones utilizadas en este ensayo. Es necesario evaluar el comportamiento de estabilidad paralelamente con un ensayo de campo posterior que permita validar la técnica.

Mediante el análisis de estabilidad fue también posible evaluar la especificidad alélica del sistema estandarizado, comprobándose la efectividad de los *primers* internos para discriminar correctamente los alelos presentes en la muestra. La excelente discriminación alélica ofrecida por el *primer TA* al no generar a AQ en el fenotipo SS indica también la efectividad de aumentar la diferencia de T_m de los extremos 3' y 5' del *primer* con el fin de mejorar su capacidad refractaria. Esto también permite demostrar que en la capacidad refractaria es fundamental la hibridación inicial de la región complementaria durante los primeros ciclos de reacción. Mientras mayor sea el impedimento térmico sobre la región complementaria en los ciclos iniciales, mayor será la capacidad refractaria. De esta manera fue posible mejorar la capacidad refractaria del *primer A* sin necesidad de incluir un *extra-mismatch*, sino únicamente reduciendo la secuencia complementaria y alargando la secuencia del *GC-clamp*.

En la figura 3.12 también se puede observar que la aparición de bandas inespecíficas sobre los fenotipos AS y SS no pudo ser corregida aún a temperaturas altas de *annealing*, muy probablemente debido a que en su generación estén involucrados los *primers* internos cuya tolerancia a estas temperaturas es mucho mayor. Sin embargo, la intensidad

de estas bandas en el gel de electroforesis permite asegurar que la generación de esta amplificación inespecífica no influye en el rendimiento de los amplicones específicos.

Mediante este ensayo es ya posible indicar que al utilizar diferenciales de entalpía entre los extremos 5' se puede lograr mejorar significativamente el rendimiento de los amplicones específicos en cualquier sistema de PCR bidireccional. Además, es importante señalar que el proceso de optimización fue relativamente sencillo, no requirió de nuevos modelos matemáticos y fue ensamblado únicamente sobre un *set* de *primers* diseñados mediante herramientas bioinformáticas sencillas.

4.7 Ensayo de campo

Como fue mencionado en la metodología, se utilizaron muestras clínicas de pacientes diagnosticados con anemia ferropénica de los cuales 8 fueron positivos para la prueba preliminar de bisulfito de sodio. Ninguno de estos pacientes mostró indicios de drepanocitosis, esplenomegalia ni ictericia. Todos ellos presentaban fatiga y dolores articulares en las extremidades inferiores. Ninguno fue diagnosticado finalmente con drepanocitosis por siclemia.

Según los análisis realizados mostrados en los resultados de la figura 3.13, los 8 pacientes positivos para la prueba con bisulfito de sodio mostraron el rasgo drepanocítico o genotipo heterocigoto correspondiente al fenotipo AS. Los doce pacientes restantes indicaron un genotipo normal correspondiente al fenotipo AA. Estos resultados concuerdan con la sintomatología presentada por los pacientes, la cual se relacionó finalmente con una anemia ferropénica gracias a los análisis de laboratorio. Es importante señalar que en este estudio no se intentó determinar la prevalencia de hemoglobina S, ni su relación con la anemia ferropénica.

Analizando más a fondo la parte técnica de los resultados obtenidos en la figura 3.13, se puede observar realmente la estabilidad de la técnica frente a diferentes concentraciones de DNA de las muestras. En el proceso de extracción de DNA de las muestras, las diez primeras rindieron una mayor concentración de DNA que las diez muestras restantes, ya que la extracción de DNA de las primeras fue realizada un día después de su recolección. Las diez muestras restantes siguieron un proceso de extracción

luego de una semana de su recolección y fueron mantenidas durante dos días a 4°C y no a los -20°C recomendados. Este inconveniente no fue tomado en cuenta para reajustar el protocolo de extracción en cuanto a la dilución final de la muestra. Mediante este ensayo fue posible determinar la influencia de la concentración de DNA de la muestra respecto al rendimiento neto de los productos de reacción. La cuantificación posterior de DNA indicó que las diez últimas muestras rindieron la mitad de DNA que lo estandarizado, es decir una concentración promedio de 10 ng/μl. Esto quiere decir que la concentración final de DNA genómico por reacción de amplificación fue de aproximadamente 0.5 ng/μl. Aunque esta concentración relativamente baja de DNA genómico es suficiente para la correcta amplificación de cualquier producto de PCR, es notable una ligera reducción en el rendimiento de los productos específicos en este ensayo. Sin embargo, el rendimiento sigue siendo aceptable y más aún existe una disminución en la generación de la amplificación inespecífica entre los amplicones PQ y PS. Por otro lado, la aparición de un *background* intenso en las muestras 1, 3 y 6 entre los amplicones PQ y PS pudo ser debido a un exceso de DNA genómico en la solución de reacción.

4.8 Discusión general y consideraciones finales sobre el sistema optimizado

Según se ha comentado en los párrafos precedentes, la utilización de *tailed-primers* internos provistos de *GC-clamps* (por lo que se les da la denominación de *clamped-primers*) ofrece ventajas evidentes con el fin de optimizar la amplificación bidireccional específica para los alelos involucrados en el padecimiento de la siclemia o del rasgo drepanocítico. La utilización de estos *clamped-primers* no ha sido considerada anteriormente en el diagnóstico molecular de siclemia, sin embargo, estos han sido aplicados sobre mutaciones en otros genes como el factor IX, FV-opp y D1 (Liu *et al.*, 1997). Actualmente se ha hecho uso de esta técnica con el fin de generar regiones 5' autocomplementarias con el extremo 3' haciendo las veces de *quencher*s para *primers* marcados con fluorocromos especiales (Nazarenko *et al.*, 2002). En todos estos casos se ha comprobado el efecto modificador que tienen estas secuencias no complementarias sobre las características termodinámicas de los *primers* y sobre el mejoramiento del rendimiento final de la amplificación.

En los resultados obtenidos al aplicar *clamped-primers* internos se ha podido contrastar su rendimiento significativamente superior frente a los *primers* totalmente complementarios utilizados tradicionalmente. Se puede ver además que la capacidad refractaria puede ser mantenida sin la necesidad de aplicar un *extra-mismatch* en la secuencia de los *primers* internos. Sería posible hacer uso de nuevas técnicas para mejorar las capacidades refractarias combinadas con la utilización de *GC-clamps* con el fin de diseñar sistemas más robustos y versátiles que requieran una menor astringencia en el proceso. Una de estas técnicas es la aplicación de LNA-*primers* o de ENA-*primers* cuyas modificaciones en la ribosa del tercer nucleótido 3' terminal incrementan significativamente la capacidad refractaria de los *primers* alelo específicos, utilizando las mismas características termodinámicas de su secuencia (Koizumi *et.al.*, 2005). Sin embargo, el rendimiento poco homogéneo obtenido siempre ha sido un problema en estas nuevas técnicas alternativas.

Según los resultados también es necesario considerar el alto rendimiento del amplicón mayor PQ, el cual estuvo siempre presente a pesar de haberse diseñado su secuencia con el fin de reducir su rendimiento a temperaturas de *annealing* altas. Si se observa en las características de los *primers* P y Q en la figura 3.4, aunque la *Tm* de ambos *primers* sea de 60°C, existe una diferencia notable entre su composición de nucleótidos G y C a más de su estabilidad reflejada en la calidad de hibridación (*quality*) que indica el *software*. El *primer* P posee un elevado porcentaje de GC y su calidad es elevada, a pesar de que su longitud sea menor a la del *primer* Q. Esto implica una alta tolerancia del *primer* P a altas temperaturas de *annealing* permitiendo un alto rendimiento de PQ aún a una *Ta* superior en 6°C a la *Ta* óptima sugerida. Más allá de este límite de *Ta* se produjo un impedimento total de la amplificación (ver Figura 3.8). La alta homología de las secuencias alrededor del gen de la beta globina con otros genes de proteínas globulares no permitió un diseño flexible para estos *primers*, sin embargo, aún existe la posibilidad de rediseñar estos *primers* con el fin de reducir su *Tm* y el %GC y controlar mejor la generación de PQ mediante el cambio de temperaturas de *annealing* en el proceso de amplificación.

5 to. Capítulo: CONCLUSIONES

- Según los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras de DNA control se puede concluir que el protocolo estandarizado para la extracción de DNA de sangre periférica es altamente efectivo para la obtención de DNA genómico de alto rendimiento, así como de un rendimiento homogéneo al realizar varias extracciones simultáneas.
- Durante el proceso de estandarización de la técnica molecular no se observaron problemas de inhibición de la PCR verificándose una buena estabilidad en la amplificación. Se puede afirmar que el sistema estandarizado de extracción de DNA ofrece una solución de DNA genómico de una pureza adecuada, que garantiza la presencia de una muy limitada cantidad de inhibidores, por lo que puede ser utilizado en técnicas de PCR exigentes sin la adición de adyuvantes.
- La utilización de *primers* específicos exentos de regiones 5' no complementarias en las técnicas de PCR bidireccional dificultan la estandarización de las condiciones de amplificación debido a: alta competitividad de los *primers* internos por regiones de secuencia homólogas, inducción al fenómeno del *mega-priming*, falta de especificidad alélica sobre los *mismatch* de baja capacidad refractaria y baja capacidad de hibridación que pueden presentar las secuencias alrededor del alelo rastreado.
- La probabilidad de hibridación inespecífica por *primers* internos exentos de regiones 5' no complementarias es igual que la obtenida mediante los *clamped-primers* ya que la región 3' siempre va a ser la misma. Por este motivo no se ha incluido a la amplificación inespecífica como una de las razones para la dificultad de estandarizar la técnica BIPASA tradicional, mencionadas en el punto anterior. El rendimiento de la amplificación inespecífica aumenta de forma paralela y directamente proporcional al rendimiento de los amplicones específicos debido a la mayor estabilidad de hibridación conferida por el *GC-clamp*.

- El *GC-clamp* es altamente efectivo para contrarrestar la competitividad de los *primers* por regiones homólogas ya que no existe la posibilidad de que el *clamped-primer* hibride de forma completa con estas secuencias homólogas. Por lo tanto, se ha demostrado que el *clamped-primer* tiende fuertemente a hibridar con los amplicones específicos generados de *novo*, que incluyen la secuencias del *GC-clamp*, y no con regiones de hibridación incompletas como las que producen competitividad.

- Según los resultados obtenidos de la estandarización de la temperatura de *annealing* aplicando la técnica propuesta se puede concluir que la utilización de los *clamped-primers* internos diseñados mejora la eficiencia de la hibridación alrededor de un rango de *Ta* bastante amplio y lo suficientemente alto como para mantener condiciones de especificidad altas.

- Por lo dicho en el punto anterior, se puede asegurar que la eficiencia de hibridación ofrecida por los *clamped-primers* permite una gran versatilidad en el diseño del sistema de amplificación pudiéndose ajustar a las condiciones requeridas de una forma rápida y menos laboriosa.

- El sistema de amplificación estandarizado (ver sección 4.4.2) ha permitido concluir que los diez primeros ciclos son cruciales para determinar el rendimiento en la generación de los amplicones específicos. Al aplicar una *Ta* en los ciclos iniciales que sea ligeramente inferior a la *Ta* de los ciclos subsiguientes existe un mejoramiento en la hibridación inicial de los *clamped-primers* permitiendo una rápida generación de los amplicones específicos sin que esto vaya en detrimento de su capacidad refractaria.

- El ajuste adecuado en el equilibrio de las concentraciones de los *primers* individuales es de crucial importancia con el fin de homogenizar la generación de los amplicones específicos. Se ha visto que en el proceso de amplificación bidireccional existe por lo general un alelo menos favorecido. Un aumento en la

- concentración de su *primer* alelo específico puede mejorar la eficiencia en la hibridación y por ende en su rendimiento.
- Según lo discutido en la sección 4.4.3, se ha concluido que la alteración en la concentración de los demás componentes de la reacción, específicamente de $MgCl_2$ y dNTPs, no mejoran de forma significativa el rendimiento de la reacción y más aún son capaces de favorecer la generación de amplificación inespecífica al utilizar concentraciones superiores a lo estandarizado.
 - Al analizar los resultados del ensayo de estabilidad y del ensayo de campo se pudo comprobar que la técnica optimizada ofrece una alta estabilidad y homogeneidad sobre las muestras analizadas y que la resolución de las bandas en el gel de electroforesis es adecuada y no requiere de análisis posteriores para su confirmación.
 - Mediante el ensayo de estabilidad es posible concluir que el aumento del diferencial de T_m de los *clamped-primers*, entre sus regiones complementarias y no complementarias, es una estrategia eficaz para lograr una mayor capacidad refractaria en el extremo 3', permitiendo facilitar el proceso de estandarización.
 - Igualmente se puede concluir que la facilidad para la optimización de la técnica propuesta permite su directa aplicación sobre muestras clínicas con fines diagnósticos e investigativos, siempre y cuando la fuente de DNA genómico sea sangre periférica. Otras fuentes celulares de DNA genómico humano no han sido evaluadas en este trabajo por lo cual no se puede asegurar un rendimiento aceptable en muestras tales como las utilizadas para realizar diagnóstico prenatal. Sin embargo, se puede afirmar que el presente trabajo marca un precedente importante para el diseño posterior de un sistema diagnóstico prenatal de siclemia para lo cual será necesario realizar una reingeniería del proceso con el fin de manejar fuentes muy limitadas de DNA y muy susceptibles a contaminación.

6 to. Capítulo: RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para el proceso de extracción de DNA genómico de sangre periférica se trabaje dentro de una cámara de flujo laminar durante todo el proceso, o mientras sea posible, con el fin de evitar la contaminación con otras fuentes de DNA. Es recomendable que los tubos utilizados para la extracción no sean abiertos fuera de la cámara de flujo laminar en caso de necesitar transportarlos a otro lugar.
- Se recomienda que para la extracción de DNA genómico se utilicen muestras previamente conservadas bajo condiciones óptimas, tal como se describe en la sección 2.4.1.1. Es importante anotar que al utilizar temperaturas tanto mayores como menores a la recomendada para la conservación de las muestras de sangre periférica puede existir un mayor riesgo de degradación de DNA genómico.
- Se recomienda conservar siempre las muestras de DNA a una temperatura de -20°C para evitar su degradación por efecto de DNAsas presentes. Cada vez que se requiera su descongelación, la muestra deberá mantenerse en hielo durante su uso y deberá protegerse de la exposición directa al ambiente mediante una cámara de bioseguridad.
- Se recomienda que en caso de realizarse una reingeniería de la técnica, se realice un nuevo diseño de los *primers P* y *Q* con el fin de que tengan una temperatura de *melting* aproximadamente 10°C inferior a la T_m de los *clamped-primers* internos, y con esto se logre reducir su tolerancia a temperaturas de *annealing* elevadas y reducir el consumo de recursos por la generación de PQ. Además se recomienda rediseñar *TS* con un *GC-clamp* más largo con el fin de reducir la competitividad de este *primer* sin la necesidad de incrementar su concentración.

- Se recomienda realizar un proceso de optimización similar al realizado en el presente trabajo pero aplicándolo sobre la mutación responsable de la hemoglobina C. Esto resulta de gran importancia en pacientes propensos a padecer de hemoglobina SC, cuyas manifestaciones clínicas pueden ser tan graves como las de la siclemia.

- Se recomienda que para proyectos relacionados con el diagnóstico molecular por amplificación alelo específica se tomen en cuenta principalmente las bases técnicas sobre las cuales se ha desarrollado el presente trabajo, así como los fundamentos de la utilización de regiones 5' no complementarias, como los *GC-clamps*, con el fin de diseñar nuevas técnicas moleculares que hagan más eficiente la detección de los alelos presentes.

- Se recomienda que para el ensayo de BIPASA sobre otras mutaciones que generen *mismatches* débilmente refractarios, se tome en cuenta el diseño de ENA-*primers* o de LNA-*primers* con el fin de aumentar las capacidades refractarias de los *primers* internos.

- Sería de gran interés para el campo de la biología molecular el diseñar *self-quenched primers* alelo específicos marcados con fluorocromos distintos como *primers* internos para la técnica BIPASA, con el fin de poder detectar los alelos presentes en una muestra directamente por medio de la fluorescencia emitida a una longitud de onda específica para cada *primer* y de esta manera evitar la realización de electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Además, la aplicación de esta técnica utilizando electroforesis capilar permitiría la creación de una *BIPASA multiplex* de alta resolución con el fin de detectar homocigosis y heterocigosis en varios alelos, en una sola reacción de amplificación.

7 mo. Capítulo: BIBLIOGRAFÍA

1. Andolfatto, S., Namour, F., Garnier, A.L., Chabot, F., Gueant, J.L. y Aimone, I. (2003). *Genomic DNA extraction from small amounts of serum to be used for I-antitrypsin genotype analysis.* Eur Respir J 21:215-219.
2. Asociación Catalana de Enólogos. (2007). Ciencia y Tecnología. Revista de Enología, 82. www.acenologia.com/figs64_ciencia2.htm.
3. Bellingham, A.J. (1974). *The sickling process in relation to clinical manifestations.* J. Clin. Pathol. Suppl. 8: 23–25.
4. Blackwell, R.Q. y Huang, J.T. (1965). *Simplified preparation of blood hemolysates for hemoglobin electrophoresis.* Department of Biochemistry. U.S. Naval Medical Research, 2 (6).
5. Cardiff University. (2006). *The Human Gene Mutation Database; Haemoglobin Beta database.* <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=HBB>
6. Dieffenbach, C.W. y Dveksler, G.S. (2003). *PCR Primer, A laboratory Manual.* Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. Eastman, J.W., Wong, R., Liao, C.L. y Morales, D.R. (1996). *Automated HPLC screening of newborns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies.* Clin Chem 42(5): 704-710.
8. Frenette, P.S. y Atweh, G.F. (2007) *Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise.* J Clin Invest, 117(4): 850–858.

9. Grenett, H.E. y Garver, F.A. (1980). *Identification and quantitation of sickle cell hemoglobin with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. J Lab Clin Med. 96(4):597-605.
10. Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. y Vogt P.H. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques 23:504-511.
11. Huisman, T.H.J., Carver, M.F.H. y Baysal, E. (1997). *A Syllabus of Thalassemia Mutations*. The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta GA-USA
12. Ingram, V.M. (2004). *Sickle-Cell Anemia Hemoglobin: The Molecular Biology of the First “Molecular” Disease*. Genetics, 167: 1-7.
13. Invitrogen Corporation. (2007). *Qubit Fluorometer*. Invitrogen, Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com/products/qubit/index.html>
14. Kalendar R. (2005). *FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein*. University of Helsinki <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm>
15. Klein, A., Barsuk, R., Dagan, S., Nusbaum, O., Shouval, D., y Galun, E. (1997). *Comparison of methods for extraction of nucleic acid from hemolytic serum for PCR amplification of hepatitis B virus DNA sequences*. J Clin Microbiol., 35(7): 1897–1899.
16. Koizumi, M., Morita, K., Takagi, M., Yasumo, H. y Kasuya, A. (2005). *SNP genotyping by allele-specific PCR using ENA primers*. Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series, 49: 47-48.

17. Liu, Q., Thorland, E.C., Heit J.A. y Sommer, S.S. (1997). *Overlapping PCR for Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles: A Rapid One-Tube Method for Simultaneously Differentiating Homozygotes and Heterozygotes*. Genome Res, 7: 389-398. <http://www.genome.org/cgi/content/full/7/4/389?ck=nck>
18. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore D. y Darnell J. E. (2002). Biología Celular y Molecular. New York: Editorial Médica Panamericana.
19. Marist Collage. (2000). *Sickle Cell Anemia*. Imagen en página web. <http://www.academic.marist.edu/~jzmz/HematologyI/Description24.html>
20. Mullis, K.B, Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G. y Erlich, H.A. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. ColdSpringHarbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263- 273.
21. National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2006). *The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. <http://130.14.29.110/BLAST/>
22. Nazarenko, I., Lowe, N., Darfler, M., Ikonomi, P., Schuster, D. y Rashtchian, A. (2002). *Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore*. Nucleic Acids Research, 30, 9e37.
23. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker N., et al. (1989). *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Res, 17:2503-2516.
24. Panjkovich, A. y Melo, F. (2005). *Comparioson of different melting temperature calculation methods for short DNA sequences*. Oxford Journals, Bioinformatics 21(6):711-722.

25. Rodríguez, R.W., Sáenz, R.G. y Chaves, V.M. (1998). *Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica*. Revista Panamericana de Salud Publica, 3(1).
26. Ruano, R.A. y Jato, D.M.. (2004). *Cribado neonatal de hemoglobinopatías*. Serie Avaluación de Tecnologías. Informe de evaluación INF2004/004.
27. Rychlik, W., Spencer, W.J. y Rhoads, R.E. (1990). *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res., 18(21): 6409-6412.
28. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
29. SantaLucia J.J. (1998). *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbour thermodynamics*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 1460-1465.
30. SantaLucia, J.J, Allawi, H.T. y Seneviratne, P.A. (1996). *Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability*. Biochemistry, 35: 3555-3562
31. Stirling, D. (2003). *DNA Extraction from Plasma and Serum*. Methods Mol Biol., 226:63-4.
32. Twyman, R. (2003). *Mutation or Polymorphism? The Human Genome*. Revista Wellcome Trust. http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html
33. U.S. Department of Energy. (2007). *Human Genome Project Information, SNP Fact Sheet*. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml

34. University of Stellenbosch y Tygerberg Academic Hospital. (2001). *Haematological Pathology Cases – Case III*. <http://academic.sun.ac.za/haema/dept/gevaliii.htm>
35. Vallone, P.M., Just, R.S., Coble, M.S., Butler, J.M. y Parsons, T.J. (2004). *A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome*. *Int J Legal Med* 118: 147–157.
36. Waterfall, C. y Cobb, B. (2001). *Single Tube Genotyping of Sickle Cell Anaemia using PCR-based SNP analysis*. *Nucleic Acids Research*, 29, 23e119.
37. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R. y Day, I.N. (2001). *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms*. *Nucleic Acids Research*, 29(17): e88.
38. Ye, S., Humphries, S. y Green, F. (1991). *Allele specific amplification by tetra-primer PCR*. *Nucleic Acids Research*, 20(5).

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen localizado en el sitio correspondiente (locus) sobre cromosomas homólogos.

Aminoácidos. Compuestos orgánicos que contienen, por lo menos, un grupo amino y uno carboxilo. En los 20 aminoácidos diferentes que componen las proteínas, un grupo amino y uno carboxilo están unidos a un átomo de carbono central, el carbono alfa, al que se adosa una cadena lateral variable.

Amplicón. Fragmento de DNA sintético producto de un proceso de amplificación.

Autocompletinario. Se refiere a una secuencia o hebra de ácido nucleico que puede formar una doble hélice parcialmente pareada entre si misma y generalmente entre sus secuencias 3' y 5' terminales (véase **complementario**). Los pareamientos autocomplementarios se pueden producir intencionalmente entre los extremos de un oligonucleótido de cadena simple formando lo que se conoce como *molecular beacons* o *hairpin like structures*.

Autosómico. Referente a cualquier cromosoma diferente de los cromosomas sexuales.

Codón. Secuencia de tres nucleótidos en el DNA o el mRNA que especifica un aminoácido particular durante la síntesis de proteínas; también se denomina *triplete*. De los 64 codones posibles, tres son de detención, los cuales no especifican para ningún aminoácido.

Cofactor. Se refiere generalmente a la parte no orgánica de una coenzima formada comúnmente por iones metálicos unidos por enlaces coordinados. La función principal de los cofactores es la de asistir las transformaciones bioquímicas realizadas por una enzima.

Complementario. Se refiere a dos secuencias o hebras de ácidos nucleicos que pueden formar una doble hélice perfectamente pareada entre si.

Cromosoma. En eucariotes, unidad estructural del material genético que consiste en una única molécula de DNA lineal bicatenario y proteínas asociadas.

Denaturación (de DNA). Separación total o parcial de las hebras de un fragmento bicatenario de DNA como consecuencia del calentamiento o de la exposición a agentes químicos o enzimáticos determinados.

Dímeros (de oligonucleótidos). Se refiere al pareamiento parcial por complementariedad entre regiones de secuencia de oligonucleótidos distintos.

DNA (ácido desoxirribonucleico). Largo polímero lineal compuesto por cuatro tipos de *nucleótidos* de desoxirribosa, que contiene la información genética. En su estado nativo, el ADN es una hélice doble compuesta por dos hebras antiparalelas unidas por enlaces de hidrógeno entre bases púricas y pirimidínicas complementarias.

DNA genómico. Todas las secuencias de DNA que componen el *genoma* de una célula u organismo.

DNA polimerasa. Enzima que copia una hebra de DNA (DNA blanco) para formar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula bicatenaria de DNA. Todas las DNA plimerasas agregan desoxirribonucleótidos uno a la vez en la dirección 5'→3' a un corto oligonucleótido cebador o *primer* ya existente.

Dominante. En genética se refiere al alelo de un gen que se expresa en el *fenotipo* de un *heterocigoto*; el alelo no expresado se denomina *recesivo*.

Electroforesis. Cualquiera de varias técnicas par la separación de macromoléculas, basadas en la migración sobre un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

Entalpías. Calor; en una reacción química, la entalpía de los reactantes o productos es equivalente al total de las energías de enlace.

Entropía. Medida del grado de aleatoriedad de un sistema; cuanto mayor es la entropía, mayor es la aleatoriedad.

Exón. Segmento de un gen eucariote (o de su transcripción primaria) que llega al citoplasma como parte de una molécula de mRNA, rRNA o tRNA.

Fenotipo. Características visibles de una célula u organismo, a diferencia de su *genotipo*.

Fluorocromo. Cualquiera de las moléculas capaces de producir fluorescencia como efecto de su excitación inducida por una longitud de onda luminosa o como producto secundario de una reacción química o cambio conformacional.

Gen. Unidad física y funcional de la herencia, que transporta información de una generación a la próxima. En términos moleculares, es toda la secuencia de DNA que incluye *exones*, *intrones* y regiones de control de la transcripción, necesaria para la producción de una proteína o un RNA funcionales.

Genoma. Total de la información genética contenida en una célula o un organismo.

Genotipo. Constitución genética completa de una célula u organismo aislado; también, los alelos de uno o más sitios específicos que pueden o no mostrar una condición fenotípica.

Genotipificación. Determinación del genotipo de una célula u organismo por medio de técnicas moleculares específicas.

Globina. Proteína que forma parte de la hemoglobina (heteroproteína) y que posee un grupo prostético *hem* como dominio reactivo para el transporte de oxígeno.

Haploide . Se refiere a un organismo o célula que sólo posee un miembro de cada par de *cromosomas homólogos* y, en consecuencia, una única copia de cada *gen* o sitio genético. Los gametos y las células bacterianas son haploides.

Hemina. Producto de oxidación del átomo de hierro del grupo *hem* a la forma Fe^{3+} .

Hem. Grupo prostético de estructura porfirínica que mantiene coordinado a su centro a un átomo de Fe^{2+} . El grupo hem se une a las globinas que componen la hemoglobina para posibilitar el transporte de oxígeno dentro del eritrocito.

Hemoglobinopatías. Patologías relacionadas al grado de disfunción de la hemoglobina producto de cambios en la secuencia de los genes de las globinas.

Heterocigoto. Se refiere a una célula u organismo diploide que contiene dos *alelos* diferentes de un gen particular.

Hibridación Asociación de dos hebras *complementarias* de ácidos nucleicos para formar moléculas bicaténarias; pueden contener dos hebras de DNA, dos hebras de RNA, o una hebra de DNA y otra de RNA.

Hipertermófilo. Organismo capaz de vivir a temperaturas superiores a los 80°C.

Homocigotos. Se refiere a una célula u organismo diploide que contiene dos *alelos* idénticos de un gen particular.

Intrón. Parte de una transcripción primaria (o del DNA que lo codifica) que se elimina por empalme durante el procesamiento de RNA y no se incluye en los mRNA, rRNA o tRNA funcionales maduros.

Mismatch. Se refiere a la falta de complementariedad entre las bases de un par nucleotídico dentro de una secuencia homóloga.

Nucleósido. Pequeña molécula compuesta por una base púrica o pirimidínica unida a un pentosa (ribosa o desoxirribosa). Las bases púricas son adenina y guanina, y las bases pirimidínicas son citosina, timina y uracilo.

Nucleótido. Consiste en un *nucleósido* con uno o más grupos fosfato unidos a la unidad de azúcar (ribosa o desoxirribosa) mediante un enlace éster.

Oligonucléotidos. Secuencia corta de *nucleótidos*, generalmente no mayor a las 20 unidades nucleotídicas.

Polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Variación de secuencia debido al cambio de un solo *nucleótido* para ser reemplazado por otro distinto, con una prevalencia mayor al 1% dentro de la población de una especie.

Recesivo. En genética se refiere al alelo de un gen que no se expresa en el *fenotipo* cuando está presente el alelo *dominante*, y por lo tanto, se requieren dos alelos recesivos para que se manifieste dicho fenotipo.

Tandem repeats. Se refieren a secuencias de DNA que se repiten una tras otra en el genoma. Dependiendo de la longitud de las unidades de secuencia que se repiten, los *tandem repeats* son denominados satélites, minisatélites o microsatélites.

Termociclador. Equipo utilizado en biología molecular que permite realizar ciclos rápidos y continuos de temperatura necesarios para el proceso de síntesis de DNA.

Transversión. Mutación puntual debido al cambio de un nucleótido púrico por uno pirimidínico, o viceversa.

ANEXO A

Determinación del volumen final de dilución del DNA genómico extraído de sangre periférica.

Dentro de los ensayos de estandarización del protocolo de extracción de DNA genómico de sangre periférica (sección 2.4.2.1) se realizó un análisis para determinar el volumen de agua de dilución y alcanzar una concentración adecuada de DNA en los extractos. Se determinó que la concentración más adecuada es 20 ng/ μ l, ya que de esta manera se podrían aplicar volúmenes más de trabajo de más fácil manipulación al ensamblar el *mix* de PCR. Además, se observaría luego una mayor eficiencia en el proceso de dilución completa del DNA genómico al llevarlo a esta concentración.

El ensayo consistió en realizar diluciones seriadas a los extractos de DNA provenientes de muestras tomadas al azar. Estas diluciones fueron sometidas posteriormente a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El volumen inicial con el que se diluyó el DNA luego del proceso de extracción fue 50 μ l. Esta dilución inicial de DNA total fue denominada dilución T. A partir de T se realizaron diluciones DNA:Agua correspondientes a las relaciones 2:1, 1:1, 1:2 y 1:4. Todas estas soluciones fueron ajustadas a un volumen de 10 μ l. También se utilizó un control negativo de agua destilada (C). Las soluciones T, C y las diluciones de T fueron mezcladas con 1 μ l de Loading Buffer 10X (Invitrogen), y todo el volumen fue cargado en los posillos del gel de agarosa al 0.8%. Paralelamente se cargaron 4 μ l del marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen) con el fin de realizar una cuantificación aproximada de las distintas diluciones. Se sometió finalmente a electroforesis durante 1 hora a 100V.

Los resultados de este ensayo se ilustran en la figura A1.1. Se pudo observar un alto rendimiento de DNA genómico diluido en 50 μ l de agua (T). Al observar la dilución 1:1 se puede observar que corresponde a una concentración aproximada de 25 ng/ μ l según el marcador de peso molecular. Por este motivo se estandarizó la técnica con una dilución final del DNA extraído en 100 μ l de agua destilada. Análisis posteriores por medio de

espectrofotometría ayudaron a confirmar estos resultados obteniéndose concentraciones entre los 18 y 24 ng/μl.

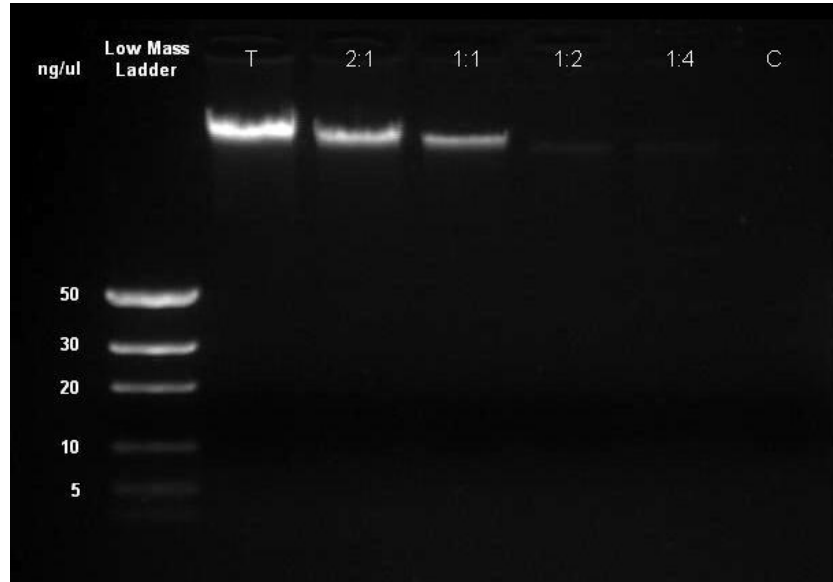


Figura A1. Electroforesis de las muestras control de DNA proveniente de sangre periférica. En el primer carril se muestra el marcador de cuantificación (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen); en el segundo carril (T) se muestra la solución de DNA total; y en los carriles subsiguientes se ubican las diferentes diluciones de T. En el carril final (C) se ubica un control negativo.

ANEXO B

Protocolo de preparación de solución *buffer* Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X

- Preparar 100 ml de EDTA 0.5M llevando a pH 8.5 mediante perlas de NaOH.
- Colocar la solución en un balón de 1000 ml de capacidad y adicionar aproximadamente 500 ml de agua destilada estéril.
- Adicionar a la mezcla 242 g de Tris base y 57.1 ml de ácido acético.
- Llevar la solución a un volumen final de 1 litro adicionando agua destilada estéril.
- Agitar hasta homogenizar totalmente la solución.

ANEXO C

Cálculo de la concentración de DNA mediante el fluorómetro Qubit™

Como se mencionó en la sección 2.4.2.2, se realizó una dilución 1:199 de las muestras de DNA en un volumen final de 200 μ l. Para calcular la concentración final en la muestra fue necesario utilizar la siguiente fórmula:

$$C = Qf \cdot \frac{200 \text{ ml}}{x}$$

donde Qf es la lectura dada por el fluorómetro, x son los microlitros de muestra adicionados y C es la concentración en el tubo de muestra en ng/ml. En la fórmula, el cociente entre los 200 μ l y los microlitros de muestra adicionados (x) representa el factor de dilución. Debido a que se adicionó 1 μ l de muestra el factor de dilución fue 200. Por lo tanto, para este ensayo el cálculo de la concentración de DNA de las muestras control se resumió en la siguiente fórmula:

$$C = Qf \cdot 200$$

Para convertir la concentración de C en ng/ μ l únicamente se dividió para 1000.

ANEXO D

Cálculo del volumen de dilución para la preparación de *stocks* de *primers*

Los *primers* adquiridos para el presente trabajo fueron oligonucleótidos liofilizados que debieron ser resuspendidos en un volumen de agua destilada (grado biología molecular) determinado por la cantidad de *primer* presente en el tubo de liofilizado. La magnitud de dicha cantidad de *primer* es siempre indicada en una tabla de especificaciones ofrecida por la casa comercial en la cual se sintetizó el oligonucleótido. La casa comercial Invitrogen especifica la cantidad de *primer* en unidades nanomolares y respecto a la magnitud indicada debe diluirse hasta la concentración final requerida. La concentración más recomendada para la preparación del *stock* de *primers* es 100 μM . Con el fin de encontrar el volumen de agua en μl necesario para alcanzar esta concentración se requiere realizar un cálculo por medio de factores de conversión estequiométricos. Este proceso se detalla a continuación:

$$x \text{ nmoles} \cdot \left| \frac{1 \text{ mmol}}{1000 \text{ nmoles}} \right| \cdot \left| \frac{1 \text{ litro}}{100 \text{ mmol}} \right| \cdot \left| \frac{1000000 \text{ nl}}{1 \text{ litro}} \right|$$

Mediante este factor de conversión es posible deducir que para hallar el volumen de agua (en μl) requerido para alcanzar una concentración de *primer* de 100 μM , es necesario multiplicar por 10 la cantidad de nanomoles de *primer* especificadas. Con el fin de reducir errores por “pipeteo” y manejar volúmenes mayores, los *stocks* de *primers* fueron llevados a una concentración de 10 μM a partir del *stock* primario de concentración 100 μM .

ANEXO E

Determinación de las condiciones óptimas de amplificación para los *primers* A y S utilizados en la evaluación de BIPASA tradicional.

Se realizó un ensayo preliminar para determinar la temperatura óptima de *annealing* para la amplificación de los productos PS y AQ generados por los *primers* A y S en la técnica BIPASA tradicional. Para este fin se realizaron amplificaciones paralelas utilizando los pares de *primers* P-S y A-Q por separado. La concentración de los *primers* fue fijada en 0.2 μ M. La concentración de los demás componentes fue igual al descrito en la Tabla 2.1. Se utilizó el mismo programa de amplificación descrito en la Tabla 2.2, exceptuando que se realizó un gradiente de *Ta* de 59, 61 y 63°C.

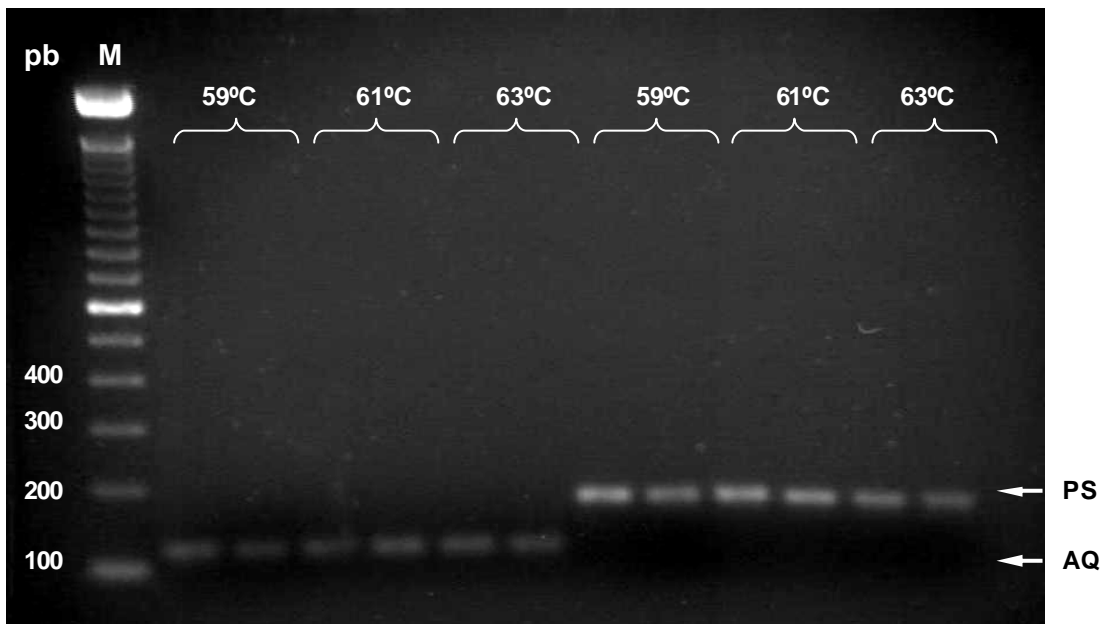


Figura A2. Análisis electroforético del ensayo para determinar la *Ta* óptima de los *primers* internos A y S. Se indican con una flecha las posiciones de los amplicones PS y AQ. M=marcador de peso molecular; pb= número de pares de bases.

Los resultados observados en la Figura A2 demuestran que la *Ta* óptima se encuentra en 61°C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por medio del programa FastPCR4.0.