

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO PRO12ALA DE PPARG2 MEDIANTE
ANÁLISIS DE CURVAS DE DISOCIACIÓN DE AMPLICONES DE PCR EN
TIEMPO REAL

TRABAJO DE TITULACIÓN MODALIDAD:
TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE GRADO
LICENCIADO EN BIOLÓGÍA
P R E S E N T A
VIVIANA CAROLINA NÚÑEZ VALDEZ
Las Agujas, Zapopan, Jal., Enero de 2011



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de carrera de Licenciado en Biología

C. Viviana Carolina Núñez Valdez

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **“IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO PRO12ALA DE PPARG2 MEDIANTE ANÁLISIS DE CURVAS DE DISOCIACIÓN DE AMPLICONES DE PCR EN TIEMPO REAL.”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la **Dra. Blanca Estela Bastidas Ramírez**.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”,
“2009, Año del Bicentenario de Charles Darwin”
Las Agujas, Zapopan, Jal., 15 de octubre de 2009.

COMITÉ DE
TITULACIÓN




DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


BIOL. MARGARITO MORA NÚÑEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

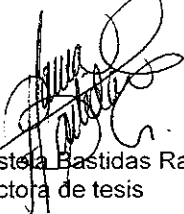
Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS, con el título: **"IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO PRO12ALA DE PPARG2 MEDIANTE ANÁLISIS DE CURVAS DE DISOCIACIÓN DE AMPLICONES DE PCR EN TIEMPO REAL"** que realizó la pasante **VIVIANA CAROLINA NÚÑEZ VALDEZ** con número de código **300350966** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

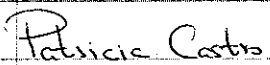

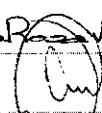
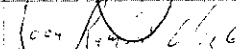
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

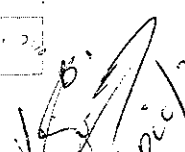
Atentamente

Zapopan., Jal. 07 de diciembre del 2010



Dra. Blanca Estela Bastidas Ramírez
 Directora de tesis

| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado | Fecha de aprobación |
|--|---|---------------------|
| Patricia Castro Félix |  | Dic-08-2010 |
| Alma Rosa Villalobos |  | Dic 8, 2010 |
| Arturo Orozco Barocio |  | 08/Dic/2010 |
| Supl. Juan Ramón Gonzáles García |  | 27- dic. 2010 |



| | |
|---|-------------|
| INDICE | I |
| ÍNDICE DE CUADROS | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | IV |
| ABREVIATURAS | V |
| AGRADECIMIENTOS | VII |
| DEDICATORIAS | VIII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.- ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1.- Receptor Activador Proliferador de Peroxisomas γ . | 3 |
| 1.2.-Polimorfismos. | 6 |
| 1.3.- Estructura del polimorfismo Pro12Ala de la isoforma de PPAR γ 2. | 6 |
| 1.3.1.- Prevalencia del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2. | 7 |
| 1.4.- Técnicas moleculares empleadas para la identificación de polimorfismos. | 8 |
| 1.4.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 8 |
| 1.4.2.- PCR-RFLP's | 9 |
| 1.4.3.- PCR _{TR} . | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 2.- PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA | 17 |
| 3- JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 4.- HIPÓTESIS | 19 |
| 5.- OBEJTIVOS | |
| 5.1.- Objetivo general | 20 |
| 5.2.- Objetivos particulares | |
| 6.- METODOLOGÍA | 21 |
| 6.1.- Obtención de la muestra | 21 |
| 6.2.- Extracción de DNAg | 21 |
| 6.3.- Cuantificación de DNAg | 22 |
| 6.4.- Electroforesis de DNAg | 23 |
| 6.5 .- PCR-RFLP'S | 23 |
| 6.5.1.- PCR | 23 |
| 6.5.2.- RFLP's; digestión con la enzima de restricción <i>MspI</i> . | 26 |
| 6.6 .- PCR _{TR} -HRM | 27 |
| 7.- RESULTADOS | 30 |
| 8.- DISCUSIÓN | 42 |
| 9.- CONCLUSIONES | 44 |
| 10.- BIBLIOGRAFIA | 45 |

INDICE DE CUADROS

| No. | DESCRIPCIÓN | Pág. |
|-----|---|------|
| 1 | Prevalencia del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 en población general procedente de diversas regiones del mundo. | 16 |
| 2 | Clases de SNP's que pueden presentarse en cualquier secuencia génica en relación con su temperatura de fusión. | 20 |
| 3 | Condiciones estandarizadas programadas para PCR convencional para la amplificación de la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2. | 29 |
| 4 | Mezcla de la reacción para PCR convencional para la amplificación de la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2 con los iniciadores correspondientes para flanquear un fragmento de 76 pb que contiene la región polimórfica en estudio. | 29 |
| 5 | Oligonucleótidos utilizados en PCR para amplificar la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2 y obtener un fragmento de 76 pb. | 30 |
| 6 | Mezcla de reacción para la digestión con la enzima <i>Msp</i> I para la identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 | 31 |
| 7 | Mezcla de reacción de PCR _{TR} -HRM para la amplificación del fragmento polimórfico Pro12Ala de PPAR γ 2. | 32 |
| 8 | Condiciones estandarizadas para PCR _{TR} -HRM para la identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2. | 33 |
| 9 | Oligonucleótidos utilizados para PCR _{TR} -HRM de la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2. | 33 |
| 10 | Costos promedios de los reactivos utilizados para llevar a cabo una reacción por PCR-RFLP's y por PCR _{TR} -HRM. | 47 |
| 11 | Tiempos comparativos para llevar a cabo la genotipificación de cada muestra por ambas metodologías. | 47 |
| 12 | Índice Kappa, valoración de concordancia de los resultados obtenidos por ambas metodologías. | 48 |

INDICE DE FIGURAS

| No. | DESCRIPCIÓN | Pág. |
|-----|--|------|
| 1 | Estructura del gen PPARy2. | 17 |
| 2 | Expresión y funciones del gen PPARy en diversos órganos y tejidos. | 17 |
| 3 | Localización cromosómica del gen PPARy. | 18 |
| 4 | Distribución de los agentes intercalantes en DNA de doble cadena. | 19 |
| 5 | Fundamentos de la metodología HRM. | 20 |
| 6 | Curvas de disociación de los genotipos diferentes obtenidos por HRM (termociclador Rotor-Gene 6000) | 21 |
| 7 | Secuencia del fragmento analizado por PCR _{TR} -HRM en el gen PPARy2 de 113 pb. | 34 |
| 8 | Gel de agarosa al 0.8% de electroforesis del DNAg extraído por el método de perlas magnéticas de Gene-Catcher. | 38 |
| 9 | Gel de agarosa al 3% de electroforesis de los productos de PCR de PPARy2 de 76 pb. | 39 |
| 10 | Gel de agarosa al 3% de electroforesis de los productos de PCR _{TR} -HRM de PPARy2113 pb. | 40 |
| 11 | Gel de agarosa al 3% representativo de los productos esperados obtenidos de la digestión enzimática con la enzima MspI del PPARy2. | 41 |
| 12 | Normalización de las curvas de disociación por PCR _{TR} -HRM de las muestras. | 42 |
| 13 | Representación de las curvas de disociación de los genotipos. | 43 |
| 14 | Los tres genotipos obtenidos por PCR-RFLP s. | 44 |
| 15 | Representación de las curvas de disociación de las muestras de estudio. | 45 |
| 16 | Resultados obtenidos por medio del HRM de forma automática por el software Rotor-Gene. | 46 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|---|
| A | Adenina |
| ADDE | agua destilada des ionizada y estéril |
| C | Citosina |
| C1 | Concentración 1 |
| C2 | Concentración 2 |
| dNTP's | desoxirribonucleotidos trifosfatados |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo2 |
| DNAc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| DNAg | Ácido desoxirribonucleico genómico |
| EtBr | Bromuro de etidio |
| EDTA | ácido etilem-diamino-tetracético |
| gr | Gramos |
| G | Guanina |
| h | Horas |
| HRM | high resolution melting point |
| K | Kappa |
| Kb | Kilo bases |
| nm | Nanómetros |
| ng | Nanogrmos |
| nM | Nanomolar |
| min | Minutos |
| mV | Milivolts |
| mL | Militros |
| mM | Milimolar |
| M | Concentración molar |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| <i>MspI</i> | <i>moraxella species I</i> |
| M25 | Marcador en escalera de 25 pares de bases |
| pb | Pares de bases |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| RFLP's | restriction fragment length polymorphism |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| PPARY | receptor activado proliferador de peroxisomas |
| RXN | Reacción |
| SNP's | single nucleotide polymorphism |
| T | Timina |
| Tr | Tiempo real |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| Tm | Temperatura de fusión |
| TBE | Amortiguador Tris-base-ácido bórico-EDTA |
| U | Unidad |
| µL | micro litros |

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| UV | Ultravioleta |
| U/ μL | Unidades por microlitro |
| V1 | Volumen 1 |
| V2 | Volumen 2 |
| $^{\circ}$C | Grados centígrados |
| μg | Microgramos |
| μM | micro molar |

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** por darme el don de la vida que a través de ella pude realizar muchas cosas para el beneficio del prójimo.

Agradezco a la **Universidad e Guadalajara** por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente dentro de esta casa máxima de estudio.

Agradezco a cada uno de mis maestros que me impulsaron a dar cada día lo mejor de mí en esta bellísima carrera que es Biología; en especial al **Dr. Arturo Orozco** por su apoyo constante y a la **Dra. Mónica Riojas** por haberme enseñado que la constancia y la dedicación son herramientas fundamentales en todo lo que queremos hacer. Agradezco a mis sinodales por su enseñanza en este proceso.

Agradezco a cada uno de mis compañeros amigos **Rafa, Marcelo, Octavio** con los que camine y aprendimos juntos de la naturaleza y de la vida que fue maravilloso; en especial a **Gerardo** por su apoyo incondicional en cada momento, **Jesús** por su gran amistad, a **Carlos** por siempre estar allí cuando lo necesitaba y a mi amiga **Diana** por ser cómplice de innumerables momentos que vivimos juntas.

Gracias a la **Dra. Blanca Estela Bastidas** por haberme brindado la oportunidad de haberme formado profesionalmente dentro del **Instituto de Enfermedades Crónico Degenerativas**, donde viví y adquirí los conocimientos que hoy me hacen alguien más competente.

Sin lugar a dudas gracias a todos mis amigos que me ayudaron en todo instante a **Alma** por su gran alma y disposición para ayudar a todos sin recibir nada a cambio, a **Ana** por sus conocimientos que me transmitió, a **Elizabeth** y **Daniela** por su apoyo al principio de este proyecto, a **Yadira** por su amistad incondicional y a mi amiga **Sofía** por su gran apoyo al final de este camino donde seguimos aprendiendo juntas.

DEDICATORIAS

Principalmente se lo dedico a **Dios** que es mi fortaleza.

Dedico este trabajo a toda mi familia que siempre ha confiado en mí y que siempre me apoyaron en todo momento en mi carrera. Especialmente lo dedico a mis padres **Angélica** y **José Luis** que me enseñaron la fortaleza, el respeto y la dedicación en todo lo que hago. Gracias madre por brindarme en cada momento que lo necesite tu ayuda que Dios te guarde siempre. A mis abuelos **José** y **María** por sus sabiduría que siempre me transmiten.

De una forma en especial también lo dedico a mis hermanos a **Karina**, **Yadira**, **Cinthia** y **Eduardo** por los momentos compartidos llenos de alegría y su apoyo en cada momento. En especial a mis tíos **Adriana** y **Eduardo** por ser mis segundos padres. Se lo dedico también al nuevo angelito que llego a nuestras vidas **Alexa Maílen**.

Dedico este trabajo a la persona más especial en mi vida y que con su llegada y nuestro gran amor nos hemos fortalecido cada día; a ti **José Luis Galván**, tu amor una bendición.

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”

Filipense 4:13

INTRODUCCIÓN

El avance del conocimiento del genoma humano ha tenido una gran implicación en el desarrollo de nuevos métodos moleculares sensibles y específicos que nos permiten investigar las bases genéticas de las enfermedades.

El genoma humano está constituido básicamente por ácido desoxirribonucleico (DNA) e histonas (Spalvieri y Rotenberg, 2004). El DNA a su vez es un polímero de nucleótidos (constituidos por base nitrogenada, desoxirribosa y fosfato), con una secuencia definida que determina las características fenotípicas de un individuo. Existen dentro del genoma variaciones en la secuencia de nucleótidos, llamados POLIMORFISMOS. Un polimorfismo se define como una variación en la secuencia de bases del DNA, que se presenta con una frecuencia de por lo menos 1% en la población general, y que no es la causa directa de ninguna patología, sino que actualmente se han establecido solamente asociaciones con algunas de ellas (Tailon et al., 1999). Los cambios más frecuentes se presentan en un solo nucleótido, por lo cual se les llama SNP's (del inglés *single nucleotide polymorphisms*). Existen múltiples polimorfismos asociados con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas, como diabetes mellitus tipo 2, resistencia a la insulina y obesidad. Por tal motivo, actualmente, el estudio de los polimorfismos constituye un campo de investigación muy importante.

Se han realizado algunos estudios de identificación y asociación de varios polimorfismos con algunos estados patológicos en diversas poblaciones. La determinación de la prevalencia de los diferentes polimorfismos en individuos de una población es útil para tomar medidas epidemiológicas, profundizar en el conocimiento de la estructura génica y las respuestas farmacológicas de las poblaciones y entender claramente la participación biológica de cada uno de ellos (Weimin, 2009; Stumvoll y Häring, 2002; Florez, 2007; Costa et al., 2009).

Existen diversos métodos para la detección de polimorfismos. La secuenciación y algunas modalidades del PCR son los métodos más comúnmente utilizados.

PPAR γ 2 es un receptor que modula la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de lípidos. El polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 se ha asociado con resistencia a la insulina y con otras patologías. Este polimorfismo se ha estudiado principalmente mediante el método PCR-RFLP's (Forga, 2004; Meirhaeghe, 1998; Soriguer et al., 2006; García, 2009), el cual consiste en la amplificación del fragmento polimórfico mediante PCR, seguido de digestión con enzimas de restricción. Es un método que resulta costoso y que requiere de varias horas para la obtención de resultados.

El avance de la tecnología ha hecho posible la implementación del análisis de alta resolución de curvas de disociación (HRM, del inglés *High Resolution Melting Point*) a partir de la amplificación por PCR en tiempo real (Wittwer et al., 2003; Gudrun et al., 2007), mediante el método llamado PCR_{TR}-HRM. El método PCR_{TR}-HRM constituye una tecnología de punta que puede aplicarse para diversos fines, tales como la identificación de polimorfismos génicos, identificación de genes de resistencia bacterianos, diagnóstico de enfermedades genéticas y caracterización genotípica de virus (Kristensen y Dobrovic, 2008; Tacaño, 2008; Slinger, 2007; Krenkova, 2008; Garritano et al., 2009). La identificación de polimorfismos a través de esta nueva metodología no requiere el empleo de sondas, digestión enzimática de restricción, ni llevar a cabo electroforesis y permite el análisis de un gran número de muestras a la vez. La poca manipulación de la muestra implica una disminución del riesgo de contaminación y del tiempo requerido para la obtención de resultados. Por lo tanto, en este trabajo se demuestra la utilidad del PCR_{TR}-HRM en la detección del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2.

1. ANTECEDENTES

1.1 Receptor Activado Proliferador de Peroxisomas γ

El Receptor Activado Proliferador de Peroxisomas γ (PPAR γ) es un receptor que tiene la capacidad de acoplarse con una gran diversidad de moléculas induciendo modificaciones estructurales. El gen PPAR γ se expresa en múltiples tejidos donde su principal función es modular la transcripción de varios genes presentándose como un amplificador de la red génica (Zarate et al., 2005).

El gen PPAR γ pertenece a la superfamilia de receptores hormonales nucleares y funciona como factor transcripcional de diversos genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, lípidos, angiogénesis e inflamación (Costa et al., 2009; Soriquer et al., 2006). Es una proteína conformada por 505 aminoácidos, con un dominio independiente de unión al ligando en su extremo amino terminal, con un sitio de unión al DNA y un sitio de unión ligando (Stumvoll y Härring, 2002) (Fig.1). Es expresado esencialmente en músculo esquelético, hígado, intestino delgado, células endoteliales vasculares, macrófagos y tejido adiposo blanco y en menor cantidad en el tejido café donde controla la diferenciación de adipositos (Cruz, et al., 2005; Ferré, 2004; Stumvoll y Härring, 2002; Balasubramanyam y Mohan, 2000) (Fig. 2). Tiene una acción sobre el metabolismo de lipoproteínas y la oxidación de ácidos grasos, genera un efecto inhibitor benéfico sobre procesos inflamatorios de la pared vascular; es capaz de reducir la producción de la proteína C reactiva, el factor de necrosis tumoral alfa, la interleucina 6 y las moléculas de adhesión vascular (Meirhaeghe et al., 1998).

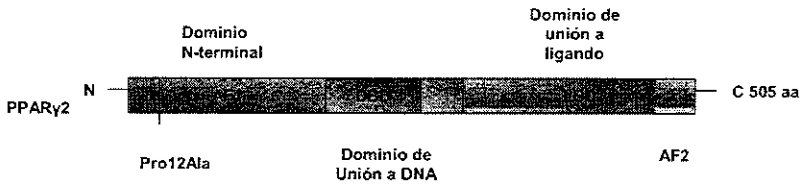


Figura 1. Estructura de PPAR γ 2.

AF1 función de activación transcripcional independiente, DBD dominio conservado de unión a DNA, LBD dominio de unión a ligando, AF2 dominio de activación transcripcional conservada dependiente de ligando (modificado de Stumvoll y Härring, 2002).

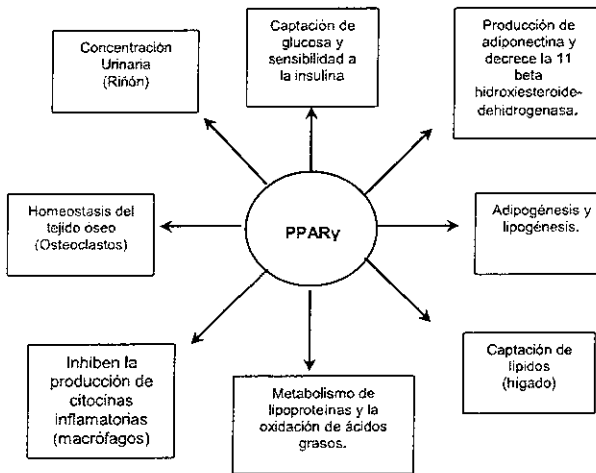


Figura 2. Expresión y funciones del gen PPAR γ en diversos órganos y tejidos (tomado de Weimin, 2009).

El gen PPAR γ se localiza en el cromosoma 3 en el brazo corto en la banda 25 con una expansión de 150 kb conformado por 9 exones (A1, A2, B y 1-6) (Cock, 2004; Stumvoll & Härring 2002; Weimin, 2009) (Fig. 3). El gen PPAR γ presenta tres isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3, resultantes del proceso de corte y empalme alternativo. PPAR γ 1 tiene el exón A1 Y A2; PPAR γ 2 el exón B y PPAR γ 3 el exón A2 (Ferré, 2004; Weimin, 2009).

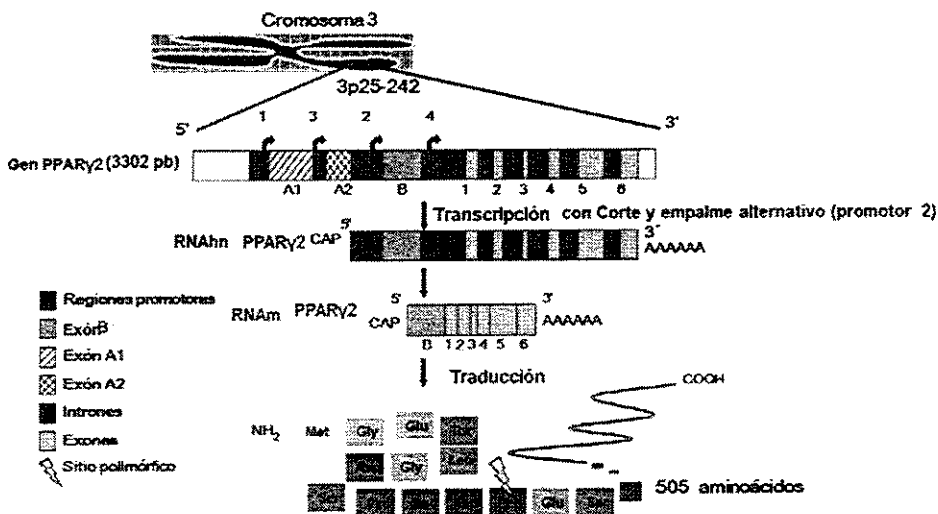


Figura 3. Localización cromosómica del gen PPAR γ 2.

El polimorfismo Pro12Ala consiste en la sustitución de prolina por alanina en el codón 12 del exón B (Weimin, 2009; Kolhmainen et al., 2003).

1.2 Polimorfismos

El genoma humano presenta alrededor de 3.2 billones de pares de bases y ahora se sabe que todos los humanos compartimos cerca de un 99% de la información genómica, por lo que existe una pequeña variabilidad (0.01%) que es suficiente para que cada individuo posea una huella genómica individual y sea fenotípicamente diferente de los demás (Spalvieri y Rotenberg, 2004).

Esta diversidad implica variaciones en la secuencia del genoma originadas por errores de replicación y reparación del DNA. Hay diferentes tipos de variaciones; pero alrededor del 90% consisten fundamentalmente en sustituciones de un nucleótido por otro y se conocen como polimorfismos de un solo nucleótidos o SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphisms*) (Tailon et al., 1999).

Un polimorfismo se define como una variación génica que se presenta con una frecuencia de al menos 1% en la población general y puede estar asociada o no a una patología, sin ser la causa de la misma (Wang et al., 1998). Por lo tanto, algunos SNPs pueden conferir cierta susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades, o determinar la progresión de la enfermedad e incluso la respuesta a fármacos (Kulkarni et al., 2008).

Actualmente, se han detectado cerca de 5 millones de SNPs en el genoma humano; algunos autores han reportado la participación de algunos de ellos en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas. Por lo tanto, la caracterización fisiológica y molecular de los polimorfismos es útil para entender su participación biológica y tomar medidas preventivas en una población (Spalvieri y Rotenberg, 2004).

1.3 Estructura del polimorfismo Pro12Ala de la isoforma de PPAR γ 2

La isoforma PPAR γ 2 presenta el polimorfismo Pro12Ala, el cual es de importancia clínica. El polimorfismo consiste en la sustitución de prolina por alanina en el codón 12 del exón B, que induce un cambio conformacional en la proteína. Esta variación hace que disminuya la actividad del receptor en elementos promotores (Stumvoll & Härring, 2002; Yen et al., 1997) (Fig. 3).

Este polimorfismo se ha asociado con el desarrollo de algunas enfermedades crónicas degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, entre otras (Costa et al., 2009; Cruz et al., 2005; Andraulionyte et al., 2006; Franks et al., 2007; Ludovico et al., 2007; Ghossaini et al., 2005). Por lo que su caracterización fisiológica y molecular en estudios de poblaciones ha sido de gran importancia en el diseño de fármacos y en la comprensión del desarrollo de estas entidades nosológicas.

1.3.1 Prevalencia del Polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2

El polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 se ha determinado en diversos grupos étnicos. La frecuencia en caucásicos es de un 25 %, Mexicanos Americanos 10%, West Samoans 8%, Africanos Americanos 4%, Japoneses 4% y una frecuencia de 1% en Chinos (Gouda et al., 2010; Weimin, 2009; Franks, 2007) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Prevalencia del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 en población general procedente de diversas regiones del mundo.

| Grupos étnicos | Prevalencia % Pro12Ala PPAR γ 2 | Referencia |
|------------------------|---|--|
| Caucásicos | 25 | Gouda et al. 2010 Stumvoll & Häring.,2002 |
| Mexicanos Americanos | 10 | Weimin., 2009 |
| West Samoans | 8 | Weimin., 2009 |
| Africanos - Americanos | 4 | Franks et al., 2007 Weimin., 2009 |
| Japoneses | 4 | Stumvoll & Häring.,2002 |
| Chinos | 1 | Weimin., 2009 |

1.4 Técnicas moleculares empleadas para la identificación de polimorfismos.

Existen varias estrategias que se aplican para la identificación de polimorfismos, algunas de ellas son: PCR, PCR-RFLP's, PCR_{TR} y PCR_{TR}-HRM.

1.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El desarrollo de la PCR en 1985 por Karry Mullis es una herramienta fundamental utilizada en biología molecular que nos permite la amplificación selectiva "*in vitro*" de un pequeño fragmento de DNA. Una reacción de PCR típica se realiza utilizando una mezcla que contiene nucleótidos, *Taq*-polimerasa, la muestra de DNA en estudio y generalmente un par de iniciadores diseñados para flanquear una secuencia específica de DNA. Esta mezcla se coloca en un termociclador, en el cual se programa la variación de temperaturas adecuada para la amplificación (Giovambattista et al., 2001; Mullis, 1987).

La PCR se lleva a cabo en tres etapas (Sambrook y Russel, (c) 2001), las cuales se repiten de 30 a 40 veces para generar copias de la molécula molde:

- a) **Desnaturalización.** Los puentes de hidrógeno que unen la doble hélice de DNA son escindidos mediante calor, sometiendo el tubo de reacción a una temperatura de 94-95°C, la cual se encuentra por encima de su punto de fusión, de tal manera que se generan dos hebras sencillas de DNA.
- b) **Hibridación o alineación.** La temperatura se baja lo suficientemente para que los iniciadores sean alineados a su secuencia blanco en el DNA, por complementariedad de bases. La temperatura varía entre 30°C y 65°C, dependiendo de la secuencia nucleotídica.
- c) **Elongación.** La *Taq* polimerasa sintetiza las nuevas cadenas de DNA, para lo cual se requiere una temperatura de 72°C.

TESIS/CUCBA

1.4.2 PCR-RFLP's

Este es un método de genotipificación basado en la longitud de los fragmentos de restricción (*RFLP*, de las siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) generados por la digestión enzimática con enzimas de restricción. Fue implementado por A. Jeffreys en 1983 en la Universidad de Leicester (Giovambattista., 2001).

La metodología PCR-RFLP's consiste en un conjunto de técnicas empleadas para la identificación de polimorfismos que afectan una diana de restricción. Esta metodología se lleva a cabo en varias etapas. Primero se realiza una PCR convencional, enseguida una electroforesis para visualizar el fragmento amplificado, después la digestión enzimática de dicho fragmento, con enzimas de restricción, y finalmente una electroforesis para la visualización de los productos de restricción de donde obtendremos los genotipos correspondientes a cada muestra (Frederiksen, et al., 2002; García, et al., 2009; Forga, 2003).

La electroforesis es una metodología que consiste en separar, identificar y purificar biomoléculas cargadas eléctricamente a través de su migración en un campo eléctrico. La biomolécula de DNA al presentar carga negativa migra hacia el polo positivo, lo que posibilita la separación de moléculas de DNA que difieren en su tamaño (Sambrook y Russel (a) 2001).

Las enzimas de restricción son proteínas que se encuentran presentes en bacterias, las cuales tienen la capacidad de cortar moléculas de DNA de doble cadena de manera específica mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster. Las enzimas de restricción en general reconocen secuencias de DNA palíndromas, las cuales son secuencias de nucleótidos que se leen igual de 5' a 3' que de 3' a 5'. Cortan de manera específica en su secuencia diana. Por ejemplo, la enzima de restricción *MspI*, aislada a partir de la bacteria *Moraxella species*, reconoce la secuencia palindrómica 5'CCGG3'.

Una vez realizada la digestión enzimática, se obtiene un patrón de restricción específico para cada genotipo, el cual es identificado mediante electroforesis y un marcador de peso molecular (Giovambattista et al., 2001).

1.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCR_{TR})

La PCR_{TR} es una herramienta que fundamentalmente se utiliza para el estudio de la expresión de genes a través de la cuantificación de DNA complementario (DNAc), proveniente del ácido ribonucleico (RNA) en estudio. Sin embargo, esta metodología también es útil para la detección de polimorfismos. La importancia de la utilización de esta metodología radica principalmente en la rapidez y exactitud con que se detectan los cambios en la expresión génica resultantes de fenómenos biológicos (Lejona., 2006).

En la PCR_{TR} se lleva a cabo la amplificación y la detección simultánea dentro del mismo tubo de reacción cerrado, sin la necesidad de ninguna acción posterior. Otro factor importante es la utilización de fluorescencia que permite medir la amplificación del DNA sintetizado en cada momento de la reacción en un tiempo real.

Los termocicladores utilizados en PCR_{TR} llevan a cabo la detección mediante un lector de fluorescencia diseñado para medir en cualquier etapa de la reacción la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos de reacción. Los diferentes tipos de sistemas para la detección por fluorescencia empleados en PCR_{TR} son: colorantes intercalantes, sondas específicas marcadas con fluorocromos (Higuchi, 1993), análisis de curvas de disociación.

1.4.3.1. Agentes intercalantes

La utilización de agentes o colorantes intercalantes aumentan la emisión de fluorescencia cuando se encuentran unidos al DNA de doble cadena, la cual es proporcional a la cantidad de DNA sintetizado. De tal manera, que estos agentes nos permiten conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Wong, 2005).

Los colorantes intercalantes presentan baja toxicidad y se han implementado colorantes de segunda generación que se intercalan en la molécula de DNA de manera baja el más empleado es SYBR Green I y los colorantes de tercera generación como el SYTO9, LC Green, EvaGreen, que se intercalan con una gran saturación en la molécula del DNA (Fig.4). La utilización de agentes intercalantes optimiza las condiciones de la reacción y es un método relativamente barato con respecto a la utilización de sondas específicas (Wittwer et al., 2003; Liew et al., 2004; Gundry et al., 2003). Sin embargo, la utilización de colorantes presenta como desventaja su baja especificidad, ya que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros que son muy frecuentes en PCR. Por tanto, para mejorar la especificidad se deben generar condiciones óptimas y un buen diseño de iniciadores con la finalidad de disminuir el riesgo de formación de dímeros (Lejona., 2006).

1.4.3.2. Sondas de hibridación específica

Las sondas de hibridación están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Por lo que se lleva a cabo mediante la transferencia de energía fluorescente a través de resonancia.

Las sondas más utilizadas en PCR_{TR} para la identificación de polimorfismos son las *sondas Taqman*, las cuales son oligonucleótidos de unión específica al DNA marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser estimulado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador (Lejona., 2006). Esta metodología puede diferenciar y cuantificar cantidades muy pequeñas de DNA en forma específica. La rapidez, la utilización de un sistema cerrado, la determinación de mutaciones puntuales son algunas de las ventajas que presenta la aplicabilidad de PCR_{TR}; sin embargo, el costo alto en ocasiones limita su uso.

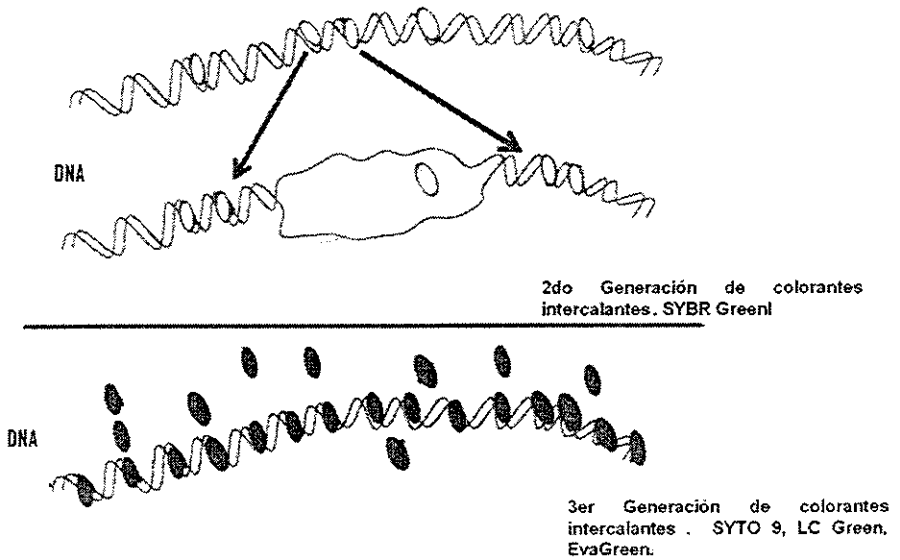


Figura 4. Distribución de los agentes intercalantes en DNA de doble cadena.

Los colorantes de 2da generación se intercalan a la molécula de DNA con menor saturación que los colorantes de 3ra generación, lo cual permite que éstos últimos sean utilizados en PCR_{TR}-HRM para la identificación de polimorfismos.

1.4.3.3. Análisis de Curvas de Disociación de amplicones de PCR_{TR} (PCR_{TR}-HRM)

El desarrollo tecnológico ha permitido la implementación de nuevas estrategias para la detección de diferencias en la estructura primaria de secuencias de DNA que pueden adaptarse a la identificación de polimorfismos.

El PCR_{TR}-HRM se utiliza para la caracterización de muestras de DNA de acuerdo con su comportamiento de disociación durante la transición del DNA de doble cadena a DNA de cadena sencilla, al aumentar la temperatura de los amplicones. El PCR_{TR}-HRM utiliza un instrumento que recoge señales fluorescentes con mayor precisión óptica y térmica que los detectores convencionales, posibilitando así su aplicación en la detección de polimorfismos (Wittwer et al., 2003; Gudrun et al., 2007; Kristensen y Dobrovic, 2008; Gundrun., 2004) (Fig.5).

Esta nueva metodología puede ser utilizada para analizar prácticamente todos los tipos de variantes de secuencias de DNA, incluso SNPs. Por lo que representa un método en la detección de genotipos con una gran sensibilidad de análisis. Los SNP's se resumen en cuatro clases (Cuadro 2). El genotipo más difícil de detectar es A/T; sin embargo, la alta resolución del equipo termociclador Rotor-Gene 6000 permite la detección de este tipo de cambios (Erali et al., 2008).

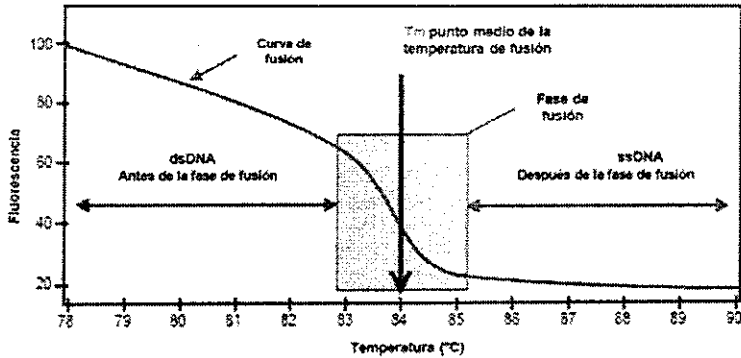


Figura 5. Fundamentos de la metodología HRM.

La curva verde representa la curva de disociación con una alta fluorescencia antes de la etapa de fusión; en la fase basal o punto de fusión (flecha azul). La fluorescencia disminuye a medida que la molécula de doble cadena de DNA se disocia convirtiéndose en cadena sencilla. El punto medio de la fase de fusión es donde la fluorescencia es mayor al mismo tiempo que define la temperatura de fusión (Tm) de la molécula de DNA.

Cuadro 2. Clases de SNP's que pueden presentarse en cualquier secuencia génica en relación con su temperatura de fusión.

| Clases de SNP | Cambio de base | Tm |
|---------------|----------------|----------------------------------|
| 1 | C/T G/A | Mayor >0.5 C ↓ Menor <0.2C |
| 2 | C/T G/A | |
| 3 | C/A | |
| 4 | A/T | |

El análisis de polimorfismos está basado en las diferencias del punto de fusión entre amplicones correspondientes a los diversos genotipos. El amplicón de cada genotipo presenta una temperatura de fusión específica; es decir, una curva de disociación diferente en contraste a un heterocigoto o un polimórfico. Por lo tanto la temperatura y la forma de la curva de disociación es la manera en que el equipo discrimina un genotipo de otro (Fig.6).

La identificación de polimorfismos por PCR_{TR}-HRM no requiere de digestión enzimática, ni de electroforesis, ni del uso de sondas. PCR_{TR}-HRM constituye una tecnología de punta que permite la identificación de polimorfismos génicos de un gran número de muestras a la vez, lo cual abate significativamente los costos y optimiza el tiempo de análisis (Taylor, 2009).

PCR_{TR}-HRM consiste en la realización de PCR_{TR} utilizando colorantes altamente intercalantes en DNA de doble cadena. El instrumento (Rotor Gene 6000) con ayuda del software mide la emisión de la fluorescencia conforme aumenta la temperatura y se desnaturaliza el amplicon obtenido (Wittwer et al., 2003; Gudrun et al., 2007; Zhou et al., 2004).

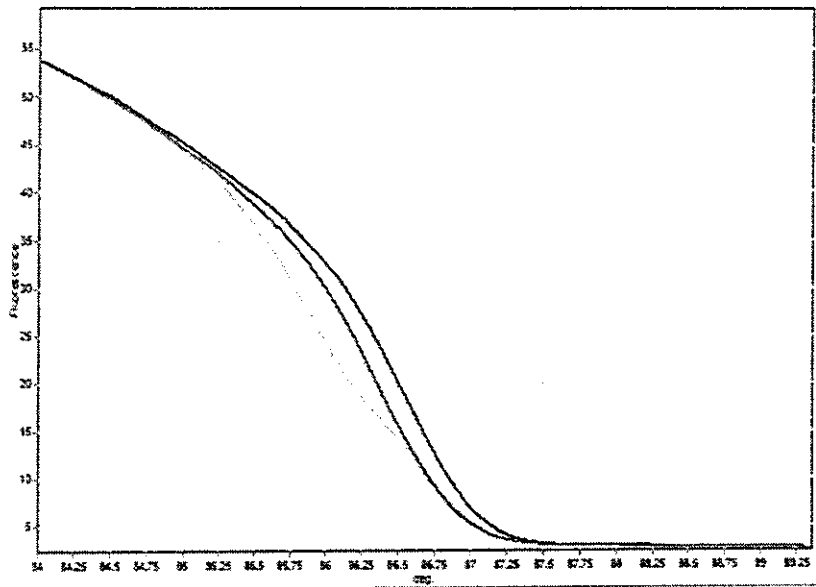


Figura 6. Curvas de disociación de los genotipos diferentes obtenidos por HRM (termociclador Rotor-Gene 6000).

El cambio en la T_m de fusión es de 0.2°C entre las muestras homocigotos. Las variantes son: homocigoto AA (azul), homocigoto TT (rojo) y heterocigotos (amarillo). Los homocigotos suelen tener la misma forma en la curva como se muestra en la figura, pero son diferenciados por un desplazamiento de la curva de la temperatura (T_m), la curva de los heterocigotos es fácil de distinguir ya que presenta una forma diferente y temperatura diferente.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El método de detección convencional del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 reportado por los investigadores que han estudiado el papel clínico de este polimorfismo es PCR-RFLP's (Frederiksen, et al., 2002; Forga, 2003). Este método requiere de la existencia de una diana de restricción o la creación de ella que identifique el polimorfismo de interés, amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción y electroforesis. De tal manera que PCR-RFLP's es una metodología que implica el uso de varios procedimientos y reactivos que repercuten en el costo del análisis y en el tiempo necesario para la obtención de resultados. La implementación de nuevos métodos para la detección de este polimorfismo que ofrezcan ventajas sobre PCR-RFLP's representa una aportación importante en la medicina genómica.

PCR_{TR}-HRM constituye una nueva metodología que podría ser útil en la determinación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2, con la posibilidad de abatir costos y tiempo para realizar el estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo tecnológico nos brinda la posibilidad de implementar nuevos métodos de detección de polimorfismos. La metodología PCR_{TR}-HRM representa una tecnología potencialmente útil para la determinación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2, consiste en la discriminación de alelos basada en la diferencia de temperatura de desnaturalización de amplicones. Por tanto, se requiere únicamente la realización de un PCR_{TR}, seguido del análisis de las curvas de disociación. Ambos procesos se llevan a cabo en el mismo tubo de reacción y en el mismo equipo, no se requiere de digestión ni de electroforesis para la identificación de genotipos. Además, este proceso constituye una metodología sustentable ya que no requiere del uso de bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de DNA amplificados, ni de ningún otro componente tóxico que contamine el ambiente.

En la medida en que seamos capaces de implementar metodologías más eficientes, económicas y seguras, contribuiremos en el desarrollo de la medicina genómica identificando factores moleculares involucrados en el proceso salud-enfermedad.

4. HIPÓTESIS

La técnica PCR_{TR}-HRM es rápida, específica y menos costosa que PCR-RFLP's para la identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar la detección del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 mediante PCR_{TR}-HRM y compararla con la técnica PCR-RFLP's.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Identificar el polimorfismo Pro12Ala mediante PCR-RFLP's en individuos clínicamente sanos.

5.2.2 Determinar el polimorfismo Pro12Ala mediante PCR_{TR}-HRM en individuos clínicamente sanos, previamente genotipificados por PCR-RFLP's.

5.2.3 Comparar los genotipos obtenidos mediante PCR-RFLP's y PCR_{TR}-HRM.

5.2.4 Determinar costos y tiempo de ejecución con la metodología PCR_{TR}-HRM y PCR-RFLP's.

6. METODOLOGÍA

6.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se obtuvieron 3 mL de sangre periférica de 14 individuos clínicamente sanos por punción venosa utilizando equipo de vacutainer con anticoagulante EDTA (Ácido etilen-diamino- tetracético).

6.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO (DNAg)

Se extrajo DNA mediante la técnica de perlas magnéticas (Gene Catcher, invitrogen, No.Cat. CS211110). Este método está basado en la utilización de perlas con carga eléctrica (+), las cuales tienen afinidad con el DNA con carga eléctrica (-), uniéndose selectivamente.

Este procedimiento se describe a continuación: se colocaron 3 mL de sangre periférica en un tubo falcón cónico estéril de 50 mL después se agregaron 45 μ L de perlas magnéticas, después se agregaron 9 mL de buffer de lisis. La mezcla se homogeneizó suavemente por inversión 3 veces; esto para permitir que el DNA se uniera a las perlas.

Se procedió a la digestión enzimática con proteasa para facilitar la unión del DNA con las perlas magnéticas, para lo cual se agregaron 3 mL de buffer de proteasa y 40 μ L de proteasa, se incubó a 65°C por 10 min. Enseguida, se realizó la precipitación y purificación del DNA con isopropanol para permitir la precipitación del DNA y el lavado nos ayudó a eliminar la cantidad de proteínas residuales en el DNA, especialmente histonas entre otros componentes; se agregaron 3 mL de isopropanol absoluto. Se mezcló suavemente movimientos giratorios hasta la formación de agregados visibles, se retiró el sobrenadante con una pipeta 5 mL. Se adicionaron al tubo 3 mL de isopropanol al 50 %; se mezcló suavemente con movimientos giratorios hasta que se formaron agregados visibles. Se retiró el sobrenadante con una pipeta de 5 mL. Enseguida se procedió al lavado con 250 μ L de buffer de lavado se incubó a temperatura ambiente por 1 min.

Se procedió a la elución del DNA para la separación del DNA de las perlas magnéticas. Para esto, se añadieron al tubo cónico 500 μL de buffer de elución y se incubó a 65°C por 1 hora. Después de este tiempo, se colocó en la gradilla magnética hasta que el sobrenadante fue claro y transparente.

Se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día con una pipeta de 1000 μL se retiró el sobrenadante que contenía el DNA, se vació el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL; la solución del DNA purificado se almacenó a -20°C .

6.3 CUANTIFICACIÓN DEL DNAg

La cuantificación de la concentración de DNA se llevo a acabo mediante un espectrofotómetro. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm nos permitió conocer la cantidad de DNA presente en la muestra y la lectura a 280 nm la cantidad de proteínas. La relación de lecturas 260 nm/280 nm se utilizó para estimar el grado de pureza del DNA, la cual debe ser aproximadamente 1.8, una relación más elevada nos indicó contaminación por proteínas especialmente de histonas que son las que se encuentran con mayor cantidad unidas a la macromolécula del DNA y una relación mayor, indicó degradación del DNA (Sambrook y Russel (a) 2001).

La cuantificación se realizó a través de un espectrofotómetro haciendo diluciones de 10 μL de DNA en 1000 μL de agua destilada. Se calculó la concentración de DNA de la siguiente manera: la lectura a 260 nm se multiplicó por el factor 50, el cual proviene de que una absorbancia $A=1$ corresponde a a una solución de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA bicatenario. Se obtuvo la concentración con la fórmula: $\text{DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = 50 \times A_{260} \times 1000$.

Enseguida, aplicamos la fórmula $V_1C_1= V_2C_2$, para obtener el volumen de la solución de DNA necesario para preparar una solución de DNA de 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ como dilución de trabajo.

6.4 ELECTROFORESIS DE DNAg

Se preparó un gel de agarosa al 0.8%, pesando 0.24 g de agarosa en un matraz y añadiendo 30 mL de amortiguador TBE 1X. Se calentó hasta que se disolvió la agarosa completamente, se añadió 1 μL de bromuro de etidio se mezcló hasta homogeneización total. Se vertió la agarosa ya disuelta en la cámara de electroforesis colocándose un peine con los pozos requeridos y se esperó hasta que se solidificó (15 min). Se retiró el peine y se cargaron los pozos con volumen total de 20 μL (1 μL de DNA, 1 μL de buffer de carga y 18 μL de agua destilada). Enseguida, se vertió el TBE 1X hasta el borde del gel, y se conectó la fuente de poder se aplicó un voltaje de 80 mV hasta ver que las muestras salieran del pozo; se interrumpió el voltaje por un momento para inundar completamente el gel con TBE 1X, una vez inundado se conectó nuevamente a la corriente para que las muestras corrieran totalmente. Al finalizar, se colocó el gel en un transiluminador de luz UV para visualizar las muestras y percibir si hubiera habido degradación en el proceso de extracción.

6.5 PCR-RFLP's

Primeramente se llevó a cabo una PCR convencional y luego se digirieron los productos de amplificación. El procedimiento se realizó como se explica enseguida.

6.5.1 PCR

Se programaron las condiciones del termociclador para llevar a cabo la amplificación del fragmento polimórfico mediante PCR, las cuales se presentan en el Cuadro 3. La mezcla de reacción se realizó en una campana de flujo laminar, la cual se limpió con alcohol al 70 % al igual que el material utilizado.

La mezcla de la reacción empleada para PCR se describe en el cuadro 4. Los iniciadores utilizados se muestran en el cuadro 5.

Se enumeraron los tubos eppendorf de 0.2 mL con el número de muestra correspondiente y en cada tubo se colocaron 20 μ L de la mezcla de reacción. Enseguida se añadieron 5 μ L de DNA de cada muestra. Se incluyó un control negativo (-) al cual se le añadieron 20 μ L de la reacción total más 5 μ L de agua, en vez de DNA. Enseguida, los tubos se colocaron en el termociclador para la amplificación de un fragmento de 76 pb para el gen PPAR γ 2.

Se observaron los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con EtBr a través de un transiluminador de luz UV.

Cuadro 3. Condiciones estandarizadas programadas para PCR convencional para la amplificación de la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2.

| | | |
|---------------------------|------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 10min. |
| 40 ciclos: | | |
| Desnaturalización | 95°C | 15 s |
| Alineamiento | 58°C | 10 s |
| Extensión | 72°C | 10 s |
| Extensión final | 72°C | 5 min |

Cuadro 4. Mezcla de la reacción para PCR-RFLP's para la amplificación de la región polimórfica Pro12A1a de PPAR γ 2 con los iniciadores correspondientes para flanquear un fragmento de 76 pb que contiene la región polimórfica en estudio.

| REACCIÓN DE PCR PARA PCR-RFLP's/ 76 pb | Concentración de la solución original | Concentración en el tubo de reacción | Volumen por tubo (μ L) |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| ADDE | | | 11.3 |
| Buffer | 10X | 1X | 2.5 |
| MgCl ₂ | 50 mM | 4 mM | 2.0 |
| dNTP's | 2.5 mM | 200 nM | 2.0 |
| Oligonucleótido 1 (76pb) | 10 μ M | 200 nM | 1.0 |
| Oligonucleótido 2 (76pb) | 10 μ M | 200 nM | 1.0 |
| Taq polimerasa | 5U/ μ L | 1U | 0.2 |
| DNA | | 100 ng | 5.0 |
| Volumen total | | | 25.0 |

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados en PCR-RFLP's para amplificar la región polimórfica Pro12A1a de PPAR γ 2 y obtener un fragmento de 76 pb.

| GEN | SECUENCIA | Fragmento amplificado (pb) |
|-----------------|---|----------------------------|
| PPAR γ 2 | 5' CAAACCCCTATTCCATGCTG3' 5'AGTGAAGGAATCGCTTTCCG3' | 76 |

La secuencia del fragmento amplificado por PCR-RFLP's se muestra en la figura 7.

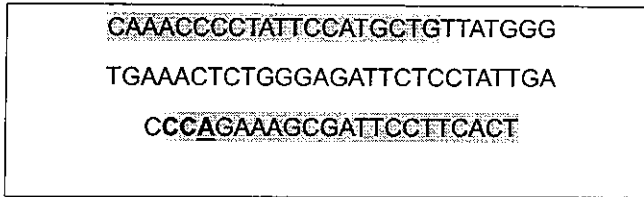


Figura 7. Secuencia del fragmento analizado por PCR-RFLP's en el gen PPAR γ 2 de 76 pb.

La región sombreada indica la alineación de los iniciadores para el PCR. El iniciador antisentido contiene el nucleótido mismatch sombreado en verde con la finalidad de generar el sitio de restricción 5'CCGG3' para la enzima *MspI* en el alelo silvestre. El codón en negritas corresponde al codón 12 del exón B, donde se encuentra el polimorfismo: **CCA** que codifica para Pro cambia por **GCA** que codifica para Ala. Cuando existe el polimorfismo, se pierde el sitio de restricción CCGG para *MspI* creado por mismatch de iniciadores.

6.5.2 RFLP's, digestión con la enzima de restricción *MspI*

Se enumeraron quince tubos eppendorf de 0.5 mL. Se preparó una mezcla con los reactivos: ADDE, buffer y enzima *MspI* se preparó un negativo por separado al que no se añadió la enzima de restricción (Cuadro 6). Se agregaron 19 μ L de la mezcla total a cada tubo; enseguida se añadió 1 μ L del producto de PCR a cada tubo con la muestra correspondiente.

Enseguida se sellaron muy bien los tubos con parafilm y se colocaron en baño maría durante un tiempo de 5 h a una temperatura de 37°C. Pasado el tiempo de la digestión, se analizaron los fragmentos de restricción obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% a una intensidad de voltaje de 80 volts. A continuación, se observaron los fragmentos esperados. El alelo silvestre presentó el sitio de restricción, mientras que la variante polimórfica no. Se llevó a cabo la genotificación de acuerdo al patrón de restricción esperado para el genotipo silvestre, heterocigoto y polimórfico.

Cuadro 6. Mezcla de reacción de digestión con la enzima *MspI* para la identificación del polimorfismo Pro12 Ala de PPAR γ 2.

| REACTIVO | [Sol. Concentrada] | Concentración final | Volumen por tubo (μ L) |
|-----------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|
| H2O inyectable | — | — | 16.8 |
| Amortiguador | 10X | 10 x | 2.0 |
| <i>MspI</i> | 20U/ μ L | 4 U/ μ L | 0.2 |
| Producto de PCR | — | — | 1 |

6. 6 PCR_{TR}-HRM

Se realizó PCR_{TR}-HRM con las mismas muestras utilizadas en PCR-RFLP's. Se diseñaron los iniciadores para la amplificación del fragmento polimórfico mediante PCR_{TR}-HRM (cuadro 9).

Se realizó una mezcla total en un tubo de eppendorf con los siguientes reactivos: Sensimix (MgCl₂, Taq polimerasa y dNTP's), Syto9, oligonucleótidos, H₂O y DNA. Enseguida se enumeraron los tubos eppendorf con las muestras de estudio se añadió a cada tubo 20 μ L de la mezcla de reacción y 5 μ L de DNA (cuadro 7). Enseguida se colocaron las muestras en el termociclador (**Rotor- Gene 6000**) programado con las condiciones para la corrida ver cuadro 8.

Pasando el tiempo estimado para la amplificación, se llevó a cabo la identificación del polimorfismo a través del análisis de las curvas de disociación de los amplicones generados por PCR_{TR}-HRM en el mismo tubo de reacción y en el mismo termociclador, el cual contiene el programa computacional y la tecnología específica para el análisis HRM.

A medida que aumentó la temperatura, se perdió la fluorescencia observada en los amplicones, ya que éstos sufrieron desnaturalización y se convirtieron en DNA de cadena sencilla, perdiendo el colorante fluorescente altamente intercalante Syto9 utilizado.

Los alelos presentaron diferencia en la temperatura de desnaturalización dependiendo de su estructura primaria.

Fue posible discriminar entre amplicones correspondientes a genotipos silvestres, heterocigotos o polimórficos, porque cada uno mostró una temperatura de desnaturalización particular.

Cuadro 7. Mezcla de la reacción de PCR_{TR}-HRM para la amplificación del fragmento polimórfico Pro12Ala de PPAR γ 2.

| REACTIVO | Concentración del reactivo | Concentración en el tubo de reacción | Volumen por tubo (μ L) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| SensiMix | 2x | 1x | 12.5 |
| ADDE | | | 4.25 |
| MgCl ₂ | 50mM | 4 mM | 0.5 |
| Oligonucleótido 1 | 10 μ M | 400 nM | 1.0 |
| Oligonucleótido 2 | 10 μ M | 400 nM | 1.0 |
| Syto-9* | 50 μ M | 1X | 0.75 |
| DNA | | 100 ng | 5.0 |
| Volumen total | | | 25.0 |

* Colorante altamente intercalante

Cuadro 8. Condiciones estandarizadas de PCR_{TR}-HRM para la identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2.

| Desnaturalización inicial | 95°C | 10 min |
|---------------------------|----------|-----------|
| 40 ciclos: | | |
| Desnaturalización | 95°C | 15 s |
| Alineamiento | 60°C | 10 s |
| Extensión | 72°C | 10 s |
| HRM | 75 -90°C | 0.1°C/2 s |

Cuadro 9. Oligonucleótidos utilizados para PCR_{TR}-HRM de la región polimórfica Pro12Ala de PPAR γ 2.

| GEN | SECUENCIA | Fragmento amplificado (pb) |
|-----------------|---|----------------------------|
| PPAR γ 2 | 5'ATGCTGTTATGGGTGAAACTCTG 3' 5'GCCGTATCTGGAAGGAACCTTAC3' | 113 |

La secuencia del fragmento amplificado por PCR_{TR}-HRM se muestra en la figura 8.

```

ATGCTGTTATGGGTGAAACTCTG
GGAGATTCTCCTATTGACCCAGAAAGCG
ATTCCTTCACTGATACACTGTCTGCAAA
CATATCACAAAGGTAAGTTCCTTCCAGA
TACGGC
    
```

Figura 8. Secuencia del fragmento analizado por PCR_{TR}-HRM en el gen PPAR γ 2 de 113 pb.

La región sombreada indica la alineación de los iniciadores, el codón en negritas corresponde al codón 12 del exón B, donde se encuentra el polimorfismo: CCA que codifica para Pro cambia por GCA que codifica para Ala. La letra subrayada indica el nucleótido que cambia de C/G en el alelo polimórfico.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de DNAg

Se tomaron 14 muestras de 3 mL de sangre periférica cada una procedente de un grupo de individuos clínicamente sanos, conformado por 9 mujeres y 5 hombres, de una edad promedio de 37 ± 13 años. Se extrajo el DNA mediante el método de perlas magnéticas y se cuantificó espectrofotométricamente. La cantidad de DNA extraída varió de 76.84 μg a 132.04 μg . La pureza de las muestras obtenidas fue determinada mediante la relación 260nm/280nm, la cual estuvo en un rango entre 1.6 y 1.75. La integridad del DNAg obtenido de las muestras fue aceptable, ya que en la electroforesis en gel de agarosa no se observó degradación (Fig. 9).

La determinación del polimorfismo Pro12Ala primeramente se realizó mediante la metodología de PCR-RFLP's, la cual se llevó a cabo a través de la realización de varios procesos. El primero de ellos fue una PCR de punto final, en donde se obtuvo un fragmento específico de 76 pb (Fig. 10) Enseguida, se realizó la digestión con la enzima *MspI*.

7.2 PCR-RFLP's

Se obtuvo el siguiente patrón de restricción: genotipo silvestre (Pro12/Pro12), 56 pb y 20 pb; genotipo polimórfico (Ala12/Ala), un fragmento no digerido de 76pb; genotipo heterocigoto (Pro12/Ala), 76 pb, 56 pb y 20 pb. Presentándose así 1 polimórfico, 8 silvestres y 5 heterocigotos (Fig. 11).

7.3 PCR_{TR}-HRM

Las muestras analizadas por PCR-RFLP's se analizaron posteriormente mediante PCR_{TR}-HRM para la determinación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 y realizar la comparación de los resultados.

La metodología PCR_{TR}-HRM consiste en llevar a cabo una PCR_{TR} y enseguida el HRM en el mismo tubo de reacción y en el mismo instrumento sin necesidad de observar los resultados mediante electroforesis, como sucede en la PCR convencional.

Sin embargo, una vez terminado el análisis de PCR_{TR}-HRM, efectuamos un gel de agarosa al 2% para tener una evidencia visual que corroborara la amplificación del fragmento de 113 pb (Fig. 12).

Los resultados obtenidos por PCR_{TR}-HRM fueron iguales a los obtenidos por PCR-RFLP's. La distribución de genotipos fue 57.1% (n=8) silvestre, 7.14% (n=1) polimórfico, y 35.7% (n=5) heterocigoto (Fig. 13). En la figura 14A se muestra la curva de disociación de los genotipos silvestres y en la figura 14B se muestra la curva de disociación de los genotipos heterocigotos se observa claramente una diferencia en cuanto a la forma de la curva. Las curvas de disociación dependiendo de la T_m y la forma de la curva son los parámetros que el instrumento utiliza para discriminar entre los diversos genotipos: silvestre, heterocigoto y polimórfico (Fig. 15).

La caracterización de las curvas de disociación y los genotipos fueron obtenidos a través del software del equipo de PCR_{TR}-HRM en forma directa (fig. 16).

Se calcularon los costos y tiempos de ejecución tanto de PCR-RFLP's, como de PCR_{TR}-HRM. El costo por reacción de PCR-RFLP's fue de \$102.28 M.N.; mientras que el costo de la genotipificación de cada muestra a través de la metodología PCR_{TR}-HRM, fue de \$42.24 M.N. De tal manera, que el análisis PCR_{TR}-HRM resultó 2.4 veces más barato que PCR-RFLP's (Cuadro 10). El tiempo necesario para la obtención del genotipo mediante la tecnología de PCR_{TR}-HRM fue de aproximadamente 2 horas con 54 minutos; mientras que PCR-RFLP's requirió de 8.5 horas aproximadamente. Estos resultados indican que la tecnología PCR-RFLP's, requiere aproximadamente 3 veces más tiempo para la obtención de resultados que PCR_{TR}-HRM (Cuadro 11).

El índice Kappa es utilizado para valorar el grado de concordancia de dos pruebas diagnósticas. En este caso la eficiencia de las dos metodologías PCR-RFLP's y PCR_{TR}-HRM mostraron una concordancia para la detección de los genotipos, por lo que se obtuvo un K= 1.0 lo cual nos demuestra que la fuerza de concordancia es casi perfecta (Cuadro 12).

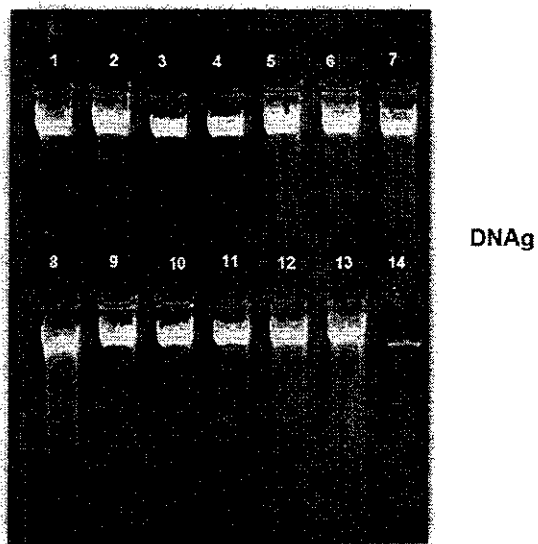


Figura 9. Gel de agarosa al 0.8% de electroforesis del DNAg extraído por el método de perlas magnéticas de Gene-Catcher, donde se observa la integridad del DNAg de las muestras estudiadas. Carriles 1-14: individuos clínicamente sanos.

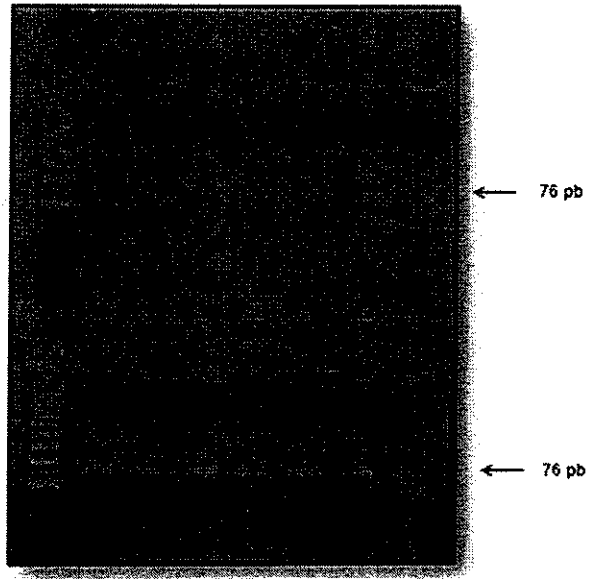


Figura 10. Gel de agarosa al 3% de electroforesis de los productos de PCR de PPAR γ 2, con una banda específica de 76pb; marcador en escalera de 50 pb; (-): control negativo, carriles 1-13 muestras de estudio.

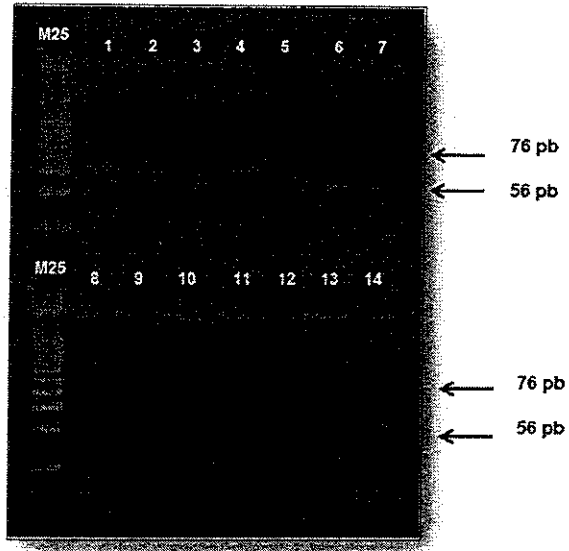


Figura 11. Gel de agarosa al 3% representativo de los productos esperados obtenidos de la digestión enzimática con la enzima de restricción *MspI* del PPAR γ 2. Carril 1: polimórfico; carriles 2, 4, 5, 11, 13: heterocigoto; carriles 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14: silvestre.

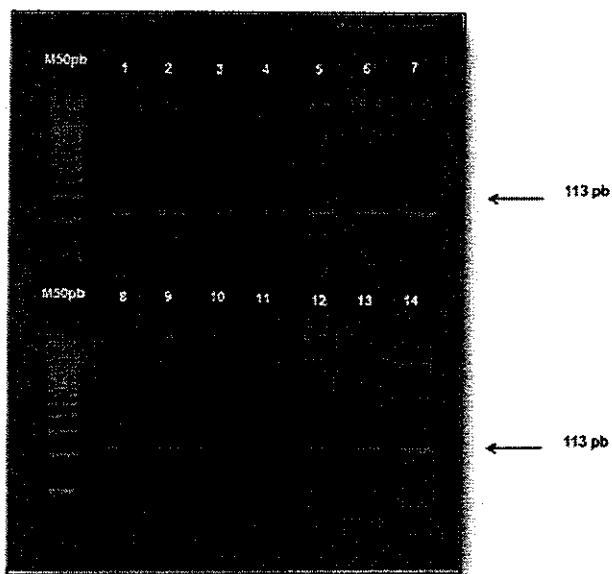


Figura 12. Gel de agarosa al 3% de electroforesis de los productos de PCR-HRM de PPAR γ 2. Con una banda específica de 113 pb; marcador en escalera de 50 pb; carriles 1-14 muestras de estudio.

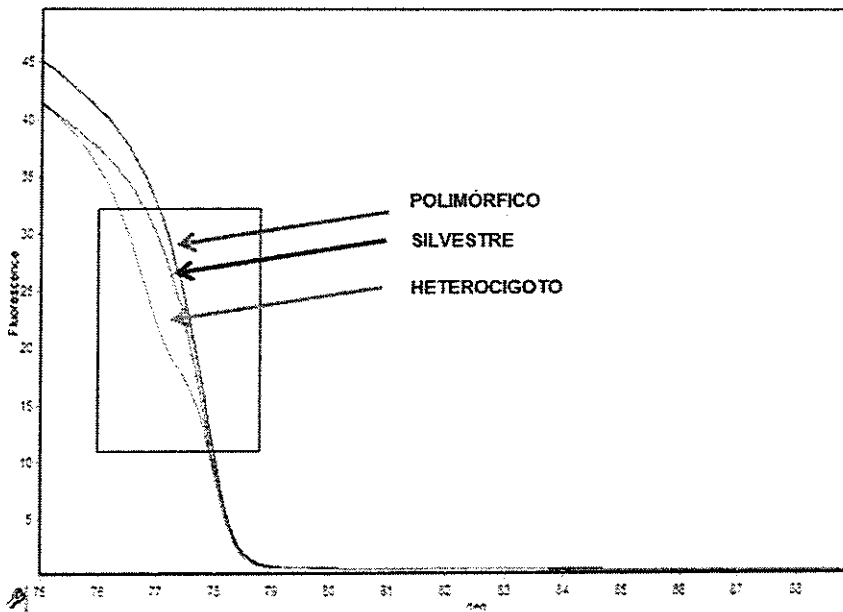
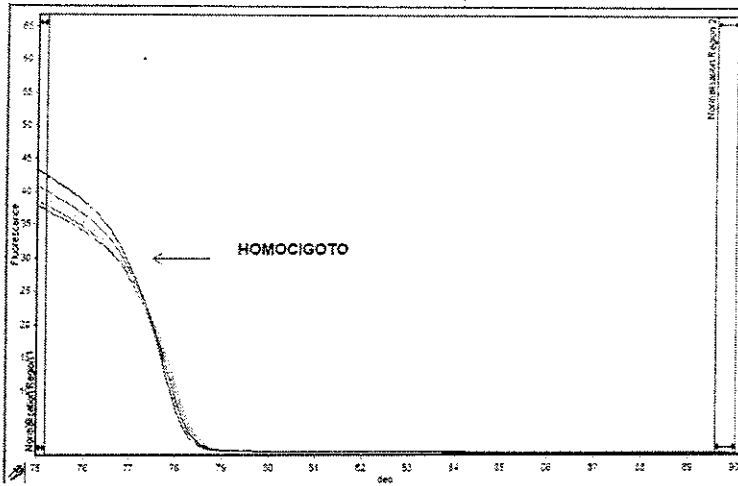


Figura 13. Normalización de las curvas de disociación por PCR_{TR}-HRM.

Representación de las curvas de disociación de cada genotipo por duplicado; la curva azul muestra el genotipo polimórfico, la curva rosa el genotipo silvestre y la curva verde el genotipo heterocigoto.

A)



B)

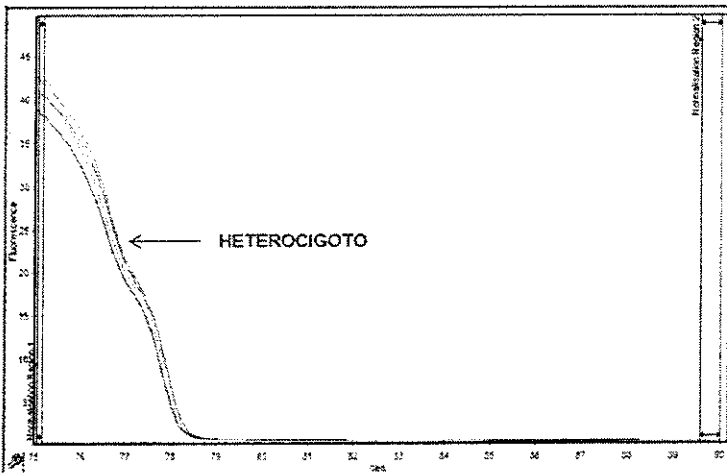
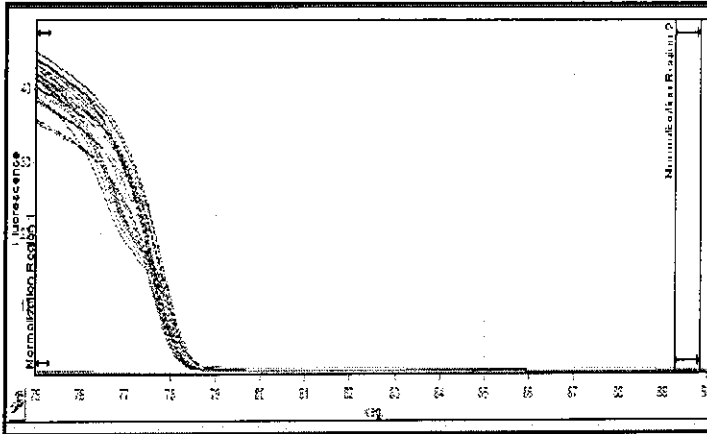


Figura 14. Representación de las curvas de disociación de los genotipos de PPAR γ 2. A) genotipos silvestres. B) genotipos heterocigotos.

A)



B)

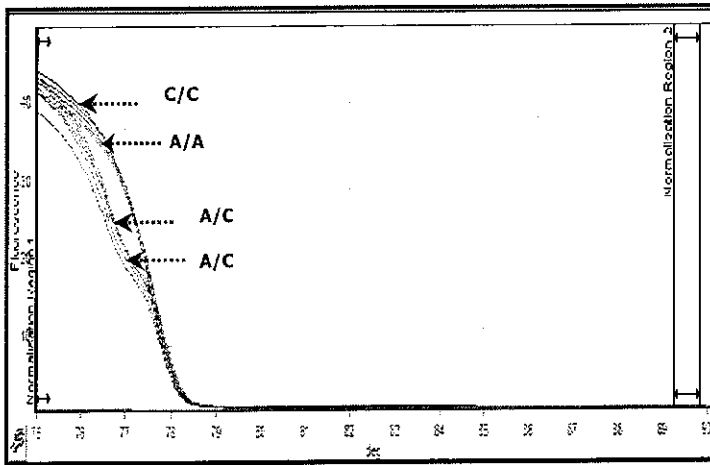


Figura 15. Representación de las curvas de disociación de las muestra de estudio.

A) Se muestran los genotipos de las muestras en conjunto. B) Se muestran las curvas de disociación de los genotipos de cada muestra: silvestre A/A, heterocigoto A/C y polimórfico C/C.

A)

| Ns. | C | Muestra | Genotipo | Confianza % |
|-----|---|---------|--------------|-------------|
| 1 | | agua | Variation | |
| 2 | | 14=1 | Polimórfico | 100.00 |
| 4 | | 14=3 | Polimórfico | 99.47 |
| 5 | | 16=1 | Heterocigoto | 100.00 |
| 7 | | 16=2 | Heterocigoto | 99.77 |
| 10 | | 53=1 | Silvestre | 100.00 |
| 11 | | 53=2 | Silvestre | 99.52 |
| 14 | | 1=1 | Heterocigoto | 99.90 |
| 15 | | 1=2 | Heterocigoto | 99.74 |
| 16 | | 1=3 | Heterocigoto | 99.33 |
| 18 | | 2=1 | Heterocigoto | 99.32 |
| 19 | | 2=2 | Heterocigoto | 99.52 |
| 20 | | 2=3 | Heterocigoto | 99.52 |
| 22 | | 3=1 | Silvestre | 99.47 |
| 23 | | 3=2 | Silvestre | 99.24 |
| 24 | | 3=3 | Silvestre | 99.39 |
| 26 | | 4=1 | Silvestre | 99.98 |
| 27 | | 4=2 | Silvestre | 99.33 |
| 28 | | 4=3 | Silvestre | 99.14 |
| 30 | | 5=1 | Silvestre | 99.63 |
| 31 | | 5=2 | Silvestre | 99.98 |
| 32 | | 5=3 | Silvestre | 99.85 |
| 34 | | agua | Variation | |

B)

| No. | C | Muestra | Genotipo | Confianza % |
|-----|---|---------|-----------|-------------|
| 1 | | agua | Variation | |
| 2 | | 14=1 | poli | 100.00 |
| 3 | | 14=2 | poli | 97.44 |
| 5 | | 16=1 | hetero | 100.00 |
| 6 | | 16=2 | hetero | 99.86 |
| 8 | | 53=1 | silv | 100.00 |
| 9 | | 53=2 | silv | 99.76 |
| 12 | | 6=2 | silv | 99.62 |
| 13 | | 6=3 | silv | 99.68 |
| 15 | | 7=1 | silv | 99.26 |
| 16 | | 7=2 | silv | 99.68 |
| 17 | | 7=3 | silv | 99.74 |
| 19 | | 8=1 | hetero | 98.69 |
| 20 | | 8=2 | hetero | 99.09 |
| 21 | | 8=3 | hetero | 91.04 |
| 23 | | 9=1 | silv | 98.99 |
| 24 | | 9=2 | silv | 98.43 |
| 25 | | 9=3 | silv | 96.48 |
| 27 | | 10=1 | hetero | 97.45 |
| 28 | | 10=2 | hetero | 95.60 |
| 29 | | 10=3 | hetero | 97.18 |
| 31 | | 11=1 | silv | 98.05 |
| 32 | | 11=2 | silv | 97.96 |
| 33 | | 11=3 | silv | 98.48 |
| 35 | | agua | Variation | |
| 36 | | agua | Variation | |

Figura 16. Resultados obtenidos de los genotipos directamente por el software del HRM.

A) Genotipos de las muestras 1-5 con un índice de confianza de 100% procesadas por triplicado; B) Continuación de las muestras 6-11 con un índice de confianza de 100% procesadas por triplicado.

Cuadro 10. Costo promedio de los reactivos utilizados para llevar a cabo una reacción por PCR-RFLP's y por PCR_{TR}-HRM.

| | PCR-RFLP'S | PCR _{TR} -HRM |
|-----------|------------|------------------------|
| PARAMETRO | Precio/RXN | Precio/RXN |
| REACTIVOS | 102.28 | 42.24 |
| TOTAL | \$ 102.28 | \$ 42.24 |

Cuadro 11. Tiempos comparativos para llevar a cabo la genotipificación de cada muestra por PCR-RFLP's y PCR_{TR}-HRM.

| METODO | TIEMPO |
|------------------------|------------|
| PCR-RFLP'S | 8h y 30min |
| PCR _{TR} -HRM | 2h y 54min |

Cuadro 12. Índice Kappa. El índice Kappa obtenido fue de 1.00, por lo que de acuerdo a la tabla de índice Kappa, nuestro resultado refleja una concordancia casi perfecta en la concordancia entre ambos métodos.

| Valores de Índice Kappa | |
|-------------------------|-----------------------------|
| Valor K | Magnitud de la concordancia |
| Menor de 0 | Pobre |
| 0-0.20 | Escasa |
| 0.21-0.40 | Leve |
| 0.41-0.60 | Moderada |
| 0.61-0.80 | Sustancial |
| 0.81-1.00 | Casi perfecta |

8. DISCUSIÓN

Existe una gran variedad de métodos para la detección de polimorfismos génicos. En la determinación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2, el método más ampliamente reportado es PCR-RFLP's (Frederiksen, et al., 2002; Forga, 2003). Esta metodología requiere del empleo a su vez de una serie de procesos para llegar a la genotipificación final, tales como: PCR, electroforesis, digestión enzimática y nuevamente electroforesis. El avance tecnológico ha permitido el desarrollo de la PCR_{TR}, la cual ha sido empleada para diversos fines, principalmente en el estudio de la expresión de genes.

Esta tecnología también ha sido utilizada, aunque con menor frecuencia, en la determinación de polimorfismos utilizando sondas fluorescentes (Lejona., 2006). Recientemente, se ha desarrollado la tecnología PCR_{TR}-HRM, la cual consiste en el análisis de las curvas de disociación de los amplicones polimórficos utilizando colorantes altamente intercalantes y detectores de fluorescencia ultrasensibles.

En este trabajo se implementó la determinación del polimorfismo Pro12 Ala de PPAR γ 2 mediante PCR_{TR}-HRM, el cual no está reportado en la literatura científica. También se demostró que los resultados son comparables con los obtenidos con la metodología convencional reportada de PCR-RFLP's, ya que los resultados fueron similares. Además, se demostró que el análisis PCR_{TR}-HRM es aproximadamente 2.5 veces más barato que PCR-RFLP's, debido a que el análisis se realiza en un solo paso y en un solo tubo de reacción, por lo que la manipulación y la posibilidad de contaminación se reducen. En consecuencia, PCR_{TR}-HRM también es un método mucho más rápido que PCR-RFLP's, ya que requiere aproximadamente un tercio del tiempo para la obtención final de resultados debido a que no requiere la realización de electroforesis ni digestión enzimática. El PCR_{TR}-HRM constituye así una metodología rápida, reproducible y sensible que nos permite el estudio de 72 muestras en una sola corrida o 24 muestras por triplicado.

La metodología PCR_{TR}-HRM ha sido utilizado para innumerables estudios, tales como la detección de mutaciones, polimorfismos génicos, identificación de genes de resistencia bacterianos y diagnóstico de enfermedades genéticas, entre otras (Kristensen y Dobrovic, 2008; Takano, 2008).

Finalmente, la PCR_{TR}-HRM constituye una metodología aplicable para la detección de cualquier variabilidad génica de una manera rápida y sensible que permite llevar a cabo estudios de epidemiología molecular en la caracterización de poblaciones con la finalidad de efectuar campañas de medicina preventiva o genotipificación masiva.

9. CONCLUSIONES

9.1. La metodología PCR_{TR}-HRM permite la identificación del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 y se obtienen resultados comparables utilizando el método convencional de PCR-RFLP's.

9.1.2. La detección del polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ 2 mediante HRM hace posible el análisis de 24 muestras por triplicado (72 muestras) en un lapso de aproximadamente de 3 horas.

9.1.3 El HRM es un método de más bajo costo y más rápido que PCR-FLP's.

9.1.4 HRM podría ser útil en estudios de epidemiología molecular en la caracterización de poblaciones con la finalidad de efectuar campañas de medicina preventiva o genotipificación.

11. - BIBLIOGRAFÍA

- Andraulionyte L., Peltola P., Chiasson J., Laakso M. Single Nucleotide Polymorphisms of PPARG in Combination With the Gly482Ser Substitution of PGC-1A and the Pro12Ala Substitution of PPARG2 Predict the Conversion From Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes: the STOP-NIDDM trial. (2006); *Diabetes*, 55 (7):2148-2152.
- Balasubramanyam M., Mohan V. Current concepts of PPAR- γ signalling in diabetes mellitus. (2000); *Current Science*, 79(10):1440-1446.
- Cruz M, García M. J, López O.E, Valladares A, Sánchez R, Rodarte N. W. y Aguilar G. R, Kumate J. Genes candidatos como posibles marcadores de susceptibilidad a diabetes tipo 2.(2005); *Revista de Educación Bioquímica*, 24 (3-4):81-86
- Cock Ta, Houten SM., & Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor – γ : too much of a good thong causes harm. (2004); *EMBO reports*, 5 (2):142- 147
- Costa V., Casamassimi A., Esposito K., Villani A., Capone M., Iannella R. Y col. Characterization of a Novel Polymorphism in PPARG Regulatory Region Associated with Type 2 Diabetes and Diabetic Retinopathy in Italy. (2009); *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1:1-17.
- Erali M., Voelkerding KV., Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine.(2008); *Experimental and Molecular Pathology*, 85: 50-58.
- Ferré, P. The biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. (2004); *Diabetes*, 53 (1): 43-49.
- Franks P.W., Jablonski K.A., Delahanty L., Hanson R.L., Kahn S.E., Altshuler D., Knowler W.C., Florez J.C., and Diabetes Prevention Program Research Group. The Pro12Ala variant at the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene and change in obesity-related traits in the Diabetes Prevention Program. (2007); *Diabetologia*, 50(12):2451-2460.
- Frederiksen L., Brodbæk K., Fenger M., Jørgensen T., Borch-Johnsen K., Madsbad S. and Urhammer SA. Studies of the Pro12Ala Polymorphism of the PPARG gene in the Danish MONICA cohort: Homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the Insulin Resistance Syndrome. (2002); *the Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87 (8): 3989-3992.

- Forga L., Corbalán M., Martínez A., Patiño A., Gofí M.J. Polimorfismos genéticos en TNF α y PPAR γ 2 y síndrome de resistencia a la insulina. (2004); *Avances Diabetología*, 20(1): 33-40.
- Florez JC., Jablonski KA., Sun M.W., Bayley N., Kahn SE., Shamon H., Hamman RF., Knowler WC., Nathan DM., and Altshuler D. Effects of the type 2 diabetes-associated *pparg* p12a polymorphism on progression to diabetes and response to troglitazone. (2007); *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (4): 1502-1509.
- García Escalante M., Suárez-Solís VM., López-Avila MJ., Pinto-Escalante DC., Laviada-Molina H. Efecto de los polimorfismos Gly972Arg del gen IRS1, SNP43 del gen CAPN10 y Pro12Ala del gen PPARG2 sobre la falla secundaria a sulfonilureas y metformina en pacientes con diabetes tipo 2 de Yucatán México. (2009); *Investigación Clínica*, 50 (1):65-76
- Ghossaini, M., Meyre, D., Lobbens, S., Charpentier, G., Clément, K., Charles, MA, Maïte Tauber, Jacques Weill y Philippe Froguel. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. (2005); *BMC Medical Genetics*, 6 (11):1-8
- Giovambattista G., Ripoli MV., Lirón JP., Kienast ME., Villegas E., Dulout FN., García PP. Aplicación de las técnicas de polimorfismo de dna en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. (2001); *Analecta Veterinaria*, 21(1): 5-11
- Gouda, HN., Sagoo GS., Harding AH., Yates J., Sandhu MS y Higgins JP. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 (*PPARG2*) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. (2010); *American Journal of Epidemiology*, 171(6) 645-655.
- Gudrun H R., Kent J O, Wittwer C T. High resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. (2007); *Pharmacogenomics*, 8 (6): 597-608.
- Gudrun H. R and Wittwer C T. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. (2004); *Clinical Chemistry*, 50 (10):1748-1754.
- Gundry C.N., Vandersteen J.G., Gudrun H. R., Pryor R. J., Chen J., and Wittwer C.T., Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. (2003); *Clinical Chemistry*, 49 (3): 396-406.

- Garritano S., Gemignani F., Voegelé C., Nguyen- Dumont T., Calvez-Kelm F.L., De Silva D., Lesueur F., Landi S. and Tavtigian S.V. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the *TP53* locus. (2009); *BMC Genetics*, 10 (5):1-5.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G y Watson R. Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. (1993); *Bio/Technology*, 11:1026-1030.
- Krenkova P., Stambergova A., Norambuena P., Macek M. Mutation scanning of the CFTR gene by high-resolution melting analysis (HRM). (2008); *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(1):4-17
- Kristensen L.S. and Dobrovic A. Direct Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms in Methyl Metabolism Genes Using Probe-Free High-Resolution Melting Analysis. (2008); *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(5): 1240 - 1247.
- Kolehmainen M., Uusitupa M., Alhava E., Laasko M., y Vidal H. Effect of the *Pro12Ala* Polymorphism in the Peroxisome Proliferator- Activated Receptor (PPAR)₂ Gene on the Expression of PPAR_γ Target Genes in Adipose Tissue of Massively Obese Subjects. (2003); *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(4): 1717-1722.
- Kulkarni V., Errami M., Barber y Garner H. Exhaustive prediction of disease susceptibility to coding base changes in the human genome. (2008); *BMC Bioinformatics*. 9(9): 1-10.
- Lejona S., Benetti M.S., Fay F., Fay O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. (2006); *Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio*, 14(1):33-37.
- Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., and Wittwer C. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. (2004); *Clinical Chemistry*, 50 (7): 1156-1164.
- Ludovico O., Pellegrini F., Di Paola R., Minenna A., Mastroianno S., Cardellini M., Marini MA., Andreozzi F., Vaccaro O., Sesti G., and Trischitta V. Heterogeneous Effect of Peroxisome Proliferator-activated Receptor $\gamma 2$ *Ala12* Variant on Type 2 Diabetes Risk. (2007); *OBESITY*, 15 (5):1076-1081.

- Meirhaeghe, A., Fajas, L., Helbecque, N., Cottel, D., Lebel, P., Dallongeville, J., Deeb S., Auwerx J and Amouyel P. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene influences plasma leptin levels in obese. (1998); *Human Molecular Genetics*, 7 (3):435-440.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. (1987); *Methods in Enzymology*, 155: 335-3350.
- Sambrook J y Russel DW (a). Commonly used techniques in molecular cloning. En: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Argentine J, Irwin N, Janssen KA et al. (eds), Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 2001; 3ª edición, vol.3, appendix 8: A8.1-A8.55.
- Sambrook J y Russel DW (b). Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarosa gel electrophoresis. En: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Argentine J, Irwin N, Janssen KA et al. (eds), Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 2001; 3ª edición, vol.1, cap. 5:1-90.
- Sambrook J y Russel DW (c). Amplification of DNA by Polimerase Chain Reactions. En: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Argentine J, Irwin N, Janssen KA et al. (eds), Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 2001; 3ª edición, vol.1, cap.8:1-126.
- Slinger R., Bellfoya D., Desjardins M. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. (2007); *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(4):455-458
- Soriquer F., Morcillo S., Cardona., Rojo M G., Almaráz M de C., Ruiz M de S., Oliveira G., Tinahones F., and Esteva I. Pro12Ala Polymorphism of the PPARG2 Gene Is Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Peripheral Insulin Sensitivity in a Population with a High Intake of Oleic Acid.(2006); *Journal of Nutrition*, 136: 2325-2330.
- Spalvieri MP., Rotenberg RG. Aplicaciones del polimorfismo de un nucleotido y micromatrices de ADN. (2004); *Medicina Buenos Aires*, 64:533-542.
- Stumvoll, M. & Häring, H. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 2 Pro12Ala Polymorphism. (2002); *Diabetes*, 51(1): 2341-2346.
- Taillon MP., Pernet E., Yan., KP. Efficient Approach to Unique Single-Nucleotide Polymorphism Discovery. (1999); *Genoma Research*, 9: 499-505

- Takano EA., Mitchell G., Fox SB., and Dobrovic A. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutation using high resolution melting analysis.(2008); *BMC Cancer*, 8(59):1-7
- Taylor F. C. Mutation scanning using high-resolution melting. (2009); *Biochemical Society Transactions*, 37:433-437.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. (1998); *Science*, 15(280): 1077-1082.
- Wittwer C.T., Gudrun H. R., Gundry C.N., Vandersteen J.G., and Pryor R.J. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen.(2003); *Clinical Chemistry*, 49(6):853-860.
- Weimin He., PPAR γ 2Pro12Ala Polymorphism and Human Health, (2009); *PPAR Research*, 2009:1-15.
- Wittwer, CT., Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG., Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. (2003); *Clinical Chemistry*, 49(6): 853-860.
- Wong L.M. and Medrano F.J. Real-time PCR for mRNA quantitation. (2005); *Biotechniques*, 39(1):1-11.
- Yen, C.J., Beamer, B.A., Negri, C., Silver, K., Brown, K.A., Yarnall, D.P. et al. Molecular Scanning of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (hPPARG) Gene in Diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala PPARG2 Missense Mutation. (1997); *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(2):270-274.
- Zarate A., Saucedo R., Hernández M. El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ) es un factor de transcripción multigénico de versatilidad metabólica. (2005); *Acta Médica grupo Ángeles*, 3(1):53-54.
- Zhou L., Vandersteen J., Wang L., Fuller T., Taylor M., Palais B., Wittwer CT. High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity.(2004); *Tissue Antigens*, 64:156-164.