

Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular

- Víctor Ricardo Moreno Medina
- Ana María Sifuentes Rincón
- Benito Pereyra Alférez

La replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un proceso biológico eficiente gracias a la capacidad de las ADN polimerasas y a los sistemas de corrección celulares para mantener la integridad de la molécula del ADN. Sin embargo, el ADN es susceptible a cambios que pueden modificar la secuencia de los nucleótidos de cualquier región del ADN y causar la variación genética entre especies y organismos. Estos cambios pueden ser, principalmente, sustituciones, deleciones e inserciones y producir variantes genéticas que provocan las modificaciones estructurales en proteínas, lo que predispone, en el caso del humano, a cerca de 1000 enfermedades y a diferentes fenotipos o características morfológicas en plantas y animales. La variación genética se produce continuamente a causa de las mutaciones cromosómicas y génicas, las cuales se propagan en los organismos de reproducción sexual mediante el proceso de recombinación.

La información genética de los organismos eucariotes se encuentra en el ADN empacada eficientemente en los cromosomas, y los cambios cromosómicos (mayores de 1Mbp) pueden ser detectados mediante técnicas citogenéticas que actualmente emplean fluorescencia, como la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Variaciones más sutiles a nivel de secuencia de nucleótidos pueden analizarse

Tabla I. Mutaciones posibles a nivel de ADN en pares de bases (pb).

Escala	Mutación
< 0.1 pb	Metilación
1 pb	Transiciones, transversiones
1-10 pb	Deleciones, inserciones
10-10 ² pb	Deleciones, inserciones, inversiones, duplicaciones
10 ² -10 ³ pb	Exón (es), intrón(es), completos
10 ³ -10 ⁵ pb	Genes completos
10 ⁵ -10 ⁷ pb	Conjunto de genes
10 ⁷ -10 ⁹ pb	Segmentos de cromosomas o cromosomas completos

mediante técnicas que han mejorado con los avances de la tecnología, y que permiten detectar y medir la variación, como en el caso de los polimorfismos de nucleótidos de una sola base (SNP's). Aunque no hay una técnica ideal, pues su aplicación y uso dependen de factores como la disponibilidad de equipo, costo de implementación, aplicación a gran escala, sensibilidad, resolución, reproducibilidad y, principalmente, del problema biológico a resolver.

La presente revisión describe de manera breve la tecnología disponible para el estudio de las variaciones conocidas o desconocidas en la secuencia de ADN y la técnica de secuenciación como prueba de oro para identificar y confirmar la variación génica. Nuevas tecnologías de secuenciación masiva como pirosecuenciación o secuenciación por síntesis y resecuenciación mediante microarreglos están emergiendo para disminuir los costos y tiempo de secuenciación. Debido a los avances de estas

tecnologías, actualmente un nuevo formato de secuenciación (SFF), adicional al aprobado para el método de Sanger, es aceptado por el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para medir las variaciones en la secuencia del ADN a lo largo del genoma, pueden utilizarse los métodos AFLP (amplified fragment length polymorphisms), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphisms), análisis de microsatélites y análisis de minisatélites. Las técnicas aplicadas a un gen específico para detectar mutaciones conocidas, como en el caso de diagnóstico de enfermedades o la búsqueda de nuevas mutaciones, utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), apoyándose con detección fluorescente, hibridación, electroforesis y cromatografía.

Herramientas moleculares para detectar variación en genomas

AFLP

Marcadores genéticos dominantes pueden ser monitoreados de manera codominante, utilizan la reacción de PCR para tamizar de manera rápida y eficiente la diversidad genética. Debido a su alta reproducibilidad y facilidad de uso, tienen una gran aplicación en sistemática, patotipificación, genética de poblaciones, mapeo de genes (*loci*) con características cuantitativas (QTL), huella o perfil específico de ADN.

RAPD

Marcadores genéticos dominantes, homocigotos, reproducibilidad sujeta a procedimientos estrictos. No requiere información previa del genoma, utiliza iniciadores universales y una pequeña cantidad de ADN. Se aplica en el desarrollo de mapas genéticos, mapeo de características específicas en poblaciones, huella de ADN, análisis de germoplasma, distancias genéticas entre individuos y estimaciones relativas de contribuciones parentales entre individuos.

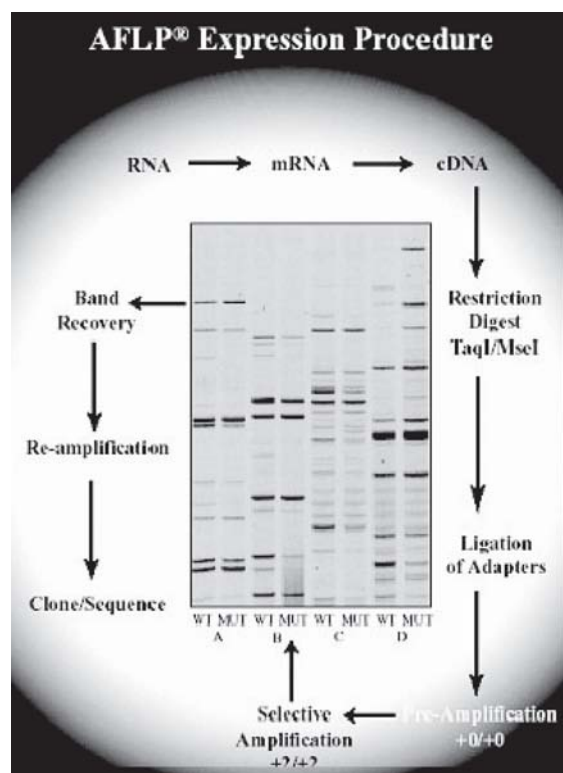


Fig. 1. Diagrama de flujo para el desarrollo de la técnica de AFLP's

Ralph

Esta técnica se utiliza mucho para analizar un número moderado de muestras con baja cantidad de resolución, también para mapeo de genes en mamíferos y plantas. Son marcadores genéticos codominantes, y pueden o no requerir información de la secuencia de ADN, pueden utilizarse para detectar mutaciones conocidas.

Ecotilling

Es un método similar al Tilling (targeting induced local lesions in genomes). De alto rendimiento para detectar SNP. No utiliza mutágenos químicos para inducir mutaciones, sino el principio de formación de heterodúplex y corte enzimático en la posición del cambio nucleótido, con monitoreo fluorescente, utilizada para el descubrimiento de SNP en humanos y plantas.

Análisis de secuencias repetidas, localizadas a lo largo del genoma

Análisis de minisatélites (MVR)

Los minisatélites son *loci* de ADN polimórfico que se encuentran a lo largo de todo el genoma. Son secuencias de 9 a 100 pb repetidas hasta 1000 veces. Se han usado para pruebas de identificación individual, pedigrí, análisis de ligamiento, mejoramiento de plantas, estudios poblacionales, huella de ADN; además para marcadores genéticos en enfermedades como brucelosis, incluyendo cáncer y mutación en células geminales. El análisis puede realizarse mediante digestión sencilla del ADN con enzimas de restricción, registrando el patrón de bandas características mediante electroforesis en gel.

Microsatélites

Son repeticiones de secuencia simple (SSR) o repeticiones de secuencia corta (STR), de 1 a 6 pb, presentan alto nivel

de heterocigotos, herramientas útiles para diagnóstico de enfermedades, pruebas de identidad y forense, estructura poblacional, son altamente polimórficos y fáciles de analizar. Pudiera decirse que el uso de microsatélites ha revolucionado el análisis genético. Las pruebas actuales de paternidad e identidad de humanos se basan en el análisis de microsatélites.

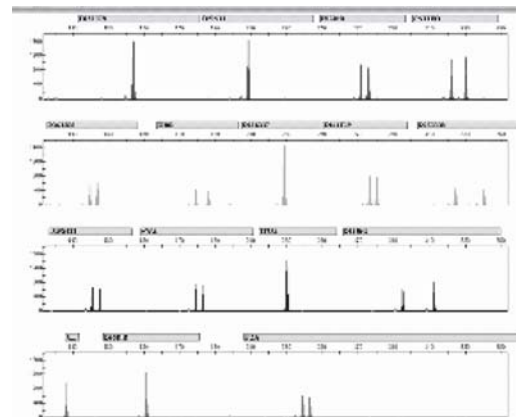


Fig. 2. Uso del análisis de microsatélites para determinar paternidad.

Herramientas para la búsqueda y confirmación de nuevas mutaciones

Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP)

Método utilizado para separar las cadenas de polinucleótidos (nativas y mutadas), en geles no desnaturizantes, se analiza la movilidad electroforética que depende de la secuencia del fragmento y la posición de la mutación. El fragmento de ADN se amplifica por PCR y debe ser menor de 400 pb, que haya una buena detección de los cambios en la secuencia. Las condiciones de análisis se optimizan de acuerdo al fragmento de ADN, el método es laborioso pero se reportan modificaciones para automatizarlo mediante electroforesis capilar.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Las moléculas de ADN, hasta con un nucleótido diferente, pueden separarse mediante electroforesis en geles con

gradiente de concentración de un agente desnaturizante como la urea o formamida. La técnica fue originalmente diseñada para detectar mutaciones puntuales en muestras clínicas, se utiliza para medir la diversidad molecular de poblaciones microbianas y otros organismos, a diferencia de la técnica de SSCP, DGGE puede distinguir variaciones en fragmentos de ADN de 1a2 kb.

Análisis heterodúplex (HDA)

Puede utilizarse en conjunto con el análisis de SSCP para lograr detectar variaciones que no se distinguen mediante SSCP. Útil para diferenciar la movilidad electroforética inducida por un anillo (*loop*) y para la detección de mutaciones en ADN mitocondrial.

Rompimiento químico o enzimático

Esta metodología se utiliza cuando se desea romper en el punto de cambio del nucleótido; para analizar posteriormente el tamaño y secuencia de los fragmentos, se usan nucleasas y compuestos químicos como el tetróxido de osmio, permanganato de potasio e hidroxilamina. Se utiliza para descubrimiento de nuevas mutaciones o diagnóstico de mutaciones conocidas.

Detección de mutaciones puntuales: ARMS (Amplification refractory mutation system)

Por su especificidad, se ha aplicado en diagnósticos de cáncer, se basa en el uso de iniciadores con el oligonucleótido involucrado en el cambio, lo que permite que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ensayo consiste en realizar dos pruebas complementarias de PCR y la presencia o ausencia del producto de PCR indica el genotipo de la muestra.

Cromatografía en condiciones desnaturizantes (DHPLC)

Es un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento, aplicado a la detección de variaciones en fragmentos menores de 1000 pb, los avances en esta tecnología permiten la automatización y procesamiento de mayor cantidad de muestras en menor tiempo que los métodos en gel DGGE y SSCP. Algunas aplicaciones de la técnica de DHPLC incluyen la discriminación alélica, mapeo de genes, análisis de microsatélites, cuantificación de expresión génica, aislamiento de clonas para secuenciación, análisis mutacional de genes candidato. Este tipo de cromatografía requiere del uso de columnas especiales que distingan el heterodúplex y realicen la separación por tamaño de los fragmentos de polinucleótidos. Un requisito importante para la identificación de mutaciones es la optimización del gradiente de temperatura y solventes, aunque algunas aplicaciones manejan condiciones isocráticas e isotérmicas. Al igual que otros métodos se requiere de secuenciación para la confirmación o identificación de mutaciones.

Ligación de oligonucleótidos (OLA)

Técnica utilizada para obtener una mayor especificidad en la detección de mutaciones que la obtenida en ensayos normales de una sonda, su especificidad radica en el uso de dos sondas que alinean muy cerca una de otra en el ADN para después ligarse. Este método utiliza varios pares de sondas y para volverse múltiple y detectar diferentes alelos. Varias mutaciones puntuales se han detectado de manera múltiple, como en la enfermedad de fibrosis quística, en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*, en individuos positivos al subtipo HIV-1, en la genotipificación del gen miostatina.

Secuenciación

Los procedimientos de secuenciación de ADN más utilizados se basan en el método enzimático descrito por Sanger, en 1977. Aplicaciones derivadas de la secuenciación son: la comparativa, los diferentes tipos de genotipificación como AFLP, estudios de paternidad, búsqueda y validación de mutacio-

nes, descubrimiento y validación de SNP, identificación de microorganismos basada en secuencias específicas y otros polimorfismos.

Metodología utilizada para confirmar y buscar nuevas mutaciones, método molecular de alta resolución, caro por la inversión inicial en equipo, pero muy recomendado por la exactitud de sus resultados. Una técnica de secuenciación para determinar variaciones nucleótidas es el SNPshot (Applied Biosystems), mediante el cual se detectan a lo largo de la secuencia del ADN los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Otras aplicaciones en el estudio de mutaciones son la investigación clínica, forense, secuenciación de genomas, diagnóstico molecular, fármaco-genómica y pruebas de paternidad. El uso de las herramientas moleculares para estudiar la variación genética y la secuenciación del genoma humano y de otros organismos ha permitido desarrollos biotecnológicos a nivel de genética humana, animal y vegetal, y se ha logrado explicar con mayor detalle la biodiversidad y procesos evolutivos.

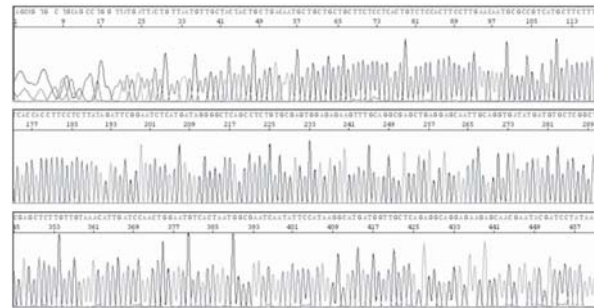


Fig. 3. Electroferograma de una reacción de secuenciación con cuatro fluorocromos.

Referencias

1. Taylor G. R. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. CRC Press USA.
2. Frayling I.M. 2002. Methods of molecular analysis: mutation detection in solid tumours. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 55:73-79.
3. Yan H and Zhou W. 2004. Allelic variations in gene expression. *Current Opinion in Oncology.* 16:39-43
4. Anollés C.G., Gresshoff M.P., 1997. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Library of Congress. USA.