



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

AUTOR

AÑO



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA TIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS
DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs) EN EL GEN *HIF-2 α* INVOLUCRADOS EN
LA RESPUESTA ADAPTATIVA A HIPOXIA POR ALTURA MEDIANTE
SNaPshot® Multiplex

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autor

Miguel Mateo Ruano Chávez

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster universitario en Biotecnología Molecular y Celular de plantas

C.C: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fabio Marcelo Idrovo Espín

Doctor en Ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)

C.C: 170595225-5

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Miguel Mateo Ruano Chávez

CC: 172246240-3

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, por brindarme salud y voluntad durante mi formación como profesional. Quiero agradecer a mis papás, por su apoyo y por haberme permitido estudiar en esta institución. Adicionalmente, a mi hermano, por su fraternidad, y a mi novia, con quien compartí innumerables horas de clase y de quién aprendí a dar el máximo para cumplir mis metas.

Quisiera agradecer también a mi Director Científico, M.Sc. Germán Burgos Figueroa, quien fue el responsable de guiarme e instruirme en las técnicas requeridas para culminar este proyecto y por sus consejos de vida. Finalmente, agradezco a la Universidad de las Américas por haberme apoyado económicamente con una beca y por ofrecerme una educación de calidad durante mi carrera como Ingeniero.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a mis padres, Rosario y Miguel, por sus consejos y criterios, que me ayudaron a formar mi carácter y a que con su apoyo económico conseguí convertirme en profesional. A mis abuelitos, Laurita y Jorgito, que estuvieron pendientes y cuidando de mí, desde mis primeros pasos. A mis abuelitos, María y Buenaventura, espero enorgullecerlos a pesar de que ya no se encuentren a mi lado. A mi novia Nikole, por ayudarme a explotar mi potencial académico y por su apoyo moral en este trabajo. En especial le dedico este trabajo a mi hermano menor, Josué, quien cada día me recuerda que siempre existen motivos para ser feliz y que el estudio es apasionante. Finalmente, al resto de mi familia que supieron valorar mi esfuerzo y dedicación, y a quienes nunca les han faltado palabras de aliento.

RESUMEN

El Factor Inducible por Hipoxia 2- α (*HIF2- α*) es el principal gen involucrado en la adaptación del organismo a condiciones de hipoxia. Este gen codifica para la segunda isoforma de la subunidad alfa del factor transcripcional HIF, que regula la expresión de más de 100 genes asociados a rutas metabólicas dependientes de oxígeno. SNPs en el gen *HIF2- α* , que afectan a la proteína (HIF2- α), se han relacionado con la regulación de la angiogénesis vascular, viscosidad de la sangre y proliferación de hepatocitos, desarrollo de células pancreáticas y placentarias; en enfermedades como isquemia retinal, hipertensión arterial y pulmonar e incluso procesos oncogénicos, como melanoma. La importancia de estudiar SNPs radica en que, dependiendo de su ubicación, tienen profundas implicaciones en el organismo. El método *Gold Standard* para la determinación de SNPs es la secuenciación fluoromarcada por el método Sanger. Sin embargo, tipificar SNPs por este método implica considerable inversión de dinero, tiempo e insumos, puesto que requiere secuenciar ambas hebras del fragmento de ADN. Con el objeto de superar estos inconvenientes, se propuso la tecnología *SNaPshot*[®], que posibilita la genotipificación de hasta 20 SNPs, incluso en diferentes cromosomas, en una sola reacción de PCR *Multiplex* y corrida de electroforesis capilar. Es por esta razón que el principal objetivo del proyecto fue desarrollar el primer protocolo de tipificación que utilice el sistema *SNaPshot*[®] en el Ecuador, empleando como objeto de estudio el gen *HIF2- α* . Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se diseñó un sistema basado en *SNaPshot*[®] para tipificar siete SNPs en el gen *HIF2- α* , mediante un par de *primers* y una sonda por SNP. De este modo, se usaron los ADN control comercial 9948M, 9947A, K562, C007, en base a los cuales se ajustaron las condiciones de la PCR y del juego de reactivos *SNaPshot*[®] *Multiplex*, finalmente, los resultados se validaron con el método *Gold Standard*. En base a la validación y al análisis de costos realizado, se concluyó que el sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex* tiene la misma sensibilidad y especificidad que el método *Gold Standard*, pero es sumamente más económico, rápido y sencillo de implementarlo en el país.

ABSTRACT

Hypoxia Inducible Factor 2- α (*HIF2- α*) is the leading gene involved in the adaptation of the organism to hypoxia conditions. This gene encodes for the second isoform of the alpha subunit of HIF transcriptional factor, which regulates the expression of more than 100 genes associated with oxygen dependent metabolic pathways. SNPs in the *HIF2- α* gene, affecting protein (HIF2- α), have been linked to the regulation of vascular angiogenesis, blood viscosity and hepatocyte proliferation, pancreatic and placental cell development; in diseases, such as retinal ischemia, arterial and pulmonary hypertension, and even oncogenic processes, such as melanoma. The importance of studying SNPs lies in the fact that, depending on their location, they have serious implications on the organism. The *Gold Standard* method for determination of SNPs is the fluorinated sequencing by the Sanger method. However, typing SNPs by this method involves considerable investment of money, time, and supplies, since it requires sequencing both strands of the DNA fragment. To overcome these drawbacks, *SNaPshot*[®] technology was proposed, which allows the genotyping of up to 20 SNPs, even on different chromosomes, in one *Multiplex* PCR reaction and capillary electrophoresis run. It is for this reason that the major aim of the project was to develop the first typing protocol using the *SNaPshot*[®] system in Ecuador, using the *HIF2- α* gene as an object of study. To fulfill the objectives of the present work, a *SNaPshot*[®]-based system was designed to typify seven SNPs in the *HIF2- α* gene, using a pair of *primers* and a probe per SNP. In this manner, the commercial control DNAs 9948M, 9947A, K562, C007, were used, based on which the conditions of the PCR and the *SNaPshot*[®] *Multiplex Kit* were adjusted, finally, the results were validated using the *Gold Standard* method. Based on validation and cost analysis, it was concluded that *SNaPshot*[®] *Multiplex* system has the same sensitivity and specificity as the *Gold Standard* method, but it is extremely economical, fast, and easy to implement in the country.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del Problema	5
1.3 Objetivo General	6
1.4 Objetivos Específicos.....	6
1.5 Justificación de la Investigación.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Introducción a la Técnica de Secuenciación.....	9
2.2 Sistema <i>SNaPshot</i> [®] <i>Multiplex</i>	12
2.3 Gen <i>HIF-2α</i>	17
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	27
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	29
4.1 POBLACIÓN Y MUESTRA	29
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS.....	29
4.2.1 Diseño de <i>Primers</i> y Sondas	29
4.2.2 Electroforesis Cuantitativa de <i>Primers</i> y Sondas	31
4.2.3 Reacción <i>SNaPshot</i> [®] <i>Primer Focus</i> [®]	32
4.2.4 Purificación Enzimática de <i>SNaPshot</i> [®] <i>Primer Focus</i> [®]	33
4.2.5 Montaje de Placas en el Analizador Genético	34
4.2.6 Reacción de PCR <i>Singleplex</i>	34
4.2.7 Purificación Enzimática de Productos de PCR <i>Singleplex</i>	35
4.2.8 Reacción <i>SNaPshot</i> [®] <i>Singleplex</i>	36
4.2.9 Reacción de PCR <i>Multiplex</i>	37
4.2.10 Reacción <i>SNaPshot</i> [®] <i>Multiplex</i>	38
4.2.11 Ajuste de Señal de los Genotipos	39
4.2.12 Método <i>Gold Standard</i>	39
4.3 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS	41
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1 Diseño de <i>Primers</i> y Sondas	42

5.2 Reacción <i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ®.....	48
5.3 Purificación Enzimática de Productos de <i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ®.....	52
5.4 Reacción de PCR <i>Singleplex</i>	53
5.5 Purificación Enzimática de Productos de PCR <i>Singleplex</i>	56
5.6 Reacción <i>SNaPshot</i> ® <i>Singleplex</i>	58
5.7 Ajuste de Señal de los Genotipos.....	62
5.8 Reacción de PCR <i>Multiplex</i>	65
5.9 Reacción <i>SNaPshot</i> ® <i>Multiplex</i>	67
5.10 Secuenciación Sanger.....	71
5.11 Validación Estadística.....	72
5.12 Implicaciones del Proyecto	74
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	76
6.1 Conclusiones	76
6.2 Recomendaciones	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXOS	87

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios en torno al genoma humano, particularmente entre la relación que existe con enfermedades o patologías de alta incidencia en la población. De esta manera se han desarrollado una amplia variedad de métodos y protocolos para la identificación de casos en los se sospeche o se haya confirmado, mediante técnicas diagnósticas, que esas enfermedades y/o patologías están asociadas con mutaciones presentes en determinados genes (Jain, 2015).

Un claro ejemplo es la investigación que demostró que la sobreexpresión del gen *Basigina (Bsg)* tiene incidencia en el desarrollo tumoral de melanoma maligno. Esto ocurre cuando el mecanismo del cual forma parte la proteína BSG interactúa con otros mecanismos mediados por las proteínas Factor Inducible por Hipoxia 2- α (HIF-2 α de sus siglas en inglés *Hipoxia-Inducible Factor-2 α*) y Receptor-2 del Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-2 de sus siglas en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) (Bougatef et al., 2010).

Por otro lado, en la actualidad es imposible que en todos los países del mundo existan métodos de identificación o de diagnóstico temprano para todas las enfermedades y patologías que estén asociadas con alteraciones en el genoma humano (Vignal, Milan, SanCristobal y Eggen, 2002). No obstante, los métodos desarrollados o en proceso de desarrollo se basan en el uso de marcadores moleculares. Entre estos marcadores se encuentran las Repeticiones Terminales Largas (LTR de sus siglas en inglés *Long Terminal Repeat*), Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP de sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*), Loci de Caracteres Cuantitativos (QTL de sus siglas en inglés *Quantitative Trait Loci*), Repeticiones Cortas en Tándem (STRs de sus siglas en inglés *Short Tandem Repeats*), entre otros. Para que estas alteraciones sean consideradas como marcadores moleculares polimórficos deben

representar un porcentaje de incidencia mayor al 1 % dentro de una población (Jain, 2015; Vignal et al., 2002).

A pesar de la gran cantidad de métodos para la detección de mutaciones en los alelos, cabe mencionar los de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP de sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) ya que usan enzimas de reconocimiento específico para cortar la doble hélice del ADN (Chuang et al., 2006) y determinar las variantes de genotipos en base a distintos tamaños de los fragmentos tras una corrida electroforética. De esta forma, durante varios años, los métodos para detectar marcadores moleculares se basaron en diversos tipos de secuenciación tradicional, en geles de agarosa y poliacrilamida (Jain, 2015). Uno de los métodos principales y el “*Gold Standard*”, es la secuenciación Sanger, a partir del cual se deriva el funcionamiento de los equipos de secuenciación actuales. En la secuenciación Sanger se amplifican ambas hebras de un determinado segmento de la cadena del ADN, con terminadores fluoromarcados, para reunir la información de los alelos de cada cromosoma (Jain, 2015). En el caso de buscar un polimorfismo de una sola base (SNP) por secuenciación Sanger, en la secuencia a analizar, se realiza todo el procedimiento para obtener la información de ambas cromosomas, denominada genotipo (Bihlmeyer et al., 2014).

Es así que Applied Biosystems (2005b) desarrolló una técnica basada en la secuenciación Sanger, el Sistema *SNaPshot® Multiplex*, el cual ha sido de gran utilidad para detectar los marcadores moleculares que más se presentan en el genoma humano, conocidos como SNPs. Estos polimorfismos tienen menores tasas de mutación que los LTRs y son analizables fácilmente por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Sanchez et al., 2006). Los SNPs se encuentran, aproximadamente, en proporción de 1 por cada 1000 pares de bases (pb) (Jain, 2015; Vignal et al., 2002).

De esta manera, el objetivo del Sistema *SNaPshot® Multiplex* es genotipificar SNPs dentro de una secuencia de ADN, mediante sondas frías o sin marcaje con fluorocromos, y el uso de ddNTPs (terminadores de la reacción de amplificación dideoxi fluoromarcados), para amplificar solamente las bases correspondientes a los polimorfismos requeridos (Applied Biosystems, 2005b).

En base al sistema *SNaPshot® Multiplex* algunas mutaciones puntuales de nucleótido simple han sido genotipificadas para realizar estudios de correlación con patologías relevantes. Tal es el caso de la enzima metabolizadora de fármacos del Complejo Enzimático Citocromo P450 (CYP2D6 de sus siglas en inglés *Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6*), en la cual, en su secuencia de ADN se han podido detectar más de 70 SNPs, que se han relacionado con la efectividad y seguridad de los fármacos, debido a que esta enzima metaboliza cerca del 25 % de todos los xenobióticos que ingresan al organismo (Ben et al., 2016).

Por otro lado, la identificación de SNPs en genes que se ven involucrados en respuestas patológicas a factores externos, como en el caso del gen *HIF-2 α* , han sido de gran relevancia en los últimos años (Basang et al., 2015). El gen *HIF-2 α* ha sido estudiado en numerosas ocasiones debido a que, se ha observado que ciertos SNPs en su secuencia juegan diversos roles en el organismo (van Patot y Gassmann, 2011). El gen *HIF-2 α* codifica para la subunidad HIF-2 α del factor transcripcional HIF, razón por la cual, alteraciones en la secuencia del gen, afectan la funcionalidad del factor de transcripción. Estas alteraciones desencadenan en múltiples patologías como la eritrocitosis o incremento desmesurado del nivel de eritrocitos en la sangre (Jang et al., 2014), debido a que juega un rol clave en la producción de eritropoyetina (Moore, 2008).

Adicionalmente, una de las principales actividades de la subunidad HIF-2 α es regular la angiogénesis vascular en estructuras como la placenta, el corazón y los pulmones (Kasimanickam et al., 2010). De este modo, la funcionalidad de la subunidad HIF-2 α tiene implicaciones directas en enfermedades cardíacas y

respiratorias, además, también regula la proliferación de hepatocitos en el hígado (Lin et al., 2014).

No obstante, la principal función del gen *HIF-2 α* es regular la respuesta del organismo a condiciones de hipoxia, es decir deficiencia de oxígeno en el torrente sanguíneo, producida por ubicaciones geográficas con altitudes superiores a los 2000 m.s.n.m. (van Patot y Gassmann, 2011). Esto representa profundas implicaciones, ya que la variación de presión hidrostática, producida por la altura geográfica, afecta a los condrocitos, que mantienen la estructura celular (Inoue et al., 2015). Por esta razón, se ha estudiado el papel del gen *HIF-2 α* en procesos de adaptación a variaciones de altura, tanto en animales como en personas (Scheinfeldt, 2010). En el caso del ser humano, se han realizado investigaciones a nivel genotípico y funcional del gen *HIF-2 α* en individuos de la República Rusa del Cáucaso (Pagani et al., 2012) y en pobladores del Tíbet (Hanaoka et al., 2012), en ambos casos demostrando la incidencia directa de los SNPs en la respuesta de hipoxia por adaptación a las variaciones de altura.

Asimismo, en animales, como por ejemplo las cabras del Tíbet, se ha demostrado la diferenciación en el gen *HIF-2 α* entre algunas poblaciones, debido a la adaptación que estas tienen por habitar en sitios ubicados a más de 3000 m.s.n.m. (Song et al., 2016). Por tal motivo se puede concluir que el gen *HIF-2 α* juega un papel clave en la respuesta adaptativa de hipoxia por variación de altura (Mowat et al., 2010). No obstante, a pesar de las múltiples afecciones que ocurren como resultado de la presencia de SNPs en el gen *HIF-2 α* , no se han realizado estudios o se han desarrollado técnicas, para diagnosticar de manera rápida, económica y sensible estas alteraciones, tanto en el Ecuador, como a nivel mundial.

1.2 Planteamiento del Problema

Las regiones montañosas del Ecuador se elevan hasta una altitud de más de 6000 m.s.n.m., con zonas habitadas por personas hasta los 4300 m.s.n.m., como en el caso de los pobladores del Cantón Chunchi, en la provincia de Chimborazo (Vance, 2012). Debido a que la disponibilidad de oxígeno es menor en cuanto se incrementan los metros sobre el nivel del mar, el gen *HIF-2 α* , que regula la adaptabilidad a la hipoxia, juega un papel activo para las rutas metabólicas dependientes de oxígeno, particularmente en los cerca de seis millones de habitantes de la serranía ecuatoriana, que se encuentran a una altura promedio de 2500 m.s.n.m. (Vance, 2012). Adicionalmente, se sabe que en el Ecuador, las enfermedades como diabetes, cardiovasculares, los tipos de cáncer y pulmonares crónicas, en el año 2011 correspondieron al 35.3 % de la tasa de mortalidad en personas menores de 70 años (Vance, 2012). A excepción de la diabetes, estas enfermedades mencionadas se relacionan con la regulación metabólica del oxígeno, ejercida por la subunidad *HIF-2 α* , y a pesar de su alta tasa de mortalidad, no se han desarrollado estudios o técnicas diagnósticas moleculares, de carácter preventivo, para SNPs en genes relacionados, como en el gen *HIF-2 α* .

De esta manera, los SNPs presentes en el gen *HIF-2 α* , dependiendo de su ubicación, pueden afectar a la salud de personas que habitan la serranía ecuatoriana, ya que podrían ser los agentes causantes para que estas personas sean propensas a contraer enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diversos tipos de cáncer, entre otras (Scheinfeldt, 2010). No obstante, los métodos actuales para identificación de SNPs son exhaustivos y toman varias horas, como la secuenciación Sanger tradicional, o en otros casos son costosos y con extensos periodos de espera, debido a que las muestras se deben enviar a otro país para ser secuenciadas.

Adicionalmente, se sabe que la detección de un solo genotipo mediante secuenciación Sanger es un método más de doce veces más costoso que el

SNaPshot® Multiplex (Applied Biosystems, 2005b). Esto se debe a que, para detectar un solo genotipo por secuenciación Sanger, es decir, los alelos de cada cromosoma correspondientes al SNP que se está identificando, se deben secuenciar ambas hebras. Por otro lado, empleando el método *SNaPshot® Multiplex* se pueden identificar hasta veinte genotipos de SNPs en una sola reacción (Sanchez et al., 2006). Sin embargo, tanto a nivel mundial como nacional, no existen métodos de detección temprana de SNPs en el gen *HIF-2α*, a pesar de que existe tecnología, como el sistema *SNaPshot®* y los antecedentes e investigaciones suficientes como para justificar el desarrollo de la técnica novedosa y barata de diagnóstico.

1.3 Objetivo General

Desarrollar un protocolo de tipificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de importancia en la respuesta adaptativa a hipoxia por altura mediante el sistema de mini-secuenciación *SNaPshot® Multiplex Kit*.

1.4 Objetivos Específicos

- Normalizar un protocolo de tipificación de cinco SNPs identificados en la respuesta adaptativa a hipoxia por altura en el gen factor inducible por hipoxia-2 alfa (*HIF-2α*) empleando el sistema *SNaPshot® Multiplex Kit*.
- Evaluar el desempeño del protocolo de detección de los SNPs mediante el sistema *SNaPshot® Multiplex Kit* en el gen factor inducible por hipoxia-2 alfa (*HIF-2α*) con el método *Gold Estándar* (Secuenciación Sanger) siguiendo las normativas internacionales existentes.

1.5 Justificación de la Investigación

Estandarizar un protocolo para la detección de polimorfismos de nucleótido simple en el gen *HIF-2 α* , en la población ecuatoriana, proporcionaría una poderosa herramienta para combatir patologías asociadas con hipoxia, como son las enfermedades cardiovasculares y respiratorias. Adicionalmente, establecer el protocolo para la detección de estas mutaciones en el gen *HIF-2 α* con muestras de ADN de ecuatorianos también se convertiría en el punto de apertura para un estudio más detallado, real y robusto de las implicaciones de los polimorfismos de nucleótido simple y sus efectos en la población ecuatoriana.

Por otro lado, si bien se han realizado algunos estudios de los efectos de mutaciones en el gen *HIF-2 α* con genes ortólogos de cabras, ratones, cerdos, yaks, entre otros, (Song et al., 2016) así como en poblaciones humanas como en los habitantes del Tíbet (Basang et al., 2015; Beall et al., 2010), este enfoque podría ser utilizado para desentrañar, en gran medida, los efectos a los que se somete el ser humano por la variación de altitud, que son regulados por la subunidad HIF-2 α (Hanaoka et al., 2012).

Con tal objeto se planea utilizar el *SNaPshot® Multiplex*, ya que es un método que a la larga es más económico que otros enfoques, es más rápido y eficaz que otras técnicas para identificar estos marcadores moleculares; además, es extremadamente sensible, ya que detecta un 5 % de ADN mutado en una muestra de ADN total (Applied Biosystems, 2005b). Un ejemplo de su ventaja frente a la secuenciación Sanger es que en una sola reacción se pueden identificar hasta veinte SNPs (Sanchez et al., 2006), mientras que en la secuenciación Sanger se requieren secuenciar ambas hebras del ADN, siendo mucho más costoso. Por otro lado, en comparación con la técnica de RFLPs, el sistema *SNaPshot® Multiplex* es sumamente ágil, ya que no requiere de realizar el corte de las dos hebras de ADN y es altamente específico (Bihlmeyer et al., 2014), ya que su visualización no ocurre en geles de agarosa o poliacrilamida para determinar el genotipo, como con los RFLPs (Applied Biosystems, 2005b).

Con el protocolo se podrían diseñar tratamientos, cuidados y métodos preventivos enfocados, de manera personalizada, para una persona desde la niñez y evitar futuras complicaciones de salud, reduciendo las tasas de mortalidad en la población ecuatoriana al emplear un método eficiente y efectivo.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción a la Técnica de Secuenciación

Las técnicas de Biología Molecular comprenden el conjunto de procedimientos de laboratorio que permiten aislar, estudiar, visualizar y manipular las biomoléculas presentes en una muestra biológica, de manera práctica y sistemática (Jain, 2015). Por consiguiente, estas técnicas han proporcionado y complementado información detallada y precisa acerca del funcionamiento, componentes, estructuras y filogenia de los seres vivos, así como de entidades virales, a nivel molecular (Naidoo, Pawitan, Soong, Cooper y Ku, 2011).

Una de las principales técnicas dentro de la Biología Molecular es la secuenciación de Ácido Desoxirribonucleico (ADN). Su función es la de develar el orden exacto de bases nitrogenadas en la porción de material genético en una determinada muestra (Hutchison, 2007). En consecuencia, esta metodología fomentó el desarrollo de la Biología Molecular y de las ciencias biológicas en ramas afines e incluso sentó las bases para algunas nuevas (Jain, 2015).

El primer método de secuenciación fue publicado por Wu (1970), el cual se basó en nucleótidos marcados radioactivamente con el isótopo de fósforo 32 (P^{32}) en el extremo 3' de fragmentos de ADN que se obtenían empleando enzimas con actividad exonucleasa 3'-5', extraídas de *Escherichia coli* (Wu, 1970). En estudios posteriores Padmanabhan y Wu (1972) mejoraron el método para secuenciar cualquier fragmento de ADN. Para ello usaron octanucleótidos marcados con P^{32} , a manera de *primers*, logrando que estos adicione entre uno a ocho nucleótidos marcados, al fragmento de ADN (Padmanabhan y Wu, 1972).

Después, se propuso el método *Plus and Minus* en 1975 por Frederick Sanger y Alan Coulson, el cual permitía secuenciar un mayor número de nucleótidos en fragmentos de ADN. Para conseguirlo emplearon marcaje radioactivo de uno de los dNTPs con P^{32} , para la secuencia *Minus*, y dNTPs sin marcar para la

secuencia *Plus* (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977). No obstante, solamente se pudo obtener el orden de los nucleótidos a partir de un molde de ADN de hebra simple, por lo que se requería de un único *primer*.

No obstante, los métodos de secuenciación química de Allan Maxam y Walter Gilbert, así como la secuenciación Sanger, son considerados como los métodos de secuenciación de primera generación y la base de las técnicas de secuenciación actuales (Jain, 2015). En el método químico también se marcaron los fragmentos de ADN con P^{32} , pero en el extremo 5' (Hutchison, 2007). Los fragmentos se leían desde el inicio del extremo marcado hasta el nucleótido del extremo. Los cortes del fragmento de ADN se realizaban empleando sustancias químicas específicas para cada base nitrogenada y la secuencia se leía al comparar los fragmentos marcados en un gel de electroforesis (Maxam y Gilbert, 1977).

Sin embargo, el método Sanger fue un hito en la historia, ya que logró secuenciar el primer genoma completo, el del *bacteriófago Phi-x174* (Sanger et al., 1977). Este método fue reconocido por ser relativamente rápido y sencillo, en comparación con los métodos anteriores (Naidoo et al., 2011), ya que se basó en el uso de ddNTPs, para terminar o inhibir el proceso de elongación de la secuencia, en cuatro reacciones separadas (Sanger, 1981). Adicionalmente, se marcó el extremo 5' de la hebra de ADN con P^{32} y se empleó un *primer* para que la ADN polimerasa tipo I realice la elongación y produzca fragmentos de distintos tamaños (Sanger, 1981). Finalmente, se colocaron en paralelo los resultados de las cuatro reacciones de ddNTPs (Adenina, Guanina, Timina y Citosina), para leerlos por electroforesis en un gel y obtener la secuencia de ADN (Hutchison, 2007).

Posteriormente, sucedieron algunos acontecimientos que mejoraron los métodos de secuenciación (Hutchison, 2007). En primer lugar, la fundación de *Applied Biosystems* en 1981 por Andre Marion y Sam Eletr (Springer, 2006). Después, la creación de bases de datos como *GenBank* en 1982 por Walter Goad (Hutchison,

2007). Posteriormente, el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) por Kary Mullis en 1983 (Jain, 2015).

Sin embargo, uno de los mayores avances para la secuenciación de ADN fue su automatización, llevado a cabo por el grupo de *Applied Biosystems* en 1986 (Huang, Quesada y Mathies, 1992). Para ello usaron como base el método de secuenciación Sanger, modificando el modo de lectura de las bases nitrogenadas, al realizar la lectura en una sola hilera, mediante electroforesis capilar y otorgando un color particular a cada una de las cuatro bases nitrogenadas, a manera de ddNTPs (Springer, 2006). De esta manera surgió la secuenciación enzimática fluoromarcada por el método Sanger, seguida de electroforesis capilar, la cual es el método *Gold Standard* para validar las nuevas técnicas de secuenciación (Jain, 2015).

A partir de este acontecimiento se comenzaron a desarrollar otras técnicas de secuenciación (Jain, 2015; Shendure y Ji, 2008) y en consecuencia, se empezaron a utilizar los equipos de secuenciación en distintos laboratorios de investigación, diagnósticos, forenses e incluso en casos judiciales (Hutchison, 2007). Los equipos de secuenciación utilizan colorantes de tamaño estándar, que funcionan a manera de marcador de peso molecular como la *LIZ*[®] y el *ROX*[™] de *GeneScan*[™] (Applied Biosystems, 2005a). También, emplean juegos de reactivos que añaden la coloración a cada base nitrogenada, como los juegos de reactivos *BigDye*[®] *Terminator* de *ThermoFisher Scientific* (Applied Biosystems, 2005a).

Un elemento fundamental para analizar las muestras en los equipos de secuenciación es un polímero que permite que las muestras corran a través de los capilares (Huang et al., 1992). Dependiendo de la resolución deseada, de menor a mayor, se utilizan el *POP-4*[™], *POP-6*[™] y *POP-7*[™], respectivamente (Applied Biosystems, 2010).

De esta manera, el Proyecto del Genoma Humano se concluyó gracias a las distintas técnicas de secuenciación y permitió obtener numerosas implicaciones para las ciencias biomédicas (Naidoo et al., 2011), como la posibilidad del diagnóstico molecular, la genética aplicada, la farmacogenómica, la medicina personalizada, entre otras (Hutchison, 2007; Naidoo et al., 2011). Posteriormente se desarrollaron nuevas técnicas de secuenciación conocidas como segunda generación y “*Next Generation*”, sin embargo, requieren de una fuerte inversión inicial y analizar gran cantidad de datos constantemente (Shendure y Ji, 2008).

Es así que mediante estas técnicas de secuenciación y el Proyecto del Genoma Humano, se lograron determinar los denominados marcadores moleculares en el ADN (Hutchison, 2007). Sin embargo, la relación que estas tienen con enfermedades o patologías son aún estudiadas y los métodos para identificarlas o realizar diagnósticos preventivos, en el caso de que se haya confirmado patologías asociadas, son varios y aún se encuentran en etapa de desarrollo u optimización (Vignal et al., 2002).

2.2 Sistema *SNaPshot*[®] Multiplex

Un enfoque de secuenciación que ha sido de utilidad para detectar los marcadores moleculares con mayor incidencia en el genoma humano, que son los SNPs, es el sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex*, el cual se empezó a desarrollar en los primeros años del 2000 por *Applied Biosystems* (Applied Biosystems, 2005b). Debido a que la importancia de estudiar a los SNPs radica en que constituyen cerca de tres millones dentro de bases dentro del genoma del ser humano (Jain, 2015).

De este modo, el sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex* constituye una metodología rápida, económica y sensible para amplificar una sola base tipo SNP, mediante una reacción de mini-secuenciación, basándose en el enfoque Sanger y empleando un equipo de secuenciación de electroforesis capilar (Applied Biosystems, 2005b). Adicionalmente, este sistema de tipificación de SNPs puede

detectar en una sola reacción en *Multiplex* hasta veinte SNPs simultáneamente (Sanchez et al., 2006), lo cual reduce el tiempo y costo de análisis (Applied Biosystems, 2005b).

El sistema *SNaPshot*[®] funciona en dos etapas, la primera tiene por objetivo obtener un amplicón que contenga al SNP, lo más al centro de la secuencia posible, para lo cual es necesario diseñar un par de *primers* (*Forward* y *Reverse*) fríos o sin marcar (Applied Biosystems, 2005b). Para la segunda etapa, se diseñan sondas, igualmente frías o sin marcar, una por cada SNP, las cuales deben unirse al amplicón y terminar en la base anterior al SNP, para que los ddNTPs se unan solamente en la posición del SNP (Applied Biosystems, 2005b). Estas sondas se suelen diseñar con colas de polinucleótidos, con la finalidad de darles distintos tamaños, pero específicos, a las señales de las bases nitrogenadas de cada SNP y que las señales de otros SNPs, representados por picos con un color para cada base nitrogenada, no se encuentren en un mismo punto en la lectura final.

El sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex* está conformado por la acción conjunta de dos juegos de reactivos, divididas en dos etapas generales. La primera etapa emplea el juego de reactivos *SNaPshot*[®] *Primer Focus*[®] (Ben et al., 2016), en donde se predice la migración de los alelos, en base a las sondas diseñadas, en un analizador genético de secuencias (Applied Biosystems, 2013). En otras palabras, empleando el juego de reactivos y la sonda diseñada, sin ADN, se amplifican las cuatro posibles bases nitrogenadas que se pueden presentar en el SNP. Cada base nitrogenada está representada por la señal de un pico de un determinado color, con una posición específica para cada uno, tanto para cada base nitrogenada, así como para las bases nitrogenadas de cada SNP, gracias a las colas de polinucleótidos. El diagrama del proceso empleado para realizar la reacción *SNaPshot*[®] *Primer Focus*[®] se encuentra ilustrado en la Figura 1.

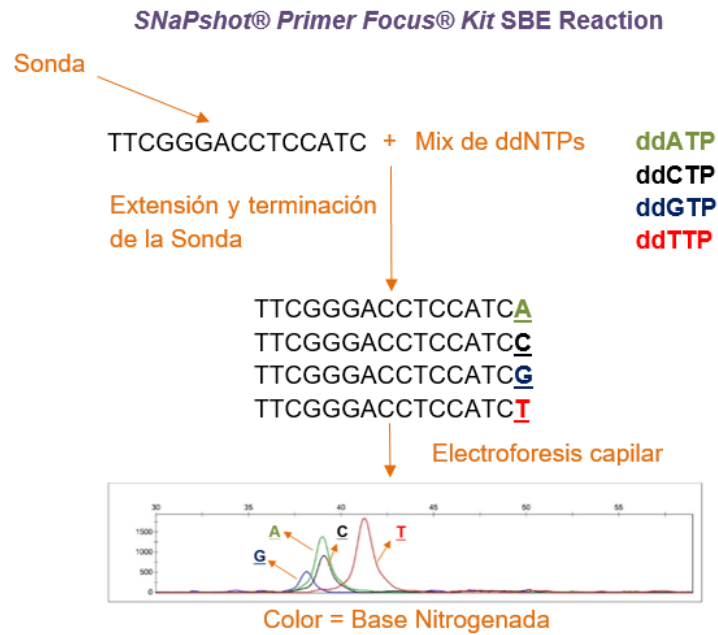


Figura 1. Diagrama de funcionamiento general de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, en donde el color de cada pico es una base nitrogenada distinta.

Este proceso también es conocido como Extensión de una Sola Base (SBE de sus siglas en inglés *Single Base Extension*) (Applied Biosystems, 2013) y sirve para determinar la ubicación que tendrá cada alelo, representado por las señales de las bases nitrogenadas, cuando se realice la lectura de la reacción con ADN y en *Multiplex*. A partir de la localización de cada señal, de las bases nitrogenadas, se ingresan en el equipo solamente las posiciones de las señales que pueden presentar cada SNP. Generalmente, un SNP puede presentar de dos a tres variantes de alelos, es decir, de las cuatro bases nitrogenadas puede presentar dos o tres. Adicionalmente, en el caso de los humanos, la información genética se agrupa en pares de cromosomas, por lo cual, máximo serán dos alelos los que se leerán por SNP, pudiendo ser homocigotos si en ambos cromosomas los alelos del SNP son los mismos y heterocigotos en el caso de que en un cromosoma se encuentre un alelo y en el otro un alelo distinto.

De este modo, en el equipo se ingresan las posiciones de las señales de las bases nitrogenadas por cada SNP. En el caso del ADN humano, se ingresan las

dos o tres posiciones de las bases nitrogenadas que se esperan para cada SNP. Los datos son ingresados a manera de rango, para que, cuando se analice una muestra y se detecte una base nitrogenada que se encuentre dentro de esa posición, automáticamente el equipo indique que se trata de una base nitrogenada específica, de un SNP determinado. A estos rangos se los denomina *bins* y en humanos, generalmente, existirán dos, uno por cada alelo, para cada SNP. En otras palabras, cuando se analice una muestra de ADN humano y existan señales de nucleótidos dentro de los rangos o *bins* creados se sabrá qué alelos posee un determinado SNP, por el color y la posición de pico, además de determinar el genotipo (homocigoto o heterocigoto) (Applied Biosystems, 2005a).

La segunda etapa consiste en la utilización del juego de reactivos *SNaPshot® Multiplex* para la puesta a punto del sistema de tipificación de los SNPs seleccionados, en una sola reacción (Ben et al., 2016). De esta manera, el primer paso consiste en utilizar todos los *primers* diseñados (*Forward y Reverse*) para ensamblar una reacción de PCR *Multiplex*, en donde se busca obtener amplicones que contengan hasta veinte SNPs por reacción.

Sin embargo, los productos de PCR deben estar purificados para poder continuar con los siguientes procesos, para lo cual, generalmente, se usan juegos de reactivos especiales o digestiones enzimáticas (Applied Biosystems, 2005b). El siguiente paso consiste en ensamblar la reacción *SNaPshot® Multiplex*, para lo cual se usan las sondas correspondientes a cada SNP. De esta manera se genera la reacción de mini-secuenciación o SBE, al amplificar solamente la base correspondiente al SNP, ya que emplea terminadores dideoxi marcados o ddNTPs (Applied Biosystems, 2005b).

De igual forma que con los productos de PCR, optativamente, los productos de la reacción *SNaPshot®* son sometidos a purificación y después se los evalúa mediante el analizador genético (Ben et al., 2016; Applied Biosystems, 2005b). Sin embargo, los resultados son determinados en base a los resultados de las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* de cada sonda (Applied Biosystems,

2013), para así analizar la ausencia o presencia de los polimorfismos tipo SNP, además de su genotipo en una sola lectura (Applied Biosystems, 2005b), tal como se muestra en la Figura 2. El análisis es realizado automáticamente por el equipo, ya que emplea softwares especializados, como por ejemplo *GeneMapper®*, de *Applied Biosystems* (Applied Biosystems, 2010).

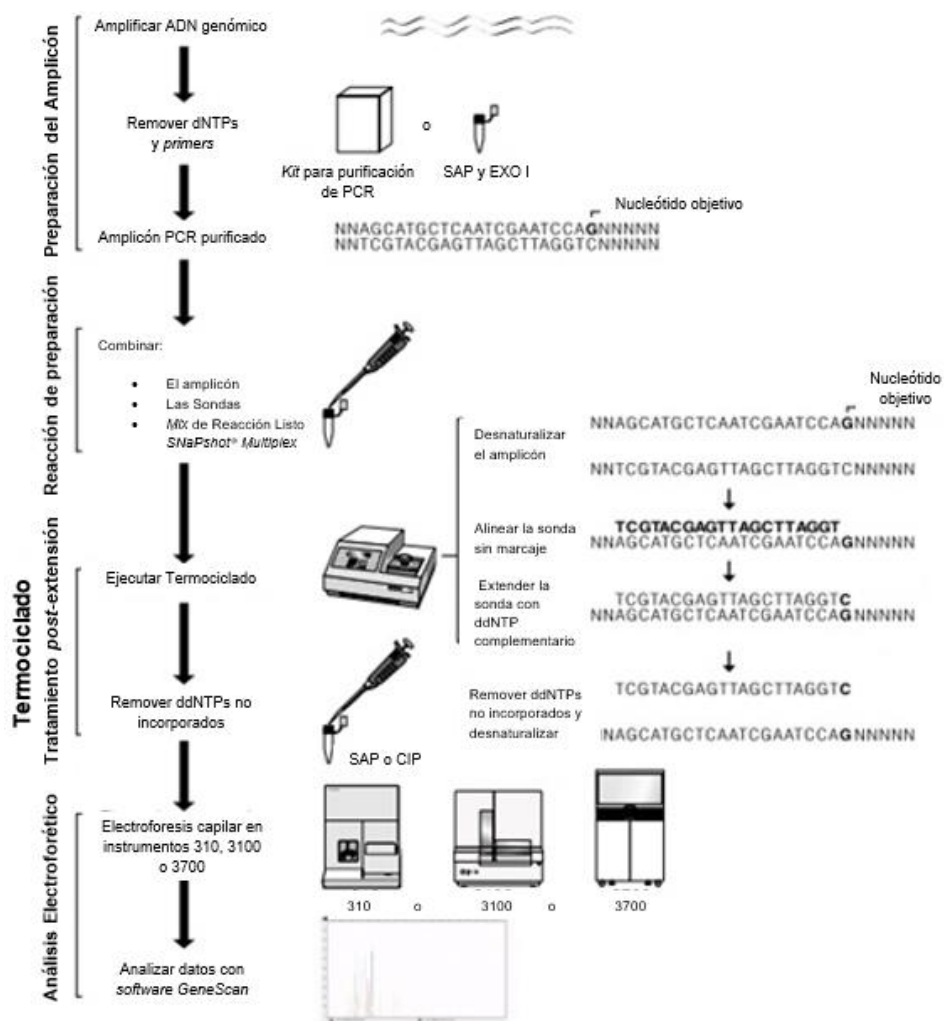


Figura 2. Proceso de elaboración de la reacción *SNaPshot® Multiplex*. Adaptado de Applied Biosystems (2005b).

Es así que, en base al sistema *SNaPshot® Multiplex*, se han realizado varios estudios para beneficiar a las ciencias forenses, como en el caso del grupo de Sanchez et al. (2006) que desarrollaron y validaron un ensayo para tipificar

cincuenta y dos SNPs que se analizan frecuentemente en la población. Sin embargo, debido a la inmensa cantidad de SNPs en el ser humano, así como en cualquier especie biológica (Jain, 2015; Vignal et al., 2002), no se han realizado suficientes estudios para desarrollar protocolos en base al Sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex* o cualquier otra tecnología, para detectar SNPs en gran parte del genoma humano o en genes ortólogos (Hutchison, 2007).

Adicionalmente, se deben realizar más estudios, en determinados genes que se conozca que afectan al bienestar de los organismos, para correlacionar la presencia de determinados genotipos en ciertos SNPs con patologías o enfermedades (Jain, 2015; Vignal et al., 2002). Esto se debe a que, ciertas neoplasias, alteraciones tisulares e incluso predisposición a sufrir otras afecciones y padecimientos bajo determinadas circunstancias, están determinadas por el genotipo (Hutchison, 2007; Jain, 2015).

2.3 Gen *HIF-2 α*

El gen Factor Inducible por Hipoxia 2- α (*HIF-2 α* de sus siglas en inglés *Hipoxia-Inducible Factor-2 α*), también conocido como Proteína Endotelial de Dominio PAS-1 (*EPAS-1* de sus siglas en inglés *Endothelial PAS Domain Protein-1*), es un gen con un tamaño de 89302 pares de bases (pb), ubicado en el brazo corto del cromosoma 2, en la primera banda de la segunda región (2p21), el cual consta de 17 exones reconocidos hasta el momento y es regulado de manera post-transcripcional (Maglott, Ostell, Pruitt y Tatusova, 2005).

Este gen codifica para la segunda isoforma de la subunidad alfa del Factor Inducible por Hipoxia (HIF de sus siglas en inglés *Hipoxia Inducible Factor*) y recibe el mismo nombre del gen (*HIF-2 α*) (Loboda et al., 2010), su estructura se ilustra en la Figura 3. El HIF, un factor transcripcional que actúa sobre más de cien genes (van Patot y Gassmann, 2011), es un heterodímero formado por una subunidad alfa y una subunidad beta. La subunidad alfa del HIF presenta tres isoformas, denominadas por números del 1 al 3, tiene un peso de 120 KDa y su

concentración es regulada por la disponibilidad de oxígeno en el organismo (Loboda et al., 2010). Por otro lado, la subunidad beta del HIF también presenta tres isoformas, parálogas a las de la subunidad alfa, tiene un peso entre 91 a 94 KDa pero se encuentra en todos los tejidos (Loboda et al., 2010).



Figura 3. Espectroscopia de Resonancia Magnética nuclear de la subunidad HIF-2 α .

Tomado de RCSB PDB (www.rcsb.org) de PDB ID 1P97 (Drew et al., 1981).

Como su nombre lo indica, el HIF es un factor transcripcional que se ve involucrado en la respuesta del organismo a condiciones de hipoxia (Basang et al., 2015). Sin embargo, tres estudios realizados en el año 2010 (van Patot y Gassmann, 2011) demostraron que no es todo el HIF el que desencadena la cascada de respuestas del organismo ante condiciones hipóxicas, sino que los responsables son los factores HIF-1 α y HIF-2 α (Loboda et al., 2010; van Patot y Gassmann, 2011).

Se ha encontrado que el gen *HIF-2 α* que codifica para la subunidad HIF-2 α se expresa en determinados tejidos, a diferencia del gen que codifica para la subunidad HIF-1 α , que se expresa constitutivamente en todos los tejidos (Beall et al., 2010). No obstante, ambas subunidades responden estrictamente a condiciones de hipoxia, debido a que en condiciones de normoxia (concentración normal de oxígeno en la sangre) existen enzimas de Dominio Prolil Hidroxilasa (PHD, de sus siglas en inglés *Prolyl Hydroxylase Domain Proteins*), que hidrolizan los dominios dependientes de oxígeno (ODD, de sus siglas en inglés *Oxygen Dependent Degradation Domain*), (Beall et al., 2010; Loboda et al., 2010). Las PHDs se encuentran activamente en el organismo y en presencia de oxígeno degradan los ODDs de las subunidades HIF-1 α y HIF-2 α , para que las proteínas *von Hippel Lindau* (VHL) les añaden ubiquitina y que así sean posteriormente degradadas por acción del proteasoma, como se ve en Figura 4 (Loboda et al., 2010; Percy, 2008).

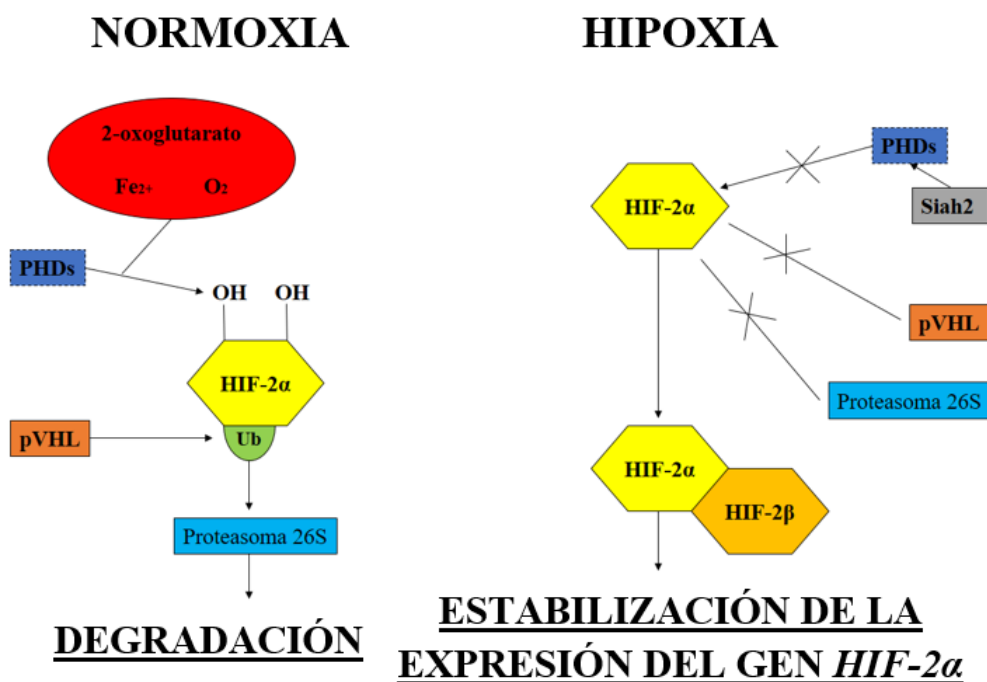


Figura 4. Esquema de regulación de las subunidades HIF-1 α y HIF-2 α bajo condiciones normales y bajas de oxígeno en la sangre. Adaptado de (Loboda, Jozkowicz y Dulak, 2010).

La subunidad HIF-2 α fue detectada inicialmente en células endoteliales, pero ahora se sabe que se encuentra en células intersticiales y del parénquima, es decir en los tejidos que separan estructuras fisiológicas o que hacen que los órganos cumplan sus funciones, respectivamente, en múltiples órganos (Patel y Simon, 2008), por ejemplo, en las células endoteliales de pulmones y neumocitos. Además, la subunidad HIF-2 α tiene profundas implicaciones en el desarrollo fetal, tanto a nivel vascular, porque regula la angiogénesis, así como en los derivados de la cresta neural, las cuales sintetizan hormonas de importancia en la modulación del tono vascular y el gasto cardíaco (Patel y Simon, 2008).

Asimismo, la subunidad HIF-2 α se ha encontrado en grandes cantidades en el órgano de Zuckerkandl, ubicado en la bifurcación aórtica, el cual es de vital importancia en el desarrollo cardiovascular fetal ya que sintetiza catecolaminas, los cuales son neurotransmisores circundantes en el torrente sanguíneo, como la adrenalina (Patel y Simon, 2008). Sin embargo, en la vida adulta el órgano de Zuckerkandl es una fuente secundaria de producción de catecolaminas, ya que son secretadas por el páncreas en situaciones de estrés físico y/o emocional (Patel y Simon, 2008). De igual forma, se ha observado que un adecuado funcionamiento del factor HIF-2 α está estrechamente relacionado con el desarrollo de las células beta del páncreas (Soggia, Ramond, Akiyama, Scharfmann y Duvillie, 2014), así también con el desarrollo y vascularización de la placenta (Kasimanickam et al., 2010), ambos estudios realizados en genes ortólogos de ratones y ovejas, respectivamente.

De este modo, dada la importancia fisiológica del gen *HIF-2 α* se han realizado gran cantidad de estudios de polimorfismos. Esto se debe a que la diversidad de fenotipos se debe a la variación genética y estos son consecuencia de los factores ambientales y del comportamiento de una determinada población (Rahim, Harismendy, Topol y Frazer, 2008). A su vez, las variaciones genéticas en una población son determinadas por la composición genética y por la

frecuencia de caracteres. Cuando se habla de composición genética, se refiere a los polimorfismos y otro tipo de marcadores moleculares que diferencian a los individuos dentro de una población. Por otro lado, la frecuencia de caracteres cataloga a las variaciones genéticas como comunes si se encuentran en más del 5 %, y raras si es en menos del 5 %, dentro de esa población (Rahim et al., 2008).

En pobladores del Tíbet y de la región Andina de América del Sur, se ha observado que las mutaciones presentes en el gen *HIF-2 α* son la clave para la adaptación del organismo a las condiciones de hipoxia provocada por vivir en sitios de gran altitud (van Patot y Gassmann, 2011). En otras palabras, la hipoxia por efecto de la altitud medida en metros sobre el nivel del mar, es la deficiencia de oxígeno en el torrente sanguíneo, lo cual afecta a algunas comunidades Tibetanas y andinas que se aislaron a causa de conquistas y conflictos (Basang et al., 2015; van Patot y Gassmann, 2011), provocando que algunos caracteres favorables para la adaptación al medio se fijaran dentro de esas poblaciones (Poveda, Castillo y García, 2013). Sin embargo, el aislamiento de estas comunidades ocasionó que con el paso del tiempo se presentaran diversas enfermedades genéticas, debido a las bajas tasas de recombinación de caracteres y a la deriva génica (Poveda et al., 2013).

Debido a que la población que habita a mayor altitud es la del Tíbet, se ha estudiado en mayor medida que los habitantes de los Andes (van Patot y Gassmann, 2011). Sin embargo, se ha llegado a determinar que la principal diferencia es que los habitantes de los Andes han incrementado el nivel de eritrocitos y hemoglobina en su sangre para sobrellevar la hipoxia por efecto de la altura (Basang et al., 2015; van Patot y Gassmann, 2011). De esta manera estos pobladores han incrementado la viscosidad de su sangre, a diferencia de los habitantes del Tíbet que no lo han hecho (Beall et al., 2010).

Adicionalmente, también se ha determinado la existencia del término de mala adaptabilidad a la hipoxia por altura en habitantes del Tíbet (van Patot y

Gassmann, 2011). En otras palabras, una persona mal adaptada a la hipoxia inducida por la altura, a pesar de que pertenezca a grupos genéticamente adaptados, presentará mayor viscosidad en sangre que una persona bien adaptada (Beall et al., 2010). Sin embargo, se ha determinado que los habitantes del Tíbet tienen SNPs en el gen *HIF-2 α* que favorecen a su adaptación mediante una compleja vascularización y preservando un nivel de hemoglobina y de eritrocitos menor que un habitante de los Andes (Basang et al., 2015; Beall et al., 2010; van Patot y Gassmann, 2011). Actualmente, en la base de datos del dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database*), perteneciente al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se han reportado más de veinte SNPs presentes en el gen *HIF-2 α* .

Otro estudios de hipoxia por altura realizados en genes ortólogos, como el de WU Xiao-yun (2015) en yaks, encontraron que la variación polimórfica en el gen *HIF-2 α* afecta a la funcionalidad de los órganos reportados por (Scortegagna, Ding, et al., 2003), pero en mayor proporción a pulmones y páncreas (WU Xiao-yun, 2015). Así también, el grupo de Fowler et al. (2013) reportó que determinados polimorfismos localizados en regiones intrónicas del gen *HIF-2 α* aumentan el índice de grasa corporal e inducen obesidad en cerdos, en tres razas distintas (Fowler et al., 2013). Además, en cabras del Tíbet, se han encontrado variaciones tipo SNP entre los grupos que habitan a distintas altitudes, con implicaciones fisiológicas similares a las reportadas en humanos (Song et al., 2016).

De esta forma, mediante una correlación estadística realizada en poblaciones humanas del Tíbet, se ha observado que determinados genotipos están presentes en ciertas condiciones. Por ejemplo, el rs1868092 se ha observado en pobladores altamente adaptados a la altura, predominando el genotipo A-A (Basang et al., 2015), de igual manera el rs10187368 estudiado en menor medida, pero que también se ha identificado en poblaciones del Tíbet con baja viscosidad de sangre (Hanaoka et al., 2012; Xu et al., 2015). Asimismo, al comparar los genotipos de los rs13419896 y rs4953354 en poblaciones

japonesas de bajas alturas con Sherpas, se identificaron que los genotipos A-A y G-G, respectivamente, se encontraron en los Sherpas adaptados a la altitud (Hanaoka et al., 2012). De esta manera, al evaluar los niveles de eritropoyetina presente en suero sanguíneo de Sherpas y compararlo con el de las poblaciones de baja altitud, se determinó estadísticamente que sus niveles son similares a los de poblaciones de baja altitud (Basang et al., 2015; Hanaoka et al., 2012).

Por otra parte, Mowat et al. (2010) reportó que un mal funcionamiento de la subunidad HIF-2 α por bajos niveles de oxígeno, se asocia con Isquemia Retinal. De esta forma, no ocurre una adecuada respuesta de todas las capas de la retina que son atravesadas por las células de Müller, ocasionando varios padecimientos oculares e incluso ceguera (Mowat et al., 2010).

El gen *HIF-2 α* , también se ha relacionado con la Policitemia vera, debido a la relación que esta enfermedad tiene con los eritrocitos (Chen, Jiang, Luo, Liu y Gao, 2014). La policitemia vera o eritrocitosis, es una patología en la cual ocurre sobreproducción de eritrocitos, incrementando la viscosidad de la sangre. En el caso de los SNPs rs13419896, rs4953354 y rs1868092, así como el rs10187368 se los ha intentado relacionar con esta patología (Chen et al., 2014; Xu et al., 2015). Sin embargo, mediante los estudios realizados, en poblaciones japonesas y del Tíbet, se ha determinado hasta el momento que el haplotipo G-G-G se puede relacionar directamente con la policitemia vera para los rs13419896, rs4953354 y rs1868092 (Chen et al., 2014), pero no para el rs10187368 (Xu et al., 2015).

De igual forma, se han reportado que otras mutaciones tipo SNP, en el gen *HIF-2 α* , provocan volumen reducido de plasma e hipertensión pulmonar y arterial, en seres humanos sometidos a gran altitud (Gale, Harten, Reid, Tuddenham y Maxwell, 2008). Además, otros autores, como Lorenzo et al. (2013), han reportado que cuando existe recombinación de ciertos alelos polimórficos y heterocigotos, existe gran probabilidad de que la descendencia presente eritrocitosis (Lorenzo et al., 2013).

Por otro lado, se sabe que el riñón es uno de los principales órganos involucrados en la adaptación a los niveles de oxígeno del organismo, especialmente porque cuando disminuyen los niveles de oxígeno en la sangre, participa en la producción de eritrocitos (Percy, 2008). El riñón es capaz de detectar los niveles de oxígeno en la sangre y, de ser necesario, estimular la producción de eritrocitos en la médula ósea, a través del gen de la Eritropoyetina (*EPO*, de sus siglas en inglés *Erythropoietin*). Este proceso ocurre ya que el gen *EPO* es regulado de manera transcripcional por la subunidad HIF-2 α , de esta manera obtiene una respuesta ante los niveles de oxígeno a los cuales se encuentre expuesto el organismo, tal como se muestra en la Figura 5 (Gale et al., 2008; Percy, 2008).

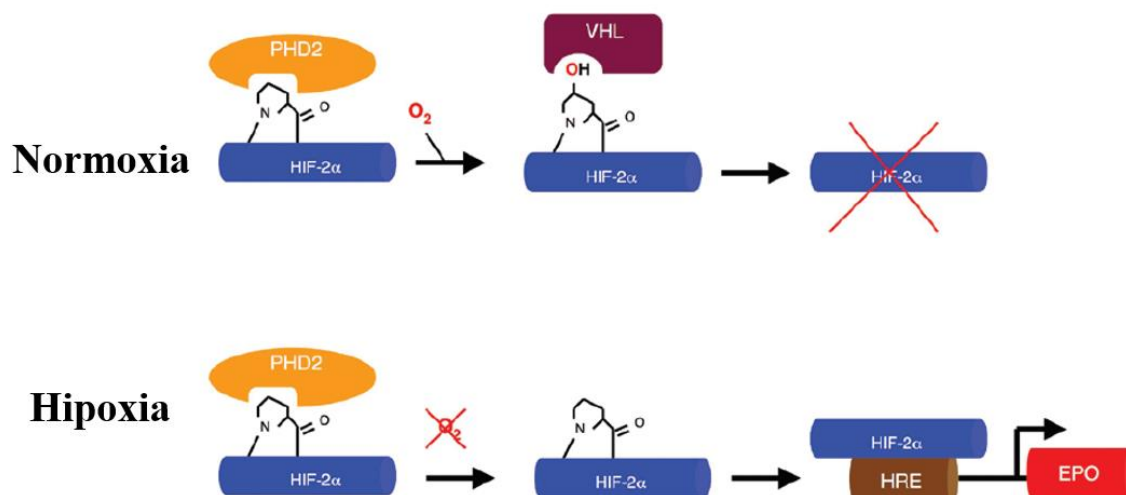


Figura 5. Esquema del control de la síntesis de eritropoyetina mediante regulación de la subunidad HIF-2 α . Tomado de (Percy, 2008).

Debido a que el gen *HIF-2 α* se ve involucrado en la regulación de genes que intervienen en la disponibilidad de oxígeno, se han realizado varios estudios para determinar la correlación de SNPs en este gen, en atletas de alto rendimiento (Henderson et al., 2005; Voisin et al., 2014). Estas investigaciones se han centrado en estos estudios ya que los atletas se ven influenciados por el volumen

máximo de asimilación y captación del oxígeno para realizar sus procesos metabólicos (Henderson et al., 2005).

En los casos particulares de los rs1867785 y rs895436, se han observado haplotipos presentes en atletas de alto rendimiento. Por ejemplo, en atletas de deportes de larga duración se han observado frecuentemente el haplotipo A-G, en comparación con el haplotipo de los controles G-C. De igual forma, en atletas de deportes de alta intensidad, pero poca duración, los haplotipos predominantes también son A-G (Henderson et al., 2005; Voisin et al., 2014). En contraste con los controles empleados, se determinó que es una condición poco frecuente para un atleta el poseer un genotipo A-A en estos SNPs (Voisin et al., 2014). De igual manera, se ha estudiado el rs1867782 en el desempeño de atletas europeos, debido a que es un SNP que ha sido estudiado en pocas ocasiones, a pesar de que se lo ha observado en la respuesta adaptativa de hipoxia, pero sin resultados significativos (Voisin et al., 2014).

Por otra parte, la subunidad HIF-2 α es clave en la oncogénesis, ya que regula la acción del gen del Factor Activador de Transcripción 3 (*ATF-3*, de sus siglas en inglés *Activating Transcription Factor 3*) (Turchi et al., 2008). El gen *ATF-3* es clave para la apoptosis celular cuando las células son sometidas a radiación UV, debido a que en acción conjunta con la subunidad HIF-2 α , inducen la expresión de genes proapoptóticos en células con daños a nivel genético. De esta manera, alteraciones en la subunidad HIF-2 α terminan siendo perjudiciales en varios procesos oncológicos (Turchi et al., 2008), como en el caso de Melanoma, en donde se ha demostrado que este proceso carcinógeno se desencadena por la interacción de una subunidad HIF-2 α alterada con el Receptor-2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFR-2 de sus siglas en inglés Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) (Bougatef et al., 2010).

De esta manera, en base a lo enunciado, se puede entender la importancia de detectar oportunamente la presencia de SNPs en el gen *HIF-2 α* . Es así, que el desarrollo de métodos de identificación de SNPs, como es el sistema basado en

SNaPshot® Multiplex, que permite analizar hasta 20 SNPs en una sola lectura, de manera rápida y económica, son el punto de apertura para crear herramientas diagnósticas eficientes y oportunas en el control de enfermedades, infecciones e incluso poder aplicarlos no solo en humanos, sino en animales, plantas y en otros campos como la epidemiología molecular.

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El presente trabajo pretende identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en el gen del Factor Inducible por Hipoxia-2 alfa (*HIF-2 α*), para lo cual se requiere diseñar *primers* y sondas propias, así como usar juegos de reactivos y equipos para identificarlos. En cuanto a softwares, se utilizará *GeneMapper*[®] (Applied Biosystems, 2010) y para el análisis estadístico se usará *SPSS Statistics V23* (IBM Corp., Lanzado en 2015). En cuanto a las variables, los genotipos de los SNPs obtenidos por el Sistema *SNaPshot*[®] *Multiplex* serán tomados como variable dependiente. De esta manera, las condiciones y perfiles térmicos de las reacciones, como tiempo, temperatura y concentración, que se modificarán para el desarrollo de las reacciones basadas en *SNaPshot*[®], serán las respectivas variables independientes. Las muestras de ADN para el proyecto serán tomadas del banco de muestras control de la Universidad de las Américas, siendo solamente muestras comerciales. De esta manera los procedimientos de desarrollo se basarán en los recomendados por los insertos de los juegos de reactivos del *SNaPshot*[®] *Multiplex*. Finalmente, el análisis estadístico se realizará calculando la efectividad del protocolo, comparando la cantidad y genotipo de los SNPs obtenidos con las variantes descritas. Posteriormente se realizará la validación del protocolo por el método *Gold Standard*, empleando la prueba de Wilcoxon para determinar si los dos ensayos presentan diferencia significativa en cuanto a sus resultados y finalmente se realizará un cálculo preliminar de la sensibilidad y especificidad del protocolo en base a los dos métodos. En la Figura 6 se aprecia el diagrama de flujo del diseño del plan experimental para desarrollar el presente proyecto.

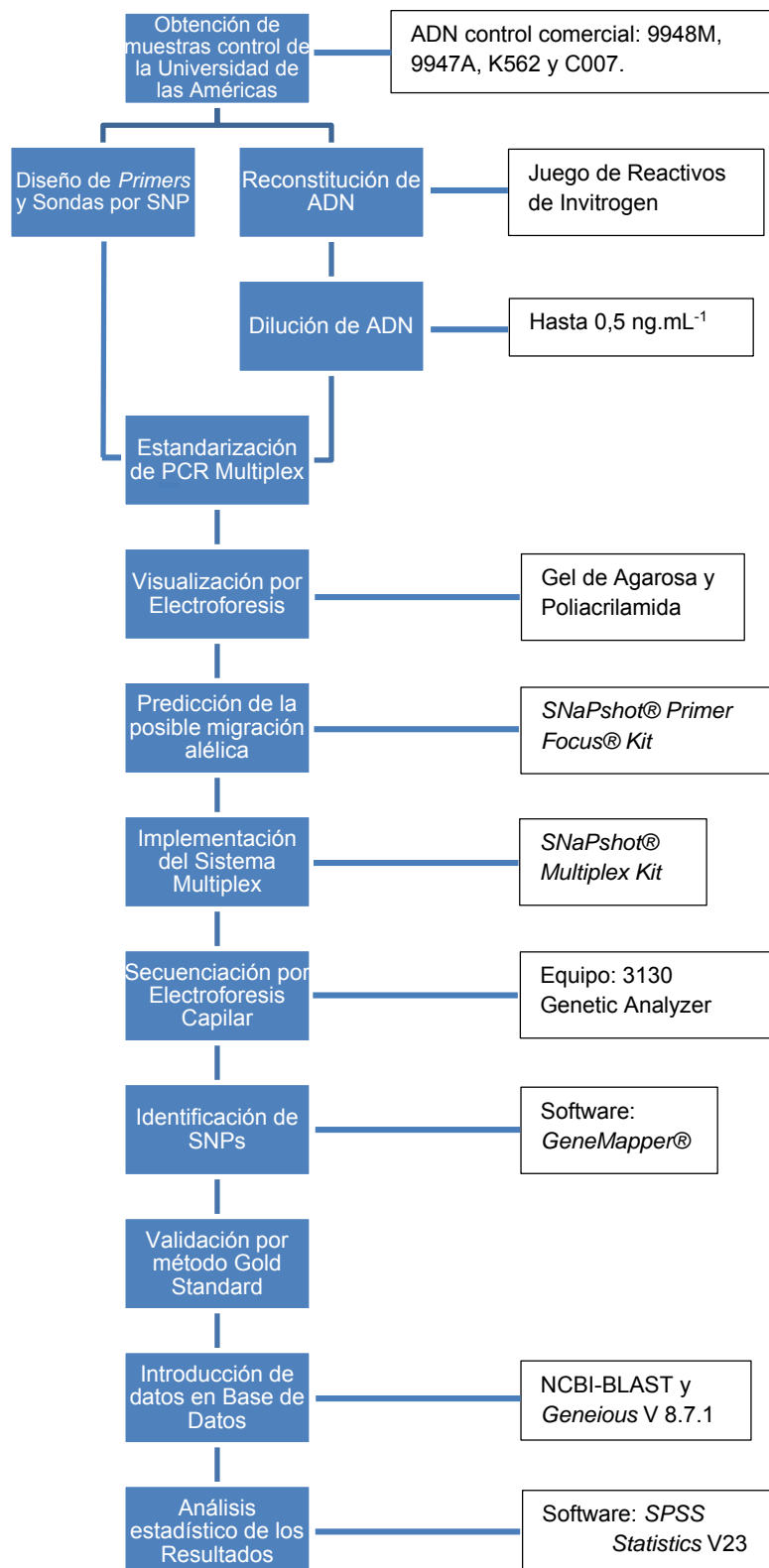


Figura 6. Diseño del plan experimental para desarrollar un protocolo de tipificación de SNPs involucrados en la respuesta adaptativa a hipoxia por altura mediante el sistema de mini-secuenciación *SNaPshot® Multiplex*.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 POBLACIÓN Y MUESTRA

El método de muestreo es por conveniencia, debido a que las muestras para la realización del proyecto se encuentran disponibles en el banco de muestras de ADN control del laboratorio de Investigación de la Universidad de las Américas. Estas no requieren de consentimientos informados ya que son comerciales, sin embargo, el proyecto sí se encuentra inscrito y aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de las Américas.

Por tal motivo la población es la colección de muestras disponibles, mientras que las muestras que se utilizarán son los ADN control comercial 9948M, 9947A, K562, C007. No obstante, a pesar de que los ADN que se utilizarán son controles, con genotipo conocido, no se requiere emplear controles positivos. Sin embargo, como control negativo, se empleará agua grado molecular para descartar que los resultados reportados sean efecto de contaminación. Esto se debe a que se intenta estandarizar un protocolo a pequeña escala, concordante con el proyecto de titulación. Además, el valor de muestra es razonable para desarrollar el proyecto de titulación dentro del tiempo disponible, ya que después se validará el protocolo mediante el método *Gold Standard*, alineamiento de secuencias con el software *Geneious V 8.7.1* y *SPSS Statistics V23*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS

4.2.1 Diseño de *Primers* y Sondas

El presente trabajo de investigación fue dirigido por el M.Sc. Germán Burgos Figueroa, en el Instituto de Investigación de la Universidad de las Américas, dentro del proyecto “*Diversidad Genética y Ancestría en la Población Ecuatoriana*”. El primer paso fue el diseño de los *primers* y sondas a partir del software *Assay Design Suite V.2.0* de *AgeneBioscience*, en base a los códigos

Una vez verificado que los amplicones y los SNPs amplifican las regiones requeridas en el gen *HIF-2 α* , se procedió a evaluar la probabilidad de que estos formen horquillas, auto-dímeros y heterodímeros con el software gratuito en línea *OligoAnalyzer 3.1* de *Integrated DNA Technologies* (Owczarzy et al., 2008). Adicionalmente se realizaron los cálculos de Temperatura de *Melting* para los *primers* mediante PCR *in silico* de *UCSC (University of California Santa Cruz)* (Kent et al., 2002), *Primer-BLAST* de NCBI (Ye et al., 2012) y *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher* (Breslauer, Frank, Blocker y Marky, 1986).

4.2.2 Electroforesis Cuantitativa de *Primers* y Sondas

Una vez recibidos los *primers* y las sondas se los resuspendió en soluciones *stock* y se cuantificó por electroforesis la concentración a la que estas soluciones se encontraban, para poder empezar a trabajar con ellos. De esta manera, se determinó la concentración de los oligos a emplear, en base a la intensidad que emitan sus bandas al compararlas con las de ocho diluciones de referencia. El siguiente paso fue preparar un gel de agarosa al 4 %, con *SYBR Gold*, en suficiente cantidad para correr los siete pares de *primers*, las siete sondas y las concentraciones de referencia.

Las concentraciones de referencia se obtuvieron a partir del *stock* de un *primer* que se conocía que se encontraba a 100 μM . Después se obtuvieron siete diluciones a partir de este, en concentraciones de: 75, 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 μM . A continuación, se les agregó *Buffer* de carga a cada uno de los oligos a cuantificar, y a las diluciones de referencia, en relación 3:1 en un volumen final de 3 μL , y se corrió la electroforesis en horizontal a 100 V por 30 minutos. Finalmente se visualizó el gel, bajo luz UV, en un fotodocumentador *MiniBIS System* de *Bio-Imaging Systems* y se comparó la intensidad de banda de los oligos a emplear con las bandas de las diluciones de referencia, para de esta manera calcular la concentración de cada oligo a emplear.

4.2.3 Reacción *SNaPshot*® *Primer Focus*®

Una vez calculada la concentración de cada una de las sondas a emplear, se procedió a montar la reacción *SNaPshot*® *Primer Focus*® para predecir la migración que tendrán los alelos de cada uno de los siete SNPs. De este modo, se realizaron diluciones de cada una de las sondas a 2 µM de acuerdo al inserto (Applied Biosystems, 2013). A continuación, la reacción se ensambló en frío, en un volumen final de reacción de 5 µL por sonda, y se evaluó la cantidad de *Mix* de ddNTP de *SNaPshot*® *Primer Focus*®, a la mitad de la concentración y a la recomendada por el inserto, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Evaluación de la concentración del juego de reactivos en la reacción *SNaPshot*® *Primer Focus*® por cada sonda

Mix de Reacción <i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ®	Volumen Recomendado	Volumen 1
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Mix de ddNTP	8,0 µL	4,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Buffer de Reacción 10X	2,0 µL	2,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Co-factor	2,0 µL	2,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Enzima	0,2 µL	0,2 µL
Agua Desionizada	5,8 µL	9,8 µL
Sonda	2,0 µL	2,0 µL
Total	20,0 µL	20,0 µL

Posteriormente, se llevaron las siete reacciones de cada sonda de *SNaPshot*® *Primer Focus*® al termociclador *SureCycler 8800* de *Agilent Technologies* y se corrió bajo el programa recomendado por el inserto (Applied Biosystems, 2013), como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.

Perfil térmico del termociclador utilizado para la reacción *SNaPshot® Primer Focus®* de cada una de las siete reacciones

Temperatura	Tiempo
37 °C	15 minutos
70 °C	10 minutos

Una vez terminado el programa en el termociclador, de acuerdo al caso, los productos de *SNaPshot® Primer Focus®* se sometieron a purificación enzimática o se conservaron a 4 °C hasta la purificación.

4.2.4 Purificación Enzimática de *SNaPshot® Primer Focus®*

El proceso de purificación enzimática, de acuerdo al inserto, para los productos de *SNaPshot® Primer Focus®*, consistió en adicionar 1 U de SAP de *Affymetrix* (Fosfatasa Alcalina de Camarón de sus siglas en inglés *Shrimp Alkaline Phosphatase*) 1X por cada 5 µL de producto y se corrió bajo el programa recomendado por el inserto para la digestión enzimática de SAP y/o EXO I (Exonucleasa I de sus siglas en inglés *Exonuclease I*) (*Applied Biosystems*, 2013, p. 1-2) como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5.

Perfil térmico del termociclador utilizado para la purificación enzimática con SAP y/o EXO I

Temperatura	Tiempo
37 °C	1 hora
80 °C	15 minutos

Posteriormente, la predicción de la migración alélica de cada uno de los SNPs fue determinada a partir de los productos purificados, resultantes de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, en un montaje de electroforesis capilar, en el

analizador genético modelo 3130 de *Applied Biosystems*, o se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

4.2.5 Montaje de Placas en el Analizador Genético

Se usó el marcador de tamaño estándar *LIZ*[®]-120 de *ThermoFisher*, para montar la placa en el analizador genético de acuerdo al manual de usuario del equipo (*Applied Biosystems*, 2005a), debido a que el tamaño de los amplicones que contendrían a los SNPs seleccionados no superan las 120 pb. La proporción en la cual se mezcló *LIZ*[®]-120 con Formamida fue de 2:92 en un volumen de 9 µL por cada pocillo en la placa, la cual se mezcló con 1 µL de producto a analizar.

4.2.6 Reacción de PCR *Singleplex*

A partir de la electroforesis cuantitativa se determinó la concentración de cada *stock* de *primers* y se los diluyó en pares (*Forward* + *Reverse*) hasta una concentración de 10 µM, para realizar PCRs en *Singleplex* con concentración de 1 µM por cada reacción. De esta manera se procedió a ensamblar el *Mix* de PCR, empleando ADN control en concentración de hasta 0.5 ng.µL⁻¹, de acuerdo a estudios previos realizados por el Director Científico del proyecto con el juego de reactivos *QIAGEN*[®] *Multiplex PCR* (*Qiagen*, 2010), como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6.

Concentración del juego de reactivos *QIAGEN*[®] *Multiplex PCR* en la reacción de PCR en *Singleplex*

Mix de Reacción de PCR <i>Singleplex</i>	Volumen
Máster Mix <i>QIAGEN</i> [®] PCR Multiplex 2X	2,5 µL
Agua libre de ARNasa	1,5 µL
Molde de ADN	0,5 µL
Primers	0,5 µL
Total	5,0 µL

Las PCRs se ensamblaron a temperatura ambiente y cada una de las siete se las sometió a pruebas para determinar el perfil térmico adecuado para obtener amplicones de calidad, empleando el termociclador *SureCycler 8800* de *Agilent Technologies*. De esta manera, las siete PCR en *Singleplex* se evaluaron mediante pruebas de gradiente de temperatura de hibridación, en base a los resultados de los softwares empleados para realizar PCR *in silico*; y a pruebas de gradiente de ciclos, de acuerdo a estudios previos realizados por el Director Científico del proyecto con el juego de reactivos *QIAGEN® Multiplex PCR* (Qiagen, 2010), como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.

Evaluación del perfil térmico del termociclador utilizado para PCR en *Singleplex* por cada par de primers

Etapa	Temperatura <i>UCSC</i>	Temperatura <i>Multiple Primer Analyzer</i>	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95 °C	95 °C	15 minutos	
Denaturación	94 °C	94 °C	1 minuto	
Hibridación	54,6 - 62,6 °C	59,3 - 67,3 °C	1 minuto	31 - 35
Elongación	72 °C	72 °C	1 minuto	
Elongación Final	72 °C	72 °C	10 minutos	

Posteriormente, se realizó purificación enzimática sobre los productos de PCR obtenidos o se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su purificación.

4.2.7 Purificación Enzimática de Productos de PCR *Singleplex*

El proceso de purificación enzimática para los productos de PCR *Singleplex* consistió en adicionar 1 U de SAP 1X más 1 U de EXO I 1X, de *Affymetrix*, por cada 5 µL de producto y se digestaron bajo el perfil térmico de la purificación de productos de *SNaPshot® Primer Focus®*, indicado en la Tabla 5. Adicionalmente, cuando se concluyó el corrido en el termociclador se procedió a visualizar los amplicones en gel de agarosa al 2% y se montó la reacción

SNaPshot® Singleplex o se almacenaron los productos de PCR a 4 °C hasta su uso.

4.2.8 Reacción *SNaPshot® Singleplex*

Las reacciones de mini-secuenciación *SNaPshot® Singleplex* se montaron en ausencia de luz, a partir de las sondas diluidas a concentración de 2 µM y de los productos de PCR *Singleplex*. Las pruebas de evaluación de concentración del juego de reactivos *SNaPshot®* en *Singleplex* se hicieron para el *Mix* de reacción *SNaPshot® Multiplex* lista, para la concentración final de las sondas (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µM por cada reacción) y para la cantidad de Agua Desionizada, de acuerdo a las cantidades de la Tabla 8.

Tabla 8.

Evaluación de la concentración del juego de reactivos en la reacción *SNaPshot® Singleplex*

Mix de Reacción <i>SNaPshot® Singleplex</i>	Volumen Recomendado	Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3
Mix de Reacción <i>SNaPshot® Multiplex</i> Lista	2,5 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Sonda	0,5 µL	1,0 µL	1,5 µL	2,0 µL
Agua Desionizada	0,5 µL	1,5 µL	1,0 µL	0,5 µL
Producto de PCR <i>Singleplex</i> Correspondiente	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
Total	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL	5,0 µL

Posteriormente, las siete reacciones de *SNaPshot® Singleplex*, de cada SNP, fueron llevadas al termociclador y se corrieron bajo el programa recomendado por el inserto (Applied Biosystems, 2005b), como se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9.

Perfil térmico del termociclador utilizado para las reacciones SNaPshot® Singleplex

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96 °C	10 segundos	
50 °C	5 segundos	25
60 °C	30 segundos	

Finalmente, los productos de SNaPshot® Singleplex fueron montados en placa del analizador genético, de igual forma que los productos de SNaPshot® Primer Focus®, para determinar los genotipos de cada SNP presente en la muestra de ADN control o en su defecto fueron almacenados a 4 °C hasta su análisis.

4.2.9 Reacción de PCR Multiplex

La reacción de PCR se estandarizó en Multiplex para los siete SNPs, de acuerdo al objetivo principal del proyecto de titulación. De esta manera se procedieron a diluir cada uno de los catorce stock de primers, a una concentración de 40 µM. Después se ensambló un Mix de todos primers, con las diluciones, en donde la concentración de cada uno de ellos fue de 2 µM y se ensambló el Máster Mix de la PCR Multiplex, con concentración final de cada primer de 0.2 µM.

Por consiguiente, se ensambló la PCR, de acuerdo a las concentraciones de la Tabla 6, pero en lugar de usar un par de primers por reacción se utilizó el Mix de primers. No obstante, para estandarizar el perfil térmico de la reacción se realizaron varias pruebas de gradiente de temperatura, para fijar la temperatura de hibridación; gradiente de ciclos y aumento del tiempo de elongación por ciclo, a 1:30 minutos, tal como se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 10.

Evaluación del perfil térmico del termociclador utilizado para PCR en Multiplex con los siete pares de primers

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95 °C	15 minutos	
Denaturación	94 °C	1 minuto	
Hibridación	62,5 - 67 °C	1 minuto	35 - 40
Elongación	72 °C	1 - 1:30 minutos	
Elongación Final	72 °C	10 minutos	

Posterior al término de la corrida en el termociclador, se llevó a cabo el proceso de purificación enzimática, de igual manera que con los productos de PCR *Singleplex* o se almacenó el producto de PCR *Multiplex* a 4 °C hasta el montaje de la reacción de *SNaPshot® Multiplex*.

4.2.10 Reacción *SNaPshot® Multiplex*

La reacción de mini-secuenciación *SNaPshot® Multiplex* se montó en ausencia de luz, de igual manera que la reacción *SNaPshot® Singleplex*. Para lo cual, primero se ensambló un *Mix* de las siete sondas, en donde la concentración final de cada una se encontró entre 1.5 y 10 µM, para obtener una concentración final en la reacción *SNaPshot® Multiplex* entre 0.15 y 1 µM, de acuerdo a la Tabla 11.

Tabla 11.

Evaluación de la concentración del Mix de sondas en la reacción *SNaPshot® Multiplex*

Polimorfismo	Mix de Diluciones
rs1868092	2 µM
rs1867782	2 - 10 µM
rs10187368	2 - 6,5 µM
rs13419896	1,5 - 2 µM
rs4953354	2 - 7,5 µM
rs895436	2 - 7,5 µM
rs1867785	2 - 6,5 µM

Una vez obtenido el *Mix* de sondas se montó la reacción *SNaPshot® Multiplex*, en donde las cantidades empleadas para montar la reacción fueron las mismas de la reacción *SNaPshot® Singleplex*. No obstante, en lugar de emplear una sola sonda por reacción, se empleó el *Mix* de sondas. Además, en cuanto al producto de PCR a emplear, no se usaron los siete de cada PCR *Singleplex*, sino el producto de PCR *Multiplex* correspondiente a la muestra de ADN a analizar. Finalmente, el perfil térmico empleado para la reacción fue el indicado en la Tabla 9, a diferencia que el número de ciclos empleado fue incrementado hasta 38.

4.2.11 Ajuste de Señal de los Genotipos

El modelo del analizador genético utilizado, para la estandarización del Sistema *SNaPshot® Multiplex*, fue el 3130 de *Applied Biosystems*. El equipo fue operado bajo el software *GeneMapper® V.3.2* (*Applied Biosystems*, 2010), mediante el cual fue posible ajustar los rangos de lectura de los alelos o también llamados *bins*, que cumplen la función de detectar la señal, representada por un pico de un color específico, de una base nitrogenada (cada base nitrogenada es un alelo), para de esta manera determinar los genotipos para cada SNP. Los *bins* fueron colocados manualmente en un panel de lectura del equipo y se fijaron de acuerdo a los resultados obtenidos de las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* y *SNaPshot® Singleplex*, mediante los cuales fue posible predecir las tasas de movilidad o posiciones en las que se espera que se encuentre cada alelo, así como las posibles bases nitrogenadas que puede presentar cada SNP.

4.2.12 Método *Gold Standard*

Para concluir con la etapa de desarrollo práctico del proyecto de titulación se realizó la genotipificación de cada uno de los SNPs a investigar, de las muestras de ADN control comercial, mediante secuenciación Sanger.

Como procedimiento inicial se amplificaron cada uno de siete SNPs, en reacciones de PCR *Singleplex*, sin emplear el juego de reactivos *QIAGEN®*

Multiplex PCR. De esta manera, se utilizaron los mismos ADN control comercial, no obstante, la concentración de *primers* empleada fue de 0.02 μM en un volumen de reacción de 17 μL . Además, se empleó una concentración de 0.1 μM de cloruro de magnesio, 0.25 μM de dNTPs, 1X de Buffer y 4 U de la enzima Taq polimerasa, distribuidas por *Promega*[®], en cada una de las reacciones. El perfil térmico utilizado fue el de la Tabla 20, pero con 45 ciclos de reacción.

Posteriormente, se realizó la purificación de los amplicones de PCR de cada una de las reacciones, empleando el sistema *AMPure* de *Agencourt*, el cual permitió remover todos los elementos no incorporados en las reacciones de PCR, utilizando una placa magnética (Dunham y Friesen, 2013). De esta forma, se pudo continuar con la reacción de secuenciación, la cual empleó un perfil térmico similar al de la Tabla 9, con la diferencia que la etapa de elongación de cada uno de los 25 ciclos dura 4 minutos.

Para llevar a cabo este proceso se empleó el juego de reactivos *BigDye*[®] *Terminator* V.3.1 de *ThermoFisher Scientific*, en el cual se usó 0.5 μL del *Mix* de reacción listo, 0.75X del *Buffer* de secuenciación, 0.27 μM de *primer* y 3 μL del producto de PCR purificado, en un volumen de reacción de 6 μL . Se empleó el mismo producto de PCR para la reacción de secuenciación con el *primer forward* y para la reacción con el *primer reverse*, correspondiente al mismo amplicón. De esta manera, tras realizar la reacción de PCR de secuenciación, los productos se sometieron a otra etapa de purificación. Esta purificación se llevó a cabo a partir del sistema *AMPure* de *Agencourt*, el cual se preparó con una solución 3 M de NaCl, con la finalidad de preparar los fragmentos de ADN amplificados para la lectura por electroforesis capilar, en el analizador genético. De esta manera, este proceso constó de la estandarización de las concentraciones y del perfil térmico de cada una de las siete PCR, empleada para amplificar el fragmento que contuvo cada SNPs.

Para concluir, se realizó la evaluación estadística de los resultados de la tipificación de los siete SNPs, obtenidos por el sistema *SNaPshot® Multiplex* diseñado y los obtenidos por el método *Gold Standard*.

4.3 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS

Para que los resultados de las reacciones de PCR sean confiables se deben verificar, mínimo en dos ocasiones, mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 2 %. No obstante, para la secuenciación por electroforesis capilar no se requiere realizar repeticiones en las lecturas de las muestras, ya que el equipo empleado es validado anualmente por el sistema ABI3130. Además, cuando se hayan obtenido los genotipos por el sistema *SNaPshot® Multiplex* diseñado, se los validará mediante secuenciación Sanger, al realizar la lectura de las dos hebras del ADN en sentido *Forward* y *Reverse*.

Por otro lado, la validación estadística del sistema diseñado, basado en *SNaPshot® Multiplex*, se efectuará en dos etapas. La primera, realizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon, para determinar si existen diferencias significativas entre la cantidad de cada genotipo obtenido por el sistema *SNaPshot® Multiplex* y la del método *Gold Standard* (Rosner, Glynn y Lee, 2006). En la segunda etapa, se aplicarán las fórmulas de la Ecuación 1, para calcular la sensibilidad y de la Ecuación 2, para la especificidad del sistema diseñado, basado en *SNaPshot® Multiplex*, en comparación con el método *Gold Standard* (Parikh, Mathai, Parikh, Chandra Sekhar y Thomas, 2008). Sin embargo, estos cálculos serán preliminares ya que no se cuenta con ensayos poblacionales para poder determinar las condiciones de enfermedad y salud. Además, no se determinaron límites de detección para el protocolo debido a que se empleó muestras de ADN control comercial y el proyecto está enfocado al uso de material genético fresco.

$$\text{Sensibilidad} = VP / (VP + FN) \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Especificidad} = VN / (VN + FP) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Leyenda. Verdaderos Positivos (VP), Verdaderos Negativos (VN), Falsos Positivos (FP), Falsos Negativos (FN).

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diseño de *Primers* y Sondas

El análisis inicial de los *primers* y sondas, diseñados a partir del software *Assay Design Suite V.2.0.* de *AgenaBioscience*, fue realizado por *Nucleotide BLAST* del NCBI. Los resultados obtenidos, de acuerdo a la bibliografía (Altschul, Gish, Miller, Myers y Lipman, 1990), determinaron que tanto los *primers*, así como las sondas, se alinearían única y específicamente al gen *HIF-2 α* .

En el caso de los *primers*, los valores de puntuación máxima obtenidos fueron los mayores puntajes de alineación registrados entre las secuencias de los oligos y la secuencia del gen *HIF-2 α* , disponible en la base de datos del NCBI, como se puede observar en la Tabla 12. No obstante, el valor de puntuación máxima, para los *primers reverse* de los polimorfismos rs1867782 y rs1867785, fueron menores que para el resto de *primers*. Al parecer, esto se debe a que estas regiones son altamente conservadas en otras especies, con genes ortólogos, disminuyendo el puntaje de alineación entre estos dos oligos y el gen *HIF-2 α* .

Tabla 12.

Valores obtenidos para los primers diseñados en el modelo de PCR Multiplex, empleado Nucleotide BLAST del NCBI

Polimorfismo	Primers	Puntuación Máx.	Puntuación Total	Cobertura de Consulta	Valor E	Identidad	Accesión
rs1868092	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
rs1867782	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	38,2	38,2	100%	0,85	100%	NG_01600,1
rs10187368	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
rs13419896	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
rs4953354	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
rs895436	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
rs1867785	Forward	40,1	40,1	100%	0,21	100%	NG_01600,1
	Reverse	38,2	38,2	100%	0,85	100%	NG_01600,1

Por otro lado, se sabe que el valor de puntuación total es la sumatoria de los puntajes de alineación de todos los segmentos del gen *HIF-2 α* , en la base de datos del NCBI, que coinciden con las secuencias de los *primers* (Altschul et al., 1990). Este valor debe ser igual a la puntuación máxima, como en los resultados obtenidos para todos los *primers* de la Tabla 12. En el caso de que este valor hubiese cambiado, probablemente las secuencias de los *primers* coincidirían con otras partes de la secuencia del gen *HIF-2 α* , caso que no ocurrió (Altschul et al., 1990).

Adicionalmente, el valor esperado o valor E que se obtuvo fue alto porque los tamaños de las secuencias de los *primers* son cortos y tienen una probabilidad elevada de alinearse con otros segmentos del ADN, por efecto del azar (Altschul et al., 1990). Generalmente se aceptan valores menores a 0.05, pero en este caso los valores E fueron los más bajos obtenidos de todos los resultados de *Nucleotide BLAST* (Altschul et al., 1990), convirtiendo a todos los *primers* en posibles candidatos a emplearlos para el estudio.

Sin embargo, también se analizaron la cobertura de la secuencia, la identidad y código de acceso, con el fin de poder llevar a los *primers* al siguiente análisis. De esta manera, se observó que, tanto para el porcentaje de secuencias de *primers* que se alineó con el gen *HIF-2 α* o cobertura de la secuencia, así como el porcentaje en que las secuencias de los *primers* y del gen *HIF-2 α* tengan los mismos residuos en iguales posiciones en la alineación, conocido como identidad (Altschul et al., 1990), se encontraron en un 100 %. Además, al someter los *primers* ante *Nucleotide BLAST* se obtuvieron los códigos de acceso correspondientes al gen *HIF-2 α* , además, se pudo corroborar que los tamaños de los amplicones eran los predichos por el software *Assay Design Suite V.2.0* de *AgenaBioscience* (Altschul et al., 1990). Por consiguiente, se decidió que todos los *primers* eran aptos para continuar con el estudio.

Adicionalmente, a todas las sondas se las sometió al software *Geneious V 8.7.1* (Kearse et al., 2012) para comprobar que se alinearían con el gen *HIF-2 α* , descargado directamente del NCBI. Este paso se realizó debido a que las sondas se unen únicamente a los amplicones obtenidos por los *primers* y no al gen *HIF-2 α* directamente. De esta manera, los resultados del software *Geneious V 8.7.1* comprobaron que todas las sondas eran aptas para el estudio, como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Alineamiento, en *Geneious V 8.7.1*, entre las secuencias de las sondas diseñadas y el gen *HIF-2 α* .

- rs1868092
- rs1867782
- rs10187368
- rs13419896
- rs4953354
- rs895436
- rs1867785.

En el literal A de la Figura 7 se observaron dos *GAPS* en el alineamiento del gen *HIF-2 α* con la sonda, a pesar de que se emplearon las secuencias de las bases de datos de NCBI para el alineamiento y el diseño de las sondas. Sin embargo, este fenómeno se atribuyó a que las bases de datos están en constante actualización y cuando se revisó el *Assembly* del SNP en la base de datos dbSNP, se pudo corroborar que, efectivamente el *Assembly* cambió de GRCh37p13 a GRCh38. Como un paso adicional para continuar con el análisis de los *primers* diseñados, se los procedió a evaluar mediante otra herramienta del NCBI, el *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012). Esta herramienta, a diferencia del *Nucleotide BLAST*, no solo permitió determinar el código de acceso y el nombre del organismo con el gen, sino que analizó, en conjunto, la acción de los pares de *primers* para determinar el tamaño del producto obtenido por su utilización. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla 13 y permitieron continuar con el análisis de los oligos diseñados, ya que comprobaron que el tamaño de los amplicones era el mismo que cuando se los diseñó con el software *Assay Design Suite V.2.0* de *AgeneBioscience*. Además, corroboraron que el tamaño del fragmento esperado es concordante con el tamaño con el que se tomó, de la base de datos del dbSNP, para diseñarlos.

Tabla 13.

Comparación del tamaño de los amplicones diseñados empleando el software *Assay Design Suite V.2.0* de *AgeneBioscience* con los resultados esperados de *Primer-BLAST* de NCBI

Polimorfismo	Tamaño del Amplicón Predicho	Tamaño del Amplicón Verificado	Accesión
rs1868092	106 pb	106 pb	NG_016000,1
rs1867782	98 pb	98 pb	NG_016000,1
rs10187368	117 pb	117 pb	NG_016000,1
rs13419896	62 pb	62 pb	NG_016000,1
rs4953354	112 pb	112 pb	NG_016000,1
rs895436	108 pb	108 pb	NG_016000,1
rs1867785	102 pb	102 pb	NG_016000,1

Por otro lado, el análisis *in silico* de los *primers* y sondas, mediante el software *OligoAnalyzer V 3.1*, también demostró que eran aptos para el estudio, debido a que cumplían con los parámetros recomendados por Owczarzy et al. (2008). Esto se debe a que, para la evaluación de horquillas, la Temperatura de *Melting* (T_m) de todos los oligos fue menor que sus condiciones de reacción (Owczarzy et al., 2008).

Además, en el análisis de auto-dímeros, los valores de ΔG de todos los diagramas de *primers* y sondas, no se encontraron valores menores a -9 Kcal.mol⁻¹, corroborando así que los oligos no se plegarían sobre ellos mismo y que no formarían dímeros individuales, entre cada uno de ellos (Owczarzy et al., 2008). Adicionalmente, se analizó la capacidad de todos los *primers* para formar heterodímeros y, al igual que con el análisis de auto-dímeros, los valores ΔG de todos ellos no fueron menores a -9 Kcal.mol⁻¹, determinando así que entre los *primers forward* y *reverse* no se formarían dímeros (Owczarzy et al., 2008).

Una vez que se comprobó que no existían problemas con la conformación estructural y bioquímica de los *primers*, se procedió a realizar PCR *in silico* de UCSC para ajustar la T_m de cada par de *primers*. Los resultados obtenidos fueron los que se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14.

Resultados de Temperatura de Melting (T_m) para cada primer empleando PCR *in silico* de UCSC

Polimorfismo	Primers		
	Tm Forward (°C)	Tm Reverse (°C)	Tm Promedio (°C)
rs1868092	63,20	55,80	59,50
rs1867782	60,70	59,90	60,30
rs10187368	60,00	60,20	60,10
rs13419896	52,20	58,70	55,45
rs4953354	53,80	60,40	57,10
rs895436	58,10	57,40	57,75
rs1867785	64,50	55,20	59,85

Finalmente, el último análisis que se realizó para evaluar el funcionamiento y modo de operar de los oligos diseñados fue a través de *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher* (Breslauer et al., 1986). A pesar de que se realizó PCR *in silico* mediante *UCSC*, también se realizó empleando este software debido a que existen diferencias en las maneras en las cuales los softwares realizan el cálculo de la temperatura de hibridación para los *primers*. Los resultados del promedio de temperatura de cada par de *primers* obtenidos de este nuevo análisis se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15.

Resultados promedio de Temperatura de Melting (Tm) para cada par de primers empleando *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher*

Polimorfismo Tm Promedio (°C)	
rs1868092	67,2
rs1867782	65,3
rs10187368	64,2
rs13419896	56,9
rs4953354	58,4
rs895436	62,4
rs1867785	68,6

De esta forma se pudo observar que existió una gran diferencia entre los cálculos de temperatura de hibridación para todos los *primers* a emplear, razón por la cual se probaron los resultados en dos pruebas de PCR. La primera prueba se realizó bajo las temperaturas de hibridación resultantes de PCR *in silico* de *UCSC* y la otra con las temperaturas de *Multiple Primer Analyzer* de *ThermoFisher* para empezar a estandarizar las condiciones de PCR, en *Singleplex*, con la prueba en la que se puedan visualizar menos inespecificidad (una sola banda por carril) y mayor intensidad de banda.

5.2 Reacción *SNaPshot*® *Primer Focus*®

La predicción de la migración alélica, es decir, la posición que tendrá cada alelo (representado por un pico de diferente color perteneciente a una base nitrogenada en particular), de cada SNP, obtenida por las reacciones *SNaPshot*® *Primer Focus*®, se sometieron a varios ensayos para estandarizar el procedimiento para las siete sondas diseñadas. En los ensayos de determinación de la cantidad de reactivos, para obtener los resultados que sugiere el inserto del juego de reactivos, se observó que no es necesario usar toda la cantidad de *SNaPshot*® *Primer Focus*® *Mix de ddNTP*. Esto se encuentra ilustrado en la Figura 8 y se basa en lo expresado en la Tabla 3; tomado del software *GeneMapper*® (Applied Biosystems, 2010, p. 1-2). Por consiguiente, la cantidad de agua desionizada en la reacción también cambió, en relación a la recomendada por el inserto del juego de reactivos *SNaPshot*® *Primer Focus*® (Applied Biosystems, 2013).

Lo importante de las lecturas que se realizan en el análisis de SNPs por la reacción *SNaPshot*® es la intensidad y posición de la señal de cada alelo y el ruido de fondo que interfiera con la lectura. En la Figura 8 se pueden observar diferentes picos de cuatro colores, en donde son relevantes solamente los que se tienen un tamaño entre 30 y 60 pares de bases (eje X), ya que ese es el tamaño aproximado de cada sonda con su cola de polinucleótidos, de acuerdo a la Tabla 2. Al igual que se pudo observar en la Figura 1, el pico de color rojo representa Timina, el verde Adenina, el negro Citosina y el azul Guanina y la posición en el eje X en la que se encuentran es en donde se esperarán leer los alelos de una muestra. Por otro lado, en el literal C se puede observar claramente que existe más ruido de fondo que en el resto de lecturas, es por motivos como este que es importante que, en lo posible, la intensidad de la señal de los alelos sea mayor a 1500 (eje Y) y que el ruido sea casi imperceptible, ya que puede ocurrir que un pico de ruido se encuentre dentro de un *bin* y se lea como alelo. Por esta razón es importante purificar los productos de PCR y usar las reacciones control que vienen dentro de los juegos de reactivos.

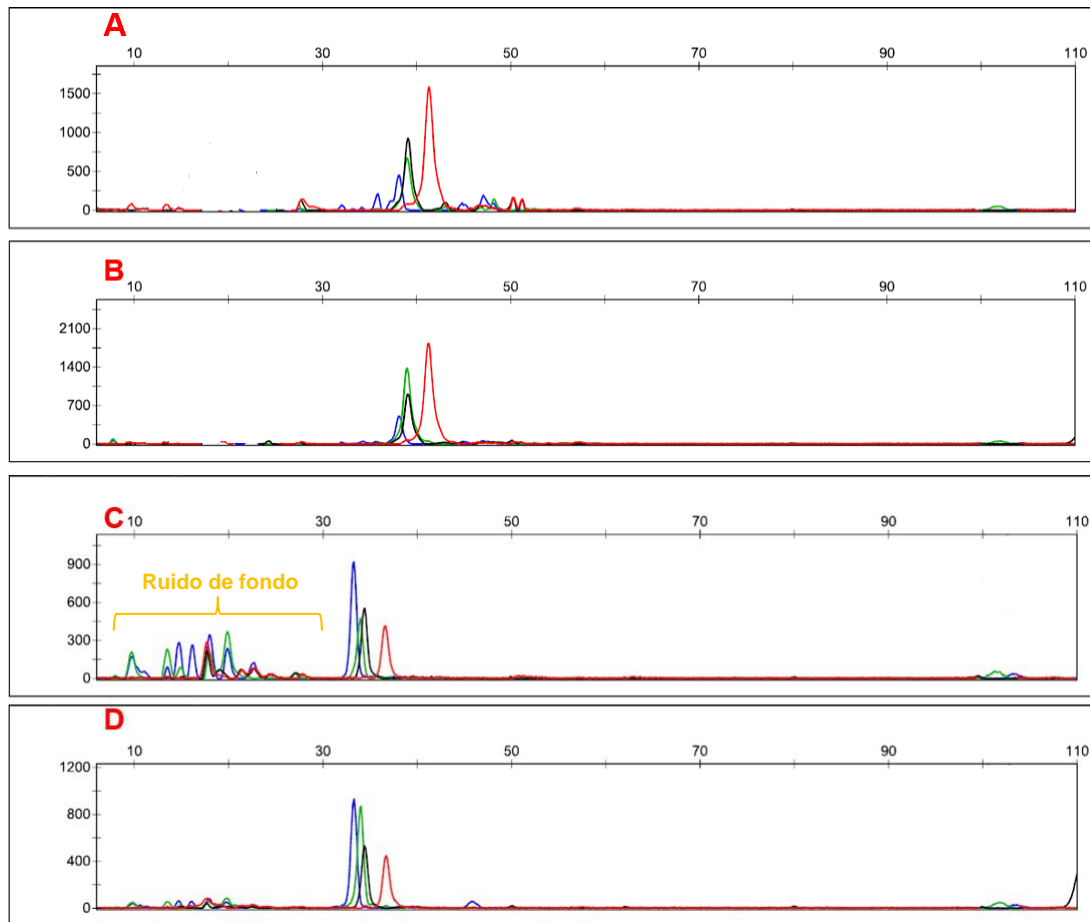


Figura 8. Lectura de las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* con las sondas:

- a) rs1868092 en concentración total de *Mix de ddNTP*
- b) rs1868092 en mitad de concentración de *Mix de ddNTP*
- c) Control Positivo de *SNaPshot® Primer Focus®* en concentración total de *Mix de ddNTP*
- d) Control Positivo de *SNaPshot® Primer Focus®* en mitad de concentración de *Mix de ddNTP*.

No obstante, las sondas funcionaron adecuadamente a concentración $2 \mu\text{M}$, a manera de *Singleplex*, de acuerdo al inserto del juego de reactivos. Además, las reacciones se ensamblaron en frío, como dicta el inserto (Applied Biosystems, 2013), debido a que se trabaja con una enzima propia del juego de reactivos y como en la gran mayoría de casos, estas se desnaturalizan o inactivan cuando sube la temperatura del medio y no tienen sustrato para actuar. Las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* para cada sonda se ensamblaron en un volumen final de $5 \mu\text{L}$ y las concentraciones de los reactivos que se usaron en la reacción se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16.

Concentración del juego de reactivos en la reacción *SNaPshot*® *Primer Focus*® utilizado por cada sonda

Mix de Reacción <i>SNaPshot</i>® <i>Primer Focus</i>®	Volumen
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Mix de ddNTP	4,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Buffer de Reacción 10X	2,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Co-factor	2,0 µL
<i>SNaPshot</i> ® <i>Primer Focus</i> ® Enzima	0,2 µL
Agua Desionizada	9,8 µL
Sonda	2,0 µL
Total	20,0 µL

Se empleó el perfil térmico de termociclador indicado en la Tabla 4, (Applied Biosystems, 2013). Estas condiciones no sufrieron modificación alguna y funcionaron adecuadamente para cada sonda. Posteriormente, de acuerdo al caso, los productos de *SNaPshot*® *Primer Focus*® se sometieron a purificación enzimática o se conservaron a 4 °C por un máximo de dos días. Los resultados de la predicción de la migración alélica para cada sonda obtenidas por las reacciones *SNaPshot*® *Primer Focus*® se encuentran ilustradas en la Figura 9.

Al igual que en la Figura 1 y 8, los colores de los picos de las bases nitrogenadas en la Figura 9 siguen siendo: rojo para Timina, verde para Adenina, negro para Citosina y azul para Guanina. Además, en la Figura 9 se puede apreciar que los alelos de cada SNP tendrán su posición específica en el eje X, en los cuales, a pesar de que dos SNPs, se lean juntos en una reacción *Multiplex*, tengan la misma base nitrogenada, estarán en distintas posiciones en la lectura final de la reacción *SNaPshot*®. Es así que en base a la Figura 9, se obtienen las posiciones en el eje X para ajustar los rangos de lectura de cada alelo (*bins*) para la lectura de la reacción *SNaPshot*® *Multiplex*.

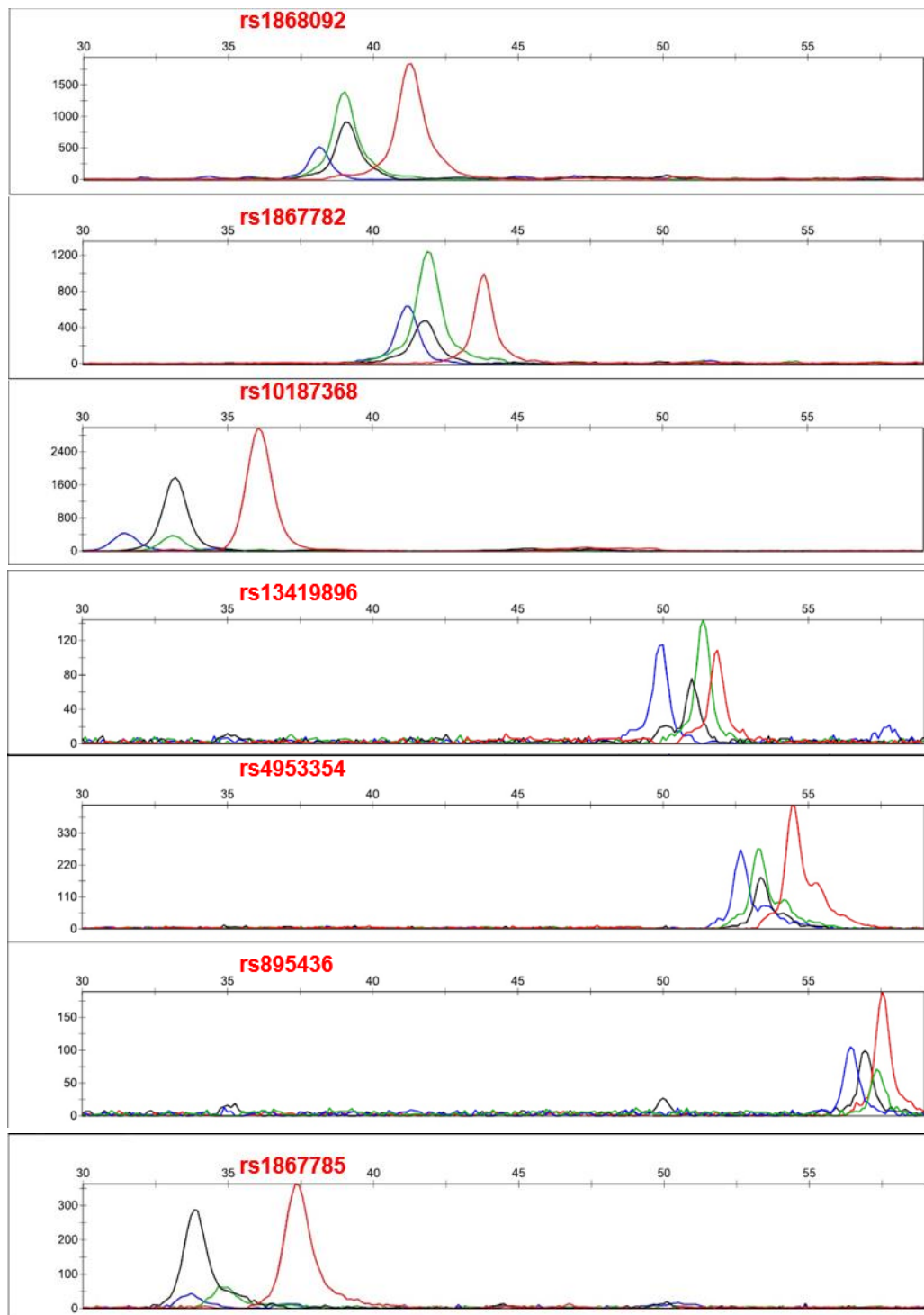


Figura 9. Predicción de la migración alélica para cada una de las sondas diseñadas, mediante reacciones *SNaPshot*® *Primer Focus*® en *Singleplex*.

5.3 Purificación Enzimática de Productos de *SNaPshot® Primer Focus®*

De acuerdo a los procedimientos descritos en la sección de materiales y métodos, se realizaron ensayos para determinar si de alguna manera influye la acción de la enzima SAP en los productos de *SNaPshot® Primer Focus®*.

El tratamiento enzimático con SAP es ampliamente utilizado en la Biología Molecular para preparar los productos de PCR para las reacciones de secuenciación, debido a que remueve los extremos fosforilados 5' de los productos de PCR y también inactiva los dNTPs no incorporados en la reacción (Bell, 2008). Esto se debe a que la acción de la enzima SAP permite que a los fragmentos de ADN se le incorporen terminadores de elongación como ddNTPs u otros agentes que se adhieren al ADN y emiten fluorescencia, como los juegos de reactivos *BigDye® Terminator*, de *ThermoFisher Scientific* (Applied Biosystems, 2005a), al remover el ruido de fondo en los productos de PCR (Bell, 2008).

Por consiguiente, se determinó experimentalmente que la adición de 1 U de SAP 1X, a los productos de las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* resulta indispensable para eliminar el ruido en la lectura, como se aprecia en la Figura 10. A diferencia del juego de reactivos que recomendaba la limpieza del producto con 1 µL de SAP se encontró que 1 U para la purificación es suficiente. Además, la digestión enzimática de los productos de *SNaPshot® Primer Focus®*, así como la inactivación de la enzima, fue llevada a cabo en el termociclador de acuerdo a la Tabla 5 (Applied Biosystems, 2013).

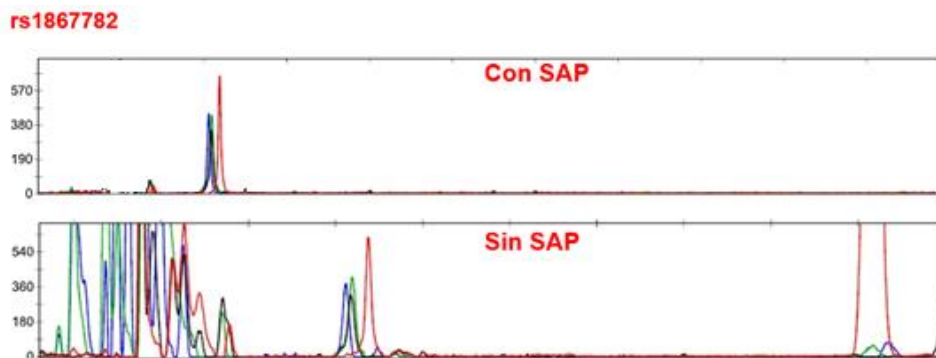


Figura 10. Efecto de la purificación del producto de reacción *SNaPshot® Primer Focus®* de la sonda del polimorfismo rs1867782 con 1 U de SAP 1X.

De esta forma, se aplicó el mismo procedimiento para purificar los productos *SNaPshot® Primer Focus®* del resto de las sondas y, empleando el software *GeneMapper®*, se logró predecir la migración alélica que tendría cada sonda.

5.4 Reacción de PCR *Singleplex*

Para determinar que la migración alélica reportada por la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, para todas las sondas, es la adecuada, se montó la reacción *SNaPshot®* en *Singleplex*. Además, al montar siete reacciones en *Singleplex* se garantizó que cada SNP fuera analizado apropiadamente en tamaño y genotipo. Sin embargo, para poder implementar la reacción *SNaPshot®*, fue necesario obtener los amplicones de productos PCR que contengan a los SNPs, empleando un par de *primers* por cada uno. De esta manera se tuvieron que realizar gradientes de temperatura y de ciclos para estandarizar las condiciones de PCR para los pares de *primers* de cada SNP, como se indicó en la Tabla 7.

Las cantidades necesarias de reactivos para que funcionen las siete reacciones de PCR, individualmente, empleando *Qiagen® Multiplex PCR Master Mix*, están indicadas en la Tabla 6. De acuerdo a lo descrito a la sección de Materiales y Métodos, se estandarizaron las reacciones de PCR en base a una concentración

final de 1 μM para cada *primer*, con hasta 0.5 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de ADN, ambos dentro de la reacción.

El juego de reactivos *Qiagen® Multiplex PCR* está diseñado especialmente para realizar reacciones *Multiplex* de manera efectiva y optimizando la cantidad de ADN molde en la reacción (Qiagen, 2010). Cada *Mix* de reacción listo contiene la enzima ADN polimerasa *HotStar® Taq*, de origen recombinante y con una alta termoestabilidad, además contiene cloruro de Magnesio y un *Mix* de dNTPs. Adicionalmente, el juego de reactivos contiene solución Q y agua de ARNasas, para favorecer la unión de los *primers* a su fragmento diana dentro de la reacción (Qiagen, 2010). Debido a la facilidad del montaje de reacciones PCR *Multiplex* con este juego de reactivos se emplea en gran variedad de ensayos (Sint, Raso y Traugott, 2012).

Del mismo modo, en la Tabla 17 se indican las condiciones de PCR, como temperatura, tiempo y cantidad de ciclos, a las cuales fueron sometidas cada par de *primers* para obtener amplicones que contengan un SNP a la vez. Para lograr obtener la única temperatura de hibridación adecuada, a la cual la intensidad de banda era fuerte y existía mínima cantidad de dímeros, se debieron realizar varias pruebas de gradiente de temperatura y de ciclos. Este proceso tomó varios intentos porque se emplearon los resultados de PCR *in silico* de UCSC y de *Multiple Primer Analyzer* de ThermoFisher.

Tabla 17.

Perfil térmico del termociclador utilizado para las reacciones de PCR Singleplex

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95 °C	15 minutos	
Denaturación	94 °C	1 minuto	
Hibridación	67 °C	1 minuto	35
Elongación	72 °C	1 minuto	
Elongación Final	72 °C	10 minutos	

Se encontró que para la evaluación de PCR *in silico*, en *Multiple Primer Analyzer* la media de T_m para amplificar los siete SNPs fue de 63.29 °C y para *UCSC* fue de 58.6 °C. De esta manera se determinó que el cálculo de *Multiple Primer Analyzer* fue más acertado que el de PCR *in silico*. Esto se pudo deber, probablemente, a que el algoritmo de *Multiple Primer Analyzer* contempla más de un par de *primers* en su lectura, mientras que *UCSC* analiza un par de *primers* a la vez. El obtener una sola temperatura de hibridación se realizó con el propósito de, posteriormente, poder emplear todos los pares de *primers* en una sola reacción *Multiplex*.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 11, los resultados de electroforesis horizontal de las siete PCRs en *Singleplex*, en geles de agarosa al 2 %, fueron los esperados cuando se los visualizó con un marcador de peso molecular de 100 Pares de Bases (pb). De este modo, se observó que los siete amplicones producto de PCR *Singleplex*, obtenidos bajo las condiciones de las Tablas 6 y 17, eran aptos para continuar con la reacción *SNaPshot*®, ya que además los tamaños de los amplicones son concordantes con los esperados, de acuerdo a la Tabla 13. Esto se concluyó debido a que no se observó inespecificidad, dímeros y, al contrario, se observaron bandas de tamaño consistente y de alta intensidad en la lectura del gel de agarosa bajo luz UV.

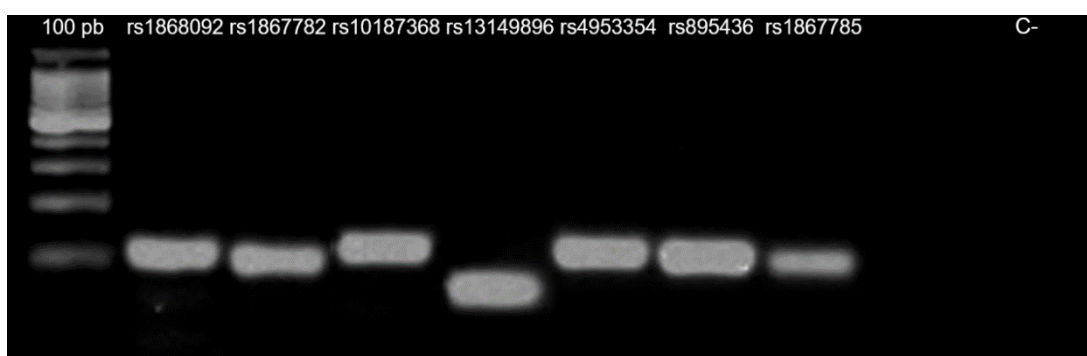


Figura 11. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR en *Singleplex* de cada uno de los siete pares de *primers*.

Por consiguiente, el volumen restante de amplicones de PCR *Singleplex*, que no se emplearon en la visualización mediante electroforesis, se preservaron a 4 °C o se sometieron a purificación enzimática SAP – EXO I, como se explicó en materiales y métodos.

5.5 Purificación Enzimática de Productos de PCR *Singleplex*

Del mismo modo que para la purificación enzimática de los productos de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, se llevaron a cabo estudios para determinar la influencia de la acción enzimática en las lecturas de los productos de reacción de PCR en *Singleplex*. La principal diferencia para esta purificación enzimática fue que, en el inserto del juego de reactivos *SNaPshot®* se recomienda emplear la acción conjunta de SAP y Exonucleasa I (EXO I) (Applied Biosystems, 2005b), a diferencia de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, que solo requirió de la acción de SAP (Applied Biosystems, 2013).

El uso particular de EXO I se extiende a procedimientos dedicados a eliminar ADN de cadena sencilla, como los *primers*, de reacciones tipo PCR (Bell, 2008). De esta manera, la EXO I actúa sobre el extremo hidroxilado 3', permitiendo que los *primers* que no se hayan utilizado durante la reacción PCR sean inactivados y eliminados (Bell, 2008). Por consiguiente, el uso de EXO I es requerido para optimizar el proceso de unión de los amplicones obtenidos con las sondas diseñadas, durante la reacción *SNaPshot®*.

De este modo, de acuerdo al inserto del juego de reactivos *SNaPshot®* (Applied Biosystems, 2005b), se purificaron los productos de PCR con ambas enzimas, SAP y EXO I, tanto para eliminar los dNTPs no incorporados y remover los extremos fosforilados 5' (Bell, 2008), así como para deshacerse de los *primers* que no se emplearon en la reacción PCR, respectivamente. Por consiguiente, el principal uso de la acción combinada de las enzimas SAP-EXO I fue para preparar a los productos de PCR para la reacción *SNaPshot®*. Esto se debe a que el reactivo *SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix* del juego de reactivos

no usa dNTPs, sino ddNTPs para extender y tipificar solamente el SNP. Adicionalmente, los oligos que emplea la reacción *SNaPshot*® no tienen el fin de obtener un amplicón, sino amplificar el SNP requerido. De esta manera, en la reacción *SNaPshot*®, no deben existir los *primers* usados para obtener el fragmento del SNP, sino la sonda diseñada que se acopla al SNP.

No obstante, se decidió evaluar las implicaciones de restringir el uso de la enzima EXO I para la purificación de los siete productos de PCR *Singleplex*. Esto se decidió debido a que ya se evaluó la influencia del uso de SAP en la purificación de productos de *SNaPshot*® *Primer Focus*®, que fueron analizados por electroforesis capilar.

De este modo, en la Figura 12 se puede ilustrar el efecto de la acción combinada de 1U de cada una de ambas enzimas 1X y solamente de 1 U de SAP 1X, sobre el producto de PCR del rs4953354 en el ADN control 9948M, el cual fue empleado en una reacción *SNaPshot*® y analizado por electroforesis capilar.

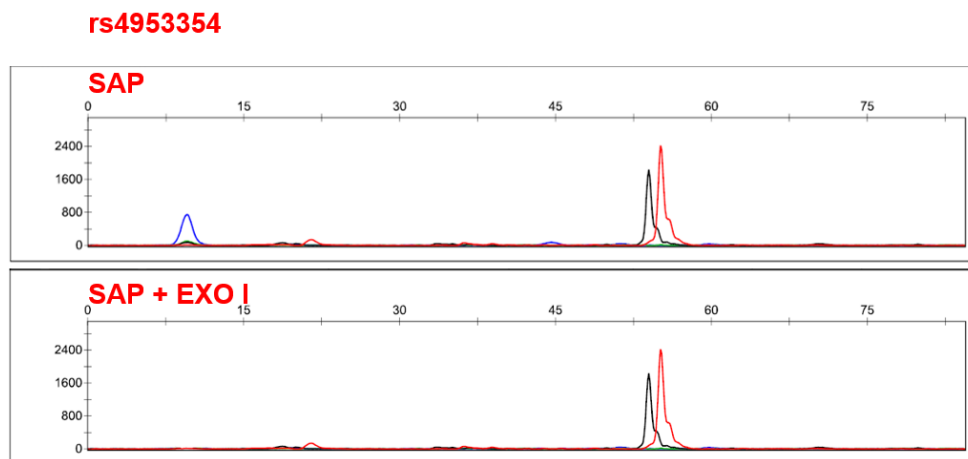


Figura 12. Efecto de la purificación del producto *SNaPshot*® del rs4953354 con 1 U de SAP y 1 U de SAP + 1 U de EXO I, en la muestra 9948M.

Como se pudo ilustrar en la imagen, se determinó que era necesario emplear la acción conjunta de ambas enzimas, bajo el programa de la Tabla 5, para que la

reacción *SNaPshot*® funcione adecuadamente y que la tipificación de genotipos en el analizador genético tenga menos ruido de fondo. Por consiguiente, el resto de productos de PCR *Singleplex* fueron sometidos a purificación SAP-EXO I, previamente a ser empleados en la reacción *SNaPshot*® en *Singleplex*.

5.6 Reacción *SNaPshot*® *Singleplex*

La tipificación de los SNPs en *Singleplex*, o uno a la vez, se llevó a cabo mediante la reacción *SNaPshot*®, la cual tuvo que ser evaluada en varios aspectos para poder ser estandarizada para los siete SNPs. El primer ensayo realizado fue para determinar la concentración de reactivos por reacción, con el fin de obtener los picos de los genotipos con buena intensidad.

Las concentraciones de los reactivos tomaron como base las indicadas por el inserto del juego de reactivos (Applied Biosystems, 2005b), no obstante se determinó que las concentraciones adecuadas para obtener resultados similares a los recomendados por el inserto son los indicados en la Tabla 18.

Tabla 18.

Concentración del juego de reactivos en la reacción *SNaPshot*® *Singleplex*

Mix de Reacción <i>SNaPshot</i>® <i>Singleplex</i>	Volumen
Mix de Reacción <i>SNaPshot</i> ® <i>Multiplex</i> Lista	1,0 µL
Sonda	1,0 µL
Agua Desionizada	1,5 µL
Producto de PCR <i>Singleplex</i> Correspondiente	1,5 µL
Total	5,0 µL

De este modo, como se puede observar en la Figura 13, tomada del software *GeneMapper*®, los ensayos realizados variando la concentración final de reactivos, de acuerdo a la Tabla 8, no tuvieron mayor incidencia en el genotipado del polimorfismo rs895436, con la muestra de ADN comercial 9948M, tomado como ejemplo.

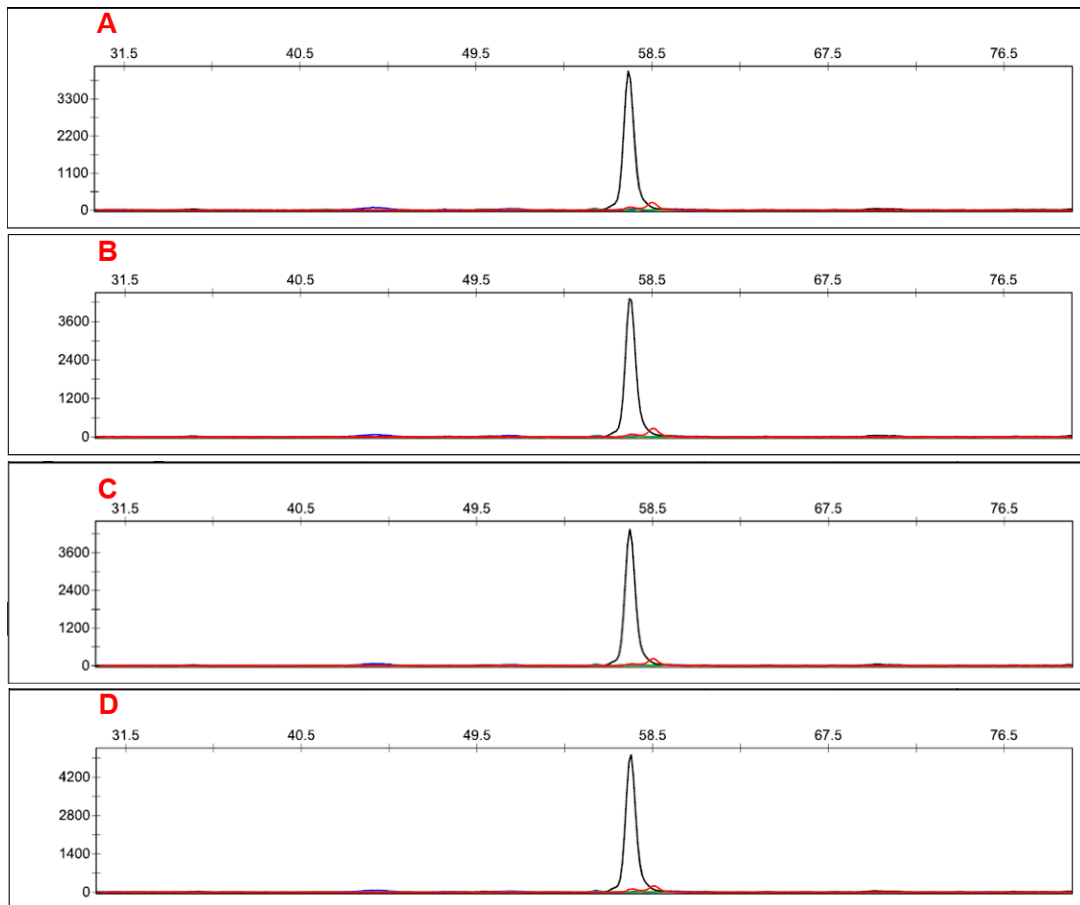


Figura 13. Reacción SNaPshot® en Singleplex para el SNP rs895436 de la muestra control 9948M:

- a) concentración final de sonda de 0.2 μM
- b) concentración final de sonda de 0.4 μM
- c) concentración final de sonda de 0.6 μM
- d) concentración final de sonda de 0.8 μM .

La concentración de sonda que recomienda el inserto es de 0.2 μM , no obstante, se pudo determinar que esta no influye, de manera significativa, en la intensidad de la señal del genotipo, debido a la eficiencia de la enzima con su cofactor, pertenecientes al juego de reactivos. De igual forma, se determinó que la concentración del *Mix de Reacción Listo SNaPshot® Multiplex* no influyó en la genotipificación, sin embargo, debido a que este contiene ddNTPs, los cuales están marcados para emitir fluorescencia, se decidió ensamblar la reacción con

la menor exposición a la luz posible, a pesar de que el inserto no lo recomienda. Finalmente, se usó el perfil térmico de la Tabla 9 para realizar la reacción *SNaPshot® Singleplex*.

De esta forma, se repitió el proceso para los siete productos de PCR, con el fin de genotipificar un solo SNP por reacción *SNaPshot®*. Como se puede observar en la Figura 14, los resultados de las reacciones *SNaPshot® Singleplex* fueron los esperados para seis de siete SNPs, ya que la señal de cada alelo es alta (eje Y) y prácticamente no se detecta ruido de fondo. La lectura de los picos (alelos) de estos seis SNPs se realiza de la misma manera que se interpretaron las lecturas de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, con los mismos colores para cada base nitrogenada. No obstante, la reacción *SNaPshot® Singleplex* que no se obtuvo se pudo deber a una baja concentración de la sonda diseñada para el rs1867782, a una mala dilución del *Stock* de la sonda o una degradación progresiva de la sonda.

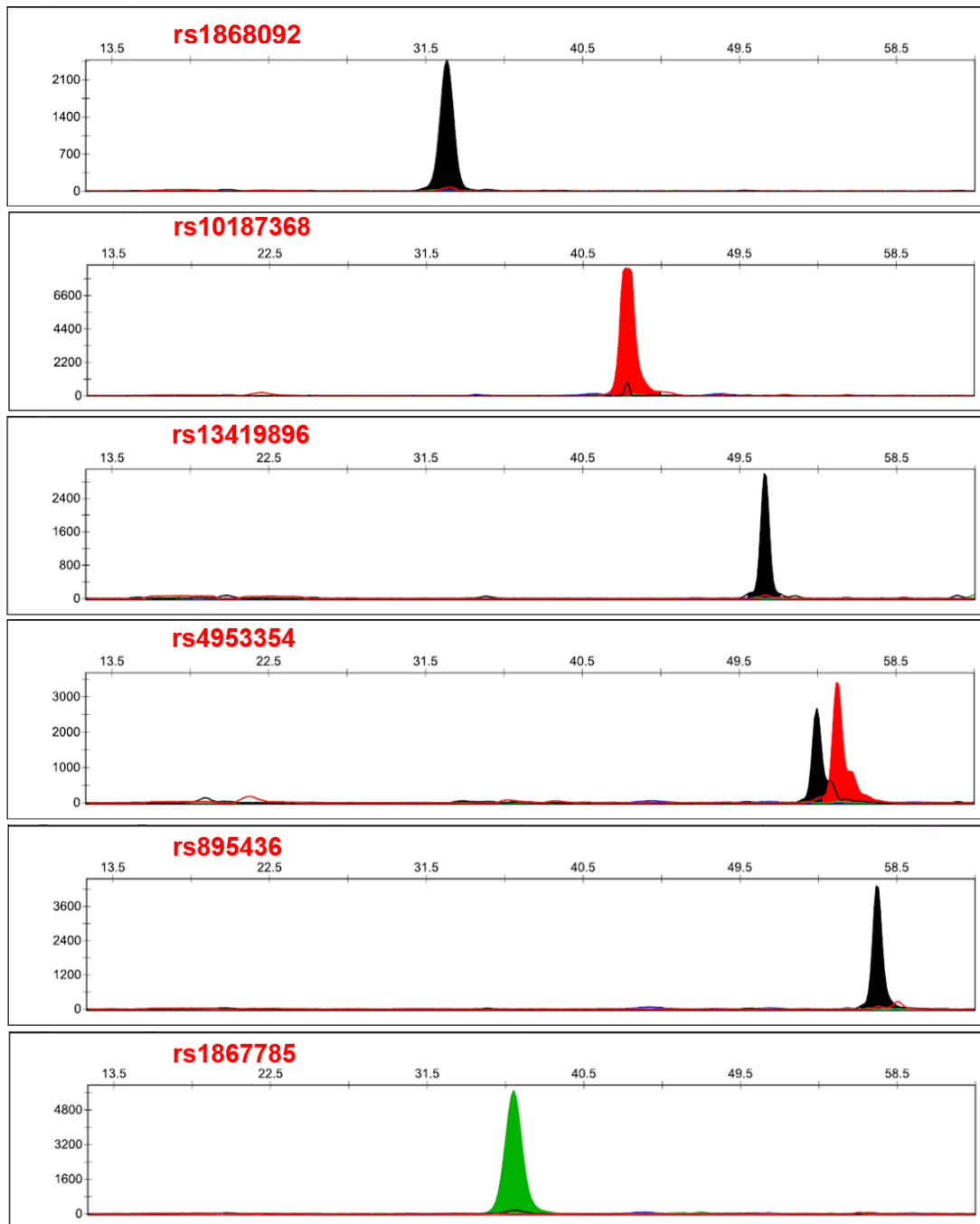


Figura 14. Alelos obtenidos por las reacciones SNaPshot® en Singleplex de cada uno de los SNPs empleados en el diseño, con el ADN control 9948M.

5.7 Ajuste de Señal de los Genotipos

De acuerdo a lo observado de manera práctica, la migración alélica que presenta cada alelo cambia dependiendo de la concentración del ADN molde, concentración de sonda en la reacción, temperatura y tiempo al que es sometida la reacción, entre otros factores. Un claro ejemplo es el de la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*, la cual no usa molde de ADN por lo tanto la sonda actúa sin competencia y la enzima del juego de reactivos actúa sin elementos que puedan inhibir su acción (Applied Biosystems, 2013). Por otro lado, cuando se ejecuta la reacción *SNaPshot® Singleplex*, se emplea como molde el ADN resultante de amplificación mediante PCR, ocasionando que la sonda se una selectivamente a la región del SNP y, por ende, modifica ligeramente la migración alélica reportada por la reacción *SNaPshot® Primer Focus®*.

Sin embargo, ajustar la lectura en este punto sirvió solamente como guía. Esto se debe a que en la reacción *SNaPshot® Multiplex* ocurren más interacciones, tanto entre todos los *primers* en la reacción de PCR, así como de todas las sondas en la reacción *SNaPshot®*, provocando que la migración alélica nuevamente sufra modificaciones. No obstante, en base a los resultados obtenidos hasta este punto se pudo obtener una tabla que permitió predecir con mayor exactitud la migración alélica previo a la implementación del sistema en *Multiplex* (Tabla 19).

Tabla 19.

Ajuste de bins para la detección de los genotipos de cada SNP para el análisis genético de la reacción SNaPshot® Multiplex

Polimorfismo	Posible Base Nitrogenada	Migración Alélica SNaPshot® Primer Focus®	Migración Alélica SNaPshot® Singleplex	Ajuste inicial de bins
rs1868092	G	39,03	32,71	32,46 - 32,96
	A	41,20	34,89	34,94 - 35,44
rs1867782	C	41,10	/	40,90 - 41,40
	G	41,67	/	41,25 - 41,75
rs10187368	G	33,20	40,77	41,18 - 41,68
	A	36,06	42,94	43,48 - 43,98
rs13419896	G	51,00	50,92	50,64 - 51,14
	A	51,80	51,91	51,66 - 52,16
rs4953354	G	53,55	54,09	53,20 - 53,70
	A	54,66	55,21	54,30 - 54,80
rs895436	G	56,46	56,39	56,64 - 57,14
	C	56,96	57,40	56,64 - 57,14
rs1867785	G	34,29	34,20	33,65 - 34,15
	A	34,83	36,48	34,69 - 34,99

Las reacciones SNaPshot® Primer Focus® y SNaPshot® Singleplex, sirvieron de base para ajustar los bins mostrados la Tabla 19, los cuales se ingresaron a modo de rango para cada posible alelo por SNP, mediante el software GeneMapper® V.3.2. Los bins permiten detectar las señales de cada base nitrogenada esperada por SNP y ajustarlos correctamente representa un ahorro de tiempo, ya que, además, cuando se realice la lectura de la reacción SNaPshot® Multiplex indicarán qué alelo es el pico que se observa y si efectivamente es una señal alélica o es ruido de fondo. Los valores reportados en la Tabla 19 fueron obtenidos tras realizar varias lecturas en el analizador genético y calcular la media de los valores. Los bins se diseñaron para que detecten las señales de los alelos en un rango de más y menos 0.5 de tamaño (eje X). De este modo, para la tipificación de SNPs, cuando la señal de la base nitrogenada adecuada se encontró dentro del rango, el equipo automáticamente reportó el alelo, como se puede apreciar en la Figura 15. Es así que, en la Figura 15 se observa la función de los bins, indicar cuál es la base nitrogenada que se observó para cada alelo y determinar los genotipos (homocigoto o heterocigoto) para cada SNP, a diferencia de la Figura 14, que solo es una lectura de señales.

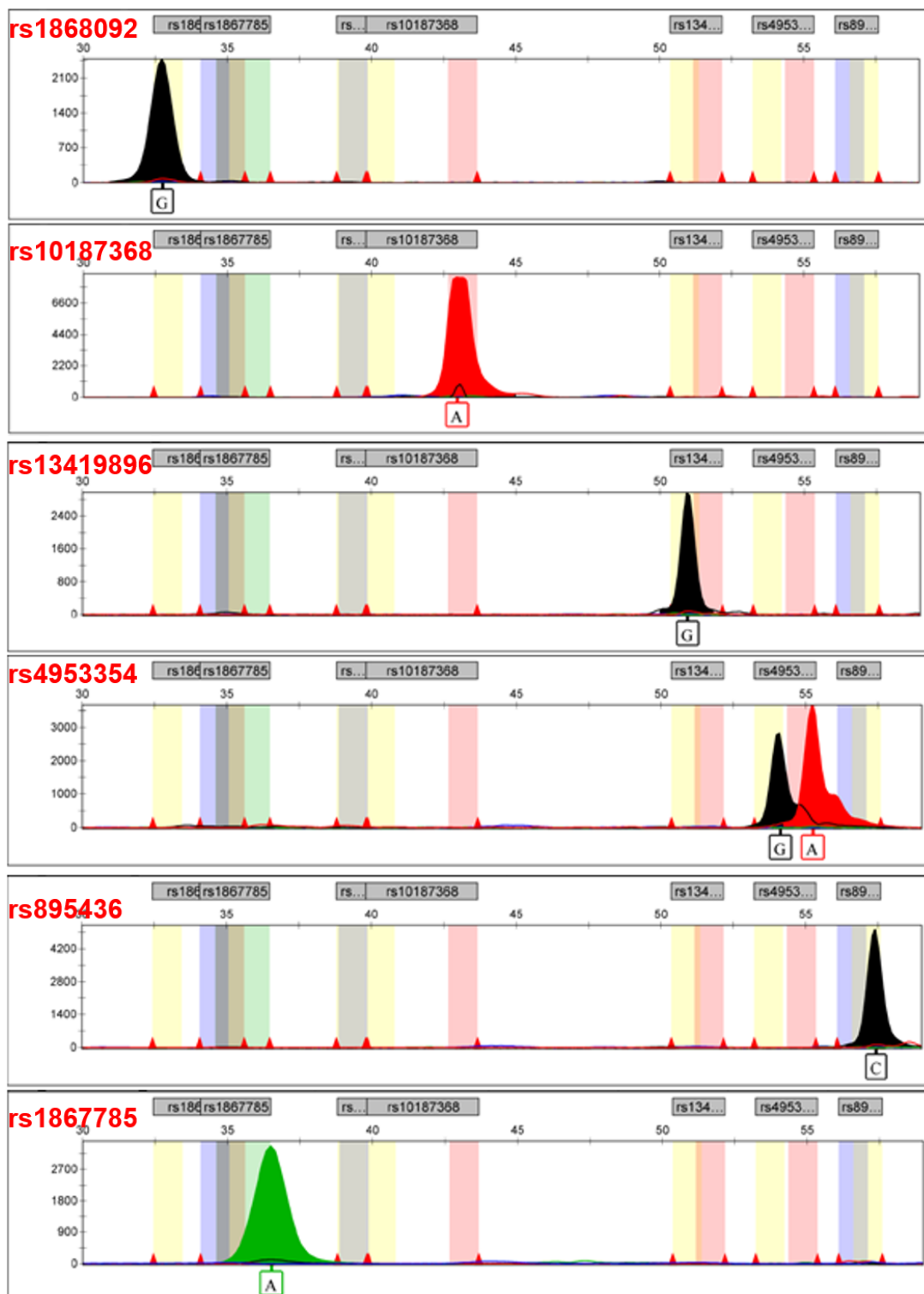


Figura 15. Lectura de los alelos de cada una de las reacciones *SNaPshot*® *Singleplex* después de ajustar los *bins*, con el ADN control 9948M.

Por consiguiente, ya que en la Figura 15 se determinó que las reacciones *SNaPshot*® en *Singleplex* fueron estandarizadas adecuadamente porque la señal de los alelos no presenta ruido y los *bins* determinan que las bases nitrogenadas que esos SNPs pueden presentar son los reportados en la base de datos dbSNP, se pudo llevar el proyecto a la etapa de genotipificación de los siete SNPs en una sola reacción en *Multiplex*.

5.8 Reacción de PCR *Multiplex*

Del mismo modo que en las reacciones *SNaPshot*® en *Singleplex*, primeramente, se estandarizaron las condiciones de PCR para la reacción en *Multiplex*. De esta manera, se tuvieron que realizar las pruebas de gradiente de temperatura y de ciclos, en base a las PCR *Singleplex*, para garantizar el adecuado desenvolvimiento de los siete pares de *primers* en una sola reacción y obtener los amplicones correspondientes a cada SNP.

De acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, las condiciones de PCR se ajustaron a una concentración final de 0.2 μM para cada *primer* y hasta 0.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para el ADN, por volumen de reacción. Las cantidades necesarias de reactivos para que funcione la reacción de PCR *Multiplex*, empleando el juego de reactivos *Qiagen*® *Multiplex PCR*, se indican en la Tabla 6, pero en lugar de usar un par de *primers* por reacción se utilizó el *Mix* de *primers*. Estas concentraciones se ajustaron en base a estudios previos realizados por el Director Científico del proyecto, con el juego de reactivos y se las empleó exitosamente en las reacciones de PCR *Singleplex* y *Multiplex*.

Se realizaron varios ensayos de gradiente de temperatura y de ciclos para obtener la temperatura de hibridación a la cual se pudieran visualizar, en las lecturas del analizador genético, los siete amplicones de la reacción de PCR *Multiplex*. Este proceso tomó varios intentos y los amplicones que se obtuvieron no se mostraban en todas las temperaturas de hibridación. No obstante, se logró determinar un punto en el cual se predijo que se obtendrían los siete amplicones.

De esta manera, en la Tabla 20 se indican las condiciones de PCR, como temperatura, tiempo y cantidad de ciclos, a la cual se sometió el *Mix* de PCR *Multiplex*, con los siete pares de *primers* en conjunto, para obtener resultados favorables.

Tabla 20.

Perfil térmico del termociclador utilizado para PCR en *Multiplex* con los siete pares de *primers*

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	95 °C	15 minutos	
Denaturación	94 °C	1 minuto	
Hibridación	62,7 °C	1 minuto	40
Elongación	72 °C	1:30 minutos	
Elongación Final	72 °C	10 minutos	

A diferencia del perfil térmico de PCR en *Singleplex*, se añadieron 5 ciclos más para aumentar la concentración de amplicones, debido a que en la PCR *Multiplex* interaccionan varios *primers* con un mismo molde de ADN. Además, al tiempo de elongación se le agregaron 30 segundos por ciclo, dándole más tiempo al ADN para unirse después de hibridar con los *primers*. Se empleó el juego de reactivos *Qiagen® Multiplex PCR*, diseñado especialmente para realizar reacciones de PCR *Multiplex*, el cual posee todos los componentes de la PCR en proporciones determinadas, a excepción del molde de ADN, los *primers* y agua grado molecular (Qiagen, 2010; Sint et al., 2012). De esta forma, se implementó la reacción *SNaPshot® Multiplex*, ya que se observó, mediante electroforesis capilar, que en este rango de temperatura de hibridación y bajo las condiciones de las Tablas 18 y 20, existía gran posibilidad de que amplificaran los siete amplicones correspondientes a cada SNP.

Adicionalmente, los productos de PCR *Multiplex* se sometieron a purificación enzimática SAP-EXO I, siguiendo el mismo protocolo que para los productos de PCR *Singleplex*, ubicado en materiales y métodos. Este proceso se realizó para eliminar los dNTPs y *primers* no usados en la reacción y para remover los grupos

fosfato de los extremos 5' de los amplicones, para que se pudiese continuar con la reacción *SNaPshot® Multiplex*. Después, los productos de PCR *Multiplex* purificados se conservaron a 4 °C, para preservarlos adecuadamente hasta que se realice la reacción *SNaPshot®*.

5.9 Reacción *SNaPshot® Multiplex*

La etapa final de desarrollo del sistema *SNaPshot®* consistió en la estandarización de la reacción en *Multiplex*, la cual se montó en ausencia de luz, de igual manera que la reacción *SNaPshot® Singleplex*. De esta forma, la reacción *SNaPshot® Multiplex* se montó empleando la concentración del juego de reactivos de la Tabla 18, no obstante, en lugar de emplear una sola sonda por reacción, se empleó un *Mix* de las siete sondas. La concentración final de cada sonda por reacción se encontró entre 0.15 y 1 µM, de acuerdo a la Tabla 11. Sin embargo, tras varios análisis se determinó que la mejor concentración para cada una de las sondas es la mostrada en la Tabla 21.

Tabla 21.

Concentración del Mix de sondas en la reacción *SNaPshot® Multiplex*

Polimorfismo	Mix de Diluciones
rs1868092	2 µM
rs1867782	10 µM
rs10187368	6,5 µM
rs13419896	1,5 µM
rs4953354	7,5 µM
rs895436	7,5 µM
rs1867785	6,5 µM

Además, en cuanto al producto de PCR a emplear, en lugar de un solo producto de PCR *Singleplex* por reacción, para el *Mix* de sondas, se empleó el producto de PCR que contenía los siete amplicones, resultante de la reacción *Multiplex* e individual para cada ADN control. No obstante, el perfil térmico empleado para la reacción *SNaPshot® Multiplex* fue el indicado en la Tabla 9, a diferencia que

se evaluó la influencia del número de ciclos, incrementándolo hasta 36, como se puede apreciar en la Figura 16.

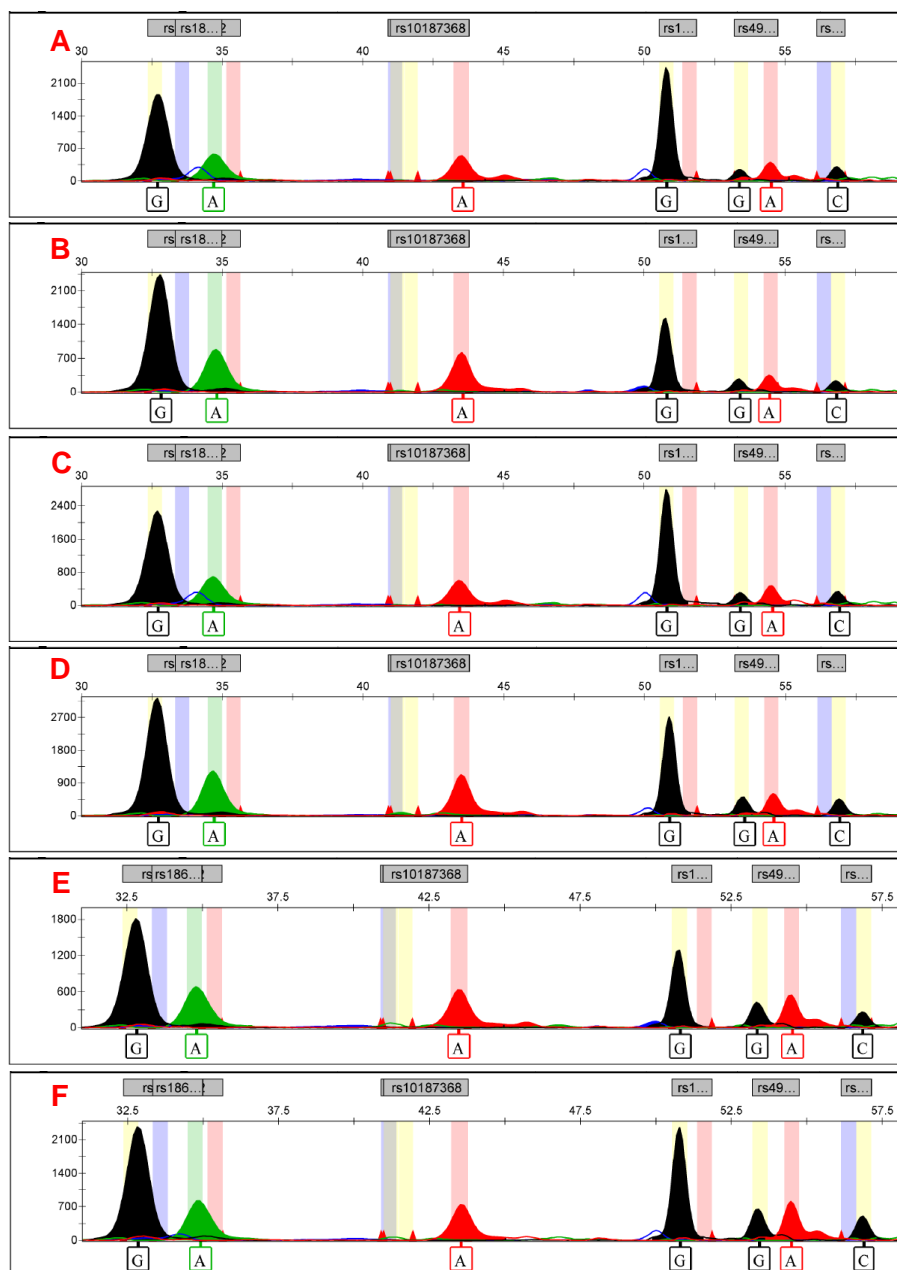


Figura 16. Reacción SNaPshot® Multiplex empleando el ADN control 9948M:

- a) 31 ciclos de reacción
- b) 32 ciclos de reacción
- c) 33 ciclos de reacción
- d) 34 ciclos de reacción
- e) 35 ciclos de reacción
- f) 36 ciclos de reacción.

En las imágenes de la Figura 16 se pueden apreciar todas las señales de bases nitrogenadas juntas, que se observaban de manera separada en las reacciones *Singleplex*. Además, se puede observar como el número de ciclos de la reacción *SNaPshot*® afecta el balance de las señales alélicas, siendo el literal D correspondiente a 34 ciclos, la lectura en la cual la señal de los picos está más uniforme.

Una vez que se determinaron las condiciones de la reacción *SNaPshot*® *Multiplex*, se repitió el proceso empleando el ADN control 9948M, y como se puede observar en la Figura 17, se obtuvieron las señales alélicas de siete SNPs en una sola reacción. En este punto se modificaron nuevamente los *bins*, para que se acoplen al sistema *Multiplex* y que los alelos puedan ser identificados sin confundirlos con ruido. Sin embargo, se siguieron presentando problemas con el rs1867782, ya que la intensidad de la señal alélica reportada fue apenas superior a los 200 (eje Y).

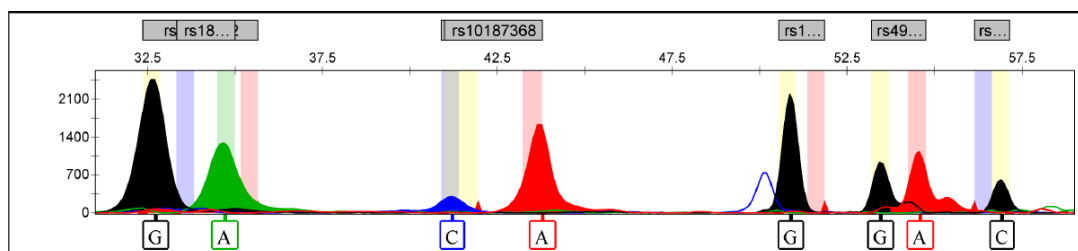


Figura 17. Reacción *SNaPshot*® *Multiplex* de tipificación de los SNPs rs1868092, rs1867728, rs10187368, rs13419896, 4953354, rs895436 y rs1867785, usando el ADN control 9948M.

De la misma forma que con la muestra 9948M, se emplearon las otras muestras de ADN control comercial (9947A, K562 y C007) y se los sometió al mismo proceso, desde el montaje de PCR en *Multiplex*, para determinar si todo el proceso *Multiplex* se estandarizó. Los resultados de aplicar el protocolo de genotipificación basado en el sistema *SNaPshot*® *Multiplex* para las muestras de ADN control se pueden observar en la Figura 18.

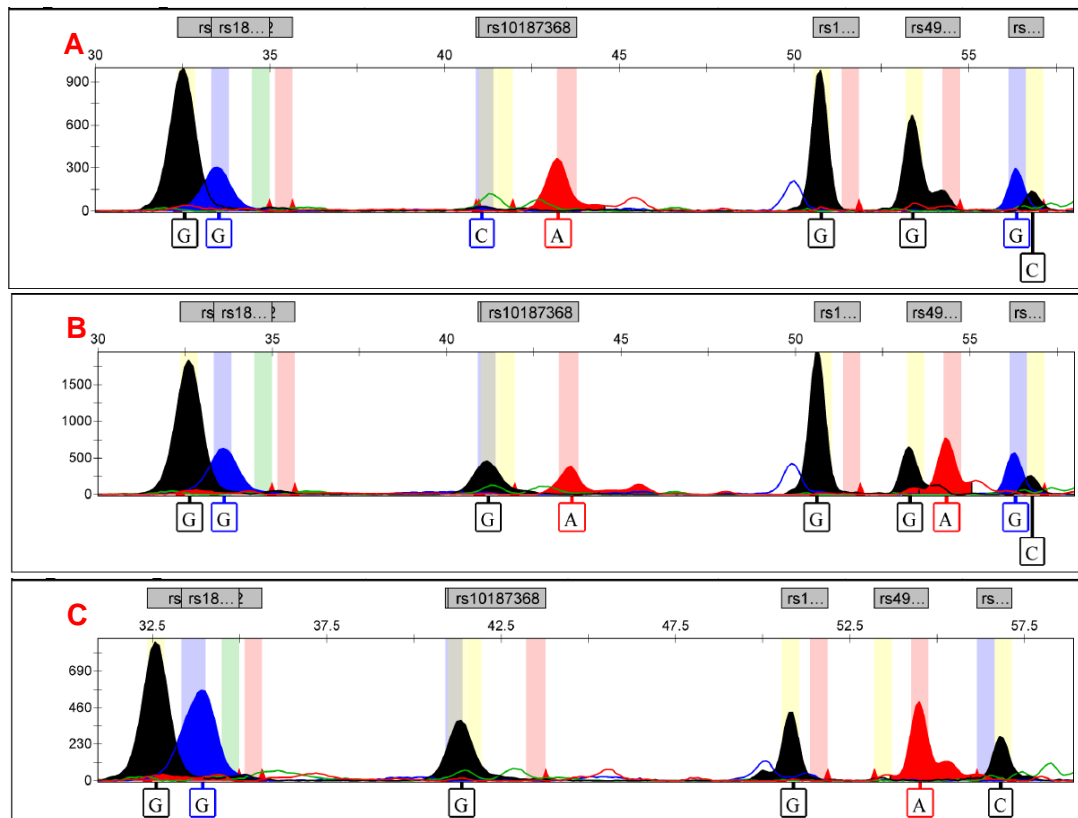


Figura 18. Reacción de genotipificación aplicando el protocolo diseñado basado en *SNaPshot® Multiplex* en los ADN control:

- a) Reacción *SNaPshot® Multiplex* del ADN 9947A
- b) Reacción *SNaPshot® Multiplex* del ADN K652
- c) Reacción *SNaPshot® Multiplex* del ADN C007.

En la Figura 18, se puede observar la genotipificación de los siete SNPs escogidos, en las muestras de ADN control 9947A, K652 y C007, aplicando el protocolo estandarizado que se basa en *SNaPshot® Multiplex*. De acuerdo a la intensidad de la señal de los alelos (eje Y) y a que el ruido en las lecturas es imperceptible se puede determinar que el protocolo se estandarizó. No obstante, el rs1867782 no fue genotipificado en la muestra K652 y C007, a lo cual se infiere que existen inserciones o deleciones en la región del gen *HIF-2α* a la cual se acopla la sonda, ya que el alineamiento de la sonda con la secuencia del gen *HIF-2α* descargado del NCBI, mediante el software *Geneious V8.7.1*, indicó que se acoplaría complementariamente. Sin embargo, esta suposición debía

comprobarse mediante secuenciación Sanger, en base a la cual también se validaría el método.

5.10 Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger mediante electroforesis capilar es el método base o *Gold Standard* para tipificar SNPs presentes en el ADN (Sanger et al., 1977; Springer, 2006). Este método requiere la extensión de un determinado fragmento de ADN en sentido *Forward* y *Reverse*, para determinar la secuencia que posee el fragmento, en el cual se pueden detectar variaciones alélicas y todo tipo de marcadores moleculares (Sanger et al., 1977). Por consiguiente, el método de secuenciación Sanger se empleó para comparar los resultados obtenidos de la genotipificación por el sistema *SNaPshot® Multiplex* diseñado para el presente proyecto.

Tras la estandarización de las condiciones de concentración y del perfil térmico de cada una de las siete PCRs, para obtener un amplicón que contuviera a un SNP por reacción, se desarrolló un protocolo experimental. Este protocolo, que empleó los reactivos distribuidos por *Promega®*, se aplicó a las cuatro muestras de ADN control comercial, el cual demostró alta efectividad para la obtención de los amplicones. Además, el sistema *AMPure* de *Agencourt*, empleado para remover todos los elementos no incorporados en las reacciones de PCR fue de gran ayuda para obtener una lectura de las secuencias con el menor ruido posible (Dunham y Friesen, 2013). Sin embargo, debido a que la estandarización de las PCR demandó gran cantidad de tiempo, no fue posible practicar la técnica de purificación adecuadamente, lo cual permitió realizar solo dos repeticiones de cada lectura. No obstante, en las dos repeticiones de la tipificación de los rs13419896 y rs1867785, solo se obtuvo una lectura adecuada para la muestra 9948M.

Los resultados de secuenciar por el método Sanger las muestras de ADN se encuentran en la sección de Anexos, del Anexo 1 al 7. Uno de los resultados que

más destacó fue el hecho de que los rs1867782 y rs895436, en las muestras de ADN control, presentaron variaciones genéticas en el sitio donde se unen sus sondas (Anexo 2 y 7, respectivamente). Por consiguiente, se puede entender la razón por la cual la especificidad del sistema *SNaPshot® Multiplex* no fue del 100 %, como se esperaba. De esta manera, se extrajo la información de la genotipificación de ambos procedimientos y se la proceso mediante *SPSS Statistics V 23*.

5.11 Validación Estadística

La primera etapa consistió en la realización de la prueba no paramétrica de Wilcoxon, para determinar si existen diferencias significativas entre la cantidad de cada genotipo obtenido por el sistema *SNaPshot® Multiplex* y la del método *Gold Standard*. Se decidió emplear una prueba estadística no paramétrica debido a que los resultados del ensayo son cualitativos y no cuantitativos. Además, se utilizó la prueba de Wilcoxon ya que permite determinar si existe variación entre dos muestras, enfoque desde el cual se abordó el estudio, ya que se emplean dos métodos para obtener resultados, en los que se espera un corto margen de variabilidad. De esta manera, la matriz de análisis se basó en la cantidad de genotipos obtenidos por los dos métodos, como se muestra en la Tabla 22, la cual se ingresó en el software *SPSS Statistics V 23*.

Tabla 22.

Matriz resumen de la cantidad de genotipos obtenidos por el sistema *SNaPshot® Multiplex* y secuenciación Sanger.

Posibles Genotipos	Número de Genotipos por <i>SNaPshot® Multiplex</i>	Número de Genotipos por <i>Gold Standar</i>
G/G	13	9
A/A	4	5
C/C	4	5
A/G	4	3
G/C	1	0

En base al resultado obtenido de la prueba de Wilcoxon, se pudo determinar que entre ambos métodos no existe diferencia significativa, ya que, como se indica en la Figura 19, el valor obtenido para el estadístico de prueba es de -0.707, ya que el valor de Z se encuentra en una de las regiones críticas (Rosner et al., 2006). Además, el valor obtenido de 0.480, al ser mayor que 0.05, indica que se acepta la hipótesis alternativa, es decir, que los métodos de tipificación en este caso, no presentan diferencia estadísticamente (Rosner et al., 2006).

Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

		Rangos		
		N	Rango promedio	Suma de rangos
Final - Inicial	Rangos negativos	3 ^a	3,33	10,00
	Rangos positivos	2 ^b	2,50	5,00
	Empates	0 ^c		
	Total	5		

a. Final < Inicial

b. Final > Inicial

c. Final = Inicial

Estadísticos de prueba^a

	Final - Inicial
Z	-,707 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,480

a. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon

b. Se basa en rangos positivos.

Figura 19. Validación estadística entre la genotipificación del sistema *SNaPshot® Multiplex* y secuenciación Sanger mediante *SPSS Statistics V23*.

Adicionalmente, los resultados del cálculo de sensibilidad y de especificidad del sistema *SNaPshot® Multiplex* diseñado, obtenidos al comparar con los resultados de la secuenciación Sanger demostraron la efectividad del método. Es así, que en cuanto a la sensibilidad se encontró que el sistema *SNaPshot®*

Multiplex diseñado tiene la capacidad de detectar los mismos genotipos que la secuenciación Sanger en un 72.73 % y una especificidad del 64.71 % (Parikh et al., 2008). No obstante, este cálculo se realizó en base a la cantidad de genotipos acertados y leídos, siendo estos 16 y 6 respectivamente. Sin embargo, estos valores son solamente representativos, ya que no se emplearon muestras de personas en las cuales se pueda relacionar alguno de los SNPs con una condición de enfermedad o salud. Asimismo, los límites de detección no fueron estudiados debido a que se emplearon muestras de ADN control comercial para estandarizar el proceso y a que el proyecto está enfocado al uso de material genético fresco.

5.12 Implicaciones del Proyecto

Estudios en modelos animales, empleado genes ortólogos del *HIF-2 α* , han estudiado la necesidad del gen en genoma. El grupo de Scortegagna, Ding, et al. (2003) produjo ratones con la subunidad *HIF-2 α* deficiente y observaron patologías en múltiples órganos, como retinopatía, esteatosis hepática, hipertrofia cardíaca, miopatías, médula ósea hipocelular, azoospermia y múltiples fallas a nivel mitocondrial. Además, a nivel bioquímico, los ratones sufrían de hipoglucemia, acidosis láctica y alteraciones en rutas metabólicas del ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos (Scortegagna, Ding, et al., 2003). Los ratones fueron obtenidos al insertar un gen *HIF-2 α* truncado y se encontró que disminuyó la concentración de enzimas antioxidantes primarias, las cuales combaten las Especies Reactivas de Oxígeno (Scortegagna, Ding, et al., 2003).

De igual forma, el grupo de Scortegagna, Morris, Oktay, Bennett y Garcia (2003) produjeron ratones *Knock-out* para el gen *HIF-2 α* , revelando que la ausencia del gen en un organismo es letal. Por consiguiente, produjeron ratones que al cruzarse engendraron una descendencia con el gen *HIF-2 α* truncado y, de esta manera, analizaron sus implicaciones en la hematopoyesis. Se encontró que, además de lo reportado por Scortegagna, Ding, et al. (2003), los ratones de la

Filial 1 no eran capaces de realizar hematopoyesis y murieron a los pocos días (Scortegagna, Morris, et al., 2003).

Es así que estudiar los SNPs en el gen *HIF-2 α* podría ayudar a reducir considerablemente la tasa de mortalidad en la población ecuatoriana. Por consiguiente, implementar este proyecto en el sector público del Ecuador, no solo representaría la introducción de una herramienta rápida y sensible para la detección temprana de enfermedades asociadas al genoma, como melanoma y eritrocitosis, sino que marcaría el paso de métodos diagnósticos tradicionales (por ejemplo, prueba de coagulación y de riesgo a padecer enfermedades cardíacas en sangre, entre otras) a los métodos modernos y de bajo impacto ambiental. Una de las principales ventajas en comparación con la secuenciación Sanger, es que se podrían analizar hasta 20 genotipos de SNPs, dispersos en un genoma, en una sola reacción, a la mitad del precio que costaría recibir la secuencia de un solo genotipo en el exterior. Además, recibir la secuencia del exterior tarda alrededor de 10 días laborales, una reacción *SNaPshot® Multiplex* tarda menos de dos días en obtenerse, incluso con un alto flujo de datos y de acuerdo a la prueba de Wilcoxon, los resultados son igual de significativos.

Adicionalmente, el sistema *SNaPshot® Multiplex* se puede emplear en varios campos, como en el establecimiento de SNPs asociados al mejoramiento de cultivos, en el diagnóstico animal, epidemiología molecular y permite usar incluso material genético degradado. De esta manera, se concluye que fomentar nuevos métodos de tipificación de genomas, en países en vía de desarrollo, como el Ecuador, es fundamental, debido a que no se requieren de complejos procesos o de grandes inversiones monetarias para alcanzar las mismas ventajas que países en donde los métodos genéticos se han ocupado para mejorar la calidad de vida de personas, animales y a generar el menor impacto posible al medio ambiente.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El diseño del sistema para tipificar los siete SNPs rs1868092, rs1867728, rs10187368, rs13419896, rs4953354, rs895436 y rs1867785, en el gen *HIF-2 α* , basado en *SNaPshot® Multiplex*, fue altamente específico, en comparación con el método de secuenciación tradicional.

El protocolo de tipificación, basado en el sistema *SNaPshot® Multiplex*, se estandarizó, primeramente, en reacciones individuales a manera de *Singleplex*, y después en una sola reacción en *Multiplex*, con la finalidad de no malinterpretar las señales de los genotipos y para determinar que los juegos de reactivos funcionan adecuadamente.

La implementación de los *bins* en el analizador genético, para ajustar el marco de lectura de los genotipos en *Multiplex*, se realizó una vez que se hayan implementado las reacciones *SNaPshot® Primer Focus®* y *SNaPshot®* en *Singleplex*, para garantizar que los genotipos sean tipificados de manera más específica, en el caso de que la reacción *SNaPshot® Multiplex* afecte a la migración alélica de los genotipos en la lectura final.

La validación del sistema *SNaPshot® Multiplex* diseñado, al comparar estadísticamente con los resultados de la secuenciación por el método *Gold Standard* (Secuenciación Sanger) demostró que no existe diferencia significativa en la tipificación de SNPs entre los dos métodos.

En base al análisis de costos realizado, se pudo concluir que implementar el sistema *SNaPshot® Multiplex* en el país resultaría sumamente beneficioso, ya que no solo reduciría el precio de pruebas diagnósticas en humanos, animales y plantas, sino que le permitiría al Ecuador competir, en el campo investigativo, con países que han desarrollado métodos de biología molecular hace varios años.

6.2 Recomendaciones

Para futuros diseños basados en el sistema *SNaPshot® Multiplex* se debe considerar las distintas variaciones genéticas que puede presentar una población, las cuales podrían alterar la especificidad de unión de las sondas en las reacciones de mini-secuenciación *SNaPshot®*.

Para estandarizar sistemas de tipificación de varios SNPs, basados en *SNaPshot®*, siempre se debe comenzar con las reacciones en *Singleplex*, debido a que pueden ocurrir problemas con el diseño de los primers o con los juegos de reactivos. Además, permitirá ajustar de mejor manera los *bins* para una lectura más sencilla y precisa de la reacción en *Multiplex*.

Se recomienda realizar la siguiente etapa del proyecto, mediante ensayos poblacionales, para poder determinar la efectividad y sensibilidad del protocolo al emplear muestras de ADN de individuos ecuatorianos.

REFERENCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/20923774_Basic_Local_Alignment_Search_Tool
- Applied Biosystems. (2005a). Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041990.pdf
- Applied Biosystems. (2005b). Using the SNaPshot® Multiplex System with the POP-7™ Polymer on Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers and 3130/3130xl Genetic Analyzers (User Bulletin). (4367258). Recuperado el 30 de mayo de 2016 de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042107.pdf
- Applied Biosystems. (2010). Early Expiration of Internal Password Affecting: 3130-Series Data Collection Software v3.1, 3730-Series Data Collection Software v3.1 & GeneMapper® Software v4.1. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_marketing/documents/generaldocuments/cms_085757.pdf
- Applied Biosystems. (2013). SNaPshot Primer Focus Kit Catalog. (4329540). Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4329540.pdf>
- Basang, Z., Wang, B., Li, L., Yang, L., Liu, L., Cui, C., . . . Wang, X. (2015). HIF2A Variants Were Associated with Different Levels of High-Altitude Hypoxia among Native Tibetans. Recuperado el 04 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368009>
- Beall, C. M., Cavalleri, G. L., Deng, L., Elston, R. C., Gao, Y., Knight, J., . . . Zheng, Y. T. (2010). Natural selection on EPAS1 (HIF2alpha) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002443107>

- Bell, J. (2008). A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <http://www.biotechniques.com/BiotechniquesJournal/2008/May/A-Simple-Way-to-Treat-PCR-Products-Prior-to-Sequencing-Using-ExoSAP-IT/biotechniques-45295.html>
- Ben, S., Cooper-DeHoff, R. M., Flaten, H. K., Evero, O., Ferrara, T. M., Spritz, R. A. y Monte, A. A. (2016). Multiplex SNaPshot-a new simple and efficient CYP2D6 and ADRB1 genotyping method. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27108086>
- Bihlmeyer, N. A., Brody, J. A., Smith, A. V., Lunetta, K. L., Nalls, M., Smith, J. A., . . . Arking, D. E. (2014). Genetic diversity is a predictor of mortality in humans. Recuperado el 16 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25543667>
- Bougatef, F., Menashi, S., Khayati, F., Naimi, B., Porcher, R., Podgorniak, M. P., . . . Mourah, S. (2010). EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2alpha mediated up-regulation of VEGF-receptor-2. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824203>
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. y Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de <http://www.pnas.org/content/83/11/3746>
- Chen, Y., Jiang, C., Luo, Y., Liu, F. y Gao, Y. (2014). An EPAS1 haplotype is associated with high altitude polycythemia in male Han Chinese at the Qinghai-Tibetan plateau. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de <http://europepmc.org/abstract/med/25239027>
- Chuang, L. Y., Yang, C. H., Cheng, Y. H., Gu, D. L., Chang, P. L., Tsui, K. H. y Chang, H. W. (2006). V-MitoSNP: visualization of human mitochondrial SNPs. Recuperado el 18 de agosto de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16907992>
- Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. y Dickerson, R. E. (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation

- and dynamics. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <http://authors.library.caltech.edu/5825/>
- Dunham, J. P. y Friesen, M. L. (2013). A cost-effective method for high-throughput construction of Illumina sequencing libraries. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2013/9/pdb.prot074187>
- Fowler, K., Pong-Wong, R., Bauer, J., Clemente, E., Reitter, C., Affara, N., . . . Griffin, D. (2013). Genome wide analysis reveals single nucleotide polymorphisms associated with fatness and putative novel copy number variants in three pig breeds. Recuperado el 31 de mayo de 2016 de <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-784>
- Gale, D. P., Harten, S. K., Reid, C. D. L., Tuddenham, E. G. D. y Maxwell, P. H. (2008). Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 α mutation. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-153718>
- Hanaoka, M., Droma, Y., Basnyat, B., Ito, M., Kobayashi, N., Katsuyama, Y., . . . Ota, M. (2012). Genetic variants in EPAS1 contribute to adaptation to high-altitude hypoxia in Sherpas. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227185>
- Henderson, J., Withford-Cave, J. M., Duffy, D. L., Cole, S. J., Sawyer, N. A., Gulbin, J. P., . . . Yu, B. (2005). The EPAS1 gene influences the aerobic-anaerobic contribution in elite endurance athletes. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-005-0066-0>
- Huang, X. C., Quesada, M. A. y Mathies, R. A. (1992). DNA sequencing using capillary array electrophoresis. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00042a021>
- Hutchison, C. A., 3rd. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094077/>

- IBM Corp. (Lanzado en 2015). IBM SPSS Statistics para Windows (Version 23.0). Armonk, N.Y: IBM Corp.
- Inoue, H., Arai, Y., Kishida, T., Terauchi, R., Honjo, K., Nakagawa, S., . . . Kubo, T. (2015). Hydrostatic pressure influences HIF-2 alpha expression in chondrocytes. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25569085>
- Jain, K. K. (2015). *Molecular Diagnostics in Personalized Medicine* (J. PharmaBiotech Ed. 2 ed. Vol. 1). Recuperado el 03 de octubre de 2016 de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4939-2553-7_2
- Jang, J. H., Seo, J. Y., Jang, J., Jung, C. W., Lee, K. O., Kim, S. H. y Kim, H. J. (2014). Hereditary gene mutations in Korean patients with isolated erythrocytosis. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482100>
- Kasimanickam, R. K., Kasimanickam, V. R., Rodriguez, J. S., Pelzer, K. D., Sponenberg, P. D. y Thatcher, C. D. (2010). Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624307>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22543367>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. y Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de http://genome.cshlp.org/content/12/6/996?ijkey=3df35aec73d5e1ebd0c57ac8c1dab2bfab7c957e&keytype=tf_ipsecsha
- Lin, T. Y., Chou, C. F., Chung, H. Y., Chiang, C. Y., Li, C. H., Wu, J. L., . . . Tzou, W. S. (2014). Hypoxia-inducible factor 2 alpha is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the

- zebrafish embryo. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25000307>
- Loboda, A., Jozkowicz, A. y Dulak, J. (2010). HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20396958>
- Lorenzo, F. R., Yang, C., Ng Tang Fui, M., Vankayalapati, H., Zhuang, Z., Huynh, T., . . . Prchal, J. T. (2013). A novel EPAS1/HIF2A germline mutation in a congenital polycythemia with paraganglioma. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090011>
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D. y Tatusova, T. (2005). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl_1/D54/2505255/Entrez-Gene-gene-centered-information-at-NCBI
- Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392330/>
- Moore, J. (2008). HIF-2 alpha plays key role in erythropoietin production. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=31655368&lang=es&site=eds-live>
- Mowat, F. M., Luhmann, U. F., Smith, A. J., Lange, C., Duran, Y., Harten, S., . . . Bainbridge, J. W. (2010). HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559438>
- Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D. N. y Ku, C. S. (2011). Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525251/>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., . . . Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2447751/>

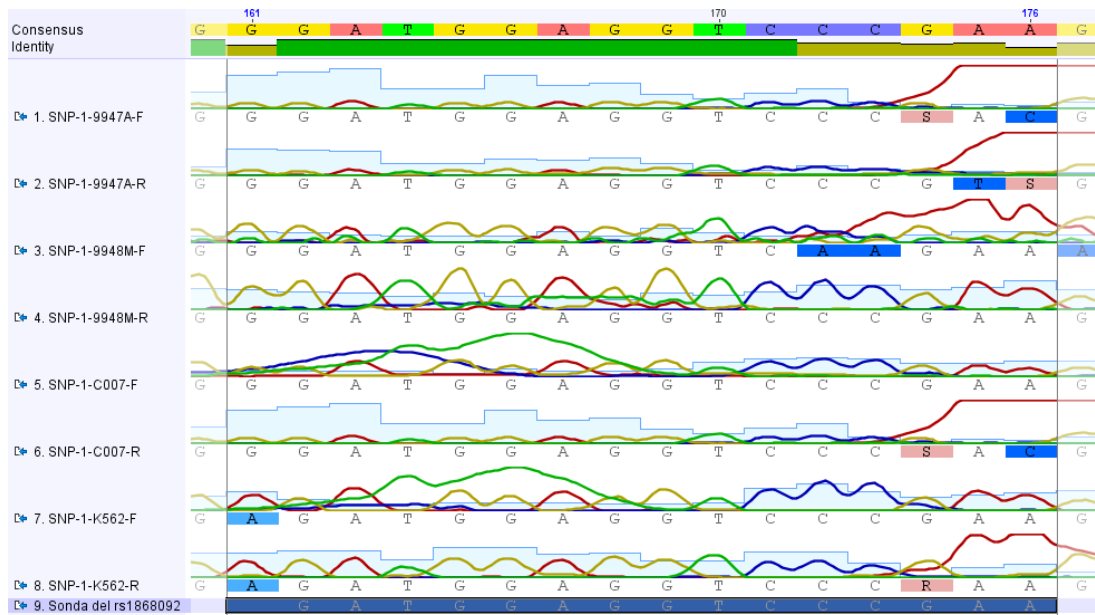
- Padmanabhan, R. y Wu, R. (1972). Nucleotide sequence analysis of DNA. IX. Use of oligonucleotides of defined sequence as primers in DNA sequence analysis. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/18606148_Nucleotide_sequence_analysis_of_DNA_IX_Use_of_oligonucleotides_of_defined_sequence_as_primers_in_DNA_sequence_analysis
- Pagani, L., Ayub, Q., MacArthur, D. G., Xue, Y., Baillie, J. K., Chen, Y., . . . Tyler-Smith, C. (2012). High altitude adaptation in Daghestani populations from the Caucasus. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904933>
- Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra Sekhar, G. y Thomas, R. (2008). Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2636062/>
- Patel, S. A. y Simon, M. C. (2008). Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.17>
- Percy, M. J. (2008). Familial erythrocytosis arising from a gain-of-function mutation in the HIF2A gene of the oxygen sensing pathway. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516423/>
- Poveda, D., Castillo, L. y García, V. (2013). Variación de la Diversidad y Estructura Genética de las Poblaciones Humanas en Centro y Suramérica. Recuperado el 16 de junio de 2016 de <http://www.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org/revistas-accb/art-7-pdf/>
- Qiagen. (2010). QIAGEN Multiplex PCR Handbook. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/end-point-pcr-enzymes-and-kits/regular-pcr/qiagen-multiplex-pcr-kit/#productdetails>
- Rahim, N. G., Harismendy, O., Topol, E. J. y Frazer, K. A. (2008). Genetic determinants of phenotypic diversity in humans. Recuperado el 16 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439327>

- Rosner, B., Glynn, R. J. y Lee, M. L. (2006). The Wilcoxon signed rank test for paired comparisons of clustered data. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-0420.2005.00389.x/abstract>
- Sanchez, J. J., Phillips, C., Borsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., . . . Morling, N. (2006). A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. Recuperado el 30 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16586411>
- Sanger, F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://science.sciencemag.org/content/214/4526/1205.long>
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431765/>
- Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L.-J., . . . Garcia, J. A. (2003). Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1038/ng1266>
- Scortegagna, M., Morris, M. A., Oktay, Y., Bennett, M. y Garcia, J. A. (2003). The HIF family member EPAS1/HIF-2 α is required for normal hematopoiesis in mice. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-02-0448>
- Scheinfeldt, L. a. T., S. (2010). Living the high life: high-altitude adaptation. Recuperado el 31 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965377/>
- Shendure, J. y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087>
- Sint, D., Raso, L. y Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. Recuperado el 09 de diciembre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x/abstract>

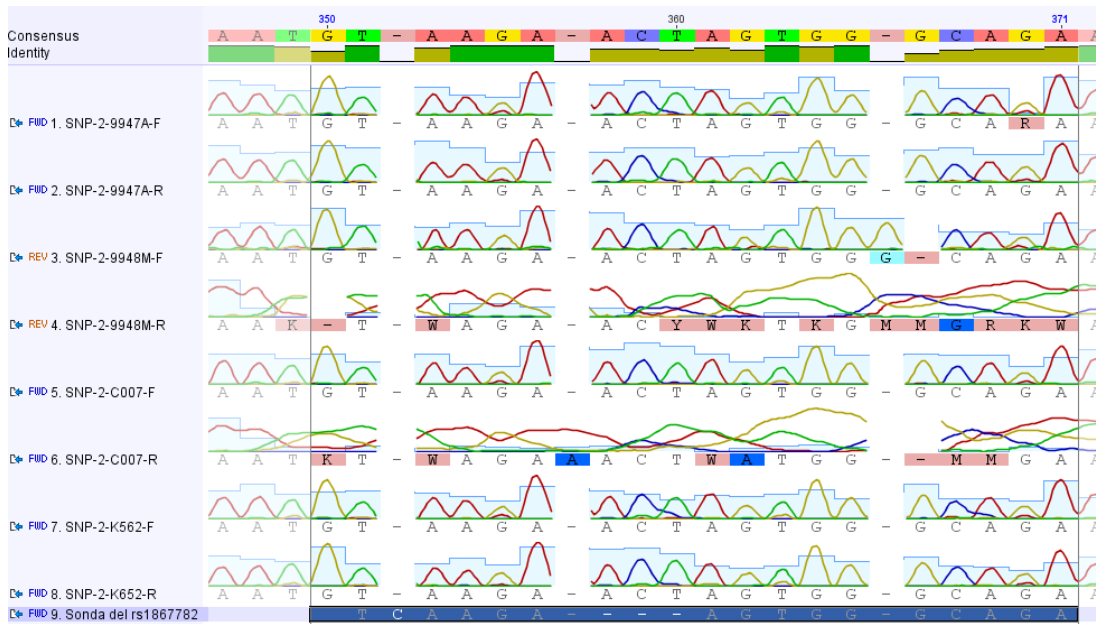
- Soggia, A., Ramond, C., Akiyama, H., Scharfmann, R. y Duvillie, B. (2014). von Hippel–Lindau gene disruption in mouse pancreatic progenitors and its consequences on endocrine differentiation in vivo: importance of HIF1- α and VEGF-A upregulation. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3365-y>
- Song, S., Yao, N., Yang, M., Liu, X., Dong, K., Zhao, Q., . . . Jiang, L. (2016). Exome sequencing reveals genetic differentiation due to high-altitude adaptation in the Tibetan cashmere goat (*Capra hircus*). Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892324>
- Springer, M. (2006). *Applied Biosystems: Celebrating 25 Years of Advancing* (CA 94404). Recuperado el 04 de octubre de 2016 de http://home.appliedbiosystems.com/about/presskit/pdfs/celebrating_25_years_aln_article.pdf
- Turchi, L., Aberdam, E., Mazure, N., Pouyssegur, J., Deckert, M., Kitajima, S., . . . Virolle, T. (2008). Hif-2 α mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511933>
- van Patot, M. C. y Gassmann, M. (2011). Hypoxia: adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2 α . Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718164>
- Vance, C. (2012). Indicadores Básicos de Salud del Ecuador 2012, Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Recuperado el 31 de mayo de 2016 de http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=471&Itemid=
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. y Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081799>
- Voisin, S., Cieszczyk, P., Pushkarev, V. P., Dyatlov, D. A., Vashlyayev, B. F., Shumaylov, V. A., . . . Eynon, N. (2014). EPAS1 gene variants are associated with sprint/power athletic performance in two cohorts of

- European athletes. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-382>
- Wu, R. (1970). Nucleotide sequence analysis of DNA. I. Partial sequence of the cohesive ends of bacteriophage lambda and 186 DNA. Recuperado el 03 de octubre de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283670900045?via%3Dihub>
- WU Xiao-yun, D. X.-z., CHU Min, GUO Xian, BAO Peng-jia, LIANG Chun-nian y YAN Ping. (2015). Novel SNP of EPAS1 Gene Associated with Higher Hemoglobin Concentration Revealed the Hypoxia Adaptation of Yak (*Bos grunniens*). Recuperado el 04 de octubre de 2016 de http://www.chinaagrisci.com/Jwk_zgnykxen
- Xu, J., Yang, Y. Z., Tang, F., Ga, Q., Tana, W. y Ge, R. L. (2015). EPAS1 Gene Polymorphisms Are Associated With High Altitude Polycythemia in Tibetans at the Qinghai-Tibetan Plateau. Recuperado el 30 de octubre de 2016 de [http://www.wemjournal.org/article/S1080-6032\(15\)00005-8/abstract](http://www.wemjournal.org/article/S1080-6032(15)00005-8/abstract)
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412702/>

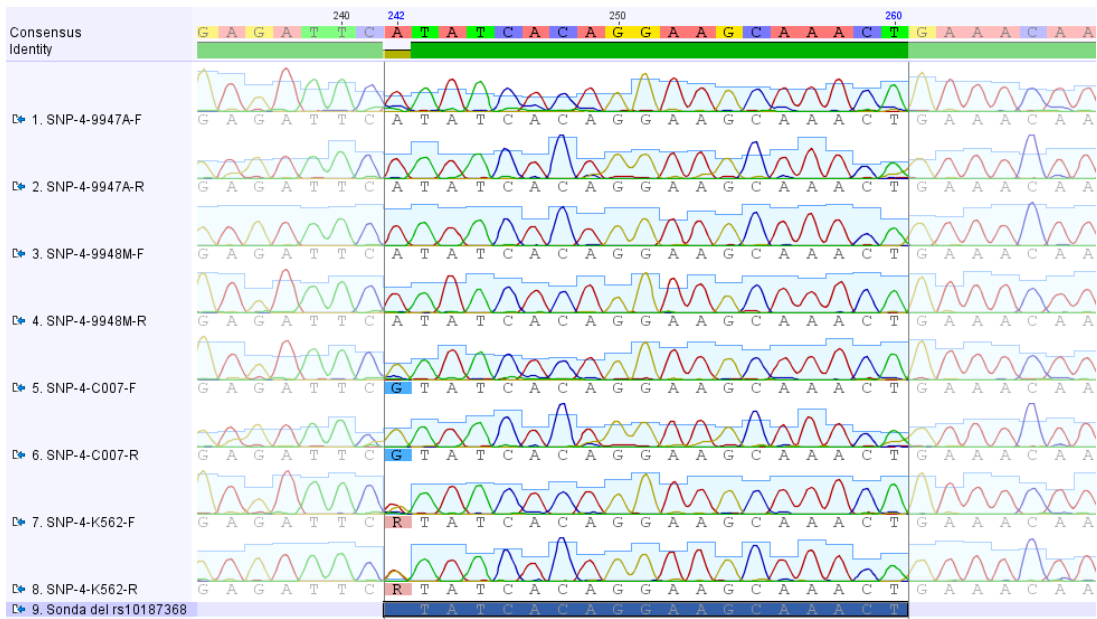
ANEXOS



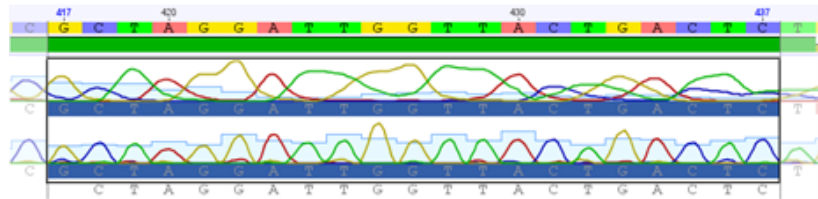
Anexo 1. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs1868092 en las muestras de ADN control comercial.



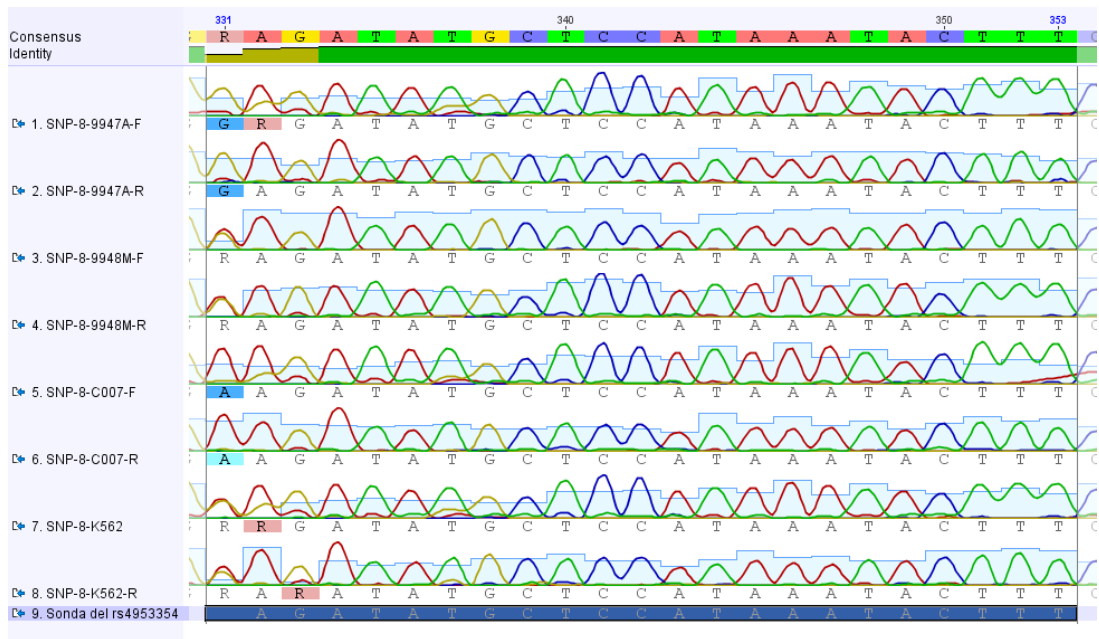
Anexo 2. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs1867782 en las muestras de ADN control comercial.



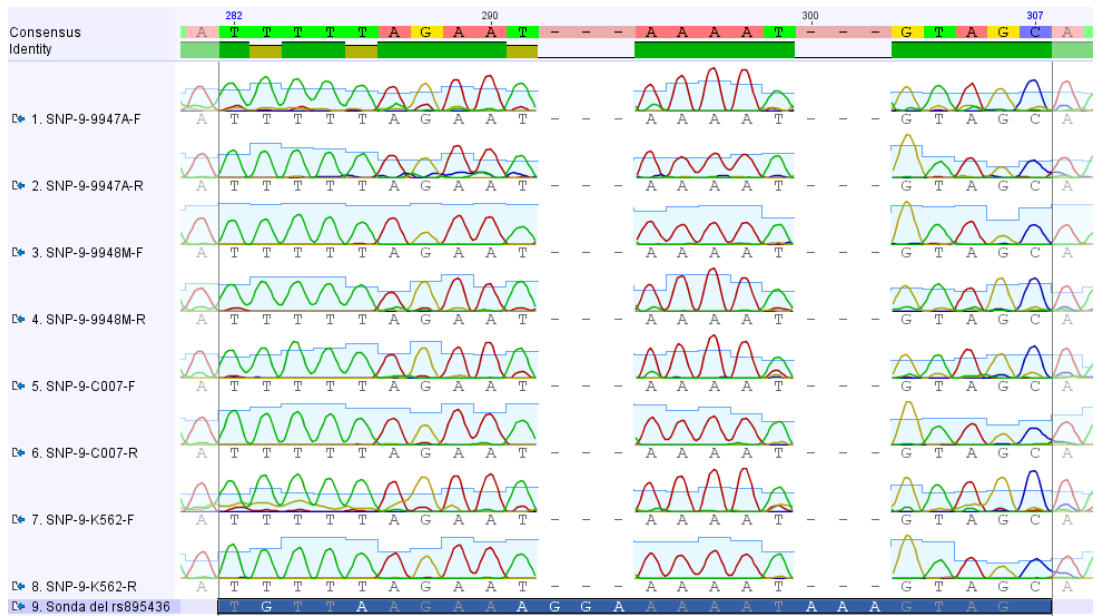
Anexo 3. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs10187368 en las muestras de ADN control comercial.



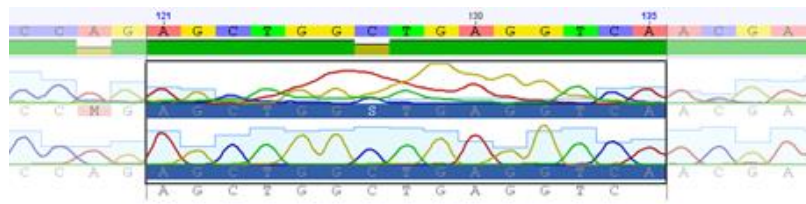
Anexo 4. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs13419896 en la muestra de ADN control comercial 9948M.



Anexo 5. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs4953354 en las muestras de ADN control comercial.



Anexo 6. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs895436 en las muestras de ADN control comercial.



Anexo 7. Secuencias *forward* y *reverse* de tipificación del rs1867785 en la muestra de ADN control comercial 9948M.

