

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL
CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE) PARA LA TIPIFICACIÓN
DE ALELOS DRB DEL CMH CLASE II EN *Aotus vociferans* (Plathyrrini)**

MARÍA JOSÉ FLÓREZ SALGADO

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA-CÓRDOBA
NOVIEMBRE DE 2016**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL
CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE) PARA LA TIPIFICACIÓN
DE ALELOS DRB DEL CMH CLASE II EN *Aotus vociferans* (Plathyrrini)**

MARÍA JOSÉ FLÓREZ SALGADO

**Trabajo de investigación presentado como parte de los requisitos para optar al
título de: Bacterióloga**

Director

CAROLINA LÓPEZ SANTANA MSc.

Investigadora GF Biología Molecular Inmunología

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia-FIDIC

Codirector

GUSTAVO QUINTERO PARDO

**Investigador Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba
(GIMBIC)**

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

MONTERÍA-CÓRDOBA

2016

PÁGINA DE RESPONSABILIDAD DEL AUTOR

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto, serán responsabilidad de los autores.

Artículo 61, acuerdo N° 093 del 26 de noviembre de 2002 del consejo superior

PÁGINA DE NOTA DE ACEPTACIÓN

**El jurado calificador no será responsable de las ideas emitidas por los autores
(Artículo 46, acuerdo 006 de Mayo de 1979)**

(Consejo Directivo)

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado

Jurado

Montería, Noviembre de 2016.

RESUMEN

Los primates no humanos del género *Aotus* constituyen un modelo de investigación animal ideal en las ciencias biomédicas, para la evaluación de antígenos candidatos a vacuna con la finalidad de contrarrestar enfermedades infecciosas como la malaria. Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase I y II, en conjunto conforman el mecanismo principal de respuesta frente a agentes patógenos. En la actualidad existen técnicas moleculares utilizadas para la tipificación de las moléculas del CMH de los modelos experimentales para vacunas, que son de elevado costo y laboriosidad. Por lo que se hace necesario implementar técnicas menos laboriosas, de bajo costo y con elevado potencial de eficacia y sensibilidad. Para tal fin, en el presente estudio se valida la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), según lo descrito por Knapp *y cols.* en 1997, para la identificación de alelos DRB del CMH clase II, en los monos del nuevo mundo *Aotus vociferans*.

Palabras clave: CMH II, DRB, *Aotus* sp, tipificación, DGGE.

ABSTRACT

Nonhuman primates, genus *Aotus* constituted an ideal animal model in the biomedical sciences research, for the evaluation of antigens vaccine candidates in order to counteract infectious diseases such as the malaria. The molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC) class I and II, together conform the main line of response to pathogens. Currently, exist molecular techniques used for typing MHC molecules of experimental models to vaccines which are of high cost and laborious. Therefore, it is necessary to implement less laborious techniques, of low cost and high efficiency potential and sensitivity. To this aim, in the present study the *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* technique (DGGE) is validated, as described by Knapp *et al* in 1997, for the identification of alleles DRB of MHC class II, in New World monkeys *Aotus vociferans*.

Keywords: MHC II, DRB, *Aotus* sp, typing, DGGE.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRÁFICAS

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TEÓRICO

- 1.1 Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- 1.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
- 1.3 Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
- 1.4 Tipificación del MHC
- 1.5 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
- 1.6 Utilidad de la grapa-GC
- 1.7 DGGE perpendicular
- 1.8 DGGE paralelo
- 1.9 Identificación de alelos MHC de clase II con DGGE
- 1.10 Tipificación por DGGE en primates no humanos
- 1.11 Ventajas de la técnica de DGGE
- 1.12 Limitaciones de la técnica de DGGE
- 1.13 Comparativa de DGGE con respecto a otras técnicas

2. OBJETIVOS

- 2.1 Objetivo General
- 2.2 Objetivos específicos

3. METODOLOGÍA

- 3.1 Tipo de estudio
- 3.2 Población y muestra
- 3.3 Amplificación del exón 2 del gen CMH-DRB de *Aotus vociferans*
 - 3.3.1 Extracción de ADN
 - 3.3.2 Cebadores
 - 3.3.3 Diseño de cebadores
 - 3.3.4 Condiciones de PCR
- 3.4 Purificación de productos de PCR
- 3.5 Montaje del gel DGGE perpendicular
- 3.6 Determinación de condiciones óptimas de operación de DGGE paralelo
- 3.7 Extracción y purificación de ADN contenido en bandas de DGGE paralelo

3.8 Secuenciación de alelos DRB

4. RESULTADOS

- 4.1 Caracterización de las diferentes bandas extraídas del gel DGGE paralelo
- 4.2 Amplificación de ADN obtenido de bandas purificadas de DGGE paralelo
- 4.3 Secuenciación de las diferentes bandas extraídas del gel DGGE paralelo
- 4.4 Interpretación de electroferogramas.

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. RECOMENDACIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

9. ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DGGE PERPENDICULAR

FIGURA 2 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DGGE PARALELO

FIGURA 3 DISEÑO DE CEBADORES

FIGURA 4 FLUJOGRAMA ETAPAS DE LA DGGE

FIGURA 5 ADN GENÓMICO *Aotus vociferans*

FIGURA 6 AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 2 DEL GEN CMH-DRB DE *Aotus vociferans*

FIGURA 7 DETERMINACIÓN ÓPTIMA DE SEPARACIÓN DE ALELOS DRB CON DGGE PERPENDICULAR

FIGURA 8 SEPARACIÓN DE ALELOS DRB USANDO DGGE PARALELO

FIGURA 9 AMPLIFICACIÓN DE DNA OBTENIDO DE BANDAS PURIFICADAS DE DGGE PARALELO.

FIGURA 10 ELECTROFEROGRAMA 1

FIGURA 11 ELECTROFEROGRAMA 2

FIGURA 12 ELECTROFEROGRAMA 3

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 identificación de las muestras de ADN empleadas en el estudio

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 PREPARACIÓN Y MONTAJE DEL GEL DGGE PERPENDICULAR

ANEXO 2 PREPARACIÓN Y MONTAJE DEL GEL DGGE PARALELO

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es considerada la infección parasitaria de mayor impacto e incidencia a nivel mundial. La infección es causada por protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium* que invaden en primera instancia el hígado y luego los eritrocitos. La enfermedad se caracteriza por la aparición repentina de fiebre acompañada generalmente de cefalea, escalofrío y sudoración profusa. Estos síntomas son intermitentes y aparecen generalmente, 10 a 15 días después de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectado con *Plasmodium*. Existen cinco especies patógenas para el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* de las cuales, *P. falciparum* es la responsable de las manifestaciones clínicas más graves y de mayor casos de muerte y *P. knowlesi* infecta principalmente a primates no humanos pero se conocen casos de transmisión a humanos (1).

A nivel mundial el número estimado de casos de malaria ha descendido, de unos 262 millones en el año 2000 a 214 millones en el año 2015. Se estima que la mayoría de casos en el año 2015 han ocurrido en la región africana (88%), seguida de Asia sudoriental (10%) y la región de Mediterráneo Oriental (2%). Considerando el crecimiento demográfico, se estima que la incidencia de paludismo ha disminuido un 37% entre los años 2000 y 2015 (2).

En la actualidad hay 95 países con malaria, con aproximadamente 3.300 millones de personas expuestas a la malaria mundialmente, con 214 millones de casos y 438.000 muertes anuales, de las cuales el 85% corresponden a menores de 5 años. El costo de manejo de la malaria asciende a 12 billones de dólares anuales y tiene un impacto de 35,4 millones de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) perdidos sólo en África subsahariana. En la región de América hay transmisión de malaria en 21 países con aproximadamente 77% de los casos por *P. vivax*, sin embargo, hay regiones de alta endemicidad para *P. falciparum* donde los casos alcanzan casi el 100%, como en Haití y República Dominicana. La región de América latina y el Caribe representan aproximadamente el 1,1% de los casos de malaria en el mundo y registran 3.000 muertes anuales (1).

La malaria en Colombia representa un importante problema de salud pública debido a la transmisión con tendencia al aumento que se presenta en algunas regiones del país, con un comportamiento cíclico epidémico que ocurre cada 2 a 7 años, relacionados con la ocurrencia del Fenómeno del Niño Oscilación Sur. El origen de la infección es principalmente rural, con transmisión urbana en regiones definidas de la geografía colombiana. Se ha descrito la aparición y reaparición de malaria en áreas libres de la enfermedad, condición que se relaciona a la migración de la población por circunstancias económicas, de conflicto social y político, factores ambientales como los desastres naturales y el deterioro del ecosistema, afectando a comunidades de escasos recursos y mayores necesidades (3,4).

La tasa de incidencia de malaria en los últimos 60 años ha sido variable, con tendencia al aumento y un comportamiento con promedios anuales de 80.000 a 120.000 casos. Desde el año 1974 en Colombia predomina la infección por *P. vivax* con un 60% de los casos anuales, en la región pacífica los casos obedecen a *P. falciparum*. También se registran

casos correspondientes al 0.5% anuales de infección mixta asociada a *P. falciparum* y *P. vivax*, en el departamento del Chocó se registran casos de *P. malariae* (4).

En la búsqueda creciente de alternativas para tratar de eliminar el problema de la malaria, y ante el aumento de la resistencia a drogas, se hace necesaria la creación de una vacuna como método profiláctico para erradicar esta infección parasitaria. Surgen entonces el uso modelos animales de investigación biomédica como los primates no humanos en la lucha contra esta enfermedad. La razón es clave, y radica en que se ha demostrado en estudios anteriores la estrecha relación que existe entre las moléculas de este modelo animal con las del ser humano, en especial con las moléculas del CMH clase II, específicamente las correspondientes al HLA-DR humano (5).

Los platirrininos o monos del nuevo mundo conforman un infra-orden que incluye 3 familias de primates nativas de América Central y del Sur: *Cebidae*, *Atelidae* y *Pitheciidae*. Las especies del género *Aotus* perteneciente a la familia *Cebidae* habitan comúnmente en los bosques húmedos del sur de América, las poblaciones de cuello rojo se localizan al sur de la Amazonía y poblaciones de cuello gris al norte de la Amazonía. Entre sus características se destacan tener hábitos nocturnos y son de gran importancia en las ciencias biomédicas, debido a que son los únicos cebidos naturalmente susceptibles a contraer malaria (6).

El uso de primates no humanos como modelos de investigación de enfermedades humanas, requiere del entendimiento de la respuesta inmune y del importante papel que desempeña el complejo mayor de histocompatibilidad en la misma. El complejo mayor de histocompatibilidad es el locus más polimórfico del genoma humano, está constituido por un conjunto de proteínas especializadas llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que se expresan en las células del huésped y tienen la función especial de presentar péptidos a los linfocitos T (7).

En los mamíferos el CMH juega un papel crítico en la respuesta inmune y se ha estudiado ampliamente en seres humanos (8). En nuestro medio existen diferentes técnicas para la tipificación del CMH, para objetivos del presente estudio la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) ofrece un método sensible para la identificación y caracterización de alelos del CMH clase II en especies de monos *Aotus*, por lo tanto se abordará la teoría, práctica, ventajas, desventajas, limitaciones y perspectivas futuras inherentes a la DGGE.

1. MARCO TEÒRICO

Los modelos animales constituyen una herramienta importante en la investigación biomédica. El uso de primates no humanos en la investigación de enfermedades infecciosas, en particular los primates del nuevo mundo (Platyrrhini) ha tenido un incremento notable. Gracias a las ventajas que ofrecen como su tamaño pequeño, adaptación al cautiverio, la analogía del comportamiento de la enfermedad y la proximidad evolutiva a los seres humanos. Son factores que convierten al género *Aotus* sp en un modelo de investigación ideal de enfermedades infecciosas como la malaria (9).

1.1 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

En general el complejo mayor de histocompatibilidad constituye un conjunto de genes aislados de mamíferos que tienen como característica principal un elevado polimorfismo. Su función está íntimamente relacionada en la respuesta inmune, con la ocurrencia de interacciones celulares y con el reconocimiento de lo propio y lo extraño. El CMH se encuentra codificado por genes agrupados en el cromosoma 6 en el humano y en el cromosoma 17 en murinos (7).

En un principio se denominó a estos genes antígenos leucocitarios humanos (HLA), debido a que se pensó que sólo eran expresados por leucocitos. Los tres primeros *loci* definidos mediante serología se llamaron HLA-A, HLA-B y HLA-C, los cuales se conocen como genes o antígenos de clase I. Posteriormente se describieron los *loci* HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR conformando los genes de clase II (7).

Los genes del CMH clase I codifican glucoproteínas que se expresan en la superficie de las células nucleadas y presentan antígenos a los LT CD8+. Los genes del CMH clase II codifican glucoproteínas que se expresan en células presentadoras de antígeno (CPA) y presentan antígenos a los LT CD4+. Por último los genes de CMH clase III codifican proteínas secretadas con funciones inmunitarias, como componentes del complemento y moléculas de inflamación que no están relacionadas con la presentación de antígenos (10).

Teniendo en cuenta el eminente polimorfismo y la existencia de un gran número de alelos, que muestran las moléculas del CMH-DRB tanto en humanos como en primates. Así como su importancia en la interacción con los péptidos, con el fin que puedan ser presentados al receptor de los linfocitos T. Se hace necesario la utilización de técnicas de tipificación para la evaluación de la respuesta inmune de vacunas frente a la malaria en monos del nuevo mundo.

Las técnicas moleculares empleadas en estudios previos para realizar ésta tipificación, son de alto costo y laboriosos, por lo que se hace necesario llevar a cabo la utilización de nuevas técnicas.

1.2 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I

Estas moléculas están conformadas por una cadena α (cadena pesada) y una cadena β -2 microglobulina (cadena liviana) unidas de forma no covalente, que interactúan para formar el bolsillo de unión de péptidos entre 8 a 11 aminoácidos de longitud (7).

Una vez es sintetizada la molécula del CMH-I, realiza su tránsito por el retículo endoplásmico dirigida por dos moléculas, una chaperona conocida como calnexina y otra, la cadena β -2 microglobulina. El complejo formado por dichas moléculas, es llevado al encuentro del péptido que debe ser transportado posteriormente hasta la membrana celular (7).

1.3 COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE II

Las moléculas de clase II están compuestas por una cadena α polimórfica unida de forma no covalente a una cadena β polimórfica. Se originan en el retículo endoplásmico en el cual una molécula llamada “cadena invariante” cubre la hendidura del antígeno, para evitar que se unan a ella antígenos internos durante su paso por el citoplasma (11).

La expresión de moléculas clase II del CMH se restringe a células presentadoras de antígeno profesionales entre las que se encuentran células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y presentan antígenos extracelulares a los linfocitos T CD4+ (12).

En general el mecanismo realizado por las células presentadoras de antígeno para el procesamiento antigénico consiste en la captura del antígeno extracelular y el transporte del mismo a un compartimiento de membrana conocido como fagosoma. El cuál experimenta modificaciones debidas a su contenido y se fusiona con los lisosomas para formar el fagolisosoma. A partir del cual van a interactuar moléculas del CMH clase II con su contenido. Una vez se ancla el péptido a las moléculas del CMH clase II, éste es transportado a la superficie celular y presentado a los linfocitos T CD4+ específicos del antígeno (12).

1.4 TIPIFICACIÓN DEL CMH

El complejo mayor de histocompatibilidad se ha estudiado ampliamente en seres humanos y ratones, y existe una variedad de métodos disponibles para la tipificación de estas especies. La secuenciación de ADN es considerada el “gold standard” y es utilizada frecuentemente para describir el CMH, no obstante cuando se requiere tipificar muchos individuos no es un método práctico (8).

La descripción precisa de los genes del CMH requiere del empleo de técnicas costosas y laboriosas, dada la compleja organización genómica. En general, debido a la presencia de diferentes haplotipos, a la expresión de diferentes genes y al elevado polimorfismo del CMH (8).

Existen diversos métodos para la tipificación del CMH entre los que se destacan: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Polimorfismo de conformación de cadenas (SSCP, del

inglés *Single Strand Conformation Polymorphism*), Análisis conformacional de cadenas de referencia (RSCA, del inglés *Reference Strand-mediated Conformational Analysis*), amplificación y clonación de fragmentos de interés especialmente del exón 2, seguida de su secuenciación. Además de esto, se han empleado microsatélites ubicados en el intrón 2, para tipificar el CMH-DRB en humanos, macacos y chimpancés; y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (5).

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) ofrece un método sensible y flexible para la identificación y caracterización de alelos del CMH en humanos, primates no humanos, vacas, peces y aves. Entre los usos más relevantes de la técnica se encuentra el hecho de que puede ser combinada con la técnica de secuenciación de ADN para determinar la secuencia de diferentes alelos del CMH (8).

1.5 ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURIZANTE

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), se fundamenta en el principio que las moléculas de ADN de doble cadena poseen tasas de desnaturización únicas, basadas en nucleótidos específicos que componen la secuencia. Las moléculas de ADN son sometidas a desnaturización bajo una temperatura constante de 60°C, éstas comienzan a desnaturizarse en regiones específicas que se denominan dominios de fusión. La temperatura en la cual los dominios de fusión sufren desnaturización es llamada temperatura de fusión (T_m). Las diferencias de desnaturización dentro de los dominios de fusión pueden ser detectadas mediante la electroforesis de moléculas de ADN en un gel de acrilamida, al cual se añade urea y formamida con el propósito de crear un ambiente desnaturizante (8).

Una vez la molécula de ADN comienza a desnaturizarse, su movilidad a través del gel de acrilamida se verá modificada. Las moléculas desnaturizadas en mayor medida migrarán de forma más lenta que aquellas con un índice de desnaturización más bajo. A partir de estas diferencias de movilidad, es posible interpretar la posición en diferentes partes del gel con gradiente desnaturizante en el que se ubican las moléculas de ADN. Cada molécula de ADN se observará como una banda separada que puede ser visualizada mediante el uso de bromuro de etidio o SYBR Gold, combinado con luz ultravioleta o mediante el uso de tinción con plata. De acuerdo a su uso, la DGGE se puede realizar de forma perpendicular o paralela (8).

1.6 UTILIDAD DE LA GRAPA GC

Debido a que en la DGGE se requiere la desnaturización parcial de las moléculas de ADN en estudio, se hace necesario incorporar a los iniciadores una cadena larga de Guanina y Citosina, que se denomina grapa GC o GC clamp. Generalmente el GC-clamp es una secuencia de 30-40 Guaninas y Citosinas, que por el hecho de poseer una T_m mayor que las secuencias de ADN con distribuciones más equivalentes de nucleótidos, permite la desnaturización del fragmento de ADN de interés, pero manteniendo el GC-

clamp. Las moléculas de ADN utilizadas en DGGE son generadas previamente mediante el uso de PCR, donde se añade la GC-clamp en el extremo 3' de uno de los cebadores (8).

1.7 DGGE PERPENDICULAR

En esta variante de la técnica de DGGE convencional, el gradiente desnaturante se extiende de forma horizontal a través del gel. Dicho de otra forma, la dirección del gradiente será perpendicular a la dirección de corrida de las muestras, generalmente en concentraciones de 0 a 80%. Existe un único carril en el cual son cargados todos los fragmentos de ADN a analizar. Una vez finaliza la corrida electroforética, se obtiene una curva de forma sigmoidea, en la que a baja concentración de desnaturante los fragmentos migran como ADN de doble cadena, mientras que a concentraciones altas de desnaturante migran como cadenas sencillas. Las condiciones útiles son las intermedias, es decir, aquellas en las que la molécula de ADN presenta una desnaturación parcial (13). Se realiza con el objetivo de determinar el gradiente desnaturante óptimo para la separación de alelos del CMH (8).

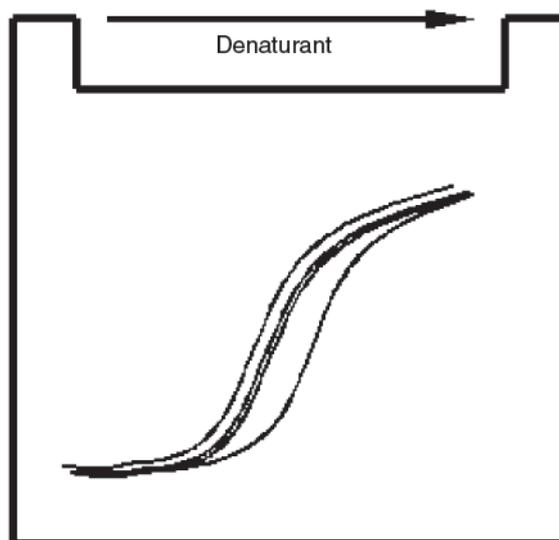


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DGGE PERPENDICULAR: cada línea corresponde a un alelo diferente. Tomado de Knapp 2005.

1.8 DGGE PARALELA

Para el caso de la DGGE paralela el gradiente desnaturante irá en dirección vertical al igual que la corrida de las muestras. El gradiente óptimo va a depender de los resultados obtenidos en la DGGE perpendicular. Al igual que en la técnica anteriormente descrita las muestras ideales son parcialmente desnaturadas, para evidenciar las diferencias en

cuanto a la movilidad de las moléculas de ADN en estudio. Por lo tanto se visualizarán diferentes bandas ubicadas en diferentes posiciones a lo largo del gel (8).

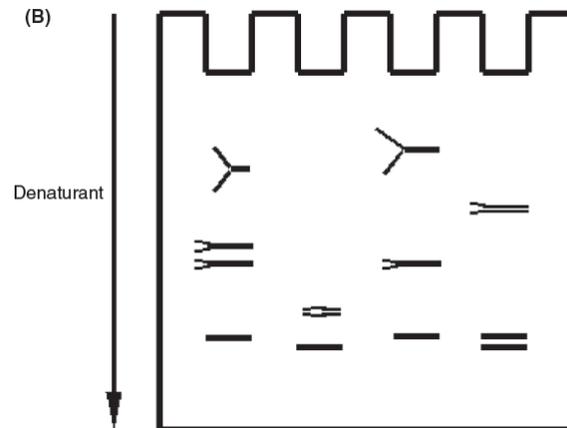


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE DGGE PARALELA: cada banda corresponde a un alelo diferente. Tomado de Knapp 2005

1.9 IDENTIFICACIÓN DE ALELOS DEL CMH CLASE II CON DGGE

Teniendo en cuenta el elevado polimorfismo del CMH, el cual en lugar de restringirse a una sola ubicación en una secuencia de ADN, se distribuye a través de todo un exón o exones, la DGGE es considerada una técnica adecuada para la tipificación de alelos del CMH. La tipificación de genes de clase II generalmente se logra por medio de la amplificación del exón 2 en una reacción de PCR (8).

1.10 TIPIFICACIÓN POR DGGE EN PRIMATES NO HUMANOS

La identificación de alelos CMH-DRB en monos del nuevo mundo se ha relacionado previamente con técnicas de clonación y secuenciación. El primer estudio que describe la utilización de DGGE para identificar alelos DRB del CMH se realizó en monos Rhesus, usando cebadores genéricos DRB para amplificar el exón 2 de alelos *Mamu*-DRB (14).

En la literatura se encuentran numerosos reportes que implementan el uso de DGGE, se destacan la tipificación de CMH-DRB en monos Rhesus (28,29), para identificar alelos CMH-DRB en una especie de monos del viejo mundo (*Macaca fascicularis*) (30) y macacos cola de león (*Macaca silenus*) (31). En ambos estudios se amplificó el exón 2 altamente polimórfico y se analizó mediante el uso de DGGE según lo descrito por Knapp y cols. (32), con ciertas modificaciones relacionadas con cambios en el gradiente desnaturante y las secuencias de cebadores de PCR para la re-amplificación de bandas extraídas del gel.

En los monos del nuevo mundo y prosimios se ha destacado la utilidad de la DGGE, para la detección de alelos del CMH. En un estudio se utilizó DGGE para analizar secuencias CMH-E, con ARN de siete monos del nuevo mundo (33), también se han estudiado

mediante DGGE alelos CMH-DRB en cinco especies de monos del nuevo mundo (27), en adición a esto, este estudio demostró que la DGGE es superior a la clonación y secuenciación en la caracterización de los primates. DGGE se ha utilizado en conjunto con oligotipificación específica de secuencia para el estudio de genes CMH-DRB de tití (34).

1.11 VENTAJAS DE LA TÉCNICA DE DGGE

El uso generalizado de la DGGE ejemplifica la importancia y valor que tiene la técnica para evaluar alelos del CMH. Tiene ventajas claves, como el hecho de ser rápida, fiable, reproducible, relativamente baja en costos, a diferencia de la clonación y secuenciación. Cabe resaltar que permite la determinación de variedad de loci y el estudio del CMH en una amplia variedad de especies (8). Por otro lado, a pesar de que se ha demostrado que la DGGE es superior a la clonación y secuenciación (14,27), el uso concomitante de DGGE seguido de clonación y secuenciación durante un subconjunto de estudios de especies, asegura una adecuada detección de alelos del CMH-DRB.

Una de las ventajas más importantes para destacar, es el hecho que se puede utilizar una sola PCR para amplificar múltiples alelos de muchos loci, o un alelo específico de un loci (8). Otra es la capacidad de analizar un mayor número de muestras a la vez, la mayoría de las unidades de DGGE permiten analizar hasta 16 muestras en un gel.

1.12 LIMITACIONES DE LA TÉCNICA DE DGGE

Existen factores que se deben considerar, como los sesgos de PCR, que pueden ocurrir antes de que se someten a electroforesis los geles (15). Además de los costos significativos que implica el uso de cebadores con GC-clamp, y que podrían dar lugar a bucles de orquilla si la secuencia amplificada es muy rica en G-C. Los productos de PCR deben ser de alta concentración para la detección de bandas, posterior a la DGGE mediante tinción con SYBR Gold. En los casos en que se amplifican más de seis secuencias del CMH en una reacción de PCR, puede resultar difícil detectar todos los alelos (8).

Los pequeños cambios en el gradiente desnaturante del gel producirán bandas distintas, por lo tanto se pueden requerir ciertas condiciones de DGGE cuando la especie, o locus de interés tiene muchas secuencias similares, con ubicaciones en el gel casi idénticas. Incluso cuando las bandas de DGGE están separadas, puede ser difícil determinar su secuencia de ADN, si están muy cerca una de la otra. Para estos casos Hayes y *cols*, demostraron como se puede mejorar la resolución del gel de DGGE realizando modificaciones a las condiciones de electroforesis del gel (16).

Es muy frecuente que se presente doble banda o background, está informado en la literatura y en un estudio realizado por Janse y *cols*, que está relacionado con la carga excesiva de producto de PCR en un solo carril, que puede ser solucionado con la reducción del volumen de PCR altamente concentrado (17).

1.13 COMPARATIVA DE DGGE FRENTE A OTRAS TÉCNICAS

Existe diversidad de técnicas utilizadas para la tipificación del CMH. Entre las que se destaca SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism analysis*), la cual es similar a la DGGE puesto que requiere de la amplificación de alelos del CMH a través de PCR que posteriormente son caracterizados según diferencias basadas en la secuencias al ser sometidos a un gel de acrilamida. Al igual que en la DGGE, se requiere una cantidad significativa para que la optimización y subsecuente separación máxima de los diferentes alelos se pueda realizar de forma confiable. Sin embargo a diferencia de la DGGE, sólo a través de la SSCP se puede determinar si es posible resolver mutaciones específicas (19).

La técnica de SSCP aunque permite analizar fragmentos de hasta 775pb (20), resulta más eficaz cuando se analizan fragmentos de 100-300pb (21), en contraposición DGGE ha demostrado eficacia para productos de hasta 500pb. En adición a esto SSCP puede no ser tan eficaz como DGGE cuando se trata de la detección de mutaciones en una cantidad elevada de secuencias amplificadas por PCR, como es el caso de amplificaciones genéricas del CMH-DRB. Un problema adicional de SSCP es la posibilidad de que se presente más de una banda para una secuencia sobre un gel (22).

El análisis heterodúplex (HA) de ADN es una técnica que depende de la conformación de fragmentos de ADN dúplex (19), al igual que la DGGE detecta pequeñas variaciones en la secuencia de ADN. Los heterodúplex son el resultado de dos secuencias de ADN similares pero no idénticas, que forman dúplex. Estos dúplex no coincidentes tendrán una alteración en la movilidad electroforética, en comparación con dos homodúplex, que podrá ser detectada mediante el uso de gel de acrilamida. Se ha usado generalmente para la tipificación del CMH-DRB en búfalos (23), la utilidad de HA podría estar relacionada con la diferenciación entre homocigotos y heterocigotos en un solo locus del CMH.

La electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) es similar a la DGGE y ha sido utilizada para describir alelos CMH-DRB en ganado vacuno (24). Generalmente alterando el gradiente de temperatura en un gel de acrilamida, en lugar de utilizar agentes químicos desnaturizantes, es posible discriminar entre alelos del CMH que difieren según la secuencia de ADN. Al igual que en la DGGE las diferencias en las secuencias serán visualizadas en diferentes partes del gel de acuerdo con su movilidad, para separar alelos previo a su secuenciación (8).

En la mayoría de estudios moleculares del CMH, la clonación y secuenciación continúan siendo el “gold standard”. La técnica permite determinar secuencias de ADN que se pueden amplificar en concentraciones muy bajas y si un gran número suficiente de clones se secuencian, incluso los alelos menos representados pueden ser identificados. Sin embargo, presenta desventajas como por ejemplo, la amplificación por PCR de secuencias del exón 2, de genes CMH-DRB seguido de la clonación da como resultado muchos recombinantes (25). Lo cual cobra mucha importancia cuando muestras degradadas se amplifican, los recombinantes resultantes pueden ser difíciles de descifrar y podrían dar lugar a una incorrecta identificación de nuevas secuencias de CMH.

Es de interés e importancia que al combinarse ésta técnica con DGGE en los estudios iniciales del CMH, es posible reducir el inconveniente de los recombinantes, dado que al

parecer dichos recombinantes, son poco frecuentes en las reacciones de PCR previas al análisis por DGGE, lo que convierte a la DGGE en una de las mejores alternativas para el estudio de CMH (8).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) como método para la caracterización molecular de alelos DRB del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II en monos del nuevo mundo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer las condiciones óptimas de operación de la técnica Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).
- Caracterizar el patrón de bandas obtenido por DGGE, para su posterior identificación para purificación y secuenciación.
- Describir los diferentes alelos DRB obtenidos por secuenciación, en la población de monos *Aotus* estudiados.

3. METODOLOGÍA

3.1 TIPO DE ESTUDIO: experimental

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA: los animales empleados en el presente estudio son primates no humanos de la especie *Aotus vociferans* provenientes de la estación de primates de la FIDIC en Leticia, Amazonas, Colombia. El gen DRB de la población en estudio se había obtenido por previa clonación y secuenciación.

TABLA 1: Identificación de las muestras de ADN empleadas en el estudio.

N° Tatuaje	N° Alelos
1-054	1
0-328	2
0-330	3
0-216	4
0-327	5

3.3 AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 2 DEL GEN CMH-DRB DE *Aotus vociferans*

3.3.1 Extracción de ADN

Para la tipificación de alelos DRB del CMH, el ADN fue extraído a partir de muestras de sangre periférica de 5 monos *Aotus vociferans* con el kit comercial de Promega (Ref: A1125), según indicaciones del fabricante.

3.3.2 Cebadores

- Directo: CLAMP-DRB-nwmcEX1F
- Reverso: DRB-nwmgenEX2R

3.3.3 Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados en este estudio amplifican el exón 2 del gen CMH-DRB, considerado el compartimiento más polimórfico de estos genes. Los cebadores se diseñaron para amplificar ADN genómico, teniendo en cuenta la similitud entre los genes CMH-DRB de todos los primates. Con base a un alineamiento de especies que incluye humanos (Hominidae), *Macaca mulatta* (Cercopithecidae) y *Callithrix jacchus* (Cebidae). El alineamiento muestra la alta conservación de las regiones flanqueantes del exón 2 entre estas familias, que en conjunto, representan los principales grupos de primates, con lo cual se asegura la amplificación de los distintos alelos en las especies de *Aotus* estudiadas.

Para obtener los amplicones de las especies de *Aotus* incluidas en este estudio, se utilizó un juego de cebadores para la amplificación de las secuencias del exón 2, que incluía el cebador directo CLAMP-DRB-nwmcDEX1F y un cebador reverso DRB-nwmgenEX2R

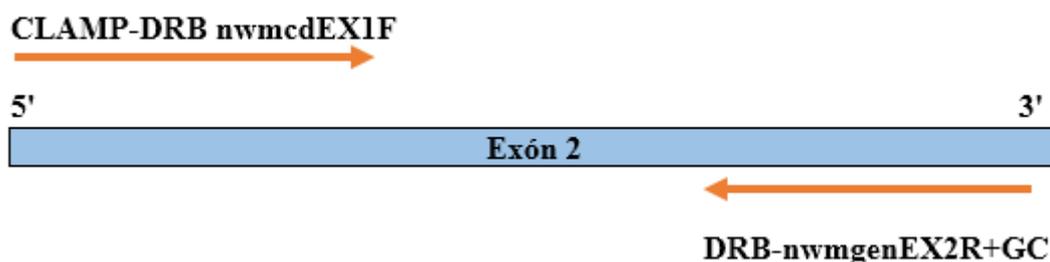


FIGURA 3. DISEÑO DE CEBADORES: El cebador reverso fue reformado añadiéndole la grapa GC según lo descrito por Knapp 1997 y Middleton 2004 (27).

3.3.4 Condiciones de PCR

El ADN_g obtenido (40ng) fue utilizado como plantilla para la amplificación del fragmento específico de los genes a estudiar, las concentraciones en la master mix fueron las siguientes: buffer 1X, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2μM de cada uno de los cebadores, 1μg/reacción de DNA y 1,25 unidades de enzima Amplitaq Gold Hot Start (byosistems) en una reacción de 50 μl. Se utilizó un juego de cebadores (CLAMP-DRB-nwmcDEX1F/DRB-nwmgenEX2R) que permitió la obtención de las secuencias de interés.

Las condiciones de la PCR constaron de 5 minutos iniciales de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de 90 segundos de desnaturalización a 94°C, 90 segundos de alineamiento a 60°C, 90 segundos de extensión a 72°C y 10 minutos adicionales de extensión a 72°C. Los productos de PCR fueron comprobados a través de electroforesis en gel de agarosa 1,5% y su tamaño se determinó con el marcador de peso molecular Hyperlader II, el cual fue de 300pb.

3.4 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La purificación de los productos de PCR obtenidos se realizó con el kit comercial de Promega, (Referencia: A1120) según indicaciones del fabricante.

La concentración de los productos, se calculó en un NanoDrop 2000 (Thermo SCIENTIFIC) y el ADN purificado obtenido fue almacenado a temperatura de -20°C hasta su uso.

3.5 MONTAJE DEL GEL DGGE PERPENDICULAR

La preparación del gel para la DGGE perpendicular se realizó con acrilamida en un gradiente de desnaturalización de 20-80% con una concentración de 12% de acrilamida, se utilizó como muestra producto de PCR purificado de *Aotus vociferans* con 5 alelos, del cual se sembró 1,5 µg (10µl) con buffer de carga 2X, se le adicionó 20µl de solución de tinción. Se agregó 6.5L de TAE 1X a la cubeta de electroforesis, con una temperatura de 60°C y se dejó correr por un tiempo de 3 horas 30 minutos a 300 voltios constantes.

3.6 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS DE OPERACIÓN DE DGGE PARALELA:

Para determinar las condiciones óptimas de operación de la DGGE paralela se realizó varios ensayos a diferentes condiciones.

ENSAYO 1:

Cantidad de muestra: 500ng de DNA

Gradiente: 40-65%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 70V

Tiempo: 16 horas

ENSAYO 2:

Cantidad de muestra: 300ng, 350ng, 400ng de DNA

Gradiente: 40-65%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 70V

Tiempo: 7 horas

ENSAYO 3:

Cantidad de muestra: 200ng, 400ng de DNA

Gradiente: 40-65%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 70V

Tiempo: 16 horas

ENSAYO 4:

Cantidad de muestra: 350ng, 400ng de DNA

Gradiente: 40-65%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 40V

Tiempo: 15 horas

ENSAYO 5:

Cantidad de muestra: 400ng, 300ng de DNA

Gradiente: 40-65%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 40V

Tiempo: 15 horas

ENSAYO 6:

Cantidad de muestra: 400ng, 300ng de DNA

Gradiente: 45-70%

Temperatura de buffer: 60°C

Voltaje: 40V

Tiempo: 15 horas

El ensayo 1 se realizó de acuerdo a metodología descrita por Knapp 1997 y Middleton 2004, a partir del primer ensayo se realizó cambios en la cantidad de muestra sembrada y tiempo de corrida del gel. Para el ensayo 6 fue necesaria la implementación del gel perpendicular, en el cual se determinó que la separación óptima de alelos se presentó en un gradiente de 45-70%, por lo tanto se decidió utilizar este gradiente para el gel paralelo, con el cual finalmente, se obtuvo la resolución esperada de las bandas correspondiente a diferentes alelos de la población de monos en estudio.

3.7 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN CONTENIDO EN BANDAS DE DGGE PARALELO

En el presente estudio se requiere secuenciar las bandas obtenidas de DGGE para identificar los alelos DRB de cada mono en estudio.

En geles de poliacrilamida, los monómeros de acrilamida están covalentemente unidos a una reacción química. Por lo tanto el gel no puede ser disuelto como geles de agarosa para extraer el DNA atrapado.

1. Preparación de la muestra

- Pesar un tubo de microcentrífuga vacío
- Transferir el fragmento de DNA (banda), obtenida por DGGE previamente cortada.
- Pesar banda de acrilamida en el tubo de microcentrífuga.

2. Extracción de DNA

- Agregar 200µl de agua nanopura por cada 100mg de gel, macerar la acrilamida con una punta de pipeta de 1000µl fundida, asegurándose de que todas la piezas del gel queden sumergidas en el agua nanopura.
- Incubar 1 hora a 50°C

3. Remoción de acrilamida

- Centrifugar a 14.000 gravedades por 1 minuto
- Pasar sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo

4. Lavado de DNA

- Agregar 2,5 volúmenes de etanol 100% y 0,1 volúmenes de acetato de sodio.
- Incubar 1 hora a -80°C
- Centrifugar 10-15 minutos a 17.000 gravedades
- Descartar sobrenadante y agregar 1 ml de etanol 70%
- Centrifugar 1 minuto a 17.000 gravedades
- Dejar secar 5 minutos en papel absorbente.

5. Elución del DNA

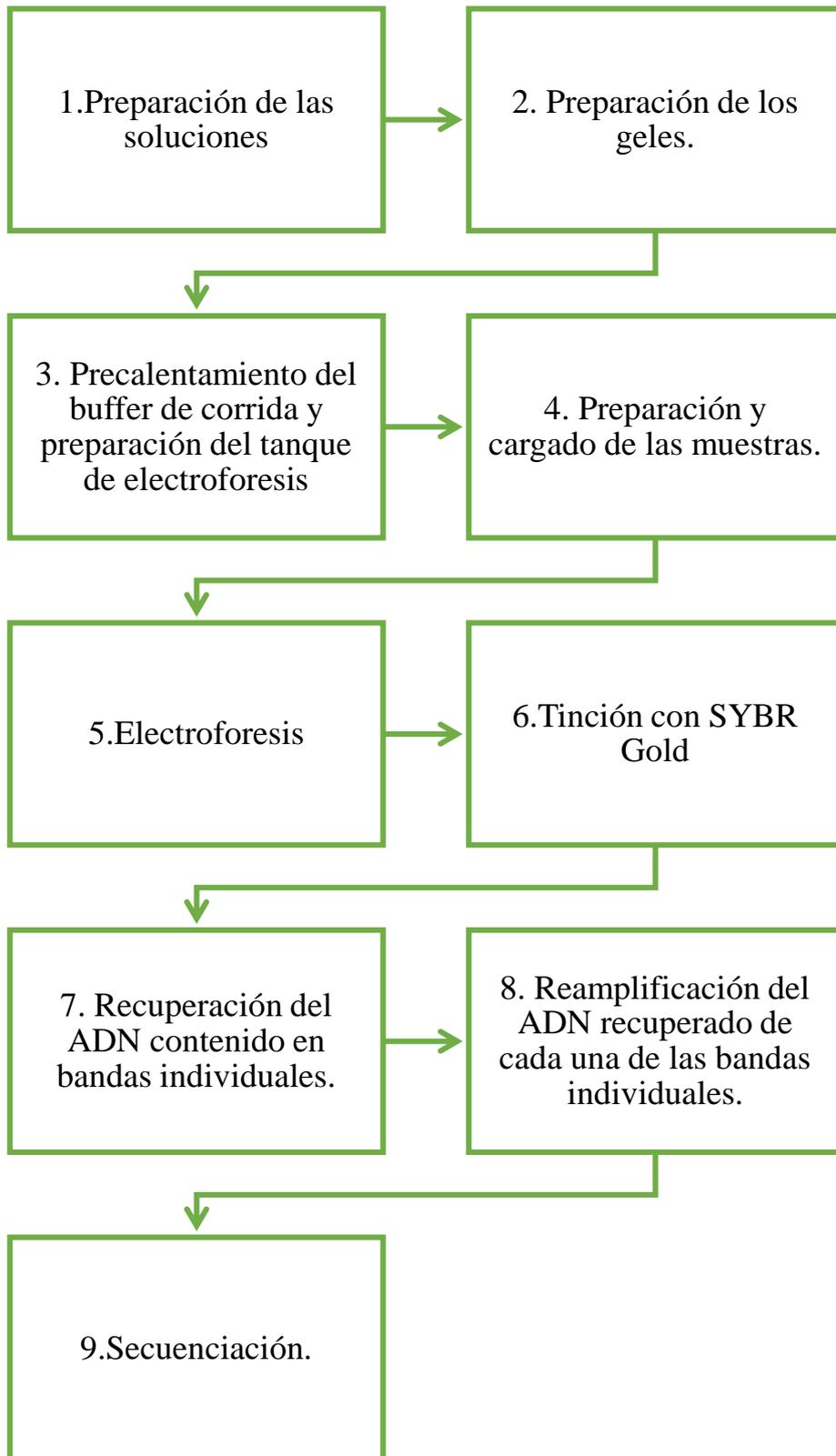
- Agregar 30µl de agua nanopura
- Incubar media hora a 50°C

- Guardar a -20°C
- Comprobar purificación en gel de agarosa de 1,5%

3.8 SECUENCIACIÓN DE ALELOS DRB

Las bandas obtenidas en el gel paralelo, fueron extraídas, purificadas con la metodología ya descrita y volvieron a ser amplificadas con el objetivo de identificar la secuencia específica de nucleótidos de los alelos, por medio de secuenciación.

FIGURA 4: flujograma de etapas de la DGGE



4. RESULTADOS

En total 5 muestras de sangre periférica de primates del género *A. vociferans* provenientes de la estación de primates de la FIDIC, fueron recolectadas. El ADNg fue extraído según la metodología anteriormente descrita.

FIGURA 5: ADN GENÓMICO DE *A. vociferans*: se comprobó visualmente mediante la realización de un gel de agarosa de 1,5% la integridad del ADN genómico de la población de monos *Aotus vociferans* en estudio, en los carriles 1 al 5. MP: marcador de peso molecular.

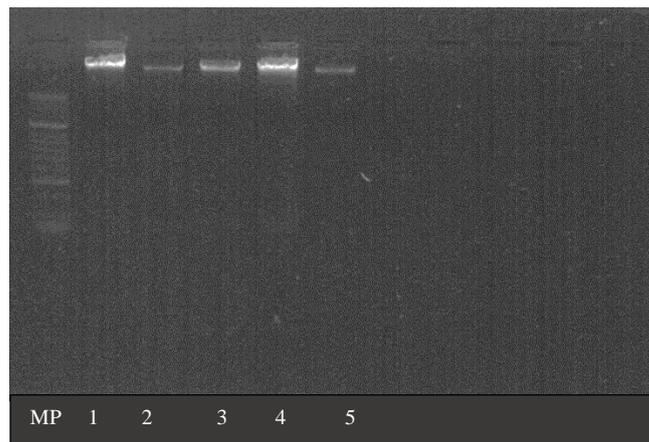


FIGURA 6: AMPLIFICACIÓN DE EXÓN 2 DEL GEN CMH-DRB DE *Aotus vociferans*: mediante PCR convencional se amplificó el exón 2 del gen CMH-DRB de la población de los 5 monos *A. vociferans* en estudio, la amplificación de los productos de PCR se comprobó en un gel de agarosa de 1,5%. Los productos de los monos 0-330A, 0-216 y 0-327A por presentar doble banda, fueron purificados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 2%.

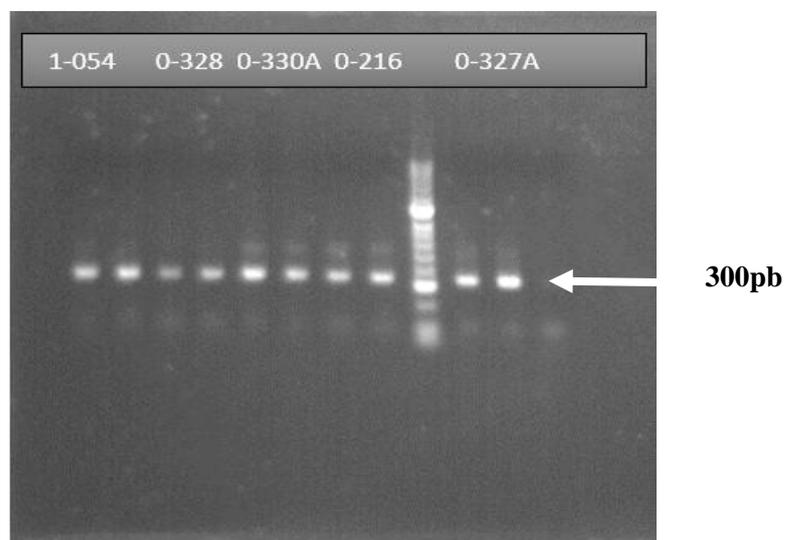


FIGURA 7: DETERMINACIÓN ÓPTIMA DE SEPARACIÓN DE ALELOS DRB CON DGGE PERPENDICULAR: posterior a la amplificación con grapa-GC en los cebadores para DRB, el ADN de *A. vociferans* se sometió a electroforesis en gel perpendicular de 20-80% para determinar el gradiente desnaturalizante óptimo para la separación de alelos DRB, en la imagen se aprecia que la máxima separación de alelos se presenta en un gradiente desnaturalizante de 45 a 70%.

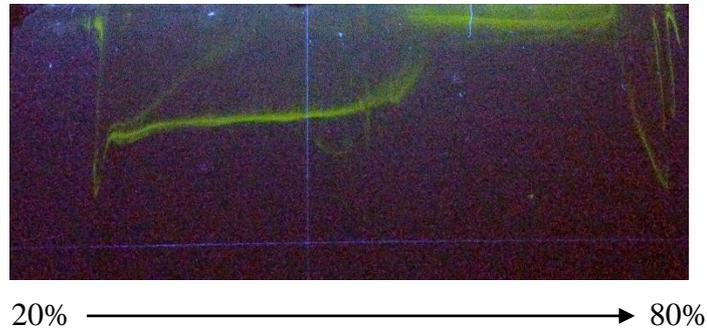
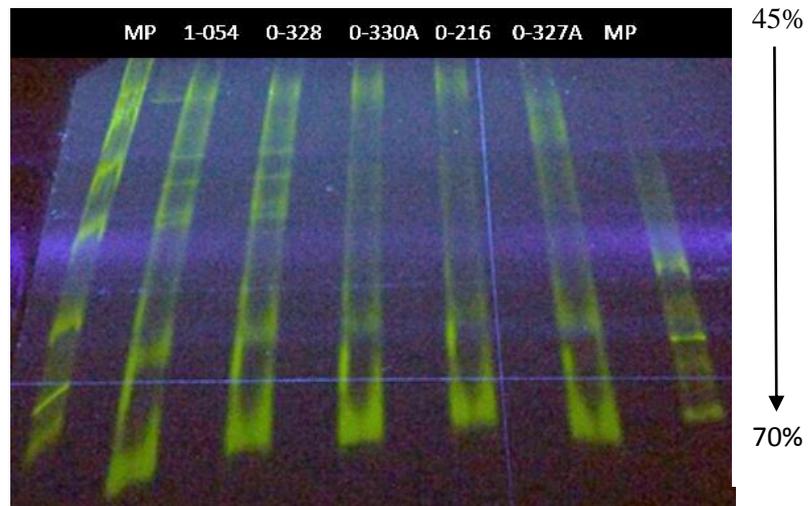
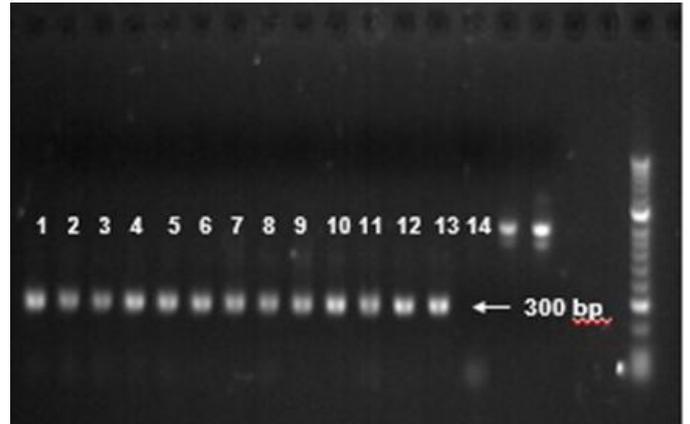
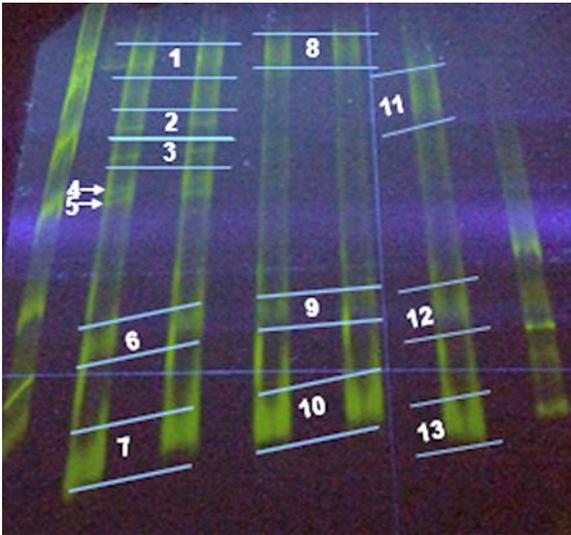


FIGURA 8: SEPARACIÓN DE ALELOS DRB USANDO DGGE PARALELO: Con la concentración óptima de gradiente desnaturalizante para la separación de alelos DRB obtenida en el gel perpendicular, se decidió implementar el gradiente 45-70%, con lo cual se obtuvo diferentes bandas correspondientes a los alelos de los monos *Aotus* estudiados.

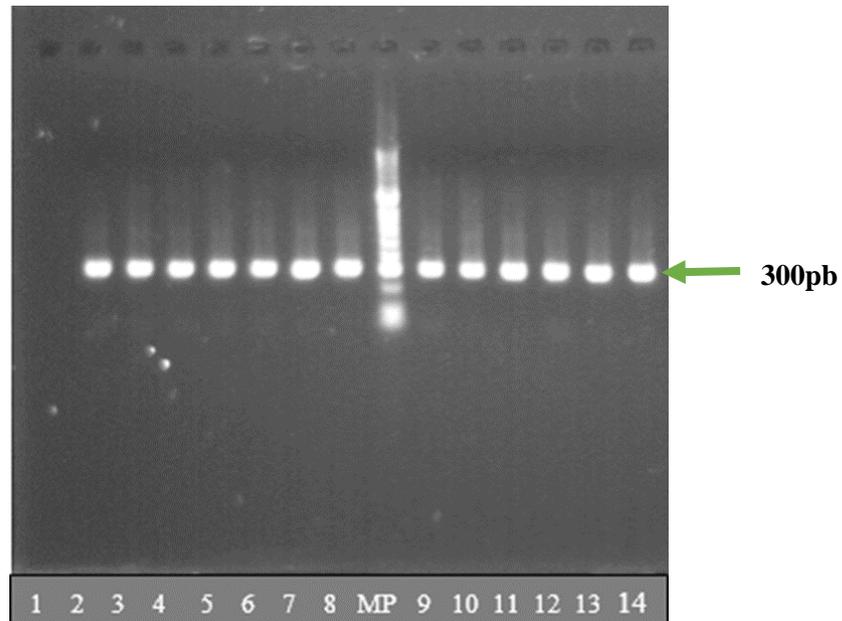


4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS DIFERENTES BANDAS EXTRAÍDAS DEL GEL DGGE PARALELO: posterior a la realización del gel paralelo, se obtuvo un total de 13 bandas correspondientes a los alelos de la población de monos *Aotus* estudiados. Con relación a lo reportado en estudios anteriores, se encontró mayor número de alelos para cada mono, lo que permite evidenciar el alto grado de sensibilidad y resolución de la técnica.



- | | | | |
|-----|---------------|---|----------|
| 1. | 327 A_Banda 1 | } | 5 alelos |
| 2. | 327 A_Banda 2 | | |
| 3. | 327 A_Banda 3 | | |
| 4. | 327 A_Banda 4 | | |
| 5. | 327 A_Banda 5 | | |
| 6. | 327 A_Banda 6 | } | 2 alelos |
| 7. | 327 A_Banda 7 | | |
| 8. | 328 banda 1 | | |
| 9. | 328 banda 2 | } | 1 alelo |
| 10. | 328 banda 3 | | |
| 11. | 054 banda 1 | | |
| 12. | 054 banda 2 | } | 1 alelo |
| 13. | 054 banda 3 | | |
| 14. | Control (-) | | |

4.2 AMPLIFICACIÓN DE ADN OBTENIDO DE BANDAS PURIFICADAS DE DGGE PARALELA: posterior a la purificación de las bandas obtenidas del gel paralelo, el ADN purificado fue nuevamente amplificado y comprobado en un gel de agarosa de 1,5%. El carril 1 corresponde a un control negativo, en los carriles 2 al 14 se observan las bandas purificadas.



4.3 SECUENCIACIÓN DE LAS DIFERENTES BANDAS EXTRAÍDAS DEL GEL DGGE PARALELO:

El ADN obtenido a partir de las bandas del gel de DGGE paralela fue amplificado por PCR, los productos fueron purificados según la metodología anteriormente descrita para gel de acrilamida, posteriormente dichos productos purificados fueron secuenciados en ambas direcciones, con cebadores previamente utilizados en la amplificación. Este proceso fue realizado en MACROGEN, Seúl, Corea del Sur, utilizando el método BigDye Terminator

4.4 INTERPRETACIÓN DE ELECTROFEROGRAMAS: un electroferograma es el gráfico que arroja el secuenciador después de analizar la electroforesis, éste permite visualizar la secuencia de nucleótidos de cada alelo a partir de curvas de fluorescencia, una por cada base. A cada una de las bases le corresponde un color que el equipo interpreta como un pico y en la parte superior le asigna la base correspondiente.

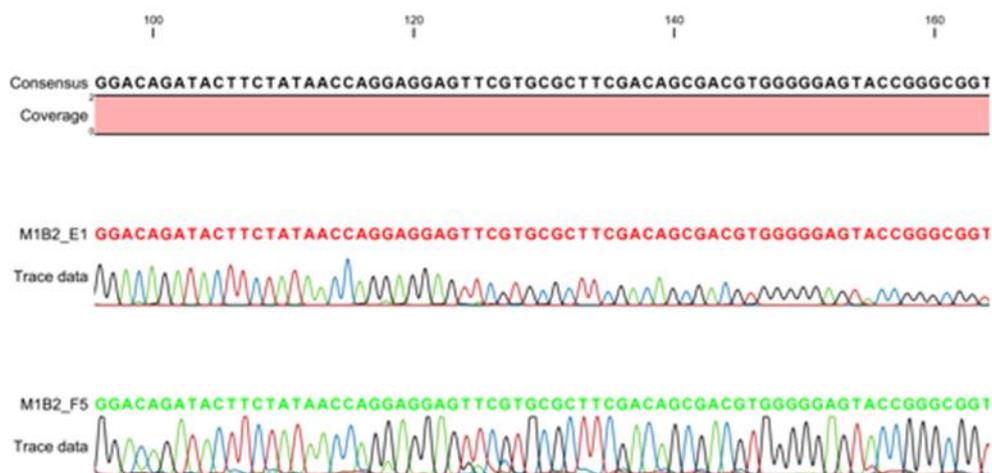


FIGURA 9: ELECTROFEROGRAMA 1: secuencia correcta, a cada base le corresponde un pico bien definido, en este estudio sólo se obtuvo una secuencia ideal, en las demás muestras no se obtuvo la resolución esperada.

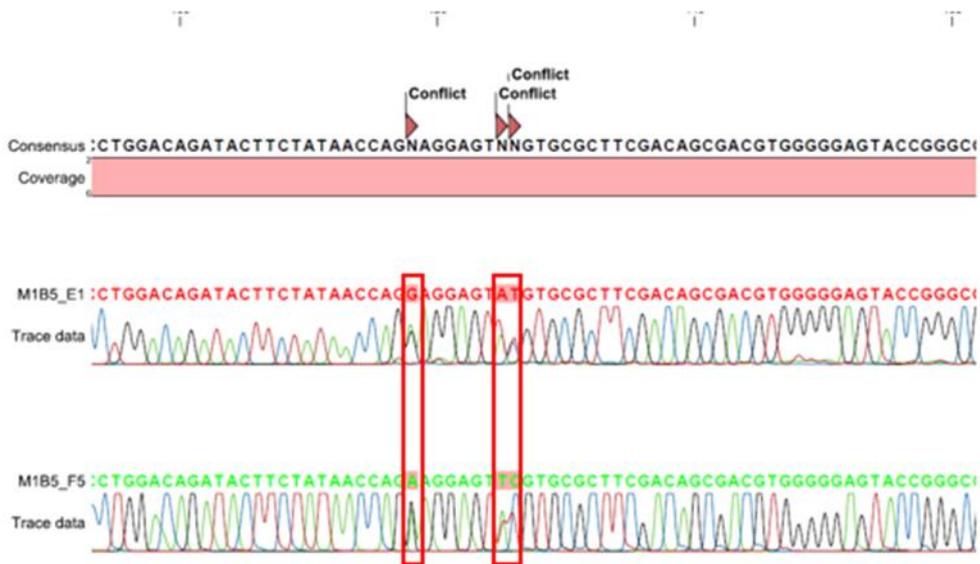


FIGURA 10: ELECTROFEROGRAMA 2: en las cajas rojas se observan 2 picos, lo que quiere decir que hay presencia de 2 alelos en la muestra.

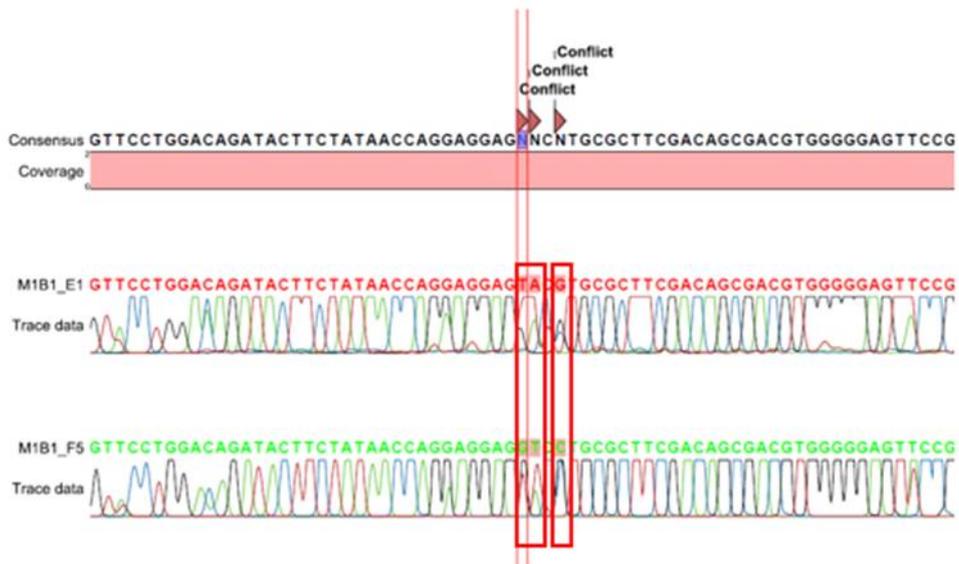


FIGURA 11: ELECTROFEROGRAMA 3: en las cajas rojas se observan 2 picos, lo que quiere decir que hay presencia de 2 alelos en la muestra.

En condiciones ideales, en una secuencia se debe observar 1 pico, en el caso de los electroferogramas 2 y 3 en las cajas rojas se observan 2 picos, lo que permite afirmar la

presencia de 2 alelos presentes en la muestra, también se puede atribuir a sesgos en los cebadores, por lo que se infiere que es necesario hacer mejoras en la técnica para obtener mejores resultados.

5. DISCUSIÓN

En estudios anteriores, la identificación de alelos del CMH en primates no humanos se ha relacionado con métodos serológicos ambiguos, técnicas equívocas como el isoelectroenfoque, o que requieren mano de obra intensiva como la clonación y secuenciación. La utilización de PCR seguido de DGGE en este estudio fue validada como técnica para tipificar monos *Aotus* caracterizados por clonación en un estudio previo. DGGE constituye un método rápido y sensible para la identificación de alelos DRB en monos del nuevo mundo considerados como modelo importante en las ciencias biomédicas, así mismo la identificación de alelos DRB de clase II en dicho modelo animal permite avanzar en el estudio inmunopatológico de la malaria, como el curso de la misma.

En estudios similares según lo descrito por Knapp 1997 se obtuvo productos similares (310pb) con respecto al obtenido en este estudio (300pb).

En este estudio se logró establecer las condiciones óptimas de operación de la DGGE, en base a la realización de DGGE perpendicular para determinar la concentración de gradiente óptimo de separación de alelos en DGGE paralela, en cuanto a los pasos técnicos fue necesario implementar una metodología artesanal, dado que los pasos descritos en la teoría no fueron aplicables del todo en la práctica.

Se logró caracterizar el patrón de bandas obtenido por DGGE paralela, es importante destacar que, con respecto a lo reportado en estudios previos, DGGE muestra un avance muy significativo puesto que se encontró un mayor número de alelos para cada mono estudiado, lo que demuestra el elevado potencial de resolución y sensibilidad de la técnica.

En el análisis de las secuencias, sólo se obtuvo un electroferograma ideal, en las demás muestras se observó picos sobrelapados que sugieren la presencia de más de un alelo, situación que se puede atribuir a sesgos en los cebadores, por lo tanto se hace necesario implementar mecanismos de mejora que permitan mayor resolución de resultados.

El uso generalizado de la DGGE ilustra la importancia y valor que tiene la técnica para evaluar alelos del CMH, la favorecen el hecho de ser rápida, fiable, reproducible, relativamente baja en costos, a diferencia de clonación y secuenciación. Cabe resaltar que permite la determinación de variedad de loci y el estudio del CMH en una amplia variedad de especies (8). Por otro lado a pesar de que se ha demostrado que la DGGE es superior a la clonación y secuenciación (14,27), el uso análogo de clonación y secuenciación seguido de DGGE durante el estudio de especies, asegura una adecuada detección de alelos CMH-DRB.

6. CONCLUSIONES

A partir de la utilización de PCR seguida de DGGE se evidencia que la técnica es sensible para la caracterización de alelos DRB en *Aotus vociferans*. En este trabajo se amplificó el exón 2 altamente polimórfico de los genes del CMH-DRB previamente descritos en esta especie, es de anotar que en las secuencias se observan picos sobrelapados por lo que se concluye la existencia de más de un alelo, en otras secuencias no se obtuvo la resolución esperada, lo que podría atribuirse a sesgos en los cebadores.

En este estudio el uso de la técnica de DGGE expone un interesante avance con respecto a técnicas alternativas como la clonación y secuenciación ya que identifica alelos no reportados por éstas. La incorporación en la PCR de un cebador con GC-clamp en teoría permite la separación de alelos que difieren en un único nucleótido, en este estudio se logró la separación de diferentes alelos en geles de DGGE, sin embargo en el análisis de las secuencias se puede inferir que la técnica resulta sensible debido a que detecta diferentes alelos, pero que se hace necesario poner a punto la técnica para la detección de un alelo específico.

7. RECOMENDACIONES

La técnica de DGGE aunque de manejo relativamente complejo, sigue siendo extremadamente eficaz, dado su elevado potencial para describir el CMH en un amplio grupo de vertebrados, además de su baja intensidad en mano de obra y bajo costo a diferencia de la clonación y secuenciación.

Es una técnica, rápida, baja en costos, cuyos principios son aplicables a cualquier locus del CMH de interés, motivo por el cual es de gran atractivo para investigadores que quieren estudiar la diversidad de éste en las especies. En otros estudios se ha demostrado que DGGE puede ser utilizado para la detección de genes del CMH clase I de más de 200 aves (26).

En general, todas las metodologías conocidas para describir el CMH, presentan ventajas y desventajas, que deben ser tenidas en cuenta al momento de realizar el estudio. En la DGGE se requiere una total atención de cada uno de los pasos necesarios para llevar a cabo la preparación del gel de acrilamida, dado que pequeñas diferencias en la concentración de agentes desnaturalizantes, pueden determinar el éxito en los resultados obtenidos.

En cuanto a los pasos técnicos a seguir para el gel paralelo y en especial para el gel perpendicular, es de resaltar, según la experiencia personal, que la teoría sin duda muy útil, no llega al nivel de desafíos que comprende la práctica diaria, por lo tanto es ésta la que aporta todas las herramientas para la transformación de ideas y contribución al conocimiento.

En el análisis de las secuencias se evidencia la presencia de picos sobrelapados que sugieren la necesidad de poner a punto la técnica con el fin de detectar un alelo específico.

Por último y no menos importante, a futuro sería muy significativo esclarecer puntualmente, mecanismos con el fin de mejorar, la resolución correcta de las bandas al utilizar DGGE. Al igual que explorar a fondo aspectos técnicos con el fin de obtener resultados en un período de tiempo más corto. Por otro lado también sería de mucho interés investigar nuevos campos de aplicación de la DGGE, como también tipificar alelos del CMH en especies aún no caracterizadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Campuzano G, Blair S. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. Editora Médica Colombiana S.A. Medicina & laboratorio 2010.
2. World Health Organization. World malaria report 2015, World Health Organization 2015, Geneva, Switzerland.
3. Rodríguez JC, Uribe G, Araújo R, Narváez P, Valencia S. Epidemiology and control of malaria in Colombia. Mem inst Oswaldo cruz. 2011 Aug; 106 Suppl 1: 114-22.
4. Instituto Nacional de Salud. (2014) GESTIÓN PARA LA VIGILANCIA ENTOMOLÓGICA Y CONTROL DE LA TRANSMISIÓN DE MALARIA [Fecha de consulta: Junio de 2016]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/?idcategoria=49752#>.
5. López C, Suárez CF, Cadavid LF, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Characterising a Microsatellite for DRB Typing in *Aotus vociferans* and *Aotus nancymaae* (*Platyrrhini*). Roscoe Stanyon, University of Florence, Italy. May 12, 2014.
6. Baer J, Weller R, Kakoma I. AOTUS: The Owl Monkey. Academic Press Inc. USA 1994.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Séptima Edición. Barcelona, España. 2012. 1-555. [disk].
8. Knapp LA. Denaturing gradient gel Electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. Tissue antigens 2005 Mar;65(3):211-9.
9. Bontrop RE. Non-human primates: essential partners in biomedical research. Immunol Rev. 2001 Oct; 183:5-9.
10. Ujvari B, Belov K. Major Histocompatibility Complex (MHC) Markers in Conservation Biology. Int. J. Mol. Sci. 15 August 2011.
11. Rojas W. Inmunología. 13ª edición. Medellín, Colombia. Fondo editorial de la CIB. 2004. 1-472.
12. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol. 2008 Aug; 8.
13. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 1998 Jan.
14. Knapp LA, Cadavid LF, Eberle ME, Knechtle SJ, Bontrop RE, Watkins DI. Identification of new mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing. Immunogenetics. 1997; 45(3):171-9.
15. Von Wintzingerode F, Göbel UB, Stakebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol Rev. 1997 Nov; 21.
16. van der Hout AH, et al. A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting. Human Mutat 2006; 27(7): 654–666.
17. Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods. 57 (2004) 279-281.

18. Lobashevsky A, Smith JP, Kasten-Jolly J, Horton H, Knapp L, Bontrop RE, Watkins D, Thomas J. Identification of DRB alleles in rhesus monkeys using polymerase chain reaction-sequence-specific primers (PCR-SSP) amplification. *Tissue Antigens*. 1999. Sep; 54 (3): 254-63.
19. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N, Highsmith WE Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*. 1999 Jun; 20 (6): 11777-85.
20. Ortí G, Hare MP, Avise JC. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol*. 1997 Jun; 6 (6): 575-80.
21. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. 2000 Nov; 9 (11): 1699-710.
22. Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K et al. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 1999; 13: 109–22.
23. De S, Singh RK, Butchiah G. MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Genet* 2002; 33:215–9.
24. Da Mota AF, Martinez ML, Coutinho LL. Genotyping BoLA-DRB3 alleles in Brazilian Dairy Gir cattle (*Bos indicus*) by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) and direct sequencing. *Eur J Immunogenet* 2004:31.
25. Longeri M, Zanotti M, Damiani G. Recombinant DRB sequences produced by mismatch repair of heteroduplexes during cloning in *Escherichia coli*. *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 517–23.
26. Westerdahl H, Wittzell H, von Schantz T et al. MHC class I typing in a songbird with numerous loci and high polymorphism using motif-specific PCR and DGGE. *Heredity* 2004:92: 534–42.
27. Middleton SA, Anzenberger G, Knapp LA. Identification of MHC-DRB alleles in New World monkeys using PCR, DGGE and direct sequencing. *Immunogenetics* 2004; 55:785–90.
28. Otting N, de Groot NG, Noort MC et al. Allelic diversity of Mhc-DRB alleles in rhesus macaques. *Tissue Antigens* 2000; 56: 58–68.
29. Sauermaun U, Stahl-Hennig C, Stolte N et al. Homozygosity for a conserved Mhc class II DQ-DRB haplotype is associated with rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques: results from a prospective study. *J Infect Dis* 2000; 182: 716–24.
30. Leuchte N, Berry N, Kohler B et al. Mhc DRB sequences from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) of different origin. *Tissue Antigens* 2004; 63: 529–37.
31. Blankenburg A, Kaup FJ, Sauermaun U. Mhc class II DRB sequences of lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). *Tissue Antigens* 2003; 62: 267–9.
32. Knapp LA, Lehmann E, Hennes L et al. High-resolution HLA-DRB typing using DGGE and direct sequencing. *Tissue Antigens* 1997; 50:170–7.
33. Knapp LA, Cadavid LF, Watkins DI. The MHC-E locus is the most well-conserved of all known primate class I histocompatibility genes. *J Immunol* 1998; 160: 189–96.

34. Antunes SG, de Groot NG, Brok H et al. The common marmoset: a new world primate species with limited Mhc class II variability. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11745-50.

9. ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN Y MONTAJE DEL GEL DGGE PERPENDICULAR

Soluciones y reactivos:

- TAE 50X
- TAE 1X
- Persulfato de amonio (APS) 10%
- Buffer de carga 2X
- Solución de tinción DCode.

Preparación de soluciones gel de gradiente desnaturante al 12% de poliacrilamida.

La concentración de gradiente desnaturante a utilizar es variable de acuerdo a la muestra a analizar con el sistema DCode. Generalmente se utiliza una gama amplia de gradiente desnaturante que va de 0-100% o de 20-70%. Así mismo la concentración de acrilamida también puede variar teniendo en cuenta el tamaño del fragmento a analizar, sin embargo, se debe preparar soluciones 0 y 100% como stock. La solución desnaturante 100% consiste en una mezcla de urea 7M y formamida desionizada al 40%.

La solución de acrilamida está compuesta por acrilamida y bis-acrilamida los cuales se encuentran en una proporción 37.5:1, relacionada con los gramos y moles, que determina la concentración al 40% del reactivo.

TABLA 2: Preparación de acrilamida 40%

40% acrilamida/bis (37.5:1)	
REACTIVOS	CANTIDAD
Acrilamida	38g
Bis-acrilamida	2g
Agua destilada	Llevar a 100 ml

Filtrar por filtro de poro de 0,45 y guardar a 4°C

TABLA 3: preparación de soluciones denaturantes 0% y 100% para gel perpendicular.

REACTIVO	SOLUCIÓN DENATURANTE 0%	SOLUCIÓN DENATURANTE 100%
Solución acrilamida/Bis 40%	15 ml	15 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Formamida	-	40 ml
Urea	-	42g
Agua nanopura	83 ml	Llevar a 100 ml

*Cantidades para 100 ml.

Desgasificar por 15 minutos y filtrar en filtro de poro 0.45 μm . Almacenar hasta por un mes a 4°C protegido de la luz.

Nota: si la solución de 100% se precipita, volver a disolverla calentándola en un baño de agua a temperatura moderada.

TABLA 4: preparación de solución denaturante 0% para gel al 12% de acrilamida.

	GEL 12%	GEL 6%	GEL 8%	GEL 10%
Acrilamida /bis 40%	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Agua destilada	83 ml	78 ml	73 ml	68 ml
Volumen total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

Desgasificar por 10- 15 minutos, por filtro de poro de 0,45 μm , guardar a 4°C protegido de la luz, aproximadamente 1 mes.

TABLA 5: preparación de la solución denaturante 100% para gel al 12% de acrilamida.

	GEL 10%	GEL 12%	GEL 6%	GEL 8%
Acrilamida/Bis 40%	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Formamida desionizada	40 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Urea	42g	42g	42g	42g
Agua destilada	Hasta completar 100 ml			

Desgasificar por 10- 15 minutos, por filtro de poro de 0,45 μm , guardar a 4°C protegido de la luz, aproximadamente 1 mes. Si la solución de 100% se precipita, volver a calentar en un baño de agua a temperatura moderada.

3.8.7 Preparación del gel de gradiente desnaturante perpendicular

3.8.8 Materiales y Reactivos

- Formador de gradiente
- Agitador mecánico
- Barras magnéticas
- Bomba peristáltica
- Mangueras
- Aguja
- Soporte

- Pinzas de sujeción
- Espaciadores
- Vidrios
- Nivel
- Pipetas
- Puntas
- Cubeta de electroforesis
- Fuente de poder
- Peine liso
- Tubos falcon de 15 ml
- Tubos falcon de 50 ml
- Caja de puntas amarillas
- Solución denaturante 0%
- Solución denaturante 100%
- Solución de tinción Dcode
- Buffer de carga 2X
- TAE 50X
- TAE 1X
- Agarosa
- Persulfato de amonio
- TEMED

3.8.9 Montaje del sándwich

1. Lavar los vidrios y los espaciadores cuidadosamente con extrán o jabón líquido diluido. Enjuagar con abundante agua y poner a secar en un lugar fijo, sólo se debe utilizar los guantes para frotar suavemente los vidrios.
2. Limpiar los vidrios y los espaciadores con etanol 96% y asegurarse de que queden completamente limpios y secos, utilizando papel que no deje desechos ni fibras sobre el vidrio (Kimwipes).
3. Colocar el vidrio grande sobre una superficie firme y limpia (libre de grasa).
4. Colocar los espaciadores sobre el vidrio grande procurando no moverlos de su posición para no engrasar los vidrios. Las muescas deben mirar hacia afuera.
5. Colocar el vidrio pequeño sobre los espaciadores, revisar que esté alineado con el vidrio grande, verificar que tenga una superficie regular, lisa, sin salientes. Sostener cuidadosamente y sellar los bordes con cinta de enmascarar.
6. Abrir las pinzas usando el tornillo, para proceder a insertar los vidrios.
7. Insertar los vidrios entre las pinzas y atornillar uno de los lados ligeramente. Repetir lo mismo con el otro lado, ajustar las pinzas a cada lado de los vidrios para fijar el montaje.
8. Con ayuda de un nivel (ojo) verificar que el soporte se encuentra nivelado.
9. Insertar las pinzas que sujetan los vidrios en el soporte.
10. Verificar el ajuste de los espaciadores introduciendo y sacando la tarjeta de alineación, ésta debe presentar una ligera presión pero no forzada.

11. Ajustar las pinzas del soporte haciendo presión hacia adentro y hacia abajo y apretando suavemente los tornillos, se debe tener precaución de no apretar excesivamente, ya que existe el riesgo de que se rompan las placas de vidrio.
12. El sándwich debe quedar hundido en la esponja, para sellar y afirmar los vidrios.
13. Colocar el peine liso y sellar con agarosa 1% para evitar la salida del gel del sándwich, verificar que no queden espacios sin sellar con agarosa, excepto en la parte superior donde se servirá el gel.
14. Colocar el sándwich con el soporte ya fijado, en posición vertical formando un ángulo de 90°, con ayuda de una caja de puntas amarillas (200µl) y una tapa de tubo falcon de 50 ml y proceder a servir el gel en el sándwich.



3.8.10 Preparación del gel de gradiente desnaturizante perpendicular.

1. Colocar en un agitador magnético el formador de gradiente con sus barras magnéticas respectivas, para preparar las soluciones 20 y 80% en la región HEAVY y LIGHT respectivamente, con el fin de permitir que las soluciones fluyan de mayor a menor concentración.

NOTA: las barras magnéticas deben girar a una velocidad moderada, de manera que se impida la formación de turbulencias o burbujas de aire que afecten la formación del gel.

2. El formador de gradiente debe estar conectado a través de una manguera con la bomba peristáltica, que se debe programar en 4 para que el tiempo de caída del gel al sándwich sea de 2 ml por minuto. Con esto se asegura que el gel no se polimerice en la manguera y que se distribuya de manera uniforme entre los vidrios del sándwich.

3. Tomar un tubo falcon de 15 ml y marcar como PLUG. Agregar 1.5 ml de solución 0% y adicionar 15 µl de persulfato de amonio (APS) al 10% y 1,2µl de TEMED, mezclar suavemente por inversión y servir con una pipeta entre los vidrios del sándwich.
4. Esperar unos minutos hasta que ocurra la polimerización. Esta solución es utilizada con el objetivo de sellar la base del gel durante la preparación del gradiente.
5. Teniendo en cuenta la ecuación: $V_1 * C_1 = V_2 * C_2$ preparar la solución al 20% tomando 2,8 ml de solución 100% y 11,2 ml de solución 0%. Para la solución 80% tomar 11,2 de solución 100% y 2,8 de solución 0%, obteniendo un volumen de 14 ml para cada dilución y un volumen total de 28 ml que llenará el sándwich.

NOTA: agregar inicialmente 2,8 ml de solución 100% en la región B (20%) del formador de gradiente y agregar 2,8 ml de solución 100% en la región A (80%) del formador de gradiente, para asegurarse que la solución 20% pasa correctamente a la solución 80%, colocando la palanca en posición vertical y levantando ligeramente el formador de gradiente por la región B e inmediatamente devolviéndolo a su posición original y cerrando la palanca.

6. Agregar a la solución más concentrada 20µl de solución de tinción DCode, seguidamente agregar 140 µl de APS y 11,2 de TEMED a cada una de las soluciones.
7. Abrir brevemente la llave del formador de gradiente para asegurar que el flujo de la solución es correcto, si es así, abrir completamente y servir el gel en el sándwich, se debe procurar que al momento del llenado no se formen burbujas.
8. Luego del llenado exitoso del sándwich, y una vez vacías ambas regiones del formador de gradiente, quitar la aguja del sándwich, pasar a un recipiente y llenar de agua desionizada las dos regiones del formador de gradiente para realizar un lavado de las mangueras y el formador de gradiente.

NOTA: el agua residual obtenida del lavado de las mangueras y el formador de gradiente no se debe descartar por el desagüe. Se debe eliminar adecuadamente.

9. Se esperan aproximadamente 1 hora hasta la polimerización, se debe evidenciar visualmente un incremento del gradiente con el aumento progresivo del color azul de la solución de tinción en el gel.
10. Limpiar y secar el formador de gradiente y mangueras.

NOTA: si el gel no se va a correr inmediatamente, se puede guardar a 4°C en cámara húmeda toda la noche, aunque se recomienda correr el mismo día de la preparación.

3.8.11 Preparación de la cubeta de electroforesis.

1. Verter 6.5L de Buffer TAE 1X en la cubeta de electroforesis.
2. Poner el módulo de control por encima de la cubeta, verificando que el eje rotativo quede bien ubicado en su envoltura.
3. Encender el equipo, ajustar la temperatura a 60°C y la tasa de incremento de temperatura al máximo (200).
4. Esperar hasta que el buffer alcance la temperatura deseada aproximadamente 1 hora 30 minutos.

NOTA: se recomienda que cuando el buffer llegue a 50°C, se introduzca el gel para evitar que por diferencia de temperaturas se rompan los vidrios.

3.8.12 Preparación de los pozos y equilibrio del gel

1. Retirar el peine delicadamente
2. Lavar la superficie del gel con buffer TAE 1X, varias veces, utilizando una pipeta.
3. Colocar buffer o agua destilada en las bandas de goma que sellan el cuadro del soporte para favorecer la adhesión y disminuir los riesgos de falta de estabilidad.
4. Humedecer con buffer o agua el marco de migración para evitar fricción de este con las pinzas del sándwich en el momento de encajarlos.
5. Retirar el gel del soporte y de la esponja humedecida girando las palancas simultáneamente 180° hacia arriba y después jalando hacia el exterior.
6. Hacer resbalar las rajadas en las pinzas del sándwich sobre el cuadro de migración. Empujar con los pulgares por debajo de las pinzas, hasta que se escuche un clic. Mantener el ángulo entre el sándwich y el soporte para evitar que el vidrio dañe los empaques blancos. Si los sándwiches no quedan bien ajustados contra el soporte, no se formará un espacio que contiene buffer y la electroforesis no correrá.
7. Revisar que la placa más grande sea la más próxima a usted y que las pinzas estén bien apretadas y estables, ya que si no se sujeta la parte baja al mismo nivel de las pinzas, las placas de vidrio pueden moverse y el montaje perdería estabilidad.
8. Juntar dos placas de vidrio sin espaciadores y sujetarlas con las pinzas de sándwich. Colocar este montaje en el lado contrario del marco de migración. **NOTA:** no olvidar humedecer las partes previamente al contacto.
9. Apagar el elemento calentador y posteriormente el equipo desde el módulo de control. Esperar un minuto antes de levantar la tapa y depositarla sobre su base, ya que el eje de cerámica es muy frágil y podría romperse por el cambio de temperatura.
10. Poner el marco de migración con el gel en la cubeta de electroforesis. **NOTA:** el cuadro se debe colocar con el punto rojo a la derecha de la cubeta, de lo contrario no entra.
11. Colocar nuevamente la tapa con el controlador de temperatura sobre la cubeta de electroforesis. **NOTA:** se debe tener mucho cuidado con el elemento calentador, ya que puede chocarse con las paredes de la cubeta y romperse.

12. Encender la bomba y revisar: que el buffer sea dirigido por encima del gel en la cámara y toque el electrodo y que el espacio que se forma entre los dos sándwich permanezca lleno con buffer.
13. Si no se llena la cámara por encima del gel, se debe a falta de estabilidad del montaje. En ese caso debe verificar que las placas de vidrio no se hayan movido y que no haya fugas de buffer, sacando el marco de migración sobre una superficie plana y llenando la cámara con agua.
14. Si todo está bajo control, deje que se equilibre el gel en el tampón hasta que se vuelva a alcanzar la temperatura deseada (60°C).

3.8.13 Carga de muestras y electroforesis.

Es importante que las muestras de ADN que se vayan a cargar hayan sido previamente purificadas y comprobadas en un gel de agarosa.

Según el manual de BIORAD para un gel denaturante perpendicular se pueden cargar de 1 a 3µg de la amplificación de ADN, por lo general 50% de un volumen de 100 µl de PCR a partir de una molde de ADN de 100 ng. Se realiza una mezcla de la muestras y se combinan en el mismo gel.

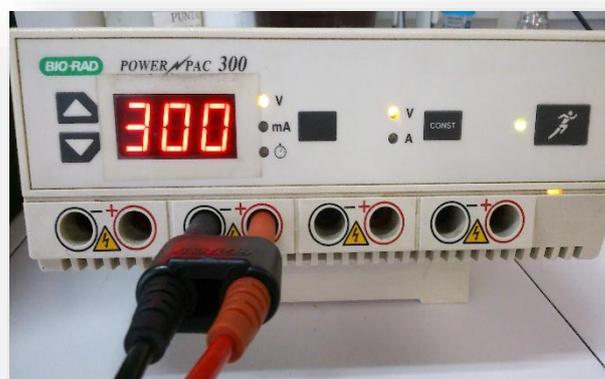
En el presente estudio se sembró 1,5µg de ADN (10µl de producto de PCR purificado) de un mono *A. vociferans* con 5 alelos, cuya cuantificación fue 104.6 ug. Se realizó los cálculos respectivos para la preparación de la muestra a sembrar, así:

$$\begin{array}{ccc}
 1000\mu\text{l} & \longrightarrow & 104,6\mu\text{g DNA} \\
 X & & 1,5\mu\text{g}
 \end{array}$$

Es necesario tomar 14,3 µl del producto de PCR purificado, agregarle 35,7 de agua nanopura, más 50µl de Buffer de carga 2X para preparar la muestra de 1,5µg a sembrar.

- Se tomó un tubo de PCR debidamente marcado, para preparar la muestra, se mezcló bien y se realizó un Spin para concentrar el volumen en la parte inferior.
1. Levantar únicamente la tapa transparente de acrílico sin levantar toda la tapa del controlador, para no disminuir la temperatura del buffer significativamente.
 2. Apagar el calentador, posteriormente la bomba y el equipo.
 3. Cargar las muestras con las puntas largas exclusivas para DGGE, para este caso la muestra fue sembrada con una jeringa HAMILTON en la mitad del gel, verificando que su distribución fuera uniforme.

4. Colocar la tapa transparente en su posición y encender nuevamente el aparato, el calentador y la bomba. Nota: si la tapa no está en su posición correcta, no se puede generar corriente eléctrica en el equipo.
5. Enchufar los cables eléctricos en la fuente de poder, teniendo en cuenta aparear los colores (rojo con rojo y negro con negro), ya que de lo contrario el ADN se saldría de los pozos.
6. El voltaje utilizado fue de 300 voltios constantes, verificar que el amperaje se mantenga constante.
7. Correr el gel durante 3 horas: 30 minutos, verificar que los parámetros son y se mantienen correctos. En especial la temperatura del buffer (60°C)
8. Una vez finalizado el corrido, apagar el equipo y esperar 5 minutos antes de retirar el sistema de control de temperatura.



3.8.14 Tinción del gel con SYBR Gold.

1. Apagar la fuente de tensión eléctrica y el aparato Dcode. Esperar 5 minutos.
2. Colocar delicadamente la tapa en su base.
3. En un recipiente de plástico o de vidrio que pueda contener el gel, llenar con solución tampón TAE 1X previamente utilizada en la corrida, agregar 5µl de SYBR gold y proteger de la luz.
4. Remover el sándwich del marco de migración. Desatornillar las pinzas y ponerlas de lado.
5. Delicadamente levantar un espaciador (no muy alto) hasta que el gel se desprenda de la placa más pequeña.
6. Dejando el gel sobre la placa más grande, coloque la placa con el gel dentro del recipiente previamente llenado con TAE 1X y mover con cuidado la placa para que el gel se desprenda y se pueda recuperar posteriormente. Esperar unos minutos.
7. Teñir durante 10 minutos con agitación lenta.
8. Sacar la foto bajo la luz UV (254nm) en el transiluminador. Para evitar que se rompa durante el proceso, moje la superficie y después haga deslizar el gel.

NOTA: utilizar guantes a lo largo del proceso, evitar tocar el gel con las manos, evitar doblar y torcer el gel.

ANEXO 2. PREPARACIÓN Y MONTAJE DEL GEL DE GRADIENTE DENATURALIZANTE PARALELO

3.9.1 Preparación de soluciones gel de gradiente desnaturante al 6% de poliacrilamida.

3.9.2 Solución de acrilamida al 40%

Para 100 ml

1. Usando guantes de nitrilo y mascarilla, pesar 38g de acrilamida en polvo
2. Agregar un poco de agua destilada en un Erlenmeyer de 250 ml
3. Adicionar lentamente la acrilamida al agua, tratando de disolverla y de no perder una mínima cantidad.
4. Pesar 2g de bisacrilamida en polvo y adicionar en el mismo Erlenmeyer
5. Agregar un poco de agua al Erlenmeyer, sin que el volumen total supere los 75 ml.
6. Introducir una barra magnética y dejar en agitación por 30 minutos.
7. Una vez disuelta completamente la acrilamida, verter la solución en un balón volumétrico de 100ml y completar el volumen con agua.
8. Filtrar la solución con filtro de poro de 0.45 μ m
9. Verter en una botella de cierre hermético, protegida de la luz y almacenar a 4°C.

TABLA 6: preparación de soluciones denaturantes 0% y 100% para gel de acrilamida 6% paralelo.

REACTIVO	SOLUCIÓN DENATURANTE 0%	SOLUCIÓN DENATURANTE 100%
Solución acrilamida bis-40%	15 ml	15 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Formamida	-	40 ml
Urea	-	42g
Agua nanopura	83 ml	Llevar a 100 ml

*Cantidades para 100 ml.

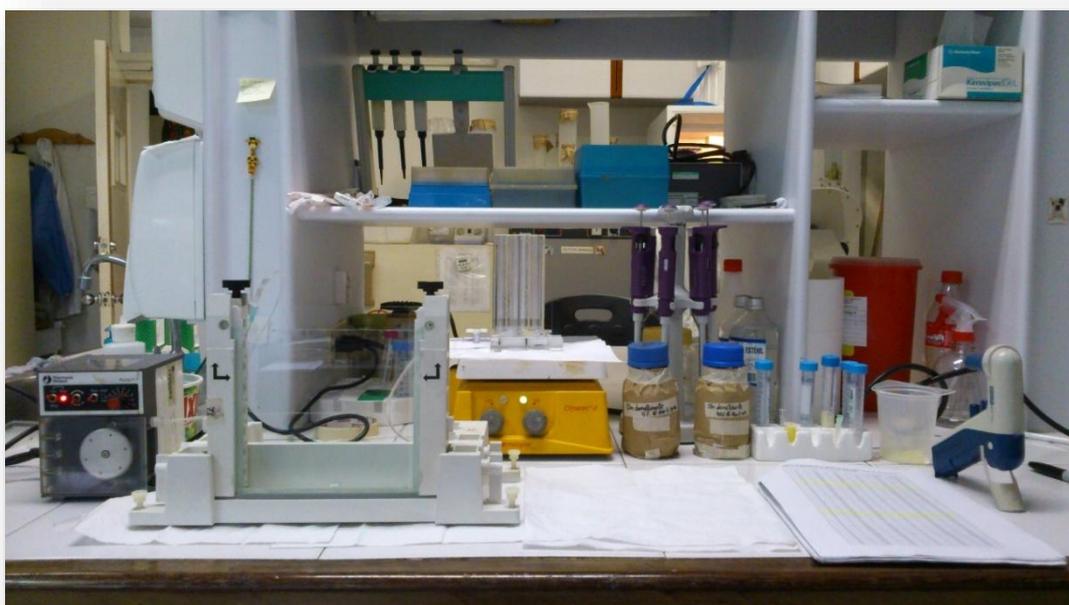
- a. Desgasificar por 15 minutos, filtrar por filtro de poro 0,45 μ m. Almacenar hasta por un mes a 4°C protegido de la luz.

NOTA: si la solución 100% se precipita, vuelva a disolverla calentándola en un baño de agua a temperatura moderada.

3.9.4 Montaje del sándwich

Lavar los vidrios y los espaciadores cuidadosamente con extrán o jabón líquido diluido. Enjuagar con abundante agua y poner a secar en un lugar fijo, sólo se debe utilizar los guantes para frotar suavemente los vidrios.

1. Limpiar los vidrios y los espaciadores con etanol 96% y asegurarse de que queden completamente limpios y secos, utilizando papel que no deje desechos ni fibras sobre el vidrio (Kimwipes).
2. Colocar el vidrio grande sobre una superficie firme y limpia (libre de grasa) como por ej: servilletas de papel.
3. Colocar los espaciadores sobre el vidrio grande procurando no moverlos de su posición para no engrasar los vidrios. Las muescas deben mirar hacia afuera.
4. Colocar el vidrio pequeño sobre los espaciadores, revisar que esté alineado con el vidrio grande, verificar que tenga una superficie regular, lisa, sin salientes. Sostener cuidadosamente y sellar los bordes con cinta de enmascarar.
5. Abrir las pinzas usando el tornillo, para proceder a insertar los vidrios.
6. Insertar los vidrios entre las pinzas y atornillar uno de los lados ligeramente. Repetir lo mismo con el otro lado, ajustar las pinzas a cada lado de los vidrios para fijar el montaje.
7. Con ayuda de un nivel verificar que el soporte se encuentra equilibrado.
8. Insertar las pinzas que sujetan los vidrios en el soporte.
9. Verificar el ajuste de los espaciadores introduciendo y sacando la tarjeta de alineación, ésta debe presentar una ligera presión pero no forzada.
10. Ajustar las pinzas del soporte haciendo presión hacia adentro y hacia abajo y apretando suavemente los tornillos, se debe tener precaución de no apretar excesivamente, ya que existe el riesgo de que se rompan las placas de vidrio.
11. El sándwich debe quedar hundido en la esponja, para sellar y afirmar los vidrios.
12. Verificar que el peine se puede insertar fácilmente entre las dos placas de vid



3.9.5 Preparación del gel de gradiente desnaturizante paralelo

1. Colocar en un agitador magnético el formador de gradiente con sus respectivas barras magnéticas, para preparar las soluciones 45% y 70% en la región LIGHT y HEAVY respectivamente, con el fin de permitir que las soluciones fluyan de mayor a menor concentración.

NOTA: las barras magnéticas deben girar a una velocidad moderada, de manera que se impida la formación de turbulencias o burbujas de aire que afecten la formación del gel.

2. El formador de gradiente debe estar conectado a través de una manguera con la bomba peristáltica, que se debe programar en 4 para que el tiempo de caída del gel al sándwich sea de 2 ml por minuto. Con esto se asegura que el gel no se polimerice en la manguera y que se distribuye de forma uniforme entre los vidrios del sándwich.
3. Tomar un tubo falcon de 15 ml y marcar como PLUG. Agregar 1.5 ml de solución 0% y adicionar 15 μ l de persulfato de amonio (APS) al 10% y 1,2 μ l de TEMED, mezclar suavemente por inversión y servir con una pipeta entre los vidrios del sándwich.
4. Esperar unos minutos hasta que ocurra la polimerización. Esta solución es utilizada con el objetivo de sellar la base del gel durante la preparación del gradiente.
5. Teniendo en cuenta la ecuación: $V_1 * C_1 = V_2 * C_2$ preparar la solución de 45% tomando 5,85 ml de solución 100% y 7,15ml de solución 0%. Preparar la solución de 70% tomando 9,1ml de solución 100% y 3,9 ml de solución 0%, obteniendo un volumen de 13 ml para cada solución y un volumen total de 26 ml que llenará el sándwich.

NOTA: agregar inicialmente 5,85 ml de solución 100% en la región B (45%) del formador de gradiente y agregar 5,85 ml de solución 100% en la región A (70%) del formador de gradiente, para asegurarse que la solución 45% pasa correctamente a la solución 70%, colocando la palanca en posición vertical y levantando ligeramente el formador de gradiente por la región B e inmediatamente devolviéndolo a su posición original y cerrando la palanca.

6. Agregar a la solución más concentrada (70%) 20 μ l de solución de tinción Dcode, seguidamente agregar 130 μ l de APS y 10,4 μ l de TEMED a cada una de las soluciones.
7. Abrir brevemente la llave del formador de gradiente para asegurar que el flujo de la solución es correcto (ambas regiones del formador de gradiente deben bajar al tiempo), si es así, abrir completamente y servir el gel en el sándwich, se debe procurar que al momento del llenado no se formen burbujas.

NOTA: se debe verificar que no existan fugas del gel por el tubo o por la cámara, si esto sucede, se debe preparar el gel nuevamente.

8. Luego del llenado exitoso del sándwich, y una vez vacías ambas regiones del formador de gradiente, quitar la aguja del sándwich, pasar a un recipiente y llenar de agua desionizada las dos regiones del formador de gradiente para realizar un lavado de las mangueras y el formador de gradiente.

NOTA: el agua residual obtenida del lavado de las mangueras y el formador de gradiente no se debe descartar por el desagüe. Se debe eliminar adecuadamente.

9. Se espera aproximadamente 1 hora hasta la polimerización, se debe evidenciar visualmente un incremento del gradiente con el aumento progresivo del color azul de la solución de tinción en el gel.
10. Limpiar y secar el formador de gradiente y mangueras.

NOTA: si el gel no se va a correr enseguida, se puede guardar a 4°C en cámara húmeda toda la noche, aunque se recomienda correr el gel el mismo día de la preparación.

3.9.6 Preparación del gel de apilamiento

1. Colocar el peine en posición central entre las dos placas de vidrio
2. Verter 5 ml de la solución denaturante 0% en un tubo falcon de 15 ml
3. Agregar a este 50µl de APS y 5µl de TEMED. Mezclar ligeramente por inversión.
4. Verter la solución de apilamiento entre las dos placas con ayuda de una pipeta.

Se debe verificar que el espacio total del peine está ocupado por la solución de acrilamida y no existen burbujas de aire. En caso de que haya burbujas, retirar el peine, eliminar las burbujas con la punta de la pipeta y ubicar de nuevo el peine.

NOTA: el nivel de acrilamida debe subir ligeramente por encima de las extremidades de las placas, sin llegar a derramarse. El volumen disminuirá ligeramente durante la polimerización.

3.9.7 Preparación de la cubeta de electroforesis

1. Verter 6.5 litros de la solución tampón TAE 1X en la cubeta de electroforesis
2. Poner el módulo de control por encima de la cubeta, asegurándose de que el eje rotativo esté bien ubicado en su envoltura.
3. Encender el equipo, ajustar la temperatura a 60°C y la tasa de incremento de temperatura al máximo (200)
4. Esperar hasta que el tampón alcance la temperatura deseada (aproximadamente 1 hora y media).

3.9.8 Preparación de los pozos y equilibrio del gel

1. Retirar el peine delicadamente
2. Lavar los pozos del gel con buffer TAE 1X, varias veces, utilizando una pipeta.

3. Colocar buffer o agua destilada en las bandas de goma que sellan el cuadro del soporte para favorecer la adhesión y disminuir los riesgos de falta de estabilidad.
4. Humedecer con buffer o agua el marco de migración para evitar fricción de este con las pinzas del sándwich en el momento de encajarlos.
5. Retirar el gel del soporte y de la esponja humedecida girando las palancas simultáneamente 180° hacia arriba y después jalando hacia el exterior.
6. Hacer resbalar las ranuras en las pinzas del sándwich sobre el cuadro de migración. Empujar con los pulgares por debajo de las pinzas, hasta que se escuche un clic. Mantener el ángulo entre el sándwich y el soporte para evitar que el vidrio dañe los empaques blancos. Si los sándwiches no quedan bien ajustados contra el soporte, no se formará un espacio que contiene buffer y la electroforesis no correrá.
7. Revisar que la placa más grande sea la más próxima a usted y que las pinzas estén bien apretadas y estables, ya que si no se sujeta la parte baja al mismo nivel de las pinzas, las placas de vidrio pueden moverse y el montaje perdería estabilidad.
8. Juntar dos placas de vidrio sin espaciadores y sujetarlas con las pinzas de sándwich. Colocar este montaje en el lado contrario del marco de migración. NOTA: no olvidar humedecer las partes previamente al contacto.
9. Apagar el elemento calentador y posteriormente el equipo desde el módulo de control. Esperar un minuto antes de levantar la tapa y depositarla sobre su base, ya que el eje de cerámica es muy frágil y podría romperse por el cambio de temperatura.
10. Poner el marco de migración con el gel en la cubeta de electroforesis. NOTA: el cuadro se debe colocar con el punto rojo a la derecha de la cubeta, de lo contrario no entra.
11. Colocar nuevamente la tapa con el controlador de temperatura sobre la cubeta de electroforesis. NOTA: se debe tener mucho cuidado con el elemento calentador, ya que puede chocarse con las paredes de la cubeta y romperse.
12. Encender la bomba y revisar: que el buffer sea dirigido por encima del gel en la cámara y toque el electrodo y que el espacio que se forma entre los dos sándwich permanezca lleno con buffer.
13. Si no se llena la cámara por encima del gel, se debe a falta de estabilidad del montaje. En ese caso debe verificar que las placas de vidrio no se hayan movido y que no haya fugas de buffer, sacando el marco de migración sobre una superficie plana y llenando la cámara con agua.
14. Si todo está bajo control, deje que se equilibre el gel en el tampón hasta que se vuelva a alcanzar la temperatura deseada (60°C).

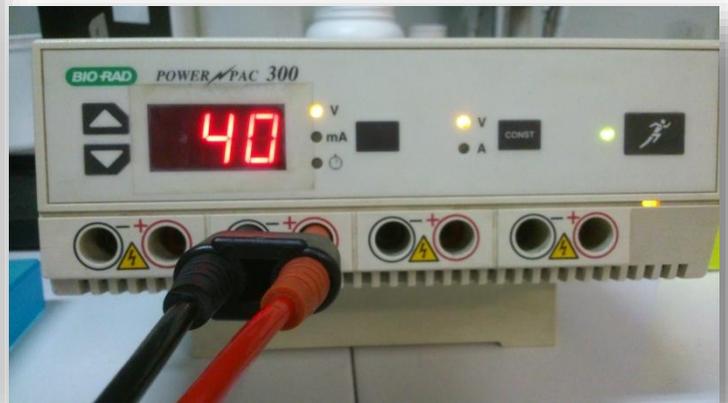
3.9.10 Carga de muestras y electroforesis

Es importante que las muestras de ADN que se vayan a cargar hayan sido previamente purificadas y comprobadas en un gel de agarosa.

NOTA: la cantidad de ADN a cargar depende del gradiente de concentración del gel, de la muestra y del tipo de tinción que se realizará. Se debe evitar cargar en exceso debido a

que esto genera ruido y hace que muchas bandas sean indetectables. Se cargan entre 20-50 μ l que equivalgan por lo menos a 400ng de DNA (producto de PCR).

En el presente estudio se sembró 25 μ l de muestra que corresponden a 300 ng de ADN, de 5 monos *Aotus vociferans*, previamente cuantificados. Se utilizó como marcador de peso molecular Hyperlader II e Hyperlader V, se corrió el gel por 15 horas (900 minutos) a un voltaje de 40V.



3.9.11 Tinción del gel con SYBR Gold.

1. Apagar la fuente de tensión eléctrica y el aparato Dcode. Esperar 5 minutos.
2. Colocar delicadamente la tapa en su base.
3. En un recipiente de plástico o de vidrio que pueda contener el gel, llenar con 150 ml de solución tampón TAE 1X previamente utilizada en la corrida, agregar 5 μ l de SYBR gold y proteger de la luz.
4. Remover el sándwich del marco de migración. Desatornillar las pinzas y ponerlas de lado.
5. Delicadamente levantar un espaciador (no muy alto) hasta que el gel se desprege de la placa más pequeña.
6. Dejando el gel sobre la placa más grande, coloque la placa con el gel dentro del recipiente llenado previamente 150 ml de TAE 1X utilizado en la corrida y mover con cuidado la placa para que el gel se desprege y se pueda recuperar posteriormente. Esperar unos minutos.
7. Teñir durante 10 minutos con agitación lenta.

8. Sacar la foto bajo la luz UV (254nm) en el transiluminador. Para evitar que se rompa durante el proceso, moje la superficie y después haga deslizar el gel.

NOTA: utilizar guantes a lo largo del proceso, evitar tocar el gel con las manos, evitar doblar y torcer el gel.