



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Diseño de un protocolo de PCR-HRM para el diagnóstico de las dos variantes del Adenovirus canino tipo I en la población de lobos de Asturias.

Oviedo, julio, 2021.

Alumno: Iris Domingo Alonso.

Tutores: Luis José Royo Martín, Ana Belén Soldado Cabezuelo.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
1 Introducción.....	2
1.1 Antecedentes	2
1.2 Adenovirus canino	2
1.2.1 Adenovirus canino tipo I	2
1.2.2 Adenovirus canino tipo II:	3
1.3 Necesidad de identificación y métodos	4
1.4 PCR (Polimerase Chain Reaction)	4
1.4.1 Fundamento	4
1.4.2 Funcionamiento de la reacción.....	6
1.5 Estrategias PCR para la detección de una mutación	8
1.5.1 PCR en tiempo real alelo-específica (AS-PCR)	8
1.5.2 PCR a tiempo real con sondas TaqMan.....	9
1.5.3 PCR basada en la técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)	10
1.5.4 PCR basada en la técnica de Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (PCR-SSCP)	10
1.5.5 Single-Base extensión (SBE).....	11
1.5.6 Técnicas de Secuenciación de ADN.....	11
1.5.7 High Resolution Melting (HRM).....	14
2 Objetivo	16
3 Material y métodos	17
3.1 Materiales, reactivos e instrumentación	17
3.2 Muestras	18
4 Resultados y discusión.....	19
4.1 Selección del método de PCR.....	19

4.2	Estudio y detección de la Secuencia asociada a la mutación.....	20
5	Desarrollo de la propuesta metodológica	23
5.1	Diseño de los cebadores (primers).....	23
5.2	Diseño de protocolos HRM	24
5.3	Puesta a punto de la PCR-HRM	26
5.4	Selección del método PCR-HRM.....	27
5.5	Optimización de la concentración de primer para llevar a cabo el método PCR-HRM 1. 31	
6	Validación de la metodología propuesta.....	34
7	Evaluación de los resultados.....	35
8	Conclusiones.....	37
9	Bibliografía.....	38

Resumen

El Adenovirus Canino tipo I (CAv-1), responsable de la Hepatitis Canina Infecciosa (HIC), es una de las enfermedades más comunes entre mamíferos, más concretamente entre animales salvajes, ya que la prevalencia de este virus entre animales domésticos ha disminuido gracias a la vacunación. Es por ello que, el oso pardo, especie en riesgo en la región de Asturias, se ha visto afectado por este virus. Con el objeto de estudiar la procedencia de este virus, se muestreó ADN procedente de diferentes lobos de la región, lo cual dio como resultado el descubrimiento de una mutación en una base nucleotídica en el CAv-1.

Atendiendo a estas consideraciones, en este Trabajo fin de Máster, se ha desarrollado un protocolo de PCR-HRM (*Polymerase Chain Reaction - High Resolution Melting*) con el objetivo de ser capaces de diagnosticar las dos variantes del CAv-1 en muestras de ADN extraído del bazo de diferentes lobos de la región. Para ello se desarrollaron diferentes protocolos a partir del diseño de *primers* específicos para el segmento de la secuencia en la que se encuentra la mutación.

Como resultado se obtuvo un método de análisis capaz de diferenciar la mutación del virus CAv-1. El protocolo desarrollado se aplicó al análisis de veinte lobos, de los cuales, mediante técnicas de referencia (secuenciación), se había encontrado que dos eran positivos en la mutación del CAv-1. Ambos lobos eran procedentes del mismo concejo de Asturias, Tineo, es por ello que, se puede suponer que esta mutación ha sido transmitida entre diferentes animales de la zona.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos mediante PCR-HRM, se realizó la secuenciación de la muestra de ADN que poseía la mutación, confirmando así que los resultados obtenidos con la metodología propuesta eran satisfactorios. Por tanto, aunque la secuenciación es la técnica de referencia, que mejores resultados aporta, ésta supone un coste elevado, que puede ser suplido por la PCR-HRM.

1 Introducción

1.1 Antecedentes

El Adenovirus Canino (CAvV) ha sido desde hace años una amenaza para diversos mamíferos. En el norte de España, entre Asturias y Castilla y León se encuentran los osos pardos, muy característicos de la zona, la cual es una especie amenazada, por ello, desde los años noventa se ha vigilado su mortalidad y la causa. Esta vigilancia ha permitido detectar que algunos individuos eran positivos en la Hepatitis Canina Infecciosa (HIC), enfermedad de la cual es causante el virus CAvV-1 (García Marín et al., 2018). Esta enfermedad no solo afecta a estas especies, sino que es muy común en todo tipo de mamíferos, especialmente en los lobos de la región, por ello, se estudió el ADN procedente de diferentes lobos, con el objeto de determinar si los responsables de la transmisión de este virus a los osos eran los lobos. Mientras se llevaba a cabo el estudio sobre la presencia del virus CAvV-1 en lobos, se detectó una nueva variante de este virus en la población de lobos de Asturias.

1.2 Adenovirus canino

El Adenovirus canino (CAvV), es un virus que afecta a diversos mamíferos y que pertenece al género *Mastadenovirus*, de la familia *Adenoviridae*. Se pueden encontrar dos tipos de Adenovirus canino, distinguibles en sus factores genéticos, antigénicos y características patogénicas (García Marín et al., 2018).

1.2.1 Adenovirus canino tipo I

El Adenovirus canino tipo 1 (CAvV-1) es el causante de la hepatitis canina infecciosa (HIC), la cual tiene homogeneidad serológica mundial y guarda similitudes inmunológicas con los adenovirus humanos. CAvV-1 afecta a numerosos mamíferos, principalmente a perros, zorros, lobos, osos e incluso se han llegado a encontrar mamíferos marinos afectados por este virus (Greene, 2006). Por tanto, se trata de una de las enfermedades más graves en animales jóvenes, entre los que la transmisión se produce por contacto directo o a través de la orina, heces o saliva (Decaro et al., 2008).

El periodo de incubación de este virus puede llegar hasta los 9 días después del contacto, produciendo síntomas como pueden ser fiebres altas, anorexia, dolor abdominal, sangre en las heces, vómitos o diarrea (Bulut et al., 2013; Decaro et al., 2008). Aunque se caracteriza principalmente por hepatitis necro hemorrágica y edema corneal o “blue eye” que suelen aparecer entre la primera y tercera semana después de la recuperación (Balboni et al., 2014; Decaro et al., 2008).

Este virus es posible aislarlo a partir de todos los tejidos corporales del individuo, así como de las secreciones durante la fase más aguda de la enfermedad (Greene, 2006). Además, tras la recuperación, el virus persiste en los riñones de los animales que contrajeron la enfermedad, por lo que es posible que el virus se elimine con la orina durante los meses posteriores a la recuperación. Aunque la vacunación a los animales domésticos en países desarrollados ha disminuido la circulación del CAdV-1, éste sigue siendo una amenaza para algunas especies salvajes susceptibles a dicha enfermedad, pudiendo provocarles incluso la muerte (Balboni et al., 2014; Decaro et al., 2008; Oleaga et al, 2021).

CAdV-1 es altamente resistente ya que es capaz de resistir meses en el medio ambiente, lo que facilita la transmisión entre especies. Incluso es resistente a condiciones extremas, ya que su eliminación utilizando compuestos químicos, como lo pueden ser el cloroformo o el éter, no es efectiva, e incluso puede ser estable a exposiciones de luz ultravioleta. Por otro lado, este virus no es resistente a temperaturas superiores a 50°C, y en el caso de que se quiera realizar una desinfección efectiva sería conveniente el uso de productos cáusticos (Decaro et al., 2008; Greene, 2006).

1.2.2 *Adenovirus canino tipo II:*

Muy relacionado con el CAdV-1, se puede encontrar el Adenovirus canino tipo 2 (CAdV-2), que se asocia principalmente a enfermedad de tipo respiratoria, ya que es el causante de la conocida tos de las perreras. Aunque también está relacionado con problemas neurológicos y diarreas, que en algunos casos puede llegar a producir la muerte. Al igual que ocurre con el CAdV-1, en los últimos años ha disminuido la transmisión de este virus debido a la vacunación de los animales domésticos. Estas vacunas se basan principalmente en la utilización de cepas atenuadas del CAdV-2, ya que también protegen de forma cruzada contra el CAdV-1 (Chander et al. 2021; Dowgier et al., 2018).

1.3 Necesidad de identificación y métodos

Como se ha mencionado anteriormente, las enfermedades adenovirales entre animales domésticos están controladas gracias a la vacunación, pero éstas siguen siendo una amenaza para algunos animales salvajes. Es por eso por lo que en Asturias se investiga la prevalencia de dicha enfermedad entre lobos en libertad, con el fin de conocer la amenaza que esto supone para esta especie y muchas otras, como puede ser el oso pardo cantábrico, ya que a nivel internacional está catalogado como especie en extinción, incluido en la Lista Roja de Especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Balseiro et al., 2021).

Entre las técnicas más ampliamente utilizadas para el estudio de ADN se encuentran las técnicas moleculares basadas en la PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A continuación, se mostrarán las diferentes posibilidades que esta técnica brinda, para poder estudiar el ADN viral de las diferentes muestras de lobos salvajes procedentes de distintas localizaciones de Asturias, con el objetivo de detectar las posibles variantes de los virus.

1.4 PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue diseñada en el 1983 por el bioquímico americano, Kary Mullis, el cual recibió el Premio Nobel en el año 1993. La PCR es una técnica dentro de la biología molecular altamente específica, que se basa en conseguir millones de copias de una secuencia en particular de ADN, y se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas debido a su rapidez, sencillez y bajo costo. También cabe destacar que no se requiere una gran cantidad de ADN para que la replicación se lleve a cabo (Joshi & Deshpande, 2011; Kadri, K., 2019). Hoy en día forma parte del trabajo rutinario de muchos laboratorios dentro de la investigación para el genotipado, detección de patógenos, expresión genética y análisis de mutaciones (Tamay de Dios et al., 2013).

1.4.1 Fundamento

El principio básico de la PCR es la réplica exponencial de un fragmento de ADN durante sucesivos ciclos, gracias a una reacción enzimática que se produce *in vitro* y que da lugar a millones de copias. Esto se consigue gracias a la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar el ADN celular (Tamay de Dios et al. 2013). Para ello es necesario que en el medio de reacción estén presentes las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G)

y Citosina (C), para que así la ADN polimerasa una las bases complementarias en función de la hebra molde (Joshi & Deshpande, 2011). Cabe destacar que también es posible llevar a cabo una PCR a partir del ARNm (Ácido Ribonucleico Mensajero), la cual es conocida como RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), ésta se consigue gracias a que previamente se hace una transcripción reversa, que se logra con la enzima transcriptasa reversa, transformando primero el ARNm en una molécula de ADN (Tamay de Dios et al., 2013).

1.4.1.1 Elementos de reacción

El elemento principal en una PCR es el ADN, el cual está formado por: un grupo fosfato, un azúcar (desoxirribosa, o ribosa en el caso del ARN) y una base nitrogenada (A, T, G y C) complementaria a la correspondiente de la otra hebra (Tamay de Dios et al., 2013).

Tal y como se puede observar en la *Figura 1* la doble hélice que forma la molécula de ADN está unida por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que se generan por complementariedad de las bases A=T y C≡G. Y debido a los grupos fosfato que la molécula posee, su carga eléctrica es negativa (Tamay de Dios et al., 2013).

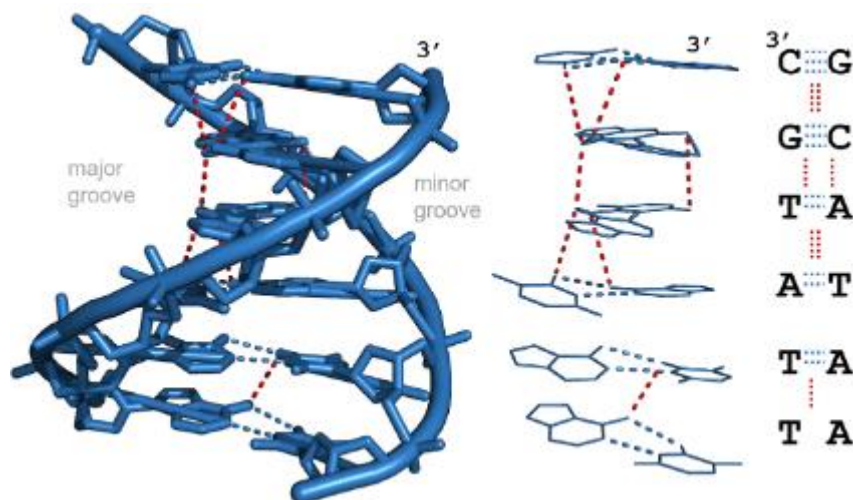


Figura 1. Estructura de la doble hélice de ADN. Las líneas discontinuas representan los puentes de hidrógeno que unen las cadenas simples de ADN (Savelev & Myakishev-Rempel, 2020).

Por otro lado, uno de los elementos más importantes para que se lleve a cabo una PCR es la presencia de una ADN polimerasa, siendo la más ampliamente utilizada la *Thermus aquaticus* (*Taq*) ADN polimerasa debido a su resistencia a altas temperaturas. Gracias a esta condición que la caracteriza, cabe esperar que no se inactivará durante el proceso de desnaturalización de la doble hélice del ADN y, por lo tanto, mantiene su funcionalidad a pesar de los cambios bruscos de temperatura que conlleva el proceso de una PCR (Ishino & Ishino, 2014).

Finalmente, para que la reacción se lleve a cabo es necesario que el medio de reacción se encuentre, a parte del ADN molde y de la enzima ADN polimerasa, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados) que son los nucleótidos (A, T, G y C) que sirven para generar nuevas cadenas de ADN, el ion magnesio (Mg^{2+}), que actúa como cofactor enzimático de la reacción, una disolución buffer (pH=8), agua, y, por último, pero no menos importante, el *primer* o cebador (Tamay de Dios et al., 2013; Joshi & Deshpande, 2011).

El *primer* consiste en una secuencia específica de bases nitrogenadas, complementaria a la hebra molde, y para que se lleve a cabo la replicación en la PCR es necesario diseñar dos *primers* que comprendan el fragmento que interesa replicar. Estos dos *primers* son llamados *forward* o *down* y *reverse* o *up*, y ambos se hibridan con cada una de las hebras molde, de modo que la *Taq* ADN polimerasa amplíe la cadena en el sentido 5'-3'. La especificidad de la reacción viene dada por el rendimiento de esta enzima el cual se puede ver afectado por las concentraciones de los reactivos anteriormente mencionados (Mg^{2+} y dNTPs) (Tamay de Dios et al., 2013; Joshi & Deshpande, 2011).

1.4.2 Funcionamiento de la reacción

La técnica PCR involucra principalmente tres etapas: desnaturalización, hibridación o *annealing* y extensión, las cuales vienen representadas en la *Figura 2*. En primer lugar, durante la desnaturalización, la temperatura se aumenta a unos 90-95°C, temperatura a la que ocurre la apertura de las cadenas de ADN, de modo que se obtendrán las hebras o moldes de ADN, a partir de los cuales se producirá la replicación. A continuación, se baja la temperatura para permitir que ocurra la hibridación, etapa en la que los *primers* se unen a los moldes por complementariedad de bases. Durante esta etapa la temperatura oscila entre 50-60°C. Por último, a una temperatura de 72°C se produce la extensión de la cadena en el sentido 5'-3' gracias a la actuación de la *Taq* ADN polimerasa, agregando los dNTPs complementarios al molde, hasta obtener cadenas de ADN completas. Este ciclo se repite entre 25-30 veces, las suficientes para que el proceso de PCR genere un número de copias de ADN suficientes para obtener resultados fiables (Tamay de Dios et al., 2013; Joshi & Deshpande, 2011).

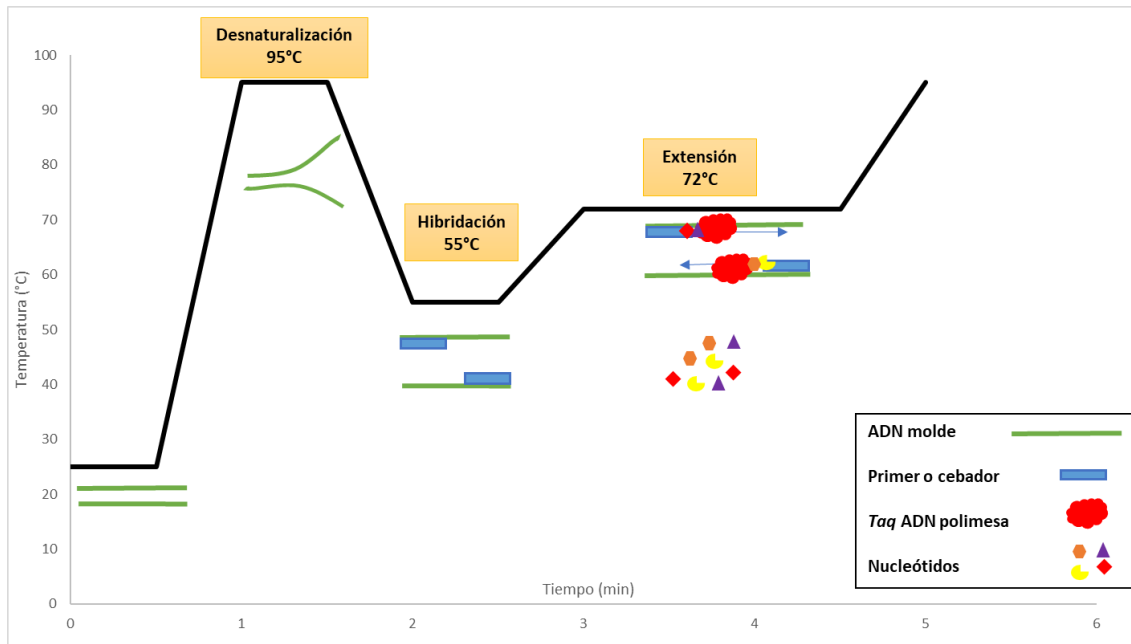


Figura 2. Etapas de un ciclo de PCR.

El producto final de una PCR, normalmente se somería a una electroforesis en gel, para que posteriormente el gel se tiña con un colorante fluorescente como puede ser el bromuro de etidio (EtBr), y éste se pueda observar utilizando luz ultravioleta. Sin embargo, con este modo de detección solo se puede obtener información cualitativa. Es por eso que hoy en día, los equipos utilizados, permiten monitorizar todo el proceso, de modo que la reacción y la detección sucedan en un mismo tubo o placa. A partir de esto se han diseñado diferentes métodos de detección asociados a la fluorescencia que se genera durante la reacción, de este modo, la información obtenida no sería cualitativa, sino que también se aportaría información cuantitativa (Matsuda, 2017).

La emisión de fluorescencia puede darse a partir de métodos no específicos, como lo son moléculas intercalantes, que producen fluorescencia cuando se encuentran entre las cadenas de una doble hélice de ADN, o bien la más ampliamente utilizada es SYBR Green. El SYBR Green es un compuesto fluorescente que se une inespecíficamente al ADN, y que se excita a $\lambda = 488 \text{ nm}$ y emite radiación fluorescente a $\lambda = 522 \text{ nm}$.

Otras alternativas de detección fluorescente son los métodos específicos, que se basan en la emisión de fluorescencia producida por una sonda en función al fragmento replicado (Tamay de Dios et al., 2013).

1.5 Estrategias PCR para la detección de una mutación

Tal y como se ha mencionado anteriormente, mediante las estrategias de PCR convencionales somos capaces de identificar una secuencia de ADN, sin embargo, para llevar a cabo el diagnóstico de dos variantes de un adenovirus como, el Adenovirus canino tipo I en la población de lobos de Asturias, es necesario utilizar metodologías basadas en PCR capaces de detectar una mutación en una secuencia de ADN. Detectar variaciones que comprendan solamente un nucleótido, requiere el uso de técnicas con una alta sensibilidad, que sean capaces de diferenciar la sustitución de un nucleótido en concreto (Matsuda, 2017).

1.5.1 PCR en tiempo real alelo-específica (AS-PCR)

La PCR en tiempo real específica para cada alelo (AS-PCR) está diseñada para detectar polimorfismos de una sola base. En ésta se llevan a cabo dos reacciones PCR (*Polymerase Chain Reaction*) simultáneas. Para ello es necesario diseñar tres tipos de *primers* o cebadores, el *primer Reverse* que es común a ambas secuencias, tanto a la de tipo salvaje o *wild type (wt)* como a las secuencias mutadas (*mut*), correspondiente a la región no alterada, y un *primer Forward* específico para cada secuencia (*wt* y *mut*), de modo que éste último debe incluir en el extremo 3' el polimorfismo puntual, es decir, el nucleótido variado en ambos alelos. Cabe destacar que, para el caso del *primer* específico para el alelo mutado, éste tiene una longitud mayor, con el objeto de aumentar la selectividad del proceso (Figueredo-Lago et al., 2015; Renaud et al., 2010).

El genotipo de cada alelo es determinado en base a la comparación de los valores del ciclo de amplificación (C_t). Éste indica el número de ciclos necesarios para que al realizar una PCR a tiempo real se obtenga un nivel detectable. De modo que comparando el C_t de cada alelo (*wt* y *mut*) se puede conocer si en la muestra están presentes las dos variantes, en el caso de que se obtengan C_t similares, o si hay una sola, que en este caso se conocería comparando los valores resultantes (Figueredo-Lago et al., 2015; Sedano et al., 2016).

Además de ser una técnica relativamente sencilla, ésta se puede realizar en un solo tubo, obteniendo los resultados a tiempo real, sin necesidad de utilizar otro método para la verificación final de los resultados. Sin embargo, cabe destacar que, a diferencia de otras técnicas, es necesario el diseño de tres *primers* específicos, uno común para las dos secuencias, y otro específico tanto para la secuencia mutada, como para la *wild type* (Toye, et al., 2018).

1.5.2 PCR a tiempo real con sondas TaqMan

La utilización de sondas TaqMan como método de emisión fluorescente, es uno de los métodos específicos más ampliamente utilizados. Este se basa en una sonda fluorescente formada por un fluoróforo y un *quencher*, que hibrida a la secuencia de interés. De modo que cuando la ADN polimerasa actúa, ésta rompe la unión entre ambos, dando lugar a la liberación de fluorescencia (Tamay de Dios et al. 2013).

La PCR con sondas TaqMan exige diseñar los *primers* específicos para la región genómica de interés, así como las sondas TaqMan para cada segmento. Cada sonda TaqMan poseerá un fluoróforo y un *quencher* específico, de modo que cuando se produzca la replicación del alelo *wild type* o del mutado, la señal detectada será característica de cada uno. Esto permite conocer que variante de la secuencia se encuentra en cada medio de reacción (Torres-Caballero, et al., 2020).

Este método también se puede combinar con la PCR alelo específica para detectar mutaciones. Para ello, tal y como se muestra en la *Figura 3*, se basa en generar una reacción competitiva entre el *primer* específico del alelo que presenta la mutación y el *primer* específico al alelo *wild type* (no mutado). Este último presenta un olinucleótido que bloquea la replicación de este alelo, de modo que la amplificación solo ocurrirá a partir del alelo mutado (Pinilla et al., 2008).

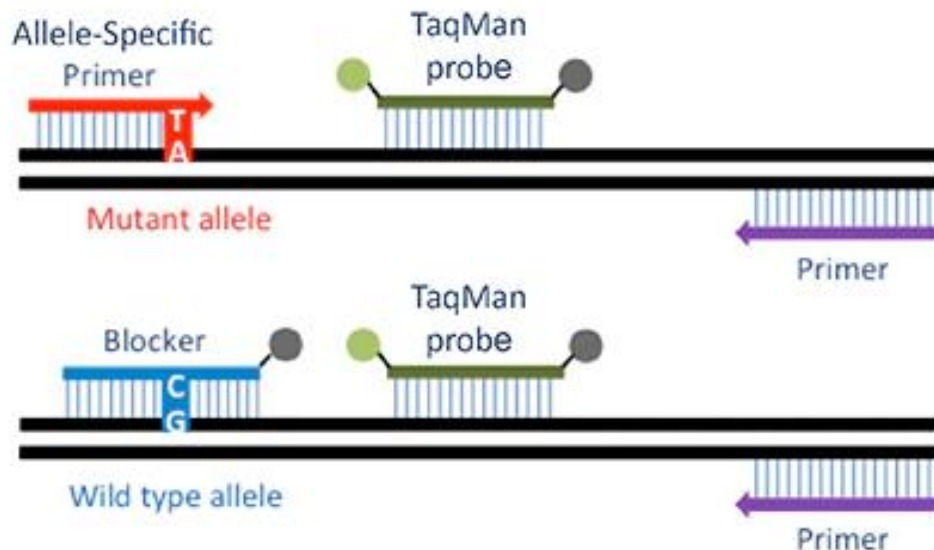


Figura 3. Esquema del funcionamiento de una PCR utilizando sondas TaqMan combinadas con primers alelo específicos. Arriba, se puede observar la amplificación del alelo mutado, mientras que abajo se observa la unión del primer específico al alelo wild type, que posee un olinucleótido bloqueador que impide su amplificación. Imagen extraída de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.

1.5.3 PCR basada en la técnica de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

La técnica molecular PCR-RFLP (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basa en la combinación de la PCR con la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Es decir, en primer lugar, se producirá una PCR común, dando lugar a la replicación de las secuencias de ADN de interés, habiendo diseñado los *primers* específicos para ello. Posteriormente se realiza una digestión con enzimas de restricción, encargadas de romper la secuencia de ADN cuando se encuentre una secuencia en concreto. Es decir, la enzima podrá romper los enlaces fosfodiéster a partir de una secuencia que reconoce, la cual puede involucrar el nucleótido mutado. Finalmente, los resultados se observan realizando una electroforesis en gel, en la que se pueden ver las bandas de los diferentes fragmentos, en función al tamaño de cada uno (Hashemi et al., 2020; Yao, et al., 2020).

La característica más destacable de esta técnica es su sencillez, además de que aporta una buena reproducibilidad. Pero, por el contrario, comparada con aquellas cuya detección es a tiempo real, puede resultar un método más tedioso de aplicar. Entre las principales limitaciones de esta metodología, cabe destacar la necesidad de obtener una enzima de restricción específica para cada secuencia, además de que la metodología se complica si se pretende detectar más de una mutación simultánea. Esto podría solucionarse realizando sucesivas digestiones con la enzima de restricción, pero supondría un aumento tanto en la complejidad del análisis como en el coste del mismo (Hashim & Al-Shuhaib, 2019; Yao, et al., 2020).

1.5.4 PCR basada en la técnica de Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (PCR-SSCP)

La PCR-SSCP, llamada así por sus siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction Single Strand Conformation Polymorphism*, se basa en que los productos resultantes de una PCR convencional son analizados utilizando un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Se basa en diferenciar la conformación que adquiere la molécula simple de ADN en función de la cadena nucleotídica que ésta posea. Para que esto ocurra, primeramente, se deben fusionar las moléculas de ADN para que estén en forma de cadena simple. De este modo las cadenas tienden a plegarse bajo condiciones no desnaturizantes, favoreciendo los enlaces intramoleculares, que resulta en que cada cadena simple adquiera una conformación característica. La conformación dependerá directamente de la secuencia, por lo que el cambio de una sola base provoca una conformación

diferente. Esta diferencia de conformaciones puede ser detectada según la migración electroforética en gel, permitiendo así detectar variaciones entre secuencias, o lo que es lo mismo, detectar mutaciones entre secuencias de ADN (Estrada-Cuzcano, et al., 2005; Hashim & Al-Shuhaib, 2019).

Aunque se trata de una técnica sencilla, económica y versátil, cabe destacar que las condiciones y la composición del gel utilizado para la electroforesis deben ser optimizados en función de la muestra a analizar (Estrada-Cuzcano, et al., 2005).

1.5.5 *Single-Base extensión (SBE)*

Es un método muy utilizado en ciencias forenses para detectar mutaciones de una sola base. Consiste en realizar un ensayo utilizando un sistema *multiplex*, el más conocido es el *SNaPshot*® (*Thermo Fisher Scientific*). Para ello se requiere de un *primer* que se hibride a la secuencia de ADN, pero cuyo extremo terminal 3' se encuentre en la base nucleotídica adyacente a la mutación que se quiere detectar (Mehta, et al., 2017). De modo que la extensión es de una sola base después del cebador con un nucleótido marcado con un fluoróforo. Este proceso ocurre tras una PCR inicial enfocada en la región en la que se encuentra la mutación. La detección se realiza mediante electroforesis capilar (CE), pero ésta, está limitada por el número de marcadores que se puedan utilizar en una misma PCR, y cuyos espectros de emisión no se vean solapados, con el objeto de diferenciar diferentes mutaciones en una única muestra.

Además, *SNaPshot* es un proceso que requiere diversas etapas que se realizan por separado en diferentes tubos, lo que aumenta el riesgo de contaminación. Por tanto, aunque se trate de una técnica que aporta resultados fiables, existen otras técnicas cuyo rendimiento es mucho mayor, permitiendo analizar diferentes mutaciones simultáneamente (Daniel et al., 2015).

1.5.6 *Técnicas de Secuenciación de ADN*

La secuenciación permite conocer el orden de nucleótidos de una secuencia de ADN para ello se requiere de un *primer* que se hibride al molde de ADN, a partir del cual la ADN polimerasa sintetizará desde su extremo 3' la cadena complementaria. A medida que se unen los nucleótidos, éste se une gracias al enlace fosfodiéster que se produce entre el grupo 3'-hidroxilo y el grupo 5'-fosfato de dos nucleótidos adyacentes. Por tanto, la secuenciación se basa en la unión de nucleótidos complementarios hasta que la secuenciación se detiene debido a la

incorporación de un ddNTP (didesoxinucleótido), el cual carece del grupo 3'-hidroxilo, evitando así la unión del siguiente nucleótido.

El método de secuenciación ideado por Sanger en un principio se basaba en realizar cuatro reacciones diferentes para la A, T, G y C, utilizando en cada una de ellas la proporción adecuada de dNTPs y de ddNTP correspondiente. Como resultado de cada reacción, se obtienen fragmentos de diferentes longitudes terminados en todas las posiciones de uno de los cuatro nucleótidos por separado. Por tanto, todos los fragmentos resultantes tendrán en el extremo 5', el cebador que comenzó la elongación, mientras que en el extremo 3' tendrán el ddNMP característico de cada una de las reacciones. Finalmente, el producto de cada reacción se introduce por separado en un gel de poliacrilamina, y tras la electroforesis los fragmentos son separados en función a su tamaño, con una diferencia entre ellos de tan solo una base. El patrón de bandas de las cuatro reacciones en conjunto da lugar a la lectura de la secuencia de la molécula de ADN (Shendure, et al., 2011).

Sin embargo, la evolución de la tecnología ha posibilitado el diseño de diferentes métodos que permiten la automatización de todo el proceso. Para ello, se utilizan ddNTPs modificados con un marcador fluorescente específico para cada nucleótido, de modo que la unión aleatoria de estos didesoxinucleótidos al molde de ADN producirá una señal fluorescente específica. En la *Tabla 1* se recogen las características, ventajas y limitaciones de los diferentes métodos de secuenciación ordenados de acuerdo a su evolución, desde los de primera generación hasta los más actuales, considerados como cuarta generación (Niedringhaus, et al., 2011).

Tabla 1. Evolución de los Métodos de secuenciación: características (Adaptado de Niedringhaus, et al., 2011).

Generación	Método de secuenciación	Método de detección	Longitud de lectura (bases)	Ventajas	Desventajas
Primera	CE-Sanger	Óptico/Fluorescente	600-1000	Largas longitudes de lectura, alta precisión.	Bajo rendimiento, alto coste de preparación de las muestras.
Segunda	SOLiD	Óptico/Fluorescente	25-35	Mayor rendimiento que la primera generación, menor coste de reactivos.	La lectura de secuencias cortas supone un aumento en el coste del instrumento a utilizar, preparación de muestras complicada.
Tercera	A tiempo real, Hibridación sonda-anclaje (cPAL)	Óptico/Fluorescente	10-1000	Menor tiempo de secuenciación, mayor rendimiento y menor coste de reactivos.	Alto coste del instrumento, preparación de muestras complicada.
Cuarta	Secuenciación de nanoporos	Actual	Todavía no se ha cuantificado	Bajo coste de producción de nanoporos, no se requiere el etiquetado fluorescente ni la óptica.	Difícil fabricación del equipo, difícil lectura de los diferentes fragmentos de ADN.

1.5.7 High Resolution Melting (HRM)

La técnica HRM es ampliamente utilizada para la detección de mutación, gracias a su sencillez y fiabilidad en los resultados. Se trata de una técnica post PCR que se puede realizar en el propio termociclador, por lo que aporta una detección a tiempo real, que la mayoría de las técnicas previamente comentadas no pueden ofrecer. Se basa en aplicar un programa de temperatura controlado una vez finalizada la PCR. Para cada amplicón o fragmento de ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa se definen las Curvas de Melting, en las que se representan las variaciones en la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura y se obtiene la Temperatura de Melting (T_m) específica, que representa la temperatura de desnaturalización de la secuencia genética. Esta T_m se define como la temperatura a la cual el 50% del ADN es monocatenario (Roy, et al., 2019; Silva, 2018).

Para seguir el proceso asociado a la Curva de Melting, es necesario utilizar un marcador fluorescente que se intercale entre las cadenas de ADN, de modo que se observa una disminución de la intensidad fluorescente al aplicar un incremento de temperatura, debido a que el ADN pasa de estar en forma de doble hélice (fluorescencia activa) a estar en forma de hélice sencilla (no fluorescente). Más aún, es posible determinar cambios mínimos en la T_m , lo suficientemente específicos y sensibles como para diferenciar la variación de un solo nucleótido en una secuencia (Ibarrondo et al., 2019; Słomka et al., 2017). La detección no se ve limitada por la mutación que se puede encontrar en la cadena, ya que no requiere de sondas específicas para la secuencia. Es decir, se diseñan los *primers* específicos para el fragmento diana en el que se encuentra la mutación, y en función de las bases nucleotídicas que formen esa cadena, existirá una variación en la T_m que será detectable (Roy, et al., 2019; Yang, et al., 2019).

El software que se utiliza para la PCR-HRM es capaz de comparar las curvas de melting, y analizar la variación de la intensidad de fluorescencia con la temperatura, para obtener similitudes o diferencias entre las muestras analizadas. En la mayoría de los casos, para evaluar los resultados obtenidos, suele ser más útil llevar a cabo la comparación de la primera derivada de la variación de fluorescencia respecto a la temperatura, ya que el máximo de la derivada de las curvas de melting representa claramente la T_m específica para la secuencia estudiada. Sin embargo, no permite la comparación cuantitativa de las diferencias, es decir, que la información que se obtiene es simplemente cualitativa (Ibarrondo et al., 2019).

Entre las características que más favorecen a esta técnica se encuentra el alto rendimiento que aporta, bajo coste y sencillez de manejo (Yang, et al., 2019). Además de tratarse de una técnica totalmente automatizada, ya que el proceso se realiza en un único tubo, sin

necesidad de utilizar otra técnica o modo de detección. El mayor limitante es que se necesita añadir en cada prueba muestras control de los diferentes genotipos que se van a diferenciar, es decir, para que el software que se utiliza para analizar los resultados sea capaz de identificar las diferentes variantes, es necesario que al menos una muestra sea conocida para que se asocien las diferencias o similitudes con esta misma (Er et al., 2009).

2 Objetivo

En vista a lo anteriormente descrito, en este trabajo se pretende diseñar un protocolo de PCR con el que se puedan detectar las dos variantes del Adenovirus canino tipo I (CAV-1) en la población de lobos de Asturias. Para ello, será necesario realizar las siguientes actividades:

- Diseñar la secuencia nucleotídica capaz de detectar la variación genética asociada a la mutación de virus.
- Evaluar haciendo uso de la técnica “*High Resolution Melting*” la posibilidad de identificar la mutación de una sola base.
- Verificar los resultados obtenidos mediante la secuenciación de la muestra de lobo analizada.

La consecución de este objetivo permitirá desarrollar una metodología de análisis capaz de identificar la presencia de la mutación en los diferentes lobos muestreados en Asturias.

3 Material y métodos

3.1 Materiales, reactivos e instrumentación

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizó el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™, y la estrategia de análisis basada en PCR-HRM. Para ello es necesario disponer de una gradilla con tubos para PCR de 0,1 mL.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción fueron los siguientes:

- *Primers*
- Agua ultrapura
- Muestra de ADN
- *Mastermix* de reacción

La *Mastermix* utilizada en esta ocasión fue *MeltDoctor™ HRM Mastermix 2x* (Life Technologies), que al igual que el ampliamente utilizado, *SYBR Green*, se basa en una detección fluorescente. Pero éste aporta una mayor sensibilidad, ya que es capaz de diferenciar pequeñas variaciones entre secuencias. *MeltDoctor™ HRM Mastermix 2x* es una mezcla maestra específica para la técnica HRM, que contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción (*Taq* ADN polimerasa, dNTPs). Además, solo son necesarios 20 µL para poder llevar a cabo el análisis por PCR.

El HRM *MeltDoctor™*, posee como compuesto fluorescente una forma estabilizada del tinte de ácido nucleico bicatenario fluorescente SYTO® 9, que es análoga al *SYBR Green*, ya que se asocia a las hebras dobles de ADN. Este compuesto se excita a $\lambda = 485$ nm y produce una emisión de radiación fluorescente a $\lambda = 498$ nm. De modo que a medida que se produce la replicación de las hebras molde, la intensidad de fluorescencia aumenta. Ésta es recogida por el detector incorporado en el termociclador, dando lugar a la posibilidad de realizar experimentos cuantitativos a tiempo real o diferenciar genotipos en función la temperatura de fusión.



Figura 4. Imagen del sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ de 96 pocillos utilizado para este estudio.

3.2 Muestras

Para este estudio se dispone de veinte muestras de ADN positivas en CAdV-1 extraídas del bazo de lobos de la región de Asturias utilizando un kit comercial (SPEEDTOOLS TISSUE DNA Extraction kit, Biotools). Estas muestras se enumeraron del siguiente modo: 0925, 1001, 1004, 1005, 1007, 1010, 1011, 1012, 1102, 1309, 1311, 1313, 1318, 1351, 1368, 1369, 1505, 1615, 1631 y F2011-4. Entre las cuales las muestras 0925, 1011, 1012, 1102 y 1309 fueron secuenciadas.

4 Resultados y discusión

En un primer estudio, anterior a este TFM se llevó a cabo la detección del adenovirus CAdV-1 en las veinte muestras de lobos y la secuenciación de cuatro de esas muestras con el fin de confirmar la secuencia genética de un fragmento del adenovirus. Sin embargo, de las cuatro muestras secuenciadas, se observó que en tres de ellas (0925, 1011, 1012) la secuencia genética del virus se correspondía con el CAdV-1, sin embargo, en el caso de la muestra 1102, la secuencia se correspondía con una variación del virus CAdV-1. Este hallazgo, llevó consigo la necesidad de diseñar un protocolo de detección de la mutación, con el objeto de conocer cuántos individuos de los muestreados poseían esta variación.

4.1 Selección del método de PCR

Tras la evaluación de los distintos métodos basados en PCR, que se recogen en la *Tabla 2*, se procedió a la selección de la metodología más adecuada para llevar a cabo la detección de la mutación genética.

Todas las técnicas detalladas en la *Tabla 2* son utilizadas para el diagnóstico de mutaciones, destacando en todas ellas la sencillez del método y la fiabilidad de los resultados. Pero las técnicas PCR-RFLP, PCR-SSCP y SBE requieren de un método de detección *ex situ*, mientras que la AS-PCR, la utilización de sondas TaqMan, o la PCR-HRM, son técnicas automatizadas gracias a la utilización de marcadores fluorescentes. Para el caso de la AS-PCR y las sondas TaqMan, es necesario el diseño de *primers* y sondas específicas del fragmento en el que se encuentra la mutación. Sin embargo, aunque se traten de métodos más específicos, lo que más destaca de la PCR-HRM es la sencillez y bajo coste del procedimiento, para la cual no es necesario el diseño de sondas específicas de la mutación, sino que el diseño de *primers* para llevar a cabo la PCR es una tarea sencilla, además de que se requieren pocos reactivos y la instrumentación que se precisa es un termociclador que aporte detección a tiempo real. La técnica finalmente seleccionada para desarrollar este trabajo será la PCR-HRM.

Es preciso destacar que la secuenciación es el método de referencia, que aporta los resultados más fiables, pero su coste es el más elevado.

Tabla 2. Metodologías basadas en PCR utilizadas en la detección de mutaciones

Método	Fundamento	Detección	
AS-PCR	Se basa en el diseño de tres <i>primers</i> , específicos para el alelo mutado y el alelo <i>wild type</i> .	Específica.	A tiempo real.
TaqMan	Se basa en la utilización de una sonda formada por un fluoróforo y un <i>quencher</i> .	Específica.	A tiempo real.
PCR-RFLP	Se basa en la utilización de enzimas de restricción que fragmenten la cadena de ADN en el lugar que se produce la mutación.	Electroforesis en gel.	
PCR-SSCP	Se basa en diferenciar la conformación que adquieren las cadenas simples de ADN en función a la secuencia nucleotídica que poseen.	Electroforesis en gel.	
SBE	Se basa en la extensión de una única base en una posición específica que viene determinada por el <i>primer</i> .	Electroforesis capilar.	
PCR-HRM	Se basa en comparar las curvas de fusión específicas de cada cadena de ADN.	No específica.	A tiempo real.

4.2 Estudio y detección de la Secuencia asociada a la mutación

Para estudiar y evaluar los resultados de las muestras secuenciadas se utilizó el software *MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)*, en el cual se pueden visualizar las secuencias de la hebra *reverse* o *down (DN)* y de la hebra *forward* o *up (UP)*. En la *Figura 5* se puede observar como la muestra 1102 presenta un cambio de una guanina con una adenina, respecto al resto de secuencias. Esto se comprobó con la hebra *up*, la cual mostraba el mismo resultado, tal y como se muestra en la *Figura 6*.

5 Desarrollo de la propuesta metodológica

5.1 Diseño de los cebadores (*primers*).

Tras conocer la secuencia del virus, así como la posición en la que se encuentra la mutación de la segunda variante del Adenovirus Canino tipo I, se procedió al diseño de los *primers* requeridos para llevar a cabo su diagnóstico utilizando la técnica PCR-HRM. Para ello se utilizó la herramienta web *Primer3plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), en la cual se fijaron los siguientes parámetros:

- **Primer size ranges:** 20-27 nucleótidos
- **Product size:** 100-120 nucleótidos
- **Primer T_m:** 57-63°C.

Entre los resultados mostrados, se decidió seleccionar tres *primers* diferentes, para combinarlos de modo que se obtengan dos pares de *primers* y con el fin de poder diseñar dos protocolos de PCR-HRM. Estos se muestran a continuación, donde todas las secuencias están indicadas en el sentido 5'-3':

- **Protocolo PCR-HRM 1 (Figura 10):**

Forward *primer* (UP): **TTC TGC CAT TTG TTC TAG ACT CTG**

Reverse *primer* (DN): **TTT AGA AAG GTT AGC AGG CTT ACA A**

	Mutación	Fordward primer	Reverse primer
1	attactacct	tgtctatatt	tatgagaact gccaccagat gccgtatgat tccccacggc
61	acaccggcca	caaagggacc	tcattcaact ggtccatggg actatggctg gtaaaatgca
121	gccataacaa	aactttcttt	ctgccatttg ttctagaactc tgcaaaaagt gctcccatta
181	ttatgactga	gactg/a	ctata actatataca tttccatgat atttttaatt gtaagcctgc
241	taacctttct	aaatg	tttta ataacgctaa acaataaata taaacactat ggagtttaaa
301	aataaactta	cctaattttt	gtcaagactt ctgggtcctg tgtctctatg tccacaaggg
361	cccctcttc	ccaactttga	tacttccact tgtgtgtgcg ggccaacttg cgcaaatgct
421	taaagacaa	tgtggtctct	cccgacagct tcccgttcac caacaccaa gccatgaagc
481	ggacacgaag	tgctctacct	gcaaattttg acccc

Figura 10. Secuencia genética analizada en la que se muestran los *primers* diseñados para el protocolo PCR-HRM 1.

- **Protocolo PCR-HRM 2 (Figura 11):**

Forward primer-2 (UP): **TGT TCT AGA CTC TGC AAA AAG TGC**

Reverse primer (DN): **TTT AGA AAG GTT AGC AGG CTT ACA A**

	Mutación	Fordward primer-2	Reverse primer
1		tgtctatatt	tatgagaact
61		acaccggcca	caaagggacc
121		gccataacaa	aactttcttt
181		ttatgactga	gactg/a
241	taacctttct	aaatg	tttctata
301		aataaactta	cctaattttt
361		ccccctcttc	ccaactttga
421		taaaagacaa	tgtggtctct
481		ggacacgaag	tgctctacct

Figura 11. Secuencia genética analizada en la que se muestran los primers diseñados para el protocolo PCR-HRM 2.

Una vez recibidos los *primers* liofilizados (*Life Technologies*), se llevó cada uno a una concentración final de 200 μM con agua ultrapura. Y a continuación, se prepararon dos diluciones en las que a cada una se adicionó la mezcla de *primers* correspondiente a cada protocolo de PCR-HRM de modo que la concentración final de cada uno sea de 5 μM .

5.2 Diseño de protocolos HRM

Con el propósito de estudiar diferentes métodos y poder seleccionar el más adecuado para detectar la mutación genética, se prepararon cuatro disoluciones *mix* a partir de las mezclas de *primers* 5 μM . Es decir, para cada protocolo de PCR-HRM diseñado previamente, se prepararon dos disoluciones a diferente concentración de *primers*: protocolo PCR-HRM 1 a 0,1 μM y a 0,2 μM y protocolo PCR-HRM 2 a 0,1 μM y 0 2 μM . Para la preparación de estas disoluciones *mix* se adicionó a cada *ependorf* el volumen correspondiente de *Melt Doctor 2x*, de la disolución de *primers* 5 μM y de agua ultrapura hasta alcanzar un volumen final de 108 μL . Los volúmenes adicionados se muestran en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Volumen adicionado (μL) de Mel Doctor 2x, agua ultrapura y de disolución de primers $5\mu\text{M}$ para la preparación de las disoluciones mix de reactivos para el protocolo PCR-HRM 1 a $0,1\mu\text{M}$ y a $0,2\mu\text{M}$ y protocolo PCR-HRM 2 a $0,1\mu\text{M}$ y $0,2\mu\text{M}$.

	PCR-HRM 1 ($0,1\mu\text{M}$)	PCR-HRM 1 ($0,2\mu\text{M}$)	PCR-HRM 2 ($0,1\mu\text{M}$)	PCR-HRM 2 ($0,2\mu\text{M}$)
Melt Doctor 2x	60	60	60	60
Primers $5\mu\text{M}$	2,4	4,8	2,4	4,8
Agua MQ	45,6	43,2	45,6	43,2

Finalmente, para poder estudiar la efectividad de cada protocolo diseñado se realizó una PCR-HRM con tres de las muestras de ADN que fueron secuenciadas (1102, 1012 y 1309). Para ello se dispuso una placa de PCR con 20 pocillos, en los cuales se adicionaron $18\mu\text{L}$ de las disoluciones mix preparadas según la *Tabla 3* y $2\mu\text{L}$ de las muestras de ADN.

Cabe destacar que la muestra 1102 es la que presenta una mutación en la secuencia, mientras que las otras dos son negativas en dicha mutación. Por tanto, se adicionó cada muestra por separado en un pocillo diferente, y, además, se decidió realizar una prueba mezclando dos muestras (1102 y 1309) añadiendo $1\mu\text{L}$ de cada muestra a un mismo pocillo, de modo que, presente la dotación genética de ambas variantes del virus, lo que en realidad estaría representando la posibilidad de que un individuo hubiera sufrido una coinfección con ambas variantes del virus.

Por tanto, las pruebas que se realizaron para determinar el protocolo a seguir con el resto de las muestras vienen representadas en la *Figura 12*, en la cual el protocolo PCR-HRM 1 ($0,1\mu\text{M}$) viene indicado en color rojo, mientras que a mayor concentración ($0,2\mu\text{M}$) en azul, y el protocolo PCR-HRM 2 a $0,1$ y $0,2\mu\text{M}$, viene indicado en amarillo y verde, respectivamente.

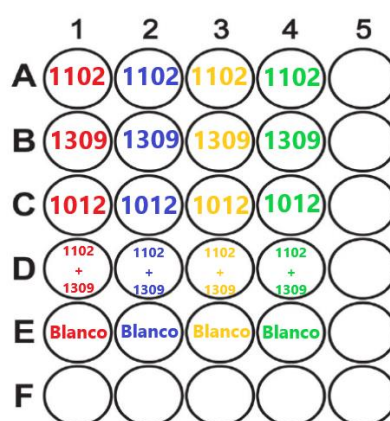


Figura 12. Esquema de la disposición de las muestras en la microplaca de PCR.

5.3 Puesta a punto de la PCR-HRM

El programa de PCR a tiempo real (*Figura 13*) se controló gracias a StepOnePlus™ Software v2.3, el cual consistió en una etapa inicial de calentamiento hasta alcanzar los 95°C durante 10 minutos, a continuación, se producen 40 ciclos de 15 segundos a la misma temperatura para que se produzca la desnaturalización y a 60°C para que los *primers* se acoplen a la hebra de ADN y se produzca la extensión del fragmento. Durante la etapa de acoplamiento-extensión se produce la medida de la fluorescencia que se produce gracias a la utilización del marcador artificial, el cual se intercala entre las hebras de ADN replicadas produciendo así el máximo de fluorescencia cuando todas las hebras están unidas.

A continuación, se llevaría a cabo del proceso de *High Resolution Melting (HRM)*, con el objeto de estudiar las curvas de disociación específicas de cada hebra de ADN. Para ello, tras finalizar la PCR, se volvió a aumentar la temperatura hasta 95°C durante 15 segundos, y descendió a 60°C durante 1 minuto. Finalmente se incrementó la temperatura cada 15 segundos, 0,3°C hasta alcanzar de nuevo la temperatura de 95°C. Durante este proceso se produce la desnaturalización de las moléculas de ADN, como consecuencia de ello, la disminución de la fluorescencia detectada, que se mide después de cada ciclo de aumento de temperatura. Esto se debe a que, durante la desnaturalización, las hebras de ADN se van abriendo, y el marcador *Melt Doctor*, que solo se intercala en las hebras dobles, deja de emitir fluorescencia. De modo que a medida que la temperatura aumenta, las hebras se irán abriendo, lo que dará lugar a que cada hebra de ADN tendrá una temperatura de disociación específica.

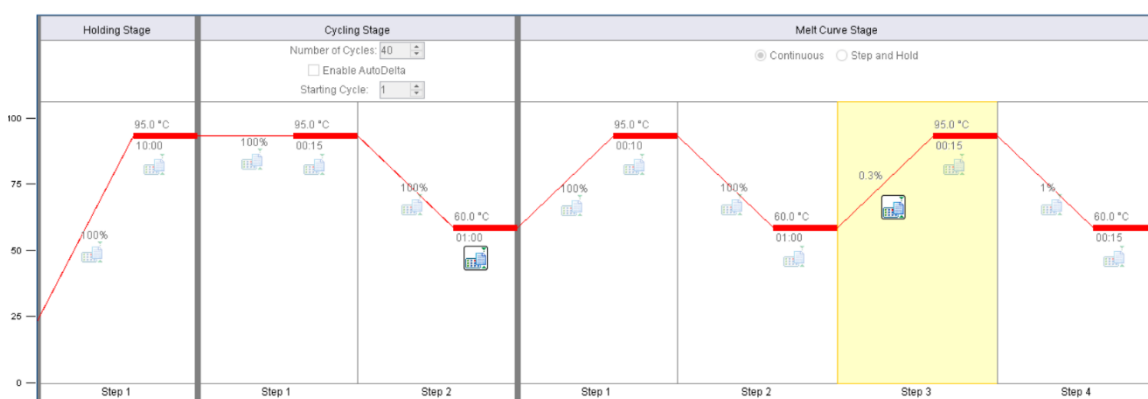


Figura 13. Etapas del programa de PCR a tiempo real llevadas a cabo en el termociclador StepOne para el estudio del protocolo a seguir.

5.4 Selección del método PCR-HRM

Una vez terminado el proceso de PCR-HRM se pueden analizar los datos, y evaluar cuál de las metodologías propuestas da lugar a mejores resultados. Para ello se analizan las gráficas de amplificación y las curvas de melting de cada uno de los protocolos seguidos.

En primer lugar, está el protocolo **PCR-HRM 1** utilizando los *primers* indicados en el Apartado 5.1. (Diseño de cebadores (*primers*)) y en la Tabla 3 del Apartado 5.2 (Diseño protocolos HRM) *con* concentraciones de 0,1 μM y 0,2 μM . En ambos casos se produce un aumento de la fluorescencia a medida que aumenta el número de ciclos, tal y como se puede observar en el gráfico de amplificación que se recoge en la *Figura 14*, por lo que se puede concluir que los *primers* diseñados son específicos de la secuencia y dan lugar a la replicación del ADN.

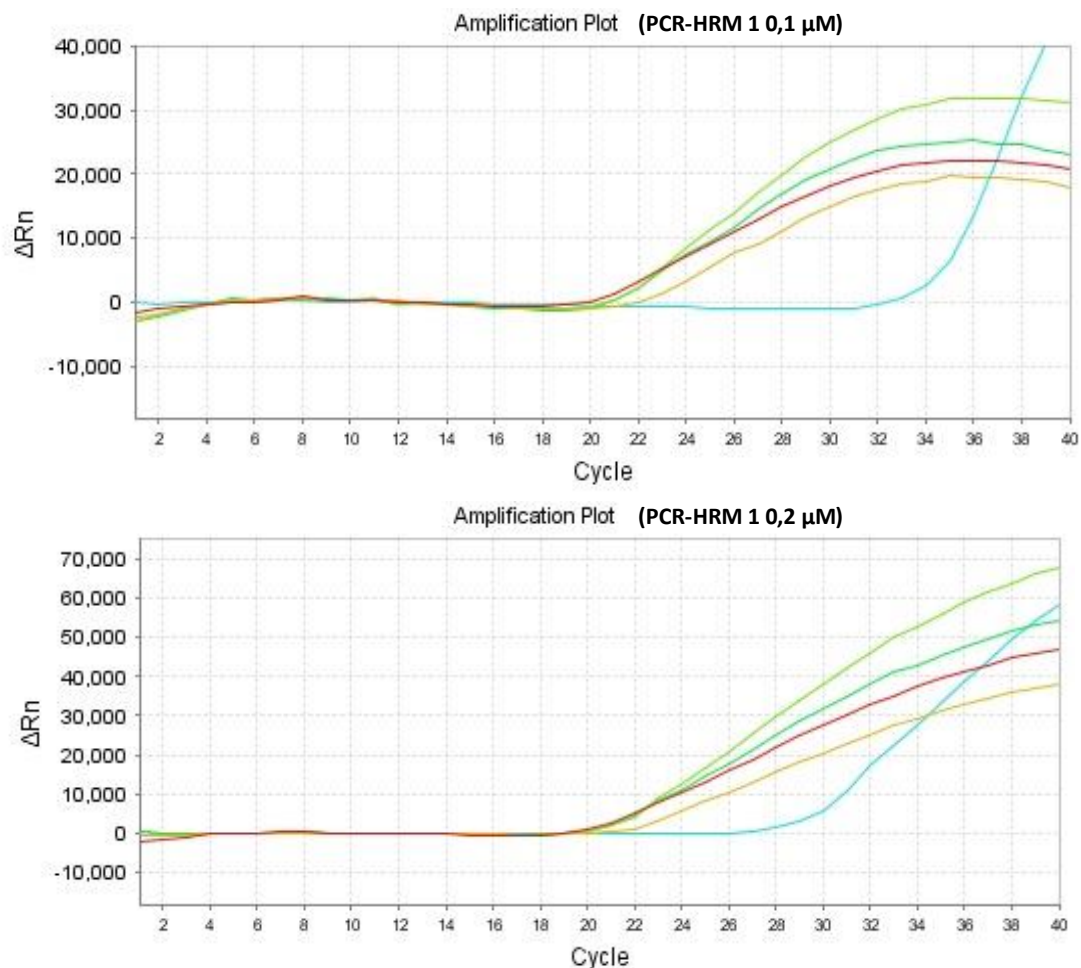


Figura 14. Representación de las curvas de amplificación, en las cuales la intensidad de fluorescencia es mayor a medida que aumenta el número de ciclos durante la PCR en tiempo real para el protocolo de **PCR-HRM 1 0,1 μM** (arriba) y **0,2 μM** (abajo).

La representación de la intensidad de fluorescencia vs. temperatura da lugar a lo que denominamos curvas de Melting, cuya primera derivada se muestra en la *Figura 15*. Las temperaturas de melting (T_m) específicas de cada muestra de ADN vienen representadas por un máximo, el pico de disociación, el cual indica el punto en el que las cadenas de ADN se desnaturalizan, y por tanto disminuye la fluorescencia detectada. Esto se produce durante el aumento progresivo y lento de la temperatura.

Como se puede observar en la *Figura 15*, la T_m obtenida para cada muestra, varía en décimas de grado, ya que en ambos casos el rango en el que se encuentran los picos de disociación está entre 72,84 – 73,74°C. En ambos casos, la muestra de ADN que presenta la mutación, que viene representada por una línea roja, es la que menor T_m tiene, mientras que es la muestra que tiene presente ambas secuencias del virus, (línea verde) es la que presenta una T_m superior al resto. Las otras dos muestras analizadas, que no presentan la mutación genética poseen en ambos casos una T_m muy similar, a diferencia de las que presentan la mutación. Es por ello que se puede afirmar que esta técnica es capaz de diferenciar mutaciones que afecten solamente a una base.

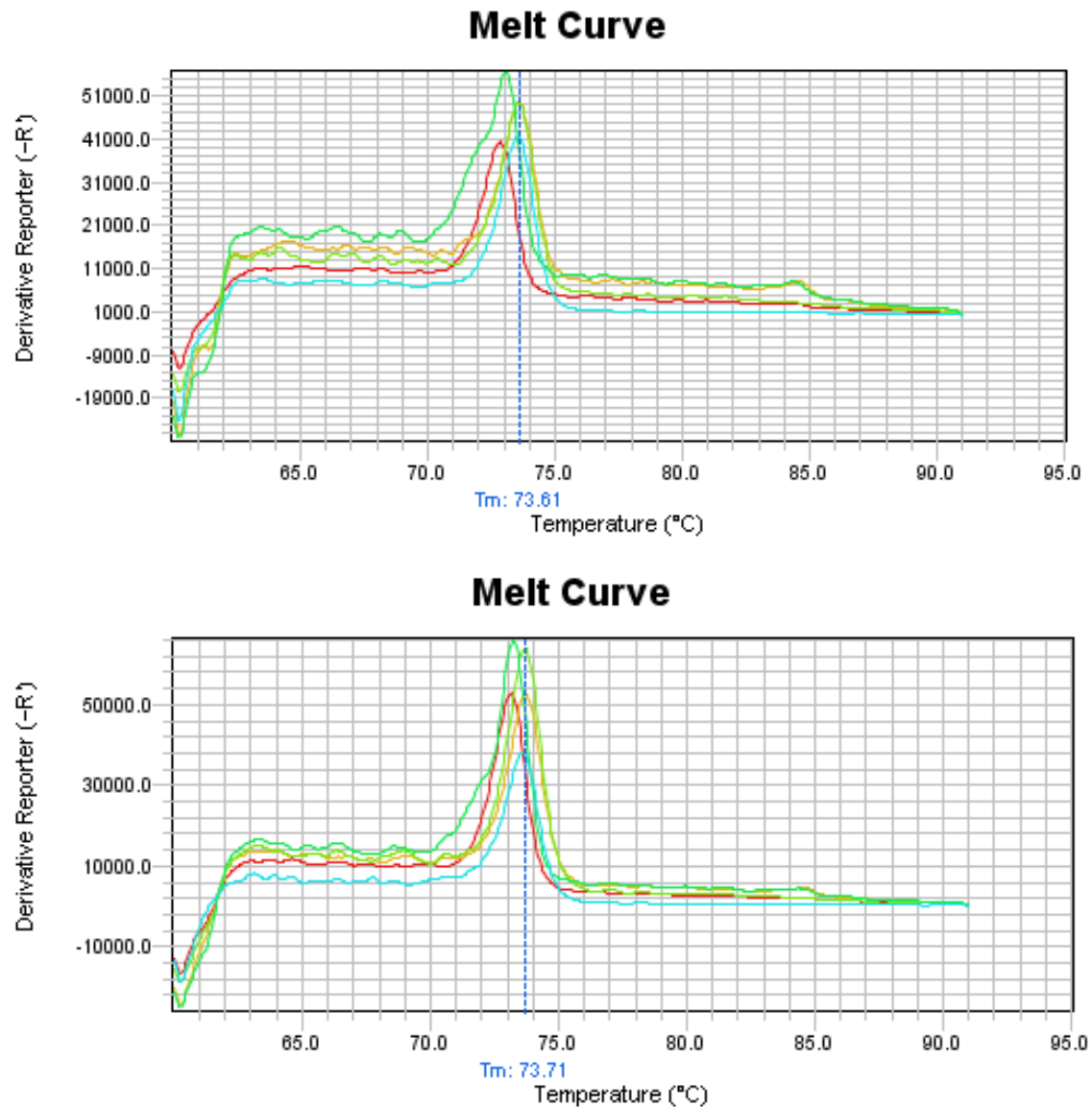


Figura 15. Representación de la derivada de las curvas de melting de cada muestra resultante al llevar a cabo el protocolo de PCR-HRM 1 $0,1 \mu\text{M}$ (arriba) y $0,2 \mu\text{M}$ (abajo).

Cabe destacar, que tanto en las gráficas de amplificación (*Figura 14*) como en las curvas de melting (*Figura 15*) se puede observar como el blanco, representado por una línea azul, da lugar a señal, lo cual no debería ocurrir. Esto puede ser debido a dos causas: una contaminación a la hora de llevar a cabo el procedimiento experimental, o la formación de productos de PCR inespecíficos o dímeros de *primers* con una temperatura de melting similar a la del producto específico de PCR. Esto no afecta significativamente a los resultados, ya que la intensidad de fluorescencia se obtiene a partir del ciclo n^o35 en el caso de la PCR-HRM 1 $0,1\mu\text{M}$, mientras que para la mezcla de *primers* más concentrada, se puede observar en torno al ciclo n^o30.

Por otro lado, el protocolo llevado a cabo con la otra pareja de *primers* no resultó tan efectivo como el evaluado previamente. Ya que como se puede observar en la *Figura 16* las gráficas de amplificación muestran señales de fluorescencia mucho menores y menos homogéneas. Resultados similares se observan para los picos de disociación en las curvas de melting. Además, cabe destacar, que a mayor concentración de *primers* (*Figura 16. 2.a y 2.b*), la amplificación es menor que cuando se utiliza el *mix* de *primers* 0,1 μM , por lo que se podría suponer que el descenso de la señal en la amplificación del ADN de las muestras es debido a un alineamiento entre los propios *primers*. Razón por la, que este protocolo de PCR no es efectivo para la detección de la mutación del Adenovirus.

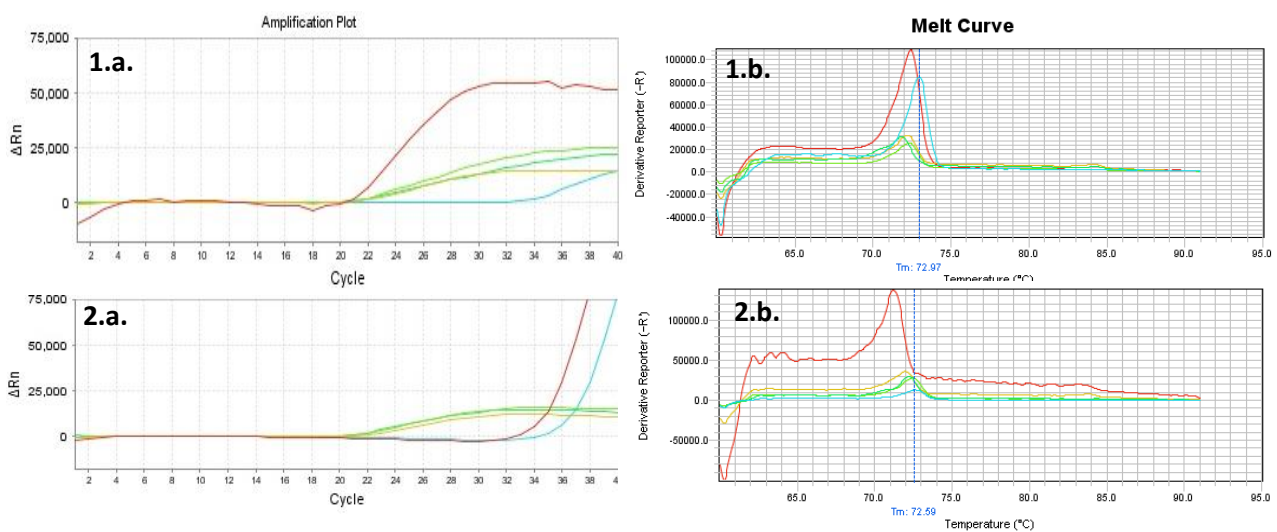


Figura 16. Representación de las gráficas de amplificación (1.a y 2.a) y de las derivadas de las curvas de melting (1.b y 2.b) del protocolo PCR-HRM 2 a 0,1 y 0,2 μM , respectivamente.

Por tanto, el método seleccionado para llevar a cabo las medidas de las muestras será el llamado PCR-HRM 1, el cual se llevó a cabo utilizando los *primers* indicados en el Apartado 5.1. (Diseño de cebadores (*primers*)).

5.5 Optimización de la concentración de primer para llevar a cabo el método PCR-HRM 1.

Con el fin de seleccionar la concentración de *primers* más adecuada para llevar a cabo la PCR, se utilizó el programa High Resolution Melting *software* v3.2 (*Thermo Fisher Scientific*), en el cual se pueden visualizar las curvas de melting para todas las muestras analizadas y sus diferencias. Como se ha indicado previamente, la técnica HRM es una técnica que permite diferenciar pequeñas variaciones entre secuencias de ADN. Y para ello se detectan diferentes T_m según la secuencia del fragmento de PCR que se esté analizando.

El empleo de software HRM permite analizar las muestras y detectar pequeñas variaciones entre ellas. Para ello es necesario realizar una PCR previa de una secuencia conocida, con el fin de establecer los límites de temperatura entre los que se deben realizar los análisis, y focalizar el análisis lo más próximo a la T_m . Para este estudio el rango de temperatura aplicado fue entre 69,5-76,2 °C, el cual aportaba una mayor sensibilidad, ya que permitía diferenciar las tres variantes que se estaban estudiando. Por otro lado, para este tipo de análisis, es necesario que se fijen las muestras control, es decir, se requiere conocer la secuencia de al menos una muestra, de modo que el software detectará las posibles diferencias o similitudes del resto de muestras en función a esa referencia. Esto se puede observar en la *Figura 17*, en la que referencia sería la línea verde, correspondiente a la muestra que simula la coinfección, es decir, la mezcla de las muestras de ADN (1102 y 1309), mientras que la muestra cuya secuencia presenta la mutación (1102) sería la línea roja y las secuencias no alteradas vienen representadas por una línea azul (1309 y 1012).

Por tanto, como se puede observar claramente en la *Figura 17*, es posible diferenciar las variantes del virus con el protocolo desarrollado. En la gráfica de la parte superior de la figura (*Aligned Melt Curves*), se observa la caída de la fluorescencia de cada secuencia en función a la temperatura cuando se aplica el programa de HRM que viene descrito en el Apartado 5.3.(Puesta a punto de la PCR-HRM). Por lo que se podría afirmar la gran especificidad y selectividad que aporta esta técnica, ya que es capaz de diferenciar muestras cuyas diferencias tan solo vienen dadas por la variación en una de sus bases. En la figura de abajo (*Difference Plot*) viene representada la diferencia encontrada en cada muestra en función a la muestra control, que viene representada por la línea verde, como se ha comentado previamente.

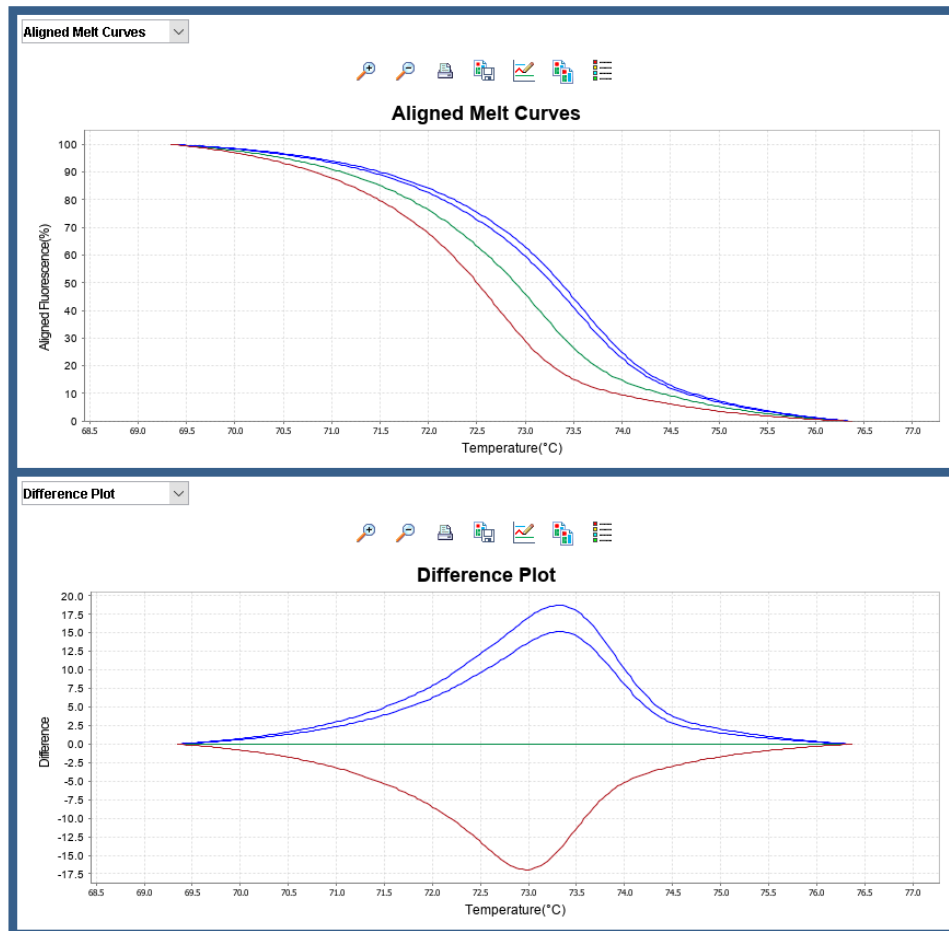


Figura 17. Representación del alineamiento de las curvas de melting (arriba) y de la diferencia entre ellas (abajo), resultantes de realizar la PCR-HRM con el protocolo **PCR-HRM 1 0,1 μ M**. En ellas se representa la secuencia del virus mutada (rojo), la secuencia del virus sin mutación (azul) y la muestra que presenta ambas variantes (verde).

El resultado mostrado en la *Figura 17*, es similar al que presenta el protocolo diseñado con una concentración mayor de *primers* (**PCR-HRM 1 0,2 μ M**), tal y como se puede observar en la *Figura 18*. Por ello se puede concluir que ambos protocolos serían igual de efectivos a la hora de detectar dicha mutación en las muestras reales. Sin embargo, se decide descartar el protocolo **PCR-HRM 1 0,2 μ M** debido a que al poseer una mayor concentración de *primers* es más probable que puedan surgir alineamientos entre ellos. Además, como se comentó previamente, en este último caso, se observaba la señal referente al blanco más significativa, ya que empezaba a ser notoria a partir del ciclo n°30.

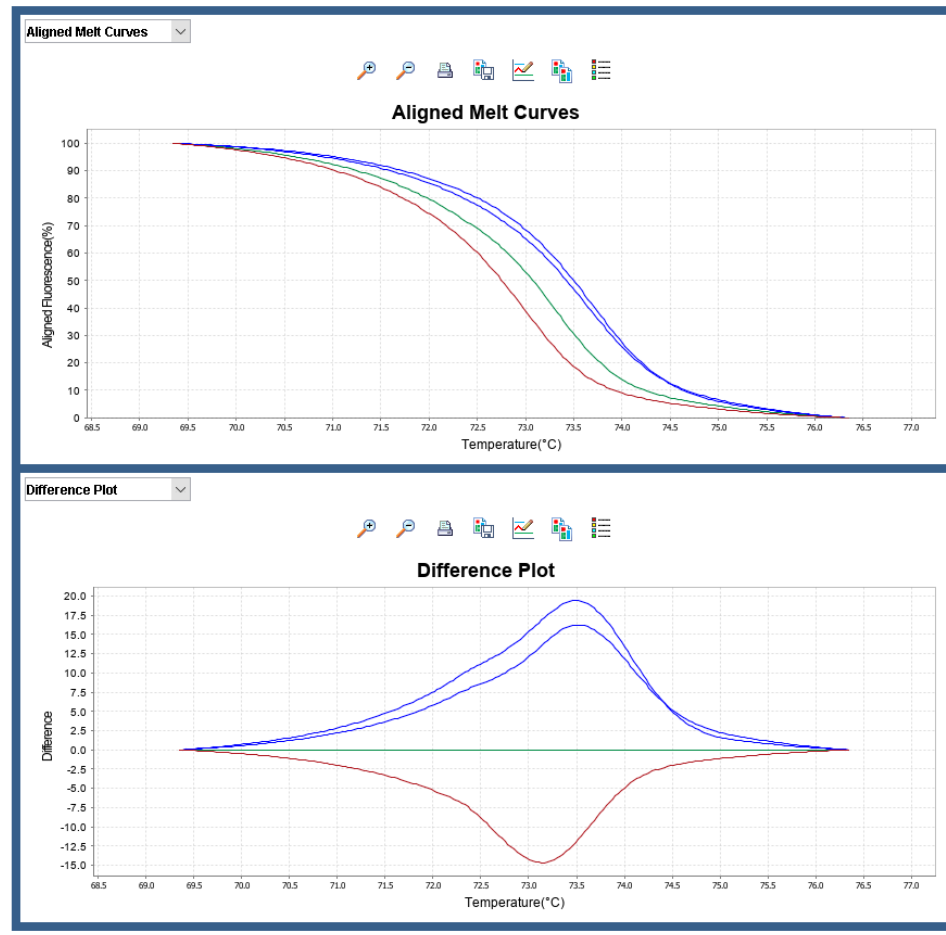


Figura 18. Representación del alineamiento de las curvas de melting (arriba) y de la diferencia entre ellas (abajo), resultantes de realizar la PCR-HRM con el protocolo **PCR-HRM 1 0,2 μ M**. En ellas se representa la secuencia del virus mutada (rojo), secuencia del virus sin mutación (azul) y la muestra que presenta ambas variantes (verde).

Por tanto, el método seleccionado para detectar una mutación en el Adenovirus Canino tipo I (CA_{AdV-1}) es aquel que posee una concentración de 0,1 μ M de los siguientes *primers*:

Forward *primer* (UP): **TTC TGC CAT TTG TTC TAG ACT CTG**

Reverse *primer* (DN): **TTT AGA AAG GTT AGC AGG CTT ACA A**

Con los cuales se llevará a cabo una PCR a tiempo real según el programa indicado en el Apartado 5.3. (Puesta a punto de la PCR HRM), seguido de HRM, lo que aportará una mayor sensibilidad de la técnica, capaz de diferenciar pequeñas variaciones entre las secuencias de ADN.

6 Validación de la metodología propuesta

Una vez seleccionado el método que se utilizará para analizar las muestras reales, con el objetivo de detectar individuos que presenten la mutación del CAdV-1 encontrada en una de las muestras de ADN secuenciadas, se procede a realizar la PCR-HRM con las muestras indicadas en el Apartado 3.2 (Muestras). Para ello se deben seleccionar dos controles, uno que no presente mutación, que para ello se utilizó la muestra 1012, mientras que para el control positivo en la mutación se utilizó la muestra de ADN secuenciada 1102. Por tanto, durante el tratamiento de los datos, se identificará las similitudes de las diferentes muestras con dichos controles.

Los resultados obtenidos tras visualizarlos utilizando el programa High Resolution Melting *software* v3.2, se muestran en la *Figura 19* donde se puede apreciar que entre las veinte muestras analizadas hay dos muestras positivas en la mutación (líneas azules). Una de esas muestras corresponde al control positivo en la mutación, tal y como se ha indicado previamente, mientras que la otra corresponde a la muestra 1318. Sin embargo, el resto de las muestras, presentan una secuencia del virus sin alterar (líneas rojas).

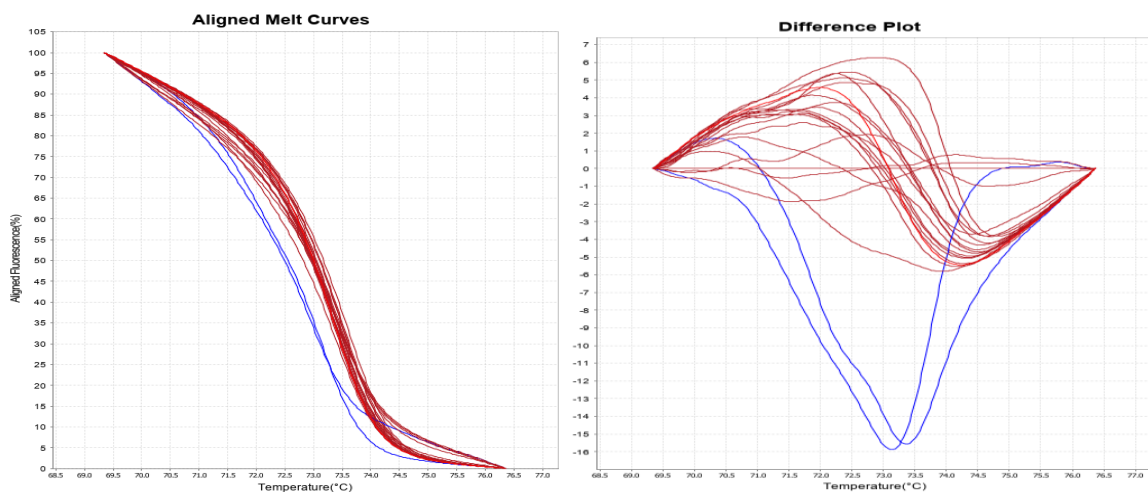


Figura 19. Representación del alineamiento de la curvas de melting (izquierda) y de la diferencia entre ellas (derecha), resultantes de realizar la PCR-HRM con el protocolo **PCR-HRM 1 0,1 μ M**. En ellas se representan los resultados de las 20 muestras de ADN procedente de lobos de distintos lugares de la región de Asturias, donde se muestran las diferencias encontradas entre ellas. Las líneas azules representan las muestras positivas en la mutación, siendo una de ellas la muestra control (1102), mientras que las muestras que no presentan variación en una de sus bases nucleotídicas vienen representadas en rojo.

Por tanto, se puede indicar que entre las muestras analizadas de ADN extraído del bazo de lobos de Asturias positivos en CAdV-1, se han encontrado dos individuos que poseen la mutación, siendo uno de ellos el hallado previamente durante el estudio de la incidencia de este virus sobre los animales salvajes de la región.

7 Evaluación de los resultados

El estudio realizado con el objetivo de ser capaces de diagnosticar la mutación del CA_{AdV-1} encontrada entre los lobos de Asturias a partir de la técnica PCR, dio pie al diseño de diversos protocolos para dicho fin. Aunque la técnica molecular basada en la PCR lleva muchos años siendo utilizada para el estudio de este virus, no se disponía de ninguna referencia acerca de la mutación encontrada en la región tras realizar un estudio sobre la incidencia en el oso pardo.

Se pudo comprobar que el diseño de *primers* es una tarea relativamente sencilla, que aporta como resultado la especificidad de la técnica. Dichos *primers* resultaron ser efectivos para el *mix* preparado para el protocolo **PCR-HRM 1**, los cuales fueron probados añadiendo diferente concentración de cada uno de ellos. Finalmente, aunque con ambos protocolos el estudio era efectivo, el protocolo elegido fue aquel que contenía una concentración menor de *primers*, con el objeto de minimizar el alineamiento entre ellos. Durante el estudio del protocolo a seguir se pudo comprobar que la técnica PCR-HRM, resulta un método sencillo, fácil y económico, en comparación con otras técnicas. Además de que es una técnica totalmente *in situ* y automatizable, que además aporta resultados sorprendentes, siendo capaz de diferenciar pequeñas variaciones entre secuencias, como lo es una variación en una sola base nucleotídica.

Es por ello por lo que, una vez conocido el protocolo a seguir, resultó sencillo el análisis de las veinte muestras de ADN extraídas de diferentes lobos de la región. Tal y como se mostró en el Apartado 6 (Validación de la metodología propuesta), el software utilizado para el análisis de datos encontró diferencias en las secuencias de dos muestras, siendo una de ellas, la muestra 1102, que había sido secuenciada con anterioridad al desarrollo de este TFM, por lo que ya se conocía de la existencia de la variación en una de sus bases. Cabe destacar, que fue esta muestra, la que llevó consigo el comienzo de este estudio. La otra muestra positiva en la mutación resultó ser la 1318, mientras que el resto de las muestras de CA_{AdV-1} no se ven alteradas en su secuencia.

Una vez analizados los resultados y observado la incidencia de la mutación entre los individuos de los que se poseía ADN, se decidió comprobar el resultado obtenido. Para ello se secuenció la muestra 1318, y haciendo uso del software *MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* se pudieron evaluar los resultados obtenidos. Tal y como se puede observar en la *Figura 20*, la secuenciación de la muestra 1318, resultó poseer la misma mutación que la muestra 1102, que, a diferencia de la secuencia del Adenovirus Canino tipo I, poseen una adenina (A) en el lugar de una guanina (G).

8 Conclusiones

A la vista del método llevado a cabo para diagnosticar la prevalencia de la mutación del Adenovirus Canino tipo I (CAdV-1) entre los lobos de Asturias y los resultados obtenidos a partir de éste, se puede determinar que:

- La metodología propuesta, PCR-HRM, es válida para poder diagnosticar ambas variantes del adenovirus canino que se diferencian sólo en un nucleótido. Además, es un método sencillo y económico.
 - La secuenciación es el método de referencia de este estudio, siendo el más adecuado para estudiar una mutación puntual, pero no para los análisis de rutina que se llevan a cabo en los controles de sanidad animal.
 - Entre los veinte individuos estudiados, dos de ellos, muestreados con dos años de diferencia, resultaron positivos en la mutación, los cuales pertenecen a la misma zona de la región de Asturias, Tineo. Esto puede indicar que la nueva variante está circulando, al menos por los animales de esta región.
-

9 Bibliografía

- Balboni, A., Mollace, C., Giunti, M., Dondi, F., Prosperi, S., & Battilani, M. (2014). Investigation of the presence of canine adenovirus (CAV) in owned dogs in Northern Italy. *Research in Veterinary Science*, 97(3), 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.010>
- Balseiro, A., Gayo, E., García Marín, J.F., Royo Marín, L.J., (2021) ¿De qué mueren los osos pardos en la cordillera Cantábrica? *The Conversation*
- Bulut, O., Yapici, O., Avci, O., Simsek, A., Atli, K., Dik, I., Yavru, S., Hasircioglu, S., Kale, M., & Mamak, N. (2013). The Serological and Virological Investigation of Canine Adenovirus Infection on the Dogs. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/587024>
- Chander, V., Sharma, G. K., Bhatt, M., Nandi, S., Mahajan, S., Singh, M., ... & Singh, R. K. (2021). Isolation and genetic characterization of canine adenovirus type 2 from a domestic dog showing neurological symptoms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00540-0>
- Daniel, R., Santos, C., Phillips, C., Fondevila, M., Van Oorschot, R. A. H., Carracedo, A., ... & McNeven, D. (2015). A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 14, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.013>
- Decaro, N., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2008). Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 799–814. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.02.006>
- Dowgier, G., Lahoreau, J., Lanave, G., Losurdo, M., Varello, K., Lucente, M. S., Ventriglia, G., Bozzetta, E., Martella, V., Buonavoglia, C., & Decaro, N. (2018). Sequential circulation of canine adenoviruses 1 and 2 in captive wild carnivores, France. *Veterinary Microbiology*, 221, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.025>
- Er, T. K., Lin, S. F., Chang, J. G., Hsieh, L. L., Lin, S. K., Wang, L. H., ... & Liu, T. C. (2009). Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. *Clinica chimica acta*, 408(1-2), 39–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.07.002>
- Estrada-Cuzcano, A., Sandoval, J., Guevara-Fujita, M. L., & Fujita, R. (2005). Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de biología*, 12(3), 349–358.
- Figueredo-Lago, J. E., Armas-Cayarga, A., González-González, Y. J., Collazo-Mesa, T., de la Rosa, I. G., Perea-Hernández, Y., & Santos-González, E. N. (2015). Development of a method

to detect three frequent mutations in the CFTR gene using allele-specific real time PCR. *Biotecnología Aplicada*, 32(4), 4301-4306.

García Marín, J. F., Royo, L. J., Oleaga, A., Gayo, E., Alarcia, O., Pinto, D., Martínez, I. Z., González, P., Balsera, R., Marcos, J. L., & Balseiro, A. (2018). Canine adenovirus type 1 (CAV-1) in free-ranging European brown bear (*Ursus arctos arctos*): A threat for Cantabrian population? *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 2049–2056. <https://doi.org/10.1111/tbed.13013>

Greene, C. E. (2006). *Infectious diseases of the dog and cat* (No. Ed. 3). WB Saunders\Elsevier Science.

Hashemi, S. A., Khoshi, A., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Ghafouri, M., Taghavi, M., Namdar-Ahmadabad, H., & Azimian, A. (2020). Development of a PCR-RFLP method for detection of D614G mutation in SARS-CoV-2. *Infection, Genetics and Evolution*, 86, 104625. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104625>

Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(4), 137-144. <https://dx.doi.org/10.29252/JABR.06.04.02>

Ibarrondo, O., Lopez-Oceja, A., Baeta, M., & M. de Pancorbo, M. (2019). A Statistical Method to Enhance the Analysis of the Differences Among High-Resolution Melting (HRM) Curves of PCR-Amplified DNA Fragments. *Journal of food science*, 84(10), 2719-2728. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14814>

Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology “the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00465>

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1). <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

Kadri, K. (2019). Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications. In *Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science*. IntechOpen.

Matsuda, K. (2017). PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. *Advances in clinical chemistry*, 80, 45-72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>

Mehta, B., Daniel, R., & McNevin, D. (2017). HRM and SNaPshot as alternative forensic SNP genotyping methods. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 13(3), 293-301. <https://doi.org/10.1007/s12024-017-9874-5>

- Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P., & Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical chemistry*, *83*(12), 4327-4341. <https://doi.org/10.1021/ac2010857>
- Oleaga, A., Balseiro, A., Espí, A., & Royo, L. J. (2021). Wolf (*Canis lupus*) as canine adenovirus type 1 (CAdV-1) sentinel for the endangered cantabrian brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.14010>
- Pinilla, G., Cubillos, K., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, *6*(9). <https://doi.org/10.22490/24629448.397>
- Renaud, C., Kuypers, J., & Corey, L. (2010). Diagnostic accuracy of an allele-specific reverse transcriptase-PCR assay targeting the H275Y oseltamivir resistant mutation in 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus. *Journal of Clinical Virology*, *49*(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.019>
- Roy, D., Hasan, M. M., & Haque, A. (2019). Mutation detection sensitivity of high-resolution melting in clinical samples: a comparative study between formamide and dimethyl sulfoxide. *J Adv Biotechnol Exp Ther*, *2*(2), 51-4. <https://doi.org/10.5455/jabet.2019.d25>
- Savelev, I., & Myakishev-Rempel, M. (2020). Evidence for DNA resonance signaling via longitudinal hydrogen bonds. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *156*, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.07.005>
- Sedano, A., Pinto, C. E., Siuce, J., & Calle, S. (2016). Estandarizacion de una tecnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan para la deteccion de *Leptospira* spp patogenas en orina de canes domesticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *27*(1), 158-168. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i1.11454>
- Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Gardner, A. F., Hendrickson, C. L., Kieleczawa, J., & Slatko, B. E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *96*(1), 7-1. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0701s96>
- Silva Molina, J.I. (2018). Identificación de las especies del género *Leishmania* mediante marcadores moleculares de alta sensibilidad a partir de láminas coloreadas con Giemsa empleando la técnica PCR-HIGH RESOLUTION MELTING (HRM). (Tesis doctoral). *Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias*. Perú. Recuperado a partir de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3832>
- Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Wachulec, M., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). High resolution melting (HRM) for high-throughput genotyping—limitations and caveats in practical case studies. *International journal of molecular sciences*, *18*(11), 2316. <https://doi.org/10.3390/ijms18112316>

- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Torres-Caballero, A., Serrato, A., López-Santaella, T., Ortiz, R., Chico-Ponce de León, F., González-Carranza, V., ... & Hernández-Hernández, A. (2020). Evaluation of the melting temperature of TaqMan probes as a genotyping method for IDH1, IDH2, and H3F3A in pediatric astrocytomas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 77(6), 303-311. <https://doi.org/10.24875/bmhim.20000092>
- Toye, E. T., van Marle, G., Hutchins, W., Abgabiaje, O., & Okpuzor, J. O. (2018). Single tube allele specific PCR: a low-cost technique for molecular screening of sickle cell anaemia in Nigeria. *African health sciences*, 18(4), 995-1002. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v18i4.20>
- Yang, M., Hou, Y., Yang, X., Wang, C., Zhi, L. & You, C. (2019). Development and application of a PCR-HRM molecular diagnostic method of SNPs linked with TNF inhibitor efficacy. *Diagnosis*, 6(3), 277-286. <https://doi.org/10.1515/dx-2018-0062>
- Yao, L., Lu, J., Qu, M., Jiang, Y., Li, F., Guo, Y., ... & Zhai, Y. (2020). Methodology and application of PCR-RFLP for species identification in tuna sashimi. *Food Science & Nutrition*, 8(7), 3138-3146. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1552>
-