Artigo de Atualização/*Update*

Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de *melting*

Applicability aspects of the melting curve analysis

Paulo Roberto Xavier Tomaz[1]

Juliana da Rocha dos Santos[2]

Paulo Caleb Júnior de Lima Santos[3]

[1]*Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.*
[2]*Farmacêutica. Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.*
[3]*PhD/FCF-USP. Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.*

Artigo recebido em 07/02/2013
Artigo aprovado em 10/04/2015

Resumo
As técnicas de biologia molecular possibilitaram o avanço no diagnóstico de inúmeras doenças monogênicas, o melhor entendimento sobre predisposição às doenças poligênicas e a descoberta de marcadores genéticos de sensibilidade e de resistência a alguns fármacos. Nesta revisão, os principais objetivos foram abordar as características da metodologia da análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*) e sua aplicabilidade na identificação de alterações genéticas. Ainda, foram relacionados alguns pontos técnicos que devem ser observados para que os ensaios de HRM sejam bem sucedidos e também vantagens e desvantagens desta metodologia, dependendo de aspectos interlaboratoriais, tais como: demanda, número de testes genéticos realizáveis, custos (manutenção dos equipamentos, tempo de consumo e estoque de segurança de reagentes específicos) e especificidade ou sensibilidade requerida no ensaio.

Palavras-chave
Diagnóstico; Fenótipo; Testes laboratoriais

INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular possibilitaram o avanço no diagnóstico de inúmeras doenças monogênicas, o melhor entendimento sobre predisposição às doenças poligênicas e a descoberta de marcadores genéticos de sensibilidade e de resistência a alguns fármacos.

Nesta revisão, os principais objetivos foram abordar as características da metodologia da análise da curva de *melting* (HRM – *high resolution melting*) e sua aplicabilidade na identificação de alterações genéticas, além de abordar as vantagens e as desvantagens da técnica.

VARIAÇÃO GENÉTICA

O genoma humano é composto por aproximadamente 3 bilhões de pares de base e 30 mil genes. Os seres humanos apresentam um alto grau de variabilidade genética e isso pode ser observado em fenótipos bem conhecidos como altura, pressão sanguínea e cor da pele. A variação na sequência de DNA pode ocorrer por diversas formas: substituição de nucleotídeos únicos (SNPs – *single nucletide polymorphisms*), inserção ou deleção única ou múltipla, alterações no número de repetição de sequências e mudanças maiores na estrutura do cromossomo.[1,2]

Toda variação genética é originada a partir do processo conhecido como mutação, definido como uma mudança na sequência referência do DNA. As mutações podem afetar tanto as células da linhagem germinativa – que podem ser transmitidas de uma geração a outra, quanto as células da linhagem somática – que são envolvidas no desenvolvimento de vários tipos de cânceres. Os alelos variantes encontrados em mais de 1% dos cromossomos na população geral são conhecidos como polimorfismos genéticos. Em contraste, os alelos com frequência menor que 1% são, por convenção, chamados de variantes raras ou mutações.[3]

POLIMORFISMO E MUTAÇÃO

Os polimorfismos genéticos são responsáveis pela diferença em fenótipos gerais dos indivíduos; no entanto, alguns polimorfismos podem estar associados à predisposição de doenças complexas, também chamadas de doenças poligênicas. Em outras palavras, um polimorfismo não é o suficiente para causar estas doenças, mas o conjunto de múltiplas alterações e a interação delas com o meio ambiente podem levar a maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças como diabetes *mellitus*, hipertensão, doenças coronarianas, distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos.

Os polimorfismos também são associados à farmacogenética, ciência que estuda a influência de variações genéticas na eficácia medicamentosa e na presença de efeitos adversos. Estes polimorfismos geralmente são localizados em genes codificadores de enzimas metabolizadoras, de receptores e de transportadores de membrana.[4,5]

Já as variações chamadas de mutações podem indicar um conceito patogênico e geralmente estão associadas aos distúrbios monogênicos, tais como: distrofia miotônica, neurofibromatose, doença de Huntington, síndrome Marfan, fibrose cística, diversas cardiomiopatias, anemia falciforme, fenilcetonúria, hemofilia, etc.

ANÁLISE DA CURVA DE *MELTING* – HRM (*HIGH RESOLUTION MELTING*)

Fundamento

A técnica de HRM exige a utilização dos reagentes de uma PCR (*polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase) convencional com a adição de um corante que emite fluorescência ao se intercalar na dupla fita de DNA (fluoróforo). Após a realização da PCR e da amplificação do fragmento específico, termociclando geralmente de trinta a quarenta ciclos, há o maior grau de fluorescência devido ao maior número de DNA de fita dupla. Assim, o aparelho de PCR com leitura em tempo real executa a análise de HRM propriamente dita, isto é, aumenta a temperatura no tubo de reação, gradativamente (aproximadamente de 70º-90ºC), a fim de dissociar a dupla fita de DNA e gerar uma curva de decaimento da fluorescência. Assim, ocorre a diminuição da fluorescência (Figura 1), que é captada pelo leitor do aparelho, gerando padrões de curvas (curvas de *melting*) de acordo com os diferentes genótipos (Figura 2).[6,7]

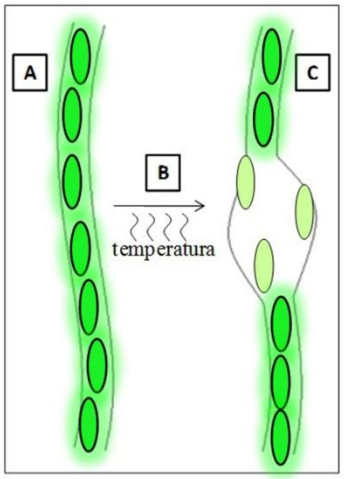

Figura 1. Atividade do agente fluorescente. A: saturação do corante na dupla fita de DNA. B: gradativo da temperatura. C: inicio da desnaturação e diminuição da fluorescência.

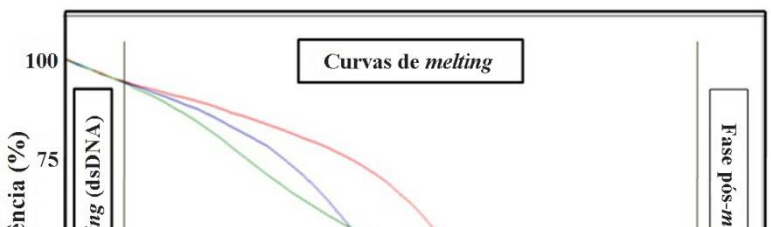

*Figura 2. Comportamento de dissociação da dupla fita de DNA em uma análise por HRM (*high resolution melting*). Na fase de* melting *são geradas curvas de acordo com os genótipos das amostras. dsDNA = DNA dupla fita; ssDNA = fita simples*

Para a realização da PCR-HRM são necessários os seguintes reagentes: diluente (água ultrapura auto-clavada), tampão para a PCR, dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), iniciadores (*forward primer* e *reverse primer*), Taq DNA polimerase, DNA genômico e reagente fluorescente em DNA dupla fita. Os corantes intercalantes de terceira geração, como o SYTO®9 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), LCGreen® (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT) e Eva Green® (Biotium Inc, Hayward, CA), por apresentarem menor toxicidade que os corantes de primeira e de segunda gerações, podem ser utilizados em concentrações mais elevadas a fim de saturar o DNA dupla fita, aumentando assim a resolução da análise de *melting*. A reação pode ser realizada manualmente ou através de instrumento automatizado – usando tubos de reação, placas ou discos – de acordo com o equipamento ou número de amostras analisadas.

Aplicações

A técnica pode ser utilizada para diversas finalidades que se embasam na análise qualitativa (análise de alterações genéticas, mapeamento do DNA, determinação da taxa de mutações somáticas adquiridas, tipagem HLA) ou na análise quantitativa, como exemplos: a análise de metilação do DNA e a quantificação de carga viral. Assim, usada em áreas de pesquisas científicas como estudos de associação, determinação da prevalência do alelo dentro de uma população ou subgrupos, rastreamento de mutações e identificação de espécies.[7]

Diversos exames genéticos disponíveis em laboratórios clínicos podem ser realizados pela técnica de HRM na pesquisa de mutações associadas às doenças monogênicas, na análise de polimorfismos relacionados à predisposição para doenças complexas, na identificação de marcadores farmacogenéticos diversos e na análise quantitativa e tipagem de vírus. Como exemplos: mutações no gene *KRAS*, pesquisa da mutação V617F no gene *JAK2*, mutações da hemocromatose hereditária, polimorfismos associados à trombofilia (nos genes fator V de Leiden, protrombina e *MTHFR*), dentre outros.

No entanto, alguns pontos técnicos, relacionados no Quadro 1, devem ser observados para que os ensaios da análise da curva de *melting* sejam bem sucedidos. Existem também vantagens e desvantagens desta metodologia que podem viabilizar ou não sua utilização (Quadro 2), dependendo de aspectos interlaboratoriais, tais como: demanda, número de testes genéticos realizáveis, custos (manutenção dos equipamentos, tempo de consumo e estoque de segurança de reagentes específicos) e especificidade ou sensibilidade requerida no ensaio.

Quadro 1 - Observações técnicas para a análise da curva de *melting* bem sucedida
Para a discriminação alélica, é ideal analisar fragmentos pequenos (não superiores a 120 pb). Fragmentos menores possuem melhor diferenciação entre os genótipos, produtos maiores podem ser analisados com sucesso, no entanto, apresentam menor resolução. Todas as amostras devem ser de igual volume e conter a mesma concentração de reagentes, pois o comportamento de fusão do DNA pode ser afetado. Os tubos das reações devem ser idênticos, evitando assimvariações devido à espessura do plástico e propriedades de mensuração da fluorescência. Partir de concentraçõe iguais de DNA e garantir que todas as reações tenham, amplificado de forma semelhante. Parcelas de amplificações anormais com sinais de fluorescência baixos podem gerar dados inconclusivos ou errôneos.

Quadro 2 - Vantagens e desvantagens da análise da curva de *melting*
Vantagens: É um método simples e robusto Apresenta rapidez na execução das análises. Aplicável à ampla gama de ensaios genômicos e detecção de alterações genéticas para fins de pesquisa e de diagnósticos clínicos. Não é necessária a utilização de eltroforese e de reagentes mutagênicos para a visualização dos fragmentos. Elimina a necessidade da utilização de sondas de *primers.* Reduz a possibilidade de contaminação, devido ao simples processo de preparação das amostras ou a automação aplicada. Não requer nenhum processamento de pós-PCR. Desvantagens: Devido à preferência pela utilização de fragmentos pequenos, estes conduzem a uma flexibilidade reduzida na síntese dos *primers*. Outras variantes genéticas presentes no fragmento amplificado podem conduzir a erros de interpretação, pois pode alterar o padrão de curva da mutação em análise. Alterações genéticas classes 3 e 4 (trocas G/C e A/T) podem ser mais difíceis de diferenciar

Referências: Lin et al. (2011); Santos (2011; Gundry et al. (2008); Liew et al. (2004); Wiechec et al. (2011; White;Potts (2006)

Análise de polimorfismos

Segundo Gundry et al.[8] e Liew et al.,[9] as quatro classes das alterações de bases nucleotídicas podem ser identificadas pela análise de HRM. Os genótipos para os polimorfismos das classes 1 (trocas C/T e G/A) e 2 (trocas C/A e G/T), que representam aproximadamente 84% dos SNPs do genoma humano, são facilmente discriminados. Como exemplos, as Figuras 3 e 4 demonstram gráficos de genotipagem de SNPs das classes 1 e 2.

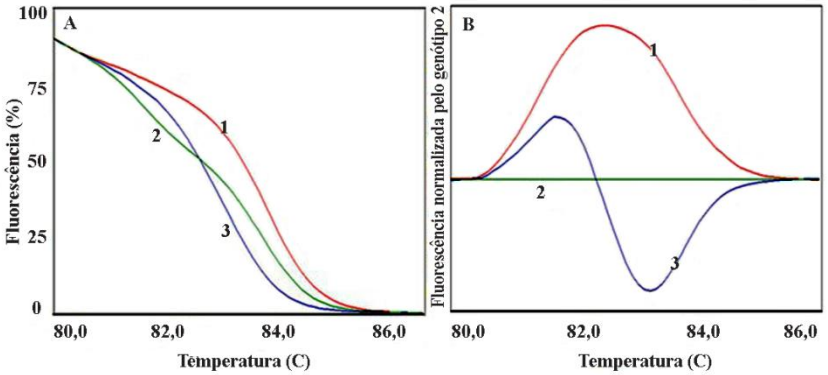

Figura *1800497). Alterações* *nucleotídicas* *de fluorescência por*

temperatura. B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseado genótipo 2) por temperatura. 1: genótipo selvagem (CC); 2: genótipo heterozigoto (CT); 3: genótipo homozigoto (TT).

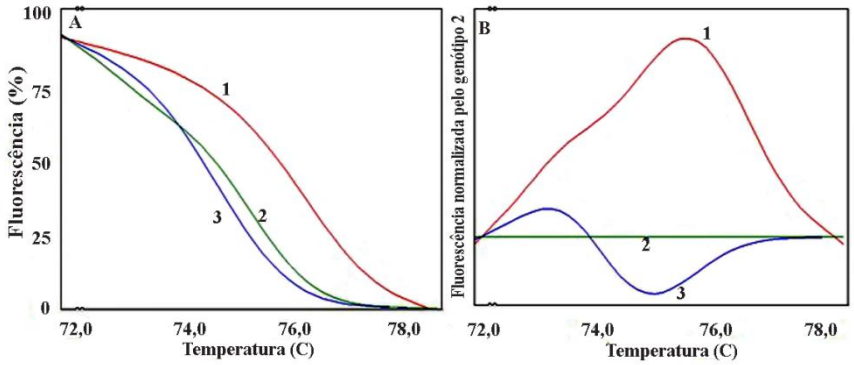

Figura 4. Gráficos da análise de melting *de polimorfismo de classe 2 (troca C/A; HMGCR rs3846662). Alterações nucleotídicas resultam em diferentes padrões de curva na análise da curva de* melting*. A: Gráfico de fluorescência por temperatura; B: Gráfico de fluorescência normalizada (baseado genótipo 2) por temperatura.1. genótipo selvagem (CC); 2: genótipo heterozigoto (CA); 3. genótipo homozigoto (AA).*

No entanto, a diferenciação dos genótipos para os polimorfismos das classes 3 (C/G) e 4 (T/A) é mais difícil pelo fato de as temperaturas para a fusão da fita de DNA dos homozigotos possuírem pequena variação (<0,4ºC), gerando curvas de *melting* com decaimentos semelhantes.[8,9]

Para possibilitar ou melhorar a genotipagem de SNPs de classes 3 e 4, pode-se usar o artifício da adição do genótipo selvagem em amostras desconhecidas. Santos et al.[10] reportaram que os genótipos homozigotos para a troca C>G foram facilmente distinguidos com a abordagem. Pode-se observar na Figura 5, primeiramente sem a adição, que os padrões de curvas de *melting* dos genótipos selvagem (CC) e homozigoto mutado (GG) são muito semelhantes e a curva gerada pelo genótipo heterozigoto (CG) possui um padrão diferenciado.

Já com a adição do genótipo selvagem (CC) nas amostras, as curvas geradas pelos genótipos selvagem e heterozigoto permanecem com a mesma característica; no entanto, a curva gerada pelo genótipo homozigoto mutado (GG) assume o padrão do genótipo heterozigoto, podendo assim, distinguir os três genótipos (Figura 5).[10]

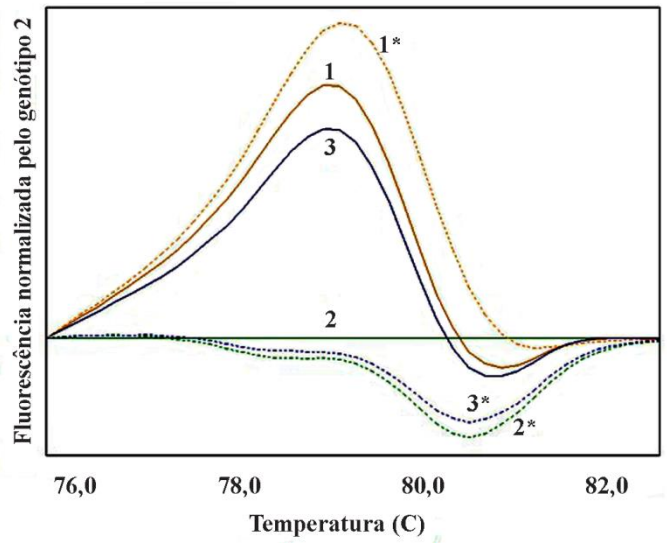

Figura 5. Gráficos da análise de melting *de polimorfismo de classe 4 (troca C/G; HFE rs). * Adição do genótipo selvagem (CC)1: genótipo selvagem (CC); 2: genótipo heterozigoto (CG); 3. Genótipo homozigoto (GG). Padrões de curvas para os genótipos selvagem e heterozigoto são diferentes e permanecem com a mesma característica, após a adição. Sem adição, a curva do genótipo homozigoto mutado apresenta curva semelhante ao genótipo selvagem. Após a adição, a curva do genótipo homozigoto apresenta similaridade à curva do genótipo heterozigoto.*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura internacional traz diversos testes moleculares realizados pela análise da curva de *melting* (HRM). Além disso, indicam inúmeras vantagens, principalmente: simples, rápida e de baixo custo. No entanto, a viabilidade dependerá de aspectos interlaboratoriais, tais como: demanda, número de testes genéticos realizáveis e custos de manutenção e de reagentes específicos.

Resumo
Molecular biology techniques allowed progress in diagnosis of numerous monogenic diseases, a better understanding on predisposition to polygenic disease and the discovery of genetic markers of sensitivity and resistance to some drugs. In this review, the main aims were to address the characteristics of the methodology of melting curve analysis (HRM – high resolution melting) and its applicability in identifying genetic variation. Also, some technical aspects and advantages and disadvantages of this methodology, depending on inter-laboratory aspects such as demand, number of genetic tests, costs (maintenance of equipment, consumption time and safety stock of specific reagents) or required sensitivity and specificity.

Keywords
Diagnosis; Laboratory test; Phenotype

REFERÊNCIAS

1. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. Eur J Surg Oncol. 2004 Aug;30(6):593-601.
2. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética médica. 3a ed. Editora Elsevier, 2004. p. 33-54.
3. Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. 6a ed. Editora Guanabara Koogan, 2002. p. 76-82.
4. Turnpenny PD, Ellard S. Emery genética médica.13a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
5. Santos PC, Dinardo CL, Schettert IT, Soares RA, Kawabata-Yoshihara L, Bensenor IM,et al. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms influence warfarin dose variability in patients on long-term anticoagulation. Eur J Clin Pharmacol. 2013 Apr;69 (4):789-97.
6. White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis: Evaluation of Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). National Genetics Reference Laboratory (Wessex, 2006).
7. Corbett. High resolution melt assay design and analysis: Rotor gene 6000. CorProtocol, 2006. p. 1-24.
8. Gundry CN, Dobrowolski SF, Martin YR, Robbins TC, Nay LM, Boyd N, et al. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons.. Nucleic Acids Res. 2008 Jun;36(10):3401-8.
9. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. Clin Chem. 2004 Jul;50(7):1156-64.
10. Santos PC, Soares RA, Krieger JE, Guerra-Shinohara EM, Pereira AC Genotyping of the hemochromatosis HFE p.H63D and p.C282Y mutations by high-resolution melting with the Rotor-Gene 6000® instrument. Clin Chem Lab Med. 2011 Oct; 49(10):1633-6.
11. Lin JT, Hsiao KJ, Chen CY, et al. High resolution melting analysis for the detection of SLC25A13 gene mutations in Taiwan. Clin Chim Acta. 2011 Feb;412(5-6):460-5.
12. Wiechec E, Wiuf C, Overgaard J, et al. High-resolution melting analysis for mutation screening of RGSL1, RGS16, and RGS8 in breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Feb;20 (2):397-407.

Correspondência
Paulo Caleb Júnior de Lima Santos
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Cerqueira César
São Paulo, SP, Brasil