



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

# **TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Evaluación de la distribución en una población uruguaya de los polimorfismos MTHFR C677T, RFC G80A y el número de repetidos en tándem en el 5' UTR de TYMS

Por Andrea Giletti Cateura

Tutora Dra. Patricia Esperón

Cátedra Biología Molecular – Facultad de Química



## **AGRADECIMIENTOS:**

Es mi intención agradecer por su enorme colaboración a la elaboración a este trabajo a la Dra. Patricia Esperón, Mag. Marcelo Vital y Bach. Victoria Pérez.

## Tabla de contenido

Resumen .....	5
Introducción.....	6
Objetivo.....	13
Materiales y Métodos.....	13
Polimorfismo C677T MTHFR.....	15
Polimorfismo G80A RFC .....	18
Polimorfismo 2R o 3R TYMS .....	22
Descripción estadística de un polimorfismo .....	26
Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	27
Resultados.....	28
Análisis del polimorfismo MTHFR .....	28
Análisis del polimorfismo RFC .....	30
Análisis del polimorfismo TYMS .....	31
Conclusiones .....	35
Polimorfismo MTHFR.....	35
Polimorfismo RFC .....	36
Polimorfismo TYMS.....	36
Conclusiones Generales .....	37
Perspectivas Futuras.....	37
Referencias Bibliográficas .....	39

## **Resumen**

La farmacogenética analiza las causas genéticas subyacentes a la diversidad de respuestas que se observan para una misma dosis de un determinado medicamento, siendo su principal objetivo optimizar al máximo el cociente beneficio/riesgo de un tratamiento.

Una de las principales ramas de la medicina en la cual la farmacogenética tiene un rol importante es la hemato-oncología. Entre los tratamientos empleados por esta se encuentra la quimioterapia y el fármaco más utilizado en estos tratamientos es el metotrexate. Aunque altamente efectivo, existe una gran variabilidad entre los pacientes en cuanto a la respuesta farmacológica y a su toxicidad, la cual puede ser limitante del tratamiento. Una de las causas de esta variabilidad es la existencia de polimorfismos en los genes que codifican enzimas dianas del metotrexate como lo son entre otras MTHFR, RFC y TYMS.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la distribución en una población uruguaya de los polimorfismos MTHFR C677T, RFC G80A y el número de repetidos en tándem en el 5' UTR de TYMS. Para esto se realizaron extracciones de ADN de muestras de saliva o sangre periférica de 57 voluntarios, reacciones de PCR-RFLP y se calcularon las frecuencias fenotípicas y genotípicas para cada uno de ellos.

En suma, disponemos en nuestro país de las herramientas necesarias para la realización de la determinación de estos polimorfismos. Estos diagnósticos moleculares pueden ser un factor más a tomar en cuenta, a la hora de ajustar la dosis a administrar de metotrexate a cada paciente. La ventaja de incluir estos diagnósticos consistirá en una disminución el número de pacientes con efectos adversos al metotrexate y/o la intensidad de los mismos, lo cual tiene una gran relevancia tanto a nivel humano como a nivel económico.

## **Introducción**

Las variaciones interindividuales en la respuesta a los fármacos pueden deberse a los efectos de la edad o el sexo, a alteraciones de la función hepática y/o renal y a interacciones medicamentosas. Sin embargo, en la actualidad está claramente establecido que además estas variaciones pueden deberse a los efectos de la información genética de cada individuo.

La farmacogenética surgió en la década de 1950 para explicar la contribución de la herencia genética a la diferente respuesta a los medicamentos. Tras las evidencias iniciales, obtenidas en los años sesenta, de que la respuesta podría estar condicionada por variaciones determinadas genéticamente en la actividad de ciertas enzimas, en la década de 1980 se demostró la importancia del polimorfismo genético en el perfil farmacocinético y se empezó a dilucidar la base molecular de dichos polimorfismos, lográndose la clonación y caracterización de algunos genes polimórficos. En los años noventa comenzaron a utilizarse los métodos farmacogenéticos en la clínica, aunque fundamentalmente con fines de investigación. En la actualidad numerosos ensayos clínicos han incorporado métodos farmacogenéticos con el fin de seleccionar a los pacientes que mejor pueden beneficiarse de los tratamientos farmacológicos (1).

La farmacogenética analiza las causas genéticas subyacentes a la diversidad de respuestas que se observan para una misma dosis de un determinado medicamento. Por ello puede entenderse como el análisis y uso de la información genética, individual o poblacional, para predecir el metabolismo, toxicidad y/o eficacia de los medicamentos, en el contexto de la investigación y desarrollo de éstos o en la práctica clínica con el fin de mejorar su efectividad.

Los objetivos que se plantean en los estudios farmacogenéticos son generalmente: a)

identificación y caracterización de polimorfismos o de determinados genes; b) correlación de los mismos con los resultados del tratamiento, y c) el desarrollo de tests genéticos que permitan predecir la respuesta, el fármaco o la dosis más adecuados para un paciente concreto, en definitiva, un tratamiento ajustado a cada perfil genético individual. Por lo tanto el objetivo último es prevenir la toxicidad y/o la ineficacia terapéutica de una terapia farmacológica o, dicho de otro modo, optimizar al máximo el cociente beneficio/riesgo de un tratamiento (1).

Es bien conocida la heterogeneidad en la eficacia y toxicidad de los fármacos, como por ejemplo aquellos empleados en la quimioterapia antineoplásica en los pacientes con cáncer. Una importante cantidad de factores pueden influir en la farmacocinética y en la respuesta de cualquier fármaco. En la respuesta farmacológica intervienen, entre otros factores, enzimas responsables del metabolismo de los fármacos (y/o de sustancias endógenas implicadas en la acción de estos), bombas transportadoras de fármacos (y/o de sustancias endógenas como por ejemplo neurotransmisores, hormonas, etc.) y receptores o dianas terapéuticas en general. Todos estos factores sabemos que presentan variantes genéticas que condicionan la farmacocinética o la farmacodinamia y, por consiguiente, la eficacia terapéutica y la toxicidad de cualquier tratamiento medicamentoso (1).

Una de las muchas ramas de la medicina en la cual la farmacogenética tiene un rol importante es la hemato-oncología. Esta es la rama de la medicina que se encarga del estudio, diagnóstico y tratamiento de enfermedades benignas y malignas concernientes a las células y componentes sanguíneos. Aquellas patologías malignas de la sangre, en adultos o niños son los que ocupan a la hemato-oncología. Se destacan por consiguiente enfermedades de los glóbulos blancos (leucopenias, leucemias, mielomas, linfomas, etc.),

glóbulos rojos (anemias congénitas y adquiridas), plaquetas (púrpuras) y factores de coagulación (trombosis y hemofilias entre otras).

Entre los tratamientos empleados por la hematooncología se encuentra la quimioterapia. La misma se define como el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, mediante la administración de fármacos, que tienen como función el impedir la proliferación de las células cancerosas. Tiene un elevado riesgo de toxicidad y es importante la obtención de una buena eficacia terapéutica, por lo que la farmacogenética tiene una extraordinaria importancia en la oncología. Un reflejo de esta importancia es que la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) ha implementado recientemente cambios en la información sobre los fármacos anticancerosos como el 6-mercaptopurina, irinotecán y el tamoxifén, para incluir información farmacogenética sobre éstos (1).

El metotrexate tiene su origen a mediados de 1940, cuando el Dr. Sidney Farber del Hospital Infantil de Boston estudiaba el efecto del ácido fólico en la leucemia aguda infantil. Fue administrado a un grupo de niños enfermos de leucemia, comprobándose su efecto beneficioso, por lo que se considera que el metotrexate marcó el comienzo de la quimioterapia en oncología. Desde entonces ha sido el fármaco más utilizado en los tratamientos de quimioterapia hemato-oncológica. Reafirmando su vigencia e importancia este año el Instituto Nacional de Cancer de U.S.A. publicó en su boletín que investigadores del Grupo Oncológico Infantil indican en un estudio clínico de fase III que al aumentar radicalmente la dosis de metotrexate utilizada para tratar pacientes con riesgo alto de leucemia linfoblástica aguda de células B se mejora significativamente la supervivencia sin enfermedad a 5 años, en comparación con el tratamiento estándar actual (2).

El metotrexate es un análogo estructural del ácido fólico y por lo tanto su antagonista. Elimina células durante la fase S del ciclo celular e incluso hace más lenta la entrada de las células en la fase S, esto lo logra ya que los folatos son esenciales para la síntesis de nucleótidos purínicos y de timidilato, que a su vez son fundamentales para la síntesis de ADN y la división celular. La principal misión de los antagonistas del folato como el metotrexate consiste en interferir en una secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de timidilato (1, 3, 4). Entra a las células vía una familia de transportadores de solutos conocida como transportador de folato reducido (RFC o SLC19A1) y luego necesita ser activado por una gamma-glutamyl hidrolasa (GGH) a una forma poliglutamado. Esto bloquea a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), inhibiendo el metabolismo de purinas, al mismo tiempo que impide la síntesis proteica al bloquear la conversión de otros aminoácidos. Además, el metotrexate poliglutamado puede interferir con la thymidylato sintetasa (TYMS) y con 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotido transformilasa (AICAR). Por último, el metotrexate poliglutamado también puede interferir con la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR), causando niveles elevados de homocisteina y toxicidad (5, 6).

Actualmente el metotrexate es uno de los fármacos más utilizados en la quimioterapia combinada en las enfermedades neoplásicas gracias a su efecto antiproliferativo y en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y la psoriasis gracias a su efecto inmunosupresor. Aunque altamente efectivo, existe una gran variabilidad entre los pacientes en cuanto a la respuesta farmacológica y a su toxicidad, la cual puede ser limitante del tratamiento (1, 4). Algunos de los posibles efectos secundarios son: trombocitopenia, aumento de las enzimas hepáticas, pancitopenia, mucositis, estomatitis, fibrosis hepática, cirrosis, neumonitis, neurotoxicidad, complicaciones gastrointestinales y alopecia (1, 3, 6, 7).

Una de las causas de esta variabilidad entre los pacientes es la existencia de polimorfismos en los genes que codifican enzimas dianas del metotrexate como lo son MTHFR, RFC y TYMS. La detección de estos polimorfismos puede ser útil para identificar a los pacientes con riesgo alto de presentar toxicidad durante el tratamiento con metotrexate (1, 5, 8).

Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia de ADN en una posición concreta del genoma denominada locus, que son tan comunes que se encuentran en más del 1% de los cromosomas en la población general. Existen muchos tipos de polimorfismos. Algunos se producen por variantes de centenares a millones de pares de bases de ADN, debidas a deleciones, duplicaciones, triplicaciones. Otras pueden deberse a cambios en una o unas pocas bases del ADN localizado entre genes o en los intrones lo cual no tiene consecuencias para el funcionamiento del gen, pueden situarse en la secuencia codificante de los propios genes y dar como resultado diferentes variantes de proteínas que pueden ocasionar fenotipos distintos, o pueden estar en regiones reguladoras y afectar a la transcripción o a la estabilidad del ARNm (9). Cada una de las distintas variaciones que podemos encontrar en un locus se denominan alelos, en el caso de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) normalmente los alelos posibles en un locus son 2 aunque pueden ser más. Si el locus corresponde a un cromosoma autosómico, cada individuo es portador de 2 alelos uno en cada copia de un cromosoma. Cuando los 2 alelos son idénticos en un locus tienen un genotipo (conjunto de alelos en un único locus) que se denomina homocigoto y los que tienen diferentes alelos en un locus un genotipo heterocigoto.

La MTHFR es inhibida por el metotrexate ya que la misma participa en la regulación del folato intracelular, compuesto esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Esta enzima cataliza la transformación de 5,10- metilentetrahidrofolato a 5-tetrahidrofolato, un donante de

grupos metilo necesario para la conversión de homocisteína en metionina. La deficiencia en su actividad está relacionada con enfermedades neurológicas y vasculares. Se ha detectado un polimorfismo genético de un único nucleótido (SNP) bastante frecuente que consiste en una transición de citosina a timina en el nucleótido 677 (C677T), que implica la sustitución de alanina por valina. Esta variante está asociada a una baja actividad enzimática, del 35 % para los homocigotas para la mutación y del 60 % para los heterocigotas, y a valores de folato alterados. Se ha observado que los pacientes homocigotas para el alelo mutante TT y los heterocigotas CT presentan un mayor riesgo de efectos adversos tras el tratamiento con metotrexate que los pacientes con genotipo salvaje CC (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11). A modo de referencia, algunas de las frecuencias genotípicas reportadas en la bibliografía internacional entre el año 2003 y el 2009 son: población italiana CC 29,8%, CT 50,2% y TT 20,1% (3); población argentina CC 45%, CT 41% y TT 14% (12); población países bajos CC 45%, CT 46% y TT 9% (5); población europea CC 50%, CT 40% y TT 10% (1); población española CC 50%, CT 40% y TT 10% (7); población estadounidense CC 35%, CT 50% y TT 15% (6).

La RFC media el mecanismo de transporte activo mediante el cual el metotrexate entra a la célula (8, 13, 16). El transporte defectivo al interior celular ocurre como resultado de polimorfismos en el RFC que inactivan la enzima o cambian la función de factores de transcripción llevando a la pérdida de la expresión génica de RFC. Se ha detectado un polimorfismo genético de un único nucleótido (SNP) que consiste en una sustitución de una guanina por una adenosina en la posición 80 del gen que lleva a un cambio de aminoácidos en el codón 27 de arginina por histidina, sustitución que se encuentra formando parte de la región que codifica para el primer dominio transmembrana de la proteína (8, 11, 14, 15, 16). El mismo afecta la actividad transcripcional del gen RFC y por lo tanto la entrada de metotrexate a la célula (8). Los pacientes homocigotas para el alelo mutante AA presentan

más altos niveles de metotrexate en sangre y por lo tanto riesgo a sufrir efectos adversos, que los pacientes pertenecientes a los grupos genotípicos GG y GA (5, 9, 13, 14, 17, 18). A modo de referencia, algunas de las frecuencias genotípicas reportadas en la bibliografía internacional entre el año 2002 y el 2007 son: población canadiense GG 33,1%, GA 46,2% y AA 20,7% (17); población europea GG 30%, GA 52% y AA 18% (19); población estadounidense GG 31,5%, GA 49,1% y AA 19,4% (14); población países bajos GG 33%, GA 48% y AA 19% (5); población tailandesa GG 27,3%, GA 54,6% y AA 18,1% (16).

La TYMS es inhibida por la forma poliglutamada del metotrexate ya que la misma se encarga de convertir deoxiuridilato a deoxitimidilato en la vía biosintética de novo de la pirimidina. La inhibición lleva a una disminución de deoxitimidilato y al aumento de la incorporación incorrecta de uracilo al ácido nucleico, lo cual lleva a daño cromosómico y muerte celular. Se ha identificado un polimorfismo de repetición en tándem con número variable de copias (VNTR) de secuencia de 28 nucleótidos en la región 5' UTR del gen TYMS, las variantes más comunes del polimorfismo son dos y tres repetidos (2R y 3R). El repetido tiene una función de potenciador, al incrementarse el número de repetidos aumenta la expresión del ARNm de TYMS y su actividad enzimática (8, 9, 14, 15, 16, 20, 21). A modo de referencia, algunas de las frecuencias genotípicas reportadas en la bibliografía internacional entre el año 2001 y el 2007 son: población japonesa 2R/2R 4,6%, 2R/3R 34,6% y 3R/3R 60,8% (21); población estadounidense 2R/2R + 2R/3R 69,8% y 3R/3R 30,2% (14); población francesa 2R/2R 41,6%, 2R/3R 51% y 3R/3R 32% (20); población tailandesa 2R/2R 0%, 2R/3R 31,8% y 3R/3R 63,6% (16).

## **Objetivo**

En este trabajo se evaluará la distribución de los polimorfismos MTHFR C677T, RFC G80A y el número de repetidos en tándem en el 5' UTR de TYMS en una población uruguaya de 57 individuos.

## **Materiales y Métodos**

Para la detección de dichos polimorfismos se realizó en primer lugar una extracción de ADN de muestras de saliva o sangre periférica de 57 voluntarios utilizando un kit comercial. Posteriormente se realizó una PCR-RFLP para analizar los polimorfismos MTHFR C677T y RFC G80A, mientras que para analizar el polimorfismo TYMS solo se realizó una PCR. Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto que fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química y se obtuvo un consentimiento informado de los voluntarios que participaron en el mismo.

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es un método de síntesis enzimático que se utiliza para amplificar fragmentos específicos de ADN in vitro. Utiliza un ADN molde, dos cebadores oligonucleotídicos (primers), desoxinucleótidos y una enzima con actividad polimerasa. Consiste en una serie de ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y polimerización. Como los productos sintetizados en cada ciclo sirven de molde para el ciclo siguiente, el número de copias de ADN blanco aumenta exponencialmente a lo largo de la reacción, permitiéndonos al terminar obtener una gran cantidad de copias del fragmento de interés.

El PCR-RFLP o polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción es una técnica que radica en el corte con enzimas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si un amplicón presenta una variación de la secuencia nucleotídica en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción va a perder el sitio de restricción, mientras que lo opuesto también puede suceder, una variación en la secuencia nucleotídica puede generar un sitio de restricción para una enzima que antes no existía. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, lo cual proporciona distintos patrones de bandas que me permiten detectar la existencia o no de dicha variación puntual.

La electroforesis es una técnica empleada para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico, la misma está determinada por la longitud y la conformación de las moléculas. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido, en disolución o a través de una matriz porosa. En este trabajo se realizó a través de una matriz porosa, como lo es un gel de poliacrilamida, la separación de fragmentos amplificados por PCR y digeridos con enzimas de restricción. Los ácidos nucleicos disponen de una carga eléctrica negativa, por lo que al aplicarles un campo eléctrico estos se moverán hacia el polo positivo atravesando los poros la matriz del gel. La velocidad de movimiento de las moléculas de ácidos nucleicos va a depender del tamaño molecular de los mismos, es por esta razón que las moléculas de pequeño tamaño molecular migraran más rápido a través de la matriz del gel que las de gran tamaño molecular.

Para el diseño de los cebadores oligonucleotídicos o también llamados primers utilizados en las tres reacciones de PCR de este trabajo, se descargaron las secuencias nucleotídicas de los tres genes a estudiar, de la base de datos de secuencias genéticas del National Center for

Biotechnology Information (NCBI) llamada Gen Bank disponible en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. A partir de dichas secuencias, utilizando como herramienta informática el programa Gene Runner versión 3.05 (Hastings Software, Inc.), se diseñaron los primers necesarios para obtener un producto de PCR que contenga el cambio nucleotídico a estudiar. Una vez diseñados los primers y conociendo las secuencias de los productos de PCR, para el posterior análisis por RFLP de los polimorfismos C677T MTHFR y G80A RFC, se seleccionaron las enzimas de restricciones a emplear y el tamaño de los fragmentos de restricción utilizando como herramienta informática el programa Gene Runner anteriormente mencionado y la página web <http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php> de la Universidad de Waterloo, Ontario, Canada.

La secuenciación de ADN es la determinación del orden de los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN, la misma puede llevarse a cabo mediante distintos métodos. En este trabajo se empleo para corroborar que el producto de amplificación obtenido en la puesta a punto de la PCR fuera el fragmento de interés.

### **Polimorfismo C677T MTHFR**

A las 57 muestras de ADN a analizar se les realizó una reacción de PCR utilizando: un buffer 10x de la enzima polimerasa *Taq*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTP, 200 μM del oligonucleótido sentido, 200 μM del oligonucleótido antisentido, 0,03 U de enzima polimerasa (*Taq* DNA Polymerase (recombinant), Fermentas), agua estéril libre de ADNasa y 2 μl de ADN en un volumen final de reacción de 20 μl. Tomando en consideración las T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos utilizados en la PCR, temperatura característica de cada oligonucleótido a la cual el 50% de las bases se encuentran hibridadas a su secuencia complementaria, las condiciones de la misma consistieron en una desnaturalización a 95°C por 3 minutos,

seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; culminados los ciclos se realizó una polimerización final por 5 minutos a 72°C. Para la visualización del producto amplificado, un fragmento de 318 pb, se corrió junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) en un gel de poliacrilamida al 6% durante 1 hora a 100 V. Una vez finalizada la corrida electroforética el revelado del gel se realizó sumergiendo el mismo en una solución de fijador (compuesta por 89,46% agua desionizada, 10% alcohol y 0,4% acético) por 5 minutos, luego en una solución nitrato de plata (al 0,3%) por 8 minutos, se lava el gel en agua desionizada por 10 segundos y finalmente se lo deja en una solución reveladora (3% soda, 96,5% agua y 0,5% formaldehído) durante el tiempo necesario para observar la bandas en el gel. Una vez confirmada la amplificación, el fragmento se sometió a una digestión enzimática con la enzima Hinf I (Fermentas) que posee sitios de corte en el fragmento, tiene un sitio de corte control y reconoce un sitio que se genera cuando la mutación está presente (Figura 1).

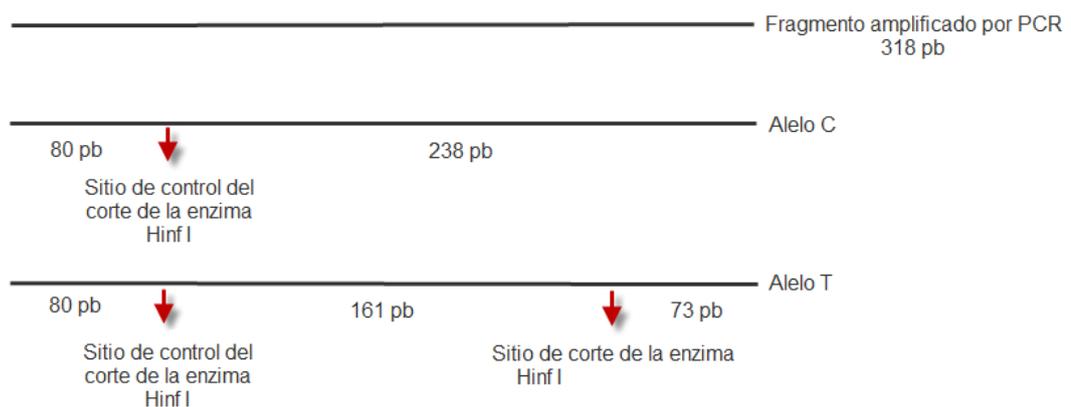


Figura 1. Diagrama en el cual se representan el fragmento amplificado por PCR antes de someterse a la digestión enzimática y los sitios de corte de la enzima Hinf I en dicho fragmento, para el polimorfismo MTHFR.

Para llevar a cabo la digestión se incubo 10 µl del producto de PCR con 0,001 unidades de enzima Hinf I a 37°C durante 3 horas. La misma se corre en un gel de poliacrilamida al 6% durante 1 hora a 100 V y el gel se revela del modo que se explico anteriormente. Al visualizar el gel donde se corrieron las digestiones se espera observar, cuando la mutación no está presente, un patrón de bandas característico que consiste en dos fragmentos de 80 pb y 238 pb, cuando la mutación está presente se observan tres fragmentos de 73 pb, 80 pb y 165 pb. Por lo tanto para realizar el diagnostico los individuos homocigotas normales se verán como un patrón de bandas de 80 y 238 pb, los individuos homocigotas para la mutación como un patrón de bandas de 73, 80 y 165 pb, mientras que los individuos heterocigotas se verán como un patrón de bandas combinado de 73, 80, 165 y 238 pb (Figura 2).

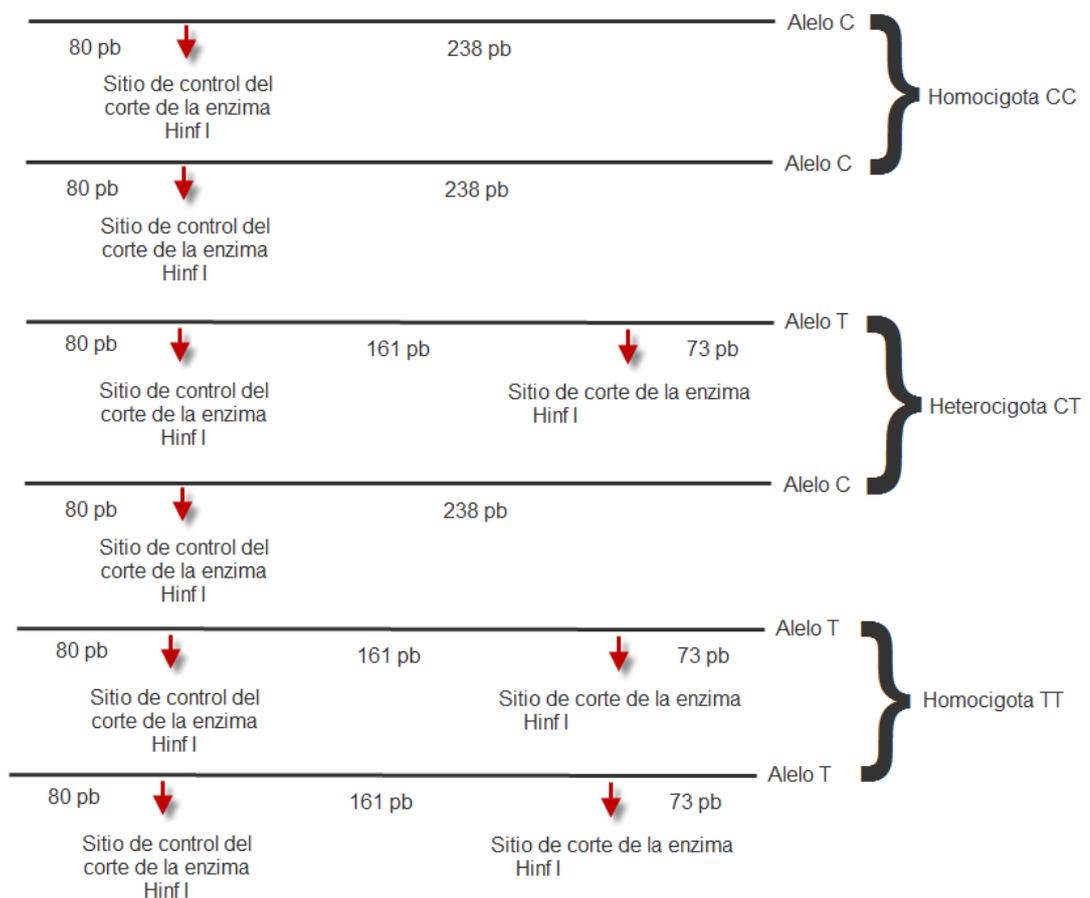


Figura 2. Diagrama de la digestión del fragmento amplificado por PCR esperada para los genotipos CC, CT y TT del polimorfismo MTHFR.

Como resultado de haber utilizado como molde para las reacciones de PCR ADN obtenido a partir de muestras de sangre periférica y de saliva, no se logró la amplificación en todos los casos. Se confirmó la amplificación del producto de PCR cuando se utilizó como molde ADN obtenido a partir de muestras de sangre periférica, pero no se confirmó cuando se utilizó como molde ADN obtenido a partir de muestras de saliva. Se corrieron en un gel de agarosa los ADN obtenidos a partir de muestras de saliva junto con una muestra de ADN obtenida a partir de sangre periférica que si se había logrado amplificar como control. Una vez finalizada la corrida electroforética se colocó el gel de agarosa sobre una lámpara de luz ultravioleta y se observó que la intensidad de las bandas correspondientes a las muestras de ADN obtenidas de saliva era menor a la intensidad de la banda de la muestra de ADN obtenida de sangre periférica utilizada como control. Por lo que se modificó la reacción de PCR, en las que se utilizó ADN obtenido a partir de muestras de saliva, aumentando el volumen de ADN empleado en la reacción de 2 a 4  $\mu$ l. Al correrlo en un gel de poliacrilamida para su visualización se pudo confirmar la presencia de producto de amplificación.

### **Polimorfismo G80A RFC**

En segunda instancia, con intención de estudiar el polimorfismo G80A del gen RFC, se ensayaron protocolos con diferentes condiciones.

La primera prueba realizada consistió en una reacción de PCR utilizando: un buffer 10x de la enzima polimerasa *Taq*, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de cada dNTP, 200  $\mu$ M del oligonucleótido sentido con una  $T_m$  de 64,1°C, 200  $\mu$ M del oligonucleótido antisentido con

una  $T_m$  de 58,8°C, 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (inhibe las estructuras secundarias tanto en el ADN molde como en los primers, las cuales obstaculizan la hibridación y la función de la enzima polimerasa), 0,03 U de enzima polimerasa (*Taq* DNA Polymerase (recombinant), Fermentas), agua estéril libre de ADNasa y 2  $\mu$ l de ADN en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l. Tomando en consideración las  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizados en la PCR las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 54°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; culminados los ciclos se realizó una polimerización final por 5 minutos a 72°C. Para su visualización el producto amplificado, un fragmento de 205 pb, se corrió junto con un marcador de peso molecular de 50 pb (O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder ready to use, Fermentas) en un gel de poliacrilamida al 6% durante 40 minutos a 100 V. Al finalizar la corrida electroforética el gel fue revelado como se explico anteriormente. Se observaron dos bandas en el mismo, una de mayor intensidad con un peso molecular aproximado de 205 pb y una de menor intensidad con un peso molecular aproximado de 300 pb.

Con la intención de obtener únicamente la banda de 205 pb se realizó una segunda prueba que solamente difería de la primera prueba en la temperatura de hibridación de la PCR que se cambio de 54°C a 56°C. Esta decisión se basó en que al aumentar la temperatura de hibridación de la PCR se favorece la especificidad de unión entre el primer y el ADN molde y por tanto disminuyen las uniones inespecíficas. Al revelar el gel se observó el mismo patrón de bandas que en la primera prueba.

Se realizó una tercera prueba la cual únicamente difería de la primera en la concentración de  $MgCl_2$  utilizada, que pasó de 1,5 mM a 1,0 mM, ya que altas concentraciones de  $MgCl_2$

incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN y podrían ser la causa de la amplificación inespecífica de la banda observada de 300 pb. Al revelar el gel se observó una única banda de 205 pb aproximadamente, la cual se correspondía con el tamaño del producto de PCR que esperaba obtener.

Por último, con la intención de ver si podía aumentar la cantidad de producto amplificado y por tanto mejorar la intensidad de la banda observada en la tercera prueba, se modificó únicamente la temperatura de hibridación de la PCR que se cambió de 54°C a 56°C. Como la intensidad de la banda empeoró se decidió utilizar el protocolo de la tercera prueba para el análisis de todas las muestras de ADN.

Por lo tanto a las 57 muestras de ADN a analizar se les realizó una reacción de PCR utilizando: un buffer 10x de la enzima polimerasa *Taq*, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTP, 200 μM del oligonucleótido sentido con una T<sub>m</sub> de 64,1°C, 200 μM del oligonucleótido antisentido con una T<sub>m</sub> de 58,8°C, 5% de dimetil sulfóxido o DMSO, 0,03 U de enzima polimerasa (*Taq* DNA Polymerase (recombinant), Fermentas), agua estéril libre de ADNasa y 2 μl de ADN en un volumen final de reacción de 20 μl. Tomando en consideración las T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos utilizados en la PCR las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 54°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; culminados los ciclos se realizó una polimerización final por 5 minutos a 72°C.. Para su visualización el producto amplificado, un fragmento de 205 pb, se corrió junto con un marcador de peso molecular de 50 pb (O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder ready to use, Fermentas) en un gel de poliacrilamida al 6% durante 40 minutos a 100 V. Al finalizar la corrida electroforética el gel fue revelado como se explicó anteriormente. Una vez confirmada

la amplificación, se sometió al producto de PCR a una digestión enzimática con la enzima Hha I (Fermentas) que corta el fragmento en un sitio control de la digestión y en un segundo sitio que se pierde cuando la mutación está presente (Figura 3).

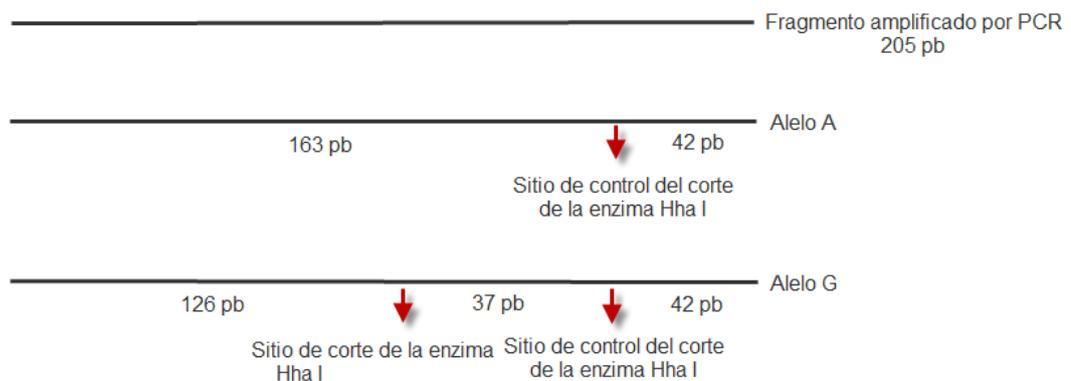


Figura 3. Diagrama en el cual se representan el fragmento amplificado por PCR antes de someterse a la digestión enzimática y los sitios de corte de la enzima Hha I en dicho fragmento, para el polimorfismo RFC.

Para llevar a cabo la digestión se incubó 10  $\mu$ l del producto de PCR con 0,001 unidades de enzima Hha I a 37°C durante 3 horas. La misma se corrió en un gel de poliacrilamida al 6% durante 1 hora a 100 V y el gel se reveló del modo que se explicó anteriormente. Al visualizar el gel donde se corrieron las digestiones espero observar cuando la mutación no está presente un patrón de bandas característico que consiste en tres fragmentos de 37 pb, 42 pb y 126 pb, cuando la mutación está presente se observan dos fragmentos de 42 pb y 163 pb. Por lo tanto para realizar el diagnóstico los individuos homocigotas normales se verán como un patrón de bandas de 37, 42 y 126 pb, los individuos homocigotas para la mutación como

un patrón de bandas de 42 y 163 pb, mientras que los individuos heterocigotas se verán como un patrón de bandas combinado de 37, 42, 126 y 163 pb (Figura 4).

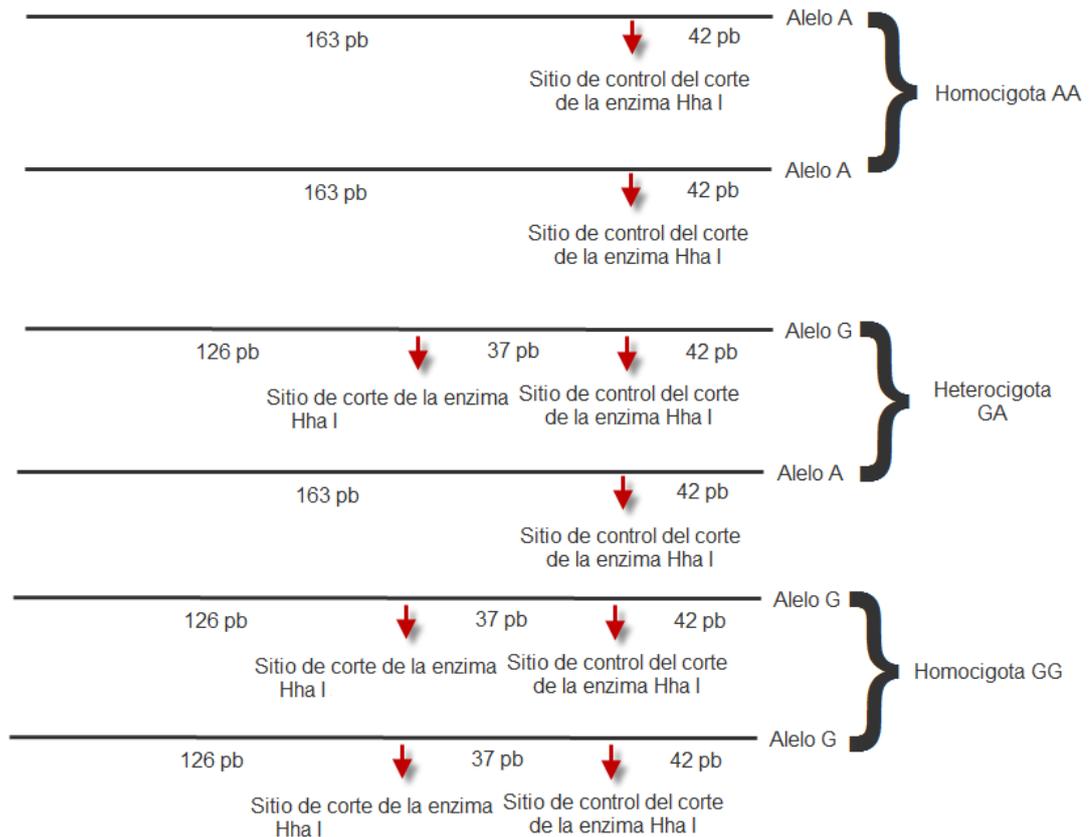


Figura 4. Diagrama de la digestión del fragmento amplificado por PCR esperada para los genotipos GG, GA y AA del polimorfismo RFC.

### **Polimorfismo 2R o 3R TYMS**

En la tercera instancia, con intención de estudiar el polimorfismo que surge de la inserción de repetidos en tandem en el 5' UTR del gen TYMS, se realizaron al igual que para el

polimorfismo G80A RFC pruebas de ensayo de protocolos utilizando como molde para los mismos dos muestras de ADN.

Las cuatro primeras pruebas realizadas consistieron en una reacción de PCR utilizando: un buffer 10x de la enzima polimerasa *Taq*, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  de cada dNTP, 200  $\mu M$  del oligonucleótido sentido con una  $T_m$  de 57,1°C, 200  $\mu M$  del oligonucleótido antisentido con una  $T_m$  de 59,1°C, 0,03 U de enzima polimerasa (*Taq* DNA Polymerase (recombinant), Fermentas), agua estéril libre de ADNasa y 2  $\mu l$  de ADN en un volumen final de reacción de 20  $\mu l$ . Tomando en consideración las  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizados en la PCR las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 52°C en la primera prueba a 53°C en la segunda a 54°C en la tercera a 55°C en la cuarta por 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; culminados los ciclos se realizó una polimerización final por 5 minutos a 72°C. Para su visualización, el producto amplificado se corrió junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) en un gel de poliacrilamida al 6% durante 50 minutos a 100 V. Al finalizar la corrida electroforética el gel fue revelado como se explico anteriormente. No se observó producto de amplificación en ninguna de las cuatro pruebas de ensayo.

Realice dos pruebas de ensayo más las cuales diferían de las primeras cuatro pruebas en la concentración de  $MgCl_2$  utilizada que pasó de 1,5 mM a 1,0 mM y en la temperatura de hibridación de la reacción de PCR. La quinta prueba utilizo una temperatura de hibridación de 54°C y la sexta de 55°C. Tampoco en este caso se observó producto de amplificación.

Por último se hicieron dos pruebas de ensayo más las cuales diferían de las primeras cuatro pruebas en que la temperatura de hibridación fue 53°C, a la reacción de PCR se le agregó

5% de DMSO y la concentración de  $MgCl_2$  utilizada fue de 1,5 mM para la séptima prueba y de 2,0 mM para la octava prueba ya que altas concentraciones de  $MgCl_2$  incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Se observó producto de amplificación en ambas pruebas, aunque fueron de mayor intensidad las bandas obtenidas a partir de la séptima prueba. Se decidió utilizar el protocolo de la séptima prueba para el análisis de todas las muestras de ADN.

Una vez puesta a punto la reacción de PCR se realizó una puesta a punto del tiempo y voltaje a los que debía correrse el producto amplificado en un gel de poliacrilamida al 6%. Se realizaron tres ensayos: el primero se corrió durante 50 minutos a 100 V, el segundo durante 80 minutos a 100 V y el tercero durante 100 minutos a 80 V. Se observó que las bandas del producto de amplificación se separaban mejor en el segundo ensayo corriendo durante 80 minutos a 100 V.

Por lo tanto a las 57 muestras de ADN a analizar se les realizó una reacción de PCR utilizando: un buffer 10x de la enzima polimerasa *Taq*, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  de cada dNTP, 200  $\mu M$  del oligonucleótido sentido con una  $T_m$  de 57,1°C, 200  $\mu M$  del oligonucleótido antisentido con una  $T_m$  de 59,1°C, 0,03 U de enzima polimerasa (*Taq* DNA Polymerase (recombinant), Fermentas), 5% de DMSO, agua estéril libre de ADNasa y 2  $\mu l$  de ADN en un volumen final de reacción de 20  $\mu l$ . Tomando en consideración las  $T_m$  de los oligonucleótidos utilizados en la PCR las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 53°C por 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; culminados los ciclos se realizó una polimerización final por 5 minutos a 72°C. Para su visualización, el producto amplificado se corrió junto con un marcador de peso molecular de 100 pb

(GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) en un gel de poliacrilamida al 6% durante 80 minutos a 100 V. Al finalizar la corrida electroforética el gel fue revelado como se explicó anteriormente. Dependiendo del número de repetidos presentes en el fragmento a amplificar de la muestra de ADN, el número de pares de bases del producto que vamos a obtener. Si el producto contiene dos repetidos (2R) el mismo va a tener 373 pb, mientras que si tiene tres repetidos (3R) va a tener 401 pb (Figura 5). El peso molecular de los productos de PCR se observará al correrlos en un gel de poliacrilamida al 6%.

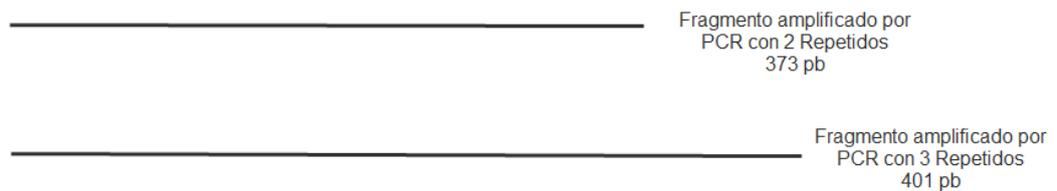


Figura 5. Diagrama en el cual se representan los fragmentos amplificados por PCR para el polimorfismo TYMS, con 2 y 3 repetidos en su secuencia.

Por lo tanto para realizar el diagnóstico los individuos homocigotas normales 2R se verán como una banda de 373 pb, los individuos homocigotas con un repetido de más 3R se verán como una banda de 401 pb, mientras que los individuos heterocigotas se verán como un patrón de bandas combinado de 373 y 401 pb (Figura 6).

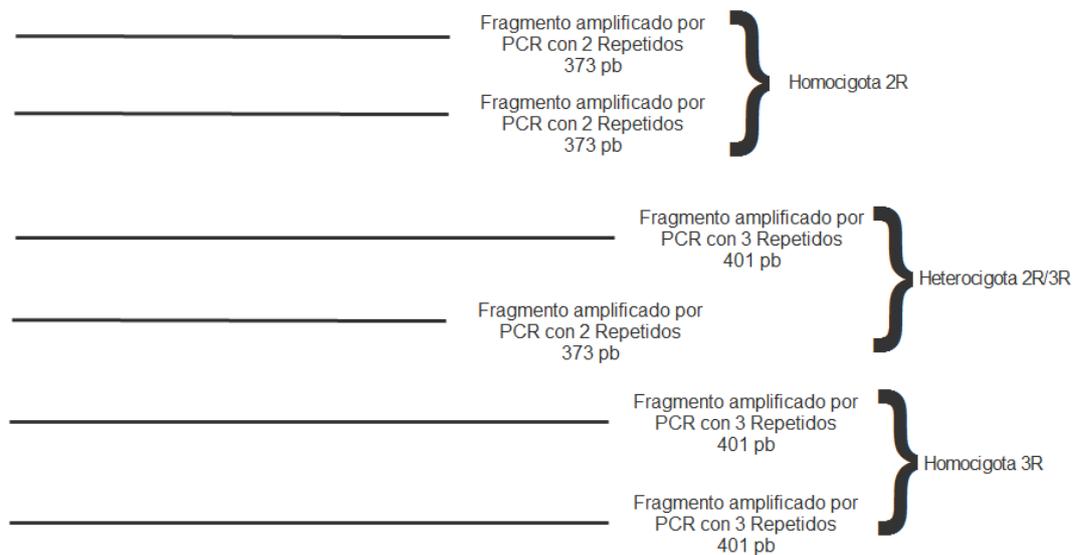


Figura 6. Diagrama del patrón de bandas esperado para los genotipos 2R, 2R/3R y 3R del polimorfismo TYMS.

### **Descripción estadística de un polimorfismo**

La descripción estadística de un polimorfismo consiste, en primer lugar, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que en nomenclatura genética se denomina estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. A partir de los diagnósticos moleculares determiné el genotipo de cada individuo. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estimaron directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo dentro del total de individuos analizados. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo. Por ejemplo para el polimorfismo MTHFR la frecuencia alélica del alelo C es:

$$\text{Frecuencia alelo C} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ individuos genotipo CC} \times 2) + \text{N}^\circ \text{ individuos genotipo CT}}{\text{N}^\circ \text{ muestras analizadas} \times 2}$$

### **Equilibrio de Hardy-Weinberg**

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo.

En nuestro ejemplo para el polimorfismo MTHFR, si llamamos  $p$  a la frecuencia del alelo C,  $q$  a la frecuencia del alelo T y  $N$  al tamaño de la muestra, las frecuencias esperadas de cada genotipo si se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg son:  $Np^2$  para el genotipo CC,  $Nq^2$  para el genotipo TT y  $2Npq$  para el genotipo CT.

Estas frecuencias esperadas (las llamaremos  $E$ ) calculadas se pueden comparar con las observadas (las llamaremos  $O$ ), calculadas al hacer la descripción estadística del polimorfismo, utilizando el test de la  $X^2$ . Para el mismo debo calcular  $X^2_{HW} = \sum (O-E)^2/E$  y a partir del mismo determinar (utilizando la tabla del test de  $X^2$ ) el valor de  $P$  con 1 grado de libertad.

## **Resultados**

### **Análisis del polimorfismo MTHFR**

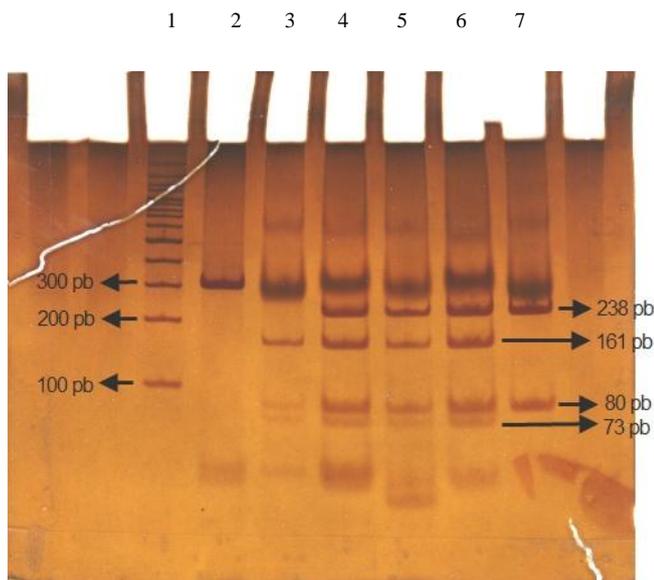
En la Figura 7 se puede observar uno de los geles de poliacrilamida en el cual se separaron mediante una electroforesis las digestiones realizadas con la enzima de restricción Hinf I al producto de PCR amplificado. En el mismo se encuentran ejemplos del patrón de bandas observado al correr las digestiones en los casos en que la muestra de ADN correspondía a un individuo homocigota CC, homocigota TT o heterocigota.

Una vez realizados todos los diagnósticos se construyó una tabla en la cual se indica para cada muestra analizada cual fue su diagnóstico molecular para el polimorfismo MTHFR, ver Tabla 1.

Se determinó que de las 57 muestras analizadas 31 presentan un genotipo homocigota CC lo cual representa una frecuencia genotípica de 54,39 %, 7 presentan un genotipo homocigota TT lo cual representa una frecuencia genotípica de 12,28 % y 19 presentan un genotipo heterocigota lo cual representa una frecuencia genotípica de 33,33 % (Figura 8).

Las frecuencias alélicas fueron para el alelo C de 0,71 mientras que para el alelo T fueron de 0,29.

Con los valores de frecuencia genotípica observada (para CC de 31, TT de 7 y CT de 19) y esperada (para CC de 28,7, TT de 4,8 y CT de 23,5) se observa que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para este polimorfismo ( $X^2$  2,05,  $P=0,15$ ).



**CARRILES:**

- 1- Marcador de Peso Molecular 100 pb.
- 2- Producto de PCR sin digerir.
- 3- Digestión del producto de PCR de la muestra P3.
- 4- Digestión del producto de PCR de la muestra P40.
- 5- Digestión del producto de PCR de la muestra P42.
- 6- Digestión del producto de PCR de la muestra P36.
- 7- Digestión del producto de PCR de la muestra P37.

Figura 7. Gel de poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnosticó el polimorfismo MTHFR para cinco muestras de ADN. En los carriles 3 se puede observar el patrón de bandas de un individuo Homocigota TT, en los carriles 4, 5 y 6 se puede observar el de un individuo Heterocigota CT, mientras que en el carril 7 se puede observar el de un individuo Homocigota CC.

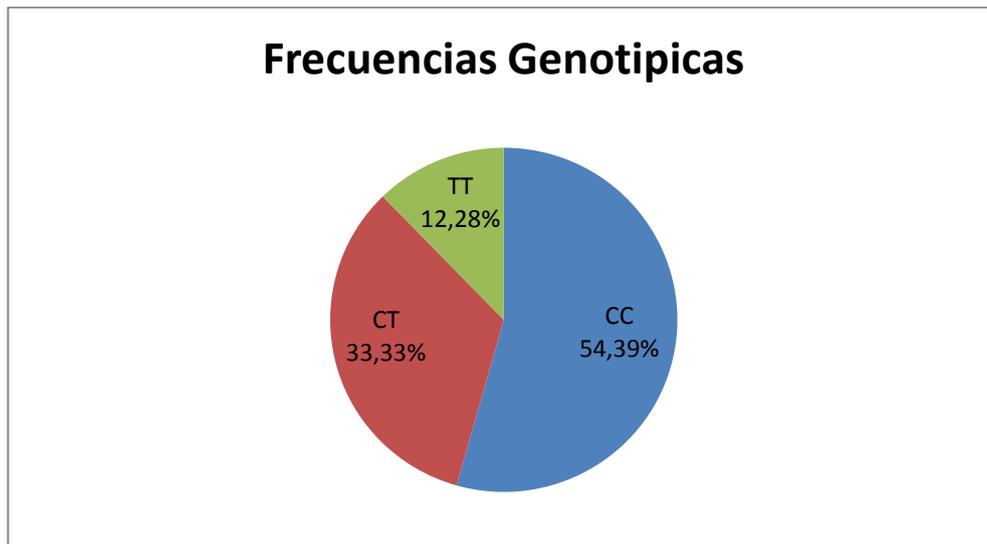


Figura 8. Grafico de frecuencias genotípicas observadas para el polimorfismo MTHFR.

## Análisis del polimorfismo RFC

En la Figura 9 se puede observar uno de los geles de poliacrilamida en el cual se separaron mediante una electroforesis las digestiones realizadas con la enzima de restricción Hha I al producto de PCR amplificado. En el mismo se encuentran ejemplos del patrón de bandas observado al correr las digestiones en los casos en que la muestra de ADN correspondía a un individuo homocigota GG, homocigota AA o heterocigota.

Una vez realizados todos los diagnósticos se construyó una tabla en la cual se indica para cada muestra analizada cual fue su diagnóstico molecular para el polimorfismo RFC, ver Tabla 1.

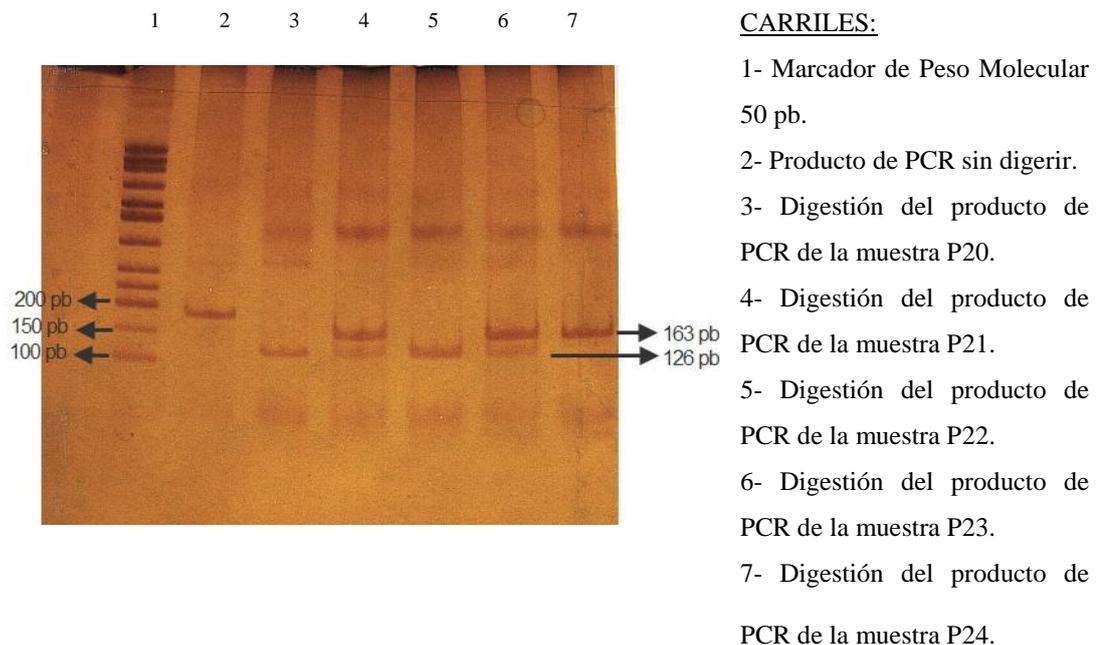


Figura 9. Gel de poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnosticó el polimorfismo RFC para cinco muestras de ADN. En los carriles 3 y 5 se puede observar el patrón de bandas de un individuo Homocigota GG, en los carriles 4 y 6 se puede observar el de un individuo Heterocigota GA, mientras que en el carril 7 se puede observar el de un individuo Homocigota AA.

Se determinó que de las 57 muestras analizadas 18 son homocigotas GG lo cual representa un 31,58 %, 11 son homocigotas AA lo cual representa un 19,30 % y 28 son heterocigotas lo cual representa un 49,12 % (Figura 10).

Las frecuencias alélicas fueron para el alelo G de 0,56 mientras que para el alelo A fueron de 0,44.

Con los valores de frecuencia genotípica observada (para GG de 18, AA de 11 y GA de 28) y esperada (para GG de 18, AA de 11 y GA de 28) se observa que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para este polimorfismo ( $X^2$  0.00035,  $P=0,98$ ).

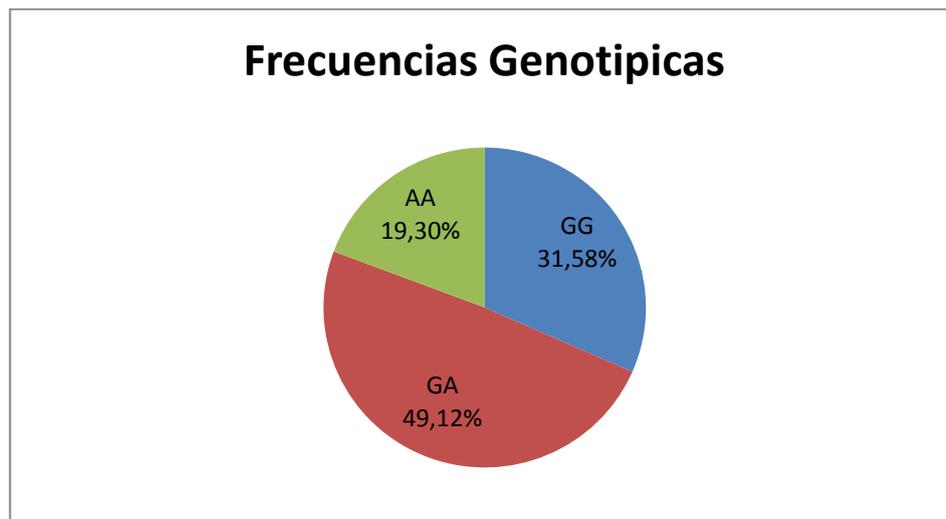
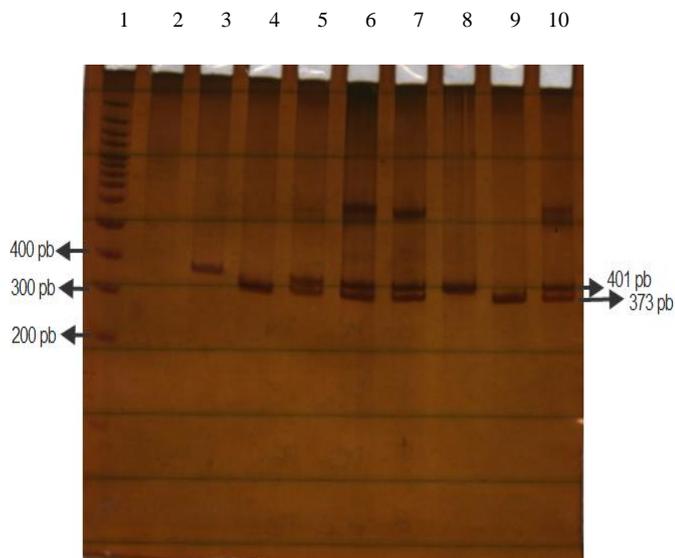


Figura 10. Gráfico de frecuencias genotípicas observadas para el polimorfismo RFC.

### **Análisis del polimorfismo TYMS**

En la Figura 11 se puede observar uno de los geles de poliacrilamida en el cual se corrieron mediante una electroforesis los productos de PCR amplificados. En el mismo, al observar la migración de las bandas, se encuentran ejemplos de los productos de PCR con dos repetidos en tándem (2R) y los que presentan tres repetidos en tándem (3R).



**CARRILES:**

1 – Marcador de Peso Molecular 100 pb.

2 – Producto de PCR sin digerir.

3 – Digestión del producto de PCR de la muestra P38.

4 – Digestión del producto de PCR de la muestra P39.

5 – Digestión del producto de PCR de la muestra P40.

6 – Digestión del producto de PCR de la muestra P41.

7 – Digestión del producto de PCR de la muestra P42.

8 – Digestión del producto de PCR de la muestra P43.

9 – Digestión del producto de PCR de la muestra P44.

10 – Digestión del producto de PCR

Figura 11. Gel de poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnosticó el polimorfismo TYMS para ocho muestras de ADN. En los carriles 3 y 8 se puede observar el patrón de bandas de un individuo Homocigota 3R, en los carriles 5, 6, 7 y 10 se puede observar el de un individuo Heterocigota 2R/3R, mientras que en los carriles 4 y 9 se puede observar el de un individuo Homocigota 2R.

Respecto a los diagnósticos, no se logro la amplificación por PCR de las muestras P35 y P72 mediante la reacción de PCR. Se probaron todas las variantes de temperatura y concentraciones utilizadas en las pruebas de ensayo, pero de todas formas no se logro

amplificar dichas muestras. Una vez realizados el resto de los diagnósticos se construyó una tabla en la cual se indica para cada muestra analizada, si lo hubo, cuál fue su diagnóstico molecular para el polimorfismo TYMS, ver Tabla 1.

Se determinó que de las 55 muestras analizadas 17 son homocigotas 2R lo cual representa un 30,9 %, 16 son homocigotas 3R lo cual representa un 29,1 % y 22 son heterocigotas lo cual representa un 40 % (Figura 12).

Las frecuencias alélicas fueron para el alelo 2R de 0,51 mientras que para el alelo 3R fueron de 0,49.

Con los valores de frecuencia genotípica observada (para 2R/2R de 17, 3R/3R de 16 y 2R/3R de 22) y esperada (para 2R/2R de 14,3, 3R/3R de 13,3 y 2R/3R de 27,5) se observa que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para este polimorfismo ( $\chi^2$  2,19,  $P=0,14$ ).

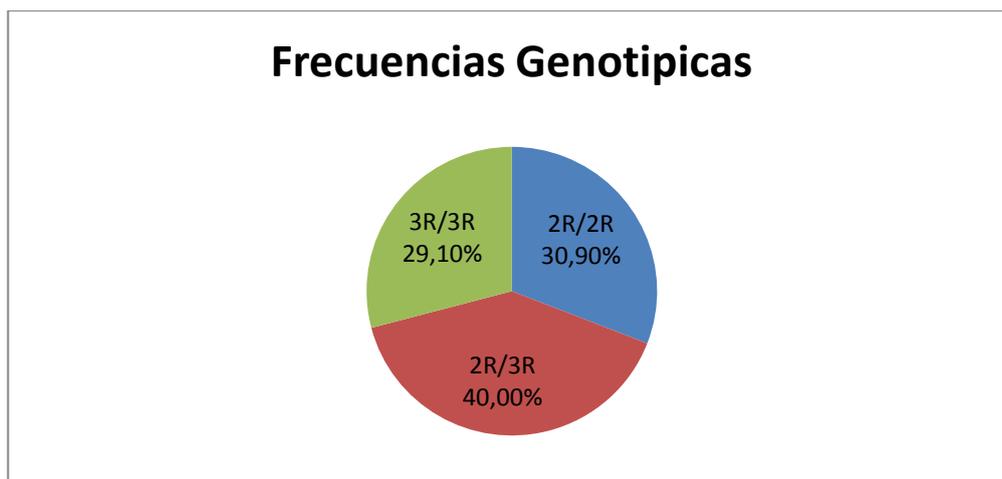


Figura 12. Gráfico de frecuencias genotípicas observadas para el polimorfismo TYMS.

Tabla 1. Muestras analizadas con sus respectivos diagnosticos para los polimorfismos MTHFR C677T, RFC G80A y TYMS 2R o 3R.

<b>MUESTRAS</b>	<b>DIAGNOSTICO MTHFR C677T</b>	<b>DIAGNOSTICO RFC G80A</b>	<b>DIAGNOSTICO TYMS</b>
P1	CC	GA	3R/3R
P2	CC	GA	2R/2R
P3	TT	GA	2R/2R
P4	CT	GG	2R/3R
P5	CC	GG	3R/3R
P6	CT	GG	3R/3R
P7	CC	GA	3R/3R
P8	CC	GG	3R/3R
P9	TT	GA	2R/2R
P10	TT	GA	2R/2R
P11	CC	GA	3R/3R
P12	CT	GA	2R/3R
P13	CT	GA	3R/3R
P14	TT	GA	2R/2R
P15	CC	AA	2R/3R
P16	CC	GG	3R/3R
P17	TT	GA	3R/3R
P18	CC	GG	2R/2R
P19	CC	AA	2R/2R
P20	CC	GG	2R/3R
P21	CC	GA	2R/2R
P22	CC	GG	2R/3R
P23	CC	GA	2R/3R
P24	CC	AA	2R/3R
P25	CT	GG	2R/2R
P26	TT	GA	2R/3R
P27	CT	GG	2R/2R
P28	CC	GA	3R/3R
P29	CT	GA	3R/3R
P30	CT	AA	2R/2R
P31	CC	GA	3R/3R
P32	TT	GG	2R/2R
P33	CC	GA	2R/3R
P34	CT	GG	2R/3R
P35	CC	GA	-

P36	CT	GA	2R/3R
P37	CC	AA	2R/2R
P38	CT	GA	3R/3R
P39	CT	AA	2R/2R
P40	CT	GA	2R/3R
P41	CT	GG	2R/3R
P42	CC	GA	2R/3R
P43	CT	GG	3R/3R
P44	CT	GG	2R/2R
P45	CC	AA	2R/3R
P46	CC	GA	2R/2R
P52	CC	GA	2R/3R
P72	CC	AA	-
P73	CC	AA	2R/3R
P74	CT	GA	3R/3R
HO 100	CC	GG	2R/3R
HO 101	CT	AA	2R/3R
HO 102	CC	GA	2R/3R
HO 103	CC	GG	2R/3R
HO 104	CC	AA	2R/2R
HO 105	CT	GG	3R/3R
HO 106	CC	GA	2R/3R

## **Conclusiones**

### **Polimorfismo MTHFR**

Al comparar las frecuencias genotípicas de la población uruguaya estudiada con las frecuencias reportadas en la literatura internacional de otras poblaciones, se observó que se asemejan a las de las poblaciones caucásicas.

La mayor parte, el 54,39 %, de la población estudiada presentó el genotipo CC, el cual no se encuentra asociado a un mayor riesgo de efectos adversos tras el tratamiento con metotrexate. Sin embargo, el 45,61 % restante de la población estudiada presentó los

genotipos TT y CT, los cuales se consideran los asociados a un mayor riesgo de efectos adversos tras el tratamiento con metotrexate.

### **Polimorfismo RFC**

Al comparar las frecuencias genotípicas de la población uruguaya estudiada con las frecuencias reportadas en la literatura internacional de otras poblaciones, se observó que son similares a las reportadas para las razas caucásica y asiática.

El 19,30 % de la población estudiada presento el genotipo AA, el cual se asocia con altos niveles de metotrexate en sangre y por lo tanto riesgo a sufrir efectos adversos. Sería importante recomendar la realización del diagnóstico molecular de este polimorfismo en particular a pacientes tratados con metotrexate.

### **Polimorfismo TYMS**

Al comparar las frecuencias genotípicas de la población uruguaya estudiada con las frecuencias reportadas en la literatura internacional de otras poblaciones, se observó que son similares a las reportadas para la raza caucásica y diferente a la raza asiática.

La mayor parte, el 70,9 %, de la población estudiada presento los genotipos 2R/2R y 2R/3R, los cuales no se encuentra asociado a un mayor riesgo de efectos adversos tras el tratamiento con metotrexate. Sin embargo, el 29,1 % restante de la población estudiada presento el genotipo 3R/3R, el cual se asocia con bajos niveles de metotrexate en sangre debido a que el aumento de repeticiones aumenta la expresión del ARNm de TYMS y su por tanto actividad enzimática. Estos bajos niveles llevan a que, para lograr una misma dosis efectiva en estos pacientes, se deban administrar mayores concentraciones iniciales de metotrexate.

En cuanto al equilibrio de Hardy-Weinberg, a partir de los resultados obtenidos podemos decir que la población estudiada se encuentra en equilibrio para todos los polimorfismos estudiados en este trabajo. Por lo tanto si se encuentra en equilibrio las frecuencias genéticas de cada uno de los polimorfismos se mantendrán constantes de una generación a la siguiente, siempre y cuando las condiciones que mantienen el equilibrio no cambien.

### **Conclusiones Generales**

Aunque las diferencias individuales en la respuesta a fármacos como el metotrexate pueden deberse a edad, sexo, enfermedad o interacciones con otros fármacos, los factores genéticos también influyen en la eficacia de los mismos y en la probabilidad de reacciones adversas. En mayor o menor medida las variantes de cada uno de los polimorfismos estudiados, asociadas a un funcionamiento defectuoso de la vía metabólica del metotrexate, se encuentran presentes en la población uruguaya estudiada. El diagnóstico molecular de los mismos previo al tratamiento con metotrexate, debería de ser un factor más a tomar en cuenta, a la hora de ajustar la dosis a administrar a cada paciente ya que nos brinda información importante sobre el funcionamiento de la vía metabólica del individuo. Esto llevaría a disminuir el número de pacientes con efectos adversos al metotrexate y/o la intensidad de los mismos, lo cual tiene una gran relevancia tanto a nivel humano como a nivel económico.

### **Perspectivas Futuras**

Las enzimas dianas estudiadas en este trabajo no son las únicas proteínas involucradas en la vía metabólica del metotrexate. Es por esta razón que sería conveniente ampliar el panel de polimorfismos genéticos conocidos, para así sumar aquellos polimorfismos en los genes que codifican para el resto de las proteínas involucradas. Esto nos llevaría a acercarnos a construir un haplotipo que ayude a determinar la dosis más adecuada a administrar de

metotrexate para cada paciente en particular y a disminuir los efectos adversos que puedan presentar dichos pacientes tras el tratamiento.

## **Referencias Bibliográficas**

- 1 - García Campelo R.; Rosell Costa R.; Alonso Curbera G.; Antón Aparicio L.M.; Benítez J. (2008). Farmacogenómica como instrumento de individualización del tratamiento del cáncer. *Revista de Formación Médica Continuada en Oncología*. Volumen 3, suplemento 1, p. 71-89.
- 2 - Phillips C. (2011) Dosis alta de metotrexato aumenta la supervivencia sin enfermedad en niños con leucemia. *National Cancer Institute Cancer Bulletin* [on line], 3 (8), p.661-670. Disponible desde <http://www.cancer.gov/ncicancerbulletin/061411/page3> [Acceso 31 de julio 2011].
- 3 - Toffoli G.; Russo A.; Innocenti F.; Corona G.; Tumolo S.; Sartor F.; Mini E.; Boiocchi M. (2003) Effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer*. Volumen 103, p. 294-299.
- 4 - Cedeño E.; Páez E.; Weiss E. (1993) Farmacología del metotrexate indicaciones en psoriasis. *Dermatología Venezolana*. Volumen 31, número 3, p. 85-90.
- 5 - Wessels J. A. M.; De Vries-Bouwstra J. K.; Heijmans B. T.; Slagboom P. E.; Goekoop-Ruiterman Y. P. M.; Allaart C. F.; Kerstens P. J. S. M.; Van Zeben D.; Breedveld F. C.; Dijkmans B. A. C.; Huizinga T. W. J.; Guchelaar H. (2006) Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. *Arthritis & Rheumatism*. Volumen 54, número 4, p. 1087-1095.

6 - Fisher M. C.; Cronstein B. N. (2009) Meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms affecting methotrexate toxicity. *Journals of Rheumatology*. Volume 36, número 3, p. 539-545.

7 - Morán González D.; Jiménez Cabrera S.; Domínguez-Gil Hurlé A. (2008) Farmacogenética en oncología. *Medicina Clínica*. Volumen 131, número 5, p. 184-195.

8 - Rocha J. C.; Cheng C.; Liu W.; Kishi S.; Das S.; Cook E. H.; Sandlund J. T.; Rubnitz J.; Ribeiro R.; Campana D., Pui C.; Evans W. E., Relling M. V. (2005) Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Volumen 105, número 12, p. 4752-4758.

9 - Nussbaum R. L.; McInnes R. R.; Willard H. F. (2008) *Thompson & Thompson Genética en Medicina*. 7ª edición. Elsevier Masson.

10 - Badell I.; del Río E.; Baiget M.; Estella J.; Fernández-Delgado R.; Javier G., Verdeguer A.; Bureo E.; Couselo J.M.; García-Miguel P.; Gómez P.; Indiano J.M.; López-Ibor B.; Melo M.; Molina J.; Moreno M.J.; Muñoz A.; Navajas A.; Cubells J. (2007) Toxicidad en el tratamiento de mantenimiento del protocolo LAL/SHOP-2005: estudio farmacogenético preliminar. *Anales de Pediatría*. Volumen 66, número 4, p. 434-436.

11 - Badell I.; del Río E.; Pardo N.; Farré R.; Torrent M.; Fraga G.; Brió S.; Pineda B.; Baiget M.; Cubells J. (2007) Aplicación de la farmacogenética a la individualización terapéutica en la leucemia linfoblástica aguda: presentación de caso clínico. *Anales de Pediatría*. Volumen 66, número 4, p. 437-438.

12 – Castañón M. M.; Lauricella A. M.; Genoud V.; Quintana I. L. (2006) Importancia de la determinación de homocisteinemia y metilentetrahidrofolato reductasa C677T. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. Volumen 40, número 003, p. 335-339.

13 - Yates Z.; Lucock M. (2005) G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life Sciences*. Volumen 77, p. 2735–2742.

14 - Dervieux T.; Furst D., Orentas Lein D.; Capps R.; Smith K.; Walsh M.; Kremer J. (2004) Polyglutamation of Methotrexate With Common Polymorphisms in Reduced Folate Carrier, Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide Transformylase, and Thymidylate Synthase Are Associated With Methotrexate Effects in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. Volumen 50, número 9, p. 2766-2774.

15 - Ranganathan P.; McLeod H. L. (2006) Methotrexate Pharmacogenetics: The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. Volumen 54, número 5, p. 1366-1377.

16 - Pakakasama S.; Kanchanakamhaeng K.; Kajanachumpol S.; Udomsubpayakul U.; Sirachainan N.; Thithapandha A.; Hongeng S. (2007) Genetic polymorphisms of folate metabolic enzymes and toxicities of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*. Volumen 86, p. 609-611.

17 - Laverdière C.; Chiasson S.; Costea I.; Moghrabi A.; Krajcinovic M. (2002) Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Volumen 100, número 10, p. 3832-3834.

18 - Efferth T.; Volm M. (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*. Volumen 107, p. 155-176.

19 - Drogan D.; Klipstein-Grobusch K.; Wans S.; Luley C.; Boeing H.; Dierkes J. (2004) Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *British Journal of Nutrition*. Volumen 92, p. 489-496.

20 - Lecomte T.; Ferraz J.; Zinzindohoue F.; Lorient M.; Tregouet D.; Landi B.; Berger A.; Cugnenc P.; Jian R.; Beaune P.; Laurent-Puig P. (2004) Thymidylate Synthase Gene Polymorphism Predicts Toxicity in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil-based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. Volumen 10, p. 5880-5888.

21 - Kawakami K.; Salonga D.; Park J. M.; Danenberg K. D.; Uetake H.; Brabender J.; Omura K.; Watanabe G.; Danenberg P. V. (2001) Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Expression. *Clinical Cancer Research*. Volumen 7, p. 4096-4101.