



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias

Tesis de Grado, Licenciatura en Bioquímica

EVALUACIÓN DE UNA POBLACIÓN URUGUAYA EN LOS POLIMORFISMOS DE TIOPURINA S- METILTRANSFERASA, TPMT*2 Y TPMT*3

Victoria Pérez Escanda

Tutor: Dra. Patricia Esperón

Montevideo, Uruguay

2012

Agradecimientos

A mis padres, a mis hermanos Enano y Di y al resto de la familia por la oportunidad el apoyo incondicional, constante y por su amor. A mis amigos por estar presente en los momentos más importantes de mi vida, en los que me dieron su amistad sin condiciones. A Mushu porque me haces feliz!!

A mis amigos de Facultad de Ciencias por esos momentos inolvidables que disfrute en mi paso por ella; a Lu, las Sangus, Fito y Capu, por su calidez y amistad maravillosa. Un agradecimiento especial para Anita, porque me enseñaste el valor de un equipo de complicidad y amistad gracias por compartir uno de nuestros sueños, por ser mi hermana y amiga.

A mi Tutora de Tesis, Dra. Patricia Esperón, por su apoyo, su crítica y consejo, dedicación, por guiarme con su experiencia.

A mis compañeros de laboratorio, Mgr. Marcelo Vital, Bca. Estela Bidegain, Lic. Flavia Varela y Lic. Andrea Giletti por su apoyo incondicional, consejos, crítica afectuosa, simpatía, y amabilidad que me sirvieron no solo para ampliar mis conocimientos sino también para aprender y crecer como persona.

Tabla de contenidos

Resumen.....	5-6
1 Introducción General.....	7
1.1 El rol de la farmacogenética.....	7-11
1.2 Beneficios de la farmacogenética.....	11-12
1.3 SNP y su influencia en la respuesta a fármacos.....	12-14
1.3.1 Enzimas metabolizadoras de fármacos, TPMT.....	14-19
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 Materiales y Métodos.....	21
3.1 Muestras.....	21
3.2 Obtención de muestras.....	21
3.2.1 Obtención de material biológico.....	21
3.2.2 Extracción de ADN.....	21-22
3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	23-24
3.3 Estudio del polimorfismo TPMT*2.....	24-27
3.4 Estudio del SNP 460 G>A, TPMT*3B.....	27-28
3.5 Estudio del SNP 719 A>G, TPMT*3C.....	29-30
3.6 Estudio del polimorfismo TPMT*3A.....	30
3.7 Purificación del ADN.....	30-31
3.8 Secuenciación del ADN.....	31-32
3.9 Análisis estadístico.....	32
4 Resultados.....	33-35
4.1 Resultado del estudio del polimorfismo TPMT*2.....	35-37
4.2 Resultado del estudio del SNP 460 G>A TPMT*3B.....	37-39
4.3 Resultado del estudio del SNP 719 A>G TPMT*3C.....	39-41
4.4 Resultado del estudio del polimorfismo TPMT*3A.....	41
4.5 Resultado de la secuenciación de ADN.....	42-43
5 Discusión y Conclusión.....	44
5.1 Estudio de las variantes alélicas de TPMT.....	44-45
5.2 Los desafíos para el futuro.....	45-46
6 Referencias Bibliográficas.....	47-50

Resumen

Las tiopurinas, Azatioprina (AZA) y 6-Mercaptopurina (6MP) son drogas ampliamente utilizadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, leucemias, enfermedad inflamatoria intestinal y trasplantes. Si bien son altamente efectivas, presentan una potencial toxicidad, por lo que se ha despertado el interés del estudio de las variantes alélicas de la enzima Tiopurina-S-metiltransferasa (TPMT) que cataliza la S-metilación de las mismas.

El gen TPMT está localizado en el cromosoma 6p22.3, es de aproximadamente 34kb, presenta 10 exones y codifica una proteína de 245aa.

La actividad enzimática de la TPMT presenta amplia variabilidad interindividual, con una distribución polimórfica trimodal, donde el 90% de los individuos presenta una actividad elevada (variante TPMT*1), 10% actividad moderada y 0.3% muestra actividad nula. Las variantes más comunes asociadas a una reducción de la actividad son TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B y TPMT*3C.

En este trabajo analizamos la distribución de los polimorfismos TPMT*2 y TPMT*3 en 55 individuos sanos no relacionados mediante la técnica de PCR-RFLP y PCR alelo específica.

Los resultados mostraron que el 92.7% de los individuos presentaban la variante TPMT*1, mientras que un 3.6% presentaban la variante TPMT*2 y el restante 3.6% el haplotipo 3A (formado por TPMT*3B y TPMT*3C).

Sería conveniente que este análisis fuera incluido en la rutina para pacientes bajo tratamiento con tiopurinas, ya que el conocimiento del genotipo junto con otras características como edad, estado de salud general, medicaciones concomitantes, etc., podrían ayudar a disminuir los efectos adversos y lograr una beneficiosa terapia individualizada.

CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL

1.1 El rol de la farmacogenética en la Medicina

Existen factores tales como el entorno, la dieta, el estado general de salud, la edad, sexo, o interacciones medicamentosas, que pueden influenciar en la forma en que un individuo responde a una determinada droga o fármaco. Si bien son muy importantes, los mismos no son los únicos factores influyentes, (ver figura 1). Las diferencias en la susceptibilidad a los efectos de un fármaco, cuando éste ha sido administrado con pautas idénticas a pacientes de características similares, se ha correlacionado, con la existencia de diferencias genéticas individuales en los genes codificadores de las enzimas metabolizadoras, de los receptores de fármacos o de las proteínas transportadoras. El estudio que permite identificar las bases genéticas de estas diferencias es lo que se conoce hoy en día como farmacogenética. [Gutiérrez R, 2004] [Ferriols Lisart, 2003].

La Farmacogenética es relevante para la variación interindividual en la respuesta a medicamentos a través de dos procesos. El primero de ellos, la farmacocinética, la cual estudia la velocidad con la que el organismo absorbe, transporta, metaboliza o elimina los fármacos o sus metabolitos. El otro proceso es el objetivo de estudio de la Farmacodinamia, la cual se encarga del estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y sus mecanismos de acción así como la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo, [Nussbaum *et al.*, 2008]. Algunas veces, existen características propias del individuo que hacen que el paso del medicamento por el organismo esté alterado, generando respuestas muy diferentes a las esperadas. Es aquí donde la farmacogenética permite complementar el conocimiento sobre el paso del mismo, incluyendo características genéticas al análisis.

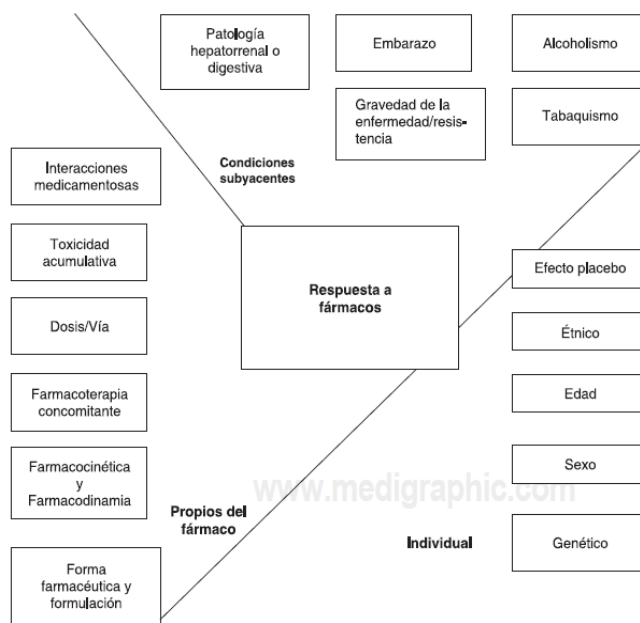


Figura 1: Factores que condicionan la respuesta a fármacos. [Banda Gurrola S. *et al.* 2010]

En base a los conceptos anteriores, la farmacogenética se puede definir como una disciplina científica destinada al estudio de los aspectos genéticos relacionados con la variabilidad en la respuesta a drogas en individuos o poblaciones, [Abad *et al.*, 2005]. Se relaciona con el estudio del rol de la herencia (las diferencias o factores genéticos) en la influencia de la variabilidad individual de la respuesta a los fármacos. [Evans *et al.*, 2003; Brockmöller *et al.*, 2008; Roses, 2000; Weinshilboum, 2003].

La disponibilidad y aplicación de tecnología en Biología Molecular, abarcando el estudio de los polimorfismos (variantes alélicas que se presentan con una frecuencia mayor al 1% en la población) y su relación con la aparición de efectos adversos, ha tenido como resultado la emergencia de la farmacogenética, [Evans *et al.*, 1999]. La predicción y la identificación de polimorfismos son de particular interés para el desarrollo de nuevos fármacos, pudiendo

conducir tanto a un mejoramiento de los conocimientos acerca de los principios farmacocinéticos y farmacodinámicos, como a una reducción en la prevalencia de reacciones adversas y una mejora en el diseño de regímenes terapéuticos, [Ferriols Lisart, 2003].

La respuesta individual a drogas o fármacos se ha vuelto una de las mayores dificultades en la práctica clínica, ya que las drogas, no solo varían en su eficiencia, sino que, además, mientras que en algunos individuos son seguras, en otros pueden ocasionar efectos adversos de diferente magnitud. Es por este motivo, que se pretende ajustar la dosis y predecir, a través de la asociación entre la respuesta farmacológica y las variaciones genéticas, cuáles pacientes serán beneficiados con el uso de un fármaco y cuáles pacientes no se verán beneficiados.

Con el fin de lograr su objetivo, la farmacogenética combina los conocimientos de la farmacología tradicional y la bioquímica, con los datos obtenidos por el Proyecto Genoma Humano, a través de los cuales es posible relacionar la presencia de variaciones en el ADN humano, entre las que se encuentran los polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), con la respuesta individual a un fármaco. En la actualidad se han identificado más de 12 millones de SNP's [Brockmöller *et al.*, 2008] y cerca de 60.000 de ellos en la región de codificación de los genes, [Evans *et al.*, 2003]. Ciertas combinaciones de SNP's (haplotipos) serían las responsables de las características individuales y conferirían susceptibilidad o resistencia a las enfermedades y diferente respuesta a los fármacos. Es importante destacar que los SNP's constituyen más del 90% de las variaciones genéticas en el genoma humano, las restantes se producen por inserciones, deleciones, duplicaciones repetidas y microsatélites [Marsh S *et al.* 2004].

Durante la última década del siglo XX y los inicios del siglo XXI, comenzó un esfuerzo internacional para determinar el genoma humano completo, denominado Proyecto Genoma Humano [Nussbaum *et al.*, 2008].

La finalización del proyecto ha puesto a disposición de todos los investigadores la secuencia completa del ADN humano. Uno de sus objetivos más relevantes es conseguir que este conocimiento de la secuencia completa permita identificar todos los genes humanos y se traduzca en conocer y determinar cómo la variación de esos genes contribuye a la salud y a la enfermedad. En particular, nos dará la posibilidad de comprender la interacción entre los componentes genéticos de las enfermedades y su fisiopatología, lo que permitirá diseñar tratamientos específicos dirigidos contra determinados blancos e individualizar las drogas utilizadas, acomodando a cada paciente la terapéutica que represente la mejor opción entre la enfermedad y los rasgos genéticos del individuo [Sookoian S, Pirola CJ, 2004].

En forma más específica podemos destacar que este conocimiento permite evaluar genes en las diferentes poblaciones [Sánchez Olavarría, M.P; 2004] para:

- Determinar la relación entre la variación genética y los riesgos para varias enfermedades. Identificar los factores de riesgo que pueden ser modificados, tales como el comportamiento y el medio ambiente, y que pueden tener interacción con los genes.
- Evaluar la utilidad y exactitud de las pruebas genéticas y los beneficios de la intervención en la prevención de enfermedades y la mejora de la salud.
- Determinar el impacto de las pruebas genéticas en la persona y la sociedad.
- Atender los aspectos sociales, legales y éticos.

Frecuentemente suele usarse como sinónimo de farmacogenética el término Farmacogenómica. Sin embargo, esta disciplina hace referencia al estudio del

genoma en su totalidad (o sea los genes expresados y no expresados, con independencia del estado fisiológico y patológico del individuo) y sus productos en relación con los procedimientos de diseño, descubrimiento y desarrollo de medicamentos. También se relaciona con la identificación de nuevas dianas terapéuticas mediante herramientas genómicas [Ruiz-Canela, 2005].

La Farmacogenómica y la Farmacogenética están estrechamente ligadas y el desarrollo de estas dos disciplinas ha permitido impulsar la llamada medicina individualizada, cuya meta principal es que cada paciente reciba un tratamiento farmacológico más seguro y eficaz de acuerdo con su perfil genético, [Sánchez Olavarría, M.P; 2004].

1.2 Beneficios de la Farmacogenética

Tres aspectos principales engloban los beneficios que representa la farmacogenética hoy en día:

1. Mejorar la seguridad:

Algunos fármacos tienen efectos secundarios o reacciones adversas en el individuo, que pueden incluso llegar a ocasionar la muerte. Si una variante genética asociada con una reacción de este tipo es encontrada, los médicos deberían evitar prescribir ese fármaco al paciente. Sin embargo, no es la única razón por la cual los fármacos pueden ser peligrosos, existen otras. Por ejemplo: errores en la prescripción o administración, pacientes que no siguen cuidadosamente las instrucciones, interacciones entre el fármaco y otras sustancias.

2. Ajustar la dosis:

La información genética podría ser usada para ajustar la dosis de un fármaco, reduciendo la fase de ensayo/error que se utiliza a menudo para determinar la mejor dosis.

3. Aumentar la eficacia:

La efectividad de las medicinas no son las mismas para todos los individuos que están siendo tratados para una misma enfermedad. Por ejemplo, algunos tratamientos comunes para la diabetes, depresión y asma son solo efectivos para un 60% de los pacientes [Nuffield Council on Bioethics, 2003].

1.3 SNP y su influencia en la respuesta a fármacos.

Un biomarcador genómico es una característica medible del ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) que es indicadora de un proceso biológico normal, de un proceso patológico y/o de una respuesta a una intervención terapéutica o de otro tipo. De los más de tres mil millones de pares de bases que se encuentran en el genoma humano, el 99.9% son idénticas entre diferentes individuos. La variabilidad que se observa en el 0.1% del genoma humano parece ser la responsable, entre otras cosas, de las diferencias observadas en la respuesta a fármacos. Un biomarcador puede estar constituido por más de una característica del ADN o del ARN, entre las cuales se encuentran los SNP, las deleciones, las inserciones, las modificaciones del ADN, por ejemplo por metilación, la variación en el número de copias,

etc. [Hernández Herrero, G. *et al.*, 2010]

Los SNP, suponen alrededor de 90% de la variación genética, se observan una vez cada 500-1000 pares de bases y se encuentran dispersos por todo el genoma humano.

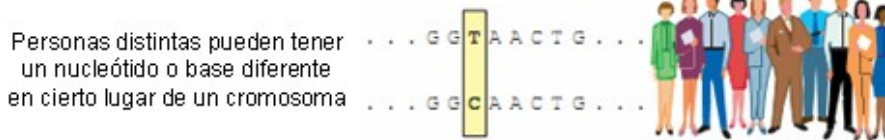
La consecuencia genotípica para un determinado individuo, dependerá de la localización del SNP en el gen (ver figura 2), se resume así:

- Que se sitúe en la región codificadora del gen, provocando una alteración de la secuencia de los aminoácidos de la proteína codificada, lo que puede afectar a su estructura y, por lo tanto, a su papel fisiológico en el organismo humano; dando como resultado disminución, pérdida o incremento de su función (por ejemplo, se modifica la afinidad de un receptor o la actividad de una enzima por el fármaco).
- Que se sitúe el SNP en la región reguladora del gen, lo que puede llevar a que se vea afectada la interacción de los factores de transcripción al gen y, en definitiva, que se vean afectados los niveles normales de expresión del gen y la cantidad de proteína expresada.
- Que se localicen en las regiones no-codificadoras del genoma, en cuyo caso está por conocer el impacto que pueden tener sobre el fenotipo de un individuo, aunque su estudio es del mayor interés como marcadores en la identificación forense y en determinados procesos patológicos de origen genético.

Puede pasar también que se pierda el gen o, por el contrario, se produzcan varias copias de él, lo que se traduce en ausencia o excesivas cantidades de enzima y, en consecuencia, el portador será un metabolizador lento o ultrarápido de los fármacos sustratos de la enzima [Arribas I.; 2010].

Si hacemos referencia al organismo humano, la acción farmacológica de un medicamento estará condicionada por el polimorfismo genético, que influirá tanto en el proceso de farmacocinética como en el de farmacodinámica.

¿Qué es un polimorfismo?



Mapa de un Polimorfismo (SNP)



Mapa de Polimorfismo y su influencia en la respuesta a los Fármacos

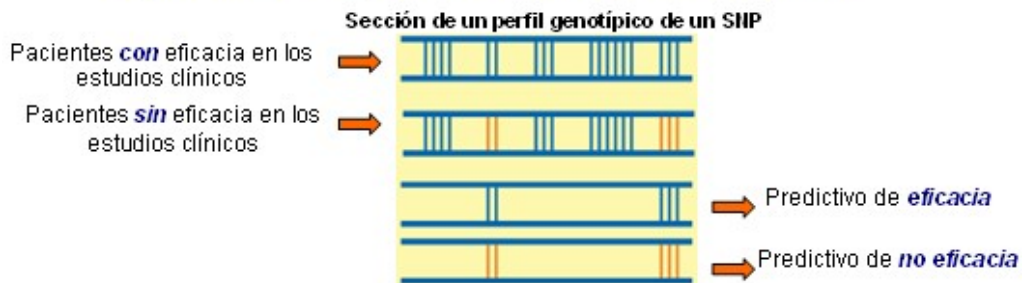


Figura 2: Polimorfismos de nucleótido único y Farmacogenética. Que es un SNP? Personas distintas pueden tener bases diferentes en un lugar del genoma, por ejemplo en la primera imagen existe un cambio de una T por una C. La tercera imagen muestra como esos cambios pueden modificar la influencia en la respuesta a los fármacos. (Roses, Nature, 2000. Volume 405)

En todas estas relaciones entre polimorfismos y fármacos se destacan dos tipos de situación:

- Las diferencias heredadas en el blanco del fármaco (drug target), como los receptores.
- La disponibilidad del fármaco, que son determinantes poligenéticos de los efectos de los fármacos.

1.3.1 Enzimas metabolizadoras de fármacos

Uno de los aspectos más estudiados de la farmacogenética son las variaciones genéticas que afectan la actividad enzimática de enzimas metabolizadoras de fármacos, que participan tanto en la conversión de pro-fármacos a metabolitos activos (metabolismo oxidativo de fase I), como en el proceso de eliminación de fármacos. En el grupo de genes de fase I se encuentra el gen de la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT; EC 2.1.1.67), cuyas variaciones pueden traducirse en metabolizadores lentos o intermedios.

TPMT

Los polimorfismos que presenta la tiopurina S-metiltransferasa son unos de los mejor caracterizados hoy en día.

TPMT es una enzima citosólica dependiente de SAM (S-adenosil metionina) que se encuentra tanto en procariotas como eucariotas. Se describió originalmente en riñón e hígado de ratas y ratones, posteriormente se demostró su presencia en la mayoría de los tejidos humanos. [Coulthard *et al.* 1998; McLeod *et al.* 1995].

El gen, que se hereda de manera autosómica, está localizado en el cromosoma 6p22.3 (ver figura 3), es de aproximadamente 34 kb, cuenta con 10 exones y codifica una proteína de 245 aminoácidos. El exón dos no está representado de manera uniforme lo que indicaría que TPMT sufre splicing alternativo [Liewei Wang *et al.*, 2010; Szumlanski CL, 1996]. Un pseudogen con un 96% de homología de secuencia al ADNc de TPMT ha sido mapeado y clonado en el cromosoma 18q21.1. [Yates, C.R., 1997; Roberts R., 2004].

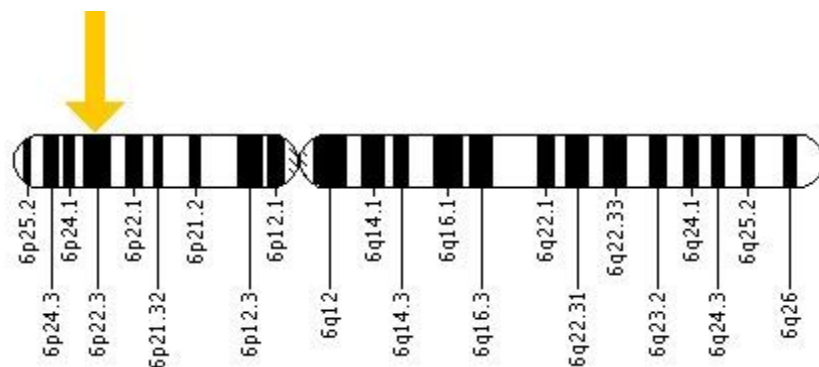


Figura 3: Esquema del cromosoma 6, la flecha amarilla indica la ubicación del gen de TPMT dentro del cromosoma.

TPMT es parte de una cascada de enzimas responsables del metabolismo de drogas tiopurínicas, incluyendo azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP) o 6-tioguanina (6-TG). El rol biológico de esta enzima no es conocido aun, además no se le ha podido identificar ningún sustrato endógeno. [Ford LT., 2010; Topic E., 2005].

Las drogas tiopurínicas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de varias enfermedades. Por ejemplo para tratar enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas, leucemias así como para prevenir el rechazo en trasplantes de órganos. A pesar de su alta eficacia, se dan reacciones adversas en un 15-30% de los pacientes, incluyendo intolerancia gastrointestinal, pancreatitis, hipersensibilidad, y supresión de la medula ósea, potencialmente mortal para el individuo, lo que a menudo termina con la suspensión del tratamiento.

La AZA es una prodroga que es convertida a 6-MP *in vivo*, siendo ésta también una prodroga que sufre una serie de reacciones enzimáticas para formar nucleótidos de tioguaninas (6-TGNs), metabolitos activos que pueden ser incorporados al ADN. Dos importantes reacciones inactivan a las drogas tiopurínicas *in vivo*, la oxidación catalizada por la xantinaoxidasasa (XO) y la S-metilación catalizada por TPMT (ver figura 4). Debido a la ausencia de XO a nivel hematopoyético, la metilación por la TPMT tiene un rol preferencial en la metabolización de las drogas tiopurínicas. La existencia de polimorfismo en el gen de la TPMT genera variantes alélicas, cuyo fenotipo muestra una capacidad disminuida en la S-metilación de AZA/6-MP, determinando un aumento de los metabolitos activos (6-TGNs), lo que produce una mayor actividad farmacológica, pero también un mayor riesgo de efectos adversos, [Luis Álvarez. *et al.*, 2009; Ford LT., 2010]

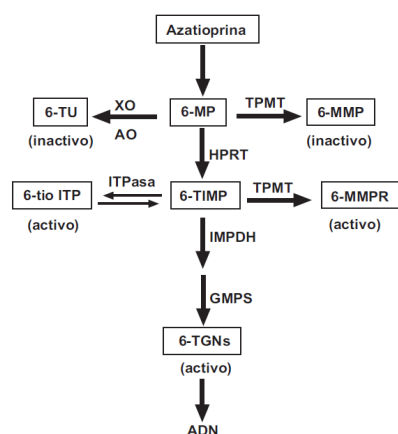


Figura 4: Metabolismo de las tiopurinas. La pro-droga azatioprina es convertida rápidamente, mediante una reacción no enzimática, a 6-mercaptopurina (6-MP), la cual es metabolizada por tres vías; xantina oxidasa (XO), tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) e hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HPRT). La vía mediada por XO produce el metabolito inactivo ácido 6 - tiourico (6-TU). La TPMT cataliza la producción de otro metabolito inactivo, la 6-metilmercaptopurina (6-MMP). La vía de la HPRT genera 6- tioinosina monofosfato (6-TIMP). Una vez formada, la 6-TIMP puede ser transformada por tres vías; mediante las enzimas inosina- 5-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) y guanina monofosfato sintetasa (GMPS), genera nucleótidos de tioguanina (6-TGNs), por medio de la TPMT es metilada a ribonucleótidos de 6-metilmercaptopurina (6-MMPR) o puede ser fosforilada por la enzima Inosina trifosfato pirofosfatasa (ITPasa) para generar 6-tio-inosina trifosfato (6- tio-ITP). Los metabolitos 6-MMPR, 6-tio-ITP y 6-TGNs son activos. Estos últimos pueden incorporarse al ADN.

(Luis Álvarez. *et al.*, 2009)

La actividad enzimática de la TPMT presenta una amplia variabilidad interindividual, presentando una distribución polimórfica trimodal en caucásicos, donde aproximadamente 90% de los individuos tienen actividad elevada (tipo silvestre), 10% tienen actividad moderada (individuos heterocigotos) y 0.3% muestra una actividad metiltransferasa nula, porque heredan los dos alelos no funcionales [Candelaria M., 2006; Yates, Charles R. 1997; Liewei Wang *et al.*, 2010; Roberts R., 2004].

El alelo silvestre de TPMT, denominado TPMT*1, codifica una proteína con elevada actividad enzimática. TPMT*2 consiste en una transversión en el exón V (G238C; Ala80Pro). TPMT*3A consiste en dos transiciones nucleotídicas; G460A (exón VII; Ala154Thr) y A719G (exón X; Tyr240Cys). Estas variantes genéticas pueden existir separadas como TPMT*3B (G460A) y TPMT*3C (A719G). Las proteínas codificadas por estas variantes genéticas son degradadas rápidamente, resultando una baja actividad enzimática.

Se han encontrado 28 variantes alélicas para el gen de TPMT (ver figura 5), muchas de las cuales han sido asociadas a una reducción de la actividad enzimática. Sin embargo, las

más comunes (TPMT*3A, *3C y *2) explican la mayoría de los casos (85-95%) de reducción de actividad en caucásicos, asiáticos y afroamericanos. En la población caucásica la variante TPMT*3A corresponde al 75-80% de las variantes alélicas detectadas. Las frecuencias alélicas de las variantes TPMT*3A, *3C y *2 son aproximadamente 4.5%, 0.4% y 0.17% respectivamente.

Estudios realizados en poblaciones de Latinoamérica muestran una mayor frecuencia de alelo TPMT*3A en Argentina, Colombia, Bolivia y Chile, mientras que en la población de Brasil el alelo más frecuente corresponde al TPMT*2. Hasta la fecha no existen estudios sobre la distribución del polimorfismo del gen de la TPMT en población uruguaya. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia y prevalencia de los alelos más frecuentes de la TPMT en una población de voluntarios uruguayos.

Hay evidencia de que otros factores pueden influir en la actividad de la enzima, ya que se han encontrado diferencias en pacientes con genotipo TPMT*1. La región del promotor contiene un número variable de repeticiones en tándem, las cuales se han relacionado con la actividad de TPMT. [Haglund S., 2011].

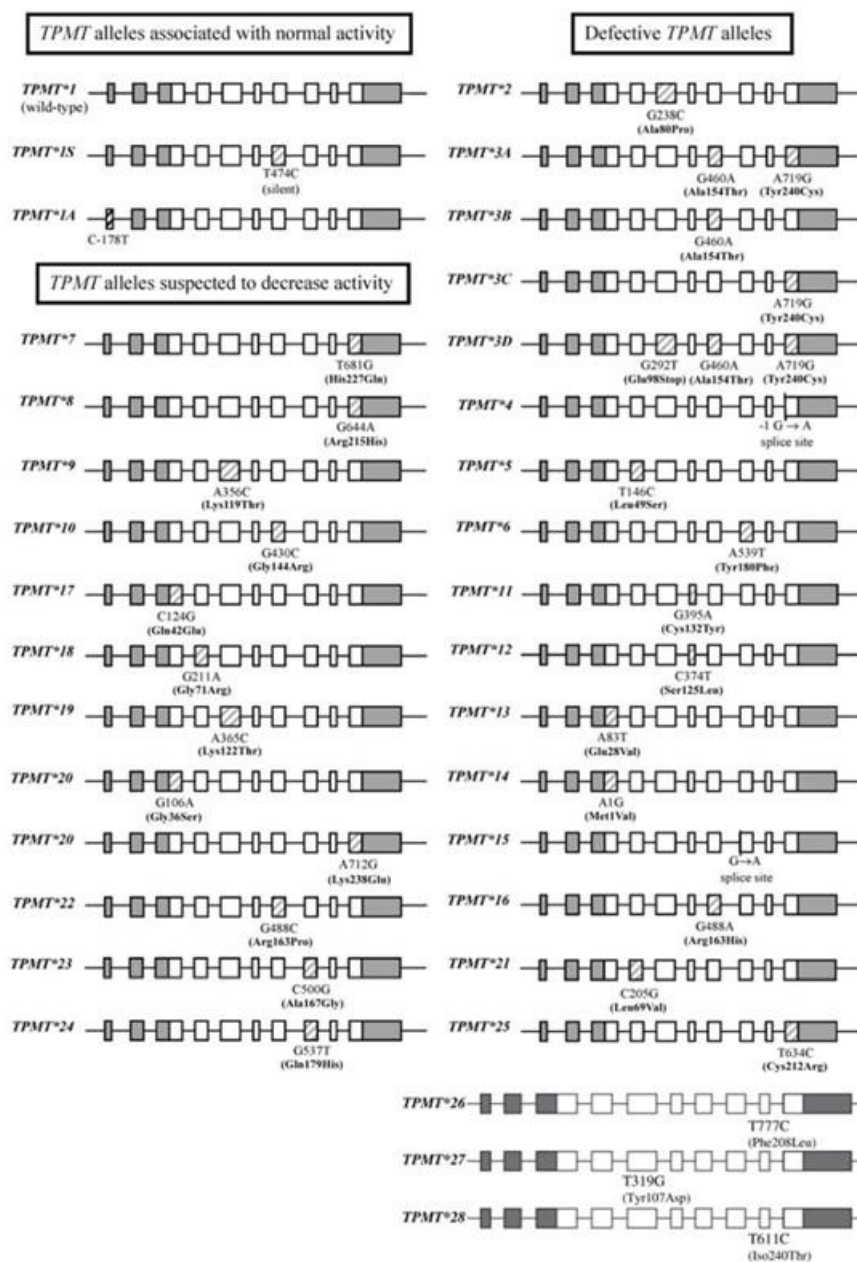


Figura 5: Resumen esquemático de las variantes genéticas de TPMT*1-TPMT*28, [Haglund S., 2011].

El caso de la TPMT es uno de los ejemplos más desarrollados de farmacogenética, abarcando desde la genética molecular hasta el diagnóstico clínico para individualizar la dosis de fármacos metabolizados por esta enzima. En resumen, este ejemplo puede ilustrar como la farmacogenética es capaz de optimizar una terapia concreta para evitar efectos adversos tóxicos entre grupos de pacientes genéticamente distintos.

CAPITULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la distribución en una población uruguaya de los polimorfismos TPMT*2 y TPMT*3, por ser los más relevantes.

2.2 Objetivos específicos

- Aplicar las metodologías clásicas y las más actuales utilizadas en la determinación de polimorfismos de TPMT, tales como RFLP y secuenciación de ADN.

CAPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras

El estudio incluyó 55 individuos sanos no relacionados procedentes de la República Oriental del Uruguay.

El proyecto reunió los requerimientos éticos del Comité de Ética de la Facultad de Química, y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Cada muestra fue identificada por un código único, garantizándose la confidencialidad de los datos de acuerdo con los requerimientos.

3.2 Obtención de las muestras

3.2.1 Obtención de las muestras biológicas

A cada uno de los individuos, se le tomó una muestra de aproximadamente 3mL de sangre periférica, la cual fue colectada en vacutainers que contenían EDTA como anticoagulante. Este procedimiento fue realizado por personal autorizado.

3.2.2 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN se empleó el kit comercial de extracción DNAeasy de Qiagen®. El protocolo utilizado fue el que la empresa recomienda para extracción de ADN a partir de sangre periférica con algunas modificaciones.

A continuación se exponen los pasos del protocolo que fueron modificados:

- Abrir con cuidado la columna mini spin QIAamp y agregar 500µl de Buffer AW2 sin mojar el borde de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a 10.000rpm durante 5 min.

(esto se debe a que la velocidad máxima de la centrifuga no es 10.000rpm, entonces en lugar de hacerlo 3 min a 12.000rpm lo hacemos 5 min a 10.000rpm)

- Un segundo y tercer paso de elución con 50µl de H₂O para PCR aumenta la eficacia en un 15% aproximadamente.

Las operaciones realizadas por el kit para extraer el DNA son: lisis de los glóbulos blancos mediante el agregado de buffer de lisis, adsorción del ADN a la membrana QIAamp, remoción de los residuos contaminantes mediante lavado con buffers de diferente astringencia y, elución de ácidos nucleicos puros con buffer de elución (ver figura 6).

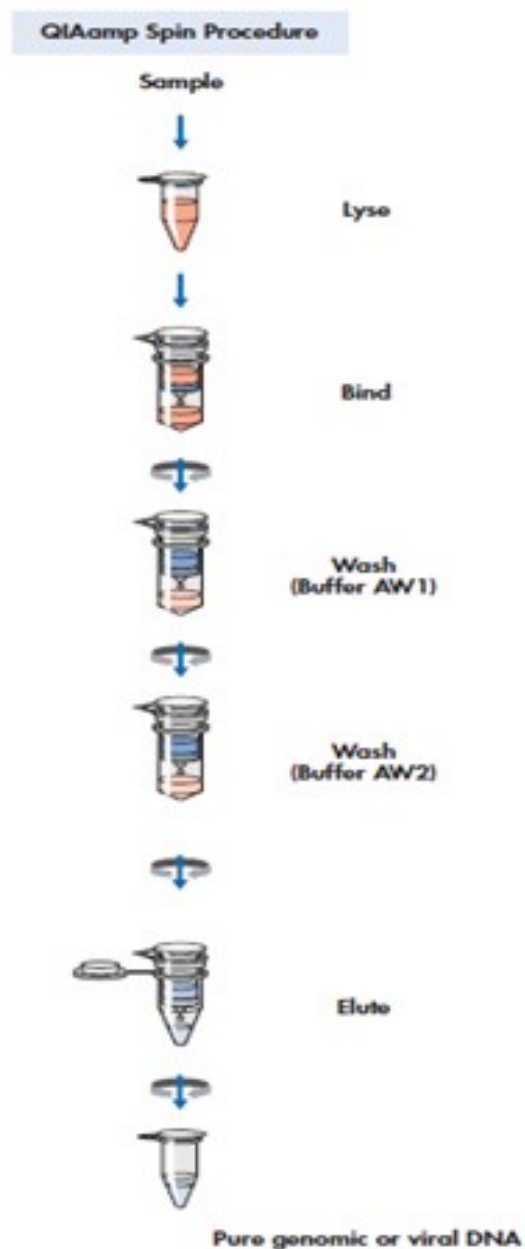


Figura 6: esquema de extracción de ADN
[QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook]

3.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la presencia e integridad del ADN se realizaron corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 0.5X (Tris base, ácido acético glacial y EDTA 0.5M

pH:8 en H₂O). Se preparo una solución de agarosa en buffer TAE 0.5X se calentó hasta disolver, luego se dejó enfriar y se añadió 1μl de Bromuro de Etidio (10mg/mL). Posteriormente se vertió la misma dentro de la cubeta nivelada de forma correcta, se dejó gelificar durante aproximadamente 20 minutos para poder retirar el peine y verter sobre el gel 200mL de Buffer TAE 0.5X. A continuación se sembraron en cada pocillo 2μL de ADN con 2μL de buffer de carga 6X (Fermentas).

La corrida fue realizada por 30 minutos a 100 voltios (V) de modo que el frente de corrida alcance las $\frac{3}{4}$ partes del gel. Se visualizó con un documentador de geles con luz ultravioleta.

3.3 Estudio del polimorfismo TPMT*2

Para el estudio del polimorfismo TPMT*2 se utilizó como método una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) conocida como PCR alelo específica (ASO-PCR). Una PCR viene determinada por la inclusión en la reacción de amplificación de dos primers o cebadores que flanquean el fragmento a amplificar. En el análisis de mutaciones que ya son conocidas es posible diseñar cebadores alelo-específicos (con un cambio de una base en el extremo 3' del primer y que coincide con la base polimórfica), para que únicamente sean amplificados aquellos alelos que presenten un determinado cambio en su secuencia. Así, en la reacción de PCR, se amplificará un alelo concreto, pero no el resto de los alelos posibles. [L. Castaño, J.R. Bilbao., 1997].

Esta PCR está diseñada de forma que se utilizan cuatro cebadores diferentes, denominados 238mtpF1, 238mtpF2 (wt), 238mtpR2mut y 238mtpR1, los cuales, al igual que los restantes cebadores utilizados en el trabajo, fueron diseñados en base a la secuencias genómicas que se encuentran publicadas en las diferentes bases de datos, utilizando el

programa Gene Runner. El cebador 238mtpR2mut es específico para el alelo mutante con el cambio 238G>C, mientras que los tres cebadores restantes se encuentran en todos los individuos con genotipo silvestre.

De esta forma, en aquellos individuos donde se amplifica un producto de 254 pares de bases (pb) con los cebadores 238mtpF2 y 238mtpR1 serán individuos normales para el polimorfismo TPMT*2, mientras que, los individuos que presentan la mutación en estudio se obtendrá un producto de 384 pb utilizando los cebadores 238mtpF1 y 238mtpR2mut (ver figura 7). Aquellos en los que el producto de amplificación sean ambas bandas (254 y 384 pb) serán individuos heterocigotos para el polimorfismo.

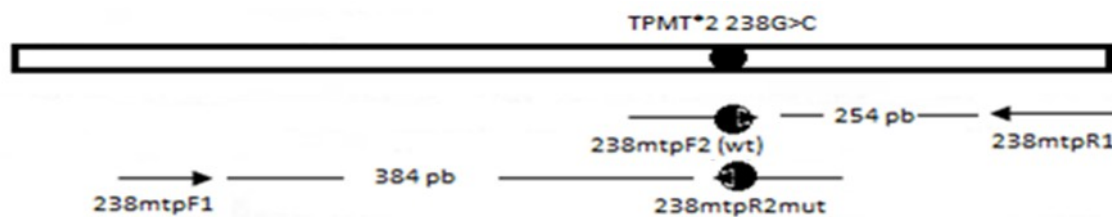


Figura 7: Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) alelo específica para determinar el polimorfismo TPMT*2. Los cebadores 238mtpF2 (wt) y 238mtpR1 amplifican un producto de 254 pb en ausencia de mutación. Los cebadores 238mtpF1 y 238mtpR2mut amplifican solamente cuando la mutación está presente un producto de 384 pb.

La amplificación por PCR fue realizada en un volumen final de 20uL utilizando agua estéril libre de ADNasa, buffer 10x de la enzima polimerasa Taq, 2mM de MgCl₂, 0.8mM de cada dNTPs, 0.03U de enzima polimerasa (Taq DNA Polymerase (Recombinant), Fermentas), 200mM de cada primer y 2μL de ADN.

El programa de amplificación consta de 30 ciclos, y se inicia con una desnaturalización de 3 minutos a 94°C, para luego ciclar: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 47°C para el par de cebadores 238mtpF2 y 238mtpR1 y 54°C para el par 238mtpF1 y 238mtpR2mut (hibridación) y 30 segundos a 72°C (polimerización), terminando con una

extensión final de 3 minutos a 72°C, mas 1 minuto a 14 °C. Se incluyó siempre en todas las reacciones un control negativo que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y donde se sustituye el molde ADN por agua. Así también, un ADN heterocigoto para el polimorfismo TPMT*2 fue incluido en las reacciones de ASO-PCR de manera de poder controlar la amplificación de la misma.

Para la verificación del producto de PCR esperado, se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 6% durante 1 hora a 100 V. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas).

Se preparo una solución de poliacrilamida al 6% a partir de una solución 30% de Acril/Bisacril. Posteriormente se añadió 40 µL de APS al 10% y 4 µL de una solución de TEMED. La solución preparada se colocó en el dispositivo correspondiente y se dejó gelificar durante 25 minutos para poder retirar el peine y colocarlo en la cuba de electroforesis. A continuación se sembraron en cada pocillo 2 µL de ADN con 2 µL de buffer de carga 6X (Fermentas).

Una vez finalizada la electroforesis el gel fue revelado a través del método de la tinción con nitrato de plata. [Yábar Varas, C; 2003].

El procedimiento utilizado es el siguiente:

1. Colocar el gel de poliacrilamida en una bandeja conteniendo solución de fijación (compuesta por 89.5% agua desionizada 10% etanol y 0.5 % ácido acético) e incubar con agitación constante durante 5 minutos. Alternativamente, el gel puede dejarse en solución de fijación, durante más tiempo.
2. Retirar el gel de la solución de fijación y colocarlo en la solución de Nitrato de plata (0.2% nitrato de plata en agua) y dejar en agitación constante durante 8 minutos.

3. Retirar el gel de la solución de tinción y lavar en agua destilada durante 5 a 10 segundos.
4. Inmediatamente colocar el gel en la solución de revelado (compuesta por 96.5% de agua, 3% de hidróxido de sodio y 0.5% de formaldehído) y dejar en agitación constante hasta que empiecen a aparecer las bandas.
5. Cuando las bandas hayan alcanzado la intensidad deseada, se vuelve a colocar el gel en la solución fijadora inicial.
6. Secar el gel para registrar el resultado final.

3.4 Estudio del SNP 460 G>A, TPMT*3B.

En la detección de SNP 460 G>A se realizó una PCR-RFLP, este método consiste en realizar una amplificación por PCR de la región del gen que queremos estudiar, posteriormente se realiza la digestión (o corte en fragmentos) del producto amplificado con enzimas de restricción, y se resuelve mediante una electroforesis. Este método es útil en casos, donde mutaciones puntuales en un gen, alteran la secuencia de nucleótidos del mismo, creando nuevos sitios de restricción o haciendo desaparecer aquellos presentes en el gen normal, lo que alterará el patrón de los fragmentos de restricción observables en la electroforesis [L. Castaño, J.R. Bilbao, 1997].

En la PCR se amplificó un fragmento de 705 pb del exón VII del gen de la TPMT, para lo cual, los cebadores utilizados fueron 460mtpF1y 460mtpR1 Para el RFLP, 10µL del amplicón se incubaron por 2 horas a 37°C en presencia de 0.2µL (0,03 U) de la enzima de restricción HpyF10VI (*Mwo*I) (Fermentas).

En el caso de no existir el SNP 460 G>A, en el ADN a analizar, o sea que el individuo presente el alelo normal, la enzima corta en un sitio generando 2 fragmentos, uno de 435 y

otro de 270pb. La presencia de la sustitución G460A elimina el sitio de corte de la enzima, por lo tanto el producto amplificado queda del tamaño original (ver figura 8).

La amplificación por PCR fue realizada en un volumen final de 20uL utilizando agua estéril libre de ADNasa, buffer 10x de la enzima polimerasa Taq, 2mM de $MgCl_2$, 0.8mM de cada dNTPs, 0.03U de enzima polimerasa (Taq DNA Polymerase (Recombinant), Fermentas), 200mM de cada primer y 3μL de ADN. Las condiciones de la misma son una desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 54°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C por 30 segundos; finalmente se dejará polimerizar 5 minutos a 72°C.

Un control negativo que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y donde se sustituye el molde ADN por agua, fue incluido en todas las reacciones. También se incluyó como control positivo, un ADN heterocigoto para la sustitución G>A.

Para verificar tanto la presencia del producto de PCR esperado, como el resultado del análisis del RFLP se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 6%, durante 1 hora a 100 V y 1hora 20 minutos a 110V respectivamente. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas).

Una vez finalizada la electroforesis el gel fue revelado mediante tinción con Nitrato de Plata.



Figura 8: Esquema de corte de la enzima *Mwo* I para el gen de la TPMT. Si el ADN no a sufrido la sustitución de la base guanina por adenina en la posición 460, la enzima cortara dando lugar a dos fragmentos de 435 y 270 pb. (A). Mientras que si hay mutación, esta eliminara el sitio de corte dando lugar al fragmento original de 705 pb (B).

3.5 Estudio del SNP 719 A>G, TPMT*3C.

Para la genotipado del polimorfismo 719 A>G, conocido como TPMT*3C, se utilizó como método PCR-RFLP. Un fragmento de 364pb del exón X del gen de TPMT es amplificado a partir de los cebadores 719mtpF1 y 719mtpR1. Para la RFLP, 10µL del amplicón se incubaron por 2 h a 37°C en presencia de 2µL de la enzima de restricción *Xmi*I (*Accl*) (Fermentas). La presencia de la sustitución A719G genera un sitio de restricción, lo que da origen a dos fragmentos, uno de 248 y otro de 116 pb (ver figura 9).

Para la detección del alelo *3C, la mezcla de la reacción de PCR estaba compuesta por agua estéril libre de ADNasa, buffer 10x de la enzima polimerasa Taq, 2mM de MgCl₂, 0.8 mM de cada dNTPs, 0.03 U de enzima polimerasa (Taq DNA Polymerase (Recombinant), Fermentas), 200 mM de cada primer y 3 µL de ADN en un total de 20 µL. Las condiciones de amplificación usadas fueron: 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, hibridación a 47°C por 30 segundos, polimerización a 72°C por 30 segundos; finalmente se dejará polimerizar 5 minutos a 72°C. Fue incluido, un control negativo que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación y donde se sustituye el molde

de ADN por agua. De igual manera se incluyó como control de corte positivo, un ADN heterocigoto para la sustitución A>G.



Figura 9: Esquema de corte de la enzima *Accl* para el gen de la TPMT. Si el ADN no ha sufrido la sustitución A>G en la posición 719, la enzima no cortará dando lugar al fragmento original de 364 pb. (A). Mientras que si hay mutación, esta genera el sitio de corte dando lugar a dos fragmentos de 248 y 116 pb (B). En el sitio de restricción de la enzima *Accl*, M corresponde tanto a la base A como a C, mientras que K puede ser G o T.

Para todas las reacciones antes señaladas, las detecciones de los productos amplificados y de los fragmentos de restricción fueron realizadas en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, como se describió anteriormente.

3.6 Estudio del polimorfismo TPMT*3A.

La variante TPMT*3A es un haplotipo que contiene dos transiciones estudiadas, 460G>A (TPMT*3B) y 719A>G (TPMT*3C), que resultan en las sustituciones Ala154Thr y Tyr240Cys, respectivamente. Entonces una vez diagnosticadas estas dos variantes por separado para cada ADN, se puede formar el haplotipo buscado.

3.7 Purificación de los productos de PCR para su posterior secuenciación

Como se ha mencionado, cada análisis de las variantes tenía además de un control negativo, un control de reacción o control de corte de la enzima. En caso de TPMT*2 se utilizó un ADN (proporcionado por el departamento de Genética de Facultad de Medicina, Universidad de la República) que se sabía era heterocigoto. De esta manera se asegura que ambos juegos de primers funcionen y que la región amplificada sea la secuencia deseada. En el caso de los PCR-RFLP se utilizó como control ADN de secuencia conocida, ya que fueron enviados a secuenciar para poder confirmar el cambio de base y luego se utilizaron como control de corte.

Los amplicones fueron purificados según el siguiente protocolo:

1. Se realiza una PCR en 30 μ L (ADN 2.5 μ L) utilizando el par de primers correspondiente.
2. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %, durante 30 minutos a 100 voltios (V) de modo que el frente de corrida alcance las $\frac{3}{4}$ partes del gel. Se visualizó con un documentador de geles con luz ultravioleta, se cortan las bandas correspondientes.
3. Se centrifuga en lana de vidrio a 5000 rpm durante 8 minutos.
4. Se agregan (1/10Vol) 10 μ L de Cloruro de litio más (2.5 vol) 250 μ L de Etanol absoluto frío.
5. Se lo deja a 4 °C durante toda la noche.
6. Se centrifuga durante 30 minutos a 10.000 rpm
7. Se descarta el sobrenadante, luego se agrega 200 μ L de EtOH al 75 % y se vuelve a centrifugar a 10.000 rpm durante 20 minutos. Se descarta el sobrenadante.
8. Se deja secar y luego se resuspende en 14 μ L de H₂O.

En todos los casos, para la detección de los productos amplificados se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, como se describió anteriormente.

3.8 Secuenciación de ADN

Se comprobó por secuenciación la presencia de la variante correspondiente en dos de las tres regiones amplificadas.

La secuenciación de los amplicones generados fue realizada por la unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto Pasteur de Montevideo, en un secuenciador automático de cuatro capilares ABI3130 de Applied Biosystems. Para lo cual se utilizaron únicamente los oligonucleótidos forward con los cuales se había realizado la amplificación.

Las secuencias obtenidas corresponden a un segmento del gen de la TPMT. El análisis de las secuencias se realizó utilizando los programas Chromas y Gene Runner.

3.9 Análisis estadístico

Las frecuencias genotípicas se han calculado mediante conteo y a partir de ellas se obtuvieron las frecuencias alélicas. Aplicando el test chi cuadrado, se verifica si la distribución genotípica difiere o no de la esperada para una población que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Estos resultados se comprobaron utilizando la aplicación web de Microsoft Excel: Court lab – HW calculator.

Se define:

Frecuencia genotípica de una población como, las proporciones o porcentajes de individuos de cada genotipo que están presentes en la población.

$$\frac{\text{Número de individuos de un genotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

Frecuencia alélica o frecuencia génica, como la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica.

Equilibrio de Hardy-Weinberg, cuando en una población panmíctica (apareamiento aleatorio, al azar), suficientemente grande y no sometida a migración, mutación, deriva génica o selección, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación". Si tal población cumple estas condiciones se dice que está en equilibrio Hardy-Weinberg.

CAPITULO 4: RESULTADOS

Se ha realizado la búsqueda de los polimorfismos más relevantes en el gen de TPMT que hasta el momento han sido involucrados con las variaciones de la actividad de la enzima.

Para llevar a cabo el análisis, se han diseñado primers específicos para cada polimorfismo a analizar. Esto ha implicado la puesta a punto de cada una de las reacciones de PCR: concentración de cloruro de magnesio, concentración de primers, unidades de enzima y optimización de la temperatura de apareamiento ADN-cebador y tiempos de extensión.

Luego de cada amplificación, se ha realizado en 2 de los tres casos un RFLP. En el caso restante se ha utilizado como método de detección una ASO-PCR (ver tabla 1).

Se trabajó con una población de 55 individuos, todos de nacionalidad Uruguaya.

	Polimorfismo	Técnica
TPMT *2	238G>C Ala(A) - Pro(P)	ASO-PCR
TPMT *3A	460G>A Ala(A) - Thr (T) 719A>G Tyr (Y) - Cys(C)	PCR-RFLP
TPMT *3B	460G>A Ala(A) - Thr (T)	PCR-RFLP
TPMT *3C	719A>G Tyr (Y) - Cys(C)	PCR-RFLP

Tabla 1: Descripción de cada polimorfismo y técnica utilizada para detectarlo.

Además de TPMT*1, las variantes genéticas de TPMT más comunes en la población mundial son TPMT*3A, *3B, *3C y *2. En la población estudiada en este trabajo, la mayoría, un 92.7% (n= 51), no poseen ninguna de las variantes genéticas investigadas. Se las considera, por lo tanto, que son silvestres TPMT*1/*1 y presentan actividad normal. El restante 7.2% (n=4) fueron todos heterocigotos para una variante alélica, y expresarían actividad intermedia. Ninguno de los individuos era homocigoto mutado (ver tabla 2). En las tablas 3 y 4 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas respectivamente.

NOMBRE DE LA MUESTRA	TPMT			
	*2	*3A	*3B	*3C
P1	GG		GG	AA
P2	GG		GG	AA
P3	GG		GG	AA
P4	GG		GG	AA
P5	GG		GG	AA
P6	GG		GG	AA
P7	GG		GG	AA
P8	GG		GG	AA
P9	GG		GG	AA
P10	GG		GG	AA
P11	GG		GG	AA
P12	GG		GG	AA
P13	GG		GG	AA
P14	GG		GG	AA
P15	GG		GG	AA
P16	GG		GG	AA
P17	GG		GG	AA
P18	GG		GG	AA
P19	GG		GG	AA
P20	GG		GG	AA
P21	GG		GG	AA
P22	GG		GG	AA
P23	GG		GA	AA
P24	GG		GG	AA
P25	GG		GG	AA
P26	GG		GG	AA
P27	GG		GG	AA
P28	GG	*3A	GA	AG
P29	GG		GG	AA
P30	GG		GG	AA
P31	GG		GG	AA
P32	GG		GG	AA
P33	GG		GG	AA
P34	GG		GG	AA
P35	GG		GG	AA
P36	GG		GG	AA
P37	GG		GG	AA
P38	GG		GG	AA
P39	GG		GG	AA
P40	GG		GG	AA
P41	GC		GG	AA
P42	GG		GG	AA
P43	GG		GG	AA
P44	GG		GG	AA
P45	GG		GG	AA
P46	GG		GG	AA
P52	GG		GG	AA
HO 100	GG		GG	AA
HO 101	GG	*3A	GA	AG
FL5	GC		GG	AA

Tabla 2: Diagnóstico molecular para cada muestra analizada de los polimorfismos TPMT*2, *3B,*3C y *3A.

Genotipo	Número de Individuos	Frecuencia en %
TPMT*1/*1	51	92.7 %
TPMT*1/*2	2	3.6 %
TPMT*1/*3A	2	3.6 %
Total	55	100

Tabla 3: Frecuencias genotípicas de las variantes del gen de la TPMT en una población de 55 individuos.

Alelo	Nº de veces que se encuentra el alelo	Frecuencia en %
TPMT*1	106	96.4 %
TPMT*2	2	1.8 %
TPMT*3A	2	1.8 %
Total	110	100

Tabla 4: Frecuencias alélicas de las variantes del gen de la TPMT en una población de 55 individuos.

La distribución genotípica obtenida para la población estudiada no se aparta de la esperada en equilibrio de Hardy- Weinberg, considerando dos alelos, el silvestre (TPMT*1) y el conjunto de los otros (no-TPMT*1). Los valores esperados para TPMT*1/TPMT*1, TPMT*1/noTPMT*1 y noTPMT*1/noTPMT*1 eran de 51, 3.9 y 0.1 respectivamente siendo X^2 : 0.078 y $P=0.78$.

4.1 Resultados del estudio del polimorfismo TPMT*2

En la tabla 5 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas, del genotipo G238C sobre la población en estudio. El genotipo GG tiene una frecuencia en la población de 96%, el GC 4% de y el CC de 0%. Las frecuencias alélicas en porcentajes fueron, para el alelo G de un 98%, mientras que para el alelo C de un 2%. No se hallan diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas (para GG de 96, GC de 3.9 y CC de 0) por el equilibrio de Hardy Weinberg siendo X^2 : 0.042 y $P=0.84$.

Genotipos	Nº de individuos	Frecuencias genotípicas TPMT*2
GG	53	96%
GC	2	4 %
CC	0	0 %
Total	55	100%
Alelos	Nº de veces que se encuentra el alelo	Frecuencias alélicas TPMT*2
G	108	98%
C	2	2%
Total	110	100

Tabla 5: Frecuencias genotípicas y alélicas de TPMT*2 en una población de 55 voluntarios uruguayos.

Como ya se dijo anteriormente para analizar este polimorfismo, donde de existir variación se vería un cambio de un G por una C en la posición 238, se ha realizado un ASO-PCR. En la figura 10 se puede ver uno de los geles de poliacrilamida en el cual se separaron mediante una electroforesis dos fragmentos, uno de ellos, de 248 pb correspondiente al genotipo silvestre (GG) el otro de 384 pb correspondiente al genotipo mutado (CC). En caso de que el individuo sea heterocigota se verían los dos fragmentos.

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 TMTP*2, ver Tabla 2.

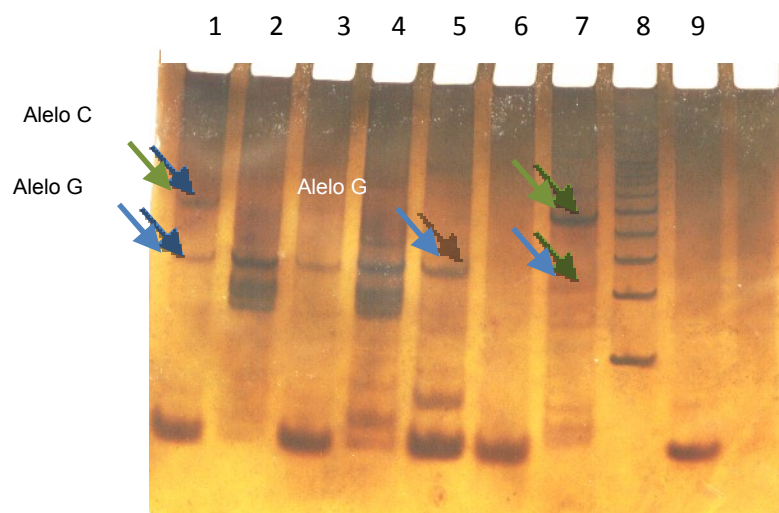


Figura 10: gel poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnostico el polimorfismo para TPMT*2. En los carriles 1 y 7 se puede observar el patrón de bandas de un individuo heterocigota GC, mientras que en los restantes carriles (2-5) se observa el patrón correspondientes a individuos homocigotas GG. En el carril 6 no se observa la presencia de ADN. Alelo G en azul, alelo C en verde.

Carriles:

1. Producto de PCR de la muestra P41
2. Producto de PCR de la muestra P42
3. Producto de PCR de la muestra P43
4. Producto de PCR de la muestra P45
5. Producto de PCR de la muestra P52
6. Producto de PCR de la muestra HO100
7. Control (heterocigota) muestra FL5
8. Marcador de peso molecular 100 pb.
9. Control Negativo de la reacción de PCR.

4.2 Resultados del estudio del SNP 460G>A

Las frecuencias genotípicas y alélicas, del genotipo TPMT*3B en una población uruguaya se pueden ver en la tabla 6. El genotipo GG tiene una frecuencia en la población de 96%, el GA de 4% y el AA de 0%. Las frecuencias alélicas en porcentajes fueron, para el alelo G de un 98%, mientras que para el alelo A de un 2%. No se hallan diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas (para GG de 96, GA de 3.9 y AA de 0) por el equilibrio de Hardy Weinberg siendo X^2 : 0.042 y $P=0.84$.

Genotipos	Nº de individuos	Frecuencias genotípicas TPMT*3B
GG	53	96%
GA	2	4 %
AA	0	0 %
Total	55	100%

Alelos	Nº de veces que se encuentra el alelo	Frecuencias alélicas TPMT*3B
G	108	98%
A	2	2%
Total	110	100

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas de TPMT*3B en una población de 55 voluntarios uruguayos.

En la Figura 11 se puede observar un gel de poliacrilamida, donde se ha separado mediante una electroforesis las digestiones realizadas con la enzima de restricción *MwoI* al producto de PCR amplificado de distintas muestras. 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 con genotipo silvestre GG (435pb + 270 pb), heterocigota GA (705 pb + 435 pb + 270 pb). En el caso de encontrarse un individuo homocigota AA se debería ver una única banda a 705 pb.

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 TPMT*3B, ver Tabla 2.

Tanto la muestra P41 como la muestra HO100 (ver figura 11) fueron enviadas a secuenciar para verificar su genotipo, se comprobó que ambos son individuos con genotipo heterocigota GA para el SNP 460>A.

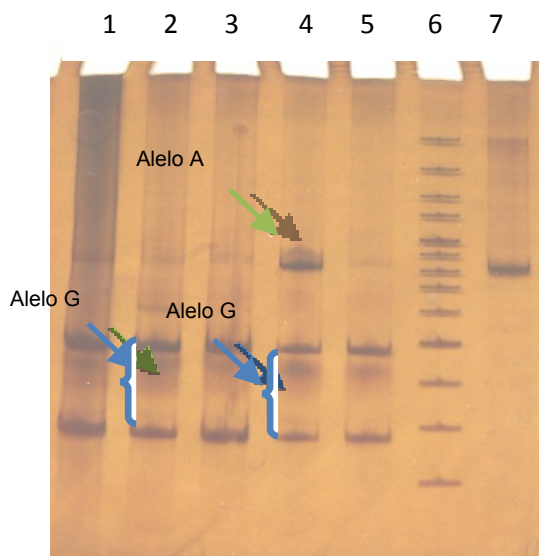


Figura 11: gel poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnostico el polimorfismo para TPMT*3B. En los carriles 1 y 4 se puede observar el patrón de bandas de un individuo heterocigota GA, mientras que en los restantes carriles (2-3 y 5) se observa el patrón correspondientes a individuos homocigotas GG, se observa una banda cerca a los 700pb que corresponde a resto del fragmento sin digerir. En el carril 7 se puede ver el fragmento sin digerir. Alelo G en azul, alelo A en verde.

Carriles:

1. Digestión del producto de PCR de la muestra P41.
2. Digestión del producto de PCR de la muestra P52.
3. Digestión del producto de PCR de la muestra HO100.
4. Digestión del producto de PCR de la muestra HO101.
5. Digestión del producto de PCR de la muestra P45.
6. Marcador de peso molecular 100 pb.
7. Fragmento sin digerir.

4.3 Resultados del estudio del SNP 719A>G

Las frecuencias genotípicas y alélicas, para el genotipo TPMT*3C en una población uruguaya se pueden ver en la tabla 7. El genotipo AA tiene una frecuencia en la población de 96%, el AG de 4% y el GG de 0%. Las frecuencias alélicas en porcentajes fueron, para el alelo A de un 98%, mientras que para el alelo G de un 2%. No se hallan diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas (para AA de 96, AG de 3.9 y GG de 0) por el equilibrio de Hardy Weinberg siendo X^2 : 0.042 y $P=0.84$.

Genotipos	Nº de individuos	Frecuencias genotípicas TPMT*3C
AA	53	96%
AG	2	4 %
GG	0	0 %
Total	55	100%

Alelos	Nº de veces que se encuentra el alelo	Frecuencias alélicas TPMT*3C
A	108	98%
G	2	2%
Total	110	100

Tabla 7: Frecuencias genotípicas y alélicas de TPMT*3C en una población de 55 voluntarios uruguayos.

En la Figura 12 se puede observar un gel de poliacrilamida, donde se ha separado mediante una electroforesis las digestiones realizadas con la enzima de restricción *AccI* al producto de PCR amplificado a partir de las diferentes muestras. 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 con genotipo silvestre AA (364 pb), heterocigota AG (364 pb + 248 pb + 116 pb). En el caso de encontrarse un individuo homocigota GG se deberían observar dos fragmentos uno a 248 pb y el otro a 116 pb.

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 TPMT*3C, ver Tabla 2.

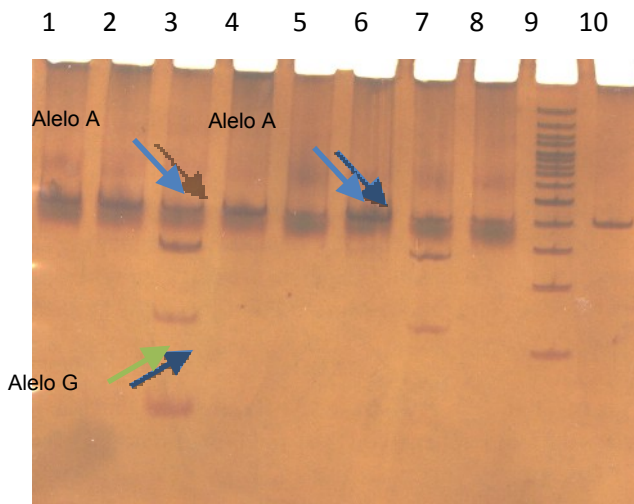


Figura 12: gel poliacrilamida al 6% a partir del cual se diagnosticó el polimorfismo para TPMT*3c. En los carriles 3 y 7 se puede observar el patrón de bandas de un individuo heterocigoto AG, mientras que en los restantes carriles se observa el patrón correspondientes a individuos homocigotas AA. En el carril 10 se puede observar el fragmento sin digerir. Alelo A en azul, alelo G en verde.

Carriles:

1. Digestión del producto de PCR de la muestra P24.
2. Digestión del producto de PCR de la muestra P25.
3. Digestión del producto de PCR de la muestra P28.
4. Digestión del producto de PCR de la muestra P29.
5. Digestión del producto de PCR de la muestra P44.
6. Digestión del producto de PCR de la muestra HO100.
7. Digestión del producto de PCR de la muestra HO101.
8. Digestión del producto de PCR de la muestra P45.
9. Marcador de peso molecular 100 pb.
10. Fragmento sin digerir.

4.4 Resultados del estudio del polimorfismo TPMT*3A

El polimorfismo TPMT*3A consiste en dos transiciones nucleotídicas; G460A (exón VII; Ala154Thr) y A719G (exón X; Tyr240Cys). Estas variantes genéticas pueden existir separadas como TPMT*B (G460A) y TPMT*3C (A719G). Por lo que se las estudia por separado y luego se las suma para obtener los datos sobre el haplotipo TPMT*3A.

La frecuencia para esta variación fue de un 2% en la población uruguaya estudiada, siendo el restante 98% silvestre para este caso.

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 TMTP*3A, ver Tabla 2.

4.5 Resultados de la secuenciación de ADN

Luego de la extracción de ADN, amplificación por PCR de la región específica, y purificación del fragmento en estudio, éste se envía a secuenciar. El resultado de esta secuenciación se muestra en la figura 13.

Como se mencionó antes, estas mutaciones consisten para:

- TPMT *3B, en un cambio G460A en el exón VII de TPMT, que implica un cambio del codón 154 que codifica para alanina (GCA) al codón ACA que codifica para treonina. (Ala154->Thr).
- TPMT*3C, en un cambio A719G en el exón X de TPMT, que implica un cambio del codón del 240 que codifica tirosina (TAT) al codón TGT que codifica para cisteína. (Tyr240->Cys).

Como se observa en las secuencias, las dos muestras analizadas tenían el cambio esperado en el ADN. Se puede observar marcadas con un círculo rojo las mutaciones en el ADN (muestra HO101) en estudio. Para el polimorfismo TPMT*3B se puede ver el cambio de guanina por adenina. Mientras que para el polimorfismo TPMT*3C se observa el cambio de adenina por guanina.

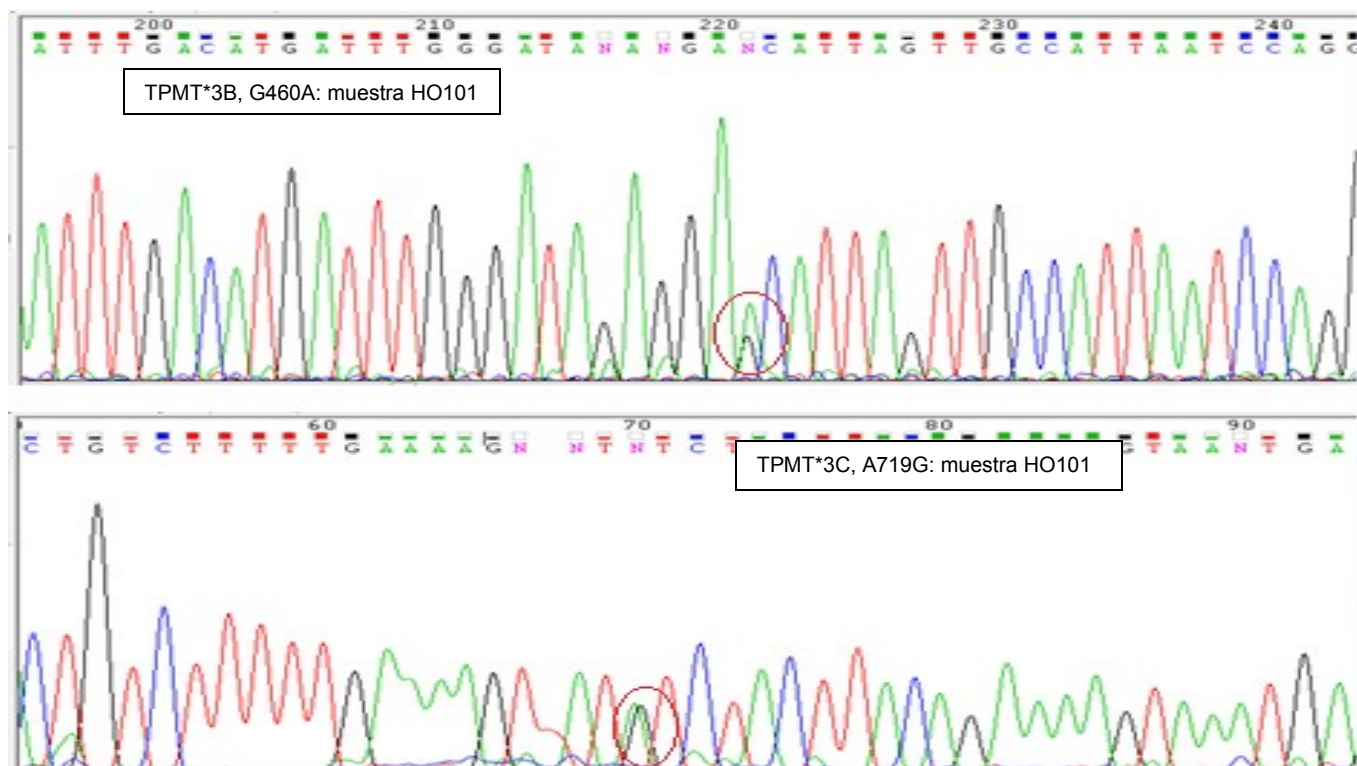


Figura 13: Secuencias de los polimorfismos TPMT*3B y *3C. Se marca con un círculo rojo los cambios de bases encontrados.

CAPITULO 5: DISCUSIÓN y CONCLUSION

5.1 Estudio de las variantes alélicas de la TPMT

El frecuente uso de AZA/6-MP entre otras tiopurinas en el tratamiento de pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil, enfermedad inflamatoria intestinal, trasplante de órganos entre otras, ha despertado el interés del estudio de las variantes alélicas de la TPMT. Los efectos adversos descritos causados por la administración de estas drogas han sido asociados a la presencia de polimorfismos en el gen de la enzima y obliga a la suspensión del tratamiento en 15-30% de los pacientes.

La información genética aportada por estos estudios, usados en combinación con otras características del paciente como la edad, estado de salud general, medicaciones concomitantes, etc., podrían ayudar a disminuir los efectos adversos y lograr una terapia individualizada beneficiosa para el paciente en cuestión.

Se ha realizado un estudio sobre 55 individuos que sirve como ejemplo para demostrar que existe un porcentaje considerable (7.2%) de individuos que presentan algunas de las variaciones. Estos son los individuos que correrían riesgo de presentar alguno de los efectos adversos al tratamiento con tiopurinas en caso de necesitarlo.

En nuestra población se observa la presencia de polimorfismo en la enzima TPMT similar a la descrita en otros estudios realizados en Argentina, Bolivia, Colombia y Chile. Observamos que el comportamiento de las frecuencias genotípicas es similar al reportado en la población caucásica americana siendo TPMT*1/*1 con el 92.7% el genotipo con mayor representación en la población seguido de TPMT*1/*2 y *1/*3A. [Yates et al. 1997; Luis Álvarez, 2009]. De la misma manera las frecuencias alélicas (TPMT*1 96.4%, *2 y *3A

1.8%) son similares a las reportadas en estudios realizados en Argentina. Como excepción encontramos que el alelo de TPMT*2 se comporta de manera similar al reportado por estudios realizados en la población brasileña, [Srikumar Sahasranaman, 2008].

Estos datos apoyan la importancia de analizar los polimorfismos relacionados con la enzima en cada población ya que pueden ser decisivos a la hora de tomar decisiones de qué medicamento utilizar y la dosis del mismo.

La distribución genotípica obtenida no se aparta de la esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg, considerando dos alelos, el silvestre (TPMT*1) y el conjunto de los otros (no-TPMT*1). Los valores esperados para TPMT*1/TPMT*1, TPMT*1/noTPMT*1 y noTPMT*1/noTPMT*1 eran de 51, 3.8 y 0.001 respectivamente. Por lo tanto las frecuencias genéticas se mantendrán constantes de generación en generación.

5.2 Los desafíos para el futuro

El presente trabajo trae como aporte al área de la farmacogenética el conocimiento de las variantes genéticas relacionadas con los polimorfismos que se consideran relevantes para la enzima TPMT.

Como se ha logrado la puesta a punto de este estudio, los individuos bajo tratamiento podrían beneficiarse con su aplicación ya que a partir de esta información es posible identificar a aquellos pacientes que se beneficiarán por cambios en los regímenes terapéuticos de modo de reducir la incidencia de reacciones adversas. Esta aproximación a la terapia personalizada posibilita una óptima y temprana racionalización del tratamiento, revirtiendo las ineficiencias de la metodología de ensayo y error usada tradicionalmente.

Nuestra intención es que este análisis sea de rutina para los pacientes que tengan que ser tratados con tiopurinas. En 2004 la FDA (Food and Drug Administration) en USA aprobó el testeo (o sea que se realice este ensayo o uno similar) de la enzima TPMT y realizó la recomendación de incluir en el folleto de la droga información sobre el testeo de TPMT.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad F, Novalbos J. (2005). Evaluación ética de los estudios de Farmacogenética. ICB digital 30:1-8 <http://www.icf.uab.es/icbdigital/> [Acceso 19 Agosto 2011]. Institut Català de Farmacologia.
- Arribas, I. (2010) Farmacogenética y variabilidad Interindividual en la respuesta a los medicamentos. Academia de farmacia “Reino de Aragón”.
- Banda Gurrola S, Torres Guevara E.J, Chavez Ramirez H.J. Farmacogenética y Farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. Rev Fac Med. UNAM Vol. 53 N°2. Marzo-Abril. 2010.
- Brockmöller J, Tzvetkov M. (2008). Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 64:133–157.
- Candelaria, M., Teja-Chayeb, L., Vidal-Millan, S., Gutiérrez, O., Serrano-Olvera, A., Arce-Salinas, C., Dueñas-Gonzalez, A. (2006) Importancia de la determinación de variantes genéticas que influyen en la eficacia y toxicidad farmacológica en oncología – Cancerología 1: 57-70.
- Coulthard, S. A., Howell, C., Robson, J. and Hall, A. G. (1998) The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 92: 2856-2862.
- Ensemble: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000137364;r=6:1812854218155305;t=ENST00000309983;time=1287767413812.812
- Evans WE, McLeod HL. (2003). Pharmacogenomics – Drug Disposition, Drug Targets and Side effects. *New Engl. J. Med.*, 348:538-549.

- Evans WE, Relling MV (1999): Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 1999; 286:487-491.
- Ferriols Lisart y R. Ferriols Lisart (2003): Farmacogenética ¿dónde estamos y a dónde vamos?. F. Farmacia Hospitalaria (Madrid). Vol. 27. N.º 2, pp. 109-120.
- Ford, L T., Berg, J D. (2010) Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. J Clin Pathol; 63: 288-295.
- Haglund, S. (2011) Interindividual differences in thiopurine metabolism – Studies with focus on inflammatory bowel disease. Medical dissertation. Linköping University- Faculty of Health Sciences.
- Hernández Herrero, G.; Moreno González, A.; Zaragoza García, F.; Porras Chavariono, A. (2010) Tratado de Medicina Farmacéutica. MediPharm. ed. Médica Panamericana.
- L. Castaño, J.R. Bilbao. (1997) Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en AND amplificado por PCR. An Esp Pediatr; 46:305-310.
- Liewei Wang, Linda Pelleymounter, Richard Weinshilboum, Julie A. Johnson, Joan M. Hebert, Russ B. Altman, and Teri E. Klein (2010) Very important pharmacogene summary: thiopurine Smethyltransferase. Pharmacogenet Genomics. June; 20(6): 401–405.
- Luis Álvarez L, Mauricio Venegas S, Milton Larrondo L, Natalia Becerra B, Ariel Castro L, Rodrigo Quera P. Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Chilean blood donors. Rev Méd Chile 2009; 137: 185-192.
- Marsh S, McLeod HL: Cancer pharmacogenetics. Br j Cancer 2004; 90:8-11

- McLeod, H. L., Relling, M. V., Liu, Q., Pui, C. H. and Evans, W. E. (1995) Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85: 1897-1902.
- Nuffield Council on Bioethics. (2003). Pharmacogenetics: Ethical issues, report. <http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/Pharmacogenetics%20Report.pdf> [Acceso 24 enero 2012].
- Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FW. (2008). Thompson & Thompson. Genética en Medicina. 7ª Edición. MASSON. S.A.
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Abril 2010. 3th Edition.
- Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez (2004): Farmacodivulgación - Farmacogenética: Medicina personalizada. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas. "Victoria de Girón". ISCM-H. . *Rev Cubana Farm* 2004;38.
- Roberts, R., Murray L. Barclay, Richard B. Gearry, Martin A. Kennedy (2004) A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clinica Chimica Acta* 341: 49–53.
- Roses AD. (2000). Pharmacogenetics and the Practice of Medicine. *Nature*, 405:857-865.
- Ruiz-Canela M. (2005). De la investigación farmacogenómica a la medicina individualizada: un espacio para la reflexión ética. *Rev. Méd. Univ. Navarra*, 49:32-33.
- Sánchez Olavarría, M.P (2004) Análisis de Procedimientos para la Evaluación de Medicamentos: Bioequivalencia y Farmacogenética. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona, España.

- Sookoian S, Pirola CJ. Farmacogenética/farmacogenómica en la práctica clínica. MEDICINA (Buenos Aires). 2004;64:563-567.
- Srikumar Sahasranaman & Danny Howard & Sandip Roy (2008) Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. Eur J Clin Pharmacol 64:753–767.
- Szumlanski, C., Otterness, D., Her, C., Lee, D., Brandriff, B., Kelsell, D., et al. (1996) Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. DNA Cell Biol 15: 17-30.
- Topic Elizabeta, Pharmacogenetic and Tumour Drugs - 2005 <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol16no2/160206200512.htm>
- Wang, B., Ngoi, S., Wang, J., Chong, S., Lee, C. (2006) The Promoter Region of the MDR1 Gene Is Largely Invariant, but Different Single Nucleotide Polymorphism Haplotypes Affect MDR1 Promoter Activity Differently in Different Cell Lines. Mol Pharmacol 70:267–276.
- Weinshilboum R. (2003). Inheritance and Drug Response. N. Engl. J. Med., 348:529-537.
- Yábar Varas, C. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003. 59 p. : 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 38).
- Yates, C. R., Krynetski, E. Y., Loennechen, T., Fessing, M. Y., Tai, H. L., Pui, C. H., et al. (1997) Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. Ann Intern Med 126: 608-614.