

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



**Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los
polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

Silvia Berenice Santana Anguiano

Tijuana, Baja California, México.

Febrero de 2019.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 033

Tijuana, B. C., a 13 de febrero de 2019

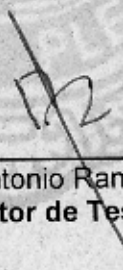
C. Silvia Berenice Santana Anguiano
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra quien será el responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema "Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS
- VII.- ANEXOS

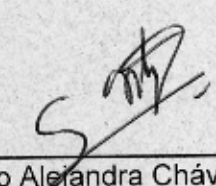


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis





Dr. José Luis González Vázquez
Director Provisional



Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy
Subdirectora

Santana Anguiano, Silvia Berenice
**Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos
C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC**
Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

1. el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
2. incluir la siguiente cita: "Santana Anguiano, Silvia Berenice. Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Febrero de 2019."
3. enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Santana Anguiano, Silvia Berenice. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2019.

Tesis: Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Institución: Universidad Autónoma de Baja California.

Sustentante: Silvia Berenice Santana Anguiano.

Fecha: Febrero de 2019.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, bajo la dirección del profesor Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra, y con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544).

Los resultados correspondientes se presentaron en el 2do. Congreso de Investigación en Salud, que realizó la Secretaría de Salud del Estado de Baja California, en el Centro de Convenciones – Baja California Center del municipio de Playas de Rosarito, los días 23 y 24 de Noviembre de 2018. La participación en el evento académico recibió apoyo de la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Detección molecular de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en pacientes con LMC.

Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.

Institución: Universidad Autónoma de Baja California.

Sustentante: Silvia Berenice Santana Anguiano.

Fecha: Febrero de 2019.

El presente manuscrito de tesis fue revisado y aprobado por el comité académico conformado por los profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Secretaria)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, Dra. (Sinodal)

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Suplente)

Pablo Alfonso Madero Ayala, QFB (Suplente)

Dedicatorias

A mi madre Silvia Anguiano

Por haberme apoyado en todo momento, por creer en mí y demostrar su amor incondicional.

A mi padre Luis Santana

Por los ejemplos de responsabilidad, perseverancia y honestidad.

A mi Hermano Alberto Santana

Por impulsarme a ser mejor ser humano para ser una buena guía como hermana mayor.

A mi abuelo Miguel Anguiano

Por inspirarme a cumplir mis metas, y quien con su ausencia sigue otorgando lecciones de vida.

Al Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Por brindarme la oportunidad de realizar un trabajo de investigación para tesis de licenciatura, por su apoyo, paciencia, consejos y, sobre todo, por compartir su conocimiento.

A la Dra. Rosa Elena Mares Alejandro

Por compartir su experiencia, apoyarme e invertir su tiempo en responder mis dudas.

A mis compañeros de laboratorio: Celina, Pablo, Álvaro y Ariana

Por hacer más amena mi estancia en el laboratorio y por brindarme apoyo.

Agradecimientos

Agradezco cordialmente a todos los profesores de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, porque influyeron en mi formación profesional.

Mi agradecimiento al comité académico por su colaboración y orientación al revisar mi tesis de licenciatura.

A la Universidad Autónoma de Baja California, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le brindo las gracias por financiar el presente trabajo.

Contenido

Dedicatorias	5
Agradecimientos	6
Contenido	7
Índice de Figuras y Tablas	9
Abreviaturas	10
I. INTRODUCCIÓN	11
I.1. Leucemia mieloide crónica	11
I.1.1. Genética del cromosoma Filadelfia	11
I.1.2. Fisiopatología	12
I.1.3. Tratamiento y resistencia a fármacos	13
I.1.4. Leucemia mieloide crónica atípica	13
I.2. Asociación genotipo-fenotipo de enfermedades cancerosas.....	13
I.2.1. Cánceres comunes	13
I.2.2. Leucemia y linfoma	14
I.2.3. Marcadores tumorales	14
I.3. Dihidropiridina deshidrogenasa (DPYD)	15
I.3.1. Genética molecular	15
I.3.2. Bioquímica y biología molecular	15
I.3.3. Genética funcional.....	16
I.3.4. Genética poblacional.....	16
I.4. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	16
I.4.1. Genética molecular	16
I.4.2. Bioquímica y biología molecular	17
I.4.3. Genética funcional.....	18
I.4.4. Genética poblacional.....	18
I.5. Mutaciones en DPYD y MTHFR como biomarcadores de LMC.....	18
II. OBJETIVOS	20
II.1. Objetivo general	20
II.2. Objetivos específicos	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
III.1. Materiales químicos y biológicos.....	21
III.2. Equipo	21
III.3. Oligonucleótidos	21
III.4. ADN genómico humano	22
III.5. Reacción de <i>PCR</i> estándar	22
III.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	23
III.7. Digestión enzimática del producto de <i>PCR</i>	23
III.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%	23

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
IV.1. Amplificación (<i>PCR</i>) de los segmentos polimórficos	24
IV.2. Detección de variantes polimórficas mediante <i>RFLP</i>	25
IV.3. Determinación de frecuencias y equilibrio génico	26
IV.4. Análisis de asociación genotipo-fenotipo: estudios de caso-control.....	28
IV.5. Contribución al conocimiento de asociación genotipo-LMC	28
V. CONCLUSIÓN.....	30
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	31

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Cromosoma Filadelfia.	12
Figura 2. Ubicación cromosómica del <i>locus</i> DPYD.....	15
Figura 3. Vía metabólica de degradación de uracilo y timina.	15
Figura 4. Efecto de DPYD IVS14+1G>A.	16
Figura 5. Ubicación cromosómica del <i>locus</i> MTHFR.	16
Figura 6. Ruta metabólica de folato.	17
Figura 7. Productos de <i>PCR</i> del gen DPYD de siete pacientes leucémicos.	24
Figura 8. Productos de <i>PCR</i> del gen MTHFR (<i>SNP</i> C677T) de ocho pacientes leucémicos.	25
Figura 9. Productos de <i>PCR</i> del gen MTHFR (<i>SNP</i> A1298C) de ocho pacientes leucémicos.	25
Figura 10. Análisis <i>RFLP</i> (NdeI) de las variantes alélicas asociadas a DPYD IVS14+1G>A de ocho pacientes leucémicos.	25
Figura 11. Análisis <i>RFLP</i> (HinfI) de las variantes alélicas asociadas a MTHFR C677T de ocho pacientes leucémicos.	26
Figura 12. Análisis <i>RFLP</i> (MfeI) de las variantes alélicas asociadas a MTHFR A1298C de ocho pacientes leucémicos.	26
Figura 13. Tablas de contingencia y análisis estadístico (prueba de Fisher). Modelos de asociación genotipo-fenotipo de las variantes de estudio y LMC.	28
Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en el presente estudio.	22
Tabla 2. Mezcla de componentes para una reacción de <i>PCR</i>	22
Tabla 3. Mezcla de componentes para realizar una reacción de digestión.	23
Tabla 4. Clasificación de las variantes polimórficas detectadas en el presente estudio.	24
Tabla 5. Frecuencias y equilibrio génico de las variantes de estudio.	27

Abreviaturas

<i>ABL</i>	Del inglés, <i>Abelson leukemia</i> : proto-oncogen v- <i>ABL</i> del virus Abelson de leucemia murina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
<i>BCR</i>	Del inglés, <i>Breakpoint Cluster Region</i> : Región agrupada de puntos de ruptura
<i>BSA</i>	Del inglés, <i>Bovine serum albumin</i> : Albúmina de suero bovino
DPYD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMCa	Leucemia mieloide crónica atípica
<i>PCR</i>	Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> : Reacción en cadena de la ADN polimerasa
<i>Ph</i>	Del inglés, <i>Philadelphia</i> : Filadelfia (referente al cromosoma)
<i>RFLP</i>	Del inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> : Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
<i>SNP</i>	Del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> : Polimorfismos de un solo nucleótido

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Leucemia mieloide crónica

La leucemia es un cáncer de células sanguíneas caracterizada por un aumento permanente, anormal y desordenado, del número de leucocitos [Lozano, 2002]. La leucemia mieloide crónica (LMC) se origina por la transformación maligna de una célula progenitora común, célula pluripotencial, que se caracteriza clínicamente por la proliferación excesiva de células mieloides inmaduras, tanto en sangre periférica como en médula ósea.

La anormalidad cromosómica más común de la LMC es la translocación t(9;22), o cromosoma Filadelfia (*Ph*), ya que se encuentra en más del 90% de los casos [Rosas-Cabral *et al.*, 2003]. Además de la presencia del cromosoma *Ph*, estudios recientes sugieren que algunos polimorfismos de un solo nucleótido, o *SNP* (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*), localizados en genes críticos pueden aumentar el riesgo de LMC [Aly *et al.*, 2014; Shet *et al.*, 2002].

I.1.1. Genética del cromosoma Filadelfia

El cromosoma *Ph* es uno de los productos generados de la recombinación no homóloga de los cromosomas 9 y 22 (Figura 1). Como producto de la fusión, el cromosoma 22 (*Ph*) se visualiza acortado. Además, a nivel molecular, se produce un rearreglo genético que rinde la fusión de la región 3' del proto-oncogén Abelson (*ABL*), del cromosoma 9, con la región 5' del gen *BCR*, del cromosoma 22.

De manera general, el punto de recombinación en el gen *BCR* ocurre en una región no mayor a 5.8 kb, conocida como M-*BCR* (localizada entre los exones 10 y 15 del gen). Por el contrario, el punto de recombinación en el gen *ABL* ocurre en una región muy extensa (100 kb). De esta forma, la fusión génica *BCR-ABL*, ubicada bajo el control de la región promotora del gen *BCR*, se transcribe de manera activa y produce un ARNm de 8.5 kb que produce una proteína quimérica *BCR-ABL*, de 210 kDa (p210), con actividad tirosina cinasa aumentada [Campos Rudín *et al.*, 1998; Shet *et al.*, 2002; McKenzie, 2000]. Tal actividad es causante de la fosforilación de diversos sustratos, los cuales activan vías de señalización relacionadas con el incremento de la proliferación celular, alteraciones en la diferenciación, resistencia a la apoptosis, alteraciones en el ciclo celular y cambios en el citoesqueleto [Avilés-Vázquez *et al.*, 2013].

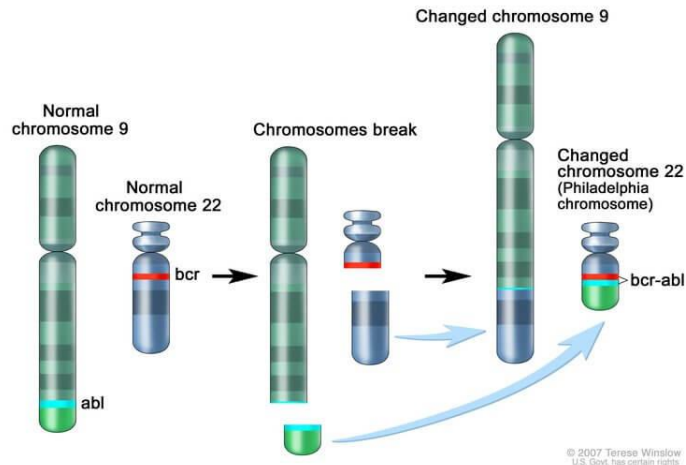


Figura 1. Cromosoma Filadelfia.

Esquema de la translocación t(9;22) y segregación cromosómica (mostrado en el formato original).
Tomado de: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/dasatinib-fda-cml-children>.

I.1.2. Fisiopatología

El intervalo de edad (promedio) en el cual puede iniciar la LMC es de 40 a 50 años; aunque, ocasionalmente ocurre en la niñez y adolescencia. En la mayoría de los casos, se desarrolla cuando una célula madre hematopoyética pluripotencial genera el cromosoma *Ph* [Banasik y Copstead, 2019]. El curso clínico de la LMC se divide en tres fases: (1) fase crónica, de duración variable, (2) fase acelerada, de corta duración, y (3) fase terminal, de crisis blástica.

El inicio de la fase crónica es usualmente lento con síntomas no específicos, como debilidad y pérdida de peso. Aquí, se puede observar una leucocitosis ($\geq 13 \times 10^3$ por μL) con granulocitos inmaduros en sangre periférica, anemia y, eventualmente, trombocitopenia. La esplenomegalia está presente comúnmente al momento del diagnóstico, la hepatomegalia es menos común, y la linfadenopatía es relativamente inusual. Los individuos en fase crónica sin un tratamiento efectivo pueden avanzar a fase acelerada dentro de los primeros 4 años.

La fase acelerada se caracteriza por el aumento de tamaño del bazo y por síntomas progresivos. El incremento del conteo de basófilos y células inmaduras en la sangre periférica o en médula ósea confirman la transformación a la fase acelerada. Durante esta fase se presentan diversos síntomas, como fiebre, sudoración nocturna, dolor de huesos y pérdida de peso. La duración de la fase acelerada es de 6 a 12 meses, generalmente.

La crisis blástica representa una evolución hacia leucemia aguda y se caracteriza por un incremento de precursores mieloides, especialmente células blásticas en la sangre ($>100 \times 10^3$ por μL). La esplenomegalia se incrementa significativamente. Los infiltrados aislados de células

leucémicas pueden afectar la piel, nódulos linfáticos, huesos y el sistema nervioso central. El pronóstico para pacientes en fase blástica es de 3 meses [Porth, 2011].

I.1.3.Tratamiento y resistencia a fármacos

El fármaco imatinib, inhibidor de *BCR-ABL* (p210), se introdujo con éxito como tratamiento estándar de LMC en fase crónica. Aunque se diseñó como un fármaco racional, el desarrollo de la resistencia al tratamiento resulta de dos tipos de mecanismos: (1) dependientes de *BCR-ABL*, como la sobreexpresión proteica o la adquisición de mutaciones puntuales en el dominio cinasa de *ABL*, o (2) independientes de *BCR-ABL*, como la evolución clonal, la activación de alguna tirosina cinasa alternativa, la sobreexpresión de un gen MDR (de resistencia a fármacos) o la presencia de células *Ph*⁺ quiescentes (células en fase G₀) [Valent, 2007; Bengio *et al.*, 2007].

I.1.4.Leucemia mieloide crónica atípica

Existen leucemias mieloides que pueden presentarse clínicamente como LMC, aunque sean diferentes genéticamente. Por ejemplo, la LMC atípica (LMCa) es una leucemia mieloide con fisiopatología similar a LMC que carece del cromosoma *Ph* y, por lo tanto, no expresa la fusión *BCR-ABL* [Gotlib, 2007; Wang, 2014].

I.2. Asociación genotipo-fenotipo de enfermedades cancerosas

Uno de los principales desafíos en el estudio de enfermedades en humanos es la identificación y explicación de la relación genotipo-fenotipo. De manera general, el conjunto de datos sobre cáncer revela que tal relación no es uno a uno, ya que diferentes alteraciones genotípicas pueden conducir al mismo patrón fenotípico en pacientes con el mismo tipo de enfermedad cancerosa. Para estos casos, una explicación factible es considerar que diferentes alteraciones genéticas pueden desregular las mismas vías metabólicas, generando fenotipos similares [Kim *et al.*, 2016].

I.2.1.Cánceres comunes

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹, los tipos de cáncer que causan un mayor número de muertes corresponden a pulmón, hígado, estómago, colon y mama. De manera particular, los cambios genéticos desempeñan un papel importante en el desarrollo

¹ OMS. Cáncer: hoja de datos. Consultada el 09-01-2019 (www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer).

del cáncer, ya que una mutación en un gen específico puede ser suficiente para perturbar una vía metabólica completa [Kim *et al.*, 2016].

Cáncer de pulmón. Aunque el cáncer de pulmón se desarrolla de manera primordial por factores ambientales, los factores genéticos también contribuyen a la patogénesis. La acumulación de alteraciones moleculares en proto-oncogenes (*Ras* y *Myc*), en genes supresores (*p53* y *p16*), y en genes anti-apoptóticos (*Bcl-2*), así como la acción de otros factores, p. ej., expresión desregulada de la telomerasa, son clave en la progresión celular de la enfermedad [Serrano, 2007].

Cáncer de hígado. Las mutaciones en el gen TP53 se identifican en 20-50% de los casos de carcinoma hepatocelular [Nault y Zucman–Rossi, 2012].

Cáncer de estómago. En un estudio, se observó que los genes de ADAM17 y FZD7 se expresan diferencialmente en el cáncer gástrico, y que los cánceres FZD7⁺ se asocian con una supervivencia significativamente más corta [Schmuck *et al.*, 2011].

Cáncer de colon. El cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) se asocia con mutaciones en los genes de reparación del ADN, de manera particular con MLH1 y MSH2 [Peltomäki *et al.*, 2001].

Cáncer de mama. 5-10% del cáncer de mama es hereditario y las mutaciones en los genes de BRCA1 y BRCA2 son responsables de la mayoría de los casos [Salha *et al.*, 2017].

I.2.2. Leucemia y linfoma

A diferencia de la leucemia, que es un cáncer de células sanguíneas, los linfomas son tumores del sistema linfático [Lozano, 2002; Shaikh *et al.*, 2016]. Muchas neoplasias hematopoyéticas y linfoides tienen anomalías genéticas [Huret *et al.*, 2012]. Por ejemplo, la leucemia promielocítica aguda se define por la translocación t(15;17), que genera la fusión PML-RARA [De Braekeleer *et al.*, 2014], o varios linfomas (incluyendo el linfoma no Hodgkin) y algunas leucemias se caracterizan por translocaciones en la región cromosómica 11q23 [Iida *et al.*, 2015].

I.2.3. Marcadores tumorales

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer de los E.U.A. (NCI/NIH)², los marcadores tumorales son sustancias producidas por las células cancerosas, o por otras células del cuerpo, como respuesta a la proliferación celular cancerosa, o a ciertas afecciones benignas (no cancerosas). De manera habitual, estos son utilizados como complemento diagnóstico, ya que

² NCI/NIH. Tumor markers. Consultada el 09-01-2019 (www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet).

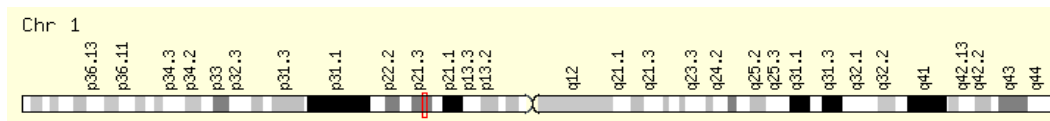


Figura 2. Ubicación cromosómica del *locus* DPYD.

Imagen tomada de Gene Cards. Consultada el 09-01-2019 (mostrada en el formato original).
www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DPYD

poseen baja especificidad. Ejemplos de marcadores tumorales en LMC son la fusión génica BCR/ABL, el ARNm de 8.5 kb y la proteína P210 [McKenzie, 2000].

I.3. Dihidropiridina deshidrogenasa (DPYD)

I.3.1. Genética molecular

El gen DPYD de humano tiene una longitud de 950 Kb, está localizado en el *locus* 1p21.3 (Figura 2), consiste en 23 exones y codifica para un polipéptido de 1,025 residuos de aminoácidos [Süzen *et al.*, 2005]. Este gen presenta más de 30 mutaciones, algunas de las cuales ocasionan disminución de la actividad enzimática. La mutación más común que produce una deficiencia severa es la transición G>A en el sitio de reconocimiento 5' GT del intrón 14, denominada como IVS14+1G>A [Al-Khateeb *et al.*, 2017].

I.3.2. Bioquímica y biología molecular

La dihidropiridina deshidrogenasa (DPYD) es tanto la primera enzima de la vía metabólica como el biocatalizador limitante de la velocidad de degradación de uracilo y timina (Figura 3). Además, degrada al fármaco 5-fluorouracilo [Van Kuilenburg *et al.*, 2003; Al-Khateeb *et al.*, 2017; Omura, 2003].

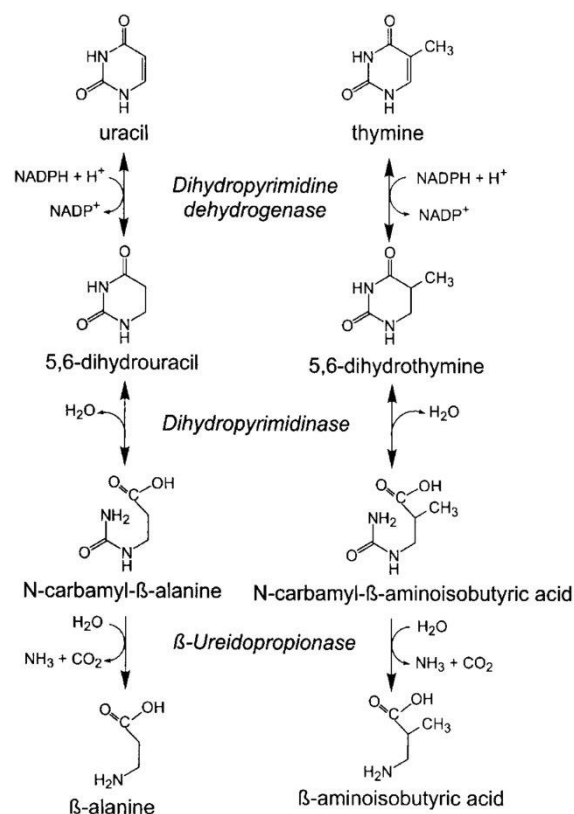


Figura 3. Vía metabólica de degradación de uracilo y timina.

Imagen tomada de van Kuilenburg *et al.* (2004), mostrada en el formato original.

La mutación IVS14+1G>A conduce a la ausencia del exón 14, como producto de *splicing* alternativo, dando como resultado un ARNm que carece de un segmento de 165 nucleótidos (ubicado en la región codificante entre los residuos 581-635) y una proteína con baja actividad enzimática (Figura 4) [van Kuilenburg *et al.*, 2001; Al-Khateeb *et al.*, 2017].

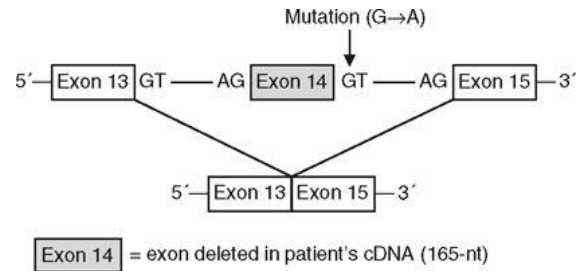


Figura 4. Efecto de DPYD IVS14+1G>A.

Imagen tomada de van Kuilenburg *et al.* (2003), mostrada en el formato original.

I.3.3. Genética funcional

La deficiencia de DPYD es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo de las pirimidinas que afecta la degradación de uracilo/timina. La expresión clínica en pacientes varía desde asintomáticos hasta gravemente afectados que sufren convulsiones, microcefalia, hipotonía muscular, retraso en el desarrollo y anomalías oculares [Fleger *et al.*, 2017].

I.3.4. Genética poblacional

A la fecha, la mutación IVS14+1G>A en DPYD no ha sido detectada en la población mexicana [Gallegos-Arreola *et al.*, 2018; Ruiz-García *et al.*, 2015]. Por otro lado, en población caucásica se reportó una frecuencia alélica de 0.75% [Sulzyc-Bielicka, 2008].

I.4. Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

I.4.1. Genética molecular

El gen MTHFR de humano tiene una longitud de 21.2 Kb, está localizado en el *locus* 1p36.3 (Figura 5), consiste en 11 exones y codifica para un polipéptido de 656 residuos de aminoácidos. Los dos polimorfismos más comunes que producen una disminución de la actividad

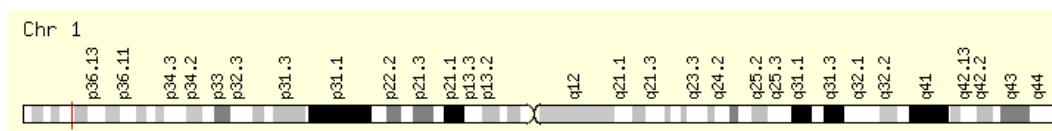


Figura 5. Ubicación cromosómica del *locus* MTHFR.

Imagen tomada de Gene Cards. Consultada el 09-01-2019 (mostrada en el formato original).
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTHFR>

I.4.2.Bioquímica y biología molecular

The diagram illustrates the biochemical pathways of the folate and methionine cycles. The folate cycle starts with Folate, which is converted to PCFT by RFC. PCFT is then converted to DHF by DHFR. DHF is converted to THF by DHFR. THF is converted to Methylene-THF by SHMT. Methylene-THF is converted to Methyl-THF by MTHFR. Methyl-THF is converted to dTMP by TYMS, which then leads to dUMP. dUMP is converted back to dTMP by MTHFD1. The methionine cycle starts with Homocysteine, which is converted to Methionine by BHMT. Methionine is converted to SAM by MAT. SAM is converted to SAH by DNMT or GNMT, releasing a methyl group (R-CH₃). SAH is converted back to Homocysteine by AHCY. Homocysteine is also converted to Betaine by CHDH. Betaine is converted to Choline by MTR, which then leads to PC. PC is converted to PE by PEMT, which then leads to Homocysteine. Choline is converted back to Betaine by MTRR. The diagram also shows the conversion of Methylene-THF to Betaine by MTR.

Representación de las vías de captación y reducción de folato y transmetilación. RFC, acarreador de folato reducido; PCFT, transportador de folato acoplado a protones; DHF, dihidrofolato; THF, tetrahydrofolato; DHFR, dihidrofolato reductasa; SHMT, serina hidroximetiltransferasa; MTHFR, metilentetrahydrofolato reductasa; MTHFD1, metilentetrahydrofolato deshidrogenasa 1; TYMS, timidilato sintasa; MTR, metionina sintasa; MTRR, metionina sintasa reductasa; BHMT, betaina hidroximetiltransferasa; CHDH, colina deshidrogenasa; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PEMT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; SAM, S-adenosilmetionina; MAT, metionina adenosiltransferasa; SHA, S-adenosilhomocisteína; AHCY, S-adeonsil-L-homocisteína hidrolasa. Las enzimas enmarcadas con un ovalo azul corresponden a genes con polimorfismos asociados a deficiencias en el metabolismo de folatos. Imagen tomada de Chittiboyina *et al.* (2018), mostrada en el formato original.

Los dos polimorfismos genéticos comunes provocan disminución de la actividad enzimática de MTHFR. El polimorfismo C677T (A222V) produce una proteína termolábil con baja actividad enzimática y en individuos homocigóticos para 677TT genera altos niveles séricos de homocisteína. Por otro lado, el polimorfismo A1298C (E429A) produce una proteína con actividad enzimática reducida, pero no causa incremento en los niveles de homocisteína en individuos homocigotos (1298CC) o heterocigotos (1298AC) [Aly *et al.*, 2014]. Sin embargo, los individuos con la combinación heterocigótica 1298AC/677CT exhiben resultados similares a los individuos homocigotos para 677TT [Dean, 2012].

I.4.3. Genética funcional

Las mutaciones de MTHFR pueden afectar de manera indirecta la metilación del ADN. Por ejemplo, se sospecha que el polimorfismo C677T está involucrado en la hipometilación de algunas regiones reguladoras que permiten la activación de proto-oncogenes, lo que explicaría la asociación entre tal polimorfismo y algunos tipos de cáncer [Arruda *et al.*, 2013]. Además, las mutaciones en MTHFR producen acúmulo de homocisteína, lo cual posee toxicidad sobre los sistemas óseo (osteoporosis), ocular (luxación del cristalino), nervioso (convulsiones, alteraciones psiquiátricas) y vascular (accidentes cerebrovasculares, enfermedad cardiovascular) [Olivar *et al.*, 2012].

I.4.4. Genética poblacional

Los polimorfismos de MTHFR existen en promedio en el 10% de la población mundial y en el 50% en la población hispanica [Quiñones-Sepúlveda *et al.*, 2010]. Además, se reportó que la frecuencia alélica en la población mestiza mexicana del alelo 677T es de 44–61% y del alelo 1298C es de 7–12% [Contreras-Cubas *et al.*, 2016].

I.5. Mutaciones en DPYD y MTHFR como biomarcadores de LMC

La variación individual en el riesgo de desarrollar cáncer se asocia con diferentes polimorfismos en genes clave que participan en mecanismos moduladores de respuesta a la carcinogénesis [Rosero *et al.*, 2016]. Muchas neoplasias se caracterizan por tener alteraciones genéticas, y la LMC no es la excepción. En un estudio reciente, donde se analizaron células de 25 pacientes con LMCA, se observaron anomalías citogenéticas en el 36% y mutaciones genéticas en el 100%. El grupo de genes polimórficos asociados a un alto riesgo incluye a MTHFR, FLT3, NQO1 y TP53 [Aly *et al.*, 2014; Patnaik *et al.*, 2017].

De manera importante, se ha reportado un incremento de la concentración de uracilo en pacientes con LMC, lo que sugiere la existencia de una posible relación entre las variantes genéticas de DPYD y LMC. Por otro lado, existen mutaciones puntuales en el gen MTHFR que muestran una clara asociación con una baja actividad enzimática, lo cual conduce a una hipometilación del ADN, que frecuentemente se asocia con el proceso neoplásico de la LMC.

Partiendo de la premisa que establece: todas las neoplasias tienen mutaciones genéticas, el presente estudio plantea determinar la asociación genotipo-fenotipo de variantes genéticas de DPYD y MTHFR con el desarrollo de LMC. Con esto, se vislumbra la posibilidad de establecer la aplicabilidad esas variantes como biomarcadores con aplicación clínica.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Determinar la relación genotipo-fenotipo de la mutación IVS14+1G>A del gen DPYD y de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR con el desarrollo de LMC mediante un estudio de asociación que permita establecer su factibilidad como posibles biomarcadores de aplicación clínica.

II.2. Objetivos específicos

1. Aplicar la técnica de *PCR* para amplificar los fragmentos cromosómicos de los genes DPYD y MTHFR que contienen la mutación o los polimorfismos de interés.
2. Detectar la presencia de alelos específicos mediante un procedimiento *RFLP* con enzimas de restricción específicas para cada variante génica.
3. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas mediante conteo directo y aplicación de la ecuación Hardy-Weinberg para establecer el equilibrio genético.
4. Establecer la asociación de los alelos ligados a los genes DPYD y MTHFR con el desarrollo de LMC mediante un análisis genotipo-fenotipo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales químicos y biológicos

A menos que se especifique de otra manera, todos los reactivos químicos y biológicos se adquirieron de representantes locales de las casas comerciales Biorad, Life Technologies Co. y Sigma-Aldrich. La enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (TaqDNAP), en solución comercial estándar (5,000 U/mL) o como mezcla 2X lista para usarse (2XTaq Mix), se compró de Qiagen. Las endonucleasas de restricción *NdeI*, *Hinfl* y *MfeI*, las soluciones 100X BSA, 10X NEB2 y 10X CutSmart™, y el marcador de peso molecular de ADN λ -HindIII se consiguieron de New England Biolabs. El marcador de peso molecular de ADN Weight Marker V se obtuvo de Boehringer Mannheim. El reactivo fluorogénico SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain (10,000X en DMSO) se consiguió de Invitrogen – Thermo Fischer Scientific. La solución 50X TAE se preparó siguiendo los protocolos estándar de laboratorio.

III.2. Equipo

Las reacciones de PCR se completaron en un equipo MultiGene™ Gradient Thermal Cycler (Labnet International, Inc.). La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo en las cámaras de electroforesis Sub-Cell® GT Mini (horizontal) o Mini-PROTEAN® 3 (vertical) acopladas a fuentes de poder PowerPac™ Basic (Biorad). La digestión de ADN se realizó en la incubadora Boekel Scientific 132000 (Boekel Industries, Inc). La visualización en geles de teñidos con bromuro de etidio o SYBR™ Green I se realizó en un transiluminador UVP TI-33e (Analytik Jena US LLC) y la fotodocumentación con un sistema GelDoc™ EZ Imager (Biorad).

III.3. Oligonucleótidos

La Tabla 1 muestra la secuencia de los oligonucleótidos sintéticos utilizados en el presente estudio. El fragmento polimórfico del gen DPYD se amplificó usando el par HUDPYD(F/R) como iniciadores [Chao et al., 2014]. Los dos fragmentos polimórficos del gen MTHFR se amplificaron utilizando los pares MTHFR677(F2/R2) y MTHFR1298(F/R) como iniciadores [Ramos et al., 2011].

Tabla 1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en el presente estudio.

Oligonucleótido*	Secuencia (5' → 3')
HUDPYDF	ATCAGGACATTGTGACATATGTTTC
HUDPYDR	CTTGTTTTAGATGTTAAATCACACATA
MTHFR677F2	GCCACCCCGAAGCAGGGA
MTHFR677R2	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG
MTHFR1298F	TTACAGGAATGGCCTCCTG
MTHFR1298R	GTAAAGAAAAAGACTTCAAAGACAATT

*Adquiridos de Eurofins Genomics LLC.

Las tallas moleculares fueron verificadas usando como molde la secuencia de los genes DPYD (NCBI Acc. AB162145) y MTHFR (NCBI Acc. AF257484) y el programa *SnapGene*[®] Viewer (GSL Biotech LLC) como sistema de cálculo y visualización.

III.4. ADN genómico humano

36 muestras de ADN genómico (ADNg) de pacientes sanos se obtuvieron de un biobanco colectado en un estudio previo [Ramos et al., 2011]. 16 muestras de ADNg de pacientes con LMC *Ph*⁺ se obtuvieron de leucocitos sanguíneos usando el estuche comercial *QIAamp*[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Se recolectó una muestra (3.5 mL) de sangre periférica total de pacientes que reciben atención médica en el Hospital ISSSTECALI Tijuana (El Mirador). Todos los datos personales se removieron del tubo de ensayo para asegurar la privacidad individual.

III.5. Reacción de PCR estándar

En microtubos para PCR, se mezclaron los componentes para una reacción (Tabla 2). Los tubos con las mezclas se colocaron en el termociclador y la reacción procedió usando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos de amplificación exponencial a 94 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg; y 1 ciclo de amplificación final de 72 °C durante 7 min.

Tabla 2. Mezcla de componentes para una reacción de PCR.

Componente	DPYD	MTHFR677	MTHFR1298
2X TaqMix	12.5	12.5	12.5
Mezcla HUDPYD(F/R) 1 µM	10	-	-
Mezcla MTHFR677(F2/R2) 1 µM	-	10	-
Mezcla MTHFR1298(F/R) 1 µM	-	-	10
ADNg de humano (100 ± 50 ng)	2.5	2.5	2.5

Volúmenes de los componentes en µL.

Tabla 3. Mezcla de componentes para realizar una reacción de digestión.

Componente	DPYD	MTHFR677	MTHFR1298
10X NEB2	1	-	-
10X BSA	1	-	-
10X CutSmart	-	1	1
Producto de <i>PCR</i>	5-7.5	5-7.5	5-7.5
NdeI (20 U/ μ L)	0.5	-	-
Hinfl (20 U/ μ L)	-	0.5	-
MfeI (20 U/ μ L)	-	-	0.5
Agua destilada	cbp 10	cbp 10	cbp 10

Volúmenes de los componentes en μ L.

III.6. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (durante 45-60 min a 80 V) y se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL).

III.7. Digestión enzimática del producto de *PCR*

En microtubos de 0.6 mL, se mezclaron los componentes para una reacción de digestión (Tabla 3). Los tubos con las mezclas se colocaron en la incubadora y se mantuvieron a 37 °C durante toda la noche.

III.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%

Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (durante 150 min a 80 V). El gel de poliacrilamida se tiñó durante 20 min (en oscuridad) en un volumen de 20 mL de TAE 1X suplementado con 2 μ L de SYBR[™] Green I.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

32 muestras de ADN_g de pacientes sanos y 16 muestras de pacientes con LMC *Ph*⁺ se analizaron de manera individual para detectar la mutación IVS14+1G>A del gen *DPYD* y los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* mediante la técnica *PCR-RFLP* (del inglés, *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta consiste en amplificar el segmento polimórfico del gen de interés y realizar cortes con una enzima de restricción específica para cada una de las variantes (silvestre o mutante), lo que permite discernir cada variante con base a un polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. La Tabla 4 muestra el razonamiento utilizado para clasificar los alelos en cada prueba *PCR-RFLP*.

Tabla 4. Clasificación de las variantes polimórficas detectadas en el presente estudio.

Polimorfismo de Interés	Producto de PCR (pb)	Endonucleasa de Restricción	Variantes Polimórficas (pb)
DPYD: IVS14+1G>A	198	NdeI	G: 181, 17 A: 154, 27, 17
MTHFR: C677T	240	HinfI	C: 240 T: 176, 64
MTHFR: A1298C	230	MfeI	A: 230 C: 202, 28

IV.1. Amplificación (PCR) de los segmentos polimórficos

La totalidad de las muestras de ADN_g se sometieron a *PCR* de los segmentos polimórficos de interés. Cada muestra se analizó de manera individual, utilizando como código de identificación un sistema alfanumérico.

El segmento que comprende la mutación IVS14+1G>A del gen *DPYD* se amplificó de manera correcta, rindiendo

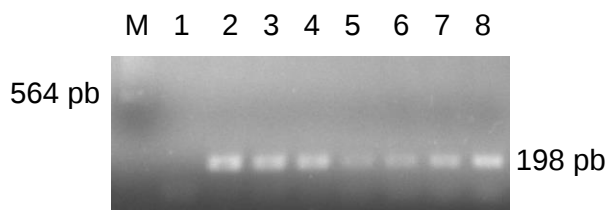


Figura 7. Productos de PCR del gen *DPYD* de siete pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador λ -HindIII; 1, control negativo; 2, P002; 3, P004; 4, P008; 5, P013; 6, P016; 7, P018; 8, P019. El marcador de PM de menor talla se muestra a la izquierda, en tanto el PM del producto esperado se muestra a la derecha.

un fragmento de 198 pb (Figura 7). De igual manera, los correspondientes a los polimorfismos C677T (240 pb; Figura 8) y A1298C (230 pb; Figura 9) del gen MTHFR. No obstante, en la mayoría de los casos, el producto del tamaño esperado se obtuvo en mayor concentración. Sin embargo, de manera ocasional, se observó amplificación inespecífica. Esto sugiere que es importante realizar las mezclas de manera rápida, mantener los tubos de ensayo en hielo y evitar (en la medida posible) tiempos prolongados de preparación a temperatura ambiente. Cabe destacar que la intensidad de la banda de interés, en el gel de agarosa, sirvió para definir el volumen del producto de *PCR* utilizado en la reacción de digestión. Esto es, señal intensa: 5 μ L, señal moderada: 7.5 μ L.

IV.2. Detección de variantes polimórficas mediante *RFLP*

Todos los productos de *PCR* se sometieron a la reacción de digestión correspondiente.

Las variantes asociadas a la mutación IVS14+1G>A del gen *DPYD* se detectaron de forma adecuada (Figura 10). Como parte del diseño de la prueba, el producto de *PCR* contiene una secuencia *NdeI* en el extremo opuesto al



Figura 8. Productos de *PCR* del gen MTHFR (*SNP* C677T) de ocho pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador λ -HindIII; 1, P009; 2, P010; 3, P011; 4, P012; 5, P013; 6, P014; 7, P015; 8, P016. El marcador de PM de menor talla se muestra a la izquierda, en tanto el PM del producto esperado se muestra a la derecha.

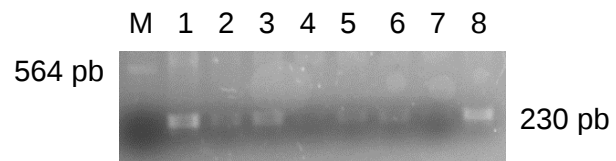


Figura 9. Productos de *PCR* del gen MTHFR (*SNP* A1298C) de ocho pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador λ -HindIII; 1, P001; 2, P002; 3, P003; 4, P004; 5, P005; 6, P006; 7, P007; 8, P008. El marcador de PM de menor talla se muestra a la izquierda, en tanto el PM del producto esperado se muestra a la derecha.

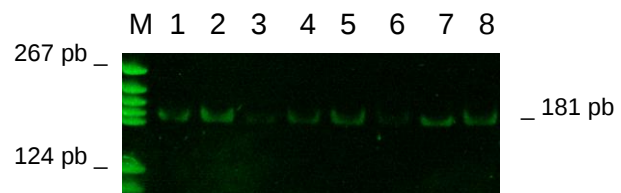


Figura 10. Análisis *RFLP* (*NdeI*) de las variantes alélicas asociadas a *DPYD* IVS14+1G>A de ocho pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con *SYBR™ Green I*. Carriles: M, *Weight Marker V*; 1, P001; 2, P003; 3, P004; 4, P005; 5, P006; 6, P007; 7, P008; 8, P009. Dos marcadores de PM (mayor y menor talla) se muestra a la izquierda, en tanto el PM del producto esperado se muestra a la derecha.

sitio polimórfico que funciona como control interno de eficiencia enzimática. Como se ubica a 17 pb del extremo 5', la talla del producto de *PCR* se reduce a 181 pb. En caso contrario, el sitio polimórfico, situado a 27 pb del extremo 3', compromete una secuencia *NdeI* en el alelo A. Por tales razones, un segmento cromosómico con la mutación IVS14+1A presenta 3 fragmentos: 154, 27 y 17 pb. En caso contrario, presenta sólo 2: 181 y 17 pb.

Las variantes asociadas a los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR se identificaron de manera consistente (Figuras 11 y 12). En el primer análisis (C677T), el sitio polimórfico, ubicado a 64 pb del extremo 5', compromete una secuencia *HinfI* en el alelo T (mutante). Por tal motivo, un segmento cromosómico con el polimorfismo 677T presenta 2 fragmentos: 176 y 64 pb. En caso contrario, sólo 1: 240 pb. En el segundo análisis (A1298C), el sitio polimórfico, situado a 28 pb del extremo 3', compromete un sitio *MfeI* en el alelo C (mutante). Por tal razón, un segmento cromosómico con el polimorfismo 1298C presenta 2 fragmentos: 202 y 28 pb. En caso contrario, sólo 1: 230 pb.

IV.3. Determinación de frecuencias y equilibrio génico

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas se obtuvieron mediante conteo directo durante el análisis individual de cada ensayo *PCR-RFLP*. Las frecuencias genotípicas esperadas fueron calculadas usando la frecuencia alélica observada y las fórmulas derivadas de la ley de

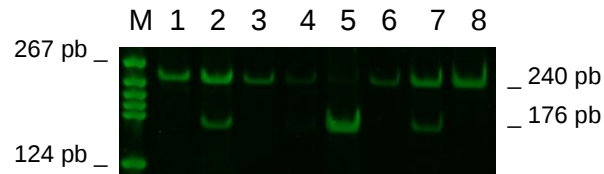


Figura 11. Análisis *RFLP* (*HinfI*) de las variantes alélicas asociadas a MTHFR C677T de ocho pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con SYBRTM Green I. Carriles: M, *Weight Marker V*; 1, P001; 2, P002; 3, P003; 4, P004; 5, P005; 6, P006; 7, P007; 8, P008. Dos marcadores de PM (mayor y menor talla) se muestran a la izquierda, en tanto los PM de los productos esperados se muestran a la derecha.

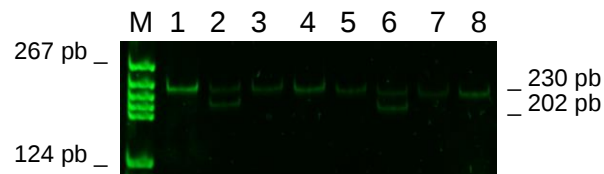


Figura 12. Análisis *RFLP* (*MfeI*) de las variantes alélicas asociadas a MTHFR A1298C de ocho pacientes leucémicos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con SYBRTM Green I. Carriles: M, *Weight Marker V*; 1, P009; 2, P010; 3, P011; 4, P012; 5, P013; 6, P014; 7, P015; 8, P016. Dos marcadores de PM (mayor y menor talla) se muestran a la izquierda, en tanto los PM de los productos esperados se muestran a la derecha.

Tabla 5. Frecuencias y equilibrio génico de las variantes de estudio.

Mutación o Polimorfismo	Grupo de Estudio	Frecuencia Alélica (%)	Frecuencias Genotípicas		EHW* χ^2 (p)
			Observada (%)	Esperada (%)	
DPYD IVS14+1G>A	Sanos n = 32	G: 64 (100)	GG: 32 (100)	GG: 32 (100)	No Determinado
		A: 0 (0)	AG: 0 (0)	AG: (0)	
			AA: 0 (0)	AA: (0)	
	Leucémicos n = 16	G: 32 (100) A: (0)	GG: 16 (100) AG: (0) AA: (0)	GG: 16 (100) AG: (0) AA: (0)	No Determinado
MTHFR C677T	Sanos n = 32	C: 38 (59.4)	CC: 12 (37.5)	CC: 11.3 (35.3)	0.278 (0.598)
		T: 26 (40.6)	CT: 14 (43.75)	CT: 15.4 (48.2)	
			TT: 6 (18.75)	TT: 5.3 (16.5)	
	Leucémicos n = 16	C: 20 (62.5) T: 12 (37.5)	CC: 6 (37.5) CT: 8 (50.0) TT: 2 (12.5)	CC: 6.25 (39.1) CT: 7.5 (46.9) TT: 2.25 (14.0)	0.071 (0.790)
MTHFR A1298C	Sanos n = 32	A: 53 (82.8)	AA: 21 (65.6)	AA: 21.95 (68.6)	1.378 (0.240)
		C: 11 (17.2)	AC: 11 (34.4)	AC: 9.1 (28.5)	
			CC: 0 (0)	CC: 0.95 (2.9)	
	Leucémicos n = 16	A: 26 (81.25) C: 6 (18.75)	AA: 10 (62.5) AC: 6 (37.5) CC: 0 (0)	AA: 10.6 (66.0) AC: 4.8 (30.5) CC: 0.6 (3.5)	0.852 (0.356)

*EHW, Equilibrio Hardy-Weinberg

Hardy-Weinberg. El equilibrio génico se determinó mediante un análisis estadístico del tipo χ^2 , contrastando los datos de las frecuencias genotípicas (Tabla 5).

Como se observa, la variante alélica A de la mutación DPYD IVS14+1G>A no se detectó en ningún paciente de ambos grupos, lo que indica la ausencia total de la mutación IVS14+1A en la muestra poblacional analizada.

Por otro lado, la variante alélica C (silvestre) del polimorfismo MTHFR C677T se encontró con alta frecuencia (59-63%) en ambos grupos analizados (pacientes sanos y leucémicos). Además, el contraste de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas, calculadas usando las equivalencias derivadas de la Ley de Hardy-Weinberg, demostró que los grupos analizados se encuentran en equilibrio génico ($\chi^2 < 3.84$; $p > 0.05$) y que el genotipo heterocigoto MTHFR 677CT es el de mayor frecuencia (43-50%).

De igual manera, la variante alélica A (silvestre) del polimorfismo MTHFR A1298C se determinó con alta frecuencia (81-83%) en ambos grupos analizados (pacientes sanos y leucémicos). Además, el contraste de las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas, calculadas como antes, demostró que los grupos analizados se encuentran en equilibrio génico ($\chi^2 < 3.84$; $p > 0.05$) y que el genotipo homocigoto silvestre MTHFR 1298AA es el de mayor frecuencia (62-66%).

IV.4. Análisis de asociación genotipo-fenotipo: estudios de caso-control

La asociación de las variantes alélicas: IVS14+1A del gen DPYD, 677T o 1298C de MTHFR, con el desarrollo de LMC ofrece la oportunidad de proponer la detección molecular de polimorfismos genéticos como biomarcadores con potencial clínico. Por tal motivo, se realizó un análisis de asociación genotipo-fenotipo mediante estudios individuales de caso-control usando tablas de contingencia y la prueba de Fisher en tres modelos propuestos: dominante, recesivo y multiplicativo (Figura 13). Como se observa, ninguna de las variantes alélicas, en cualquier modelo de asociación, mostró significancia estadística con respecto a su posible asociación con el desarrollo de LMC.

DPYD IVS14+1G>A		MODELO DE ASOCIACIÓN							
		GENERAL			DOMINANTE		RECESIVO		MULTIPLICATIVO
		GG	GA	AA	GG	GA+AA	GG+GA	AA	G A
CASO		16	0	0	16	0	16	0	32 0
CONTROL		32	0	0	32	0	32	0	64 0
		SIGNIFICANCIA			NO (p = 1.00)		NO (p = 1.00)		NO (p = 1.00)

MTHFR C677T		MODELO DE ASOCIACIÓN							
		GENERAL			DOMINANTE		RECESIVO		MULTIPLICATIVO
		CC	CT	TT	CC	CT+TT	CC+CT	TT	C T
CASO		6	8	2	6	10	14	2	20 12
CONTROL		12	14	6	12	20	26	6	38 26
		SIGNIFICANCIA			NO (p = 1.00)		NO (p = 0.70)		NO (p = 0.83)

MTHFR A1298C		MODELO DE ASOCIACIÓN							
		GENERAL			DOMINANTE		RECESIVO		MULTIPLICATIVO
		AA	AC	CC	AA	AC+CC	AA+AC	CC	A C
CASO		10	6	0	10	6	16	0	26 6
CONTROL		21	11	0	21	11	32	0	53 11
		SIGNIFICANCIA			NO (p = 1.00)		NO (p = 1.00)		NO (p = 1.00)

Figura 13. Tablas de contingencia y análisis estadístico (prueba de Fisher). Modelos de asociación genotipo-fenotipo de las variantes de estudio y LMC.

IV.5. Contribución al conocimiento de asociación genotipo-LMC

En todos los modelos, no se observó asociación entre las frecuencias alélicas y genotípicas observadas de las variantes génicas estudiadas y el desarrollo de LMC. Aun cuando ambas poblaciones de estudio (pacientes sanos y leucémicos) mostraron equilibrio génico, de

acuerdo con Hardy-Weinberg, las frecuencias alélicas observadas revelaron datos no esperados, por ejemplo, el alelo IVS14+1A del gen DPYD no se detectó. De manera general, la falta de asociación genotipo-fenotipo puede atribuirse al tamaño reducido de la muestra de pacientes leucémicos.

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente reporte, los estudios previos de asociación DPYD (IVS14+1G> A) con el desarrollo de leucemia en pacientes mexicanos no revelaron significancia estadística [Gallegos-Arreola *et al.*, 2018; Ruiz-García *et al.*, 2015], lo que sugiere un posible efecto epigenético; es decir, el desarrollo de LMC es producto de la contribución de varias mutaciones y polimorfismos genéticos en enzimas clave del metabolismo y regulación de la síntesis de ácidos nucleicos [Machova Polakova *et al.*, 2013; Keramatinia *et al.*, 2018]. Por otro lado, los estudios de asociación de los polimorfismos de MTHFR (C677T/A1298C) con el desarrollo de leucemia ofrecen mayor claridad. En un estudio realizado con 115 pacientes coreanos con LMC [Moon *et al.*, 2007], reportaron que el genotipo homocigótico 1298CC está fuertemente asociado con un mayor riesgo de leucemia y que los genotipos derivados del polimorfismo C677T no afectan significativamente.

De manera independiente a los resultados obtenidos, los estudios de asociación genotipo-fenotipo son relevantes como estrategia para la identificación de biomarcadores de importancia clínica que apoyen al pronóstico, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan la salud de la población. En nuestro país, la incidencia de nuevos casos y los índices de prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas, como cáncer o diabetes, son elevados. Por tal motivo, es importante enfocar los esfuerzos técnicos y científicos hacia el desarrollo de nuevas tecnologías biomédicas dirigidas a reducir las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a padecimientos de la población actual.

En este sentido, el presente estudio representa el primer esfuerzo dirigido hacia la identificación de mutaciones o polimorfismos de genes de importancia biológica que muestren una clara asociación con el desarrollo de enfermedades cancerosas, de tal manera que sean útiles como biomarcadores clínicos para la intervención profiláctica o detección oportuna del padecimiento.

V. CONCLUSIÓN

Tal como en pacientes sanos, la mutación derivada del polimorfismo IVS14+1G>A del gen DPYD no es prevalente en pacientes con LMC. Los genotipos derivados de los alelos de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR son prevalentes en ambos grupos. Los análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas observadas entre las poblaciones analizadas (pacientes sanos y leucémicos) no muestran asociaciones genotipo-fenotipo en los tres modelos aplicados: dominante, recesivo o multiplicativo. Lo anterior, se debe al reducido número de pacientes con LMC que participaron en el presente estudio. Se recomienda realizar un análisis exhaustivo con un grupo mayor de participantes. No obstante, el presente estudio representa la primera etapa para la búsqueda de biomarcadores de interés clínico que apoyen el pronóstico y diagnóstico de pacientes con predisposición para el desarrollo de LMC.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Khateeb, M., Awidi, A., Al-Hadidi, K., & Battah, A. (2017). Low incidence of the DPD IVS 14+1 G>A polymorphism in Jordanian breast and colorectal cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(6), 1651-1654.
- Aly, R.M., Taalab, M.M., & Ghazy, H.F. (2014). MTHFR A1298C and C677T gene polymorphisms and susceptibility to chronic myeloid leukemia in Egypt. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(5), 2571.
- Arruda, I.T.S.D., Persuhn, D.C., & Oliveira, N.F.P.D. (2013). The MTHFR C677T polymorphism and global DNA methylation in oral epithelial cells. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 490-493.
- Avilés-Vázquez, S., Chávez-González, A.N & Mayani, H. (2013). Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). *Gaceta Médica de México*. 149, 646-654.
- Banasik, J.L., & Copstead, L.E. (2019). *Pathophysiology*. St. Louis, MO: Elsevier. p. 221.
- Bengio, R.M., Gargallo, P., Barreyro, P., et al. (2007). Leucemia mieloide crónica mecanismos genéticos de resistencia al imatinib. *Medicina*, 67, 71-74.
- Bioulac-Sage, P., Blanc, J.F., Rebouissou, S., et al. (2007). Genotype phenotype classification of hepatocellular adenoma. *World Journal of Gastroenterology*, 13(19), 2649-2654.
- Campos Rudín, M., Cuenca Berger, P., Gutiérrez Espeleta, G., et al. (1998). Diagnóstico molecular del cromosoma Filadelfia. *Acta Med Costarric*, 40(3), 24-30.
- Chao, C.T., Wu, Y.L., Hsu, T.F., et al. (2014). Polymorphisms in EGFR, GSTP1, XPD, DPD, ERCC1, and UTG1A1 of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan chemotherapy. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(4), 183-185.
- Chittiboyina, S., Chen, Z., Chiorean, E.G., et al. (2018). The role of the folate pathway in pancreatic cancer risk. *PLoS One*, 13(2), e0193298.
- Contreras-Cubas, C., Sánchez-Hernández, B.E., García-Ortiz, H., et al. (2016). Heterogenous distribution of MTHFR gene variants among mestizos and diverse Amerindian groups from Mexico. *PLoS One*, 11(9), e0163248.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., & De Braekeleer, M. (2014). RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert Review of Hematology*, 7(3), 347-357.
- Dean, L. (2012). Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Medical Genetics Summaries*, 421.
- Fleger, M., Willomitzer, J., Meinsma, R., et al. (2017). Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: metabolic disease or biochemical phenotype? *JIMD Reports*, Volume 37 (pp. 49-54).
- Gallegos-Arreola M.P., Zúñiga-González, G.M., Sánchez-López, J.Y., et al. (2018). TYMS 2R3R polymorphism and DPYD [IVS]14+1G>A gene mutation in Mexican colorectal cancer patients. *Acta Biochim Pol*, 65(2), 227-234.
- Gotlib, J. (2017). How I treat atypical chronic myeloid leukemia. *Blood*, 129(7), 838-845.
- Huret, J.L., Ahmad, M., Arsaban, M., et al. (2012). Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D920-D924.
- Iida, S., Saito, M., Okazaki, T., et al., (1992) Phenotypic and genotypic characterization of 14 leukemia and lymphoma cell lines with 11q23 translocations. *Leukemia Research*, 16(12), 1155-1163.
- Keramatnia, A., Ahadi, A., Akbari, M.E., et al. (2018). The roles of DNA epigenetics and clinical significance in Chronic Myeloid Leukemia: a review. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 64(9), 58-63.

- Kim, Y.A., Cho, D.Y., & Przytycka, T.M. (2016). Understanding genotype-phenotype effects in cancer via network approaches. *PLoS Computational Biology*, 12(3), e1004747.
- Li, W.X., Dai, S.X., Zheng, J.J., *et al.* (2015). Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. *Nutrients*, 7(8), 6670-6687.
- Lozano, J.A. (2002). Oncología. Leucemias agudas. *Offarm*, 21(6), 117-122.
- Machova Polakova, K., Koblihova, J., & Stopka, T. (2013). Role of epigenetics in chronic myeloid leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 8(1), 28-36.
- McKenzie, S. B. (2000). Hematología clínica. Cd. México, México: Manual Moderno. pp. 378-387.
- McKenzie, S. B. (2000). Hematología clínica. Ciudad de México, México: Manual Moderno. pp. 378-387.
- Mesa-Cornejo, V. M., Barros-Núñez, P., & Medina-Lozano, C. (2006). Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gaceta Médica de México*, 142(1), 81-82.
- Moon, H.W., Kim, T.Y., Oh, B.R., *et al.* (2007). MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. *Leukemia Research*, 31(9), 1213-1217.
- Nault, J.C., & Zucman-Rossi, J. (2012). Genotype-phenotype relationships in hepatocellular carcinoma: p53 inactivation promotes tumors with stem cell features. *Gastroenterol*, 142(5), 1066-1069.
- Olivar Roldán, J., Fernández Martínez, A., Díaz Guardiola, P., *et al.* (2012). Homocistinuria; curso clínico y tratamiento dietético: a propósito de dos casos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 2133-2138.
- Omura, K. (2003). Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity in 5-FU-based chemotherapy: mutations in the DPD gene, and DPD inhibitory fluoropyrimidines. *International Journal of Clinical Oncology*, 8(3), 132-138.
- Patnaik, M.M., Barraco, D., Lasho, T.L., *et al.* (2017). Targeted next generation sequencing and identification of risk factors in World Health Organization defined atypical chronic myeloid leukemia. *Am Journal of Hematology*, 92(6), 542-548.
- Peltomäki, P., Gao, X., & Mecklin, J.P. (2001). Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. *Familial Cancer*, 1(1), 9-15.
- Porth, C. (2011). Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states. Lippincott Williams & Wilkins. pp.254-255.
- Quiñones-Sepúlveda, L., Arriagada, A.R., Squicciarini-Rueda, V., *et al.* (2010). Polimorfismos genéticos y su influencia en la efectividad del tratamiento quimioterapéutico de pacientes leucémicos. *Cuad Méd Soc (Chile)*, 50(4), 288-295.
- Ramos, M.A., Mares, R.E., Avalos, E.D., *et al.* (2011). Pharmacogenetic screening of N-acetyltransferase 2, thiopurine s-methyltransferase, and 5, 10-methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms in Northwestern Mexicans. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 15(5), 351-355.
- Rosas-Cabral, A., Martínez-Mancilla, M., Ayala-Sánchez, M., *et al.* (2003). Análisis del tipo de transcrito bcr-abl y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gaceta Médica de México*, 139(6), 553-559.
- Rosero, C.Y., Corredor, M., & Mejía, L. (2016). Polimorfismos en genes implicados en el desarrollo de cáncer gástrico: revisión. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(4), 391-402.
- Ruiz-García, E., López-Yañez, A., Caderillo-Ruiz, G., *et al.* (2015). Determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) gene single-nucleotide polymorphism (SNP) in Mexican patients with locally advanced esophageal carcinoma. *J Clin Oncol*, 33(3), 93-93.
- Salha, M., Hekmet, A.B., & Reem, J.A.S. (2017). Genotype and phenotype correlation of breast cancer in BRCA mutation carriers and non-carriers. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 9(2), 358-364.

- Schmuck, R., Warneke, V., Behrens, H.M., *et al.* (2011). Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines. *The American Journal of Pathology*, 178(4), 1792-1804.
- Serrano, P. (2007). Carcinogénesis pulmonar. *Revista de Patología Respiratoria*, 10(1), 50-54.
- Shaikh, A. B., Waghmare, S., Koshti-Khude, S., & Koshy, A. V. (2016). Unusual presentation of non-Hodgkin's lymphoma: Case report and review of literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(3), 510-517.
- Shet, A.S., Jahagirdar, B.N., & Verfaillie, C.M. (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*, 16, 1402–1411.
- Stern, L.L., Mason, J.B., Selhub, J., & Choi, S.W. (2000). Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(8), 849-853.
- Sulzyc-Bielicka, V., Bińczak-Kuleta, A., Pioch, W., *et al.* (2008). 5-Fluorouracil toxicity-attributable IVS 14+1 G>A mutation of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in Polish colorectal cancer patients. *Pharmacological Reports*, 60, 238-242.
- Süzen, H.S., Yüce, N., Güvenç, G., *et al.* (2005). TYMS and DPYD polymorphisms in a Turkish population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61(12), 881.
- Ueland, P.M., Hustad, S., Schneede, J., *et al.* (2001). Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 195-201.
- Valent, P. (2007). Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics: Targets & Therapy*, 1(4), 433.
- Van Kuilenburg, A.B., De Abreu, R.A., & Van Gennip, A.H. (2003). Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Annals of Clinical Biochemistry*, 40(1), 41-45.
- van Kuilenburg, A.B., Meisma, R., Beke, E., *et al.* (2004). β -Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 13(22), 2793-2801.
- van Kuilenburg, A.B., Muller, E.W., Haasjes, J., *et al.* (2001). Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clinical Cancer Research*, 7(5), 1149-1153.
- Wang, S.A., Hasserjian, R.P., Fox, P.S., *et al.* (2014). Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123(17), 2645-2651.