

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina Mexicali



“Distribución de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la gamma-glutamil hidrolasa (GGH) y G80A del gen del transportador de folatos reducidos (RFC-1) en una población mestiza del Noroeste de México”

T E S I S

**QUE PARA OBTENEREL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

MARTHA TERESA GARCÍA LÓPEZ PORTILLO

DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. RAÚL DÍAZ MOLINA

MEXICALI, B.C.

DICIEMBRE DE 2017

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Medicina Mexicali

“Distribución de los polimorfismos -C401T y C452T en el gen de la gamma-glutamyl hidrolasa (GGH) y G80A en el gen del transportador de folatos reducidos (RFC-1) en una población mestiza del Noroeste de México”

Autora de la tesis

Médico Martha Teresa García López Portillo

Docente de la asignatura de Bioquímica Básica
Facultad de Medicina-Unidad de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Tutor y Director de Tesis

Dr. en C. Raúl Díaz Molina

Coordinador de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Asesor

Dr. en C. Jesús René Machado Contreras

Profesor-Investigador
Responsable del Laboratorio de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Asesor

Dra. en C. Ana Gabriela Leija Montoya

Profesora-Investigadora
Responsable del Laboratorio de Bioquímica Básica
Facultad de Medicina-Unidad de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

Mexicali, B.C., a 11 de Diciembre de 2017.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: ***Distribución de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la gamma-glutamyl hidrolasa (GGH) y G80A del gen del transportador de folatos reducidos (RFC-1) en una población mestiza del Noroeste de México***, que para obtener el GRADO de MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD presenta ***Martha Teresa García López Portillo***.

Realizada la evaluación resolvimos: Aprobar el documento



Dr. Raul Diaz Molina
Presidente



Dr. Jesús René Machado Contreras
Secretario



Dra. Mónica Carrillo Beltrán
Sinodal



Dra. Ana Gabriela Leija Montoya
Sinodal

ÍNDICE

Agradecimientos	7
Abreviaturas	9
Lista de tablas y figuras	11
Resumen	13
1. Introducción	15
2. Marco teórico	18
2.1. Polimorfismo de nucleótido sencillo	18
2.2. Genética de poblaciones y Equilibrio de Hardy-Weinberg	20
2.3. Transportador de folatos reducidos-1 (RFC-1)	23
2.3.1. Homeóstasis del folato y RFC-1	23
2.3.2. Estructura y fisiología del RFC-1	24
2.3.3. Gen del RFC-1 y su regulación	28
2.4. Gamma glutamil hidrolasa (GGH)	30
2.4.1. La GGH y el metabolismo del folato y antifolatos.	30
2.4.2. Estructura del gen de la GGH y su regulación	32
2.4.3. Papel de la GGH en la resistencia a fármacos	34
2.5. Metotrexato	35
2.6. Antecedentes	36
3. Planteamiento del problema	41
3.1. Pregunta de investigación	41
4. Justificación	42
5. Hipótesis	43

6. Objetivos	44
7. Metodología	45
7.1. Tipo de estudio	45
7.1.1. Área geográfica de estudio	45
7.1.2. Población diana	45
7.1.3. Población accesible	45
7.2. Determinación del grupo de estudio	45
7.2.1. Criterios de inclusión	45
7.2.2. Criterios de exclusión	46
7.2.3. Criterios de eliminación	46
7.3. Cálculo del tamaño de muestra	46
7.4. Selección de la muestra	47
7.4.1. Tipo de muestreo	47
7.4.1. Determinación de sujetos clínicamente sanos	48
7.5. Variables	48
7.6. Métodos para la genotipificación de los polimorfismos.	
7.6.1. Extracción de ADN	49
7.6.2. Identificación del PNS G80A del gen RFC-1	50
7.6.3. Identificación de los PNS –C401T y C452T del gen GGH	51
7.7. Análisis estadístico	52
7.8. Aspectos éticos, normativos y de seguridad	52
8. Resultados	54
8.1. Características demográficas de la muestra de estudio	54

8.2. Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS G80A del gen RFC-1	56
8.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS –C401T del gen GGH	60
8.4. Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS C452T del gen GGH	62
8.5. Secuenciación	65
9. Discusión	67
10. Conclusiones	73
Referencias bibliográficas	74
Anexos	82
Anexo 1. Hoja de datos del voluntario	83
Anexo 2. Documento de Consentimiento Informado	84
Anexo 3. Técnica de extracción de ADN genómico	87

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque teniéndolo a Él tengo todo.

A mi mamá que siempre ha sido un ejemplo de superación y de aprendizaje sin importar la edad.

A mi esposo José Carlos por todo su apoyo incondicional.

A mis hijos Mariana, Alicia y Pedro por el tiempo que les quité y no conviví o jugué con ellos.

A mi Tutor el Dr. Raúl Díaz Molina por ser un verdadero guía, porque siempre me escucha y me responde, por su paciencia, su acompañamiento en todo mi proceso de aprendizaje, sus consejos y ayuda en todo.

A Dra. Ana Gabriela Leija Montoya que me ayudó durante todo el proceso con sus conocimientos, consejos y apoyo en todo, y muy en especial en el reclutamiento.

Al Dr. Jesús René Machado que me guió en la adquisición de las técnicas de biología molecular e interpretación de los resultados y por su apoyo.

A Dra. Mónica Carrillo Beltrán quien es un ejemplo a seguir de motivación hacia las ciencias, por su interés en que niños y jóvenes estudien esta área.

Al Dr. Roberto Núñez por su gran calidad humana y siempre en apoyo de la docencia y la investigación.

A Dra. Julia Estrada por tener fe en mí siempre.

Al Dr. Víctor García que me abrió las puertas de su laboratorio y me apoyó con material cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros Javier Vasconcelos y Ángel Pulido, que siempre me ayudaron con sus conocimientos en el laboratorio y por su valiosa amistad.

A mis maestros y guías, Dr. Prince, Maestro Rafael Ayala, Dra. Ana Gabriela Leija y Dr. Raúl Díaz, que me transmitieron sus conocimientos y me motivaron a aprender más.

A los médicos pasantes Ariel Rangel, Marisela Del Rayo y Lizeth Gutierrez porque siempre pude contar con ellos.

A todos mis alumnos que me contagiaron su entusiasmo por aprender y por toda su energía.

A mi casa de estudios la Universidad Autónoma de Baja California y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo.

Y finalmente, un agradecimiento muy especial al Dr. Octavio Robinson, por transmitirme su amor por la ciencia y por motivarme e invitarme a embarcarme en esta maestría.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATIC	5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido transformilasa
ATP	Adenosina trifosfato
C	Extremo carboxiloterminial
cSNP	PNS en regiones codificantes
Cys	Aminoácido cisteína
CRE	Elementos de respuesta conservados
CREB-1	Proteína de unión al CRE
DHFR	Dihidrofolato reductasa
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FOL	Folatos
FPGS	Folil-poliglutamil sintetasa
FR α	Receptor de folatos alfa
GGH	Gamma-glutamil hidrolasa
Glu	Glutamato
gSNP	PNS en regiones intergenómicas
His	Histidina
IMC	Índice de masa corporal
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
iSNP	PNS en regiones intrónicas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LLA	Leucemia linfoblástica aguda

Lys	Lisina
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTX	Metotrexato
N	Extremo aminoterminal
nsSNP	PNS no sinónimo
OAT2	Transportador de aniones orgánicos
PCFT	Transportador de folatos protón acoplado
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PKA	Proteín quinasa A
PNS	Polimorfismo de nucleótido sencillo
RFC-1	Transportador de folatos reducidos-1
Ser	Serina
SNC	Sistema nervioso central
sSNP	PNS sinónimo o silencioso
SSRs	Secuencias simples repetidas
TMD	Dominio transmembranal
TMS	Timidilato sintasa
Tre	Treonina
UTR	Regiones no traducidas

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Página
Tabla 1. Distribución de los PNS –C401T y C452T del gen GGH.	37
Tabla 2. Distribución genotípica de los PNS G80A del RFC-1, -C401T y C452T de la GGH en diferentes etnias.	39
Tabla 3. Características de los PNS G80A del gen RFC-1, -C401T y C452T del gen GGH.	40
Tabla 4. Frecuencias alélicas de los PNS –C401T y C452T del gen GGH y G80A del gen RFC-1	47
Tabla 5. Características generales de la población de estudio.	54
Tabla 6. Genotipos observados y esperados para el PNS G80A del gen RFC-1.	58
Tabla 7. Distribución de genotipos y frecuencia alélica del PNS G80A del RFC-1.	59
Tabla 8. Frecuencias genotípicas del PNS C452T del gen GGH en la muestra.	63
Tabla 9. Distribución de genotipos y frecuencias alélicas de los PNS –C401T y C452 T de la GGH en la muestra de estudio.	64
Tabla 10. Comparación de la distribución de PNS G80A del gen RFC-1, –C401T y C452T del gen de la enzima GGH en diferentes etnias.	71

FIGURAS	Página
Figura 1. Clasificación de los PNS de acuerdo con su localización en el genoma.	19
Figura 2. Sustratos del RFC-1, se muestran estructuras de los folatos y antifolatos	24
Figura 3. Estructura del RFC-1.	25
Figura 4. Modelo tridimensional del RFC-1.	25
Figura 5. Localización de los transportadores de folatos.	27
Figura 6. Transportadores de folatos RFC-1 y PCFT.	28
Figura 7. Metabolismo de los folatos.	32
Figura 8. Diagrama de listón de la enzima GGH.	34
Figura 9. Transporte, metabolismo y efecto del metotrexato.	35
Figura 10. Gráfica de concentración y relación 260/280nm por Nanodrop	55
Figura 11. Electroforesis de ADN genómico extraído de leucocitos totales.	56

Figura 12. Producto de la amplificación del gen RFC-1 para el PNS G80A.	56
Figura 13. Digestión enzimática con Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1.	57
Figura 14. Digestión enzimática con Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1.	57
Figura 15. Digestión enzimática con Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1	58
Figura 16. Distribución de la frecuencia genotípica del PNS G80A del gen RFC-1.	59
Figura 17. Producto de amplificación del gen GGH para el PNS –C401T.	60
Figura 18. Digestión enzimática del PNS –C401T del gen GGH con enzima Bsl I.	60
Figura 19. Digestión enzimática del gen GGH para el PNS –C401T con Bsl I.	61
Figura 20. Producto de la amplificación del gen GGH para el PNS C452T.	62
Figura 21. Digestión enzimática del gen GGH para el PNS C452T con Ase I.	63
Figura 22. Frecuencia genotípica del PNS –C401T del gen GGH en la muestra.	64
Figura 23. Distribución genotípica del PNS C452T del gen GGH.	65
Figura 24. Cromatograma de la secuenciación del PNS G80A del gen RFC-1	65
Figura 25. Cromatograma de la secuenciación del PNS –C401T del gen GGH.	66
Figura 26. Cromatograma de la secuenciación del PNS C452T del gen GGH.	66

RESUMEN

Introducción: El conocimiento de los polimorfismos de nucleótido sencillo (PNS) en genes de enzimas y transportadores implicados en el metabolismo de los fármacos, nos permite explicar la diferencia en la respuesta al tratamiento farmacológico entre individuos de una misma población e identificar pacientes respondedores y no-respondedores, con la promesa de llegar a establecer tratamientos personalizados. Para establecer el impacto de los PNS, primero se debe definir la poza génica y determinar si estos polimorfismos siguen el equilibrio de Hardy-Weinberg, el cual establece la constancia de las frecuencias alélicas de generación en generación. En este contexto resulta importante el estudio de los polimorfismos relacionados con el metabolismo del metotrexato, fármaco utilizado en el tratamiento de neoplasias como la leucemia aguda linfoblástica y enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Algunas proteínas involucradas en su metabolismo son el transportador de folatos reducidos (RFC-1) y la gamma-glutamyl hidrolasa (GGH). **Objetivo:** Conocer la distribución de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la GGH, y el A80G del gen del RFC-1, y determinar si dicha distribución se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg en una muestra de una población de la ciudad de Mexicali, B.C. **Material y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo, observacional de tipo transversal, que incluyó a 141 individuos aparentemente sanos pertenecientes a la tercera generación de nacidos en Mexicali, B.C. Se calcularon las frecuencias genotípicas (frecuencias observadas) en la población de estudio, para cada uno de los polimorfismos antes mencionados. Con la ecuación de Hardy-Weinberg $[(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1]$, donde p^2 corresponde a homocigotos salvajes; $2pq$, a heterocigotos; y q^2 , a homocigotos variantes], se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas. Se compararon ambas frecuencias (esperadas y observadas) mediante la prueba chi cuadrado (X^2) para determinar si las frecuencias observadas se desviaban en forma significativa ($p < 0.05$) de las esperadas. **Resultados:** Las frecuencias genotípicas observadas en la muestra de estudio para el PNS G80A del gen RFC-1 fueron 43 (30.5%) individuos GG, 73 (51.8%) con genotipo GA, y 25 (17.7%) con genotipo AA. Para el PNS -C401T del gen GGH se encontraron: 85 (60.3%) con genotipo CC, 44

(31.2%) con genotipo CT y 12 (8.5%) con genotipo TT. Y para el el PNS C452T del gen de la GGH fueron 131 (92.9%) individuos con CC, 10 (7.1%) con genotipo CT y ninguno con el genotipo TT. Los tres PNS estudiados se encontraron sin desviación del EHW con valores para p de 0.53, 0.08 y 0.47 respectivamente.

Conclusión: Los PNS G80A del gen RFC-1, el –C401T y C452T del gen GGH se encuentran en EHW en la población sana perteneciente a la tercera generación de nacidos en Mexicali, B.C.

1. INTRODUCCIÓN

El “Proyecto Genoma Humano” surgió en 1990 con el propósito de secuenciar los 3,200 millones de nucleótidos del genoma humano. Éste, fue patrocinado en su mayoría por el Gobierno de Estados Unidos de América, a través de los Institutos Nacionales de Salud y de su Departamento de Energía y con la colaboración de la industria privada Celera Genomics a cargo de Craig Venter. Además del país mencionado se vieron involucrados Francia, Alemania, Reino Unido, China y Japón. En un principio, estuvo bajo la dirección de James Watson, y posteriormente bajo la de Francis S. Collins quien fuera Director del Instituto de Investigaciones sobre el Genoma Humano de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. En el 2003, el proyecto logró la secuencia casi completa del genoma humano (99.9%) y el trazo de un mapa donde se ubica cada gen dentro de los 23 pares de cromosomas. En octubre de 2002 surge “HapMap” o “Mapa de Haplotipos”, proyecto internacional en el que colaboran además de Estados Unidos, los países del Reino Unido, Canadá, Nigeria, China y Japón. Su objetivo es buscar genes y variaciones genéticas conocidas como polimorfismos, que expliquen la susceptibilidad a una enfermedad o las diferencias en la respuesta a fármacos y vacunas. Las variaciones más comunes son los polimorfismos de nucleótido sencillo (PNS). A través de dicho proyecto se han identificado 10 millones de PNS. Cuando los polimorfismos se encuentran cercanos unos a otros dentro de un mismo cromosoma y éstos se heredan en bloque, reciben el nombre de haplotipos (Checa, 2007).

La variabilidad fenotípica de un individuo, es decir, todos los rasgos y expresiones determinadas por el genotipo o carga genética en relación con el ambiente, tales como susceptibilidad a enfermedades y las diferencias en respuesta a fármacos, es determinada principalmente por los PNS y en menor grado por inserciones, deleciones, translocaciones y duplicaciones. Los PNS son cambios en una sola base en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las inserciones y deleciones se deben a la adición y eliminación de bases, respectivamente. Las translocaciones son intercambios de material genético entre cromosomas no homólogos, mientras que las duplicaciones consisten de material genético que se

encuentra replicado. Todas estas mutaciones o cambios en la secuencia de ADN se originan por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN o por factores ambientales ya sean físicos, químicos o biológicos. Las mutaciones pueden ser perjudiciales y causar enfermedades, o pueden ser silentes originando variabilidad genética o alélica entre los individuos de una población. Por lo anterior, entendemos que existen varios tipos de polimorfismos, sin embargo y de acuerdo con Nebert (1997), los más frecuentes son los PNS.

La variabilidad genética o polimorfismos han sido descritos como *individualidad química* por Archibald Garrod desde 1902, quien en su libro *Error Congénito del Metabolismo*, muestra un recuento de enfermedades ocasionadas por enzimas defectuosas heredadas (Weiss, 1998). Posteriormente en 1960, el médico David Price Evans caracteriza polimorfismos en el metabolismo de la isoniazida. Con el rápido ascenso de la genética y el surgimiento del Proyecto Genoma Humano a finales del siglo pasado, los PNS se han ido consolidando como herramientas de estudio en distintas áreas, debido a que los PNS se mantienen estables de una generación a otra. El estudio de los PNS resulta útil en la antropología para conocer la historia evolutiva de una determinada población, se utilizan como marcadores moleculares en la medicina forense, en el estudio de enfermedades multigénicas, en las asociaciones genotipo-enfermedad y genotipo-reacciones adversas a medicamentos, así como para el desarrollo de nuevos fármacos. Su estudio ha dado origen a diversas disciplinas, tales como la ecogenética, nutrigenética y farmacogenética. El presente trabajo se centra en la genética de poblaciones, rama de la biología que estudia la composición genética de las poblaciones.

La farmacogenética estudia los PNS en genes de proteínas involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamento, ya sea transportadores, receptores y/o enzimas. Estos PNS en conjunto con factores no genéticos, ya sean fisiológicos (edad, sexo, IMC), fisiopatológicos (enfermedades concomitantes) y ambientales (tabaquismo, nutrición, fármacos concomitantes); determinan la variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos. Los factores genéticos

permanecen constantes a lo largo de la vida de un individuo mientras que los factores no genéticos pueden variar y presentarse en diferentes combinaciones.

Por ello los PNS son de utilidad para identificar fenotipos asociados a genotipos. Se han identificado individuos con enzimas funcionalmente lentas o metabolizadores lentos, individuos con enzimas con alta funcionalidad o metabolizadores rápidos y ultrarrápidos, e individuos con una enzima con función estándar o metabolizadores normales. Por lo tanto, si se administra a un paciente un fármaco o un profármaco, medicamento que requiere ser metabolizado para ser un fármaco activo, éste presentará una respuesta eficaz, no responderá o bien manifestará efectos tóxicos. Si se desea conocer el impacto de los PNS en los genes de las enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo de los fármacos primero tenemos que establecer la poza génica, es decir la frecuencia de los alelos en una población mediante y determinar si ésta se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg, modelo matemático necesario en un estudio farmacogenético, el cual establece que las frecuencias alélicas en la población se mantienen estables de generación en generación bajo ciertas aseveraciones. Una vez establecido, y con base en el enfoque de la medicina personalizada o de estudios de riesgo para el desarrollo de patologías en función de los PNS que porte el paciente, se podrán plantear diversos estudios para evaluar el impacto de los PNS en la toxicidad y eficacia de ciertos fármacos. Esta información podría tener aplicación para el ajuste de dosis, disminución de reacciones adversas y mejora en la eficacia de ciertos tratamientos.

En el presente estudio nos centramos en determinar la distribución de tres PNS en genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo de folatos y antifolatos como el metotrexato, en una población de individuos sanos del noroeste de México, y establecer su apego o no al equilibrio de Hardy-Weinberg. Se estudiaron los siguientes PNS: G80A del gen del transportador de folatos reducidos-1 (RFC-1), y -C401T y C452T del gen de la gamma-glutamyl-hidrolasa (GGH).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SENCILLO.

Los cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) se conocen como mutaciones, las cuales son ocasionadas por errores en la replicación y reparación del ADN o por factores ambientales. Las mutaciones pueden ser inofensivas o perjudiciales. Las mutaciones originan los polimorfismos, los cuales generan variación alélica entre los individuos y diversidad en la misma especie (Checa, 2007). Los polimorfismos se definen como la variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre individuos de una población, las cuales aparecen por mutaciones y se transmiten a la descendencia, adquiriendo cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Guttmacher, 2002). Se considera polimorfismo cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es mayor a 1%. Los polimorfismos ocurren con una frecuencia de 1 por cada 200 pares de nucleótidos. La variabilidad fenotípica entre individuos, así como la susceptibilidad o resistencia individual a distintas enfermedades radica en los polimorfismos de nucleótido sencillo en mayor grado, y con menor frecuencia se deben a inserciones, deleciones y cambios en el número de secuencias repetidas.

Los PNS determinan dos alelos que generan tres genotipos en los individuos de una población. Los alelos se clasifican, de acuerdo con su frecuencia observada en la población, como alelo principal o silvestre y alelo raro o variante. De esta forma los genotipos generados por la combinación de alelos serán homocigoto silvestre, heterocigoto u homocigoto variante.

De acuerdo con su localización en el genoma los PNS pueden estar presentes en regiones codificantes o exones (cSNP) y producir un cambio en un aminoácido, lo que se conoce como no sinónimo (nsSNP); o bien, pueden no producir un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado, sin embargo podría presentarse alguna consecuencia funcional por mecanismos aún desconocidos (Duan, 2003), este tipo de PNS recibe el nombre de sinónimo o silencioso (sSNP). Los PNS también pueden estar localizados en la región promotora de un gen,

influyendo la actividad transcripcional del mismo; pueden localizarse en regiones intrónicas (iSNP) o no codificantes, en sitios de corte y empalme (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones), y en regiones intergenómicas (gSNP) (Cargill, 1999) (Figura1).

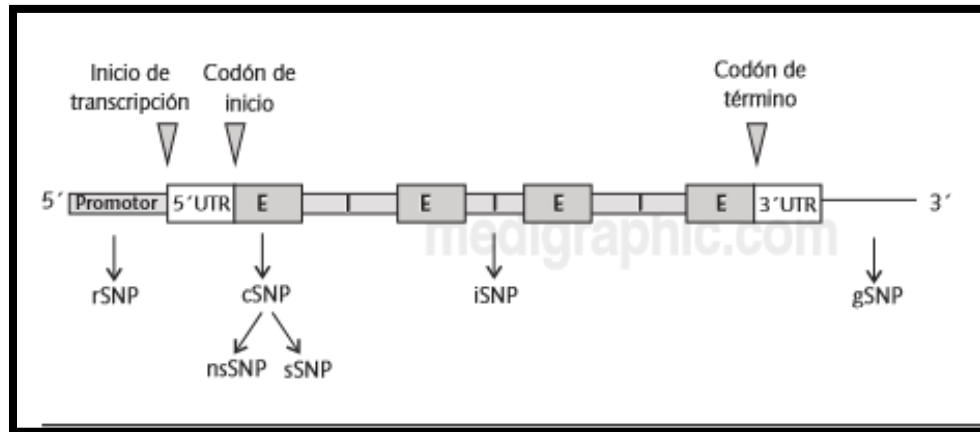


Figura 1. Clasificación de los PNS de acuerdo con su localización en el genoma. E=exones, I=intrones, UTR=regiones no codificantes (Checa, 2007).

Es importante mencionar que a diferencia de otros marcadores del ADN como los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), que son regiones en el genoma de 2 a 6 pares de bases que se repiten en un cierto número de veces y que se caracterizan por presentar altas tasas de mutación (Zhang, 2014), los PNS poseen tasa baja de mutación por lo que son útiles en estudios de genética de poblaciones.

Cuando un conjunto de PNS están localizados en el mismo cromosoma se les llama haplotipos. La diferencia entre un haplotipo y los PNS individuales, es que los alelos de un haplotipo son asignados a un cromosoma particular, en cambio los PNS individuales no están asignados a un cromosoma específico (Checa, 2007). Los diplotipos resultan de la combinación de dos haplotipos. El estudio de haplotipos es de utilidad para estudiar la recombinación o intercambio de ADN durante la meiosis (Checa, 2007). La identificación de PNS para la determinación de genotipos en una población, se realiza mediante la extracción de ADN genómico, amplificación de un

gen o segmento deseado por la reacción en cadena de polimerasa (PCR), generación de cortes con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción polimórfica mediante electroforesis. Los PNS también se pueden identificar por hibridación alelo-específica, ligación de oligonucleótidos alelo-específicos e incorporación de oligonucleótidos alelo-específicos (Checa, 2007).

2.2. GENÉTICA DE POBLACIONES Y EL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.

La genética de poblaciones estudia los procesos que determinan el destino de los alelos en las poblaciones, si se establecen o se pierden al pasar de una generación a otra (Genetics, 2009).

Todas las subpoblaciones comparten una poza génica, cada individuo al ser diploide posee dos alelos en su genotipo, por ejemplo, 1,000 personas tienen un total de 2,000 alelos. Cuando se van a analizar datos es mejor usar frecuencias más que números observados, así tenemos que la frecuencia de genotipos se refiere a la proporción de organismos que poseen un genotipo particular y se obtiene dividiendo el número de genotipos observados entre el total de genotipos de la muestra (ejemplo 1,000 genotipos). La frecuencia de alelos o frecuencia alélica se refiere a la proporción de alelos de un tipo específico (silvestre o variante) entre el número total de alelos de la muestra (por ejemplo, 1,000 genotipos implica 2,000 alelos).

La genética de poblaciones surgió en 1908 con el principio de Hardy-Weinberg establecido por el matemático inglés Hardy y el médico alemán Weinberg, de forma independiente. Es un modelo matemático que predice la frecuencia de genotipos en la siguiente generación de acuerdo con las frecuencias observadas en la generación presente. Mediante el cuadro de Punnett se pueden predecir los genotipos de la descendencia de una pareja, y mediante el equilibrio de Hardy-Weinberg se pueden predecir los genotipos de toda la población en la siguiente generación.

Se dice que los genes en una población están en equilibrio cuando los alelos de los polimorfismos mantienen su frecuencia a través de las generaciones. El principio del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se basa en la teoría de la probabilidad, es decir, que la probabilidad de ocurrencia simultánea de dos o más eventos independientes es igual al producto de las probabilidades de cada evento. El equilibrio determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones normales y en una población grande, si no ocurren fenómenos distorsionadores (aparición frecuente de mutaciones, apareamiento no aleatorio o la selección de alelos) la probabilidad de observar una combinación de alelos determinada o un genotipo depende del producto de las frecuencias de cada alelo. Si llamamos p a la frecuencia del alelo A y q a la frecuencia del alelo a, la ecuación del EHW es: $Np^2 + 2Npq + Nq^2 = 1$, donde p , pq y q representan los tres posibles genotipos: AA, Aa y aa; mientras que N representa el tamaño de la muestra (Inieta, 2005). Si las frecuencias observadas no muestran una diferencia significativa de las esperadas se dice que se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg y si hay diferencia se dice que existe una desviación o violación de este equilibrio. Para que se logre el equilibrio genético se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. La población debe ser infinitamente grande y los apareamientos al azar (panmíctica).
2. Los genotipos deben tener la misma supervivencia y con el mismo éxito reproductivo, es decir no hay selección natural.
3. Debe ser una población cerrada, sin migración.
4. No deben presentarse mutaciones.
5. Asume que cada generación es discreta y no se empalma con otra generación.

El EHW implica que las frecuencias genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones, independientemente de si su frecuencia es alta o baja. La

utilidad de establecer el apego al EHW para cierto PNS y cierta subpoblación, radica en que se puede extender a toda la población.

Este equilibrio genético es un estado ideal que ofrece una línea para medir el cambio entre generaciones, sin embargo, dado que no existen poblaciones ideales, el EHW es una proposición teórica que resulta muy útil para evaluar los factores evolutivos que están actuando en las poblaciones. La desviación del EHW se debe a cualquiera de los siguientes procesos biológicos:

1. Una población de tamaño pequeño que resulte en errores de muestreo aleatorio y frecuencias genotípicas impredecibles.
2. Una alta tasa de mutación en la población o migración masiva.
3. Selección de uno o una combinación de genotipos, como eliminación selectiva de homocigotos por algunas enfermedades autosómicas dominantes.
4. En términos de biomarcadores podemos citar dos aplicaciones importantes del EHW: a) detecta errores de genotipado, ya que en ocasiones se producen sesgos al interpretar resultados; b) si un biomarcador está asociado a una enfermedad, en este caso se espera desequilibrio de Hardy-Weinberg, es decir, que en estudios de casos y controles, se espera desequilibrio en los casos, pero no necesariamente en los controles, de ahí la importancia de determinar el EHW en una muestra de la población sana (como representantes de la población general), lo cual permitirá cotejar con una población enferma y determinar si en realidad hay una desviación del EHW, lo que implicaría la asociación entre genotipo y enfermedad, evitando falsas asociaciones (Nielsen, 1998).

2.3. TRANSPORTADOR DE FOLATOS REDUCIDO (RFC-1)

2.3.1. Homeóstasis del folato y RFC-1.

El folato es el término genérico para referirse a la vitamina hidrosoluble B9. La estructura química de los folatos comprende una molécula de ácido paraminobenzoico unida a pteridina y a residuos de glutamato. El ácido fólico es la forma monoglutámica completamente oxidada de la vitamina B9, es sintética y se usa para fortificar alimentos y como suplemento vitamínico (Brito, 2012).

Los folatos reducidos son donadores esenciales de fragmentos monocarbonados en varias reacciones metabólicas que llevan a la síntesis de nucleótidos y aminoácidos. Los seres humanos no podemos sintetizar folatos de novo y dependemos de los folatos que se obtienen de la dieta (exógenos). Si se presenta una deficiencia de folatos severa puede resultar en una síntesis defectuosa de ADN, ARN, proteínas y reacciones de metilación (Ly, 2012).

Los folatos y el ácido fólico se absorben en el duodeno y yeyuno, los poliglutamatos de folatos son hidrolizados a monoglutamatos de folatos por la enzima glutamato-carboxipeptidasa-II de las microvellosidades intestinales, tanto el ácido fólico como los folatos comparten la misma vía de absorción (Brito, 2012). Los folatos y el ácido fólico son moléculas hidrofílicas aniónicas que no pueden atravesar las membranas biológicas por difusión simple. Para ello existen sistemas de transporte activo que facilitan el ingreso de folato a la célula, como el transportador de folatos reducidos (RFC-1 o SLC19A1) que es el principal transportador de membrana para folatos y que es funcional a pH neutro. Otros sistemas de transporte de folatos son el transportador protón-acoplado (PCFT), que absorbe el folato a nivel del tracto gastrointestinal superior y que es dependiente de pH ácido, y el receptor de folato alfa (FR α) que internaliza folatos a través de la membrana epitelial intestinal por una unión de alta afinidad y endocitosis. También hay miembros de la familia de transportadores de aniones orgánicos (por ejemplo el OAT2) que transporta una amplia variedad de aniones orgánicos incluyendo folatos en el epitelio renal (Matherly, 2008).

Por otro lado, los fármacos antifolatos que se utilizan contra el cáncer, como el metotrexato, son sustratos de los sistemas de transporte de folatos. En el caso específico del RFC-1, este transportador es crítico en la eficacia de la respuesta al tratamiento con los antifolatos citotóxicos (Figura 2).

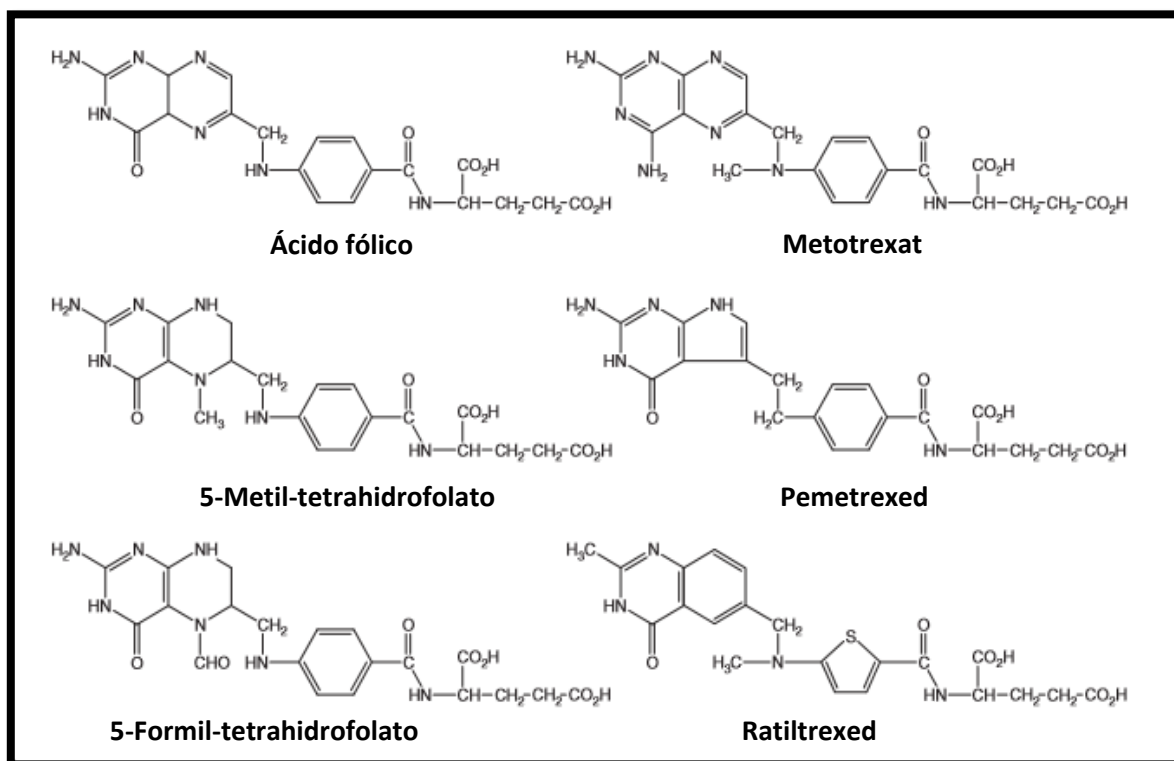


Figura 2. Sustratos del RFC-1, se muestran estructuras de los folatos (panel izquierdo) y antifolatos (panel derecho) (Matherly, 2008).

2.3.2. Estructura y fisiología del RFC-1.

El RFC-1 es una proteína de membrana que consta de 591 aminoácidos y 12 dominios transmembranales con las terminaciones N y C hacia el citoplasma (Matherly, 2008). Posee un sitio de glucosilación en una asa externa localizada entre el primero y segundo dominio transmembranal, que no es importante para su función como transportador de folatos (Wong, 1998) (Figura 3). Varias regiones de la proteína han sido relacionadas con diferentes funciones, por ejemplo, la presencia intracelular de ambos extremos terminales es importante para mantener la apropiada localización celular del RFC-1, mientras que el asa intracelular entre los

dominios 6 y 7 son requeridos para la estabilidad proteica y la eficiente translocación del sustrato (Figura 4).

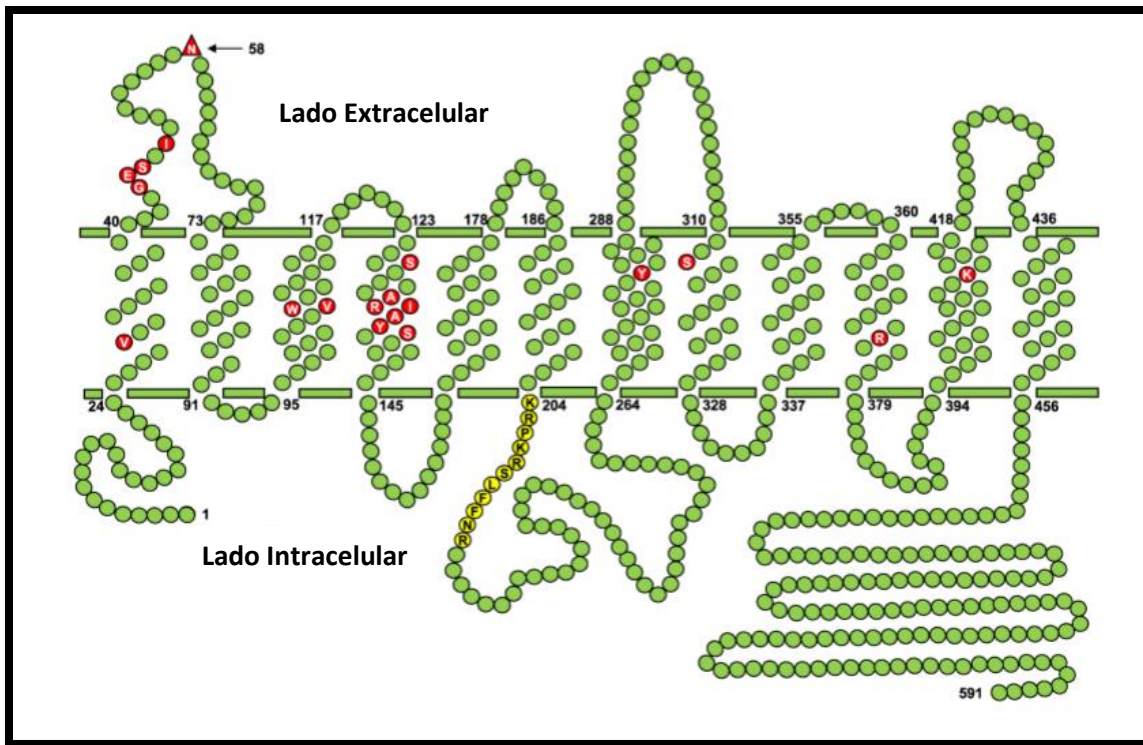


Figura 3. Estructura del RFC-1 que muestra sus doce dominios transmembranales (TMD) con los extremos N y C hacia el espacio intracelular, el asa que une el TMD6 y TMD7, en rojo los aminoácidos que son estructural y funcionalmente importantes, y un segmento de aminoácidos de la Lys204-Arg214 en amarillo importantes para el transporte. Se marca con un triángulo la N-glucosilación en la Asn58 (Hou, 2014).

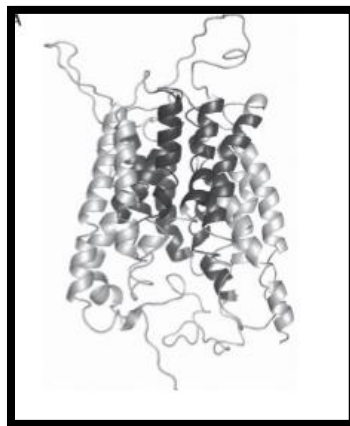


Figura 4. Modelo tridimensional del RFC-1 propuesto por cristalización (Matherly, 2008).

El RFC-1 pertenece a la superfamilia de facilitadores principales (MFS). El RFC-1 se localiza en todas las células del cuerpo humano, su pH óptimo es de 7.4 y es la principal ruta de entrada de folatos hacia tejidos sistémicos. Si bien este transportador se expresa en todos los tejidos, tiene funciones especializadas en los bordes en cepillo del epitelio intestinal, en los plexos coroideos, en la membrana basolateral de los túbulos renales proximales y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Figura 5) (Zhao, 2013). A pesar de que el RFC-1 se encuentra en altas concentraciones en intestino delgado no es importante para la absorción de folatos en este sitio, ya que los folatos son introducidos por otro transportador llamado transportador de folatos protón-acoplado (PCFT) dependiente de pH ácido (Qiu, 2006). Sin embargo, si hay deficiencia en la ingesta de folatos aumenta la expresión de RFC-1 a nivel intestinal. La deficiencia de transportadores RFC-1 se asocia a enfermedades por deficiencia de folato como enfermedades cardiovasculares, anomalías fetales, trastornos neurológicos y posiblemente cáncer (Matherly, 2004). Cabe resaltar que el RFC-1 también es importante para la actividad antitumoral de los antifolatos como el metotrexato utilizado como parte de la quimioterapia en pacientes con cáncer (Matherly, 2007).

El RFC-1 no depende de sodio ni de protones, de hecho es un transportador aniónico bidireccional, intercambia folatos reducidos por fosfatos orgánicos que son sintetizados y retenidos por la célula. La generación de un gradiente electroquímico producido por el aumento intracelular de fosfatos orgánicos mediante las reacciones dependientes de ATP, dirige la entrada de folatos a la célula. Los fosfatos se transportan a favor de un gradiente de concentración, mientras que el folato lo hace en contra de un gradiente de concentración. El Adenosin monofosfato cíclico (AMPC) es un inhibidor competitivo potente del RFC-1 (Goldman, 1971). En comparación con el RFC-1, el PCFT es un cotransportador de tipo simporte que introduce folatos e hidrógenos (Figura 6) (Zhao, 2011).

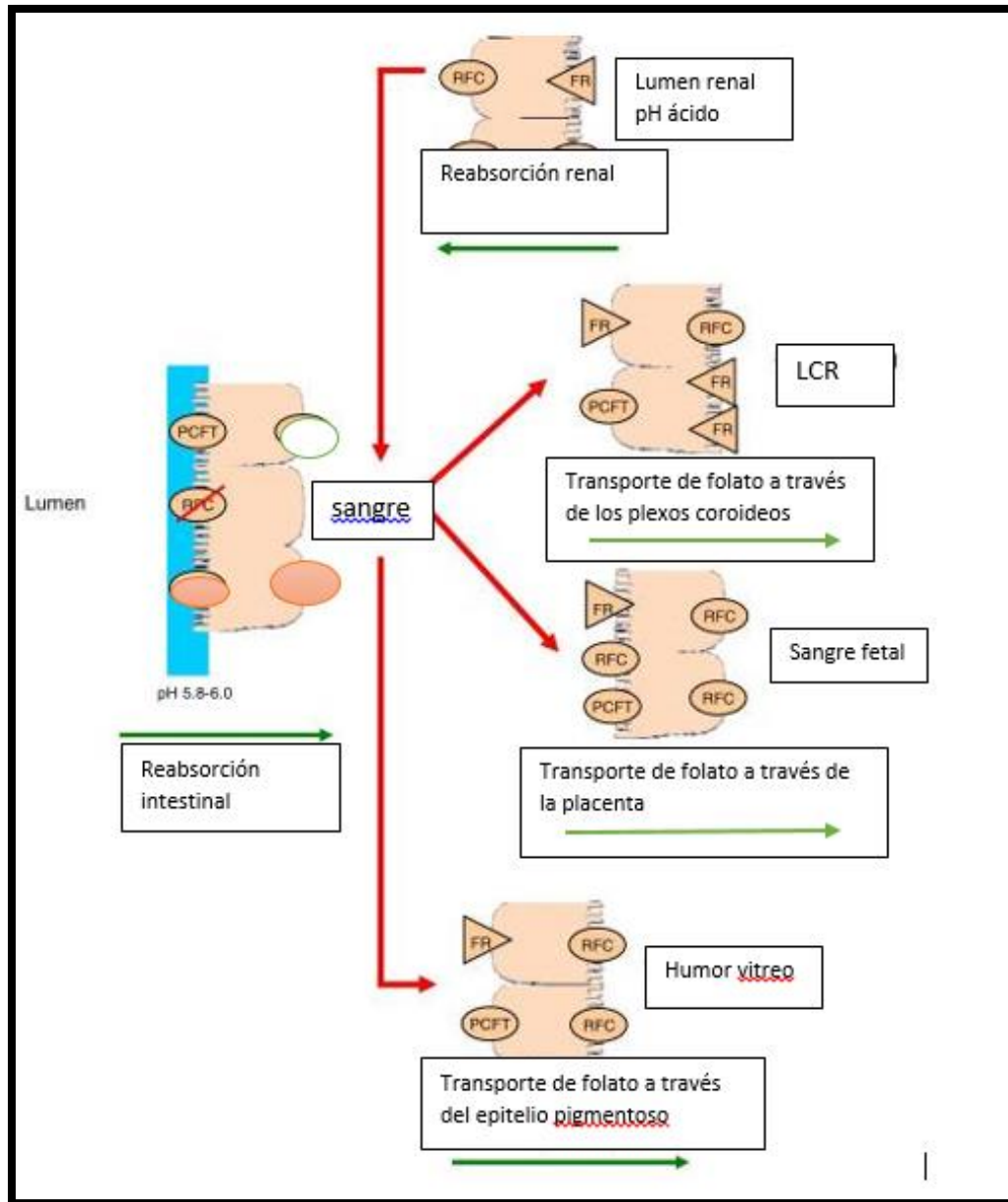


Figura 5. Localización de los transportadores de folatos en células de algunos tejidos epiteliales. PCFT=Transportador de Folatos Protón Acoplado, FR=Receptor de Folato, RFC=Transportador de Folatos Reducido-1, LCR=Líquido Cefalorraquídeo (Zhao, 2013).

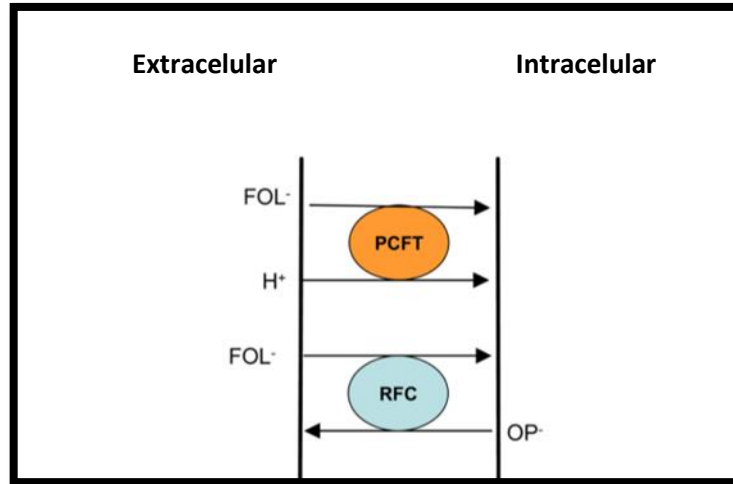


Figura 6. Transportadores de folatos RFC-1 y PCFT. FOL=Folatos, H=Hidrógenos, OP=Fosfatos Orgánicos (Zhao, 2011).

2.3.3. GEN DEL RFC-1 Y SU REGULACIÓN.

El gen que codifica al RFC-1 se encuentra localizado en el cromosoma 21q22.3 (Moscow, 1995). Posee 5 exones que codifican para una proteína de 591 aminoácidos y 6 regiones no codificantes precedidos cada uno por una región promotora (Matherly, 2007). La regulación de la expresión y función del RFC-1 es dirigida por el estatus de folatos extracelulares, un incremento en la disponibilidad de folatos suprime la expresión del RFC-1 mientras que su deficiencia incrementa la expresión del transportador. La expresión del transportador también es dependiente del ciclo celular, con un alto nivel de expresión en la transición de G1 a S. La transcripción de p53 suprime la expresión del RFC-1. Además, la actividad y expresión del transportador son suprimidas por la presencia de óxido nítrico y por hiperglucemia (Ganapathy, 2003).

Se han identificado diversos PNS en el gen del RFC-1, siendo uno de los más estudiados el G80A, el cual se localiza en el exón 2. Consiste en la sustitución de una guanina por una adenina en la posición 80 lo que provoca el reemplazo de una arginina por una histidina en la posición 27 de la proteína (Arg27His), por lo tanto se clasifica como PNS de tipo codificante no sinónimo. El impacto de este cambio de aminoácido sobre la función de este transportador es desconocido.

Probablemente la afinidad del transportador por la forma reducida del folato y el metotrexato este disminuida (Niedzielsca, 2013) debido al cambio de un aminoácido de tipo básico fuerte (Arg) por un aminoácido básico débil (His), lo que afecta las propiedades transportadoras del RFC-1 (Whetstine, 2001).

El transcrito RFC presenta un control postranscripcional, ya que cuando existe un alta concentración extracelular de folatos se presenta un tráfico intracelular defectuoso de RFC-1 hacia la membrana plasmática quedándose atrapado en el retículo endoplásmico (Hou et al, 2013). La N-glucosilación del Asn58 del RFC-1 es un paso limitante para la migración de la proteína hacia la membrana pero tiene poca importancia para la función de transporte del RFC-1 (Matherly, 2014). El RFC-1 forma homo-oligómeros, cada monómero funciona como una unidad transportadora independiente, sin embargo, la oligomerización es crucial para el tráfico de RFC-1 desde el retículo endoplásmico a la membrana celular, proporcionando otro nivel de regulación importante.

Hay una regulación adaptativa del RFC-1 en respuesta al incremento extracelular de folatos que incluye:

1. Incremento de los transcritos del gen del RFC-1, que reflejan cambios en la estabilidad de los mismos.
2. Incremento en los RFC-1 retenidos en el retículo endoplásmico, por el tráfico intracelular defectuoso hacia la membrana plasmática.
3. Vía de señalización generada por el RFC-1 a través del AMPc-PKA.

El AMPc estimula la expresión de varios genes blanco a través de los elementos de respuesta conservados (CRE) de AMPc, que consiste en una secuencia palindrómica de 8 pb (TGACGTCA). La proteínquinasa A (PKA) es necesaria para la transcripción dependiente de AMPc, ésta se encarga de fosforilar a la proteína de unión a CRE (CREB-1), miembro de una familia de factores de transcripción que regula varios procesos fisiológicos como el control del ciclo celular, proliferación celular y señalización neuronal. La fosforilación de la familia de proteínas CREB en la Ser133 en respuesta al estímulo inducido por AMPc provoca la expresión de

genes blanco. La CREB-1 fosforilada se une directamente al sitio de unión-CRE y a p300 que inducen la transcripción por su unión física a la ARN polimerasa II. Los factores de transcripción para CRE se unen a las cajas GC, a los sitios Sp1 y Sp3 localizados en la región promotora del gen de RFC-1 (Rothem, 2004). Existe evidencia que sugiere que la unión de la proteína CREB-1 en la región promotora es un factor importante en la expresión del gen de RFC-1. Por lo tanto, cuando hay una fosforilación defectuosa de CREB-1 resulta en una disminución en la expresión de RFC-1 dependiente de CRE. Sp1 puede ser fosforilado por la acción de la PKA, convirtiendo a Sp1 en un represor de la transcripción. Este es un mecanismo de resistencia a antifolatos como el metotrexato en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, donde la función de RFC-1 está disminuida y los antifolatos no pueden ingresar a la célula para ejercer su acción (Stark, 2006).

El AMPc se forma por la adenilato ciclasa que se encuentra asociada a una proteína G de membrana, que se encarga de activarla originando incremento en los niveles de AMPc, el cual pone en marcha la activación de la PKA, la cual consta de 4 subunidades: 2 reguladoras y 2 catalíticas. Se requiere la unión de 2 AMPc por molécula reguladora, lo que desplaza el equilibrio de la interacción y libera a las subunidades catalíticas que se encargan de fosforilar a las proteínas blanco en los residuos de Ser o Tre, utilizando como sustrato al ATP.

2.4. GAMMA-GLUTAMIL HIDROLASA

2.4.1. La GGH y el metabolismo del folato y antifolatos.

El ácido fólico, ácido pteroil-L-glutámico o también conocido como vitamina B9, es el mediador de la transferencia de unidades de carbono necesario para la biosíntesis de timidilato y purinas, y en las reacciones de metilación del ADN (Kim, 2007 y Shane, 2010). En células animales el ácido fólico se encuentra como poli- γ -glutamatos, que a diferencia de los monoglutamatos, no pueden penetrar fácilmente la membrana celular. Sin embargo, como las células de mamíferos no pueden sintetizar de novo el ácido fólico, dependemos de la ingesta de alimentos ricos en

él, como los vegetales, los cuales lo sintetizan en forma de poli- γ -glutamato. Antes de que el ácido fólico sea absorbido por el sistema digestivo, los folatos poliglutamados necesitan ser convertidos en monoglutamatos por la enzima glutamato carboxipeptidasa II. Una vez dentro de la célula los monoglutamatos deben convertirse de nuevo en poliglutamatos para lograr reternerlos intracelularmente. El proceso consiste en la adición sucesiva de hasta nueve residuos de ácido glutámico por la enzima folil-poli- γ -glutamil sintetasa (FPGS) en el citoplasma. Los poliglutamatos de ácido fólico son esenciales para varios procesos metabólicos como la síntesis de purinas y pirimidinas. Las células también tienen la habilidad de revertir este proceso y remover los glutamatos adicionados, utilizando para ello la enzima gamma-glutamil hidrolasa (GGH) (Figura 7). El ácido fólico en forma de monoglutamato es más fácil de exportar del interior de la célula. La GGH en contraste con la FPGS, es una enzima lisosomal (Wang, 1986), cuya localización organelar le permite a la célula separar el proceso anabólico de adicionar glutamatos del proceso catabólico de remover glutamatos del ácido fólico. Al parecer esta separación contribuye de manera importante al control de la homeostasis de los folatos dentro de la célula (Schneider, 2006).

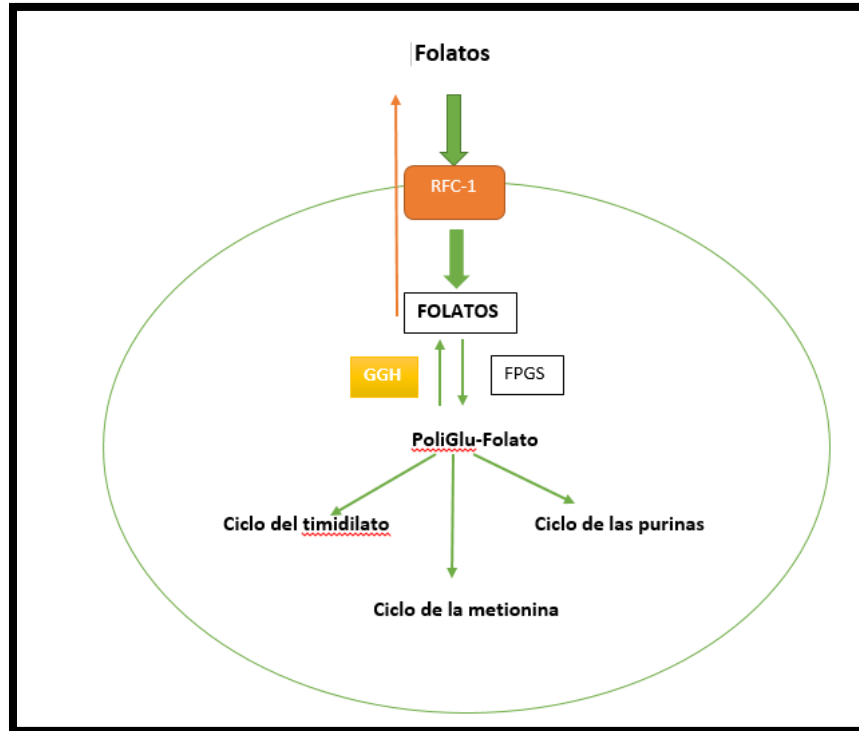


Figura 7. Metabolismo de los folatos. Se muestra el papel del RFC-1 como transportador y el de la enzima GGH en el clivaje de glutamatos para facilitar la salida de folatos de la célula. FPGS= Folil-poliglutamil sintetasa, PoliGlu-folato= poliglutamatos de folatos. (Oppeneer, 2014).

2.4.2. Estructura del gen de la GGH y su regulación.

El gen de la gamma-glutamil hidrolasa (GGH) comprende 24 kb, se localiza en el cromosoma 8q12.23-13.1 y comprende 9 exones (Yao, 1997). Se requiere un elemento regulador positivo en el promotor localizado en la porción 5' del gen, desde la posición -52 a +4, sugiriendo que la expresión es regulada en forma específica según el tejido (Yin, 1999).

Se han identificado varios PNS en el gen de esta enzima, entre éstos podemos menciona el -C401T, -G354T, -T124G, T16C, C452T y A1102G; los tres primeros se encuentran ubicados en la región promotora y están relacionados con un aumento en la expresión de la enzima GGH (Chave, 2003).

El PNS C452T consiste en el cambio de una citosina por una timina en el exón 5 y particularmente en la posición 452 del gen de la GGH, lo cual repercute en el cambio

de la treonina-127 por una isoleucina, disminuyendo con esto la actividad catalítica de la enzima sobre los poliglutamatos de foaltos y antifolatos (Chave, 2003). Este polimorfismo se ha asociado con una disminución en la actividad catalítica de la GGH en células B y T en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y con una mayor acumulación de metotrexato de larga cadena de poli- γ -glutamatos en células *in vivo* (Cheng, 2004). El -C401T, el cual consiste en la sustitución de una citosina por una timina en la posición -401 del gen, se ha asociado con una acumulación de poliglutamatos de metotrexato de 4 a 6 residuos en eritrocitos de homocigotos TT con artritis reumatoide (Dervieux, 2004).

El PNS T16C del gen GGH es codificante no sinónimo porque resulta en el cambio de una cisteína por arginina en la posición 6 de la proteína y corresponde al péptido señal que es clivado, por lo tanto no afecta a la estructura de la proteína funcional. El PNS A1102G está presente en la región 3'UTR del gen de la GGH, si bien tiene un efecto desconocido, se cree que afecta la estabilidad del ARN mensajero (Chave, 2003).

La enzima GGH comprende una sola cadena de 318 aminoácidos y tiene un peso molecular de 35,983 Da (Yao, 1997). Los primeros 24 aminoácidos constituyen un péptido señal, el cual es clivado para generar la enzima madura. Es una peptidasa que contiene una cisteína en el sitio activo indispensable para ejercer su acción. Además de esta Cis-110, la His-220, Glu-222, His-171 y la Tir-36 también son importantes para la actividad enzimática. El mecanismo catalítico propuesto sugiere un ataque nucleofílico por la Cis-110 sobre el grupo γ -carbonilo del enlace Glu- γ -Glu para formar un intermediario tioacil, seguido por la liberación del grupo amino. El sitio activo de la GGH está adaptado para acomodar grandes sustratos de poli- γ -glutamatos, de esta forma cataliza la hidrólisis del último o penúltimo enlace γ -glutamato, liberando mono-Glu o di-Glu (Schneider, 2006). El análisis de la estructura cristalizada de la GGH humana muestra que es un homodímero en solución con una gran interfase monómero-monómero, importante para que el monómero se pliegue en una configuración activa. Cada monómero contiene un sitio activo característico (Figura 8) (Li, 2002).

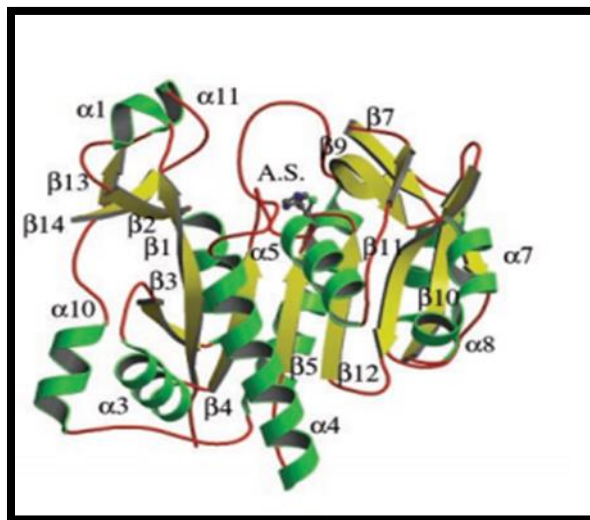


Figura 8. Diagrama de listón de la enzima GGH. Se identifican las estructuras secundarias y el plegamiento de la proteína. Se observa el sitio activo donde está incluida la Cys-110 y la His-220. A.S.= Sitio activo (Li, 2002).

2.4.3. Papel de la GGH en la resistencia a fármacos.

La sensibilidad de las células a los antifolatos depende de la concentración del fármaco a nivel intracelular. Sin embargo, la adición de glutamatos por parte de la FPGS hace que el fármaco sea retenido intracelularmente, lo que aumenta su concentración dentro de la célula y disminuye su salida. El metotrexato (MTX) es un monoglutamato que inhibe a la dihidrofolato reductasa (DHFR), cuando se encuentra poliglutamado el MTX puede inhibir otras enzimas como la timidilato sintasa y enzimas de la biosíntesis de purinas, como la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa y la aminoimidazol carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (Figura 9). Debido a esto los bajos niveles de FPGS y/o una alta actividad de la GGH resulta en una reducida concentración de especies poliglutamadas que puede asociarse con una baja eficacia terapéutica, lo que fue detectado por primera vez en pacientes con sarcoma (Li, 1993). El incremento en la expresión de GGH debida a la presencia del PNS -C401T (genotipo TT) ha sido asociado con bajos niveles de poliglutamatos de larga cadena de MTX en pacientes con artritis reumatoide. Estos datos sugieren que una alta actividad de la GGH afecta en forma negativa la longitud

de la cadena de glutamatos de los antifolatos y en forma consecuente su eficacia (Schneider, 2006).

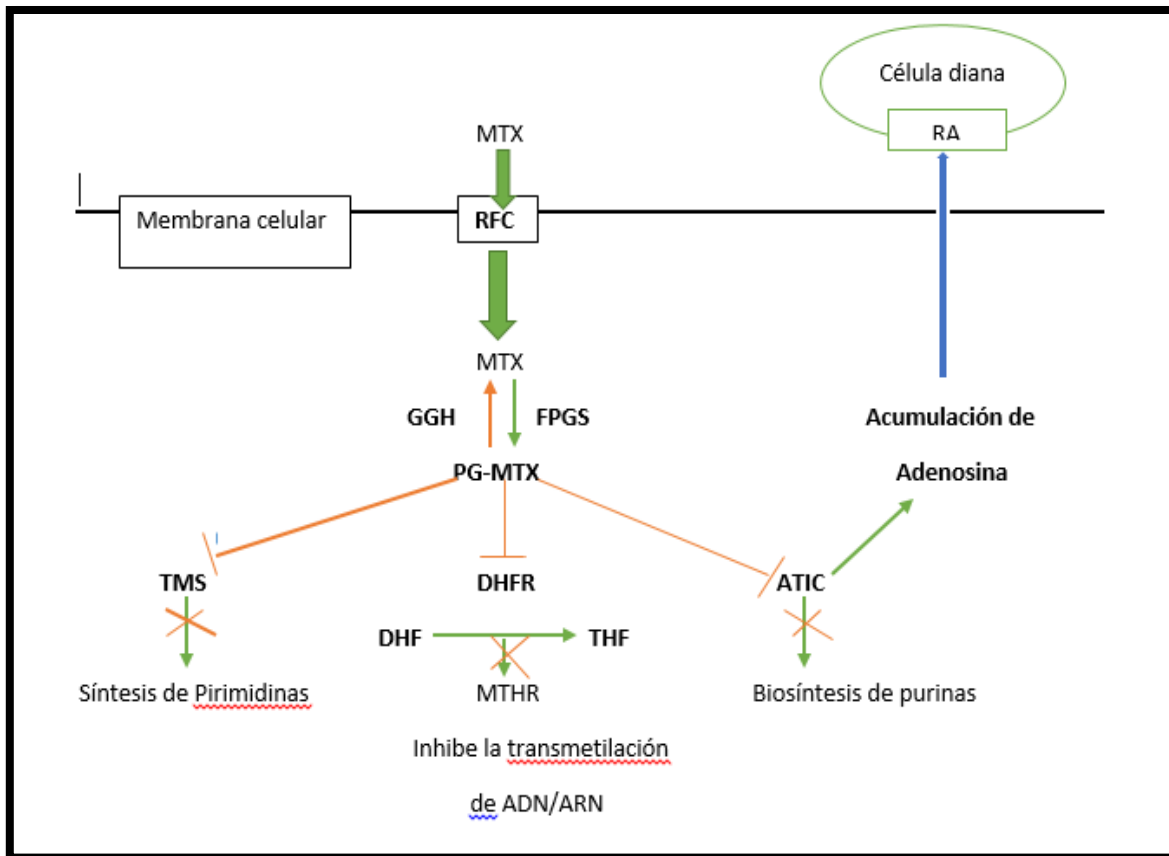


Figura 9. Transporte, metabolismo y efecto del metotrexato. RFC: Transportador de folatos reducido. GGH: Gamma-glutamil hidrolasa. FPGS: Folil-poli-glutamil sintetasa. MTX-PG: Poliglutamatos de metotrexato. TMS: Timidilato sintasa. DHFR: Dihidrofolato reductasa. ATIC: Aminoimidazol carboxamida ribonucleótido formiltransferasa. MTHR: Metilentetrahidrofolato reductasa. DHF: Dihidrofolato. THF: Tetrahidrofolato. RA: Receptor de adenosina. (Esquema basado en S.L. Hider, 2007).

2.5. METOTREXATO (MTX)

El metotrexato (MTX) es un antimetabolito del ácido fólico y fue descrito en 1940 como un fármaco eficiente en oncología. Su mecanismo de acción (Figura 8) consiste en cesar la producción de purinas y pirimidinas, que son esenciales para la formación de ADN, por inhibición de las enzimas 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido transformilasa (ATIC) y de la timidilato sintasa (TMS), respectivamente; además de inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa, lo que

conduce a una depleción de tetrahidrofolato causando disminución de la remetilación de homocisteína a metionina, acumulación de homocisteína a nivel intracelular y afectando de esta forma la transmetilación de los ácidos nucleicos (Tian, 2007). En cuanto al uso de MTX en pacientes con enfermedades autoinmunes se aplicó por primera vez en 1951 (Roszkewickz, 2017). Su efecto antiinflamatorio se debe a que estimula la liberación de adenosina, nucleósido de purina endógeno, que después de ser liberado al espacio extracelular se une a receptores específicos A2 y A3, involucrados en la respuesta antiinflamatoria, al inhibir la adhesión de neutrófilos activados (Tian, 2007). El MTX y otros antimetabolitos del ácido fólico ingresan a la célula utilizando la misma vía del ácido fólico ya descrita. En la actualidad el MTX es el fármaco de primera elección en el tratamiento de artritis reumatoide, ya que ha demostrado ser altamente efectivo, de acción rápida y con buen pronóstico de la enfermedad a largo plazo. Sin embargo, solo un 35 a 65% de los pacientes con artritis reumatoide tratados con MTX presenta buena respuesta, y un 10 a 30% de los pacientes interrumpen el tratamiento debido a la presencia de efectos adversos (Swierkot, 2015).

2.6. ANTECEDENTES

Existen reportes que muestran que los PNS en genes de proteínas y transportadores relacionados con el metabolismo de fármacos, como el MTX y el RFC-1 en pacientes con LLA, osteosarcoma y artritis reumatoide (AR), juegan un papel importante en la respuesta al tratamiento. Uno de los PNS más estudiado es el C677T del gen de la MTHFR asociado con actividad enzimática reducida (Kang, 1988). Se han estudiado las distribuciones genotípicas de los PNS del RFC-1 G80A, C452T y -C401T de la GGH en diversas etnias para establecer el EHW.

Si bien se han identificado varios PNS en el gen de la GGH, uno de los de mayor relevancia es el -C401T, relacionado con un aumento en la expresión de la enzima y por lo tanto de su actividad, lo cual conduce a una disminución en la concentración intracelular de PG-MTX y por ende a una disminución en la eficacia del tratamiento con MTX (Chave, 2003). El genotipo CC (homocigoto silvestre) presenta una mayor

toxicidad gastrointestinal y en sistema nervioso central (SNC) (Dervieux, 2004). El genotipo TT está relacionado con un incremento en el riesgo de leucopenia y trombocitopenia después de altas dosis con MTX (Koomdee, 2012). Se realizó un estudio de toxicidad al MTX en 91 pacientes pediátricos chinos con LLA y se encontró que el PNS –C401T contribuye a la variabilidad interindividual en la farmacocinética del MTX, y que su genotipificación puede contribuir a la disminución de la toxicidad por el uso de dicho medicamento, ya que los individuos con genotipo CC muestran un menor nivel sérico de MTX que los individuos CT y TT (Wang, 2014). En la tabla 1 se observan las distribuciones de los genotipos del PNS –C401T del gen GGH en distintas poblaciones sanas y con apego al equilibrio de Hardy-Weinberg.

El otro polimorfismo de mayor frecuencia identificado en el gen de la GGH es el C452T, el cual se encuentra localizado en el exón 5 involucrando un cambio de una treonina por isoleucina, lo que disminuye la actividad hidrolítica de la GGH (Cheng, 2004). En la tabla 1 se muestra la distribución del PNS C452T del gen de la GGH en distintas poblaciones sanas y con apego al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 1. Distribución de los PNS –C401T y C452T del gen GGH en diferentes poblaciones sanas.

PNS del gen GGH	Población	% CC	%CT	%TT	Referencia
-C401T	EUA	50	35	15	Dervieux, 2004
	Korea	66.5	29.2	4.6	Kim, 2008
	Mexicanos (Guerrero)	75	21.4	3.5	Organista-Nava, 2010
C452T	Japoneses	89.2	10.4	0.4	Hayashi, 2007
	Caucásicos	80.6	18.7	0.6	Cheng, 2004
	Afroamericana	91.3	8.8	0	Cheng, 2004
	Mexicanos (Guerrero)	94.4	3.6	0	Organista-Nava, 2010

El PNS del gen del RFC-1 más frecuente es el G80A que cambia una arginina por una histidina en el codón 27 (Patrizia De Marco, 2003). Los individuos con genotipo

AA (homocigoto variante) presentan un aumento en los niveles plasmáticos de folatos y MTX (Drozdzić, 2007). En un estudio realizado en 174 pacientes con AR y tratados con MTX presentaron una remisión de los síntomas 3.32 veces mayor en pacientes con el genotipo AA que en pacientes con el genotipo GG, por lo que se concluye que la evaluación del PNS G80A del gen del RFC-1 es una herramienta útil para optimizar el tratamiento con MTX en pacientes con artritis reumatoide que reciben dosis bajas de MTX (Drozdzić, 2007). Algunos investigadores estudiaron este polimorfismo del RFC-1 (G80A) y su relación con el riesgo de recaída en pacientes pediátricos con LLA. En un grupo de 204 pacientes con LLA, el genotipo AA fue asociado con altas concentraciones séricas de MTX, indicando que el polimorfismo probablemente se asocie a una disminución de la afinidad del RFC-1 por el MTX (Laverdicre, 2002). Un estudio de la distribución del polimorfismo G80A del RFC-1 realizado en Francia por Chango (2000), demostró que dicha distribución se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg presentado los siguientes datos: homocigoto AA 21.9%, heterocigoto AG 50.9% y homocigoto GG 27.1%. En Yucatán se realizó un estudio en padres y madres de hijos con espina bífida encontrándose que el genotipo GG del gen RFC-1 se asocia más comúnmente a espina bífida debido a que el RFC-1 es importante durante el desarrollo embrionario por su papel en el transporte de folato a través de la barrera placentaria (González-Herrera, 2012). En otra investigación llevada a cabo en pacientes con osteosarcoma tratados con MTX, el genotipo GG del RFC-1 se asoció con mejoría clínica mientras que el genotipo AA de dicho polimorfismo se observó con mayor frecuencia en pacientes con metástasis (Jabeen, 2015).

Se realizó un estudio en la India que incluyó 327 pacientes con artritis reumatoide y 322 controles con la siguiente distribución del G80A del RFC-1: GG 26.08%, GA 60.86% y AA 13.04% (Muralidharan, 2015).

En un estudio de casos y controles realizado en el Centro Estatal de Cancerología (CECAN) en el estado de Durango, México, de 73 pacientes pediátricos con LLA y

133 niños sanos, se reporta una distribución en EHW del PNS G80A en los controles de 19% GG, 45% GA y 36% del AA (Zaruma-Torres, 2016).

Hashigushi (2016) estudió las frecuencias alélicas en 299 japoneses sanos y las comparó con diferentes etnias y/o poblaciones de diez PNS del RFC-1 y de la GGH (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución genotípica de los PNS G80A del gen RFC-1, -C401T y C452T del gen GGH en sujetos sanos de diferentes etnias.

PNS	GEN	ETNIA	N	Homocig. silvestres	Heteroci g.	Homocig. variantes	Referencia
G80A	RFC-1	Japoneses	299	17.4 GG	51.8 GA	30.8 AA	Hashigushi, 2016
		Japoneses	472	19.1	48.3	32.6	Hashigushi, 2016
		Asiáticos	168	27.4	45.2	27.4	Hashigushi, 2016
		Caucásicos	1203	30.2	48.6	21.2	Hashigushi, 2016
		Africanos	23	13	52.2	34.8	Summers, 2010
C452T	GGH	Japoneses	299	83.3 CC	15.7 CT	1.0 TT	Hashigushi, 2016
		Japoneses	525	81.1	18.3	0.6	Hayashi, 2007
		Asiáticos	564	80.3	18.5	1.2	Oppeneer, 2012
		Caucásicos	209	74.2	23.4	2.4	Herrlinger, 2005
		Africanos	332	85.5	13.3	1.2	Hashigushi, 2016
-C401T	GGH	Japoneses	299	58.5	36.8	4.7	Hashigushi, 2016
		Japoneses	86	39.5	48.8	11.7	Hashigushi, 2016
		Asiáticos	90	60	35.6	4.4	Hashigushi, 2016
		Caucásicos	120	45	48.3	6.7	Hashigushi, 2016
		Africanos	120	75	21.7	3.3	Hashigushi, 2016

Hashigushi (2016), describe las características de los PNS en genes de enzimas y transportadores relacionados con el metotrexato, las cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los PNS G80A del gen RFC-1, y -C401T y C452T del gen GGH.

Gen	PNS	Efectos en el producto del gen	Significado clínico
RFC-1	G80A	Afecta la actividad transcripcional del gen RFC-1 y la entrada de MTX a la célula.	Aumenta la concentración de PG-MTX en eritrocitos de pacientes con AR y buena respuesta clínica al tratamiento con MTX en los portadores del alelo A (Dervieux, 2004)
GGH	C452T	Asociado con baja actividad catalítica de la GGH, y mayor acumulación intracelular de PG-MTX de cadena larga.	No asociación con la eficacia ni toxicidad al MTX (Cheng, 2004)
GGH	-C401T	Asociado con mayor actividad promotora GGH, disminución de poliglutamación del MTX en individuos TT.	Aumenta la toxicidad del MTX en individuos con el genotipo CC. (Dervieux, 2004).

Nota: Tomado de Hashigushi, 2016.

En 37 pacientes pediátricos koreanos con osteosarcoma y tratados con MTX, se concluye que en relación con el PNS G80A del RFC-1, el genotipo AA confiere protección contra toxicidad por altas dosis de MTX (Park, 2016) versus el genotipo GG en donde se observa un aumento de efectos adversos, específicamente mucositis, por lo que se propone la genotipificación de este PNS como un predictor de toxicidad en pacientes tratados con MTX. El mecanismo propuesto como responsable de la disminución de la toxicidad al MTX en individuos con el genotipo AA del PNS G80A del RFC-1, es que la sustitución de la histidina por la arginina aumenta la afinidad del transportador por folatos reducidos como el MTX y ácido folínico ($K_m = 1-10 \mu M$) y al ácido fólico con menor afinidad ($K_m = 200-400 \mu M$) (Schmiegelow, 2009).

Candelaria (2016) realizó un estudio de casos y controles en pacientes mexicanos con LLA, encontrando en los controles una frecuencia del alelo A de 50.7% para el PNS G80A del RFC-1, y sugiere que dicho polimorfismo es de utilidad en la optimización de la dosis de MTX en pacientes adultos con LLA.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los reportes, no se encuentra documentada la distribución de los polimorfismos de nucleótidos sencillo de los genes de la gamma-glutamyl hidrolasa (-C401T y C452T) y del transportador de folatos reducido-1 (G80A), involucrados en el metabolismo del ácido fólico y los antifolatos, en poblaciones del norte y noroeste de México. Por lo que en una muestra aleatoria de sujetos, pertenecientes a la tercera generación de nacidos en la ciudad de Mexicali, B.C., es importante establecer si estos polimorfismos están presentes, determinar sus frecuencias y evaluar si cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Esto nos permitirá en un futuro, realizar estudios de asociación de estos polimorfismos con diversas patologías como cáncer de mama, leucemias, linfoma no Hodking, artritis reumatoide y otras donde se utilizan los antifolatos; evaluar la eficacia y reacciones adversas del tratamiento y distinguir a los pacientes como buenos o malos respondedores a los antifolatos.

3.1. Pregunta de investigación.

¿Se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg la distribución de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la gamma-glutamyl hidrolasa, y el polimorfismo G80A del gen del transportador de folatos reducidos 1, en una muestra de la población de la ciudad de Mexicali, B.C.?

4. JUSTIFICACIÓN

El metotrexato es un medicamento muy utilizado en nuestro medio para pacientes con enfermedades autoinmunes como psoriasis y artritis reumatoide y en el tratamiento de neoplasias como la LLA, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, linfoma no-Hodgkin y sarcoma osteogénico. Su eficacia es limitada debido a resistencia durante el tratamiento o abandono del mismo por aparición de efectos tóxicos importantes tales como hepatitis, toxicidad gastrointestinal, neurotoxicidad y alteraciones hematológicas como leucopenia y trombocitopenia. Existen reportes en la literatura médica que asocian a los polimorfismos de nucleótido sencillo a ciertos genotipos de las enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo del metotrexato, como el C677T y el A1298C del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), ambos asociados a una actividad reducida de la enzima, y a una mayor toxicidad y/o recaídas frente al MTX (Hider, 2007). Para establecer si estos polimorfismos son confiables como biomarcadores y determinar si un paciente será un buen respondedor o no, es necesario conocer su distribución en una muestra de la población general y establecer si dicha distribución se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg. Este cálculo es imprescindible dentro de los estudios de farmacogenética para realizar de manera confiable estudios de asociación genotipo-enfermedad, genotipo-reacciones adversas, o genotipo-eficacia para cierto tratamiento.

Es importante resaltar que no existe en la literatura ningún reporte en relación con la distribución de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la GGH y G80A del gen RFC-1, en poblaciones mestizas del Noroeste de México. El demostrar su apego al Equilibrio de Hardy-Weinberg contribuye al establecimiento de las bases para realizar estudios de asociación genética entre estos polimorfismos y el desarrollo de reacciones adversas o eficacia del tratamiento con metotrexato en pacientes con artritis reumatoide y leucemia linfoblástica aguda, padecimientos en donde está indicado el uso de este fármaco.

5. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula:

La distribución de los PNS -C401T y C452T del gen de la GGH, y G80A del gen del RFC-1 en una población de la ciudad de Mexicali, B.C., se encuentra en equilibrio de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg.

Hipótesis de Investigación:

La distribución de los PNS -C401T y C452T del gen GGH, y G80A del gen RFC-1 en una población de la ciudad de Mexicali, B.C., no se encuentra en equilibrio de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer la distribución de los PNS -C401T y C452T del gen de la enzima GGH, y el polimorfismo G80A del gen del transportador RFC-1, y determinar si dicha distribución se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg en una muestra de sujetos aparentemente sanos nacidos en la ciudad de Mexicali, B.C.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar en cada sujeto de estudio si es portador de los PNS -C401T y C452T del gen GGH, y G80A del gen del RFC-1.
2. Determinar si los sujetos son homocigotos silvestres, heterocigotos u homocigotos variantes para cada uno de los polimorfismos a estudiar.
3. Calcular las frecuencias genotípicas observadas de cada polimorfismo dentro de la muestra poblacional estudiada.
4. Aplicar la ecuación del equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de las frecuencias alélicas observadas y calcular las frecuencias genotípicas esperadas.
5. Contrastar, mediante análisis estadístico, las frecuencias genotípicas esperadas con las observadas y establecer si la población estudiada se apega al equilibrio de Hardy-Weinberg.

7. METODOLOGÍA

7.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo con un diseño observacional de tipo transversal o transeccional de un solo grupo.

7.1.1. Área geográfica de estudio

Zona urbana de la ciudad de Mexicali, Baja California, ubicada en la región noroeste de México.

7.1.2. Población diana

La población a estudiar comprendió a todos aquellos sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión pertenecientes a la tercera generación de nativos de la ciudad de Mexicali, B.C.

7.1.3. Población accesible

Estudiantes de educación superior de la Unidad de Ciencias de la Salud Campus Mexicali de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), médicos pasantes, médicos internos de pregrado así como personal que labora en el Instituto Mexicano del Seguro Social Clínica 31 (IMSS).

7.2. Determinación del grupo de estudio

Todos los sujetos que fueron incluidos en este trabajo cumplieron con los siguientes criterios de selección:

7.2.1. Criterios de inclusión

- Sujetos de cualquier edad
- De género indistinto
- Pertenecientes a la tercera generación nativa de Mexicali, B.C.
- Firmen consentimiento informado.
- Sujetos no consanguíneos y que en el examen clínico se aprecien sanos.

7.2.2. Criterios de exclusión

- Individuos con incapacidad de proporcionar con certeza sus datos.
- Aquellos que no deseen participar en el estudio.

7.2.3. Criterios de eliminación

- Aquellos sujetos que decidan retirarse del estudio.
- Muestra insuficiente para realizar el estudio de laboratorio.

7.3. Cálculo del tamaño de muestra

Como ya se mencionó, el presente trabajo consistió en un estudio descriptivo con variables dicotómicas. Para estimar el tamaño de la muestra en términos de una proporción, se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = Z\alpha^2 p (1 - p) / D^2$$

En donde:

N = Tamaño de muestra que se requiere.

$Z\alpha^2$ = Distancia de la media del valor de significación propuesto. Se obtiene de tablas de distribución normal y habitualmente se utiliza un valor de α de 0.05, a la cual le corresponde un valor de Z de 1.96 elevado al cuadrado.

p = Proporción de sujetos portadores de la variable de interés en la población.

$1-p$ = Complementario, sujetos que no tienen la variable de estudio q .

D = Precisión o magnitud del error que estamos dispuestos a aceptar. (Velasco Rodriguez, 2002)

Para determinar el valor de p se investigaron las prevalencias de los alelos de los PNS -C401T y C452T del gen de la GGH y el G80A del gen del RFC-1 (Tabla 4). Una vez determinadas las prevalencias, se tomó como valor de p , a la proporción mayor del alelo de menor prevalencia.

Tabla 4. Frecuencias alélicas de los polimorfismos -C401T y C452T del gen de la GGH y el A80G del gen del RFC-1.

Polimorfismo	Prevalencia	Referencia
-C401T del gen de la GGH	Alelo C 85.7%	<i>Organista-Nava, 2010</i>
	Alelo T 14.3%	
	Alelo C 69.2%	<i>HapMap</i>
	Alelo T 30.8%	
C452T del gen de la GGH	Alelo C 98.2%	<i>Organista-Nava, 2010</i>
	Alelo T 1.8%	
	Alelo C 90%	<i>Cheng, 2004</i>
	Alelo T 10%	
G80A del gen del RFC-1	Alelo A 44.6%	<i>González-Herrera, 2012</i>
	Alelo G 55.4%	
	Alelo A 44.3%	<i>Aristea Binia, 2014</i>
	Alelo G 55.7%	

En este caso tomamos el alelo T del polimorfismo -C401T del gen GGH con una frecuencia alélica del 30.8% (HapMap), que corresponde a 0.308 para el valor de p . Para un nivel de confianza del 95%, $Z\alpha = 1.96$ y $D = 0.08$. Sustituyendo en la fórmula obtenemos lo siguiente:

$$N = (1.96)^2 \cdot 0.308 \times 0.692 / 0.08^2 = 128$$

El tamaño de muestra calculado mediante esta fórmula fue de 128 individuos, se agregó un 10% más en caso de llegar a tener muestra insuficiente o se presente abandono del estudio por parte de algún participante, lo que nos da un total de 141 sujetos como muestra poblacional para el presente trabajo.

7.4. Selección de la muestra

7.4.1. Tipo de muestreo

Se utilizó un muestreo no probabilístico por casos consecutivos. Se seleccionaron a aquellos individuos que cumplieron los criterios de selección hasta alcanzar el tamaño de muestra, más un 10% en caso de pérdidas por cualquier causa.

7.4.2. Determinación de sujetos clínicamente sanos

A los sujetos se les realizó historia clínica y exploración física. Se excluyeron aquellos pacientes con enfermedades crónico-degenerativas.

7.5. Operacionalización de las variables

Variable dependiente: Equilibrio de Hardy-Weinberg.

- Definición Conceptual:
La ley o equilibrio de Hardy-Weinberg establece que en una población de ciertas características ideales (suficientemente grande, con apareamientos al azar y carente de mutación, selección o migración) las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra.
- Definición Operacional:
Modelo matemático para estimar las frecuencias génicas y genotípicas en una población $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, que representan los tres posibles genotipos AA (p^2), Aa (pq) y aa (q^2).
- Tipo de Variable:
Cualitativa.
- Escala de Medición:
Nominal.
- Grado de Medición:
Si está en equilibrio o no.
- Reactivos-Indicador:
Identificación de frecuencias alélicas y genotipos en la población mediante métodos de biología molecular.
- Instrumentos:
Hoja de Excel.
- Técnicas Estadísticas:
Prueba de Chi-cuadrada.

Variables independientes: Polimorfismos -C401T y C452T del gen de la GGH y el A80G del gen del RFC-1.

- Definición Conceptual:
Un polimorfismo de un solo nucleótido es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base nitrogenada, la cual debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como polimorfismo.
- Definición Operacional:
Identificación de alelos y genotipos a partir de la identificación de polimorfismos de un sólo nucleótido.
- Tipo de Variable:
Cualitativa.
- Escala de Medición:
Nominal.
- Grado de Medición:
Policotómica (homocigoto silvestre, heterocigoto, homocigoto variante).
- Reactivos-Indicador:
Identificación de polimorfismos de un sólo nucleótido mediante técnicas de biología molecular.
- Instrumentos:
Hoja de Excel.
- Técnicas Estadísticas:
Prueba de Chi-cuadrada.

7.6. Métodos para la genotipificación de los polimorfismos.

7.6.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de leucocitos de sangre total de los sujetos seleccionados, para lo cual se les tomó una muestra de sangre que se colocó en tubos con EDTA. La extracción del ADN se realizó mediante dos métodos:

1. Mediante el estuche comercial "*Wizard Genomic DNA Purification kit*" (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante.
2. A través del método de Miller modificado o de precipitación salina que se describe en los anexos de este documento (Bartlett y White, 2003).

La concentración necesaria para realizar una reacción de PCR es de 10 a 200 ng/ μ L. La pureza del ADN se estimó a través de la relación de absorbancias medidas a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) la cual se determinó mediante un espectrofotómetro nanodrop 1000 Thermo Scientific. Si la determinación arroja un valor cercano a 1.8 es aceptada como ADN de buena pureza, ya que proporciones menores nos indican presencia de proteínas; por otro lado, una relación mayor de 2 sugiere contaminación por fenoles. Además de conocer la cantidad y calidad del ADN extraído se valoró la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está íntegro se observa una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó, y si está fragmentado se observa un barrido o sendero luminoso a lo largo del carril. Los viales donde se colocó el ADN extraído fueron etiquetados y almacenados a -20°C .

7.6.2. Identificación del PNS G80A del gen RFC-1

El polimorfismo G80A del transportador de folato reducido (RFC-1) se analizó mediante la amplificación de un fragmento de 230 pb del gen de dicho transportador obtenido mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa, la digestión del producto de la amplificación con la enzima de restricción Cfo I y la visualización por electroforesis de los fragmentos de restricción polimórfica (PCR-FRLP) generados (Coppede, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con 30 ng de ADN genómico, mediante el estuche comercial Go Taq PCR systems marca Promega, con un volumen final de reacción de 25 μ L conteniendo amortiguador para PCR 1X, 4 pmol de cada oligonucleótido [forward: 5'-AG CGT CAC CTT CGT CCC-3' and reverse: 5'-TCC CGC GTG AAG TTC TTG-3'], 0.15 mM de cada dNTP, 1.25 mM de MgCl_2 y 0.5 U de Taq DNA polimerasa. Se utilizó agua Mili-Q como control negativo. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial (95°C , 5 min), 40 ciclos de desnaturalización (95°C , 30 s), hibridación (62°C , 45 s), y elongación (72°C , 45 s), seguidos de una extensión final (72°C , 10 min). Se utilizó un termociclador Gene Amp PCR system 2400 marca Perkin Elmer. Se verificó la amplificación mediante electroforesis en agarosa al 2%. Una alícuota de 10 μ L del producto de cada amplificación se sometió a digestión enzimática con 10 U de Cfo I (Promega) y se incubó en baño María a una

temperatura de 37°C por 3 horas. Posteriormente y para visualizar los fragmentos obtenidos de cada digestión se realizó electroforesis en agarosa al 4%, con tinción de Bromuro de Etidio y lectura en fotodocumentador Modelo Universal Hood II marca Bio-Rad. Los individuos portadores del genotipo GG presentan 3 fragmentos de restricción (125, 68 y 37 pb) al digerir el ADN amplificado con la enzima Cfo I, mientras que los individuos con el genotipo AA presentan sólo 2 fragmentos (162 y 68 pb), como resultado de la sustitución de la guanina por la adenina en la posición 80 del gen RFC-1; y los individuos que portan el genotipo GA presentan 4 fragmentos de restricción (162, 125, 68 y 37 pb) (Chango, 2000).

7.6.3. Identificación de los PNS -C401T y C452T del gen GGH

La presencia del polimorfismo -C401T se investigó mediante la PCR-FRLP reportada por Dervieux (2004), con modificaciones menores. El ADN genómico (30 ng) se amplificó en amortiguador para PCR 1X conteniendo 200 µM de cada dNTP, 25 ng de cada iniciador [forward: 5'-CG CTG CCT GGT TAC CAA ACT-3' y reverse: 5'-TGT TTA CGT CGA TGT GGA CTT CAG-3'], 0.5 U de Taq DNA polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂, en un volumen final de 25 µL. Se utilizó agua Mili-Q como control negativo. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de desnaturalización de 15 s a 94 °C, hibridación a 60 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto amplificado (109 pb) se sometió a una digestión a 55 °C utilizando 2.5 U de Bsl I. El producto de la digestión se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 4% (Sambrook, 2001). Los individuos portadores del genotipo CC presentan dos fragmentos (61 y 48 pb), los individuos portadores del genotipo heterocigoto CT presentan tres fragmentos (109, 61 y 48 pb), y aquellos que porten el genotipo TT presentan un fragmento (109 pb) (Dervieux, 2004).

El polimorfismo C452T se investigó mediante la PCR-FRLP reportada por Chave (2003), con modificaciones menores. El ADN genómico (100 ng) se amplificó en amortiguador para PCR 1X conteniendo 200 µM de cada dNTP, 25 ng de cada iniciador [forward: 5'-GT GCC TAT TTG GTT ATG ACA-3' y reverse: 5'-CT ACT

TAC TAA TCC TGC CCA-3'], 0.5 U de Taq DNA polimerasa y 1.5 mM de MgCl₂, en un volumen final de 25 µL. Se utilizó agua Mili-Q como control negativo. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de desnaturalización de 15 s a 94 °C, hibridación de 45 s a 55 °C y elongación de 45 s a 72 °C; seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto amplificado (286 pb) se sometió a digestión con 2.5 U de Ase I. Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (Ausubel, 1994-2000). Los individuos portadores del genotipo CC presentan una banda de 286 pb, los individuos portadores del genotipo heterocigoto CT presentan tres fragmentos (286, 177 y 109 pb) y aquellos que porten el genotipo TT presentan dos fragmentos (177 y 109 pb) (Organista-Nava, 2010).

7.7. Análisis estadístico.

Se calcularon las frecuencias genotípicas observadas para cada uno de los polimorfismos de interés en la población de estudio. Con la aplicación de la ecuación de la Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg $[(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1]$, donde p^2 es la fracción de homocigóticos dominantes (AA), $2pq$ corresponde a la fracción de los heterocigóticos (Aa) y q^2 representa la fracción de los homocigóticos recesivos (aa)] se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas. Se compararon las frecuencias observadas y las esperadas mediante la prueba chi cuadrado (X^2), para determinar si las frecuencias observadas se desviaron en forma significativa ($p < 0.05$) de las frecuencias esperadas.

7.8. Aspectos éticos, normativos y de seguridad

El presente estudio se realizó de conformidad con los principios éticos emanados de la décimo octava Asamblea Médica Mundial de Helsinki y sus respectivas modificaciones; así como en apego a las disposiciones legales de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos y las Normas Oficiales Mexicanas NOM-012-SSA3-2012 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002, en materia de ejecución de proyectos de investigación para la salud en humanos y en materia de protección al ambiente, respectivamente.

Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, se obtuvo el consentimiento bajo información por escrito de cada participante en el estudio. Se explicó a cada participante las características de la investigación, su objetivo, los procedimientos que se realizarían, la duración del mismo, así como los riesgos potenciales y beneficios esperados. Se indicó claramente a cada participante que su inclusión en el estudio era totalmente voluntaria, por lo que no se realizó pago alguno como compensación por su participación, y que de considerarlo conveniente o necesario podría abandonarlo en el momento que lo deseara.

Los participantes en el estudio fueron identificados únicamente mediante un número de folio en la base de datos que se generó. Los expedientes que se elaboraron a partir de esta investigación y los resultados de laboratorio estuvieron disponibles sólo para los investigadores principales y, con las restricciones de ley, para los participantes. Dichos expedientes se mantendrán en custodia en el lugar donde se desarrolló la investigación hasta por 5 años contados a partir de la finalización del estudio.

8. RESULTADOS

8.1. Características demográficas

De un total de 141 sujetos clínicamente sanos y que cumplieron con los criterios de selección, 60 fueron hombres y 81 mujeres. La mediana de la edad fue de 19 años, la media de 21 ± 3.72 años y el rango de 18 a 37 años. Toda la muestra fue reclutada en un periodo de 2 meses que comprendió del 31 de agosto al 30 de octubre de 2016. En la Tabla 5 se muestran las características generales de la población estudiada.

Tabla 5. Características generales de la población clínicamente sana incluida en el presente trabajo.

Variable	Individuos n= 141
Género	
Masculino	60 (42.6%)
Femenino	81 (57.4%)
Edad (años)	21 ± 3.72
Frecuencia cardiaca (latidos por minuto)	74 ± 11.27
Frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)	17 ± 2.6
Tensión arterial sistólica (mmHg)	114 ± 15.08
Tensión arterial diastólica (mmHg)	72 ± 8.36
Temperatura (°C)	36 ± 0.6
Peso (kg)	73 ± 18.75
Talla (m)	1.68 ± 0.09
IMC (kg/m ²)	25.54 ± 5.37

Los datos presentados en la tabla corresponden a la media $\pm$ desviación estándar, excepto para el género.

A los 141 sujetos se les tomó una muestra de 3 mL de sangre venosa para la extracción de ADN. Un total de 131 muestras fueron extraídas mediante el uso de estuche comercial (Wizard Genomic DNA Purification kit marca Promega) y 10 con el método manual de Miller modificado, éstas últimas muestras estaban congeladas y la concentración de ADN que se obtuvo mediante los reactivos comerciales fue

insuficiente, sin embargo con el método manual se recuperó una cantidad óptima de ADN con una pureza adecuada.

Se evaluó la pureza del ADN extraído mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), considerando una relación óptima de absorbancias a 260/280 nm entre 1.80 y 2.0 (Figura 10). Se valoró la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 11). La concentración de ADN de los 141 sujetos osciló entre 10 y 146 ng/μL en las extracciones con estuche comercial y de 169 a 275 ng/μL en las extracciones con el método manual. Esta diferencia es debida a los volúmenes que se utilizan de sangre total en cada método.

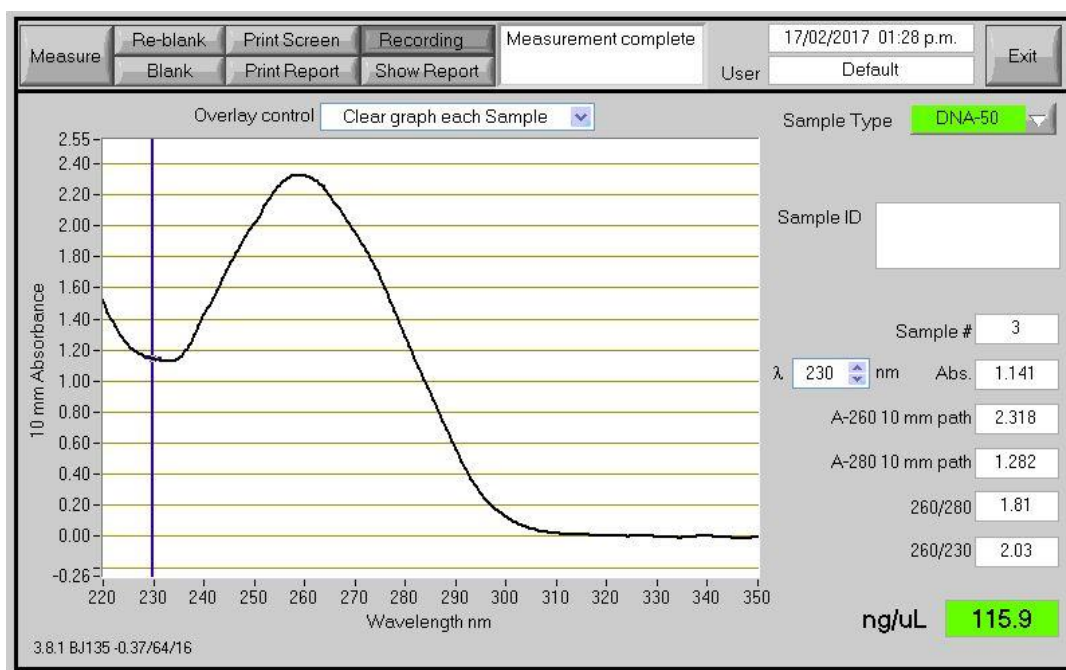


Figura 10. Gráfica que muestra la lectura de concentración y la relación 260/280 nm (pureza) por medio de nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) de una muestra de ADN extraída por estuche comercial (Wizard, Promega).

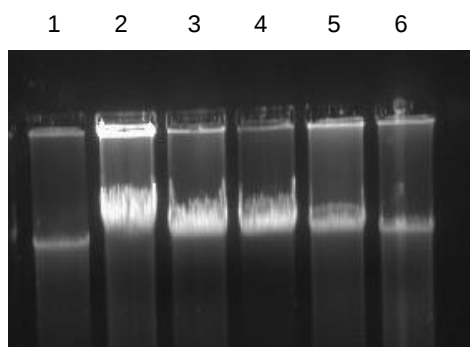


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN genómico extraído de leucocitos totales. Se observa la integridad del ADN. Los carriles 1 al 6 corresponden a muestras de diferentes concentraciones de ADN (35, 113, 73, 63, 44 y 30 ng/μL respectivamente)

8.2. Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS G80A del gen RFC-1.

Las 141 muestras de ADN de los sujetos de estudio mostraron una amplificación de una banda de 230 pb correspondientes al gen de RFC-1 (Figura 12).

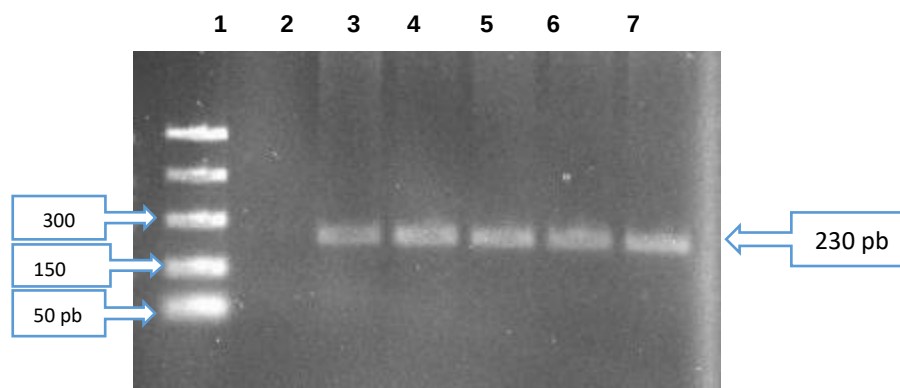


Figura 12. Producto de la amplificación del gen RFC-1 para el PNS G80A. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en el que se observan bandas de 230 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: control negativo (agua Mili-Q), carril 3: control positivo (ADN genómico utilizado para estandarización), carriles 4 al 7: amplificaciones de sujetos incluidos en el estudio.

El genotipo más frecuente del PNS G80A del gen RFC-1 en la población estudiada fue el heterocigoto GA con un total de 73 sujetos (51.8%), 43 (30.5%) presentaron el genotipo homocigoto silvestre GG y 25 (17.7%) sujetos correspondieron a

homocigotos variantes AA. Las figuras 13, 14 y 15 muestran los fragmentos de restricción correspondientes a cada uno de los genotipos identificados.

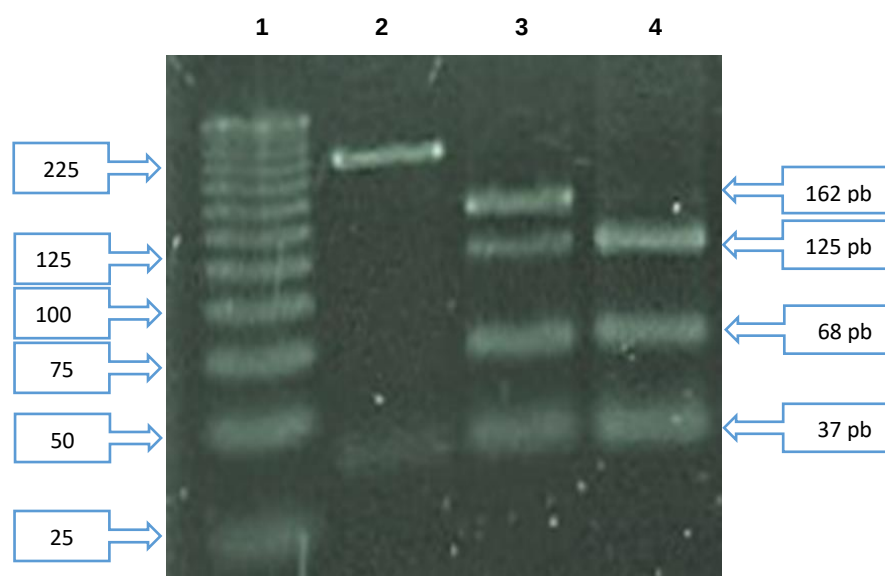


Figura 13. Digestión enzimática con Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1. Electroforesis en gel de agarosa al 4% que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular y en el carril 2 el producto de la amplificación, carril 3 genotipo heterocigoto GA y en el carril 4 el genotipo GG.

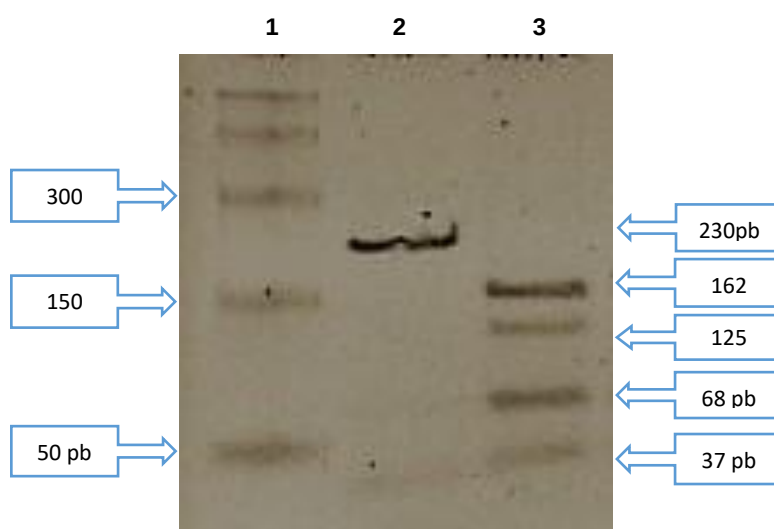


Figura 14. Digestión enzimática con enzima Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1. Electroforesis en gel de agarosa al 4% del genotipo heterocigoto GA, se observan 4 fragmentos de restricción: 162, 125, 68 y 37 pb (carril 3), En el carril 2 se observa una banda de 230 pb correspondiente al producto de la amplificación sin digerir.

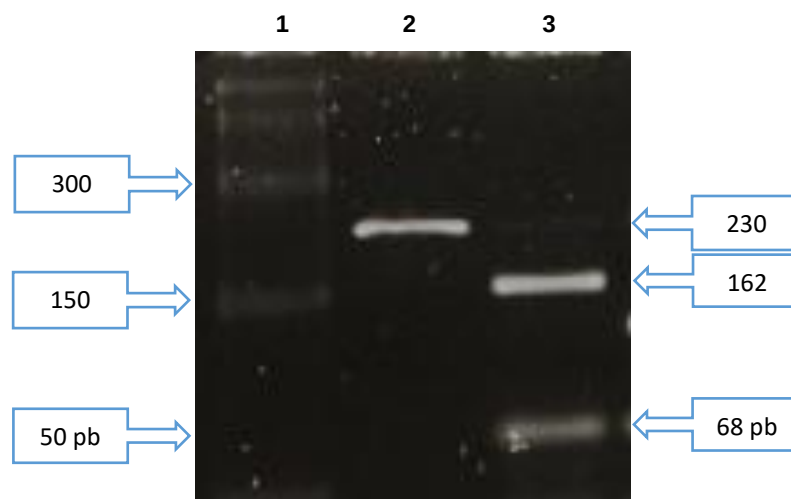


Figura 15. Digestión enzimática con Cfo I del PNS G80A del gen RFC-1. Electroforesis en gel de agarosa al 4% se observan 2 fragmentos de restricción: 162 y 68 pb (carril 3), que corresponden al genotipo homocigoto AA. En el carril 2 se observa una banda de 230 pb correspondiente al producto de la amplificación sin digerir.

Las frecuencias genotípicas del PNS G80A del gen RFC-1 se encontraron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg ($p=0.53$). La frecuencia observada del alelo G fue de 56.38% y del alelo A 43.62%. A partir de estas frecuencias se aplicó la ecuación del equilibrio de Hardy Weinberg para calcular las frecuencias genotípicas esperadas y se construyó una tabla de contingencia (Tabla 6).

Tabla 6. Se muestran los genotipos observados y esperados en la población de estudio para el PNS G80A del gen RFC-1.

Genotipos	GG	GA	AA	Total
Observados	43	73	25	141
Esperados	44.68	69.37	26.91	141
Total	87.68	142.37	51.91	282

Mediante la prueba no paramétrica chi cuadrada (χ^2) se compararon las frecuencias genotípicas observadas y esperadas:

$$\chi^2 = \left\{ \frac{(43-44.68)^2}{44.68} + \frac{(73-69.37)^2}{69.37} + \frac{(25-26.91)^2}{26.91} \right\} = 0.388$$

La Chi-cuadrada tabulada con un intervalo de confianza del 95% o 0.05 de nivel de significancia a un grado de libertad tiene un valor de 3.84 y la Chi-cuadrada

calculada fue de 0.388, resultando ser menor que la tabulada por lo que se concluye que no hay diferencia entre las muestras observadas y esperadas, por lo que este polimorfismo se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg con un valor de $p=0.53$, obtenido con la función de Excel CHI DIST RF (0.388,1). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7, y en la Figura 16 se observa la distribución de las frecuencias genotípicas del PNS G80A del gen RFC-1 en la población estudiada.

Tabla 7. Distribución de genotipos y frecuencia alélica del polimorfismo G80A del RFC-1 en la población estudiada.

Población (n)	GG	GA	AA	Alelo G	Alelo A	Valor p	EHW
141	43 (30.5%)	73 (51.8%)	25 (17.7%)	159 (56.4%)	123 (43.6%)	0.53	0.388

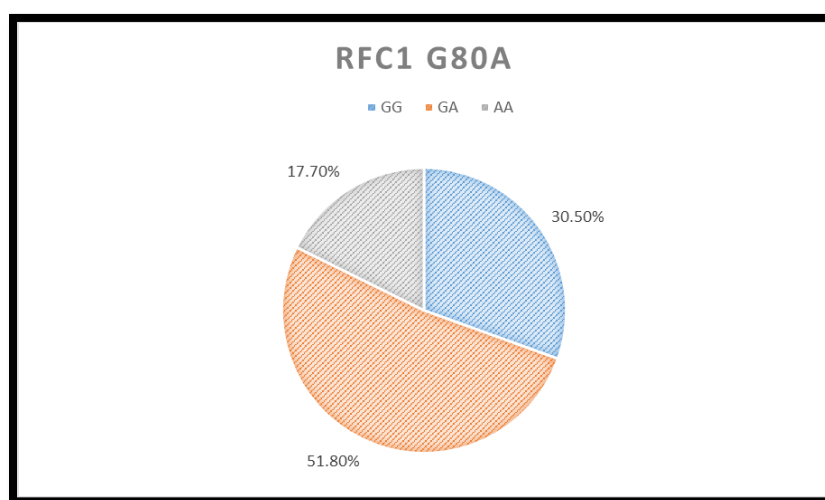


Figura 16. Distribución de la frecuencia genotípica del PNS G80A del gen RFC-1 en la población estudiada.

8.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS -C401T del gen de la GGH.

Las muestras de ADN de los 141 individuos sanos mostraron productos de amplificación de 109 pares de bases (pb) para el PNS –C401T de la GGH (Figura 17).

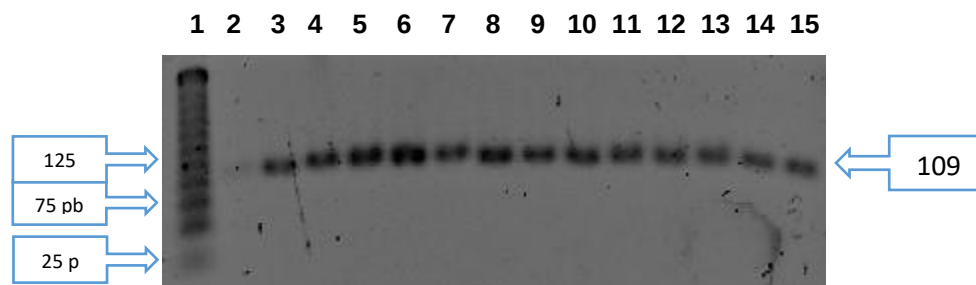


Figura 17. Producto de amplificación del gen GGH para el PNS –C401T. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra fragmentos de 109 pb. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo; carriles 4 al 15: sujetos de estudio.

El genotipo más frecuente del polimorfismo –C401T de la GGH en la muestra de sujetos fue el homocigoto silvestre CC, que se presentó en 85 sujetos de la población estudiada (60.3%), el genotipo heterocigoto CT se observó en 44 sujetos (31.2%) y el homocigoto variante TT en 12 (8.5%) (Figuras 18 y 19).

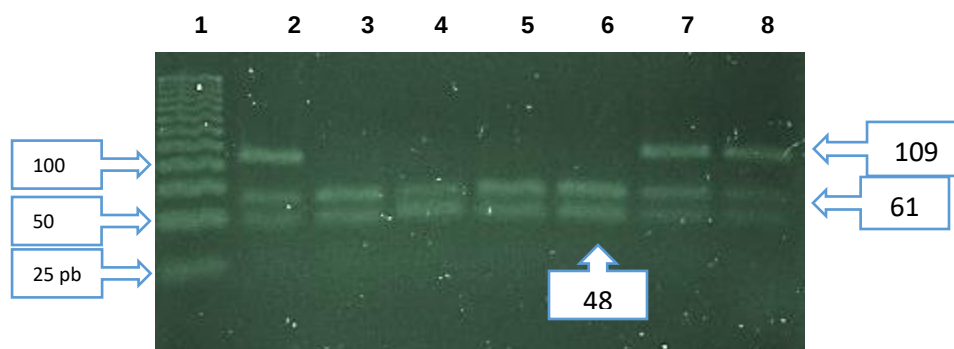


Figura 18. Digestión enzimática del PNS –C401T del gen GGH con enzima Bst I. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de siete sujetos (carriles 2 al 8). Se observa un genotipo heterocigoto CT en los carriles 2, 7 y 8; genotipo homocigoto silvestre (CC) en los carriles 3, 4, 5 y 6. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular.

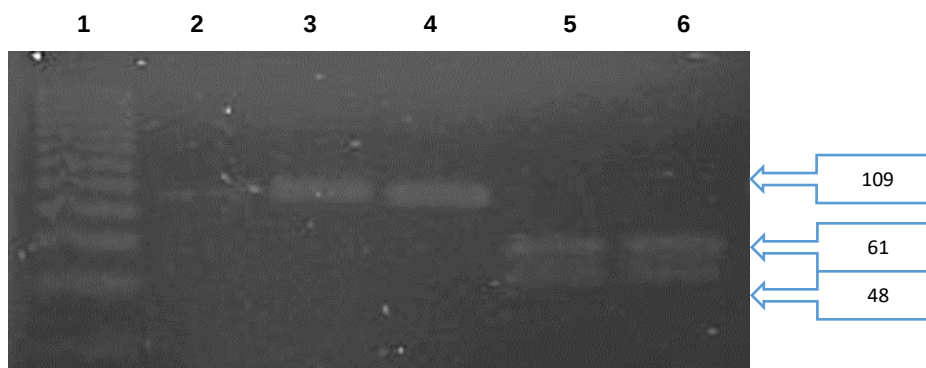


Figura 19. Digestión enzimática del gen GGH para el PNS –C401T con Bsl I. Electroforesis en gel de agarosa al 4%. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular. Los carriles 3 y 4 corresponden a sujetos con genotipo homocigoto variante TT, y los carriles 5 y 6 con genotipo homocigoto silvestre CC.

El alelo C fue observado en 107 individuos (75.9%) y el alelo T en 34 (24.1%) de los 141 sujetos. Con estas frecuencias alélicas se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas y se construyó un cuadro de contingencia (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el PNS –C401T del gen de la GGH.

Genotipos	CC	CT	TT	Total
Observados	85	44	12	141
Esperados	80.93	51.6	8.2	141
Total	165.93	95.6	20.2	282

Mediante la prueba de Chi-Cuadrada se compararon las frecuencias genotípicas esperadas y observadas:

$$\chi^2 = \left\{ \frac{(85-80.93)^2}{80.93} + \frac{(44-51.6)^2}{51.6} + \frac{(12-8.2)^2}{8.2} \right\} = 3.07$$

Se obtuvo un valor de 3.07 el cual es menor a la Chi-cuadrada tabulada a un grado de libertad, misma que correspondió a 3.84, por lo que se concluye que la distribución del PNS –C401T del gen de la GGH es compatible con el equilibrio de

Hardy-Weinberg con un valor de $p=0.08$, obtenido con la función de Excel CHI DIST RT (3.07, 1) (Tabla 9).

8.4 Frecuencias genotípicas y alélicas del PNS C452T del gen GGH.

Se realizó la amplificación del gen de la GGH para la búsqueda del polimorfismo C452T con 100 ng de ADN genómico en los 141 sujetos involucrados en el estudio. El producto de la amplificación fue una molécula de 286 pb como se puede observar en la figura 20.

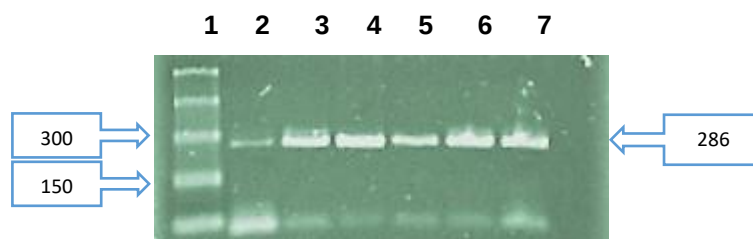


Figura 20. Producto de la amplificación del gen GGH para el PNS C452T. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra en los carriles 2 al 7, bandas de 286 pb. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular.

La distribución del polimorfismo C452T de la GGH en la población estudiada fue la siguiente: el genotipo homocigoto silvestre CC se observó en 131 sujetos (92.9%), el genotipo heterocigoto CT en 10 (7.1%), mientras que el genotipo homocigoto variante TT no se observó en ningún sujeto (Figura 21).

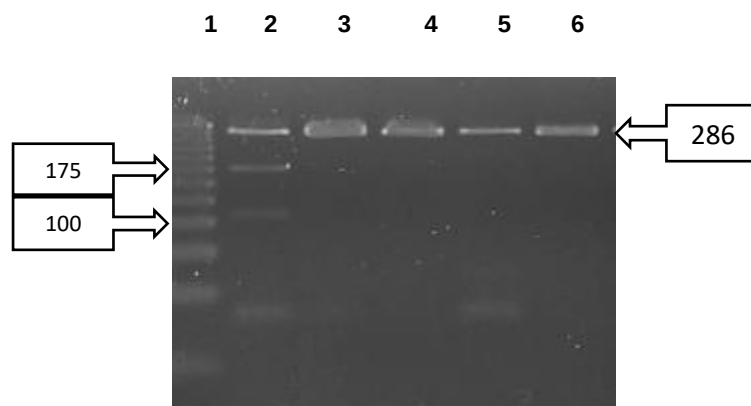


Figura 21. Digestión enzimática del gen GGH para el PNS C452T con enzima Ase I. Electroforesis en gel de agarosa al 4% que muestra en el carril 1 el marcador de PM, el carril 2 corresponde al genotipo heterocigoto CT (fragmentos de restricción de 286, 177 y 109 pb), y los carriles 3, 4, 5 y 6 al genotipo homocigoto silvestre CC (banda de 286 pb).

Las frecuencias genotípicas del PNS C452T del gen de la GGH en la población estudiada se encontraron en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg ($p=0.45$). El alelo C se observó en 136 individuos (96.5%) y el alelo T en 5 sujetos (3.5%). A partir de estas frecuencias alélicas y de acuerdo con la ecuación de Hardy-Weinberg se calcularon las frecuencias genotípicas esperadas y se elaboró la Tabla 8.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas observadas y esperadas para el PNS C452T del gen de la GGH en la población de estudio.

Genotipos	CC	CT	TT	Total
Observados	131	10	0	141
Esperados	132.6	8.2	0.12	141
Total	263.6	18.2	0.12	282

Mediante la prueba Chi-cuadrada se compararon las frecuencias genotípicas esperadas y observadas:

$$\chi^2 = \left\{ \frac{(131-132.6)^2}{132.6} + \frac{(10-8.2)^2}{8.2} + \frac{(0-0.12)^2}{0.12} \right\} = 0.5151$$

La Chi-cuadrada tabulada con un nivel de significancia de 0.05 y a un grado de libertad es de 3.84, como el valor de Chi-cuadrada calculado es menor, se acepta que la distribución de este polimorfismo es compatible con el equilibrio de Hardy-

Weinberg con un valor $p=0.47$, obtenido con la función de Excel CHI DIST RT (0.51, 1). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9 y la distribución genotípica de los PNS –C401T y C452T del gen de la GGH en la población estudiada se resumen en las Figuras 22 y 23.

Tabla 9. Distribución de genotipos y frecuencia alélica de los polimorfismos –C401T y C452T de la GGH en adultos sanos. Se muestran el valor p y el valor del EHW obtenido por Chi-cuadrada.

Población (n= 141)	CC	CT	TT	Alelo C	Alelo T	Valor p	EHW
-C401T	85 (60.3%)	44 (31.2%)	12 (8.5%)	214 (75.9%)	68 (24.1%)	0.08	3.07
C452T	131 (92.9%)	10 (7.1%)	0 (0.0%)	272 (96.5%)	10 (3.5%)	0.47	0.51

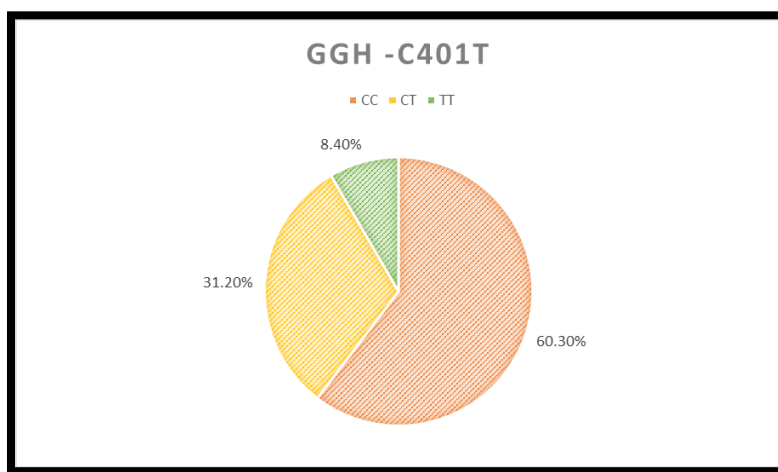


Figura 22. Distribución genotípica del PNS –C401T del gen GGH en la población de estudio.

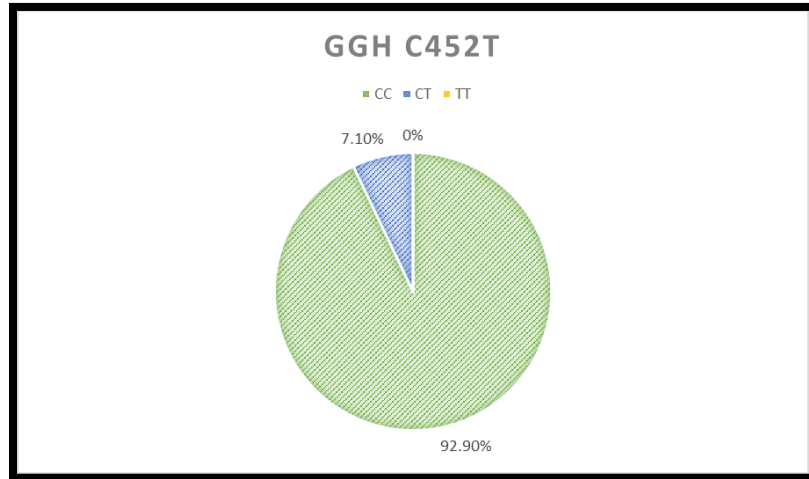


Figura 23. Distribución genotípica del PNS C452T del gen de la GGH en la población de estudio.

8.5. Secuenciación

Para corroborar la genotipificación se enviaron los productos de amplificación de tres sujetos con genotipos heterocigotos para los PNS G80A del gen del RFC-1, y el -C401T y C452T del gen de la GGH, para su secuenciación (estándar de oro).

En el caso del sujeto heterocigoto para el PNS G80A del gen del RFC-1 se observó un cambio de G por A en el amplificado que corrobora la presencia de este PNS en el sujeto de estudio (Figura 24).

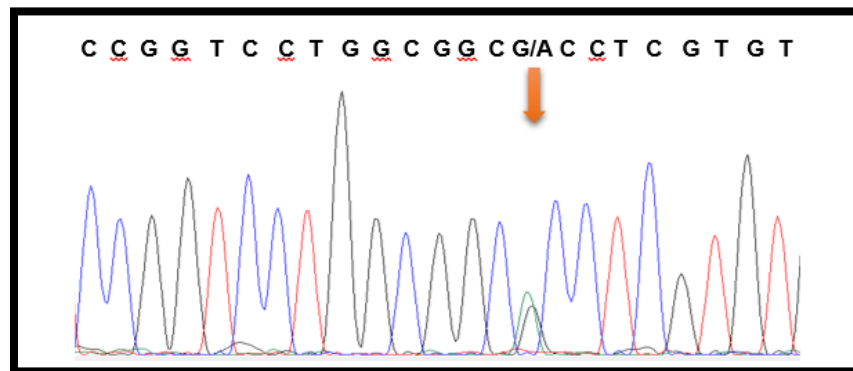


Figura 24. Cromatograma de la secuenciación del producto de PCR de un sujeto de estudio con genotipo heterocigoto para el PNS G80A del gen RFC-1. Se muestra el sitio del cambio de base (G/A).

La secuenciación del producto de la amplificación del PNS –C401T del gen de la GGH no confirmó la presencia del polimorfismo en el sujeto de estudio con genotipo CT. La secuencia inicia en forma correcta pero al llegar a los 80 pb se observan dos secuencias superpuestas, también se observa la presencia de picos saturados y fuera de escala en el cromatograma. Las causas pueden ser contaminación del ADN, la presencia de dímeros o por degradación del cebador (Figura 25).

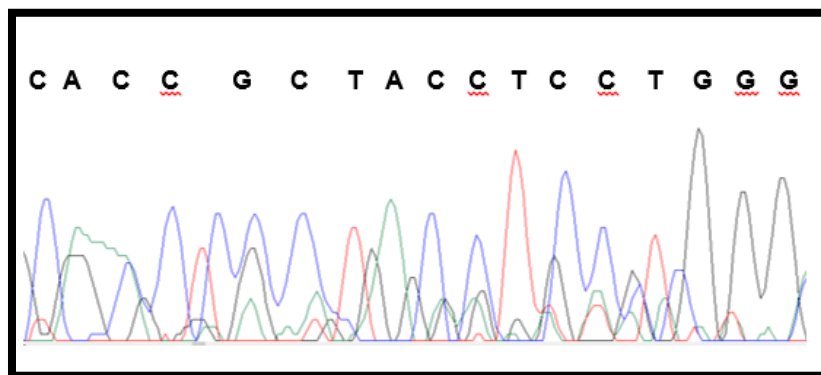


Figura 25. Cromatograma de la secuenciación del amplificado del PNS –C401T del gen de la GGH de un sujeto de estudio con genotipo CT. No se logra corroborar el PNS por una posible contaminación del ADN, la presencia de dímeros y/o la degradación del cebador.

La secuenciación del PNS C452T del gen de la GGH nos confirma la presencia del polimorfismo en un sujeto de estudio con genotipo CT (Figura 26).

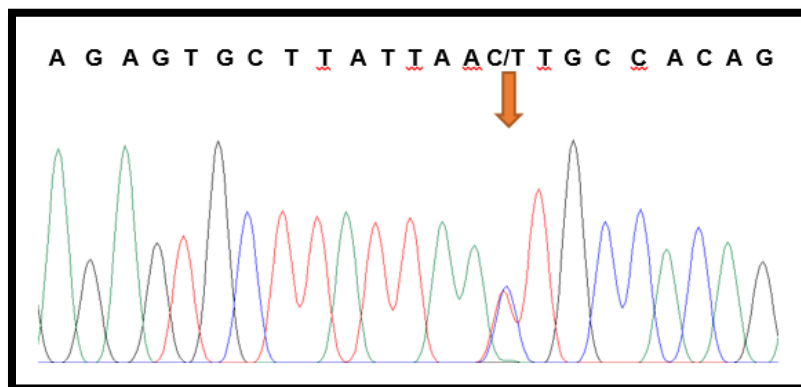


Figura 26. Cromatograma de la secuenciación del amplificado del PNS C452T del gen de la GGH de un sujeto con genotipo CT. Se muestra el sitio del polimorfismo.

9. DISCUSIÓN

El principal obstáculo para el desarrollo de fármacos y el uso de éstos en el tratamiento de enfermedades específicas es la presencia de reacciones adversas, debido a que cada individuo responde en forma distinta al mismo fármaco. Existen reportes de que solo un 30 a 60% de los individuos con la misma enfermedad responden al fármaco en forma eficaz y que de este grupo de pacientes muchos presentan reacciones adversas que los obligan a interrumpir el tratamiento (Chaudhary, 2015). La variabilidad interindividual en la respuesta está dada principalmente por factores genéticos, tales como los polimorfismos de nucleótido simple, y por factores no genéticos, como la edad, el género, hábitos higiénico-dietéticos, peso e interacciones con otros fármacos. El metotrexato (MTX) es un antimetabolito del ácido fólico que se usa en el tratamiento de malignidades hematológicas como leucemia linfoblástica aguda (LLA), en tumores sólidos y en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide (AR) y psoriasis, se estima que entre un 20 y 55% de los pacientes con AR y LLA no responden al tratamiento con MTX. En este contexto, los estudios de farmacogenética nos permiten estudiar el impacto de los PNS en genes de moléculas transportadoras y enzimas en el metabolismo y función de los folatos, así como la eficacia y desarrollo de reacciones adversas por el uso de MTX (Gervasini, 2009). El conocer la presencia de estos PNS en los pacientes candidatos a utilizar el MTX nos conduce a la individualización del tratamiento para minimizar o evitar efectos tóxicos y falta de respuesta farmacológica.

El gen del RFC-1, localizado en el cromosoma 21, involucrado con el transporte intracelular del MTX, presenta varios PNS, el que se estudió es el G80A (rs1051266) localizado en el exón 2. Es un polimorfismo no sinónimo que cambia el aminoácido Arg 27 por His en la secuencia proteica, provocando una disminución de la afinidad del transportador por su metabolito (Whetstine, 2001) y afectando la actividad transcripcional del gen del RFC-1 (Dervieux, 2004). En nuestra población de estudio la frecuencia genotípica y alélica de este polimorfismo fue consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 10). Encontramos que la frecuencia del alelo A

(variante) fue de 0.436, mientras que las frecuencias genotípicas para el genotipo GG fueron de 30.5%, GA 51.8% y AA 17.7%. En un estudio de 184 sujetos sanos llevado a cabo en Sonora, México, la frecuencia del alelo A fue de 0.44 y las frecuencias genotípicas encontradas fueron de GG=0.32, GA=0.47 y AA=0.21 (Aristea, 2014), como se puede observar la frecuencia del alelo variante es muy similar a la encontrada en nuestra población; en cuanto a la distribución de las frecuencias genotípicas, nuestra población presenta mayor cantidad de heterocigotos, 0.47 en Sonora y 0.518 en nuestro estudio. En otro estudio realizado a 195 sujetos sanos de Yucatán, México, la frecuencia del alelo A fue de 0.45, similar a la encontrada en nuestro estudio y las frecuencias genotípicas, también similares a las nuestras, fueron GG= 0.28, GA= 0.53 y AA= 0.18 (González-Herrera, 2012). En otro estudio llevado a cabo en población uruguaya de 55 sujetos sanos se encontró una frecuencia del alelo A de 0.50 y una frecuencia genotípica del GG=26.8, GA=46.4 y AA=26.8 (Giletti, 2017), comparado con nuestro estudio la frecuencia del alelo variante es mayor y la distribución genotípica es distinta probablemente por pertenecer a diferentes etnias, ya que nuestra población es una mezcla de europeos (61%), amerindios (35%) y africanos (3.5%) (Moreno-Estrada, 2014), mientras que en Uruguay encontramos la misma mezcla pero en porcentajes desiguales: europeos 84.1%, amerindios 10.4% y africanos 5.6% (Giletti, 2017). En relación con otras etnias como los caucásicos la frecuencia del alelo variante es de 0.55, en africanos es 0.32, en asiáticos 0.50 y en japoneses de 0.43 (Hashigushi, 2016). En resumen, la frecuencia del alelo A en nuestra población de estudio es menor que en los caucásicos y asiáticos, en los africanos es más frecuente el alelo silvestre y la frecuencia del alelo variante de nuestra población es muy similar a los japoneses.

El PNS C452T localizado en el exón 5 del gen de la GGH, el cual se ubica en el cromosoma 8, es un polimorfismo no sinónimo debido a que involucra el cambio del aminoácido Thr por Ile, lo que resulta en una disminución de la actividad catalítica de la GGH (Cheng, 2004). En el presente trabajo se determinó la distribución genotípica y la frecuencia alélica del PNS C452T en 141 individuos sanos y nativos de Mexicali, B.C. Como se muestra en la Tabla 9 de la sección de resultados, la

distribución de genotipos de este polimorfismo mostró apego al equilibrio de Hardy-Weinberg. El porcentaje de genotipos fue el siguiente 92.9% para CC (131) CT, 7.1% para CT (10) y 0% para TT (0). La frecuencia del alelo C fue de 0.965 y del alelo T 0.035. La distribución de genotipos y la frecuencia alélica de los bajacalifornianos fue comparada con la obtenida en poblaciones mexicanas en otros estados como Guerrero (Organista-Nava, 2010). En este estudio llevado a cabo en 140 niños sanos se encontró la siguiente distribución genotípica del PNS C452T siguiente: CC=135(96.4%), CT=5 (3.6%) y TT=0 (0%), la frecuencia del alelo C fue de 0.982 y del alelo T de 0.018. La distribución alélica en ambas poblaciones tiene similitud y la distribución genotípica no es exactamente igual posiblemente por la influencia de la mezcla racial ya que la población mestiza de la parte norte del país tiene un mayor componente europeo comparado con la región del sureste y centro del país (INMEGEN, 2014) además en Guerrero existe un componente africano del 22% y en la región norte del país éste constituye el 3.6% (Moreno-Estrada, 2014). En lo que se refiere a otras etnias, y en cuanto al PNS C452T del gen GGH en un estudio realizado en 299 japoneses sanos se reportó una frecuencia de 0.91 y 0.09 de los alelos C y T respectivamente, mientras que las frecuencias genotípicas fueron 83.3% para CC, 15.7% para CT y 1% para TT (Hashigushi, 2016); en este mismo estudio reportan las frecuencias alélicas y genotípicas de otras etnias como asiáticos, caucásicos y africanos (Tabla 10) y se observa que tanto las frecuencias genotípicas como alélicas son distintas a la de nuestro estudio ya que el alelo T o variante es más frecuente en ellas, lo cual puede deberse a que el 65% de la carga genética de la población mexicana no se comparte con ninguna otra población, según datos del INMEGEN.

El PNS –C401T del gen de la GGH se localiza en la región promotora, en el cromosoma 8, se asocia con mayor actividad promotora del gen de la GGH y con una disminución de la poliglutamación de los antifolatos en los portadores del genotipo TT (Dervieux, 2004). Por otro lado, las frecuencias genotípicas del PNS –C401T de la GGH en los 141 nativos sanos de Mexicali, B.C., fueron CC=60.3%, CT=31.2% y TT=8.5%, y sus frecuencias alélicas resultaron de 0.759 y 0.241 para los alelos C y T respectivamente. Nuestros resultados se compararon con las

frecuencias genotípicas y alélicas del estudio realizado en Guerrero (Organista-Nava, 2010) en 140 niños sanos (Tabla 10) encontrándose una mayor proporción del alelo salvaje en dicha población y una distribución de genotipos distinta a la encontrada en nuestro estudio, lo que puede deberse a la diferencia de componente europeo y africano en ambas poblaciones mestizas. Guerrero es un estado del sur del país con mayor influencia africana que Baja California, además el componente europeo es mayor en los estados del norte que en los estados del centro y sur del país (Moreno-Estrada, 2014). Al comparar nuestros resultados con otras poblaciones como japoneses, asiáticos, caucásicos y africanos (Tabla 10) observamos también diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas por la mezcla genética que poseemos los mexicanos muy distinta al resto de las poblaciones.

El RFC-1 y la enzima GGH son importantes en el transporte y metabolismo de los folatos y antifolatos como el MTX. El PNS G80A del gen RFC-1 afecta su transporte intracelular, el alelo con la variante A se asocia a una mejor respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR, mientras que el genotipo GG es asociado con un aumento del riesgo de toxicidad por MTX (Muralidharan, 2015). En contraste, en un estudio realizado en México en pacientes con LLA, el PNS G80A fue asociado a un pobre pronóstico de la enfermedad (Candelaria, 2016). Sin embargo en varios meta-análisis realizados se encontraron discrepancias en cuanto a la asociación del PNS G80A con toxicidad y pronóstico y concluyen que no es un buen biomarcador de toxicidad relacionada al MTX en pacientes con LLA (Hai-Rong He, 2014, Forat-Yazdi, M., 2015). Por lo otro lado, en un estudio reciente realizado en pacientes con cáncer de mama se reporta que el PNS G80A es un biomarcador útil para predecir la eficacia al tratamiento con MTX, y asocia el genotipo GG con mal pronóstico (Ludovini, V. 2017).

En cuanto al PNS C452T del gen de la GGH, se propone como un biomarcador confiable en población japonesa, para anticipar la eficacia y efectos adversos del MTX en pacientes que reciben bajas dosis de MTX, ya que el nivel sérico de MTX a bajas dosis es indetectable (Hayashi, 2007). En el estudio realizado por Organista-

Nava (2010) en pacientes pediátricos mexicanos con LLA no se encontró asociación del polimorfismo C452T de la GGH con riesgo de recaída.

El PNS –C401T del gen de la GGH es útil como biomarcador para la eficacia del tratamiento con MTX en pacientes pediátricos mexicanos con LLA (Organista-Nava, 2010). En pacientes de etnia asiática se asocian los genotipos CT y TT, con un aumento en el riesgo de desarrollar leucopenia y trombocitopenia en pacientes pediátricos tratados con altas dosis de MTX (Koomdee, 2012).

La presencia de los PNS estudiados en el presente trabajo, nos sugiere llevar a cabo estudios en pacientes bajacalifornianos con patologías en las que esté indicado el uso del MTX para individualizar el tratamiento, evitando así toxicidad y con ello abandono del tratamiento por esta causa, así como falta de respuesta al MTX. De esta manera se podría en un futuro disminuir la morbilidad y mortalidad asociada al uso del MTX en nuestro medio.

Tabla 10. Comparación de la distribución de PNS G80A del gen RFC-1, –C401T y C452T del gen de la enzima GGH en poblaciones sanas de diferentes etnias. NR=No reportado

Etnia	N	Frecuencia genotípica (%)			Frecuencia alélica		EHW	VALOR P	REFERENCIA
G80A RFC-1		%GG	%GA	%AA	G	A			
MEXICANOS (B.C.)	141	30.5	51.8	17.7	0.563	0.437	0.388	0.532	Nuestro estudio
MEXICANOS (SONORA)	184	32	47	21	0.56	0.44	0.32	0.57	Aristea Binia, 2014
MEXICANOS (YUCATAN)	195	28.2	53	18	0.55	0.45	0.609	0.76	Gonzalez-Herrera, 2012
URUGUAYOS	55	26.8	46.4	26.8	0.50	0.50	NR	0.04	Andrea Giletti, 2017
JAPONESES	472	19.1	48.3	32.6	0.43	0.57	0.731	0.626	Hashigushi, 2016
ASIATICOS	168	27.4	45.2	27.4	0.50	0.50	0.217	0.039	Hashigushi, 2016
CAUCASICOS	1203	30.2	48.6	21.2	0.55	0.45	0.498	0.00001	Hashigushi, 2016
AFRICANOS	249	13.3	36.9	49.8	0.32	0.68	0.020	0.00001	Hashigushi, 2016
C452T GGH		%CC	%CT	%TT	C	T			
MEXICANOS (B.C.)	141	92.9	7.1	0	0.965	0.035	0.5151	0.47	Nuestro estudio

MEXICANOS (GUERRERO)	140	96.4	3.6	0	0.982	0.018	0.8297	0.47	Organista-Nava, 2010
JAPONESES	525	81.1	18.3	0.6	0.9	0.1	0.331	0.51	Hashigushi M., 2016
ÁSIATICOS	564	80.3	18.5	1.2	0.9	0.1	0.710	0.5680	Oppeneer, 2012
CAUCÁSICOS	209	74.2	23.4	2.4	0.86	0.14	0.633	0.0350	Hashigushi, 2016
AFRICANOS	332	85.5	13.3	1.2	0.92	0.08	0.135	0.665	Hashigushi, 2016
-C401T GGH		%CC	%CT	%TT	C	T			
MEXICANOS (B.C.)	141	60.3	31.2	8.5	0.759	0.241	3.07	0.08	Nuestro estudio
MEXICANOS (GUERRERO)	140	75	21.4	3.5	0.857	0.143	0.1391	0.001	Organista-Nava, 2010
JAPONESES	86	39.5	48.8	11.7	0.64	0.36	0.583	0.003	Hashigushi, 2016
ASIATICOS	90	60	35.6	4.4	0.78	0.22	0.786	0.9690	Hashigushi, 2016
CAUCASICOS	120	45	48.3	6.7	0.69	0.31	0.145	0.04	Hashigushi, 2016
AFRICANOS	120	75	21.7	3.3	0.86	0.14	0.232	0.0053	Hashigushi, 2016

10. CONCLUSIONES

La distribución de los polimorfismos G80A del gen del transportador de folatos reducido-1 (RFC-1) y los polimorfismos –C401T y C452T del gen de la gamma-glutamyl-hidrolasa se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg con un valor p no significativo en una muestra de población nativa y clínicamente sana, de la ciudad de Mexicali, B.C.

Fue posible establecer que el polimorfismo G80A del gen RFC-1 presentó una distribución, en la población estudiada y perteneciente a la tercera generación de nacidos en Mexicali, B.C., de 51.8% de individuos con genotipo heterocigoto (GA), 30.5%, con genotipo homocigoto silvestre (GG) y 17.7% con genotipo homocigoto variante (AA), con un valor $p=0.53$, consistente con el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). La frecuencia de los alelos G y A fue de 0.563 y de 0.437 respectivamente.

El polimorfismo –C401T del gen de la GGH se encontró con la siguiente proporción: 60.3% de individuos con genotipo homocigoto silvestre (CC), 31.2% con genotipo heterocigoto (CT) y 8.5% con genotipo homocigoto variante (TT) con un valor $p=0.08$ compatible con el EHW. La frecuencia del alelo C correspondió a 0.759 y el alelo T a 0.241.

En cuanto al polimorfismo C452T del gen GGH también se encontró en EHW con un valor $p=0.47$ y presentó una frecuencia de individuos con el genotipo homocigoto silvestre (CC) de 92.9%, con el genotipo heterocigoto (CT) de 7.1%, mientras que el genotipo homocigoto variante (TT) no se encontró en la población de estudio. Las frecuencias alélicas de C y T fueron de 0.965 y 0.035, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aristea Binia, et al. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr* 2014; 9(5):421.
- Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(1):153-81.
- Ausubel, F.M., et al. (Eds.), *Current protocols in molecular biology. Preparation and analysis of DNA*, vol. 1, 1994–2000. United States of America, p. 2.0.1–4.10.11.
- Bartlett JM, White A. Extraction of DNA from whole blood. *Methods Mol Biol*. 2003;226:29-32. DOI: 10.1385/1-59259-384-4:29
- Brito A, et al. Folate, vitamin B12 and human health. *Rev Med Chile* 2012; 140: 1464-1475
- Candelaria M, Ojeda J, Gutierrez-Hernandez O, et al. G80A Single nucleotide polymorphisms in reduced folate carrier-1 gene in a Mexican population and its impact on survival in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev Inves Clin*. 2016;68:154-62.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999; 22(3):231-8.
- Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism A80G in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000; 70(4):310-5.
- Chaudary, R., Bharat Singh, Manish Kumar, Surendra K. Gakhar, Adesh K. Saini, Virinder S. Parmar, y Anil K. Chhillar. Role of single nucleotide polymorphisms in pharmacogenomics and their association with human diseases. *Drug Metabolism Reviews*, 2015; 47(3): 281–290
- Chave K.J., Ryan T.J., Chmura S.E., Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene* 2003; 319:167-75.
- Checa Caratachea Marco Antonio. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 2007; 20(3):213-21.

- Cheng Q, Cheng C, Crews KR, Ribeiro RC, Pui CH, Relling MV, et al. Epigenetic regulation of human gamma-glutamyl hydrolase activity in acute lymphoblastic leukemia cells. *Am J Hum Genet* 2006; 79(2):264-74.
- Coppede Fabio, et al. A pilot study evaluating the contribution of SLC19A1 (RFC-1) 80>A polymorphisms to Alzheimer's disease in Italian Caucasians. *Biomed Res Int* 2014; 2014:1-6.
- Cornejo Romero A., Serrato Díaz A., Rendón Aguilar B., Rocha Munive M. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. SEMARNAT, Primera Edición 2014; páginas 14 y 15.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(9):2766-74.
- Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and [gamma]-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics* 2004; 14(11):733–9.
- De Marco Patrizia, et al. Reduced folate carrier polymorphisms A80G and neural tube defects. *European Journal of Human Genetics* 2003; 11:245-252.
- Drozdic M, Rudas T, Pawlik A, Gornik W, Kurzawski M, Herczynska M. Reduced folate carrier-1 80>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J* 2007; 7(6):404-7.
- Duan J, Wainwright MS, Cameron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2(DRD2) affect messenger RNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003; 12:205-16.
- Flintoff Wayne F, Williams Frederick y Sadlish Heather. The Region between Transmembrane Domains 1 and 2 of the Reduced Folate Carrier Forms Part of the Substrate-binding Pocket. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:40867-40876.
- Fotoohi AK. Resistance of human leukaemia cells to the antimetabolites. *Oncol Pathol Suecia* 2007; 1:1-84.
- Ganapathy V, Smith SB, Prasat B. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2004) 447:641–646 DOI 10.1007/s00424-003-1068-1

- Giletti A, et al. Methotrexate pharmacogenetics in Uruguayan adults with hematological malignant diseases, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2017), doi:10.1016/j.ejps.2017.09.006
- Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *Biol Chem J* 1968; 243:5007-17.
- González-Herrera Lizbeth, et al. Association of G80A polymorphisms in the RFC-1 gene with the risk for having spina bifida affected offspring in Southeast Mexico and interaction with C677T in the MTHFR gene. *Documento electrónico www.intechopen.com*, 2012:179-190.
- Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med* 2002; 347(19):1512-20.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the chromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431:931-945.
- Hai-Rong He, Ping Liu, et al. Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & Lymphoma*, December 2014; 55(12): 2793–2800.
- Hartl Daniel y Jones Elizabeth. *Genetics Analysis of Genes and Genomes*. Séptima Edición (2009) Editorial Jones and Bartlett p618-627.
- Hashigushi M, et al. Genetic polymorphisms of enzyme proteins and transporters related to methotrexate response and pharmacokinetics in a Japanese population. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences* (2016) 2:35 DOI 10.1186/s40780-016-0069-0
- Hayashi H, Fujimaki C, Inoue K, Suzuki T, Itoh K. Genetic polymorphism of C454T (T127) in human gamma-glutamyl hydrolase in a Japanese population. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(4):839-41.
- Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC, Schwab M, Ahmad T, Jewell DP. The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. [Pharmacogenet Genomics](#). 2005 Oct;15(10):705-11.
- Hou Zhanjun , Orr Steve y Matherly Larry H. Post-transcriptional regulation of the human reduced folate carrier as a novel adaptive mechanism in response to folate excess or deficiency. *Biosci. Rep.* 2014 , 34 / art:e00130.

- Instituto Nacional de Medicina Genómica. Proyecto Genoma Humano tomado de http://www.inmegen.gob.mx/tema/cms_page_media/242/PGH.pdf.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit* 2005; 19(4):333-41.
- Jabeen, S., L. Holmboe, et al. (2015). "Impact of genetic variants of RFC1, DHFR and MTHFR in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate." *The Pharmacogenomics Journal* 15(5): 385-390.
- Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414–21.
- Kim K, Kang SB, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS. XRCC1 Arginine194Tryptophan and GGH-401Cytosine/Thymine polymorphisms are associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 111(3):509-15.
- Koomdee N1, Hongeng S, Apibal S, Pakakasama S. Association between polymorphisms of dihydrofolate reductase and gamma-glutamyl hydrolase genes and toxicity of high dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(7):3461-4.
- Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100(10): 3832–4.
- Li H., Ryan, T.J., Chave, K.J., y Van Roey. Three-dimensional Structure of Human Gamma-Glutamyl Hydrolase. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(27):24522-24529.
- Li WW, Waltham M, Tong W, Schweitzer BI, Bertino JR. Increased activity of gamma-glutamyl hydrolase in human sarcoma cell line: a novel mechanism of intrinsic resistance to methotrexate (MTX). *Adv Exp Med Biol* 1993;338:635-8.
- Ludovini, V., et al. Influence of chemotherapeutic drug-related gene polymorphisms on toxicity and survival of early breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* (2017) 17:502 DOI 10.1186/s12885-017-3483-2
- Ly, A., Hoyt, L., Crowell, J. y Kim, Y. I. Folate and DNA methylation. *Antioxid. Redox Signal.* 2012. 17:302–326.
- Matherly Larry H., Wilson Mike R. y Zhanjun Hou. The Major Facilitative Folate Transporters Solute Carrier 19A1 and Solute Carrier 46A1: Biology and Role in Antifolate Chemotherapy of Cancer. *Drug Metab Dispos.* Abril 2014, 42:632–649.

- Miller S.A., Dykes D.D. y Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3): 1215.
- Moreno-Estrada A., et al. The Genetics of Mexico Recapitulates Native American Substructure and Affects Biomedical Traits. *Science.* 2014 June 13; 344(6189): 1280–1285. doi:10.1126/science.1251688
- Moscow, J. A., Gong, M., He, R., Sgagias, M. K., Dixon, K. H., Anzick, S. L., Meltzer, P. S. and Cowan, K. H. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995. 55: 3790–3794.
- Muralidharan, N., Mariaselvam, CM, Mithun, CB, Vir Singh Negi. Reduced folate carrier-1 80G > A gene polymorphism is not associated with methotrexate treatment response in South Indian Tamils with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2015. DOI 10.1007/s10067-015-2917-y
- Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997; 60:265-71.
- Niedzielska E., et al. The Influence of Genetic RFC1, MS and MTRR Polymorphisms on the Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse in Children and the Adverse Effects of Methotrexate. *Adv Clin Exp Med* 2013; 22(4):579–84.
- Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet.* 1998; 63:1531-40.
- Oppeneer SJ, Ross JA, Koh WP, Yuan JM, Robien K. Genetic variation in folylpolyglutamate synthase and gamma-glutamyl hydrolase and plasma homocysteine levels in the Singapore Chinese Health Study. *Mol Genet Metab.* 2012;105(1):73–8.
- Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Saavedra-Herrera MV, Rivera-Ramirez AB, et al. Polymorphisms of the gamma-glutamyl hydrolase gene and risk of relapse to acute lymphoblastic leukemia in Mexico. *Leuk Res* 2010; 34(6):728-32.
- Park JA, Hee Young Shin. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. *Blood Res* 2016; 51:50-7.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, and Goldman ID. Identification of an intestinal folate transporter

- and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, 2006. 127:917–928.
- Rady PL, Szucs S, Matalon RK, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H. Genetic polymorphism (G80A) of reduced folate carrier gene in ethnic populations. *Mol Genet Metab* 2001;73:285–286.
- Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, McLeod HL. Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2003; 62:4-9.
- Rothem Lilah, Stark Michal y Assaraf Yehuda G. Impaired CREB-1 Phosphorylation in Antifolate-Resistant Cell Lines with Down-Regulation of the Reduced Folate Carrier Gene. *Mol Pharmacol*. 2004, 66:1536–1543.
- Roszkiewicz J y Smolewska E. In the Pursuit of Methotrexate Treatment Response Biomarker in Juvenile Idiopathic Arthritis—Are We Getting Closer to Personalised Medicine?. *Curr Rheumatol Rep* (2017) 19: 19 DOI 10.1007/s11926-017-0646-8
- Ruiz-Linares A., Kaustubh A., Acuña-Alonzo V., et al. Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *Plos Genet* 2014 Sep; 10(9): e1004572.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, vols. 1–2, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol* 2009;146:489-503.
- Schneider F, Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta* 2006; 374(1-2):25-32.
- Shane B, Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 1989; 45:263-335.
- Silva-Zolezzi I, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. [PNAS](#) 2009 May 26; 106(21): 8611–8616.
- Stark Michal y Assaraf Yehuda G. Loss of Sp1 function via inhibitory phosphorylation in antifolate-resistant human leukemia cells with down-regulation of the reduced folate carrier. www.bloodjournal.org, May 24, 2006.
- Summers CM, Mitchell LE, et al. Genetic and lifestyle variables associated with homocysteine concentrations and the distribution of folate derivatives in healthy premenopausal women. [Birth Defects Res A Clin Mol Teratol](#). 2010 Aug;88(8):679-88. doi: 10.1002/bdra.20683

- Swierkot J., Ryszard S., Pawel K., et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Wewn.* 2015; 125(3):152-161.
- Tian Henghe y Cronstein N. Bruce. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007;65(3):168-73.
- Universidad de la República de Uruguay. 2003. Ley de Hardy-Weinberg. Recuperado de <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/Popgen/popeq.html>
- Velasco Rodríguez Víctor, et al. Muestreo y tamaño de muestra. Una Guía práctica para personal de salud que realiza investigación. Primera edición 2002, Torreón, Coahuila, México. p 45.
- Whetstine JR, Gifford AJ, Witt T, Liu XY, Flatley RM, Norris M, Haber M, Taub JW, Ravindranath Y, Matherly LH (2001) Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier Characterization of a High-Frequency G/A Variant at Position 80 and Transport Properties of the His27 and Arg27 Carriers. *Clin Cancer Res* 7:3416–3422
- Wang SM, Sun LL, Zeng WX, Wu WS, Zhang GL. Influence of genetic polymorphisms of FPGS, GGH, and MTHFR on serum methotrexate levels in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Aug;74(2):283-9. doi: 10.1007/s00280-014-2507-8.
- Wong S. C., Zhang, L., Proefke, S. A. and Matherly, L. H. Effects of the loss of capacity for N-glycosylation on the transport activity and cellular localization of the human reduced folate carrier. *Biochim. Biophys.* 1998. *Acta* 1375: 6–12.
- Yao Z, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J. Human gamma-glutamyl Hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10134-8.
- Zaruma-Torres, F. et al. Genetic Polymorphisms Associated to Folate Transport as Predictors of Increased Risk for Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Children. *Frontiers in Pharmacology* www.frontiersin.org, August, 2016 Volumen 7 artículo 238.
- Zhang, D-X. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol. Evol.* 2004; 19:507-9.
- Zhao Rongbao y Goldman David. Folate and Thiamine Transporters mediated by Facilitative Carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and Folate Receptors. *Mol Aspects Med.* 2013 ; 34(0).

Zhao R, Goldman I.D .Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003; 22(47):7431-57.

Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman D. Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and Across Epithelia. *Annu Rev Nutr.* 2011 August 21; 31: doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145133

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA

HOJA DE DATOS DEL VOLUNTARIO

Proyecto de Investigación: Distribución de los polimorfismos –C401T y C452T de la gamma-glutamyl- hidrolasa (GGH) y A80G del transportador de folatos reducido (RFC-1) en una población mestiza del noroeste de México.

Nombre: _____ Género: _____

Edad: _____

Lugar de nacimiento: _____

Domicilio: _____

Lugar de nacimiento de su abuela materna: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO ¿cuánto tiempo vivió en Mexicali? _____

Lugar de nacimiento de su abuelo materno: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO ¿cuánto tiempo vivió en Mexicali? _____

Lugar de nacimiento de su abuela paterna: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO ¿cuánto tiempo vivió en Mexicali? _____

Lugar de nacimiento de su abuelo paterno: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO ¿cuánto tiempo vivió en Mexicali? _____

Lugar de nacimiento de su madre: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO

Lugar de nacimiento de su padre: _____

Vive o vivía en Mexicali: SI NO

Fecha: _____

Investigador: Martha Teresa García López Portillo

ANEXO 2



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Medicina

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este formulario de consentimiento informado se dirige a todas las personas de cualquier género, de cualquier edad, sanos, que residan en Mexicali, B.C., mexicanos y que pertenezcan a la tercera generación nacida en Baja California.

Investigador principal: Martha Teresa García López Portillo

Proyecto de investigación: “Distribución de los polimorfismos –C401T y C452T de la gamma-glutamyl hidrolasa (GGH) y A80G del transportador de folatos reducidos (RFC-1) en una población mestiza del noroeste de México”.

Este documento de consentimiento informado tiene dos partes:

- Información sobre el estudio
- Formulario de consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del documento completo de Consentimiento informado.

PARTE I: Información

Yo, Martha Teresa García López Portillo, soy estudiante de una maestría en ciencias de la salud en la Facultad de Medicina de la UABC, y mi tutor es el Dr. Raúl Díaz Molina. Ambos estamos investigando la presencia de polimorfismos, es decir variaciones en los genes de proteínas involucradas en el metabolismo de un medicamento llamado metotrexato que es utilizado frecuentemente para tratamiento de tumores y enfermedades autoinmunes. El objetivo del estudio es establecer las características genéticas de la población nacida y residente de Baja California para conocer la presencia o no de estas variaciones (polimorfismos) en sus genes.

Puede que haya algunas palabras que no entienda, por favor dígame para explicarle. Si tiene preguntas puede hacerlas.

Su participación en esta investigación consistirá en una sola entrevista para llenar una hoja de datos generales y una sola toma de muestra de sangre obtenida del brazo con una jeringa y una aguja muy similar a cuando le hacen exámenes de laboratorio, para extraer 3 ml de sangre, de donde se extraerá su ADN (Ácido desoxirribonucleico), al final de la investigación su muestra de sangre será eliminada. El reclutamiento de voluntarios se llevará a cabo del 01 de septiembre al 31 de Octubre del 2016. Su participación es totalmente voluntaria y sin fines de intervención médica alguna ni de experimentación de algún medicamento. Solo se extraerá sangre de su brazo, no se inyectará absolutamente nada. Durante la extracción de sangre es posible que experimente molestias por la punción de la aguja en el brazo, podrá posiblemente aparecer irritación, un pequeño sangrado o un

moretón, que será tratado con compresión mecánica con una gasa para evitar que continúe el sangrado. Ante esto usted puede retirarse en el momento que lo desee.

Usted puede elegir participar o no hacerlo. Los beneficios que Usted recibirá por participar en esta investigación serán conocer si responde bien o no a un medicamento llamado Metotrexato, que se utiliza en personas con tumores y enfermedades autoinmunes. Si en un futuro usted llegará a requerir del uso de este medicamento ya contará con la información genética si tolera o no el Metotrexato, debido a que una parte importante de la población no lo tolera por poseer variaciones en los genes que vamos a estudiar. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes. Su muestra de sangre será utilizada únicamente para este estudio y será almacenada a menos 20 grados centígrados en el laboratorio de análisis clínicos de la Facultad de Medicina durante el período que duré el análisis de la misma para después ser desechada en un contenedor.

Si usted acepta participar en esta investigación ayudará a encontrar la siguiente información: la presencia o no de variaciones en el ADN de personas originarias de Mexicali, B.C. relacionadas con efectos secundarios o falta de respuesta al tratamiento con el medicamento llamado Metotrexato. Toda la información que usted nos proporcione así como los resultados del estudio se mantendrán de manera confidencial y su identidad solo será conocida por el investigador principal, ya que será identificado por un número de folio y no por su nombre en una base de datos. La información que de usted se recogerá durante la investigación, será utilizada solamente para el análisis por parte de los investigadores en forma confidencial y sin algún otro fin y nunca será identificado en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio. La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California no ofrece compensación económica alguna a las personas que voluntariamente acepten participar en esta investigación.

Usted no tiene por qué participar en esta investigación si no desea hacerlo, puede dejar de participar en el momento que quiera. Es su elección y todos sus derechos serán respetados. Todos los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial, serán resguardados hasta el término de la investigación y almacenados durante un período de un año como evidencia de que se realizó la investigación.

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Puede contactarme al correo electrónico matgarcia72@yahoo.com.

Las pruebas de ADN y la interpretación de los resultados son complejos, por lo que tomará unos meses obtenerlos, si usted desea saber si su ADN porta las variaciones o polimorfismos relacionados con la respuesta al uso del medicamento Metotrexato puede contactarme al mismo correo electrónico antes mencionado.

PARTE II: Formulario de consentimiento

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna forma.

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Mexicali, B.C. a _____

He sido testigo, y le he leído la información al participante.

Nombre del investigador: _____

Firma: _____

Mexicali, B.C. a _____

ANEXO 3

Extracción de ADN genómico

(Técnica de Miller modificada)

1. Colocar en un tubo cónico de 15 ml una muestra de 3 ml de sangre periférica con EDTA.
2. Añadir 3 ml de TTS y agitar en vórtex 15 minutos para provocar lisis de eritrocitos. El TTS debe estar en volumen 1:1.
3. Centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos para formar el botón de leucocitos, a temperatura ambiente.
4. Decantar sobrenadante (en un vaso con cloro) y añadir 1 ml de TTS al botón de células (sacudir cuidadosamente hasta separar el botón del fondo).
5. Transferir el contenido a un tubo de 1.5 ml y homogeneizar en vortex durante 10 minutos hasta disolver el botón.
6. Centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos y decantar sobrenadante.
7. Añadir 1 ml de TTS al botón de células, homogeneizar en vórtex hasta disolver el botón y centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos (repetir este paso 2 a 3 veces hasta obtener un botón blanco).
8. Decantar el último sobrenadante y añadir 570 µl de NaCl 5 mM y homogeneizar en vórtex durante 2 minutos.
9. Añadir 30 µl de SDS al 10% y homogeneizar en vórtex 10 minutos.
10. Agregar 200 µl de NaCl saturado y homogeneizar 15 minutos en vórtex.
11. Centrifugar a 11600 rpm durante 25 minutos y decantar el sobrenadante en un tubo Falcon estéril con 2 ml de etanol absoluto frío.
12. Reposar el sobrenadante a -20°C toda la noche.
13. Colocar 500 µl de etanol al 70% frío en un tubo eppendorf de 1.5 ml
14. Aspirar el ADN del tubo con una pipeta y punta de 1000 µl y transferir al tubo con etanol al 70% frío. Centrifugar a 9000 rpm por 10 minutos y decantar.
15. Agregar 500 µl de etanol al 70% frío.
16. Agitar en vórtex por 2 minutos y centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos.
17. Decantar el sobrenadante y añadir 500 µl de etanol al 70 % (repetir 4 veces).
18. Decantar el último lavado y dejar reposar los tubos en posición invertida 5 a 10 minutos (para evaporar el etanol).
19. Agregar 300 a 400 µl de agua destilada estéril y agitar en vórtex durante 15 minutos
20. Almacenar a -20 °C. (Bartlett y White, 2003).