

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería**



**Aplicación de la Técnica PCR tetra-primer para  
Detectar el Polimorfismo TPMT\*2 en Humanos**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
PRESENTA**

**ANA PATRICIA JUÁREZ MERCADO**

**Tijuana, B. C.**

**Diciembre de 2007.**

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**E INGENIERÍA**

FOLIO No. 239

Tijuana, B.C.  
07 DE DICIEMBRE DE 2007

C. ANA PATRICIA JUÁREZ MERCADO

Pasante de QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presente

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

Opción TESIS

es propuesto, por el C. DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema

Aplicación de la Técnica PCR tetra-primer para Detectar el Polimorfismo

TPMT\*2 en Humanos.


el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- JUSTIFICACIÓN
- III.- OBJETIVOS
- IV.- MATERIALES Y MÉTODOS
- V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA

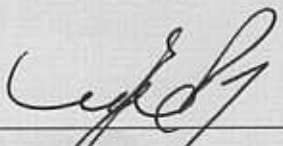


FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA

  
M.C. RUBÉN GUILLERMO SEPÚLVEDA  
MARQUÉS  
Sub-Director Secretario

  
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Asesor

  
M.C. MARÍA EUGENIA PÉREZ MORALES

Directora

El presente trabajo de investigación fue realizado en el  
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA  
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Tutoría y Dirección del  
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
(8ª y 9ª Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación.)

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres María Guadalupe y Patricio por su apoyo, amor y comprensión en todos los momentos de mi vida.

A mi hermano Leonardo por compartir momentos difíciles y buenos, así como su apoyo incondicional.

A la Universidad Autónoma de Baja California, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

Al Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra por creer en mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis porque por sus consejos, conocimientos y amistad ayudó en mi formación profesional y como ser humano.

A la M.C. Rosa Elena Mares Alejandre por compartir su experiencia, brindar su apoyo y su incalculable amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Joaquín, Robert y Liz por todos los momentos compartidos.

A todos ellos... Gracias!

# TABLA DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>3</b>
I.1. FARMACOGENÉTICA Y TIOPURINAS .....	3
I.2. METABOLISMO DE TIOPURINAS .....	5
I.3. TIOPURINA S-METILTRANSFERASA (TPMT).....	6
<i>I.3.1. Bioquímica.....</i>	<i>6</i>
<i>I.3.2. Genética molecular.....</i>	<i>6</i>
<i>I.3.3. Polimorfismos genéticos.....</i>	<i>7</i>
<i>I.3.4. Consecuencias de la deficiencia enzimática.....</i>	<i>9</i>
I.4. PRUEBAS DE ADN COMO MÉTODO DE DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....	10
<i>I.4.1. Pruebas de ADN y detección molecular.....</i>	<i>11</i>
<i>I.4.2. Detección molecular de TPMT.....</i>	<i>12</i>
<b>II. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
III.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>IV. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>15</b>
IV.1. REACTIVOS QUÍMICOS Y SOLUCIONES .....	15
IV.2. MATERIALES BIOLÓGICOS .....	15
IV.3. EQUIPO.....	16
IV.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS .....	16
IV.5. ADN GENÓMICO HUMANO TPMT*2.....	17
IV.6. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO HUMANO.....	17
IV.7. REACCIÓN DE PCR ESTÁNDAR .....	18
IV.8. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	19

IV.9. REACCIÓN DE PCR TRI-PRIMER .....	19
IV.10. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR UTILIZANDO ADN GENÓMICO DE INDIVIDUOS NO PORTADORES DE TPMT*2.....	20
<i>IV.10.1. Temperatura de hibridación y relación molar de oligonucleótidos.....</i>	<i>20</i>
<i>IV.10.2. Ensayo ortogonal de optimización de 4 variables.....</i>	<i>21</i>
IV.11. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR UTILIZANDO ADN GENÓMICO DE INDIVIDUOS PORTADORES DE TPMT*2.....	22
<i>IV.11.1. Temperatura de hibridación y cantidad de ADN genómico.....</i>	<i>22</i>
<i>IV.11.2. Ensayo ortogonal de optimización de 4 variables.....</i>	<i>23</i>
IV.12. AMPLIFICACIÓN DE LA VARIANTE DE TPMT*2 EN CONDICIONES DE REACCIÓN OPTIMAS .....	23
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>25</b>
V.1. PCR TETRA-PRIMER PARA DETECTAR EL POLIMORFISMO TPMT*2 EN HUMANOS .....	25
V.2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GEN TPMT SILVESTRE .....	26
V.3. OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO SILVESTRE .....	28
V.4. OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO MUTANTE .....	31
V.5. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR TETRA-PRIMER .....	32
V.6. DETECCIÓN MOLECULAR DEL POLIMORFISMO TPMT*2 MEDIANTE PCR TETRA-PRIMER .....	33
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>37</b>

# **I. INTRODUCCION**

## **I.1. Farmacogenética y tiopurinas**

La variabilidad inter-individual en la respuesta a fármacos es un problema clínico importante, tales variaciones comprenden desde el fracaso en la respuesta a un fármaco hasta reacciones adversas e interacciones medicamentosas [Gallego García y col., 2001; Wolf y col., 2001].

Numerosos ejemplos han establecido que estas variaciones inter-individuales son atribuidas, en parte, a polimorfismos presentes en genes que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos, acarreadores y blancos farmacológicos (p.e. enzimas o receptores). Adicionalmente, se han reconocido otros factores no hereditarios que influyen en el efecto farmacológico en pacientes, incluyendo la naturaleza y severidad de la enfermedad, función del órgano o sistema fisiológico, edad, sexo y grupo étnico [Johnson y Evans, 2002].

Actualmente, está claro que la individualidad en la respuesta a fármacos tiene un origen hereditario, esta variabilidad individual determinada genéticamente define el área de investigación conocida como “farmacogenética” (enfoque sobre un solo gen; investiga la relación entre la respuesta al fármaco y las diferencias genéticas; estudia la variabilidad individual en la respuesta farmacológica, determinándola genéticamente) [Gallego García y col. 2001; Wolf y col., 2001; Shastry, 2006].

La aplicación diagnóstica de la farmacogenética se fundamenta primordialmente en la habilidad para determinar o inferir, a partir de una prueba de ADN, la probabilidad

de que un fármaco específico produzca los efectos terapéuticos deseados (eficacia) o el riesgo de una reacción adversa (toxicidad) [Johnson y Evans, 2002].

Los polimorfismos genéticos (variantes alélicas de un gen) pueden ser importantes determinantes de la respuesta clínica. Esto es, se han identificado polimorfismos genéticos en más de 20 enzimas humanas relacionadas con el metabolismo de fármacos, incluso algunos con importantes diferencias étnicas en sus frecuencias, tal como las enzimas N-acetiltransferasa 2, tiopurina S-metiltransferasa y algunas isoenzimas de la familia citocromo P450. Por lo tanto, la variabilidad en la respuesta farmacológica está determinada genéticamente en relación al nivel de expresión o función de esas enzimas, las cuales tiene un efecto sobre la eficacia del fármaco [Gallego García y col., 2001].

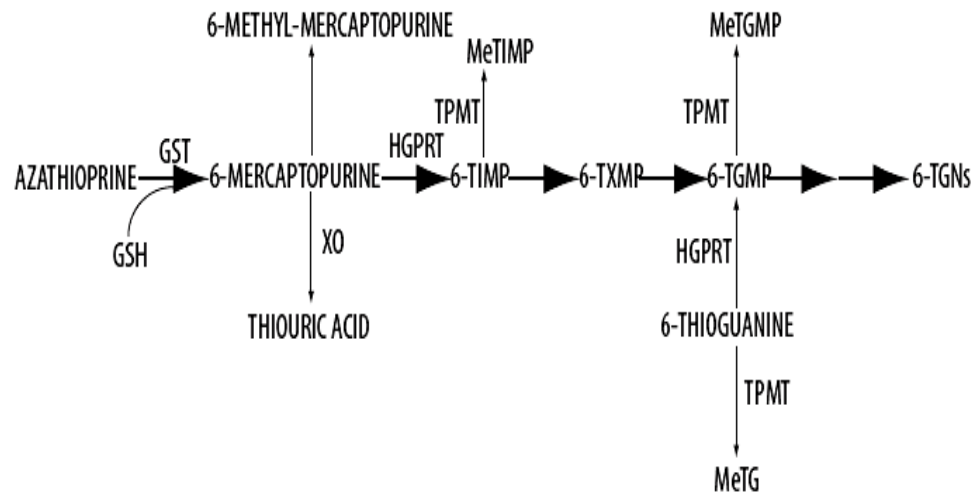
Las fármacos tiopurínicos son análogos estructurales a las purinas (bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos) que actúan como anti-metabolitos, ya que utilizan las vías de biosíntesis de nucleótidos para incorporarse a los ácidos nucleicos. Es decir, las tiopurinas son antagonistas de la purina, ya que participan en la incorporación de grupos tio-purínicos (p.e. 6-tioguanina) tanto en las moléculas de ácidos nucleicos.

Los fármacos 6-mercaptopurina y azatioprina son utilizados como anticancerígenos y como inmunosupresores en padecimientos tales como la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la artritis reumatoide (AR), respectivamente.

El efecto tóxico principal de las tiopurinas es la depresión de la médula ósea, la cual se debe a una acumulación del fármaco debido a un pobre metabolismo, afectando las líneas celulares del tejido hematopoyético y, por consecuencia, ocasionando anemia, trombocitopenia, leucopenia e, incluso, el desarrollo de cáncer (leucemia mielocítica).

## I.2. Metabolismo de tiopurinas

El principal mecanismo de acción de las tiopurinas es la incorporación de los nucleótidos de tioguanina (NTG) tanto en la molécula de ADN como de ARN. Como se observa en la Figura 1, los NTG son formados por una vía metabólica con múltiples rutas, dando inicio por la HGPRT (hipoxantina-guanosina fosforibosiltransferasa). Estos agentes son metabolizados mediante la incorporación de un grupo metilo, reacción que es llevada a cabo por la enzima TPMT (tiopurina S-metiltransferasa), formando metil-tiopurinas; o mediante la oxidación a ácido tiúrico, catalizada por la enzima xantina oxidasa (XO). Tanto TPMT como XO reducen la formación de NTG activos.



**Figura 1.** Ruta metabólica de las tiopurinas (azatioprina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina) que forman nucleótidos de tioguanina (NTG), considerados como los metabolitos activos. GST, glutatión S-transferasa; GSH, glutatión reducido; XO, xantina oxidasa; TPMT, tiopurina S-metiltransferasa; 6-MeMP, 6-metilmercaptopurina; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa; 6-TIMP, 6-tioinosina monofosfato; MeTIMP, metil tioinosina monofosfato; 6-TXMP, 6-tioxantina monofosfato; 6-TGMP, 6-tioguanina monofosfato; MeTGMP, metil tioguanona monofosfato; 6-TGN, nucleótido de 6-tioguanina; MeTG, metil tioguanina [Cara y col., 2004].

### **I.3. Tiopurina S-metiltransferasa (TPMT)**

#### **I.3.1. Bioquímica**

La tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) es una enzima citoplásmica que preferencialmente cataliza la S-metilación de compuestos sulfhídricos aromáticos y heterocíclicos, tal como 6-mercaptopurina y 6-tioguanina. La actividad es típicamente medida en eritrocitos, la cual tiene una fuerte correlación entre la actividad de TPMT con otros tejidos, como hígado, riñón y linfocitos [Krynetski y col., 1995].

Métodos bioquímicos convencionales fueron utilizados para evaluar la actividad enzimática de TPMT en eritrocitos humanos: mediante la incorporación metabólica de un grupo metilo radiomarcado, a partir del sustrato S-adenosilmetionina (SAM) [Krynetski y Evans, 1999]. Otros estudios han reportado el uso de derivados de ácido benzoico como inhibidores no competitivos y que algunos tiofenoles pueden ser utilizados como sustratos [Ames y col., 1986].

#### **I.3.2. Genética molecular**

El gen *tpmt* humano tiene una longitud de 34 Kb, está localizado en el *locus* 6p22.3, consiste de 10 exones y codifica para un polipéptido de 245 residuos de aminoácido [OMIM].

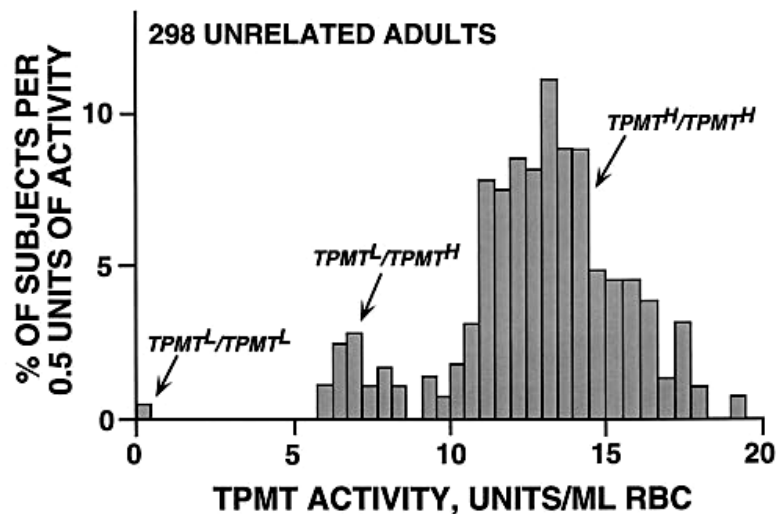
En un estudio con población caucásica, *Weinshilboum* y *Sladek* [1980] determinaron la correlación entre la variación en la actividad de TPMT y las diferencias en los niveles intracelulares de los NTG en eritrocitos humanos. Los resultados demostraron que la actividad de TPMT se distribuye de manera trimodal: aprox. 90% de las personas exhibían actividad alta, 10% actividad intermedia y 0.3% baja actividad o

indetectable. Esta distribución se ajusta al equilibrio Hardy-Weinberg para un par de alelos autosómicos co-dominantes: uno para baja y otro para alta actividad de TPMT (Figura 2) [McLeod y Siva, 2002; OMIM].

En otro estudio poblacional con británicos-caucásicos, realizado por *Ameway y col.* [1999], se observaron las 4 variantes alélicas, denominadas TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B y TPMT\*3C, siendo TPMT\*3A la variante más común. En otro estudio comparativo entre población afro-americana y caucásico-americana se observó que la variante TPMT\*3C es el alelo más prevalente en la población afro-americana. Por otro lado, estudios de genética evolutiva sugieren que la mutación TPMT\*3C puede ser la variante alélica ancestral para TPMT [varias referencias].

### I.3.3. Polimorfismos genéticos

Cuatro variantes alélicas o polimorfismos genéticos han sido asociados a la baja o nula actividad de TPMT humana:



**Figura 2.** Histograma de la frecuencia de distribución de TPMT en eritrocitos de 298 caucásicos aleatoriamente seleccionados [Weinshilboum, 2001].

TPMT\*2 (G238C, A80P). Es una transversión en el nucleótido 238 (G → C) conduciendo a una sustitución del aminoácido en el codón 80 (Ala → Pro). Estudios en levadura mostraron que reduce 100 veces la actividad catalítica de TPMT. Es la mutación más agresiva pero también la menos frecuente.

TPMT\*3A (G460A, A154T; A719G, Y240C). Este polimorfismo contiene dos transiciones nucleotídicas: 460 (G → A) y 719 (A → G), produciendo cambios en los aminoácidos 154 (Ala → Thr) y 240 (Tyr → Cys). Utilizando mutagénesis sitio-dirigida y expresión heteróloga se observó que cualquier mutación TPMT\*3 individual conduce a una reducción parcial en la actividad catalítica, mientras que la presencia de ambas mutaciones conduce la pérdida total de la actividad.

TPMT\*3B (G460A, A154T). Este alelo contiene un solo cambio en el nucleótido en la posición 460 (G → A), dando por resultado una sustitución en el aminoácido 165 (Ala → Thr). Reduce 9 veces la actividad enzimática de TPMT.

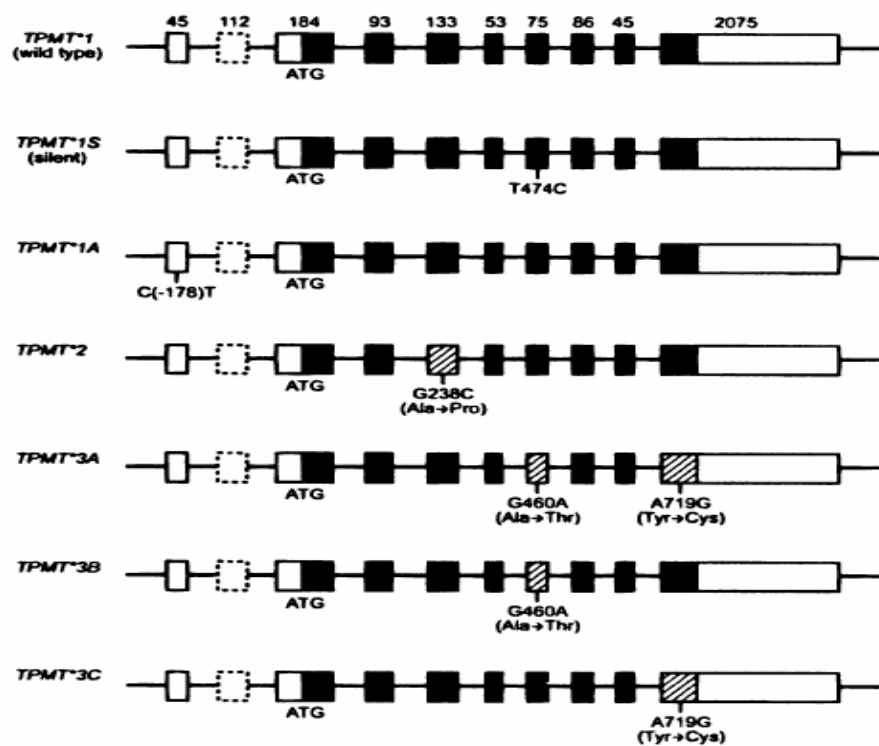
TPMT\*3C (A719G, Y240C). Este alelo contiene un solo cambio del nucleótido en la posición 719 (A → G), dando por resultado una sustitución en el aminoácido 240 (Tyr → Cys). Reduce 1.4 veces la actividad enzimática de TPMT.

Otros estudios han detectado la presencia de polimorfismos poco comunes: TPMT\*4, una transición de G → A que da como resultado la pérdida de un sitio de unión en el intrón localizado los exones 9 y 10, sustituyendo Gln por un codón de paro; TPMT\*5, una transición del nucleótido 146 (T → C) ocasionando un cambio en el codón 49 (Leu → Ser); TPMT\*6, una transversión en el nucleótido 539 (A → T) ocasionando un cambio en el codón 180 (Tyr → Phe); TPMT\*7, una transversión en el nucleótido 681 (T → G) ocasionando un cambio en el codón 227 (His → Glu); y TPMT\*8, una

transición en el nucleótido 644 (G → A) ocasionando un cambio en el codón 215 (Arg → His). La mayoría de estos alelos han sido identificados en sujetos heterocigotos que presentan una actividad catalítica TPMT intermedia [McLeod y Siva, 2002].

### I.3.4. Consecuencias de la deficiencia enzimática

Como se ha descrito, los polimorfismos genéticos de la enzima TPMT ocasionan un cambio funcional importante en la actividad catalítica. Individuos que muestran un genotipo de baja o nula actividad de TPMT tienen un mayor riesgo de presentar mielosupresión y toxicidad hematopoyética debido a la acumulación de los NTG cuando son tratados con tiopurinas a dosis terapéuticas.



**Figura 3.** Variantes alélicas de la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT). Los rectángulos de color negro representan a los exones, las blancas son regiones sin traducir y aquellos que están sombreados representan a exones con mutaciones resultando en cambios de aminoácidos [Krynetski y Evans, 1999].

Dada la naturaleza potencialmente fatal de la toxicidad hematopoyética y la inhabilidad de medir exactamente la actividad de TPMT cuando han sido transfundidos con paquetes globulares, la implementación de un método confiable que determine el genotipo de TPMT permitirá la identificación anticipada de pacientes con riesgo.

#### **I.4. Pruebas de ADN como método de detección de polimorfismos genéticos**

La integración del diagnóstico molecular en la práctica representa una nueva y mayor oportunidad para guiar la medicina hacia la selección de dosis, ruta de administración y combinación de múltiples fármacos que produzcan el incremento de la eficacia y reduzcan la toxicidad de los productos farmacéuticos.

Durante los siguientes 5 a 10 años, la aplicación clínica del diagnóstico molecular revolucionará el descubrimiento de fármacos y el sistema de liberación tejido-específico; además, mejorará el régimen de dosificación y rutas de administración, lo cual repercutirá en la personalización del cuidado médico.

La secuenciación del genoma humano y el desciframiento de la información genética con tecnología innovadora, tales como la imagen funcional, los biosensores y la biología computacional, están produciendo cambios sin precedentes en el cuidado de la salud. Incluso, se esperan grandes avances en el uso de medicamentos genéticamente prescritos.

Como se ha mencionado repetidamente, en el genoma humano existe más de un millón de marcadores genéticos conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido o

SNP's (de sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), los cuales son blancos de detección en estudios de genotipificación y fenotipificación. Constantemente, emergen nuevas estrategias de genotipificación, como los microarreglos y los chips de oligonucleótidos; que permiten la identificación de genes para enfermedades complejas tales como asma, diabetes mellitus, aterosclerosis y desórdenes neurodegenerativos.

En oncología, la tecnología de SNP se ha enfocado en detectar la predisposición al cáncer con el fin de predecir la respuesta toxicológica a fármacos y la selección del fármaco anticancerígeno más conveniente [Ross y Ginsburg, 2003].

#### **I.4.1. Pruebas de ADN y detección molecular**

Existen varias pruebas para analizar el DNA; sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es la técnica más ampliamente utilizada en laboratorios de investigación y tiene muchas aplicaciones en diferentes áreas del diagnóstico, entre los que se incluyen la detección de enfermedades infecciosas, los estudios de parentesco y el control de calidad en alimentos, entre otras.

La técnica de PCR tiene la ventaja de ser rápida y poco laboriosa (comparada con otras pruebas moleculares). Al ser una de las técnicas de mayor aplicabilidad, se han desarrollado diferentes adaptaciones y variantes par resolver problemáticas específicas, tal es el caso de las técnicas PCR alelo específico y PCR-RFLP que se utilizan para detectar SNP's.

#### **I.4.2. Detección molecular de TPMT**

Los polimorfismos SNP de TPMT se han determinado principalmente mediante variantes de la técnica de PCR. Utilizando PCR-RFLP se han detectado los alelos TPMT\*3A, TPMT\*3B, TPMT\*3C. La técnica se fundamenta en el hecho de que el SNP está implicado en la pérdida o ganancia de un sitio de reconocimiento por una enzima de restricción o endonucleasa, lo cual genera diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción. Otra variante utilizada con frecuencia es el PCR alelo específico, el cual ha sido utilizado para detectar el polimorfismo TPMT\*2. Esta técnica se fundamenta en utilizar un oligonucleótido no específico para el alelo (ONE) que hibrida en una región anti-sentido distante (no mayor a 1 kb) al polimorfismo y un par de oligonucleótidos alelo-específicos (OE), que hibridan de manera diferencial en los alelos silvestre y mutante, respectivamente.

## II. JUSTIFICACIÓN

La elucidación de los mecanismos moleculares y las consecuencias bioquímicas de la deficiencia de la enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) demuestra como los rasgos genéticos asociados a deficiencias enzimáticas pueden ser utilizados para identificar y caracterizar poblaciones.

La implementación de un protocolo molecular que permita la detección rápida de un polimorfismo genético asociado a la variabilidad en una actividad enzimática ofrece una alternativa metodológica viable, sobretodo cuando el protocolo de detección de la actividad por métodos bioquímicos es costoso o riesgoso (mediante HPLC o usando radioactividad), tal como es caso para la enzima TPMT humana.

Los estudios que ilustran la utilización de la farmacogenética para la optimización de la terapia y la reducción de los efectos colaterales en subgrupos poblacionales genéticamente distintos ofrecen la oportunidad de conducir adecuadamente y optimizar los recursos destinados para la preservación de la salud.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. Objetivo general**

Implementar la técnica PCR tetra-primer como método de detección molecular del polimorfismo TPMT\*2 en humanos.

#### **III.2. Objetivos específicos**

1. Diseñar un juego de 4 oligonucleótidos que permitan amplificar la región polimórfica de TPMT\*2 utilizando aplicaciones bioinformáticas.
2. Obtener ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante un protocolo estándar de laboratorio.
3. Implementar la técnica PCR tetra-primer para detectar el polimorfismo TPMT\*2.
4. Optimizar las condiciones de la reacción de PCR tetra-primer mediante un ensayo experimental ortogonal.

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **IV.1. Reactivos químicos y soluciones**

Los reactivos químicos para soluciones estándar de biología molecular fueron adquiridos a través de los representantes en México de Biorad, IBI, JT Baker y Sigma-Aldrich: ácido clorhídrico, agarosa, bicarbonato de sodio, bromuro de etidio, cloruro de amonio, EDTA, hidróxido de sodio, Tris.

Las soluciones amortiguadoras de trabajo (Lisis, TE, TAE) y el amortiguador de carga para ADN fueron preparadas siguiendo los procedimientos estándar de laboratorio (Sambrook y col., 1989). Las soluciones que contienen bromuro de etidio fueron preparadas y dispuestas de acuerdo a los procedimientos de laboratorio y las reglas de seguridad pertinentes.

### **IV.2. Materiales biológicos**

La enzima *Taq* ADN polimerasa, los amortiguadores 10X para PCR (con o sin  $Mg^{2+}$ ) y la solución 25mM de  $MgCl_2$  fueron adquiridos del representante en México de *Roche Biochemicals*. Los deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y los marcadores de PM conocidos (2-log y 50 pb *DNA Ladder*) fueron adquiridos del representante en México de *New England Biolabs*.

### **IV.3. Equipo**

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador *Gradient Master Cycler™* de *Eppendorf*. La separación de fragmentos de ADN fue realizada utilizando una cámara de electroforesis *Mini Sub-Cell GT™* de *Biorad*. La visualización y análisis de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio fue realizada utilizando un fotodocumentador *GelDoc™* 2000 y el paquete computacional *QuantityOne™* de *Biorad*.

### **IV.4. Diseño de Oligonucleótidos**

El diseño de los oligonucleótidos y el cálculo de las tallas moleculares de los fragmentos esperados fue realizado utilizando como molde la secuencia del gen *tpmt* humano reportada en la base de datos del *GenBank™* (No. AB045146) y el programa computacional OLIGO v4.0 para Mac.

Adicionalmente, el programa ARMS-PCR, disponible en línea vía internet, fue utilizado para diseñar los cuatro oligonucleótidos utilizados para la detección del polimorfismo TPMT\*2: TPMT\*2FO y TPMT\*2RO los cuales hibridan en la región que flanquean el sitio polimórfico; TPMT\*2FG y TPMT\*2RC que hibridan de manera específica con los alelos silvestre y mutante, respectivamente (ver Tabla 1).

Los oligonucleótidos sintéticos fueron adquiridos de la compañía *Genosys Inc.*, representados por Sigma-Aldrich de México.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar un fragmento del gen TPMT humano y detectar el polimorfismo TPMT\*2.

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tm (°C)
TPMT*2FO	AAATTTTAATGGGCAGTGCTGATTTAGA	74
TPMT*2RO	TCTACAGTGAATCTGCGTGCTAAATAG	80
TPMT*2FG	GTGTAAATGTATGATTTTATGCAGGTATG	66
TPMT*2RC	CAACTACACTGTGTCCCCGGTCAGG	70

#### IV.5. ADN genómico humano TPMT\*2

Muestras de ADN genómico provenientes de dos individuos (un homocigoto TPMT\*2/\*2 y otro heterocigoto TPMT\*2/\*3A) fueron amablemente proporcionadas por el *Dr. William E. Evans* del *St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN)* y utilizadas como controles positivos.

#### IV.6. Extracción de ADN genómico humano

A partir de voluntarios sanos, se obtuvieron muestras de sangre periférica total (SPT) mediante punción venosa. Los leucocitos fueron aislados siguiendo un protocolo reportado, ligeramente modificado [de Vries y col., 2001] y el ADN fue obtenido siguiendo un protocolo estándar. Brevemente, 40 µL de SPT fueron mezclados con 2 mL de una solución de lisis fría e incubada durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada durante 3 min a 750 Xg y el paquete celular fue resuspendido en 40 µL de una solución 1X de TE. Para la extracción de ADN, 20 µL de la suspensión celular fueron transferidos a un microtubo de 1.5 mL y mezclados con 600 µL de una solución

50mM de NaOH. La lisis celular fue favorecida mediante 10 seg de agitación vórtex, seguidos de 5 min a 95°C. La mezcla fue neutralizada, posteriormente, con 60 µL de una solución 1M de Tris-HCl (pH 8.0) y agitada durante 10 seg en vórtex. El lisado leucocitario fue centrifugado durante 1 minuto a máxima velocidad y el sobrenadante clarificado fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

#### IV.7. Reacción de PCR estándar

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando las condiciones estándar para una reacción. En microtubos para PCR, se mezclaron los siguientes volúmenes (µL):

Componente	1	2	3	4	5	Conc. Final
ADNg [10-20 ng/µL]	5	5	5	5	5	50-100 ng
10X Amortiguador para PCR	2	2	2	2	2	1X
2.5mM de dNTP	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	200µM
10 µM de TPMT*2FO	0.8	0.8	-	0.8	-	400nM
10 µM de TPMT*2FG	-	-	0.8	0.8	-	400nM
10 µM de TPMT*2RO	0.8	-	0.8	0.8	-	400nM
10 µM de TPMT*2RC	-	0.8	-	0.8	-	400nM
Taq ADN pol [5 U/µL]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1 U
Agua destilada estéril	9.6	9.6	9.6	8	11.2	-

Las mezclas de reacción fueron colocadas en un termociclador y se realizó una amplificación utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 35 ciclos de amplificación exponencial a 94°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min; y 1 ciclo de amplificación final de 72°C durante 7 min. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### IV.8. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación del gen de tpmt humano fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (1 a 2.5% en solución TAE) y teñidos con el agente intercalante bromuro de etidio. La talla molecular de cada fragmento fue calculada mediante comparación con marcadores de peso molecular.

#### IV.9. Reacción de PCR tri-primer

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando las condiciones estándar para una reacción. En microtubos para PCR, mezclar los siguientes volúmenes ( $\mu\text{L}$ ):

Componentes	1	2	3	4	Conc. Final
ADNg [10-20 ng/ $\mu\text{L}$ ]	2	2	2	-	20-40 ng
10X Amortiguador para PCR	1	1	1	1	1X
2.5mM de dNTP	0.8	0.8	0.8	0.8	200 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2FO	0.4	0.4	0.4	0.4	400nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2FG	-	0.4	-	-	400nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2RO	0.4	0.4	0.4	0.4	400nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2RC	-	-	0.4	-	400nM
Taq ADN pol [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	0.1	0.1	0.1	0.1	1 U
Agua destilada estéril	5.3	4.9	4.9	7.3	-

Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador y se realizó una amplificación usando las condiciones previamente utilizadas (sección IV.7.). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

## **IV.10. Optimización de las condiciones de PCR utilizando ADN genómico de individuos no portadores de TPMT\*2**

### **IV.10.1. Temperatura de hibridación y relación molar de oligonucleótidos**

Para optimizar las variables de temperatura de hibridación (45, 50 y 55°C) y relación molar de oligonucleótidos OI:OE (10:1, 1:1, 1:10), se utilizó ADN genómico de individuos voluntarios no portadores de TPMT\*2 y un esquema de experimentación basado en una matriz 3 x 3.

Temperatura (°C)	Relación OI:OE		
	10:1	1:1	1:10
45	45, 10:1	45, 1:1	45, 1:10
50	50, 10:1	50, 1:1	50, 1:10
55	55, 10:1	55, 1:1	55, 1:10

Las mezclas de reacción fueron preparadas de manera similar a la amplificación estándar (Sección IV.7.) con algunos pequeños ajustes: las concentraciones finales de los oligonucleótidos fueron 400 o 40 nM, mayor y menor respectivamente, y el volumen final de reacción fue de 10 µL.

Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador y se realizó una amplificación programada para un gradiente  $50 \pm 5.4$  °C en la temperatura de hibridación. Las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 35 ciclos de amplificación exponencial a 94°C durante 30 seg, 45, 50 o 55 °C durante 30 seg y 72°C durante 1 min; y 1 ciclo de amplificación final de 72°C durante 7 min. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### IV.10.2. Ensayo ortogonal de optimización de 4 variables

Para optimizar la concentración de cada par de los oligonucleótidos, FO/RC (amplificación del alelo mutante) y FG/RO (amplificación del alelo silvestre), la concentración de  $Mg^{2+}$  y la concentración de los deoxirribonucleótidos (dNTP's), se realizó un ensayo basado en un arreglo ortogonal [Waterfall y col., 2001].

VARIABLES	CONDICIONES		
	A	B	C
FG/RO (nM), par silvestre	200	400	800
FO/RC (nM), par mutante	200	400	800
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	1.5	2.0
dNTP (μM)	100	200	300

Reacción	FG/RO (wt)	FO/RC (mt)	MgCl <sub>2</sub>	dNTP
1	A	A	A	A
2	A	B	B	B
3	A	C	C	C
4	B	A	B	C
5	B	B	C	A
6	B	C	A	B
7	C	A	C	B
8	C	B	A	C
9	C	C	B	A

Las diferentes reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μL conteniendo 50-100 ng de ADN genómico humano, 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa, solución amortiguadora para PCR libre de  $Mg^{2+}$ , y las cantidades necesarias de cada variable a partir de las soluciones concentradas: 10 μM de cada uno de los oligonucleótidos (FO, RO, FG, RC), 25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2.5 mM de dNTP.

La amplificación se realizó usando las condiciones de termociclado previamente utilizadas (Sección IV.7.). Los productos fueron analizados mediante electroforesis de gel de agarosa.

## **IV.11. Optimización de las condiciones de PCR utilizando ADN genómico de individuos portadores de TPMT\*2**

### **IV.11.1. Temperatura de hibridación y cantidad de ADN genómico**

Utilizando ADN genómico de individuos portadores del polimorfismo TPMT\*2, primeramente se realizó una matriz de 3x3 para optimizar 2 variables: la temperatura de hibridación (50, 55 y 60°C) y la concentración de ADN genómico (20, 30 y 40 ng)

Temperatura (°C)	ADN genómico (ng)		
	20	30	40
50	50, 20	50, 30	50, 40
55	55, 20	55, 30	55, 40
60	60, 20	60, 30	60, 40

Las mezclas de reacción fueron preparadas de manera similar a la amplificación estándar (Sección IV.7.) considerando los ajustes respectivos a la cantidad de ADN por reacción. Además, el cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) fue suplementado a una concentración final de 2.0 mM. Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador y se realizó una amplificación programada para un gradiente  $55 \pm 5.2$  °C, usando las condiciones previamente utilizadas (Sección IV.10.1.). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### IV.11.2. Ensayo ortogonal de optimización de 4 variables

Para optimizar las condiciones del PCR tetra-primer utilizando ADN genómico de individuos portadores del polimorfismo TPMT\*2 se siguió un ensayo ortogonal tal como se describió en la Sección IV.10.2.

#### IV.12. Amplificación de la variante de TPMT\*2 en condiciones de reacción óptimas

Para determinar la transversión G238C, característico del polimorfismo TPMT\*2 humano, se realizó el PCR tetra-primer utilizando las condiciones óptimas y ADN genómico de individuos portadores y no portadores de la mutación. En microtubos para PCR, se mezclaron los siguientes volúmenes ( $\mu\text{L}$ ):

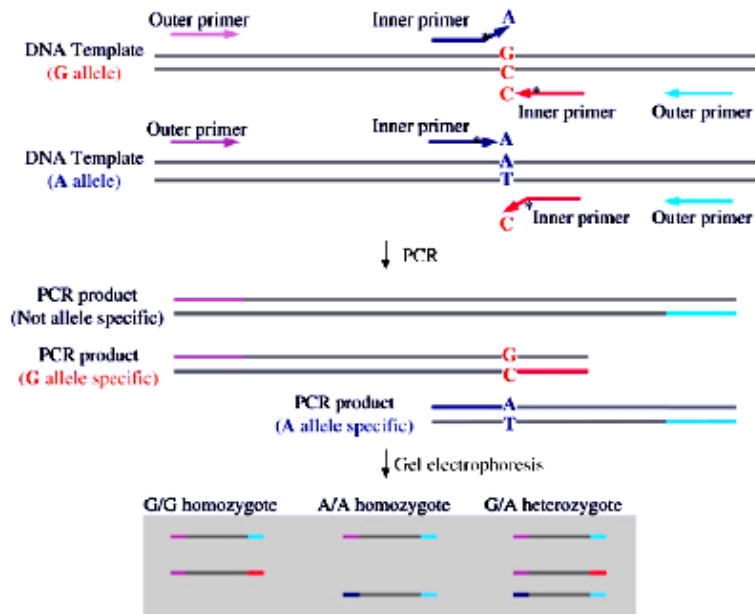
Componente	*2/*2	*2/*3A	*1/*1	Conc. Final
ADNg *2/*2 [10 ng/ $\mu\text{L}$ ]	2	-	-	20 ng
ADNg *2/3A [20 ng/ $\mu\text{L}$ ]	-	1	-	20 ng
ADNg *1/*1 [10-20 ng/ $\mu\text{L}$ ]	-	-	5	50-100 ng
10X PCR Amortiguador – sin $\text{Mg}^{2+}$	2.5	2.5	2.5	1X
25mM $\text{MgCl}_2$	2	2	2	2 mM
2.5mM de dNTP	3	3	3	200 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2FO	2	2	2	400 nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2FG	0.5	0.5	0.5	400 nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2RO	0.5	0.5	0.5	400 nM
10 $\mu\text{M}$ de TPMT*2RC	2	2	2	400 nM
Taq ADN pol [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	0.25	0.25	0.25	1 U
Agua destilada estéril	10.25	11.25	7.25	-

Las reacciones de PCR fueron colocadas en un termociclador y se realizó una amplificación utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 35 ciclos de amplificación exponencial a 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 1 min; y 1 ciclo de amplificación final de 72°C durante 7 min. Los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### V.1. PCR tetra-primer para detectar el polimorfismo TPMT\*2 en humanos

Para determinar la transversión G238C del gen *tpmt* humano (polimorfismo TPMT\*2) se implementó una variante de la técnica de PCR alelo específico denominada “PCR tetra-primer”. La reacción consiste colocar en la misma mezcla de reacción cuatro oligonucleótidos iniciadores: dos diseñados para hibridar en regiones conservadas del gen (que flanquean el sitio de la mutación), un tercero (en orientación sentido) diseñado para hibridar en la región donde se localiza el alelo silvestre y un cuarto (en orientación anti-sentido) diseñado para hibridar en la región donde se localiza el alelo mutante (Figura 4).

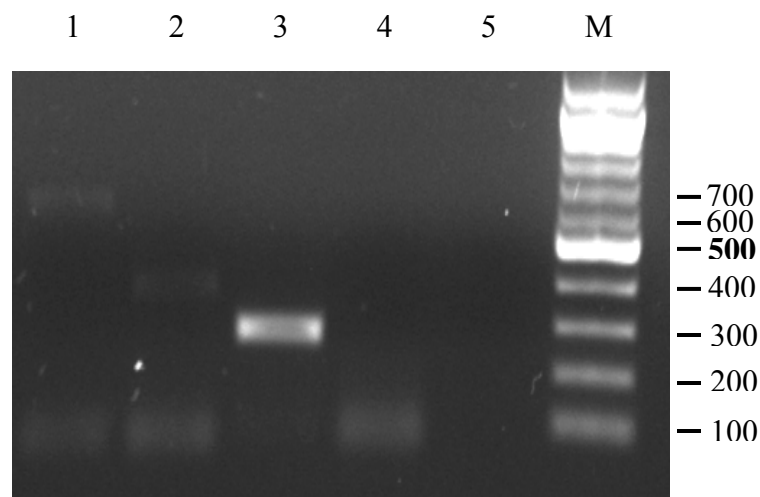


**Figura 4.** Representación esquemática de una reacción de PCR tetra-primer. Los alelos están representados con A o G. [Ye y col., 2001]

El diseño de la técnica PCR tetra-primer para detectar TPMT\*2 considera la amplificación de un fragmento de alto peso molecular (625 pb, utilizado como control interno), un fragmento de bajo peso molecular (283 pb, específico para el alelo silvestre) y un fragmento de mediano peso molecular (396 pb, específico para el alelo mutante). De esta manera, será posible identificar el genotipo molecular de TPMT\*2 en humanos: homocigoto silvestre (625 y 283 pb), heterocigoto (625, 396 y 283 pb) y homocigoto mutante (625 y 396 pb).

## V.2. Amplificación de fragmentos del gen *tpmt* silvestre

Como etapa inicial, se amplificaron los fragmentos de 625 y 283 pb a partir de ADN genómico (ADNg) de un individuo no portador del polimorfismo TPMT\*2. Como se puede observar en la Figura 5, se amplificaron los tres productos del tamaño esperado.

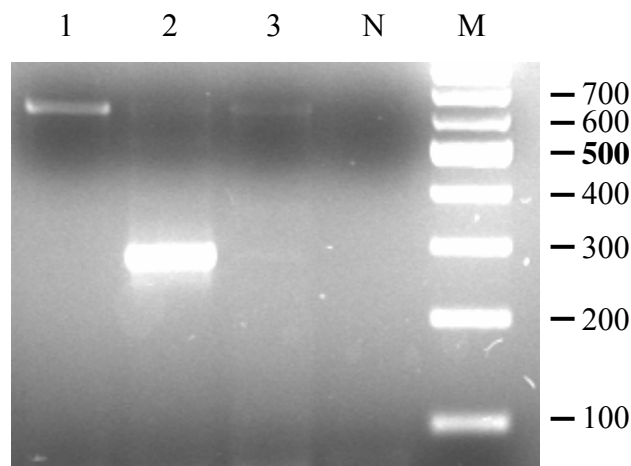


**Figura 5.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etido. Carriles: 1, FO/RO; 2, FO/RC; 3, RO/FG; 4, FO/RO/FG/RC; 5, negativo; M, marcador de peso molecular. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

Es evidente que los oligonucleótidos hibridan en las regiones esperadas; sin embargo, debido a que las condiciones de termociclado fueron muy laxas, la concentración de los productos es muy variable: el fragmento de 625 pb (carril 1, FO/RO) se ve muy tenue, en tanto que se observa una banda intensa en el carril 3, RO/FG (283 pb), correspondiente a la amplificación del fragmento silvestre.

Además, hay que hacer notar que se observa un producto de bajo rendimiento en el carril 2, FO/RC (396 pb), correspondiente a la amplificación del fragmento mutante. Esto es indicativo de que las condiciones de termociclado no son lo suficientemente astringentes para discernir adecuadamente el genotipo molecular. Por otro lado, no fue posible amplificar ninguno de los tres fragmentos cuando están presentes los cuatro oligonucleótidos iniciadores en el mismo tubo de reacción (carril 4), haciendo evidente que las condiciones y concentraciones de los componentes de reacción no eran las adecuadas.

Paralelamente, se realizaron amplificaciones con tres oligonucleótidos en la



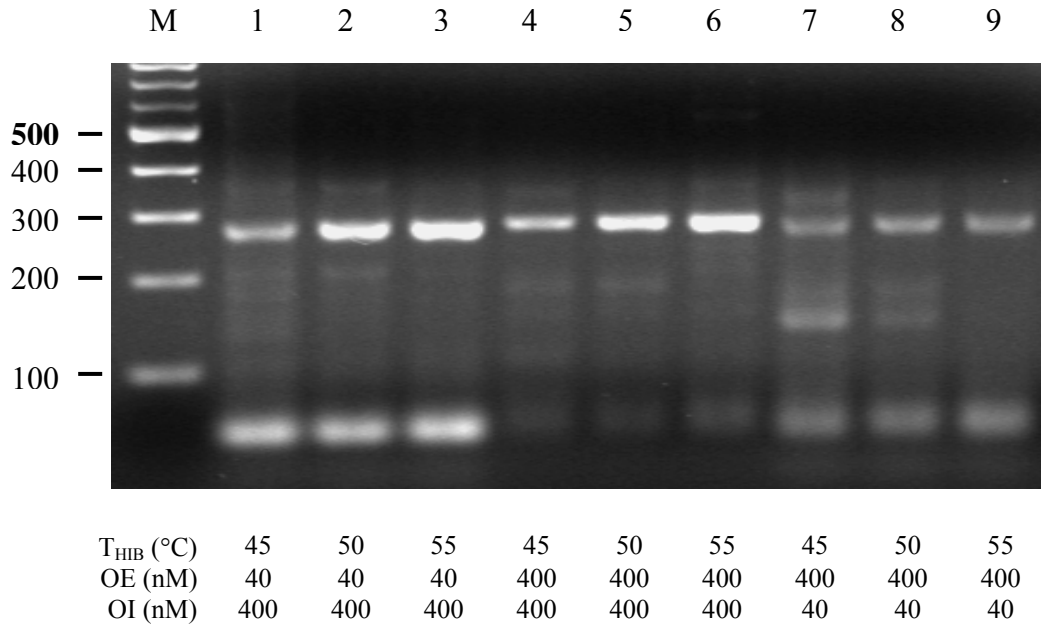
**Figura 6.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. Carriles: 1, FO/RO; 2, FO/RO/FG; 3, FO/RO/RC; N, negativo; M, marcador de peso molecular. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

misma reacción, esto con la intención de detectar simultáneamente los fragmentos específicos para el alelo silvestre (283 pb) y el control de alto peso molecular (625 pb). En la Figura 6 se observa una amplificación pobre del fragmento de 625 pb (carriles 1-3); sin embargo, se observa un alto rendimiento en la amplificación del fragmento 283 pb (carril 2). Esta variación en el rendimiento de las diferentes amplificaciones sugiere que la concentración de oligonucleótidos debe ser optimizada.

### **V.3. Optimización de la amplificación del fragmento silvestre**

En la primera fase de optimización, se consideraron como variables significativas la temperatura de hibridación ( $T_{HIB}$ ) y la relación molar entre los oligonucleótidos externos (OE) e internos (OI). Para esto, se diseñó una matriz 3x3 que consideró las  $T_{HIB}$  de 45, 50 y 55 °C, así como las relaciones molares OE:OI de 10:1, 1:1 y 1:10.

En la Figura 7 se muestran los productos obtenidos en las 9 reacciones de PCR. Como se puede observar en los carriles 1-6, las relaciones molares 10:1 y 1:1 (de OE:OI) se amplifica el producto de 283 pb a un buen rendimiento; el cual, además, aumenta en concentración con respecto al aumento de temperatura (carriles 3 y 6). Sin embargo, independientemente de la temperatura, la relación 10:1 (carriles 1-3) favorece la formación de dímeros, lo cual no es deseable en reacciones múltiplex. Por otro lado, la amplificación se observa menos favorecida en la relación 1:10 (carriles 7-9); y, además, permite la formación de dímeros y amplificaciones inespecíficas.



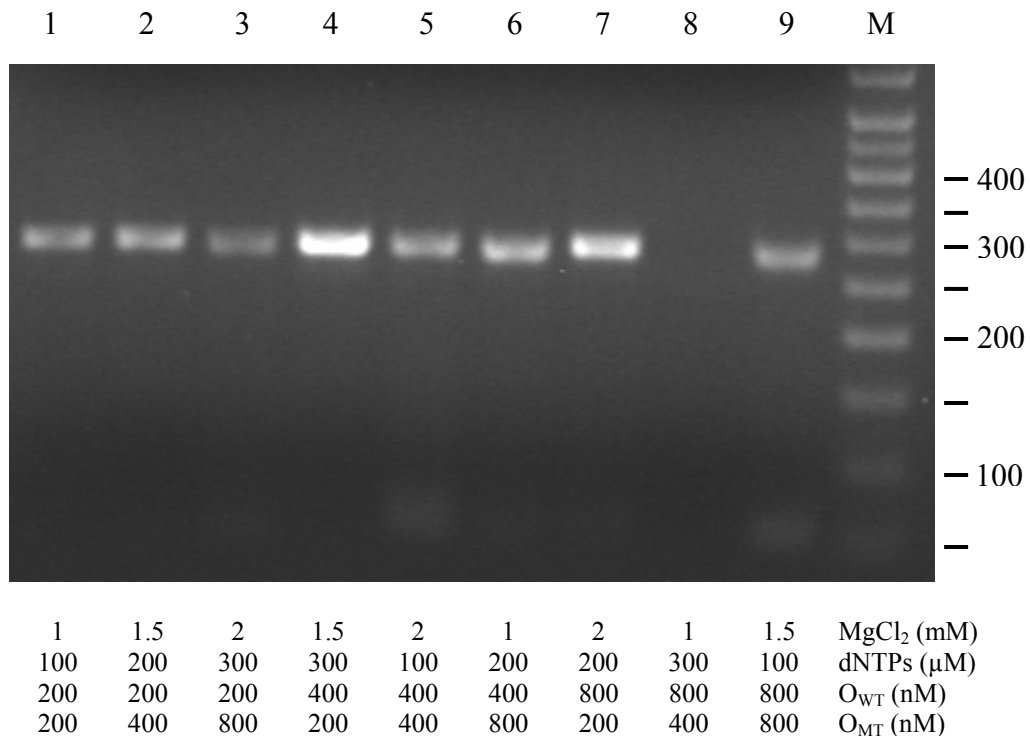
**Figura 7.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. La información correspondiente a cada condición o concentración se muestra en la parte inferior. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la izquierda del gel.

Considerando estos resultados, se estableció a la relación molar 1:1 (OE:OI) y la  $T_{HIB}$  de 55 °C como las condiciones apropiadas para amplificar el fragmento silvestre del gen *tpmt* humano. No obstante, la formación de dímeros fue una preocupación que se consideró para la siguiente etapa de optimización.

En la segunda fase de la optimización, se consideraron como variables significativas las concentraciones de  $Mg^{+2}$  y de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), así como la relación molar entre los oligonucleótidos que amplifican el fragmento silvestre ( $O_{WT}$ ) y el mutante ( $O_{MT}$ ), respectivamente. Para optimización, se implementó un ensayo ortogonal que considera 9 permutaciones de las tres variables.

En la Figura 8 se muestran los productos de las 9 reacciones. Como se puede observar, en la mayoría de las reacciones se amplificó el fragmento de 283 pb (en 8 de 9), en las cuales el rendimiento es muy variable. De acuerdo a un análisis meramente visual de la intensidad de la banda, se puede considerar que las condiciones de amplificación utilizadas en las reacciones 4 y 7 rinden una mayor concentración del producto silvestre del gen *tpmt* humano.

Algo interesante de notar es el hecho de que se redujo de manera significativa la formación de dímeros de oligonucleótidos; además, la ausencia del producto en la reacción 8 puede deberse a una baja concentración de magnesio y una alta concentración de dNTPs, lo cual en conjunto podría ser motivo de un pobre o nulo rendimiento.

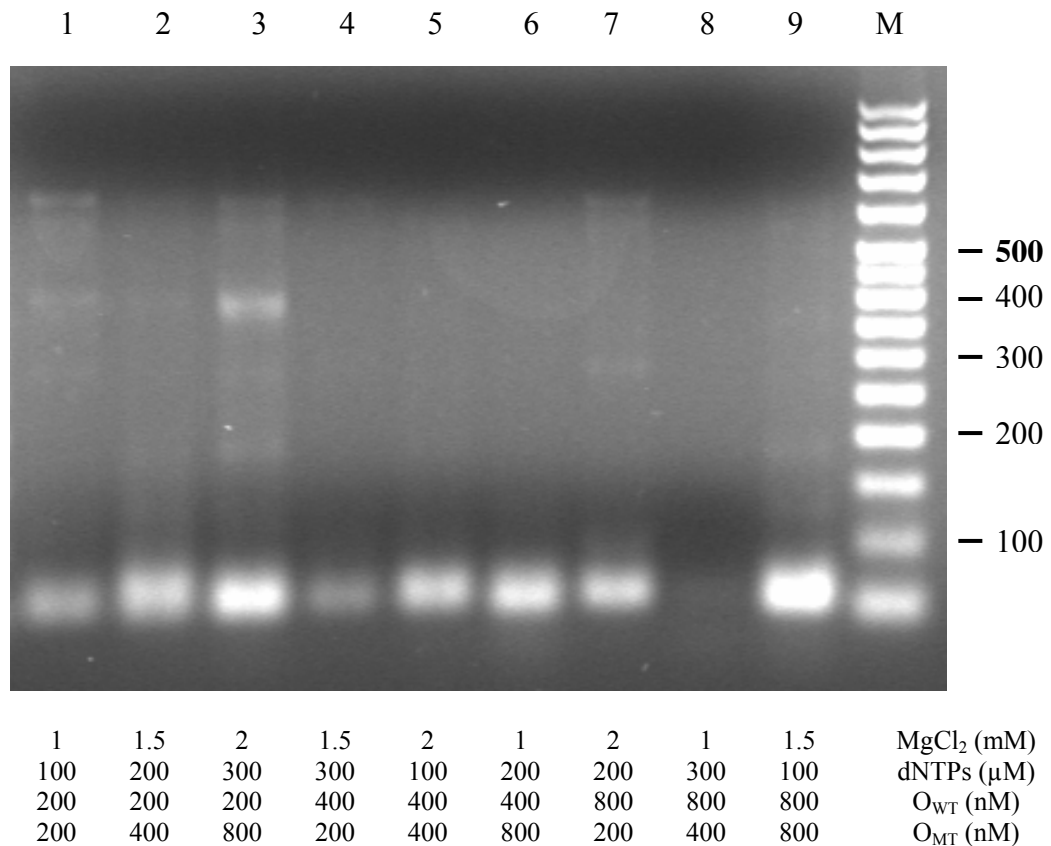


**Figura 8.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. La información correspondiente a cada condición o concentración se muestra en la parte inferior. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

#### V.4. Optimización de la amplificación del fragmento mutante

Para optimizar la reacción de amplificación del fragmento mutante (396 pb) del gen *tpmt* humano se implementó el ensayo ortogonal considerando las mismas variables utilizadas en la optimización de la amplificación del fragmento silvestre, con la diferencia de que se utilizó el ADN de un individuo homocigoto TPMT\*2/\*2.

Como se puede apreciar en la Figura 9, la amplificación fue poco exitosa ya que sólo se observa el producto de 396 pb en el carril 3; además, se observa una pobre



**Figura 9.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. La información correspondiente a cada condición o concentración se muestra en la parte inferior. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

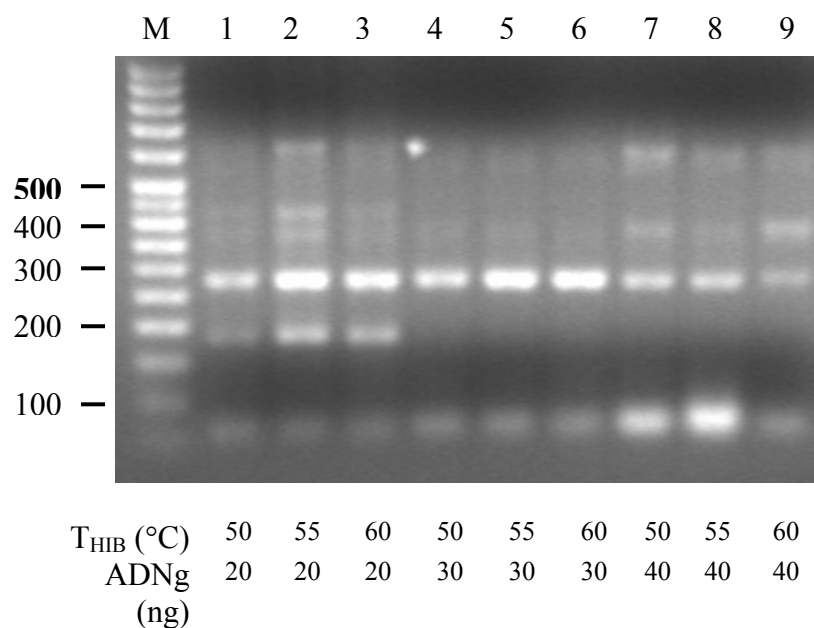
amplificación del producto de 625 pb. Sin embargo, también son evidentes otros productos de amplificación (inespecífica) y la formación de dímeros de oligonucleótidos.

Ante esta situación, se consideró que la temperatura de hibridación no era lo suficiente astringente para evitar tales inespecificidades. Además, la pobre amplificación es sugerente de una limitación del sustrato (en este caso ADNg). Por lo tanto, como fase final de la optimización se consideró la realización de un ensayo basado en una matriz 3x3, donde se utilizaron como variables significativas la temperatura de hibridación y la cantidad inicial de ADN genómico.

#### **V.5. Optimización de la reacción de PCR tetra-primer**

Para optimizar la reacción PCR tetra-primer, se utilizó un ADN heterocigoto (\*2/\*3A), con el fin de observar simultáneamente todos los fragmentos en la misma amplificación: 283 pb (alelo silvestre), 396 pb (alelo mutante), y 625 pb (control).

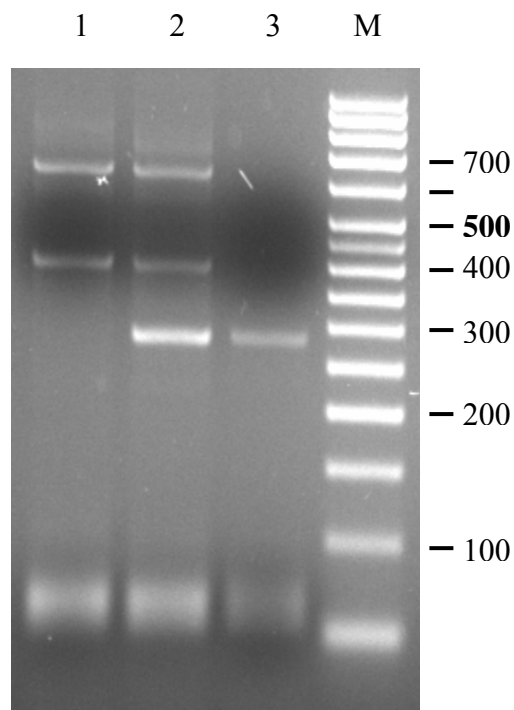
Como se puede observar en la Figura 10, a una  $T_{HIB}$  de 50 °C (carriles 1, 4 y 7) se amplifica el producto de 283 pb y muy pobremente el producto de 625 pb. Sin embargo, también se observan otros productos de amplificación (inespecífica). En tanto que a una  $T_{HIB}$  de 55 °C (carriles 2, 5 y 8) se observan los tres fragmentos; sin embargo, la amplificación de los productos de 396 y 625 pb fue muy pobre. Por otro lado, a una  $T_{HIB}$  de 60 °C (carriles 3, 6 y 9) se observaron los tres productos; aunque con diferentes rendimientos.



**Figura 10.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. La información correspondiente a cada condición o concentración se muestra en la parte inferior. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la izquierda del gel.

## V.6. Detección molecular del polimorfismo TPMT\*2 mediante PCR tetra-primer

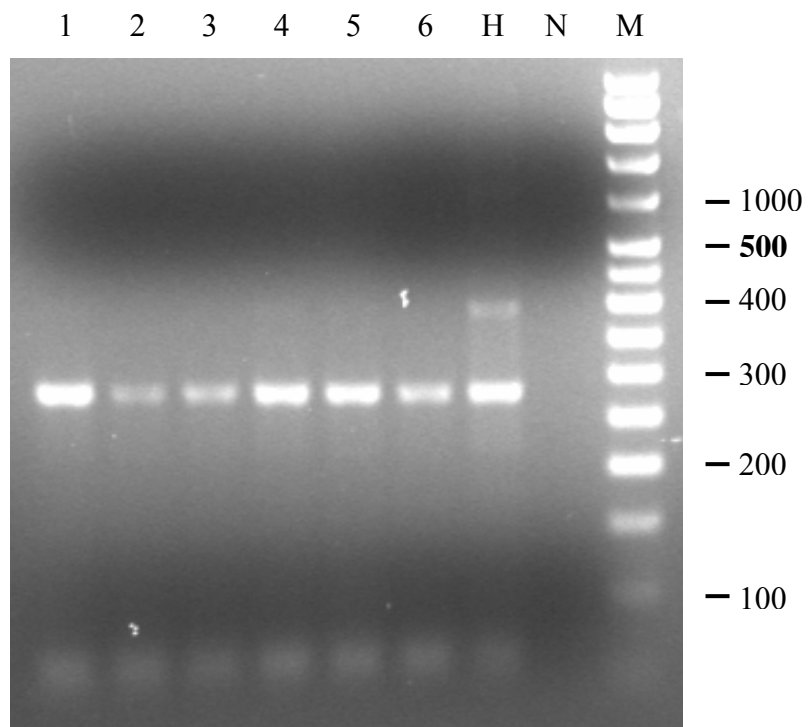
Utilizando las condiciones óptimas, se realizó una reacción de PCR tetra-primer utilizando el ADNg homocigoto mutante (TPMT\*2/\*2), heterocigoto (TPMT\*2/\*3A) y silvestre (TPMT\*1/\*1). Las condiciones utilizados fueron las siguientes: 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 μM de dNTPs, 0.8 y 0.2 μM de cada par de oligonucleótidos (mutante y silvestre, respectivamente). Se utilizó un  $T_{HIB}$  de 60 °C y la cantidad de ADNg de alta pureza de 20 ng.



**Figura 11.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. Carriles: 1, homocigoto mutante (TPMT\*2/\*2); 2, heterocigoto (TPMT\*2/\*3A); homocigoto silvestre (TPMT\*1/\*1); M, marcador de peso molecular. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

Como se observa en la Figura 11, las condiciones de la amplificación permiten la discriminación entre individuos con diferentes genotipos moleculares para el polimorfismo TPMT\*2. Sin embargo, se aprecia que la amplificación del producto de 625 pb es poco reproducible, ya que no es evidente en uno de las reacciones (carril 3). Cabe mencionar que este hecho ya se ha reportado en la literatura como un evento que puede suceder en este tipo de variante de PCR.

Finalmente, utilizando las condiciones de reacción optimizadas, se realizó el análisis molecular de 6 muestras de ADN<sub>g</sub> proveniente de individuos voluntarios. Como era de esperarse, sólo se observa el producto de 283 pb (correspondiente al genotipo silvestre TPMT\*1/\*1); hay que hacer notar la ausencia del producto de 625 pb.



**Figura 12.** Separación de productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etido. Carriles 1-6, muestras de individuos voluntarios; H, control heterocigoto TPMT\*2/\*3A; N, control negativo; M, marcador de peso molecular. El peso molecular de los marcadores (en pb) se indica a la derecha del gel.

## **VI. CONCLUSIONES**

Mediante una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), denominada PCR tetra-primer, se logró identificar la mutación puntual que caracteriza al genotipo molecular TPMT\*2 de la enzima tiopurina S-metiltransferasa de humano.

Mediante un ensayo ortogonal basado en la evaluación estadística de 4 variables fue posible la optimización de las condiciones de reacción y termociclado para una amplificación exitosa. En condiciones óptimas, la reacción de PCR tetra-primer permite identificar ADN genómico con genotipo homocigoto mutante, heterocigoto y homocigoto silvestre.

Finalmente, se hizo evidente la aplicación de una metodología de detección molecular para mutaciones y polimorfismos genéticos; las cuales pueden ser de gran apoyo para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades o para la prevención de efectos no deseados o tóxicos durante el tratamiento terapéutico, tal como en el caso del tratamiento con tiopurinas.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Ames MM, Selassie CD, Woodson LC, Van Loon JA, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase: structure-activity relationships for benzoic acid inhibitors and thiophenol substrates. *J Med Chem.* 1986;29(3):354-8.
- Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet.* 1999;8(2):367-70.
- Cara CJ, Pena AS, Sans M, Guerrero EM, Hinojosa J, Paredes JG, Guijarro LG. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10(11): 247-54
- de Vries JE, Wijnen PA, Hamulyák K, van Dieijen-Visser MP, Bekers O. PCR on cell lysates obtained from whole blood circumvents DNA isolation. *Clin Chem.* 2001;47(9):1701-2.
- Gallego García MC, Escrivá Muñoz JJ, Colomina Mañá MT. Estudios farmacogenéticos en ensayos clínicos: aspectos éticos y legales. *Farmacia Hospitalaria* 2001;25(6):366-70.
- Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet.* 1999;8(2):371-6.
- Johnson JA, Evans WE. Molecular diagnostics as a predictive tool: genetics of drug efficacy and toxicity. *Trends Mol Med.* 2002;8(6):300-5.

- Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 8va. Edición. Manual Moderno. 2002
- Krynetski EY, Evans WE. Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. *Pharm Res.* 1999;16(3):342-9.
- Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. Evans WE. A single point mutation to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:949-53.
- McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2002;3(1):89-98.
- OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, \*187680, - Thiopurine S-Methyltransferase; TPMT.
- Ross JS, Ginsburg GS. The integration of molecular diagnostics with therapeutics: Implications for drug development and pathology practice. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003, 119: 26-36.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J.* 2006;6:16-21.
- Waterfall CM, Cobb BD. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucleic Acids Research* 2001;29(23):E119
- Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet.* 1980;32:651-62.

Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metabolism and Disposition* 2001; 29 (4): 601-5.

Wolf CR, Smith G, Smith RL. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *BMJ*. 2000;320(7240):987-90.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(17):E88-8.