



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS Y FRECUENCIAS ALÉLICAS
DE POLIMORFISMOS EN *UGT1A9*, EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS MEXICANOS CANDIDATOS A TRATAMIENTO
CON ÁCIDO MICOFENÓLICO POSTRASPLANTE RENAL.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ROSALIA SANTILLÁN MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
VOCAL:	Profesor:	CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ
SECRETARIO:	Profesor:	BENJAMÍN ANTONIO RODRÍGUEZ ESPINO
1^{er} SUPLENTE:	Profesor:	NANCY MONROY JARAMILLO
2^o SUPLENTE:	Profesor:	TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN NEFROLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. BENJAMÍN ANTONIO RODRÍGUEZ ESPINO

SUSTENTANTE:

ROSALIA SANTILLÁN MARTÍNEZ

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	II
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 DESARROLLO DE LA FARMACOGENÉTICA Y LA FARMACOGENÓMICA	2
1.2 PGX EN TRASPLANTE RENAL	6
1.3 AMF Y UGT1A9	9
1.4 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS	17
II. JUSTIFICACIÓN	19
III. OBJETIVO	19
IV. MÉTODOS	20
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	21
4.2. TOMA DE MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ADN	21
4.3. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN	24
4.4. SECUENCIACIÓN DE <i>UGT1A9</i> POR EL MÉTODO DE LOS TERMINADORES	26
4.5 LECTURA EN EL SECUENCIADOR	28
V. RESULTADOS	29
5.1 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO	29
5.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR	31
5.3 SECUENCIACIÓN POR EL MÉTODO DE SANGER	32
5.4 FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS	37
VI. DISCUSIÓN	45
6.1 FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS	51
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1.	Gráfico de concentración plasmática vs tiempo.	3
Figura 1.2.	Farmacocinética.	3
Figura 1.3.	Enzimas que participan en el metabolismo de fármacos.	4
Tabla 1.1.	Biomarcadores genéticos.	7
Figura 1.4.	Obtención de AMF a partir del profármaco MMF.	9
Figura 1.5.	Mecanismo de acción del AMF	11
Figura 1.6.	Representación esquemática del metabolismo del AMF	12
Figura 1.7.	Localización del gen <i>UGT1A9</i>	13
Figura 1.8	Polimorfismos descritos en <i>UGT1A9</i>	14
Tabla 1.2.	Polimorfismos en <i>UGT1A9</i>	15
Tabla 1.3.	Polimorfismos de <i>UGT1A9</i> asociados con la farmacogenómica de otros fármacos.	16
Tabla 1.4.	Frecuencias genotípicas de SNPs en <i>UGT1A9</i> en cuatro poblaciones distintas.	18

IV. MÉTODOS

Figura 4.1	Diagrama de trabajo para la genotipificación.	20
Tabla 4.1	Diseño de oligos	25
Tabla 4.2	Reactivos para realizar la amplificación por PCR.	25
Figura 4.2	Programa estándar para el termociclador.	26
Figura 4.3	Condiciones para la reacción de secuenciación	27

V. RESULTADOS

Figura 5.1	Evaluación de la integridad del ADN	29
Figura 5.2	Cuantificación del ADN extraído	30
Tabla 5.1	Condiciones estandarizadas para la PCR por fragmento	31
Figura 5.3	Evaluación por electroforesis de la amplificación mediante PCR	31
Figura 5.4	Resultado de alineamiento de las secuencias	32
Figura 5.5	Electroferogramas de los SNPs en los que se encontraron los tres genotipos	34-35
Figura 5.6	Electroferogramas de los SNPs que mostraron sólo dos genotipos	36
Figura 5.7	Electroferogramas de los SNPs en los que sólo se localizó el genotipo homocigoto ancestral	37
Tabla 5.2	Frecuencias genóticas para los ocho SNPs evaluados	37
Tabla 5.3	Frecuencias alélicas para los ocho SNPs evaluados	38
Tabla 5.4	Determinación del Equilibrio Hardy-Weinberg	38
Figura 5.8	Distribución de los SNPs en las poblaciones	40
Figura 5.9	Distribución de los SNPs en las poblaciones	41
Figura 5.10	Distribución del SNP rs6714486 en las poblaciones	42
Tabla 5.5	Análisis de predicción en el efecto fenotípico de los SNPs exónicos.	44

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva de la concentración del fármaco
AcMPAG	Acilglucurónido del ácido micofenólico
A	Adenina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ARN	Ácido ribonucleico
AMF	Ácido micofenólico
C	Citosina
COMT	Catecol O-metiltransferasa
CYP	Citocromo P450
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
EMF	Enzimas metabolizadoras de fármacos
G	Guanina
G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GST	Glutación S-transferasa
HLA	Antígeno leucocitario humano
IMPDH2	Inosina monofosfato deshidrogenasa 2
MPAG	7-O-glucurónido del AMF
MMF	Micofenolato de mofetilo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAT	N-acetiltransferasa
NQO1	quinona oxidoreductasa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
PGx	Farmacogenética o farmacogenómica
SJS	Síndrome Stevens-Johnson
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de un solo nucleótido
T	Timina
TEN	Necrólisis epidérmica tóxica
TGI	Tracto gastrointestinal
TPMT	Tiopurina S-metiltransferasa
UGT	Uridín trifosfato glucuronosiltransferasa, UDP-glucuronosiltransferasa
UGT1A9	Uridín difosfato glucuronosiltransferasa familia 1 polipéptido A9

RESUMEN

La farmacogenética o farmacogenómica (PGx) tienen como objetivo mejorar la respuesta farmacológica con base en la interpretación de pruebas moleculares y datos del genoma humano. La variación en la respuesta a los fármacos tiene causas multifactoriales y se ha demostrado que el factor genético influye de forma importante en la idiosincrasia de los pacientes. Diversos estudios farmacogenómicos indican que las variaciones en las respuestas más importantes se deben a genes que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos (EMF), con impacto principalmente sobre la farmacocinética. La actividad enzimática puede ser modificada por variaciones genéticas de *novo* o hereditarias, que son aprovechadas en la PGx para análisis de asociación como potenciales blancos de estudio o marcadores de población asociados con la respuesta farmacológica.

El ácido micofenólico (AMF) es un fármaco inmunosupresor administrado como parte de la terapia postrasplante renal que inhibe la síntesis de *novo* de nucleótidos de guanina mediante la inhibición de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2, EC 1.1.1.205). El metabolismo del AMF se lleva a cabo por glucuronidación, la enzima uridín difosfato glucuronosiltransferasa familia1 polipéptidoA9 (UGT1A9, EC 2.4.1.17) es la principal responsable para obtener el metabolito inactivo, el glucurónido fenólico del AMF (MPAG); mientras que la enzima UGT2B7 es la implicada en la producción del metabolito farmacológicamente activo, el acilglucurónido del AMF (AcMPAG).

Los factores genéticos de la enzima UGT1A9 contribuyen a la variación en la respuesta al AMF. Existen diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre poblaciones, la evaluación de éstas para los SNPs: rs17868320 (-2152C>T), rs2741045 (-440 C>T), rs2741046 (-331 T>C), rs6714486 (-275 T>A), rs3832043 (-118T9>10), rs72551329 (8 C>G), rs72551330 (98 T>C), (rs2741049 (1399 T>C) permitirá tener una referencia en la población mexicana, de quien no existen estudios farmacogenómicos referentes a los polimorfismos en *UGT1A9* y su posible asociación con la respuesta al AMF.

Justificación. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) se realizan un promedio de 30 trasplantes renales por año, en donde se recomienda al AMF como parte de la terapia postrasplante. Sin embargo, no existen estudios farmacogenéticos referentes a los polimorfismos en *UGT1A9* en nuestra población y su posible asociación con la respuesta al AMF.

Objetivo. Genotipificar y evaluar la frecuencia de SNPs en *UGT1A9* asociados con diferencias en la respuesta farmacológica del AMF en pacientes pediátricos candidatos a tratamiento con AMF postrasplante renal.

Métodos. Se extrajo ADN de muestras sanguíneas de 51 pacientes pediátricos con diagnóstico de insuficiencia renal crónica terminal, registrados en el programa de trasplante renal. Se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones correspondientes a SNPs de importancia farmacológica en el gen *UGT1A9* y se determinaron los alelos mediante secuenciación capilar; se evaluó el equilibrio Hardy – Weinberg.

Resultados. De la genotipificación se pueden obtener los tres genotipos: **A)** homocigoto ancestral, **B)** heterocigoto y **C)** homocigoto alternativo. Los tres genotipos se obtuvieron para los SNPs *rs3832043* (-118 T_{8>9}), *rs2741049* (1399 T>C), *rs2741046* (-331 T>C), *rs2741045* (-440 C>T); para *rs6714486* (-275 T>A) y *rs17868320* (-2152 C>T) sólo se encontraron los genotipos homocigoto ancestral y heterocigoto; mientras que para *rs72551329* (8 C>G) y *rs72551330* (98 T>C) únicamente se localizaron los genotipos ancestrales.

Conclusiones. Es el primer estudio en población mexicana de determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs en *UGT1A9*. Se requiere de un incremento de la muestra poblacional y realizar de manera paralela determinaciones farmacocinéticas de los niveles de AMF en pacientes con trasplante renal, de manera que estos estudios sean de utilidad como apoyo clínico en la terapia inmunosupresora para la prevención del rechazo y toxicidad en el paciente. Éste estudio favoreció el desarrollo de un protocolo actualmente en operación en el HIMFG; para la asignación de dosis de fármacos de acuerdo al genotipo del individuo, con dos inmunosupresores (Tacrolimus – AMF) en pacientes con trasplante renal.

I. INTRODUCCIÓN

El concepto de “genética” fue establecido en 1906 por William Bateson, es definido como la ciencia que estudia las bases y los principios de la herencia. En el año de 1908 el matemático Hardy en Gran Bretaña y el antropólogo Weinberg en Alemania demostraron que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural o algún otro factor y no se produzca alguna mutación, estableciendo el equilibrio de Hardy-Weinberg. En la década de 1950 Rosalind Franklin, Erwin Chargaff, Watson y Crick contribuyeron a elucidar el modelo de la doble hélice del ADN, una secuencia de los nucleótidos Adenina, Citosina, Guanina y Timina, marcando la transición a la era de la genética molecular [Watson, Crick,1953]. Posteriormente el término “gen” es incorporado para hacer referencia a un fragmento o porción de la secuencia del ADN que codifica la información necesaria para sintetizar una proteína o un ARN [Sweeney, 2004].

Friedrich Vogel en 1959 introduce el concepto “farmacogenética” para definir a una disciplina con el objetivo de asociar la respuesta farmacológica y las variaciones genéticas, el panorama inicial se centraba en la posibilidad de que la respuesta a un fármaco en particular estuviera regulada por un único gen [Meyer, 2004]. Los métodos de secuenciación implementados en la década de 1970 por Allan Maxam, Walter Gilbert y Frederick Sanger, así como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) desarrollada por Kary Mullis en 1987, permitieron la disminución del tiempo de análisis, la optimización de investigaciones y el avance en el estudio del ADN y del genoma en su conjunto [Sweeney, 2004].

La era de la genómica se inició a finales del siglo XX con la aportación de avances científicos y tecnológicos dirigidos al estudio y comprensión de la información contenida en el genoma. La aportación de distintos genes y sus variantes sobre la respuesta a los tratamientos farmacológicos entre individuos y poblaciones étnicas, así como el desarrollo de perfiles de expresión génica con el fin de optimizar la terapia fue consolidado en una nueva disciplina denominada

“farmacogenómica”, cuyo desarrollo se favoreció con el progreso del Proyecto del Genoma Humano y los avances tecnológicos del presente siglo [Evans, 2004].

1.1 DESARROLLO DE LA FARMACOGENÉTICA Y LA FARMACOGENÓMICA

La línea que distingue la farmacogenómica de la farmacogenética se hace cada vez más estrecha, con la optimización de los métodos en biología molecular y la genética, actualmente ambos términos se utilizan de manera indistinta y se designan como PGx [Meyer, 2004]. Su objetivo es mejorar la respuesta farmacológica con base en la interpretación de pruebas moleculares y datos del genoma humano.

Los fármacos son administrados para proporcionar un efecto terapéutico sin causar toxicidad (Figura 1.1), la farmacocinética es una disciplina que estudia los procesos a los que éstos son sometidos durante su paso por el cuerpo, desde la administración hasta la eliminación, pasando por las siguientes fases: liberación de la sustancia activa, absorción de la misma por parte del organismo, distribución a los diferentes tejidos, metabolismo y eliminación (Figura 1.2). En particular el metabolismo es el proceso por el cual los fármacos son modificados por reacciones bioquímicas para su activación y/o inactivación y su eliminación del organismo.

El metabolismo de los fármacos se divide en dos grupos, de acuerdo a las reacciones que se llevan a cabo: las reacciones de fase I cuya importancia radica en lograr la biotransformación de los grupos funcionales presentes en los fármacos, mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis para transformarlos en moléculas de mayor polaridad, facilitando su excreción corporal. En las reacciones de fase II las enzimas que participan generalmente catalizan la adición de moléculas polares a los metabolitos o fármacos para hacerlos más polares. Las reacciones más comunes son: glucuronidación, conjugación con sulfatos, conjugación con glutatión, metilación, acetilación, conjugación con aminoácidos [Hernández, 2009]. La Figura 1.3 muestra las principales enzimas que participan en el metabolismo de fármacos.

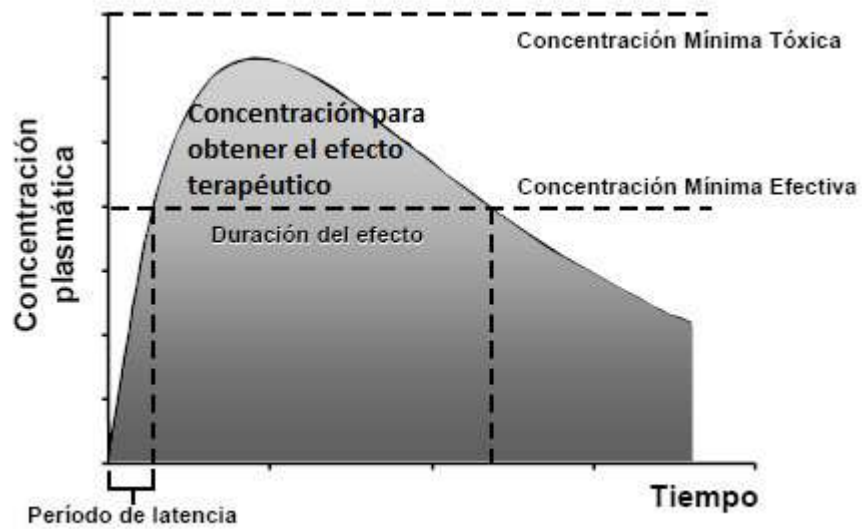


Figura 1.1. Gráfico de concentración plasmática vs tiempo. Respuesta generada al administrar un fármaco y alcanzar una concentración plasmática necesaria para producir un efecto benéfico en un organismo desarrollando el efecto terapéutico deseado, evitando el efecto tóxico [Modificado de Maya J.D., 2007].

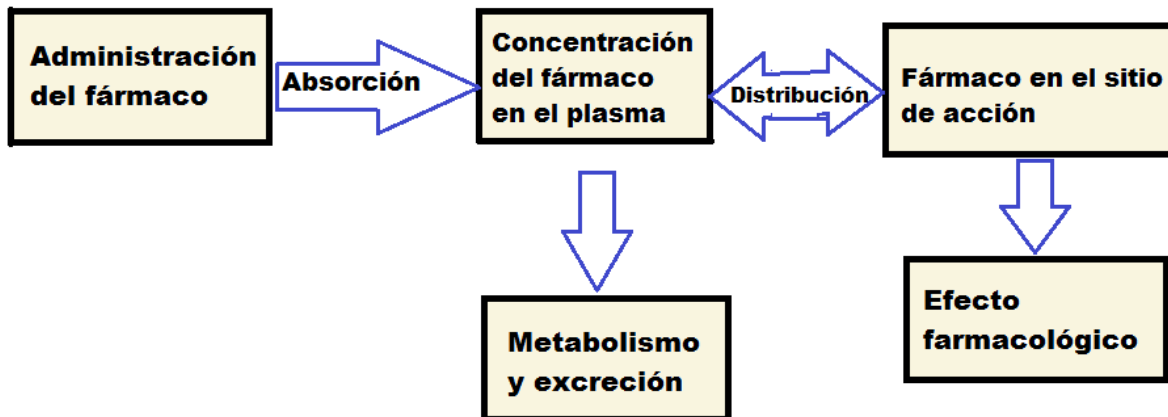


Figura 1.2. Farmacocinética. Después de la administración del fármaco se llevan a cabo procesos para obtener la concentración plasmática necesaria con un efecto terapéutico y el metabolismo para la eliminación del fármaco.

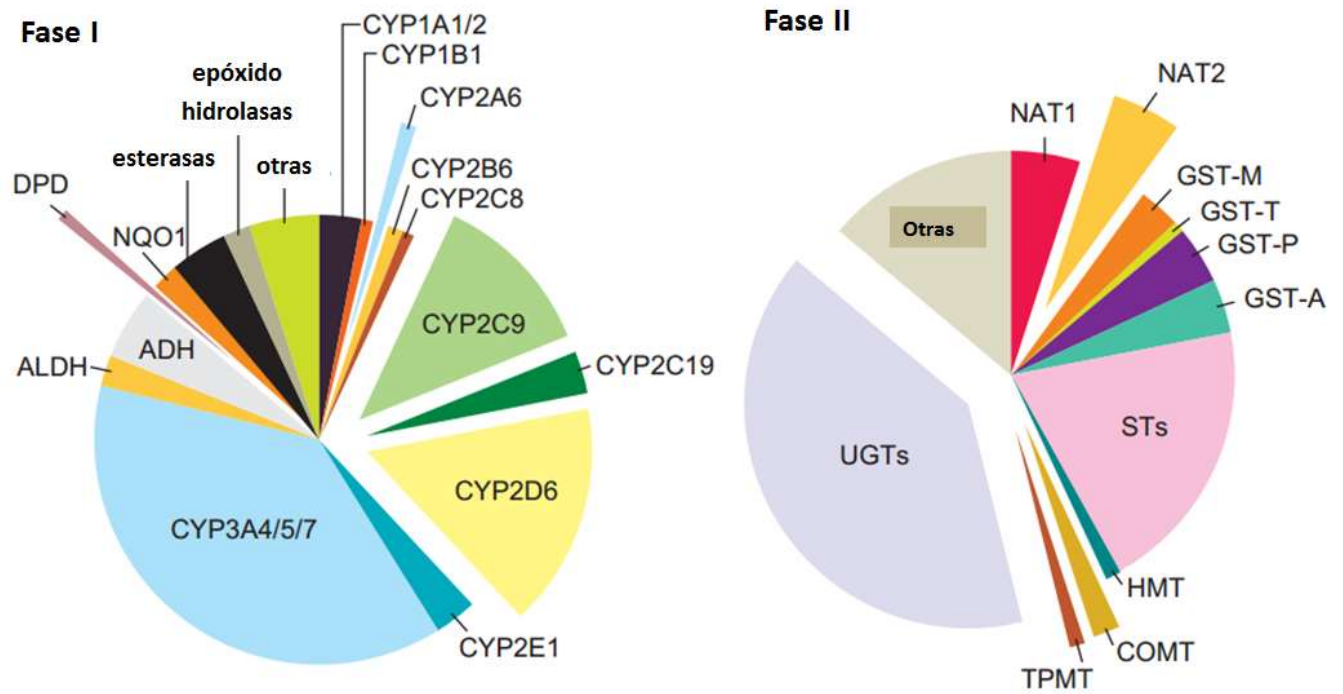


Figura 1.3 Enzimas que participan en el metabolismo de fármacos. Las enzimas modifican la estructura de los fármacos, son divididas en fase I y fase II; los gráficos muestran la proporción de fármacos metabolizados por cada enzima. **ADH**, alcohol deshidrogenasa; **ALDH**, aldehído deshidrogenasa; **CYP**, citocromo P450; **DPD**, dihidropirimida deshidrogenasa; **NQO1**, quinona oxidoreductasa; **NADPH**, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **COMT**, Catecol O-metiltransferasa; **GST**, glutatión S-transferasa; **NAT**, N-acetiltransferasa; **TPMT**, Tiopurina S-metiltransferasa; **UGT**, uridín trifosfato glucuronosiltransferasa [Modificado de Evans *et al.* 1999].

La observación y contribución de personajes como el médico británico Archibald E. Garrod, quien a principios del siglo XX estudió la etiología de la alcaptonuria y la porfiria, dio el término de “individualidad química” al notar la predisposición familiar de ciertos individuos a padecer alcaptonuria; más tarde Alf Alving y colaboradores durante la Segunda Guerra Mundial, observaron que aproximadamente 10% de los soldados afroamericanos desarrollaban una crisis hemolítica aguda, mientras que esto se presentaba sólo en un pequeño número de soldados caucásicos, al administrar una dosis de primaquina o algún fármaco antimalárico, posteriormente se demostró que esta sensibilidad era desarrollada por la deficiencia de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) [Meyer, 2004].

La variación en la respuesta a los fármacos tiene causas multifactoriales, sin embargo se ha demostrado que el factor genético influye de forma importante en la idiosincrasia de los pacientes. Diversos estudios farmacogenómicos indican que las variaciones en las respuestas más importantes se deben a genes que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos (EMF, Figura 1.3), transportadores o blancos de fármacos con impacto principalmente sobre la farmacocinética, al conducir a reacciones adversas (toxicidad) o al afectar la eficacia terapéutica. Evans y Relling [1999; 2004] coinciden en que la actividad enzimática puede ser modificada por variaciones genéticas de *novo* o hereditarias, que son aprovechadas en la PGx para análisis de asociación como potenciales blancos de estudio o marcadores de población asociados con la respuesta farmacológica.

Estos cambios en la secuencia del ADN pueden ser producto de deleciones, inserciones, duplicaciones, mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Las diferencias en la secuencia generan formas alternativas de un gen, denominados alelos y pueden o no producir modificaciones sobre los niveles de expresión y sobre la función de la proteína o ARN que son codificados [Evans, 1999]. Una variación genética se considera como polimorfismo, cuando se encuentra en alrededor del 1% de la población en relación con su secuencia ancestral. Para distinguir los polimorfismos

se denomina a la secuencia ancestral por el nombre del gen seguido de *1 (*CYP2D6*1*) y las variantes polimórficas por *2, *3 y así sucesivamente de acuerdo al orden de descubrimiento.

Wei y sus colaboradores [2012] recopilan la información de fármacos que son afectados por los polimorfismos en EMF, para su desarrollo como biomarcadores genéticos, que se definen por establecer un indicador característico con suficiente evidencia para predecir la respuesta a un fármaco específico (Tabla 1.1).

Un grupo de investigación examinó los perfiles de diferenciación de SNPs en 283 EMF así como en transportadores de fármacos, en 62 grupos étnicos alrededor del mundo, indicando que hay una selección positiva sobre la variación en los genes que codifican para EMF y que su diferenciación genética contribuye a la heterogeneidad en la respuesta a fármacos de la población [Sim *et al.*, 2013].

1.2 PGX EN TRASPLANTE RENAL

La fisiopatología de la insuficiencia renal crónica en niños afecta directamente el desarrollo integral normal, dentro de la etiología destacan la actividad del sistema inmune, la biodisponibilidad y toxicidad de medicamentos. El trasplante renal se considera el tratamiento ideal en niños, ya que mejora el desarrollo neurológico, psicológico, la calidad y el tiempo de vida de manera superior a los procedimientos dialíticos disponibles. Al realizar el trasplante el principal problema se debe a una reacción inflamatoria denominada rechazo del injerto, una forma de inmunidad específica del receptor. El rechazo puede evitarse o tratarse farmacológicamente al inducir una inmunosupresión controlada en el receptor [Medeiros *et al.*, 2005].

De acuerdo con el Centro Nacional de Trasplantes [CENATRA, www.cenatra.salud.gob.mx] en el 2013 en México se realizaron 2 mil 707 trasplantes renales, después del trasplante renal la terapia con inmunosupresores puede incluir a fármacos como tacrolimus, ciclosporina, azatioprina y ácido micofenólico (AMF). Es importante optimizar la terapia inmunosupresora para pacientes trasplantados, una opción puede ser mediante la PGx, debido a que los diferentes genotipos de las EMF pueden generar niveles elevados del fármaco,

Tabla 1.1. Biomarcadores genéticos. Datos clínicos de pruebas farmacogenómicas útiles en la predicción de la eficacia y reacciones adversas a fármacos [Wei *et al.* 2012].

Biomarcadores	Fármacos	Aplicaciones Clínicas
CYP2C9	Celecoxib Flurbiprofeno	Considerar iniciar el tratamiento con la mitad de dosis recomendada en metabolizadores lentos (<i>CYP2C9</i> *3/*3) para evitar eventos adversos cardiovasculares y gastrointestinales.
CYP2C9 + VKORC1	Warfarina	Ajuste de la dosis con base en los genotipos para lograr la eficacia y evitar complicaciones hemorrágicas.
CYP2C19	Clopidogrel	En metabolizadores lentos (<i>CYP2C19</i> *2*2) considerar una terapia alternativa para evitar complicaciones hemorrágicas.
CYP2D6	Codeína Doxepina	Metabolizadores ultrarrápidos (<i>CYP2D6</i> *1*1 y *1*2) se recomienda evitar su uso debido a la potencial toxicidad. Los metabolizadores lentos (<i>CYP2D6</i> *3*3) deben reducir la dosis en un 60 % para evitar arritmias y mielosupresión.
DPD (deficiencia)	Capecitabina Fluoracilo	Evitar el uso en pacientes con deficiencia de la enzima para evitar reacciones adversas graves.
G6PD (deficiencia)	Cloroquina Dapsona Rasburicasa	Evitar el uso en pacientes con deficiencia de la enzima para evitar hemólisis.
HLA-B*1502	Carbamazepina Fenitoína	Evitar el uso en pacientes portadores del genotipo <i>HLA-B*1502</i> para prevenir SJS/TEN
HLA-B*5701	Abacavir Flucloxacilina	Evitar el uso en pacientes portadores del genotipo <i>HLA-B*5701</i> para prevenir hepatotoxicidad.
HLA-B*5801	Alopurinol	Evitar el uso en pacientes portadores del genotipo <i>HLA-B*5801</i> para prevenir reacciones adversas cutáneas.
SLCO1B1	Simvastatina	El ajuste de dosis basado en el genotipo de <i>SLCO1B1</i> (rs4149056) para evitar miopatía.
TPMT	Azatioprina Mercaptopurina	Ajuste de la dosis basada en el genotipo para lograr la eficacia y evitar la mielosupresión (alelos no funcionales <i>TPMT</i> *2, <i>TPMT</i> *3A y <i>TPMT</i> *3C)
UGT1A1	Irinotecán	Ajuste de la dosis basada en el genotipo (<i>UGT1A1</i> *28) para lograr la eficacia y evitar neutropenia.

CYP, citocromo P450; **DPD**, dihidropirimidina deshidrogenasa; **G6PD**, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; **HLA**, antígeno leucocitario humano; **SJS**, Síndrome Stevens-Johnson; **TEN**, Necrólisis epidérmica tóxica; **TPMT**, Tiopurina S-metiltransferasa; **UGT**, UDP-glucuronosiltransferasa.

asociados con incremento en la toxicidad, o niveles inferiores a los terapéuticos relacionados con mayor riesgo en el rechazo del órgano [Cascorbi *et al.* 2013].

Tacrolimus es un inmunosupresor que inhibe la calcineurina, una enzima que efectúa una regulación positiva de las vías de transducción de señales en los linfocitos T. Tacrolimus es metabolizado en hígado e intestino por las enzimas de fase I CYP3A4 y CYP3A5. Se sabe que existe variación en la expresión y función de estas enzimas, algunos asociados a diferentes genotipos como el obtenido por el SNP *rs776746* (6986 A>G) en el alelo *CYP3A5*3* que codifica para un codón de paro, que conduce a la pérdida de la función y ausencia de la proteína, como resultado se presenta una menor eliminación del fármaco y la solución es administrar una menor dosis. Las personas con genotipo homocigoto para *CYP3A5*3* son llamados no expresadores, se encuentran en un 80% de los caucásicos y 30% de la población afroamericana; mientras que quienes expresan la proteína funcional, *CYP3A5*1/*1* y *CYP3A5*1/*3*, requieren una mayor dosis de tacrolimus para alcanzar los niveles mínimos terapéuticos. Recientemente se identificó una variante cuya consecuencia es la pérdida de la función de la enzima, *CYP3A4*22*, contribuyendo a la explicación de la variabilidad interindividual de las dosis de tacrolimus requeridas para obtener el efecto inmunosupresor deseado [Cascorbi *et al.* 2013].

Recientemente un estudio realizado por García *et al.* [2012] tuvo como objetivo determinar la frecuencia de los polimorfismos de *CYP3A5* en la población mexicana, evaluar las dosis requeridas de tacrolimus de acuerdo al genotipo y comparar los datos de frecuencia de los genotipos con las de otras poblaciones. Se realizó un estudio multicéntrico con pacientes reclutados de tres instituciones ubicadas en la ciudad de México. La genotipificación de los alelos para *CYP3A5* fue realizado por secuenciación directa, obteniendo como resultados que el 6,2% de la población de estudio fueron homocigotos para *CYP3A5*1*, el 41.6% eran heterocigotos *CYP3A5*1/*3* y el 52.2% fue homocigoto para *CYP3A5*3*.

Azatioprina, profármaco de la 6-mercaptopurina, es un antimetabolito de las purinas, es metabolizado por la enzima de fase II TPMT. Se ha reportado que pacientes deficientes en la enzima, portadores de los alelos no funcionales

*TPMT*2*, *TPMT*3A* Y *TPMT*3C*, tienen riesgo de presentar toxicidad hematológica o mielosupresión; [Wei *et al*, 2012]. Entre un 30 y 60% de individuos con genotipo heterocigoto muestran una toxicidad moderada, mientras que los homocigotos del genotipo ancestral muestran una menor actividad de los nucleótidos de tioguanina y menor mielosupresión. Estos tres SNPs en *TPMT* se asocian con más del 90% de alelos no funcionales. Con la información recabada por estudios PGx, es posible hacer ajustes en la dosis basados en el genotipo *TPMT*, reduciendo los efectos adversos sin comprometer la actividad inmunosupresora [Relling *et al*. 2011].

El ácido micofenólico (AMF) inhibe la síntesis de *ново* de nucleótidos de guanina mediante la inhibición de la enzima IMPDH2, es metabolizado por la enzima de fase II UGT1A9 cuyas variantes genóticas se han asociado con diferencias en la respuesta farmacológica.

1.3 PGX DE AMF

El AMF (*Myforic*® Novartis Pharma Stein AG) es generalmente sintetizado y administrado en forma de micofenolato de mofetilo (MMF: *Cell Cept*® Roche Laboratories Inc.) es hidrolizado por esterasas a AMF en un 95% (Figura 1.4). Es una molécula obtenida de *Penicillium stoloniferum* y se distribuye en presentación oral e intravenosa [Van *et al*. 2009].

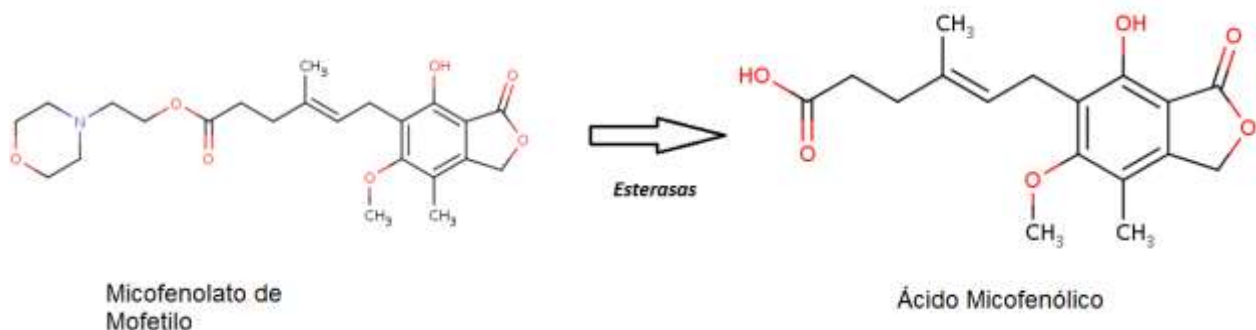


Figura 1.4. Obtención de AMF a partir del profármaco MMF. El MMF es un profármaco administrado y metabolizado por esterasas para obtener el AMF, que es la molécula activa que lleva a cabo el efecto terapéutico [Modificado de www.drugbank.ca/reactions]

La base de datos *Drug Bank* describe al AMF como un potente y selectivo, inhibidor no competitivo y reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa 2 (IMPDH2, EC 1.1.1.205); inhibe la síntesis de *ново* de nucleótidos de guanina sin incorporación al ADN. Debido a que los linfocitos T y B son dependientes de la síntesis de *ново* de purinas para su proliferación, el AMF tiene gran efecto citostático en los linfocitos, mientras que otras células pueden utilizar mecanismos alternos de recuperación. El AMF impide la glicosilación de las glicoproteínas de linfocitos y monocitos que están implicadas en la adhesión intercelular de las células endoteliales y puede inhibir el reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación y rechazo del injerto, así como la formación de anticuerpos a partir de los linfocitos B (Figura 1.5) [www.drugbank.ca].

En el metabolismo de fármacos fase II destaca la familia de las UGTs, la uridín difosfato glucuroniltransferasa familia 1 polipéptido A9 (UGT1A9, EC 2.4.1.17) es una enzima importante en la glucuronidación del AMF en tracto gastrointestinal (TGI), hígado y riñón. UGT1A9 es una enzima de la vía de glucuronidación que transforma moléculas lipofílicas, como esteroides, bilirrubina, hormonas y fármacos en metabolitos hidrofílicos para ser excretados. La enzima es activa en fenoles [www.genecards.org].

De acuerdo a experimentos *in vitro* UGT1A9 es responsable de la producción del metabolito inactivo el glucurónido fenólico del AMF (7-O-glucurónido del AMF, MPAG) en el hígado, el riñón y la mucosa intestinal, en un 55%, 75% y 50% respectivamente. Por su parte UGT2B7 es la enzima implicada en la producción del metabolito farmacológicamente activo el acilglucurónido del AMF (AcMPAG) (Figura 1.6) [Prausa *et al.*, 2009]. La evaluación de estos metabolitos se realiza a través del monitoreo terapéutico de AMF que requiere de un análisis farmacocinético de área bajo la curva de la concentración del fármaco (ABC) en un tiempo de 12 horas, este análisis también permite determinar la biodisponibilidad del AMF [Tett *et al.* 2011].

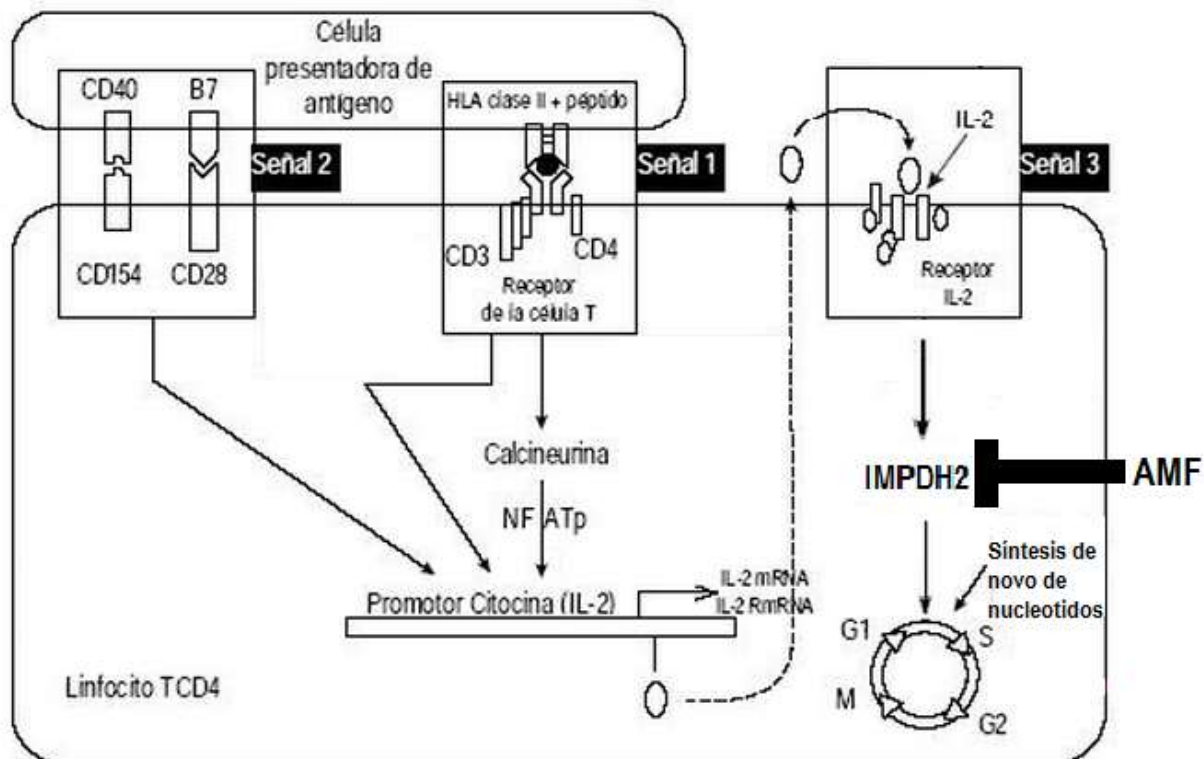


Figura 1.5. Mecanismo de acción del AMF. El fármaco inhibe la IMPDH2, inhibiendo la síntesis de *novus* de nucleótidos de guanina, produciendo un efecto citostático en los linfocitos [Modificado de Alberú, 2005].

Los padecimientos en el TGI (como diarrea, náuseas, vómito, dolor abdominal), cefalea, hipertensión, mielosupresión reversible y leucopenia son los principales efectos adversos relacionados con el AMF. La función renal, la concentración de albúmina sérica y el tipo de inhibidor de la calcineurina utilizado, contribuyen a una parte de la variabilidad en la respuesta al AMF; la otra parte incluye factores genéticos de la enzima UGT1A9 [Prausa *et al.* 2009].

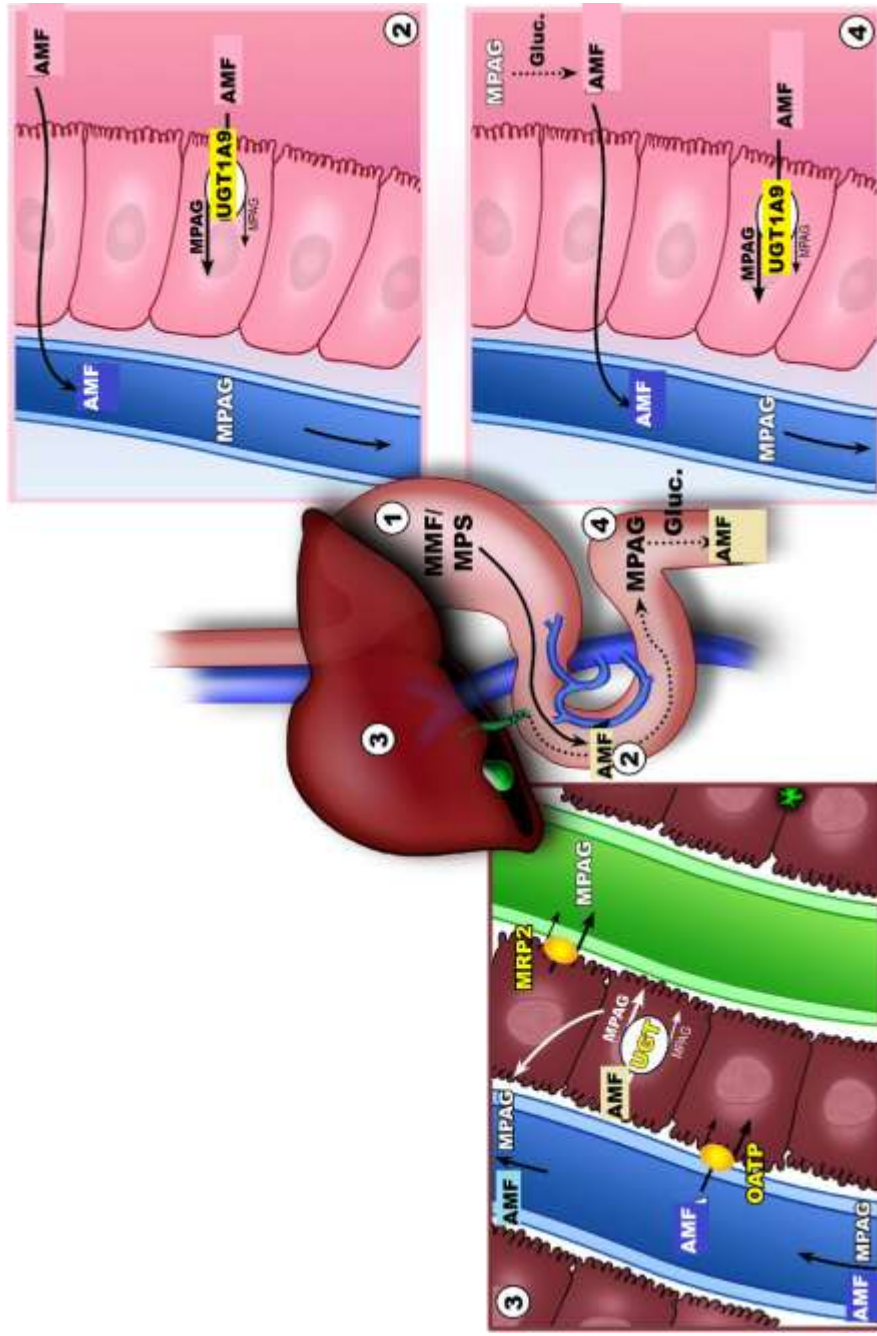


Figura 1.6. Representación esquemática del metabolismo del AMF. 1) Después de la administración oral y disolución del medicamento, el AMF se absorbe a través del intestino delgado. 2) Parte del AMF es metabolizado por UGTs intestinales: UGT1A9 produce MPAG y UGT2B7 a AcMPAG. 3) AMF pasa al hígado por los transportadores MRP2 y es transportado dentro de los hepatocitos por transportadores (OATP), y es metabolizado por UGT1A9 y UGT2B7 expresadas en hígado. 4) MPAG y AcMPAG se excretan en bilis y se someten a recirculación enterohepática. Los metabolitos son reconvertidos a AMF por glucuronidasas de las bacterias del colon, parte del AMF se reabsorbe y otra parte es metabolizado en el intestino delgado. [Modificado de Rosso, *et al.*, 2009].

El gen que codifica la principal enzima metabolizadora del AMF es *UGT1A9*, es parte de un *locus* complejo que codifica varias UDP-glucuronosiltransferasas.

El *locus* incluye trece únicos primeros exones, es decir el primer exón es alternativo y es seguido de cuatro exones comunes. Cuatro de los primeros exones se consideran pseudogenes, cada uno de los nueve exones 5' restantes se puede empalmar a los cuatro exones comunes, resultando en nueve proteínas con diferentes extremos aminos e idénticos extremos carboxilos terminales. Cada primer exón codifica el sitio de unión a sustrato, y está regulada por su propio promotor [www.genecards.org]. El gen *UGT1A9* se localiza en el cromosoma 2q37.1 (234,580,499-234,681,946), con una longitud de 2416 y codifica para 530 aminoácidos (Figura 1.7).

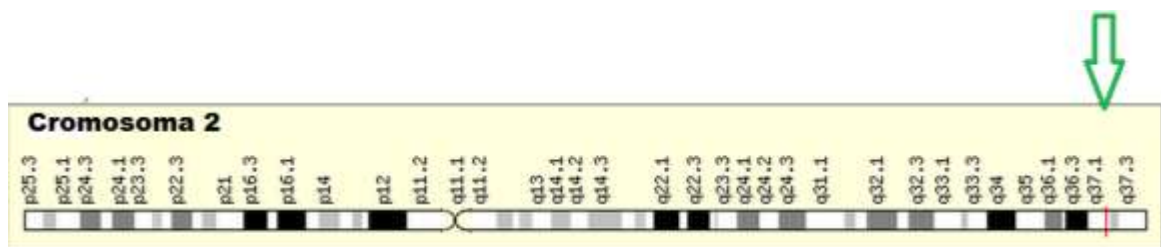


Figura 1.7. Localización del gen *UGT1A9*. El gen se encuentra en el cromosoma 2, en el brazo largo en la banda 37.1 (2q37.1)[Modificado de www.genecards.org]

Se han reportado SNPs en *UGT1A9* que afectan la actividad enzimática. Se encontraron dos en la región promotora del gen: *rs6714486* ubicado en $-275T>A$ y *rs17868320* localizado en $-2152C>T$, ambos favorecen una mayor expresión de la enzima, como consecuencia una mayor glucuronidación de AMF a MPAG, obteniendo una menor concentración de AMF y reduciendo la exposición a éste. En microsomas de hígado humano que contienen uno o ambos de estos SNPs, se observó mayor glucuronidación de AMF en comparación con microsomas de hígado que no poseen estos SNPs. En un estudio clínico de 95 receptores de trasplante renal, los individuos con uno o ambos de estos SNPs presentaban una menor exposición al AMF y un mayor aclaramiento, es decir mayor eliminación, en comparación con los receptores con genotipo ancestral [Prausa *et al.*, 2009].

Kuypers y colaboradores [2005] reportaron que 32 pacientes con genotipo heterocigoto para *rs6714486* y *rs17868320*, quienes recibieron 2g de MMF diarios, mostraron menor concentración plasmática de AMF (ABC) y una mayor tendencia a padecer efectos adversos en el TGI.

Por el contrario, *rs2741045* en $-440C>T$ y *rs2741046* localizado en $-331T>C$ de la región promotora del gen, confieren una disminución de la actividad enzimática, aumentando la exposición al AMF y en consecuencia la probabilidad de reacciones adversas como la leucopenia. El SNP *rs72551330* situado en la región codificante $98T>C$ (*UGT1A9*3*), se asocia con una disminución de la glucuronidación, que se traduce en una mayor exposición al AMF o un aumento en él. La Tabla 1.2 muestra una recopilación de datos de diferentes polimorfismos en *UGT1A9* y los fenotipos obtenidos para el AMF ABC [Prausa *et al.*, 2009]. La Figura 1.8 muestra los SNPs identificados en el gen.

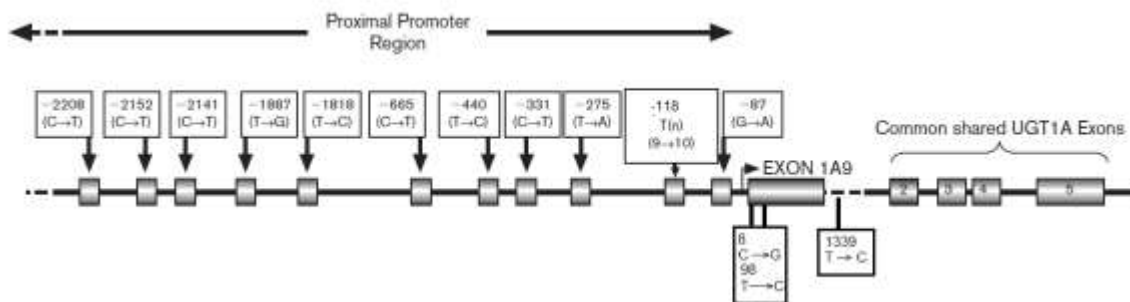


Figura 1.8. Polimorfismos descritos en el gen *UGT1A9*. [Modificada de Girard *et al.* 2004].

UGT1A9 juega un papel central en la detoxificación de moléculas que incluyen varios fenoles, esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, alimentos, participa en el metabolismo de varios fármacos incluyendo fibratos, antiarrítmicos, agentes anticancerígenos y el anestésico propofol. La presencia de los polimorfismos en *UGT1A9* alteran la actividad de glucuronidación y farmacocinética de algunos fármacos. La Tabla 1.3 muestra los SNPs en asociados con su farmacogenómica, por ejemplo variantes polimórficas

encontradas en la región codificante del gen incluyendo C3Y, M33T, Y242X y D256N, conducen a la completa o parcial inactivación de la actividad enzimática en varios sustratos como SN-38, el metabolito activo del profármaco irinotecán utilizado en tratamiento de cáncer colorectal [Girard *et al.* 2004].

Tabla 1.2. Polimorfismos en UGT1A9. Las variaciones en la secuencia del gen producen cambios en la farmacocinética del AMF, se reportan en términos de actividad enzimática: ↑ actividad se asocia con una disminución en la biodisponibilidad del fármaco, ↓ actividad se relaciona con un incremento en la biodisponibilidad del AMF [Van *et al.*, 2009, Kuypers *et al.* 2005, Prausa *et al.* 2009, Guo, *et al.*, 2013].

	rs17868320	rs2741045	rs2741046	rs6714486	rs3832043	rs72551329	rs72551330	rs2741049
	-2152 C>T	-440 C>T	-331 T>C	-275 T>A	-118T 9>10	8 C>G C3W UGT1A9*2	98T>C (M33T) UGT1A9*3	1399 T>C
Actividad enzimática	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓
	Exogénico	Exogénico	Exogénico	Exogénico	Exogénico	Exón 1	Exón 1	Intrónico

Tabla 1.3. Polimorfismos de *UGT1A9* asociados con la farmacogenómica de otros fármacos. Variantes genéticas de *UGT1A9* relacionadas en el metabolismo de otros fármacos [www.pharmgkb.org].

SNPs	Variantes	Fármacos	Indicaciones
<i>rs17868320</i>	-2152 C>T	Sorafenib	Antineoplásico
<i>rs3832043</i>	- 118 T 9>10	Entacapona Tolcapona Irinotecán Cisplatino SN-38	Parkinson Antineoplásicos
<i>rs72551330</i>	98 T>C	Entacapona Sulfinpirazona Tolcapona	Parkinson
<i>rs2741049</i>	1399 T>C	Ácido valproico	Epilepsia

El efecto de los SNPs no es comprendido en todos los casos, con base en el dogma central de la biología molecular los polimorfismos pueden afectar el fenotipo a nivel de ADN, ARN y proteína. Los SNPs se producen en mayor frecuencia en las regiones codificantes del genoma, que en las regiones no codificadoras. Los SNPs en los sitios reguladores de un gen pueden afectar la transcripción, cambiando la expresión de la proteína correspondiente. En las regiones codificantes, los SNPs exónicos pueden ser categorizados en dos clases: los polimorfismos no sinónimos que alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína y han sido caracterizados pues su efecto es detectado experimentalmente y por programas computacionales; los SNPs sinónimos no afectan la secuencia de la proteína, se asume que no producen un efecto discernible sobre la función del gen o de un fenotipo, también son llamadas “mutaciones silenciosas”, sin embargo varias mutaciones de este tipo alteran la expresión del gen o la proteína [Liao, Lee, 2010].

1.4 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS

En genética la frecuencia alélica es la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un *locus* determinado en una población, por otra parte, la proporción en la que se observan los genotipos de una población para un *locus* determinado se denomina frecuencia genotípica.

Las frecuencias alélicas y genotípicas muestran variabilidad interétnica, existe evidencia de que algunos fármacos son metabolizados de manera distinta en mexicanos con respecto a sujetos caucásicos, por lo tanto los regímenes de dosificación no pueden ser extrapolados en la población mexicana sin un análisis previo. Se sabe que el 90% de la población mexicana se compone de mestizos, que exhibe una mezcla de ascendencias amerindias, europeas y africanas [García *et al.*, 2010].

La Tabla 1.4 muestra las frecuencias genotípicas de los SNPs de *UGT1A9* en cuatro poblaciones diferentes.

En genética de poblaciones el principio de Hardy–Weinberg afirma que, bajo ciertas condiciones, la composición de una población permanece en equilibrio mientras no actúen ni la selección ni algún otro factor, es decir que la herencia mendeliana por sí misma, no engendra cambio evolutivo, no es un mecanismo de alteración de las frecuencias genotípicas en las poblaciones. La demostración de este equilibrio implica que las frecuencias génicas permanecen constantes de generación en generación bajo condiciones ideales, como ser una población amplia, ser organismos diploides, no haber mutaciones o selección natural. En el modelo de Hardy-Weinberg la relación matemática entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas está dada por el desarrollo del cuadrado de un binomio. Si se denota como p a la frecuencia de un alelo y q a la frecuencia de otro alelo del mismo gen, se tiene que las frecuencias genotípicas serán p^2 para el genotipo ancestral, $2pq$ para el heterocigoto y q^2 para el homocigoto polimórfico, tal que: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ [Sweeney, 2004].

Tabla 1.4. Frecuencias genotípicas de SNPs en UGT1A9 en cuatro poblaciones distintas. MXL, Población con ascendencia mexicana residente en los Ángeles, EU; AMR, Población Americana; EUR, Población Europea; AFR, Población Africana; ASN, Población de Asia Oriental [Proyecto de los 1000 Genomas (2010)].

SNPs	MXL n= 66	Genotipos	AMR n=181	EUR n=379	AFR n=246	ASN n=286
rs17868320	27.3	C/C	90.6	90.2	94.7	100
-2152 C>T	43.9	C/T	9.4	9.5	4.9	
	27.3	T/T		0.3	0.4	
rs2741045	66.7	C/C	66.9	51.5	92.7	95.5
-440 C>T	31.8	C/T	28.7	41.7	6.5	
	1.5	T/T	4.4	6.9	0.8	4.5
rs2741046	66.7	T/T	66.9	51.5	93.5	95.5
-331 T>C	31.8	T/C	28.7	42.2	5.7	4.5
	1.5	C/C	4.4	6.3	0.8	
rs6714486	89.4	T/T	87.3	89.7	74	100
-275 T>A	10.6	T/A	12.2	10	23.6	
	0	A/A	0.6	0.3	2.4	
rs72551330	98.5	T/T	98.3	96.8	100	100
98 T>C	1.5	T/C	1.7	3.2		
rs2741049	27.3	T/T	19.9	15.6	14.2	33.2
1399 T>C	43.9	T/C	50.3	46.2	46.7	50
	27.3	C/C	29.8	38.3	39.1	16.8

II. JUSTIFICACIÓN

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se realizan un promedio de 30 trasplantes renales por año, en donde se recomienda al AMF como parte de la terapia postrasplante. Sin embargo, no existen estudios farmacogenéticos referentes a los polimorfismos en *UGT1A9* en nuestra población y su posible asociación con la respuesta al AMF. El presente estudio permitirá tener una referencia de los genotipos y frecuencias alélicas de ocho SNPs en el gen *UGT1A9*, previamente reportados en la literatura.

III. OBJETIVO

Genotipificar y evaluar la frecuencia de SNPs en *UGT1A9* asociados con diferencias en la respuesta farmacológica del AMF en pacientes pediátricos candidatos a tratamiento con AMF postrasplante renal.

IV. MÉTODOS

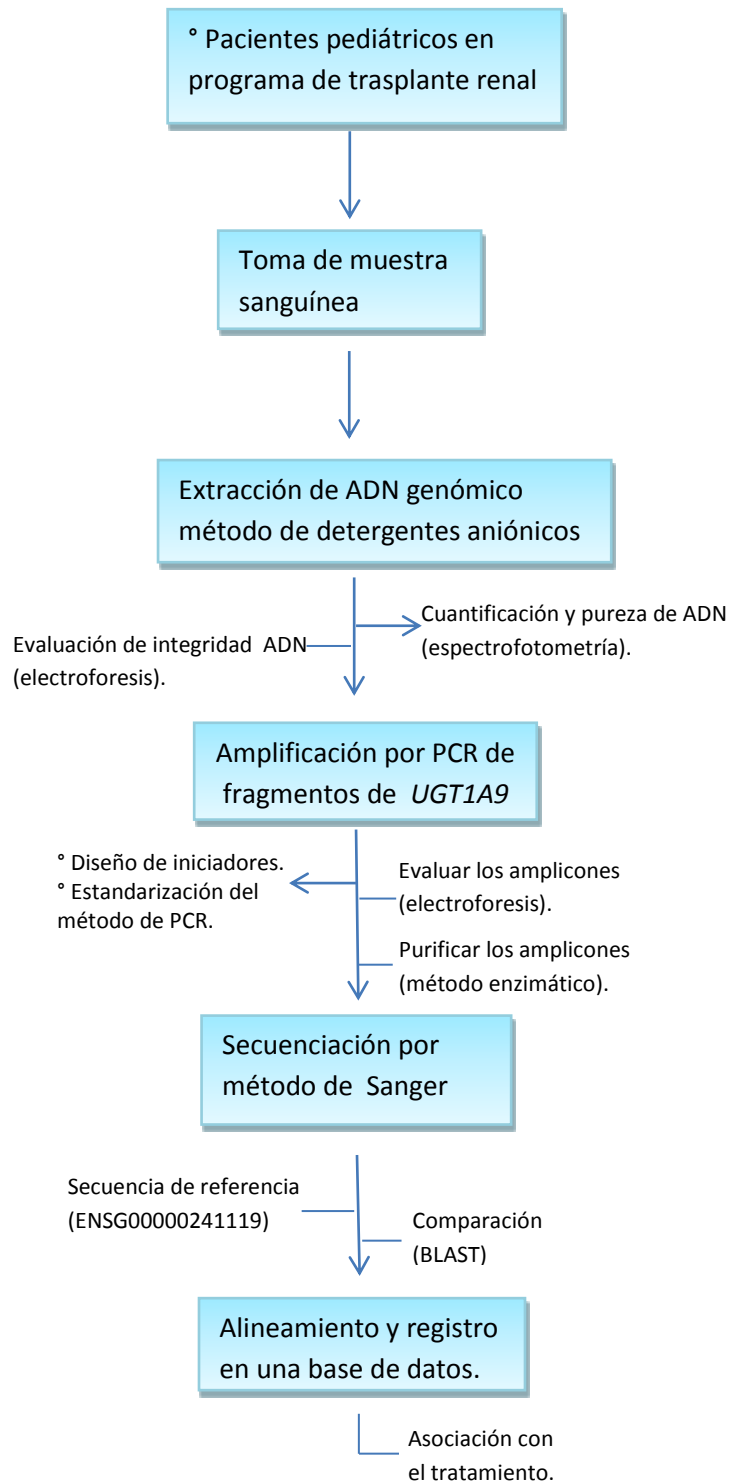


Figura 4.1. Diagrama de trabajo para la genotipificación de *UGT1A9*.

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cincuenta y un pacientes pediátricos registrados en el programa para trasplante renal en el HIMFG, en quienes se considera recibirán en el postrasplante renal régimen inmunosupresor con alguna formulación de AMF. Los Principales Criterios de Inclusión son: a) edad de 2 a 17, b) género indistinto, c) firma de consentimiento informado por el tutor y asentimiento del paciente, d) con muestras y datos clínicos completos

Como criterio de exclusión y eliminación se consideran: a) deseo voluntario de abandonar el estudio, b) pacientes en quienes se documenta falta de adherencia.

El estudio se aprobó por las Comisiones de Investigación, Ética y Bioseguridad del HIMFG (Reg. HIM/2011/013).

4.2 TOMA DE MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE ADN

A cada paciente se le realizó una toma de muestra sanguínea, en un tubo Vacutainer™ con EDTA como anticoagulante; se extrajo ADN genómico por el método de detergentes aniónicos, utilizando Gentra® Puregene® Blood Kit-QIAGEN®. Éste método incluye la lisis de eritrocitos, lisis celular, precipitación de proteínas, la separación del ADN y la resuspensión del mismo.

Procedimiento (tomado de Gentra® Pueregene® Handbook 06/2011)

1. Se preparó un microtubo estéril de 1.5 ml, agregando 900 µl de solución de lisis de células rojas (*RBC Lysis Solution*).
2. Se agregaron 450 µl de sangre total, previamente homogeneizada por inversión.
3. Se incubó de 1 a 5 min a temperatura ambiente (invertir el tubo varias veces durante la incubación).
4. Se centrifugó a 13,000 x g por 20 s.
5. Se eliminó el sobrenadante con la micropipeta, dejando alrededor de 10 µl para facilitar la disgregación del botón con la micropipeta o con vórtex a velocidad media por 15 s.

6. Se agregaron 300 µl de solución de lisis celular (*Cell Lysis Solution*) y se pipeteó continuamente hasta formar espuma y no observar agregados celulares.
7. Se agregaron 100 µl de solución de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) y se mezclaron con vórtex a velocidad máxima por 20 s. Incubar 15 min a -20° C.
8. Se centrifugó a 13,000 x g por 1 min.
9. Se preparó un microtubo nuevo y estéril de 1.5 ml agregando 300 µl de isopropanol.
10. Se transvasó cuidadosamente el sobrenadante al tubo con isopropanol, cuidando de no tomar los residuos precipitados.
11. Se mezcló la muestra mediante inversión del tubo 50 veces hasta que el ADN fue visible. Se centrifuga 13,000 x g por 1 min.
12. Se removió el sobrenadante por decantación, cuidado de no perder la pastilla.
13. Se agregaron 300 µl de etanol al 70 %, girando horizontalmente el tubo varias veces para lavar el isopropanol residual. Se centrifugó a 13,000 x g por 1 min.
14. Se removió el sobrenadante por decantación, cuidando de no perder la pastilla.
15. Se realizó un segundo lavado con etanol al 70%.
16. Se centrifugó a 13000 rpm por 1 min.
17. Se drenó el exceso de etanol invirtiendo el tubo y colocándolo sobre un papel absorbente por 5 min.
18. Se dejó el tubo abierto por 2 h, para permitir la evaporación del etanol o secar en concentrador de vacío por 10 min a T° baja.
19. Se agregaron de 50 a 100 µl de solución de hidratación de ADN (*DNA Hydratation Solution*), se mezcla en vórtex a velocidad media por 10 s.
20. Se incubó a 40°C por 2 h, mezclando con vórtex a velocidad baja por 10 s, cada 30 min.

21. Se cuantificó la concentración y evaluó la pureza del ADN por espectrofotometría (*Nanodrop*[™]), verificando la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (100 v por 30 min).
22. Se almacenó a -20°C.

La evaluación de la integridad del ADN se llevó a cabo por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% (p/v) (100 v por 30 min), revelado con GelRed[™]. La agarosa es un polisacárido derivado del agar, se utiliza para separar macromoléculas como los ácidos nucleicos, el tamaño del poro puede ser predeterminado ajustando su concentración en el gel. El ADN tiene carga negativa a pH neutro, característica que le permite migrar al polo positivo a través de la matriz de agarosa durante la electroforesis.

La cuantificación y pureza del ADN se determinaron por espectrofotometría en el equipo NanoDrop® ND-1000. Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta (UV) por la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de la cadena de ADN. Cada base tiene su propio espectro de absorción y contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de luz UV de una molécula de ADN, con un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm ($\lambda \sim 260$ nm). A pesar de que el coeficiente de extinción de un ácido nucleico en particular depende de la secuencia de nucleótidos, algunas reglas empíricas permiten estimar la concentración a partir del valor de $A_{\lambda 260\text{nm}}$.

Los aminoácidos aromáticos absorben luz UV, por lo cual la presencia de proteínas en las preparaciones de ácidos nucleicos lleva a sobrestimaciones de la concentración de los mismos. Dado que el máximo de absorbancia de las proteínas se encuentra en $\lambda \sim 280$ nm, es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente A_{260}/A_{280} . Para el ADN doble hebra en soluciones de alta pureza se espera $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$.

4.3 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

La amplificación se realizó con la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), técnica que reproduce *in vitro* el proceso de la duplicación del ADN en las células y se fundamenta en la propiedad de la *ADN polimerasa* para replicar hebras de ADN, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas. La PCR multiplica exponencialmente una secuencia específica de ADN, sintetizando grandes cantidades de este segmento específico a partir de un ADN de muestra. Los ciclos son divididos en tres etapas: **desnaturalización** del ADN por calor (95°C), **alineamiento** donde los extremos 3' de las hebras separadas se alinean con los oligos complementarios, la *Taq Polimerasa* realiza la **extensión** de los extremos 3' de ambos cebadores utilizando las hebras de ADN templado como plantilla.

La PCR fue estandarizada para amplificar los *loci* correspondientes al gen *UGT1A9*, así como evidenciar los polimorfismos asociados con la expresión de la enzima. El diseño de oligos se llevó a cabo con base en la secuencia de referencia ENSG00000241119 (*UGT1A9*) a través del software Primer3 (Tabla 4.1). Se utilizaron 4 pares de oligos para determinar definir los ocho SNPs posibles, la Tabla 4.1 indica que par de oligos corresponde a cada SNP.

Los reactivos utilizados se mencionan en la Tabla 4.2. La amplificación por PCR se realiza en un termociclador My Cycler™- Bio Rad, utilizando el programa de la Figura 4.2, los productos se evaluaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.0 % (p/v) revelado con GelRed™-Biotium. Los amplicones son purificados por el método enzimático con ExoSAP-IT™, que contiene las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina.

Tabla 4.1. Diseño de oligos.

Nombre	Secuencia	Longitud (pb)	Fragmento (pb)	Tm (°C)	SNPs
X1A Sentido	5'-agatatctcagcaaaagctactc-3'	23	379	57.1	rs3832043 (-118 T _{8>9})
X1A Antisentido	5'-tcacctctggcatgactac-3'	19			rs72551329 (8C>G) rs72551330 (98 T>C)
rs17868320 Sentido	5'-tagcatagaaggtttgtggg-3'	22	233	58.0	rs17868320 (-2152 C>T)
rs17868320 Antisentido	5'-caacatggtgaaaccctatctc-3'	22			
rs2741049 Sentido	5'-aagtaccatgtagaaaagtacc-3'	24	287	57.6	rs2741049 (1399 T>C)
rs2741049 Antisentido	5'-gtcaaatctgtctgtattggtc-3'	22			
rs6714486 Sentido	5'-ggaaatggaagaagagaagcag-3'	22	420	56.4	rs2741046 (-331 T>C) rs2741045 (-440 C>T)
rs6714486 Antisentido	5'-cactgacaatgattacccaaaag-3'	24			rs6714486 (-275 T>A)

Tabla 4.2. Reactivos para realizar la amplificación por PCR.

Reactivos	Stock	Diluciones	Concentración necesaria	Volumen Necesario (µL)
Buffer	10X PCR Buffer (20mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mMKCl)	_____	1x	2.5
MgCl₂	50 mM	-----	2.5 mM	1.25
dNTP	10mM dNTP Mix (Thermo Scientific)	_____	0.2 mM	0.5
Platinum® TaqDNA Polymerase	5 U/ µL (invitrogen™)	1 U/µL	1 U	1
Primer Fw	100 pmol/µL	10 pmol/µL	5 pmol	0.5
Primer Rv	100 pmol/µL	10 pmol/µL	5 pmol	0.5
DNA		20 ng/µL	20 ng	1
Agua		-----	c.b.p. 25 µL	17.75



Fig.4.2. Programa estándar para el termociclador.

Procedimiento de purificación de amplicones ExoSAP – IT™.

1. Se adicionó en un tubo 5 µl de producto de PCR y 2 µl de ExoSAP – IT.
2. Se mezclaron e incubaron durante 20 minutos a 37 °C.
3. Se inactivaron las enzimas de ExoSAP – IT a 80 °C durante 15 minutos.

Se cuantificó y determinó la pureza de los amplicones por espectrofotometría en el equipo NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

4.4 SECUENCIACIÓN DE UGT1A9 POR EL MÉTODO DE LOS TERMINADORES.

La secuenciación por el método de los terminadores utiliza didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), los cuales tienen un H en el carbono 3' de la ribosa en lugar del OH encontrado en un desoxinucleótido trifosfato (dNTPs). Los ddNTPs son terminadores de elongación de la cadena, es decir en una reacción de secuenciación al adicionar un ddNTP en lugar de un dNTP, la síntesis se detiene en este punto, pues el 3'-OH necesario para la adición del próximo dNTP está ausente.

La secuenciación de los fragmentos de *UGT1A9* se llevó a cabo por el método de didesoxi, utilizando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, utilizando 40ng de amplicones purificados (Tabla 4.3). La reacción se realizó en un termociclador MyCycler™- Bio Rad durante 50 ciclos.

Tabla 4.3. Condiciones para la reacción de secuenciación.

Nombre del fragmento	Tm (°C)	Iniciador
X1A	57.0	Antisentido
X1D	56.2	Antisentido
rs17868320	57.5	Sentido
rs2741049	55.6	Antisentido
rs6714486	57.8	Sentido

Se purificó el producto de la reacción de secuenciación con columna Centri-Sep™. Procedimiento:

1. Se hidrata la columna con 800µl de agua, se mezcló y eliminó las burbujas de aire.
2. Se incubó 30min a temperatura ambiente para precipitar la resina de la columna y formar la matriz.
3. Se quitó la tapa superior de la columna, y después la tapa inferior. Se colocó la columna en un tubo de recolección y la tapa superior. Se centrifugó durante 2 min a 1500g para eliminar el agua.
4. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf y se adicionó la muestra en el centro de la columna, sin tocar la matriz. Se centrifugó durante 2 min 1500g.
5. Se eliminó la columna y se evaporó el agua de la muestra en el SpeedVac.
6. Al tubo de 1.5 ml con la muestra liofilizada, se añadió 12µl de formamida y se agitó en el vórtex 30 s.
7. Se pasó el contenido a un tubo para secuenciador de 500µl y se colocó una septa (tapa).
8. Se incubó durante 2.5 min a una temperatura de 96 °C.
9. Se incubó en hielo al menos 5 min antes de inyectar en el secuenciador.

4.5 LECTURA EN EL SECUENCIADOR

La lectura se llevó a cabo en el secuenciador 310 GeneticAnalyzer–ABI PRISM™ Applied Biosystem, software 310 Data Collection Version 3.1.0. El análisis del electroferograma obtenido se realizó con el software Sequencing Analysis 5.2 Patch 2.

Se alinearon y compararon las secuencias problema con una de referencia de *UGT1A9*, ENSG00000241119, obtenida de la base de datos ENSEMBL (relase 70).

Los datos obtenidos fueron evaluados para determinar el genotipo y la frecuencia de los polimorfismos en *UGT1A9*, para finalmente ser recabados en una base de datos.

V. RESULTADOS

Se evaluaron ocho SNPs en *UGT1A9* reportados en estudios PGx del AMF, obteniendo los alelos de 50 pacientes pediátricos registrados en el programa de trasplante renal.

5.1 CUANTIFICACIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN GENÓMICO

Un ejemplo de la cuantificación del ADN extraído de muestras sanguíneas de los pacientes se muestra en la Figura 5.1. La evaluación por espectrofotometría indica la concentración obtenida de ADN y la pureza, cuyos valores adecuados para realizar las siguientes técnicas experimentales son $A_{280}/A_{260} > 1.75$. La integridad del AND se muestra en la Figura 5.2, se considera integra la muestra al no observar degradación de las mismas.

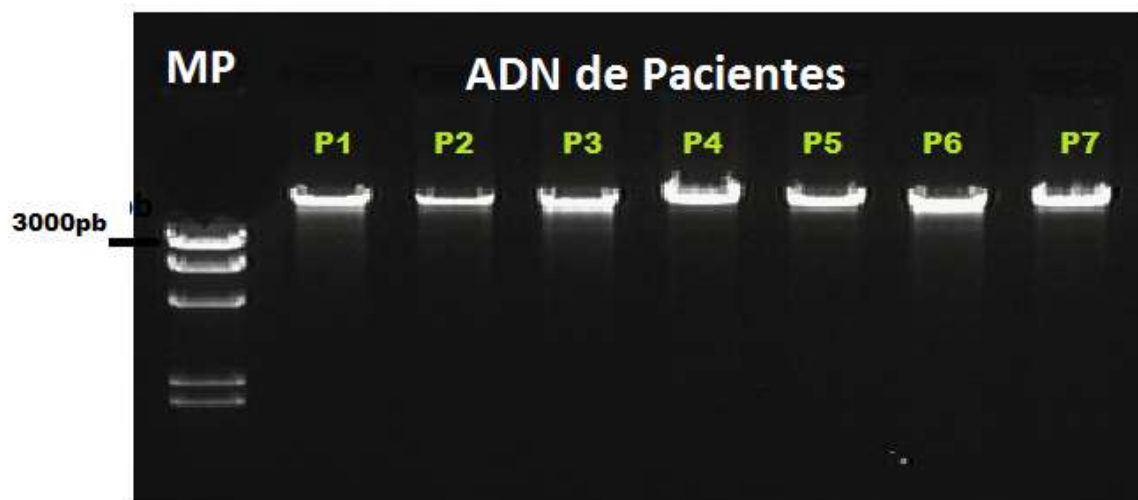


Figura 5.1. Evaluación de la integridad del ADN. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% (p/v TAE 1X) revelado con GelRed™.

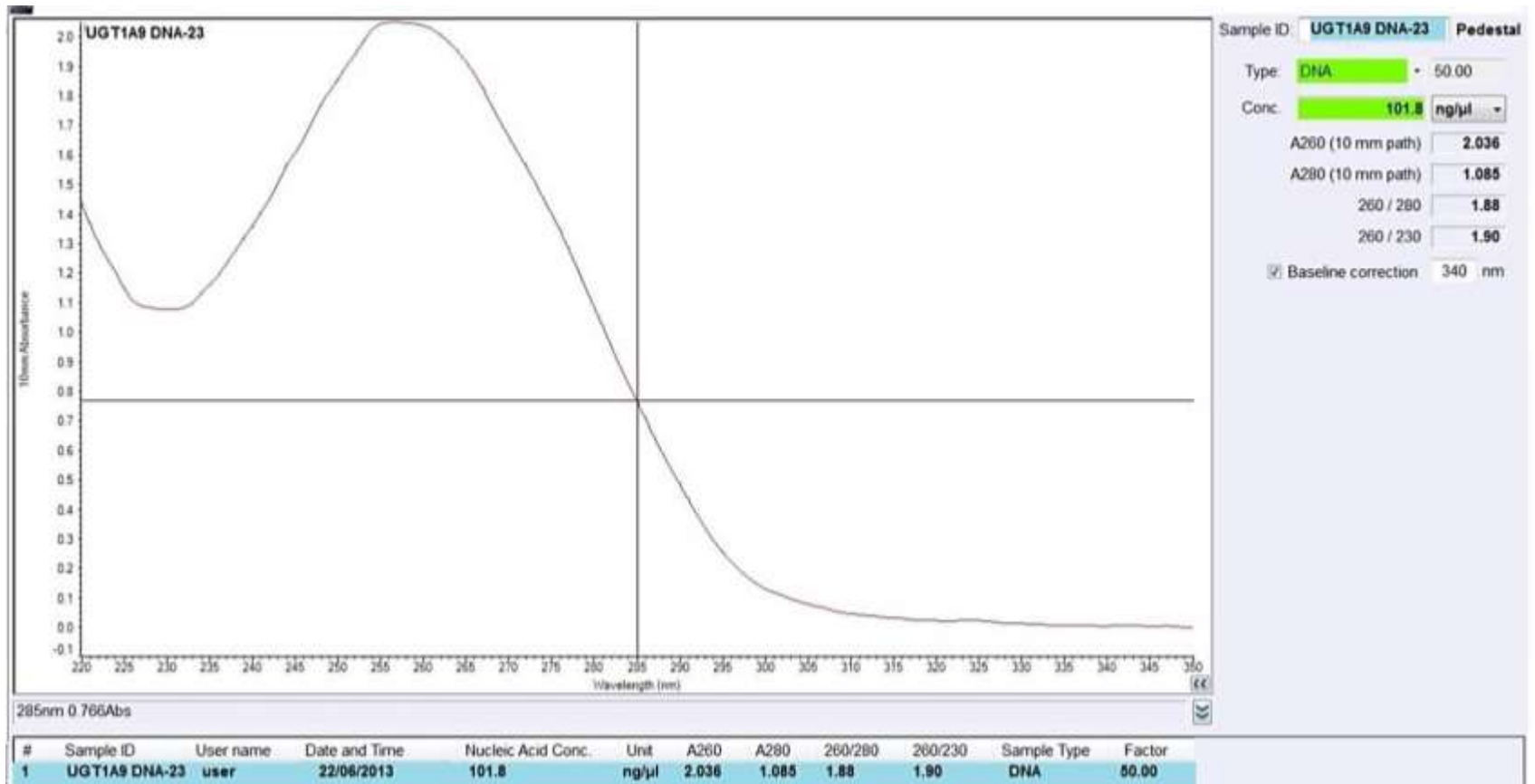


Figura 5.2. Cuantificación del ADN extraído. Evaluación de la concentración y pureza de ADN por espectrofotometría.

5.2 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR

Los fragmentos de ADN correspondientes al gen *UGT1A9* fueron amplificados por PCR. Las reacciones fueron estandarizadas, las condiciones modificadas fueron temperatura media de fusión (T_m) y concentración de $MgCl_2$. La Tabla 5.1 muestra las condiciones finales para la amplificación de cada fragmento. La Figura 5.3 presenta la evaluación de los amplicones por electroforesis.

Tabla 5.1. Condiciones estandarizadas para la PCR por fragmento.

Fragmento	T_m (°C)	$MgCl_2$ (mM)
X1A	57.1	2.5
rs17868320	58.0	1.5
rs2741049	57.6	2.5
rs6714486	56.4	2.5



Figura 5.3. Evaluación por electroforesis de la amplificación mediante PCR. Gel de agarosa al 2% (p/v TAE 1X) revelado con GelRed™. Amplificación de tres fragmentos con sus respectivos pesos moleculares: marcador de peso molecular (MP) en escalera de 100 pb, amplicones de las muestras de pacientes y control negativo [C(-)] para descartar contaminantes.

5.3 SECUENCIACIÓN POR EL MÉTODO DE SANGER

El resultado de la secuenciación se presenta como un electroferograma, cada pico corresponde a una base nitrogenada de la secuencia: A, T, G, C, identificada por un color específico.

La secuencia obtenida se alinea contra una secuencia de referencia (ENSG00000241119), en busca de polimorfismos (Figura 5.4).

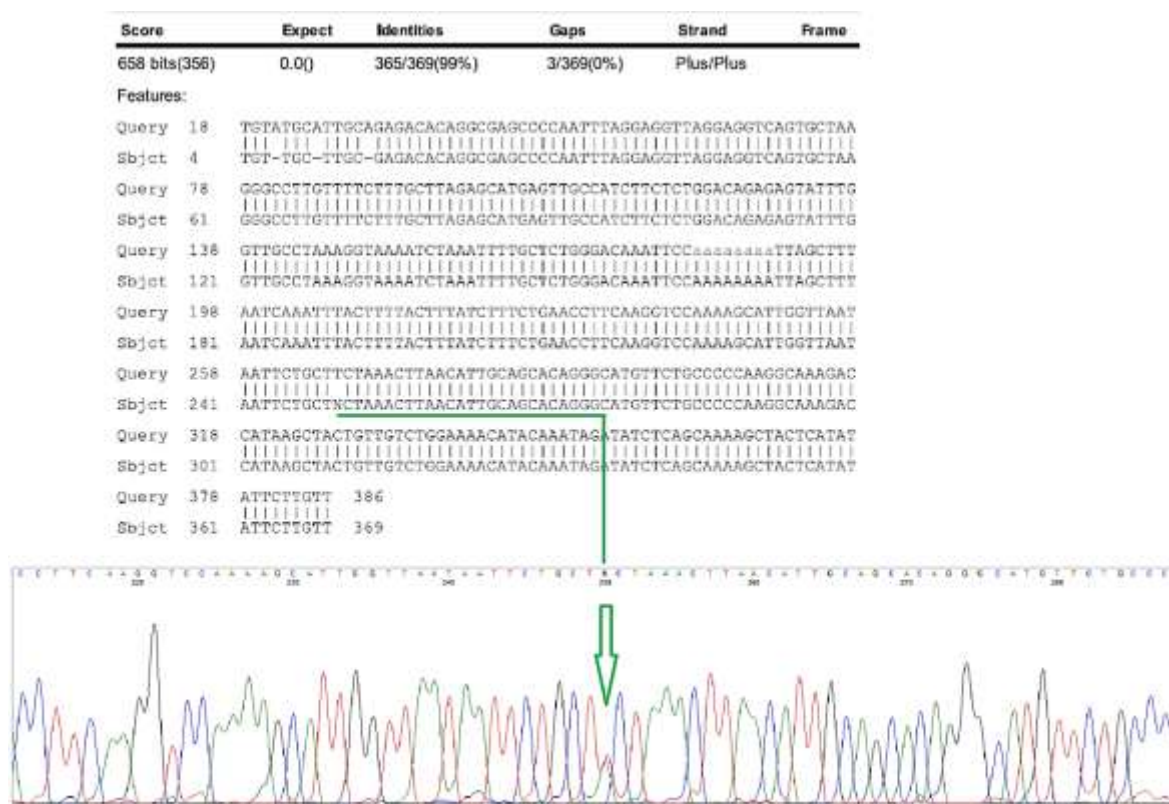
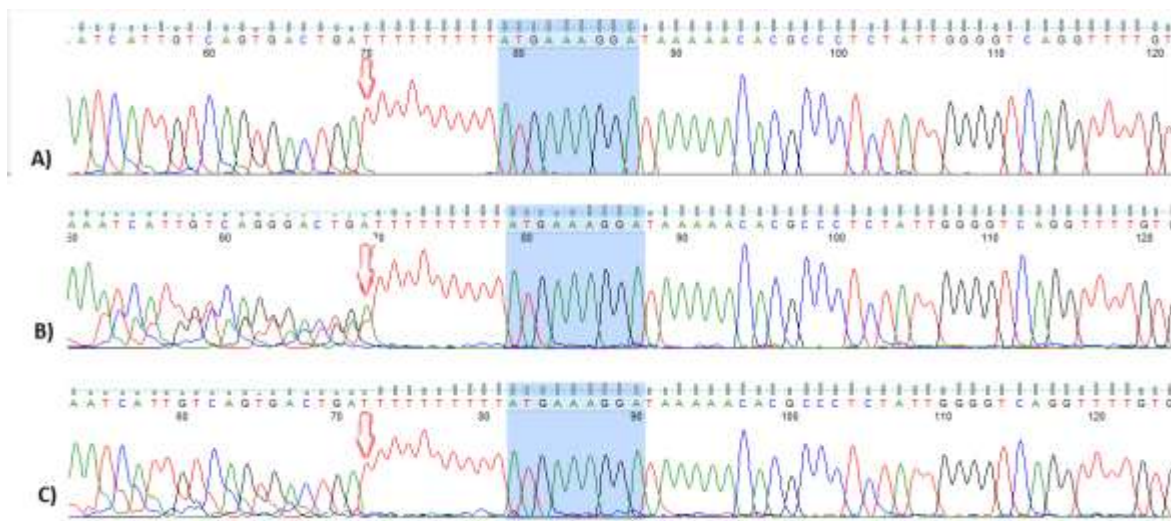
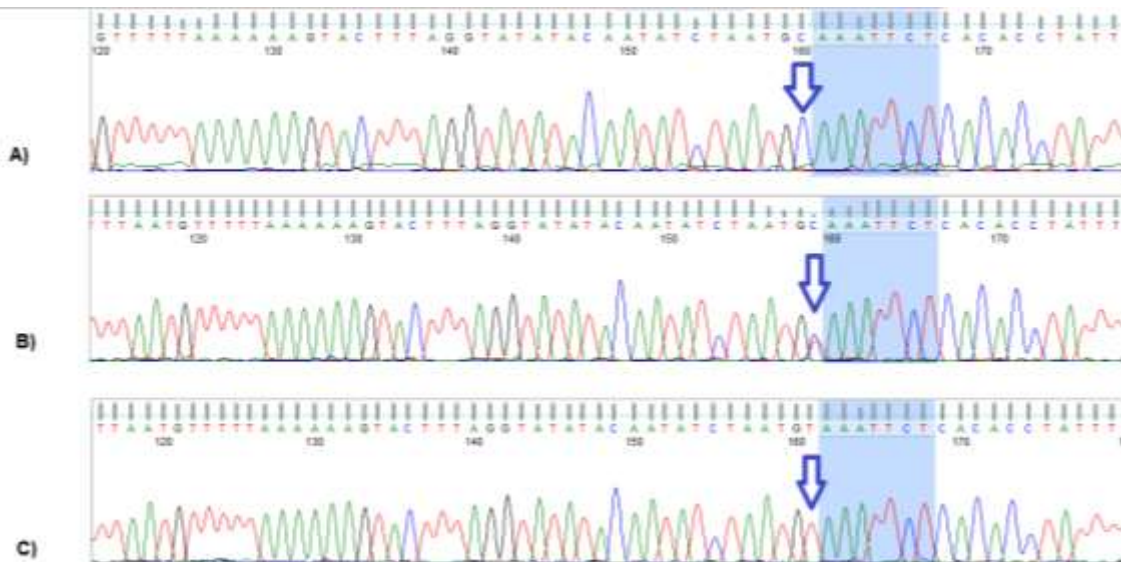


Figura 5.4. Resultado de alineamiento de las secuencias. La imagen superior es el resultado de la alineación en BLAST de las secuencias problema y la de referencia. Abajo el electroferograma de la secuencia problema, en donde se ilustran dos picos empalmados en la misma posición (alelos), indicando que la muestra pertenece a un paciente con genotipo heterocigoto para éste polimorfismo específico *rs6714486* (-275 T>A).

De la genotipificación se pueden obtener tres resultados: **A)** homocigoto ancestral, **B)** heterocigoto y **C)** homocigoto alternativo, las siguientes figuras muestran los electroferogramas obtenidos al analizar las muestras. Los tres genotipos se obtuvieron para los SNPs *rs3832043* (-118 T_{8>9}), *rs2741049* (1399 T>C), *rs2741046* (-331 T>C), *rs2741045* (-440 C>T) (Figura 5.5). Para *rs6714486* (-275 T>A) y *rs17868320* (-2152 C>T) sólo se encontraron los genotipos homocigoto ancestral y heterocigoto (Figura 5.6). Mientras que para *rs72551329* (8C>G) y *rs72551330* (98 T>C) únicamente se localizaron genotipos homocigotos ancestrales (Figura 5.7).

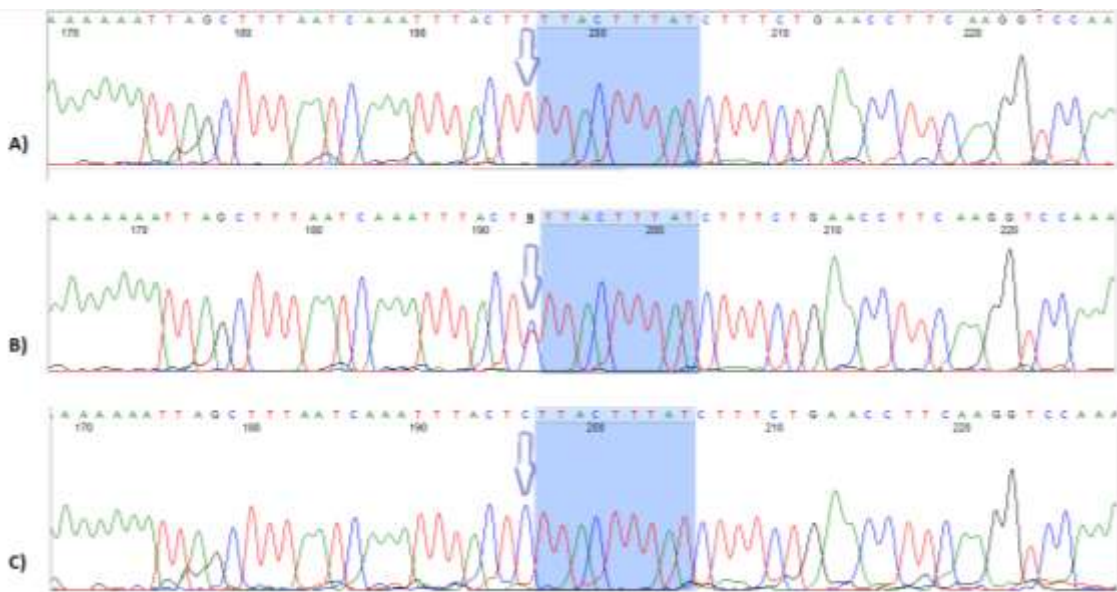


rs3832043 (-118 T_{9>10})

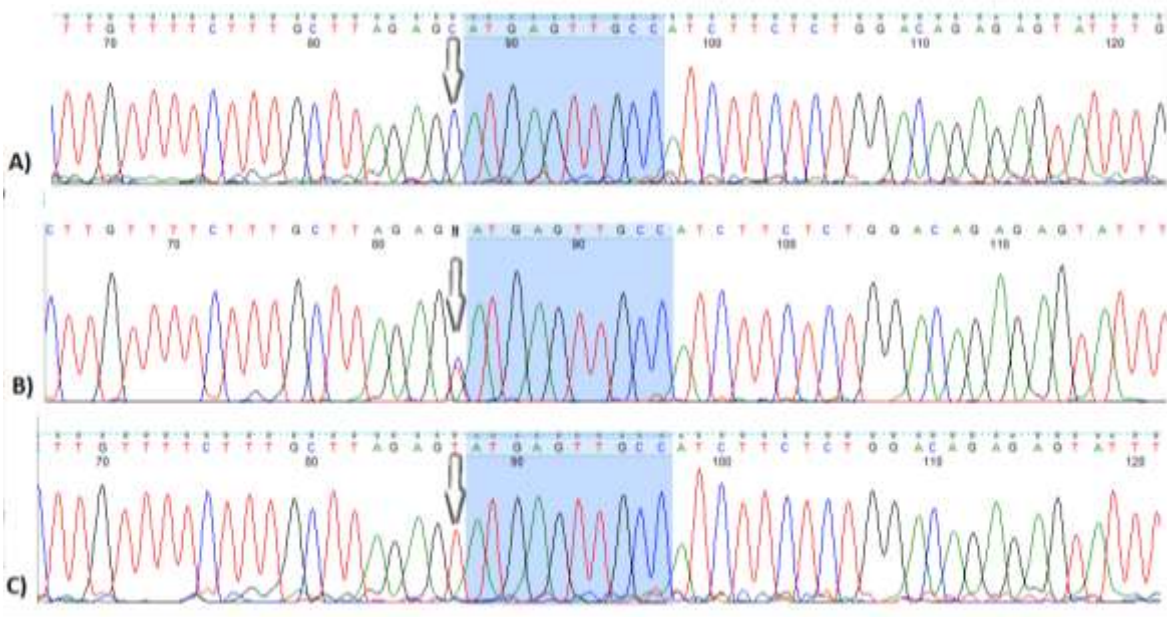


rs2741049 (1399 C>T)

Figura 5.5. Electroferogramas de los SNPs en los que se encontraron los tres genotipos. A) Secuencia de un paciente con genotipo homocigoto ancestral. **B)** Secuencia de un paciente con genotipo heterocigoto. **C)** Secuencia con genotipo homocigoto alternativo. Para el SNP *rs3831043* el alelo ancestral corresponde a 9 T a 118 bases corriente arriba del gen (-118 T_{9>10}), mientras que el alelo alternativo se refiere a la inserción de una T en la secuencia. Por otra parte para el SNP *rs2741049* el alelo ancestral es C a 1399, el alelo alternativo es T (1399 C>T).



rs2741046 (-331 T>C)



rs2741045 (-440 C>T)

Figura 5.5. Electroferogramas de los SNPs en los que se encontraron los tres genotipos. A) Secuencia de un paciente con genotipo homocigoto ancestral. **B)** Secuencia de un paciente con genotipo heterocigoto. **C)** Secuencia con genotipo homocigoto alternativo. El alelo ancestral de *rs2741046* es una T, es sustituido por una C en el alelo alternativo y se ubica a 331 bases corriente arriba del gen (-331 T>C). En *rs2741045* el alelo ancestral es una C ubicado 440 bases corriente arriba del gen, mientras que el alelo alternativo es una T (-440 C>T).

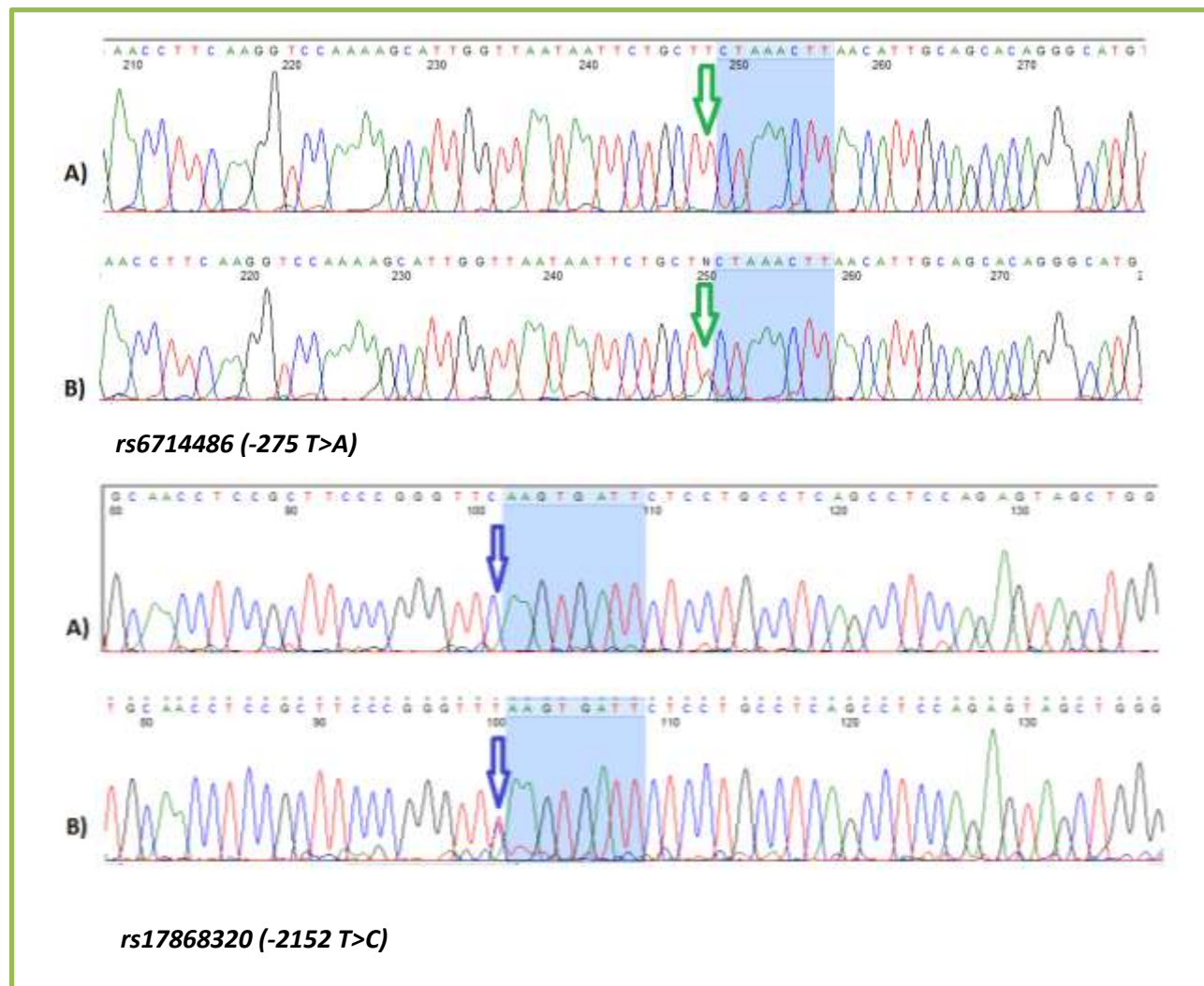


Figura 5.6. Electroferogramas de los SNPs que mostraron sólo dos genotipos.

A) Secuencia de un paciente con genotipo homocigoto ancestral. **B)** Secuencia de un paciente con genotipo heterocigoto. El SNP *rs6714486* tiene como alelo ancestral una T sustituido por una A, en una posición de 275 bases corriente arriba del gen (-275 T>A). El alelo ancestral en *rs17868320* corresponde a una T a 2152 bases corriente arriba del gen, mientras que es sustituido por el alelo alternativo C (-2152 T>C).

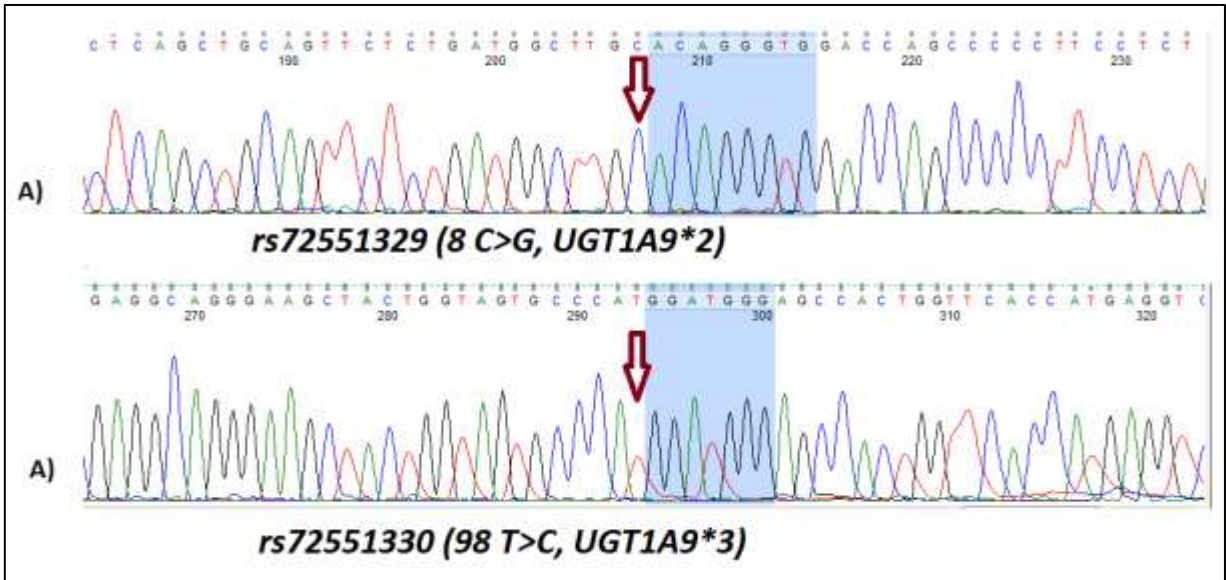


Figura 5.7. Electroferograma de los SNPs en los que sólo se localizó el genotipo homocigoto ancestral. El alelo silvestre en el SNP *rs72551329* corresponde a una C, mientras que es sustituido por una G en el alelo alternativo y se ubica en la base 8 de la región codificadora del gen (8 C>G). Por su parte el polimorfismo *rs72551330* se encuentra a 98 bases, el alelo silvestre corresponde a una T, mientras que el alelo alternativo es una C (98 T>C).

5.4 FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS

La distribución del genotipo de los pacientes y sus frecuencias alélicas para los ocho SNPs evaluados se encuentran en las Tablas 5.2 y 5.3.

Tabla 5.2. Frecuencias genotípicas para los ocho SNPs evaluados.

	<i>rs17868320</i> -2152 C>T	<i>rs2741045</i> -440 C>T	<i>rs2741046</i> -331 T>C	<i>rs6714486</i> -275 T>A	<i>rs3832043</i> -118 T	<i>rs72551329</i> 8 C>G	<i>rs72551330</i> 98 T>C	<i>rs2741049</i> 1399 T>C
N = 51					9>10			
Homocigoto Ancestral n (%)	48 (94.1)	43 (84.3)	42 (82.4)	49 (96.1)	14 (27.5)	51 (100)	51 (100)	20 (39.2)
Heterocigoto n (%)	3 (5.9)	6 (11.8)	8 (15.7)	2 (3.9)	33 (64.7)	0	0	28 (54.9)
Homocigoto Alternativo n (%)	0	2 (3.9)	1 (1.9)	0	4 (7.8)	0	0	3 (5.9)

Tabla 5.3. Frecuencias alélicas para los ocho SNPs evaluados.

	<i>rs17868320</i> -2152 C>T	<i>rs2741045</i> -440 C>T	<i>rs2741046</i> -331 T>C	<i>rs6714486</i> -275 T>A	<i>rs3832043</i> - 118 T 9>10	<i>rs72551329</i> 8 C>G	<i>rs72551330</i> 98 T>C	<i>rs2741049</i> 1399 T>C
N = 102								
Alelo Ancestral n (%)	99 (99.1)	92 (90.2)	92 (90.2)	100 (98.0)	61 (59.8)	102 (100)	102 (100)	68 (66.7)
Alelo Alternativo n (%)	3 (2.9)	10 (9.8)	10 (9.8)	2 (2.0)	41 (40.2)	0	0	34 (33.3)

Se determinó el equilibrio Hardy-Weinberg para los SNPs, la Tabla 5.4 indica las frecuencias genotípicas resultado de la evaluación y las frecuencias esperadas.

Tabla 5.4. Determinación del equilibrio Hardy-Weinberg.

SNPs N=51	Genotipos	Frecuencias observadas	Esperado	X²
<i>rs17868320</i> -2152 C>T	C/C	0.941	0.94	0
	C/T	0.059	0.06	
	T/T		0	
<i>rs2741045</i> -440 C>T	C/C	0.843	0.81	0.11
	C/T	0.118	0.18	
	T/T	0.039	0.01	
<i>rs2741046</i> -331 T>C	T/T	0.824	0.81	0.01
	T/C	0.157	0.18	
	C/C	0.019	0.01	
<i>rs6714486</i> -275 T>A	T/T	0.961	0.96	0
	T/A	0.039	0.04	
	A/A			
<i>rs3832043</i> - 118 T 9>10	9T/9T	0.269	0.36	0.13
	9T/10T	0.654	0.48	
	10T/10T	0.077	0.16	
<i>rs72551329</i> 8 C>G	C/C	1	NA	NA
<i>rs72551330</i> 98 T>C	T/T	1	NA	NA
<i>rs2741049</i> 1399 T>C	T/T	0.392	0.44	0.06
	T/C	0.549	0.44	
	C/C	0.059	0.11	

X² = chi cuadrada.

Se realizó una comparación entre las proporciones de SNPs obtenidos en la población mexicana y las poblaciones americana, europea, africana, asiáticos y un grupo de 66 personas con ancestría mexicana residentes en la ciudad de los Ángeles, en Estados Unidos reportados en el Proyecto de los 1000 Genomas (2010). La prueba χ^2 de Pearson se utilizó para hacer el análisis estadístico en todos los casos, donde H_0 : las diferencias entre los datos observados en mexicanos y los esperados entre las poblaciones reportadas se deben al azar. H_a : existe una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias observadas en la población mexicana y las reportadas. Con un nivel de significancia de 0.05 ($P \leq 0.05$) y dos grados de libertad.

Para los SNPs *rs2741045*, *rs2741046* y *rs2741049* existe una diferencia significativa entre las frecuencias observadas en la población mexicana y las reportadas (Figura 5.8).

En el caso de las variantes *rs17868320* y *rs72551330* las diferencias entre los datos observados en mexicanos y los esperados entre las poblaciones reportadas se deben al azar (Figura 5.9).

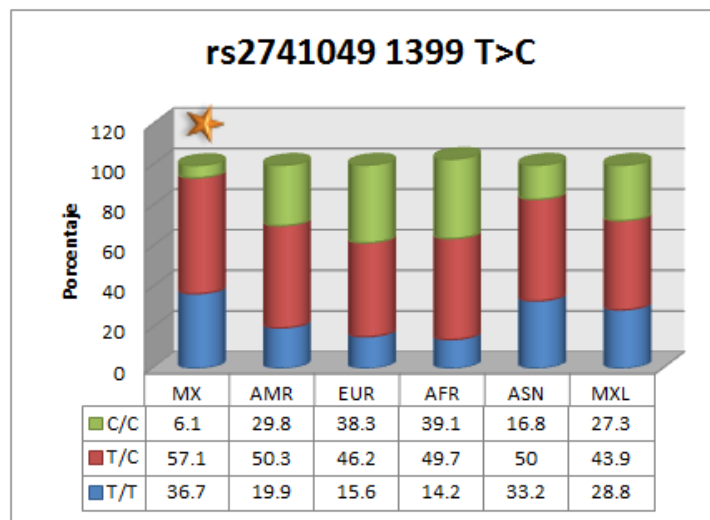
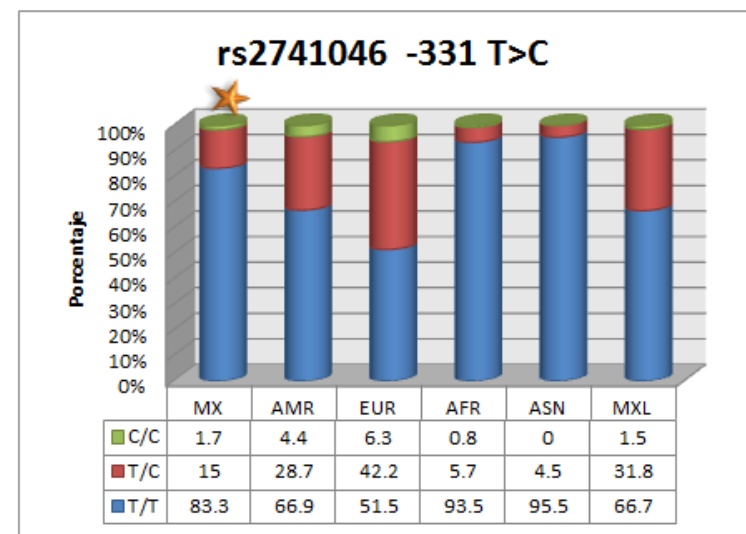
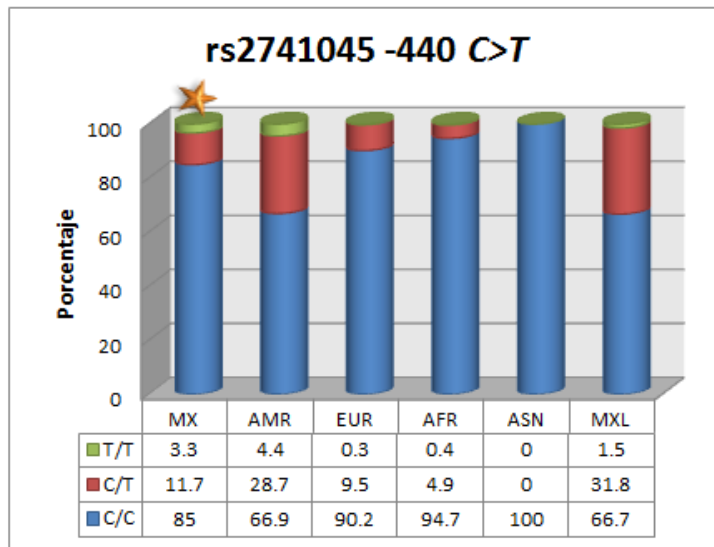


Figura 5.8. Distribución de SNPs en las poblaciones. Polimorfismos en los que existe una diferencia significativa entre las frecuencias observadas en la población mexicana y las reportadas. ★ $P < 0.05$ **MX**, Población pediátrica mexicana HIMFG vs las siguientes poblaciones: **MXL**, Población con ancestría mexicana residente en los Ángeles, EU; **AMR**, Población Americana; **EUR**, Población Europea; **AFR**, Población Africana; **ASN**, Población de Asia Oriental [Proyecto de los 1000 Genomas (2010)].

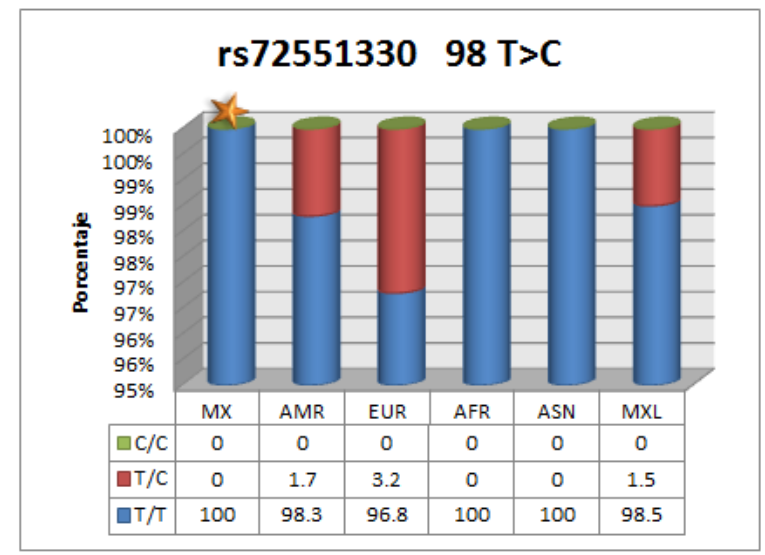
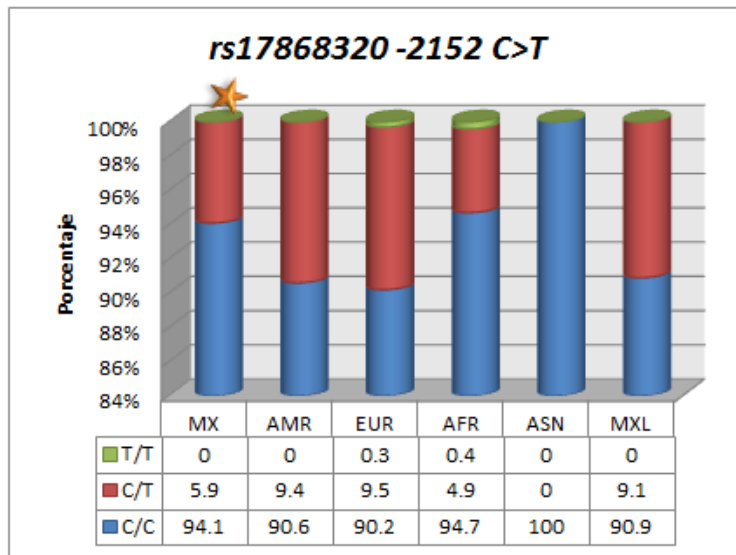


Figura 5.9. Distribución de SNPs en las poblaciones. Polimorfismos donde las diferencias entre los resultados observados en la población mexicana y en las poblaciones reportadas se deben al azar. ★ $p < 0.05$ **MX**, Población pediátrica mexicana HIMFG vs las siguientes poblaciones: **MXL**, Población con ancestría mexicana residente en los Ángeles, EU; **AMR**, Población Americana; **EUR**, Población Europea; **AFR**, Población Africana; **ASN**, Población de Asia Oriental [Proyecto de los 1000 Genomas (2010)].

El polimorfismo *rs6714486* presenta un comportamiento particular donde H_0 es rechazado para las poblaciones americana y africana; mientras que H_0 se acepta para las poblaciones europeas, asiática y mexicana residente en los Ángeles (Figura 5.10).

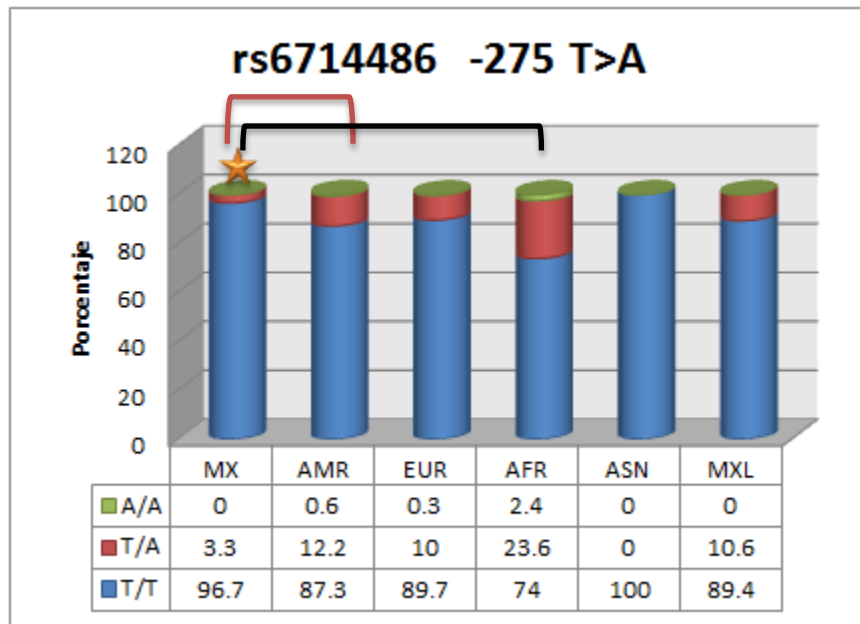


Figura 5.10. Distribución del SNP *rs6714486* en las poblaciones. Polimorfismo que en la población mexicana presenta diferencias significativas con AMR y AFR.

★ $p < 0.05$ **MX**, Población pediátrica mexicana HIMFG vs las siguientes poblaciones: **MXL**, Población con ascendencia mexicana residente en los Ángeles, EU; **AMR**, Población Americana; **EUR**, Población Europea; **AFR**, Población Africana; **ASN**, Población de Asia Oriental [Proyecto de los 1000 Genomas (2010)].

Se realizó un análisis en el programa PROVEAN v1.1 (Protein Variation Effect Analyzer), una herramienta que predice si la sustitución de aminoácidos tienen un impacto en la función biológica de una proteína. Si la puntuación es igual o por debajo de un umbral predefinido ($c=-2.5$), se predice que la variante de la proteína tiene un efecto perjudicial; si está por encima del umbral, se predice un efecto neutro para la variante (Tabla 5.5).

Un análisis en SIFT (Sorts Intolerant From Tolerant amino acid) una herramienta basada en la homología que evalúa sustituciones de aminoácidos y predice si una sustitución de aminoácidos en una proteína generará un efecto fenotípico, basado en la premisa de que la evolución de proteínas se correlaciona con la función de la proteína, como el obtenido por el SNP *rs776746* (6986 A>G) en el alelo *CYP3A5*3* que codifica para un codón de paro prematuro, conduciendo a la pérdida de la función y ausencia de la proteína [García *et al.*, 2012].

Con base en el cálculo de las probabilidades normalizadas para las sustituciones se predice que aquellos con valores mayores o igual a 0.05 serán cambios tolerados y no producirán algún efecto fenotípico (Tabla 5.5).

<i>Anotación</i>						<i>Predicción PROVEAN</i>	<i>Predicción SIFT</i>		
dbSNP_ID	Cambio en el Codón	Posición	Residuo de referencia	Residuo alternativo	Tipo	Puntuación	Predicción (c= -2.5)	Puntuación	Predicción (c= 0.05)
rs72551329	GCT TG[C/G] ACA	3	C	W	Cambio de sentido equivocado	-0.872	Neutral	0.125	Tolerado
rs72551330	CCC A[TC]G GAT	33	M	T	Cambio de sentido equivocado	-2.717	Deletereo	0.696	Tolerado

Tabla 5.5. Análisis de predicción en el efecto fenotípico de los SNPs exónicos. Evaluación de los SNPs exónicos en los programas PROVEAN v1.1 y SIFT, para identificar si la sustitución de aminoácidos produce un impacto en la función de la proteína.

VI. DISCUSIÓN

El ácido micofenólico (AMF) es un fármaco inmunosupresor administrado como parte de la terapia postrasplante renal. El metabolismo del AMF se lleva a cabo por glucuronidación, la enzima UGT1A9 es la principal responsable para obtener el metabolito inactivo, el glucurónido fenólico del AMF (MPAG). Mientras tanto la enzima UGT2B7 es la implicada en la producción del metabolito farmacológicamente activo, el acilglucurónido del AMF (AcMPAG).

El gen que codifica para la enzima que produce el metabolito MPAG es *UGT1A9*. Éste posee polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*) que alteran el metabolismo y la farmacocinética de algunos fármacos, como el inmunosupresor AMF, el anticancerígeno irinotecan y el anestésico propofol [Prausa *et al.*, 2009].

Existen diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre poblaciones, la evaluación de éstas para los *SNPs*: rs17868320 (-2152C>T), rs2741045 (-440 C>T), rs2741046 (-331 T>C), rs6714486 (-275 T>A), rs3832043 (-118T9>10), rs72551329 (8 C>G), rs72551330 (98 T>C), (rs2741049 (1399 T>C) permitirá tener una referencia en la población mexicana, de quien no existen estudios farmacogenómicos referentes a los polimorfismos en *UGT1A9* y su posible asociación con la respuesta al AMF.

El presente estudio surge del interés de mejorar la terapia inmunosupresora en pacientes postrasplante renal, pues tan sólo en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se efectúan un promedio de 30 trasplantes renales por año. Los trasplantes realizados son pocos en comparación con la demanda de trasplantes, por lo tanto resulta tan importante mantener la vida del paciente como la sobrevida del injerto. En este contexto, el artículo de García Roca *et al.*[2012] es un antecedente directo de estudios farmacogenómicos en trasplante renal, desarrollado en población mexicana donde se asocian polimorfismos en *CYP3A5* y la dosis de tacrolimus administrada a los pacientes atendidos en el Departamento y Laboratorio de Nefrología del HIMFG, donde se realizó la presente tesis.

Los mecanismos por los cuales los SNPs generan diferencias en la expresión y actividad enzimática de UGT1A9 aún no son elucidados, abriendo un nuevo campo de investigación. La revisión de Liao y Lee (2010) describe los posibles mecanismos por los que los SNPs generan diferentes fenotipos, afectando en distintos niveles de expresión la información contenida en el genoma.

El gen *UGT1A9* pertenece a la subfamilia *UGT1A*, donde la síntesis de la proteína sólo difiere en la secuencia del exón 1 y los cuatro exones restantes son comunes para las nueve isoformas de las proteínas funcionales (*UGT1A1*, *UGT1A3-UGT1A10*) y cuatro pseudogenes (*UGT1A2p*, *UGT1A11p*, *UGT1A12p*, *UGT1A13p*). Tomando en cuenta que el primer exón es el que determina la isoforma activada, puede inferirse que los SNPs en esta región modificarán la expresión y actividad enzimática. Existe una gran posibilidad de que los principales mecanismos para estas modificaciones se den en la región codificante.

Los SNPs *rs72551329* (8 C>G) y *rs72551330* (98T>C), corresponden al alelo 2 (*UGT1A9*2*) y al alelo 3 (*UGT1A9*3*) del gen respectivamente. Ambas son variantes de sentido equivocado *rs72551329:C3W* y *rs72551330:M33T*. Éste último es asociado con una disminución de la glucuronidación que se traduce en una mayor exposición al AMF. Ambos polimorfismos conducen a la completa o parcial inactivación de la actividad de glucuronidación para varios sustratos como el anticancerígeno SN-38 [Girard *et al.* 2004].

Se realizó un análisis a través de los programas PROVEAN v1.1 y SIFT que predicen si la sustitución de aminoácidos producen un impacto en la función biológica de una proteína, generando un efecto fenotípico. Para el polimorfismo *rs72551329* no se predijo alguna modificación, sin embargo para *rs72551330* la predicción de PROVEAN indica que el cambio produce un impacto en la función de la proteína, mientras que SIFT no predice cambio alguno.

A nivel de la traducción, los SNPs pueden alterar el plegamiento del ARNm, incrementando o disminuyendo la estabilidad del ARNm y como consecuencia la

actividad enzimática. Las diferentes estructuras de ARNm producidas por los SNPs también pueden alterar la velocidad de síntesis de proteínas y la eficiencia de la iniciación de la traducción, mostrando resultados similares en los niveles de ARNm pero diferentes niveles de proteína [Liao, Lee, 2010].

A nivel postraduccional, se ha descrito como los SNPs no sinónimos afectan la función de la proteína y su interacción, en términos de estabilidad, afinidad, propiedades catalíticas y modificaciones postraduccionales [Liao, Lee, 2010]. Por ejemplo el gen que codifica la enzima TPMT posee varios alelos que alteran la secuencia de aminoácidos codificada generando una proteína menos estable, lo que nos indica que las variaciones en la estabilidad de la proteína generadas por los SNPs en la secuencia codificante puede producir diferentes niveles de la actividad enzimática [Wei *et al.*, 2012].

Los SNPs en la secuencia codificante de *UGT1A9* son no sinónimos. El mecanismo por el cual afectan la actividad enzimática aún no han sido descritos. La propuesta en este trabajo es que pueden alterar la afinidad de la unión a la proteína y con ello las propiedades catalíticas. La presencia de los dos polimorfismos en la región codificante a una distancia de 30 aminoácidos entre sí, infiere la potencial asociación por haplotipos de ambos SNPs. Al estar ambos presentes alterando la secuencia de aminoácidos, es posible que modifiquen la conformación de la proteína, produciendo menor estabilidad de la misma y menor afinidad de unión del sustrato, disminuyendo su actividad.

Se han presentado posibles mecanismos por los cuales los SNPs en la región codificante del exón 1 pueden modificar la actividad de *UGT1A9*. Sin embargo, en la población analizada, los 102 alelos evaluados presentaron genotipo ancestral para ambos polimorfismos (*rs72551329* y *rs72551330*). En poblaciones como la caucásica, se ha reportado menos del 5% de la presencia de estos, sugiriendo que estos polimorfismos presentan una actividad limitada en la variación de la glucuronidación mediada por *UGT1A9* [Girard *et al.*, 2004].

Un estudio realizado en el HIMFG en pacientes pediátricos postrasplante renal, mostró que el 75% de los pacientes tienen un ABC_{0-12h} de AMF por arriba de

los valores recomendados, a pesar de recibir una dosis ponderal apropiada [Medeiros *et al.*, 2005]. Como parte complementaria, se realizó en el HIMFG, un estudio de los polimorfismos en *UGT1A9* y su impacto en la farmacocinética del AMF [Jiménez, 2013], el cual evaluó el ABC de AMF postrasplante renal en 15 pacientes. El nivel terapéutico de AMF recomendado en niños se relaciona con un ABC entre 36 y 64 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$. Sólo dos pacientes se encontraron dentro de estos niveles, mientras que diez pacientes se encontraron por debajo de estos valores con un efecto inmunosupresor disminuido. Por otra parte tres pacientes presentaron niveles por arriba de los recomendados, los cuáles, se encontraron en riesgo de toxicidad debida al fármaco.

El grupo de Girard *et al.* [2004] fue el primero en describir y demostrar que variaciones en la secuencia del promotor de *UGT1A9* están ligados con efectos *in vivo* en la expresión de proteína en el hígado y mediar la actividad de glucuronidación para sustratos farmacológicamente relevantes.

Con base en lo anterior y en la literatura se realizó la evaluación de cinco SNPs exogénicos en *UGT1A9*, ubicados en la región promotora. Se ha reportado que los SNPs *rs17868320* (-2152C>T) y *rs6714486* (-275T>A) favorecen una mayor expresión enzimática produciendo un incremento en la glucuronidación de AMF a MPAG, reduciendo una exposición al fármaco, esto se ha observado en pacientes que poseen uno o ambos polimorfismos. [Kuypers *et al.* 2005, Prausa *et al.* 2009].

Por el contrario *rs2741045* (-440 C>T) y *rs2741046* (-331 T>C) producen un decremento en la actividad enzimática, traducido como un aumento en la exposición al AMF y la posible presencia de efectos adversos relacionados al AMF como la leucopenia, estos SNPs tienen una estrecha relación en caucásicos [Kuypers *et al.* 2005, Prausa *et al.* 2009].

Basados en el dogma central de la biología molecular, los polimorfismos en la región promotora pueden actuar a nivel de la transcripción, principalmente en la regulación, variando los niveles de proteína o la expresión de la misma. Los genes

se encuentran generalmente inactivos y requieren ser activados para transcribirse. Los humanos poseemos tres ARN polimerasas que reconocen secuencias de promotores específicas para el inicio de la transcripción. Cambios en las regiones promotoras pueden producir que las ARN polimerasas no reconozcan estas regiones de manera específica, posiblemente alterando el inicio de la transcripción. Los polimorfismos en la región reguladora pueden causar variaciones en la expresión del gen y están clasificados en dos grupos: polimorfismos *cis*, que afectan el gen dentro o cerca del *locus*, y los *trans*, que se encuentran en un gen pero afecta la expresión de otro gen en un *locus* distinto. Un SNP en un sitio de unión a ADN regulado puede alterar la afinidad con la proteína reguladora, resultando en diferencias en la expresión de un gen [Liao, Lee 2010].

Como antecedente de esta propuesta se tiene la descripción de dos polimorfismos localizados en la región promotora de los genes de la familia UGT. El primero se encuentra en *UGT1A1* y consiste en la inserción de un par de bases extras en el promotor (en la caja TATA), disminuyendo la expresión del gen *in vitro* y en individuos homocigotos alternativos, se predice una reducción de aproximadamente 30% de los niveles de proteína [Girard *et al.*, 2004]. El segundo está en *UGT2B7* y en una línea celular de hepatocarcinoma HepG2 conduce a una actividad siete veces menor de la actividad promotora *in vitro* [Girard *et al.*, 2004].

Hay poca información respecto a la regulación de *UGT1A9*. Lo anterior sugiere que los SNPs *rs2741045* (-440 C>T) y *rs2741046* (-331 T>C), que se encuentran a 109 bases de distancia entre ellos y producen un decremento en la actividad enzimática, pueda deberse a una disminución en la expresión causada por modificaciones negativas en la regulación de la transcripción, probablemente tratándose de un polimorfismo *cis*.

Las variantes *rs17868320* (-2152C>T) y *rs6714486* (-275T>A) producen una mayor actividad enzimática [Kuypers *et al.* 2005, Prausa *et al.* 2009]. Ésto contradice lo antes mencionado referido a la disminución de la expresión. Sin embargo en un análisis *in vitro* en muestras de hígado humano realizado por

Girard *et al.* [2004], se comprueba el aumento en la expresión de la proteína. Una posibilidad es que en el proceso de regulación de la transcripción los SNPs modifiquen la secuencia de unión de activadores o potenciadores produciendo el aumento de la expresión.

Girard *et al.* [2004] reporta diez polimorfismos en la región promotora de *UGT1A9* con una frecuencia de una variante cada 222 pb al analizar la secuencia de 2224 bases corriente arriba del gen. Esto demuestra la mayor variabilidad encontrada en este gen en contraste con *UGT1A1* y *UGT2B7*, así como la complejidad en la regulación. Al tener las variables posibles de la región promotora realizó un análisis de haplotipos, donde sugiere una posible asociación entre *rs17868320* (-2152C>T) y *rs6714486* (-275T>A), pero haciendo un análisis con los niveles de la proteína y su actividad, indica que la variante *rs6714486* puede o no ir acompañada de *rs17868320* para producir el aumento en los niveles de la proteína y en la actividad de la misma.

Con base en lo anterior, se propone que la variante *rs17868320*, que se encuentra a 2152 bases corriente arriba del gen, por su lejanía con el codón de inicio, podría no producir por sí sólo modificaciones en la región promotora que afecten el fenotipo. Sin embargo, un motivo por el que está asociada con el aumento de la actividad enzimática sería que se encuentre en haplotipo (desequilibrio de ligamiento), al tener un desequilibrio de ligamiento con el SNP responsable de la variación en la respuesta, es decir que en algún momento en el proceso de recombinación las variantes segreguen de manera dependiente. En este caso deberán realizarse investigaciones para identificar el SNP causante del fenotipo; por lo descrito por Girard *et al.* [2004] el SNP *rs6714486* es un candidato idóneo como la variante modificadora.

El SNPs *rs3832043* (-118 T_{9>10}) en el análisis realizado por Girard *et al.* [2004] no muestra cambios en los niveles de expresión de la proteína; sin embargo en artículos recientes se ha observado una disminución en la actividad enzimática para *rs3832043* (-118 T_{9>10}) [Guo *et al.*, 2013]. En este caso, se sugieren dos mecanismos para esta variante. La primera es que al no ser afectada aparentemente la expresión de la enzima, puede ser un caso similar al

mencionado para *rs17868320*, donde estos SNPs se encuentran en haplotipo con otra variante que sea la que produzca realmente la modificación en la expresión y actividad enzimática. El segundo es que la inserción de la T sea causa de la disminución en la actividad enzimática, con un mínimo decremento en la expresión. Lo anterior permite la apertura de una línea de investigación para la evaluación de éste SNP mediante estudios *in vitro*.

El *rs2741049* (1399 C>T) se encuentra en el intrón 1 y aún no se han reportado resultados consistentes respecto a éste en el área clínica. Sin embargo, se sabe que produce un incremento en la expresión de la proteína [Guo *et al.*, 2013]. La propuesta es que al estar en la región intrónica participa en la modificación del proceso de splicing pre-ARNm, el cual es un mecanismo complejo que se basa en el reconocimiento correcto de las secuencias codificantes de la proteína (exones) y de las no codificantes (intrones) en el ARN transcrito.

6.1 FRECUENCIAS GÉNICAS Y ALÉLICAS

Diversos estudios han sido desarrollados a nivel mundial con el objetivo de encontrar las variaciones más frecuentes, en las poblaciones ancestrales como en el Proyecto Internacional HapMAp, o en estudios en cada país con el análisis de un gen en particular como los realizados por Guo *et al.* [2013] y Zakerska *et al.* [2013] en las poblaciones China y Polaca, respectivamente. La importancia del impacto que pudieran tener las variaciones en *UGT1A9* en la salud de pacientes bajo la terapia inmunosupresora con AMF, principalmente posterior a un trasplante renal, llevó la determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los principales SNPs en *UGT1A9* en un grupo de población mexicana (Tablas 5.1 y 5.2).

El 90% de la población mexicana se compone de mestizos, que exhibe una mezcla de ascendencias amerindias, europeas y africanas [García *et al.* 2012]. En el presente trabajo se realizó una comparación entre las proporciones de los SNPs obtenidas en la población mexicana evaluada y las poblaciones americana,

europaea, africana, asiáticos y un grupo de 66 personas con ancestría mexicana residentes en la ciudad de los Ángeles, en Estados Unidos, reportadas en el Proyecto de los 1000 Genomas [Abecasis *et al.*, 2010].

Los polimorfismos *rs2741045*, *rs2741046* y *rs2741049* presentan una diferencia significativa entre las frecuencias observadas en la población mexicana y las reportadas (Figura 5.7). En la variante *rs17868320*, los datos observados en mexicanos y los reportados para otras poblaciones no muestran diferencias significativas (Figura 5.8). Los SNPs que se encuentran en el exón I son *rs72551329* y *rs72551330*. De ambos sólo se obtuvo el genotipo homocigoto ancestral. En el caso de *rs72551329* no se encuentran reportadas las frecuencias en otras poblaciones en el Proyecto de los 1000 Genomas [Abecasis *et al.*, 2010]. Sin embargo, Villeneuve *et al.* [2003] lo reportó por primera vez asociándolo con su impacto en el metabolismo principalmente de fármacos anticancerígenos. En el caso de *rs72551330*, la Figura 5.8 indica que no hay diferencia entre las frecuencias obtenidas y las reportadas en las otras poblaciones.

Los resultados muestran que el SNP *rs6714486* muestra una diferencia significativa entre las frecuencias observadas para la población mexicana respecto a las poblaciones americana y africana; mientras que no presenta diferencias con las poblaciones europeas, asiática y mexicana residente en los Angeles (Figura 5.9).

El SNP *rs3832043* no muestra datos de frecuencia en el Proyecto de los 1000 Genomas [Abecasis *et al.*, 2010], pero han sido estudiado por Girard *et al.* [2004] y Guo *et al.* [2012], asociándolo con un incremento en la actividad enzimática y reducción en la toxicidad, en pacientes con cáncer colorectal tratados con capecitabina e irinotecán. En la población mexicana se obtuvo mayor frecuencia del genotipo heterocigoto que del genotipo ancestral, generando la apertura de un estudio para la determinación de las frecuencias en otras poblaciones, para determinar su asociación con el fenotipo.

La Tabla 5.3 muestra la evaluación del equilibrio Hardy- Weinberg de acuerdo a los genotipos obtenidos, la cual, con base en la prueba χ^2 de Pearson indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa, lo que indica que

el grupo evaluado se encuentra en equilibrio para los SNPs: *rs17868320* (-1052 C>T), *rs2741045* (-440 C>T), *rs2741046* (-331 T>C), *rs6714486* (-275 T>A), *rs3832043* (-118 T>G) y (*rs2741049* (1399 T>C)). Por otro lado los polimorfismos *rs72551329* (8 C>G) y *rs72551330* (98 T>C) no alcanzan el equilibrio al obtener sólo el alelo ancestral en la población evaluada, lo que sugiere un incremento en la muestra para encontrar el alelo variante.

El análisis global de genotipos y farmacocinética realizado por Jiménez [2013] no mostró una asociación significativa entre los SNPs de manera individual, pero en un análisis por haplotipos, sugiere que la presencia de los genotipos heterocigotos para *rs2741049* y *rs2741046* resulta en una mayor $ABC_{0-12\text{ h}}$ en comparación con la obtenida al presentarse los alelos ancestrales.

Respecto a la población evaluada en el presente estudio, el tamaño de la muestra es reducido en comparación con las evaluadas en el Proyecto de los 1000 Genomas o en otras publicaciones [Guo *et al.* 2012, Zakerska *et al.*, 2013], sin embargo debe considerarse que el muestreo para genotipificación de *UGT1A9* tomó casi dos años por las condiciones de los pacientes evaluados. Además de la determinación de la frecuencia es importante realizar el análisis farmacocinético y farmacodinámico para compararlo con los SNPs encontrados y determinar si existe una asociación directa entre polimorfismo y fenotipo en nuestra población, para definir si existe un marcador susceptible al tratamiento que se va a administrar postrasplante renal.

La población mexicana en su mayoría es mestiza y existen diferencias genéticas regionales en México. Sin embargo, el principal objetivo de este estudio es tener un primer acercamiento de la frecuencia de los SNPs de *UGT1A9* hacia el desarrollo de la PGx del AMF. Por lo tanto, el origen étnico de los pacientes no es tan relevante como lo es el mantener la sobrevida del injerto y la vida del paciente.

En perspectiva, además de analizar *UGT1A9*, podrían evaluarse otros genes asociados con la farmacocinética y farmacodinamia de AMF como *UGT1A8*, *UGT2B7* y *MRP2* que codifican para enzimas que participan en su metabolismo, o *IMPDH2* blanco del fármaco.

VII. Conclusiones

Es el primer estudio en población mexicana de determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs en *UGT1A9*.

En los SNPs exónicos no se encontró algún alelo alternativo siendo los genotipos obtenidos ancestrales.

En los polimorfismos *rs3832043* y *rs2741049* se obtuvo mayor frecuencia de los genotipos heterocigotos.

Los SNPs *rs3832043* y *rs72551329* no muestran frecuencias reportadas en otras poblaciones en el Proyecto de los 1000 Genomas.

Los mecanismos de la regulación de la transcripción de *UGT1A9* y el impacto de los SNPs en la región promotora aún no han sido explicados y requiere mayor investigación.

Se requiere de un incremento de la muestra y realizar de manera paralela determinaciones farmacocinéticas de los niveles de AMF en pacientes con trasplante renal, de manera que estos estudios sean de utilidad como apoyo clínico en la terapia inmunosupresora para la prevención del rechazo y toxicidad en el paciente.

Este estudio favoreció el desarrollo de un nuevo protocolo de Asignación de dosis por genotipo, con dos inmunosupresores (Tacrolimus – AMF) en pacientes con trasplante renal.

VIII. REFERENCIAS

- 1.- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467 (7319)** : 1061 – 73.
- 2.- Alberú J., E. Mancilla. (2005).Inmunosupresión para receptores de trasplante renal: estrategias actuales. *Rev Invest Clin* **57 (2)**: 213-224.
- 3.- Cascorbi I., O. Bruhn, A.N. Werk. (2013). Challenges in pharmacogenetics. *Eur J Clin Pharmacol* **69(Suppl 1)**: S17-S23.
- 4.- Evans W.E., M.V. Relling. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286 (5439)**: 487–91.
- 5.- Evans W.E., M.V. Relling. (2004). Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics.*Nature* **429 (6990)**: 464-8.
- 6.- García Roca P., M. Medeiros, H. Reyes, B.A. Rodríguez Espino, J. Alberú, L. Ortiz, M. Vázquez Perdomo, G. Elizondo, L.E. Morales Buenrostro, E. Mancilla Urrea, G. Castañeda Hernández. (2012). CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res* **43 (4)**: 283-7.
- 7.- Girard H., M.H. Court, O. Bernard, L.C. Fortier, L. Villeneuve, Q. Hao, DJ Greenblatt, LL von Moltke, L. Perusse, C. Guillemette. (2004). Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* **14 (8)**: 501–15.
- 8.- Guo D., L.F. Pang, Y. Han, H. Yang, G. Wang, Z.R. Tan, W. Zhang, H.H. Zhou. (2013). Polymorphisms of UGT1A9 and UGT2B7 influence the pharmacokinetics of mycophenolic acid after a single oral dose in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **69 (4)**: 843-9.

- 9.- Jiménez Peña B. (2013). Polimorfismo UGT1A9 e impacto en la farmacocinética del ácido micofenólico en pacientes pediátricos pre y post-trasplante renal. Tesis. UNAM, Facultad de Medicina.
- 10.- Katzung BG., S. Masters, A. Trevor. (2009). Farmacología básica y clínica. 11 Edición. Mc Graw- Hill.
- 11.- Kuypers D.R., M. Naesens, S. Vermeire, Y. Vanrenterghem. (2005). The impact of uridina diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in the novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* **78 (4):** 351-61.
- 12.- Liao P.Y., K.H. Lee. (2010). From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochem Eng J* **49:** 149-158.
- 13.- Maya J.D. (2007). Pharmacokinetics: absorption and distribution. *Medwave* **7 (4):** e3449.
- 14.- Medeiros Domingo M., B. Romero Navarro, S. Valverde Rosas, R. Delgadillo, G. Varela Fascinetto, R. Muñoz Arizpe (2005). Trasplante renal en pediatría. *Rev Inv Clin* **57 (2):** 230-6.
- 15.- Meyer U.A. (2004). Pharmacogenetics- five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* **5(9):** 669-76.
- 16.- Prausa S.E., T. Fukuda, D. Maseck, K.L. Curtsinger, C. Liu, K. Zhang, T.G. Nick, J.R. Sherbotie, E.N. Ellis, J. Goebel, A.A. Vinks. (2009). UGT Genotype May Contribute to Adverse Events Following Medication with Mycophenolate Mofetil in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *Clin Pharmacol Ther* **85 (5):**495 -500.
- 17.- Relling M.V., T.E. Klein. (2011). CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther* **89(3):** 464-7.

- 18.- Rosso F.C., de Sanse TV., Sampaio E.L., Park S.I., Silva H.T. Jr., Medina Pestana J.O. (2009) Clinical impact of polymorphisms of transport proteins and enzyme involved in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* **41 (5)**: 1441-55.
- 19.- Sánchez-Fructuoso A.I., M.L. Maestro, N. Calvo, M. Viudarreta, I. Pérez-Flores, S. Veganzone, V. De la Orden, D. Ortega, M. Arroyo, A. Barrientos. (2009). The prevalence of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Transplant Proc* **41 (6)**: 2313-6.
- 20.- Sim S.C., M. Kacevska, M. Ingelman Sundberg. (2013). Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J* **13 (1)**: 1-11.
- 21.- Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- 22.- Sweeney BP. (2004). Watson and Crick 50 years on. From double helix to pharmacogenomics. *Anaesthesia*. **59(2)**: 150 – 65.
- 23.- Tett S.E., F. Saint- Marcoux, C.E. Staatz, M. Brunet, A.A. Vinks, M. Miura, P. Marquet, D.R. Kuypers, T. van Gelder, D. Cattaneo. (2011). Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev* **25 (2)**: 47-57.
- 24.- Van Schaik R.H.N., M. van Agteren, J.W. de Fijter, A. Hartmann, J. Schmidt, K. Budde, D. Kuypers, Y. Le Meur, M van der Werf, R. Mamelok, T van Gelder. (2009). UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* **86 (3)**: 319-27.

- 25.- Villeneuve L., H. Girard, L.C.Fortier, J.f. Gagné, C. Guillemette. (2003). Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African- American subjects and their impact on the metabolism of 7-thyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **307 (1)**: 117-128.
- 26.- Watson J.D. & F.H.C. Crick (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **4356 (171)**: 737,738.
- 27.- Wei C.Y., M.T. Lee, Y.T. Chen. (2012). Pharmacogenomics of adverse drug reactions: implementing personalized medicine. *Hum Mol Genet* **21 (R1)**: R58-65.
- 28.- Zakerska O., M. Skrzypczak- Zielinska, A. Mikstacki, B. Tamowicz, B. Malengowska, M. Szalata, R. Slomski. (2013). Genotype and allele frequencies of polymorphic UGT1A9 in the Polish populations.
- 29.- Zaza G., S. Granata, F. Sallustio, G. Grandaliano, F.P. Schena. (2010). Pharmacogenomics: a new paradigm to personalize treatments in nephrology patients. *Clin Exp Immunol.* **159 (3)**: 268–80.

PÁGINAS CITADAS

www.cenatra.salud.gob.mx

www.drugbank.ca

www.ensembl.org

www.genecards.org

www.pharmgkb.org