



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Estandarización de la Genotipificación
de los polimorfismos C677T y A1298C
del gen Metilentetrahidrofolato
reductasa (*MTHFR*) relacionados con el
metabolismo del metotrexato.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTAN

GODINEZ MORALES DULCE KARINA
MARTÍNEZ CORTÉS MASSYEL SHENDELL

ASESOR: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo
COASESOR: M. en C. Gabriel Arturo Lima Villeda

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales**



**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Estandarización de la Genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) relacionados con el metabolismo del metotrexato.

Que presenta la pasante: **Massyel Shendell Martínez Cortés**
Con número de cuenta: **415098337** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de septiembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos Massyel

Quiero agradecer a mi alma mater la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido formarme como profesionista en tan hermosa escuela, en la cual no sólo aprendí académicamente, si no también conocí a excelentes personas.

A mis asesores de tesis, como la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por haberme dado la oportunidad de dar este último paso bajo su tutela, gracias por los conocimientos que adquirí a su lado y por todo el apoyo que me brindó en este proceso, es una excelente persona. Por otro lado, a mi coasesor, M. en C. Gabriel A. Lima Villeda por la paciencia, los conocimientos, pero sobre todo por el apoyo, consejos y todo el tiempo dedicado hacia mí y este trabajo. Los aprecio mucho.

A mis sinodales: M. en C. Maritere Domínguez Rojas, Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García, M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón y LBD. Larisa Andrea González Salcedo por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo, al igual que el esmero por formarme académicamente cuando fui su alumna. Gracias.

A mi amiga Dulce, por la perseverancia y dedicación para que esto saliera adelante. Al igual que las palabras de aliento en aquellos días de desvelo cuando ya no veíamos el final de este trabajo.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi mamá y abuelita por estar conmigo en cada paso de mi educación, por su apoyo incondicional y por el amor que me brindan para cumplir cada meta que me propongo y a no darme por vencida. Gracias por creer en mí, las amo.

Agradecimientos Dulce

Gracias a mi universidad, gracias por darme la oportunidad de subir un peldaño más para alcanzar mis metas, de ti me llevo invaluable experiencias, gracias por haber hecho posible formarme en tus instalaciones y permitirme conocer a todas las personas que fueron participes y contribuyeron en este proceso, buenas o malas, profesores o compañeros de clases, personas que realizaron un pequeño aporte día a día y que finalmente se ve reflejado en la culminación de mi paso por la universidad. Gracias también a mis padres por apoyarme incondicionalmente durante toda esta travesía, gracias a mis amigos ajenos a la universidad y familiares que me brindaron su apoyo moral y palabras de ánimo para no rendirme, por la fe desmedida que me tienen, por creer en mí y por ayudarme a despejar la mente en momentos críticos, pero en especial gracias a mi amiga y compañera de tesis por realizar este trabajo en conjunto, por esas noches de desvelos y trabajo arduo, por tu perseverancia y constancia, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) clave PE206518 titulado “Fortalecimiento de la Enseñanza de la Farmacogenómica en la FESC”, cuya responsable es la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo. La alumna Massyel Shendell Martínez Cortés agradece la beca que le fue otorgada en el proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
2.1 Fármacos antineoplásicos	10
2.1.1 Metotrexato	11
2.1.2 Enfermedades tratadas con metotrexato	12
2.1.3 Farmacocinética del metotrexato	13
2.1.4 Mecanismo de acción antitumoral del metotrexato	15
2.1.5 Toxicidad en el tratamiento con metotrexato	16
2.2 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	17
2.2.1 Estructura de la enzima MTHFR	18
2.2.2 Reacción que cataliza	18
2.2.3 Polimorfismos de MTHFR	19
2.2.3.1 Polimorfismo C677T	19
2.2.3.2 Polimorfismo A1298C	20
2.2.3.3 Relación de los polimorfismos del gen MTHFR con la toxicidad y eficacia del Metotrexato	21
2.3 Técnicas de biología molecular	22
2.3.1 Toma de muestra	22
2.3.2 Extracción de DNA	23
2.3.3 Cuantificación de DNA por espectrofotometría.	24
2.3.4 Electroforesis en gel de agarosa	25
2.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.3.6 Endonucleasas de restricción y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)	27
2.3.7 PCR-Alelo específico (PCR-ASO)	27
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos particulares	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1 Participantes del estudio	31
5.2 Evaluación del DNA extraído	31
5.3 Diseño de la técnica PCR-RFLP	31
5.4 Diseño de la técnica PCR-ASO	32
5.5 Estandarización de la técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T	35

5.6 Estandarización de la técnica PCR-ASO para el polimorfismo A1298C	36
5.7 Genotipificación de los polimorfismos mediante las técnicas PCR-ASO y PCR-RFLP	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Resultados técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T.	38
6.1.1 Diseño de oligonucleótidos	38
6.1.2 Gradientes de temperatura	38
6.1.3. Uso de diferentes Master Mix y cambio de concentración de primers.	38
6.1.4. Cambios en tiempo de digestión y concentración de enzima.	40
6.1.5 Genotipificación del polimorfismo C677T por la técnica PCR-RFLP.	43
6.2 Resultados técnica PCR-ASO para el polimorfismo A1298C	44
6.2.1 Diseño de oligonucleótidos	44
6.2.2 Gradiente de temperatura	44
6.2.3. Cambio de Master Mix, Concentración de primers, Temperatura de alineamiento y número de ciclos de PCR	45
6.2.4 Genotipificación del polimorfismo A1208C por la técnica PCR-ASO	46
6.3 Resultados de genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C	47
6.4. Productos de PCR de ambas técnicas	50
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	59
9. PERSPECTIVAS	60
10. REFERENCIAS	61
ANEXO I	66
ANEXO II	68
ANEXO III	69

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción del Metotrexato.	16
Figura 2. Reacción catalizada por la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).	19
<i>Figura 3. Extensión dependiente del reconocimiento por el oligonucleótido alelo específico.</i>	28
<i>Figura 4. Patrón de bandas en electroforesis esperado de la genotipificación del polimorfismo C677T por técnica PCR-RFLP utilizando la enzima HinfI..</i>	32
Figura 5. Esquema de diseño del Oligonucleótido Reverse Alelo Específico para el alelo A y Forward Alelo Específico para el alelo C del polimorfismo A1298C.	34
Figura 6. . Electroforesis esperada de la genotipificación del polimorfismo A1298C mediante técnica PCR-ASO.	34
<i>Figura 7. PCR de gradiente de temperaturas del polimorfismo C677T.</i>	38
Figura 8. Concentración diferente de primers.	39
Figura 9. Digestión con enzima HinfI del polimorfismo C677T con variación de volumen de producto de PCR de 2 y 4 μ L.	40
Figura 10. Digestión con enzima HinfI del polimorfismo C677T con variable de volumen de producto de PCR de 4 y 6 μ L.	41
Figura 11. Digestión de enzima HinfI con variable en concentración de enzima de 5 y 7.5U/ μ L.	42
<i>Figura 12. Digestión con enzima HinfI con variable en concentración de enzima 2.5U/μL.</i>	42
<i>Figura 13. Genotipificación del polimorfismo C677T por PCR-RFLP.</i>	43
<i>Figura 14. PCR de gradiente para el polimorfismo A1298C.</i>	44
<i>Figura 15. PCR-ASO con variación de las concentraciones de los oligonucleótidos para el polimorfismo A1298C.</i>	45
<i>Figura 16. PCR-ASO con reducción en ciclos de PCR para el polimorfismo A1298C.</i>	45
<i>Figura 17. Genotipificación de las muestras 54 a 65 por técnica PCR-ASO del polimorfismo A1298C.</i>	46
<i>Figura 18. Genotipificación de las muestras 67, 70, 76 y 77 por técnica PCR-ASO para polimorfismo A1298C.</i>	46
<i>Figura 19. Genotipificación de las muestras 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74 y 78 por técnica PCR-ASO para polimorfismo A1298C.</i>	47
<i>Figura 20. Verificación de tamaños de productos de PCR con Bromuro de etidio.</i>	50

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Programa de PCR para los polimorfismos C677T y A1298C.</i>	37
<i>Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T.</i>	38
<i>Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la técnica PCR-ASO.</i>	44
<i>Tabla 4. Genotipos por individuo de los polimorfismos C677T y A1298C.</i>	47
<i>Tabla 5. Frecuencias Genotípicas del polimorfismo C677T.</i>	48
<i>Tabla 6. Frecuencias Alélicas del polimorfismo C677T.</i>	48
<i>Tabla 7. Prueba de Hardy-Weinberg del polimorfismo C677T.</i>	48
<i>Tabla 8. Frecuencias Genotípicas del polimorfismo A1298C.</i>	49
<i>Tabla 9. Frecuencias Alélicas del polimorfismo A1298C.</i>	49
<i>Tabla 10. Prueba de Hardy-Weinberg del polimorfismo A1298C.</i>	50
<i>Tabla 11. Condiciones de Genotipificación para polimorfismo C677T</i>	56
<i>Tabla 12. Condiciones de Genotipificación para polimorfismo A1298C</i>	56
<i>Tabla 13. Comparación de frecuencias obtenidas con frecuencias de referencia del polimorfismo C677T y A1298C en población mexicana.</i>	58
<i>Tabla 14. Cantidades de los componentes para reacción de PCR del polimorfismo C677T.</i>	68
<i>Tabla 15. Cantidades de componentes para digestión con enzima HinfI para polimorfismo C677T.</i>	68
<i>Tabla 16. Cantidades de componentes para reacción de PCR del polimorfismo A1298C.</i>	68

Abreviaturas

5,10-CH₂-THF: Metilen-tetrahidrofolato
5-CH₃-THF: Metil-tetrahidrofolato
ABC: Transportadores de unión a ATP del inglés ATP- binding cassette
AS: Alelo Específico
ASO: Oligonucleótido Alelo específico
ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa
DHF: Dihidrofolato
DHFR: Dihidrofolato reductasa
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
dTMP: Desoxitimidina monofosfato
dUMP: Desoxiuridina monofosfato
FAD: Flavin Adenin Dinucleótido
FPGH: Folipoliglutamato hidrolasa
FPGS: Folipoliglutamato sintetasa
MDR: Proteína de resistencia a Fármacos
MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa
MTX: Metotrexato
MTX-PG: Metotrexato poliglutamato
NaCl: Cloruro de Sodio
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PASA: Amplificación de PCR alelo específico
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP: Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica
RNA: Ácido Ribonucleico
SAH: S-adenosil homocisteína
SAM: S-adenosil metionina
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
SLC19A1 o RFC1: Transportador de folatos reducidos
SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único
TBE: Tris-Ácido Bórico-EDTA
THF: Tetrahidrofolato
TS: Timidilato sintetasa
TTS: Tris-Tritón-Sacarosa
WHO: Organización Mundial de la Salud

1. RESUMEN

El Metotrexato (MTX) es un antimetabolito del ácido fólico capaz de bloquear la síntesis de las pirimidinas y purinas, favoreciendo la muerte celular. Sin embargo, existen variaciones a nivel genético que pueden implicar modificaciones en las proteínas que metabolizan o transportan a los fármacos, sus receptores o ambos, influyendo tanto en la eficacia como en la seguridad de cada fármaco. La enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) está involucrada en el metabolismo del MTX, la cual es estudiada con frecuencia debido a dos polimorfismos en particular, C677T y A1298C. La importancia de estos polimorfismos reside en la deficiencia en la actividad de la enzima, lo que causa hiperhomocisteinemia, lo cual podría estar estrechamente ligado con la toxicidad causada por el MTX. Por ello, que el objetivo de este trabajo fue diseñar un protocolo que permita la identificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR*.

La genotipificación de los polimorfismos se hizo a través de las técnicas PCR-RFLP y PCR-ASO, ya que se consideran metodologías de bajo costo. En la estandarización de ambas metodologías se encontraron las condiciones óptimas de PCR como la temperatura de alineamiento, la concentración de oligonucleótidos y la cantidad de ciclos; así también se buscaron las condiciones óptimas necesarias adicionales a la PCR-RFLP para realizar la genotipificación, como el tiempo de digestión, temperatura óptima de digestión, y concentración de la enzima de restricción. Se genotipificaron 24 personas para los dos polimorfismos y las frecuencias obtenidas resultaron ser similares a las reportadas en la literatura para población mestizo-mexicana y con base en el principio de Hardy-Weinberg al realizar la prueba de X^2 con un nivel de confianza de 95%, se encontró que la población está en equilibrio.

Debido a que estos polimorfismos son frecuentes en la población mexicana y contribuyen a la aparición de efectos adversos en aquellos individuos que se encuentran en tratamiento con MTX, se espera que esta investigación contribuya a esclarecer la relación entre MTHFR y la toxicidad del MTX para que se pueda elaborar un algoritmo personalizado que permita una dosificación más adecuada y eficaz durante el tratamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la medicina moderna ha impulsado el desarrollo de un nuevo enfoque terapéutico centrado en el tratamiento, pretendiendo la administración del fármaco correcto a la dosis correcta en el momento adecuado, conocido como medicina personalizada, fundamentado en las características individuales de cada paciente, provocadas por los factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Estas variaciones a nivel genético pueden implicar modificaciones en las proteínas que metabolizan o transportan a los fármacos, sus receptores o ambos, influyendo tanto en la eficacia como en la seguridad de cada fármaco (Pierna *et al*, 2018; Lina y Tabak, 2012).

En aras de desarrollar nuevos tratamientos para mejorar los resultados clínicos de la farmacoterapia, este nuevo enfoque ha sido impulsado por la Farmacogenómica, disciplina encargada del estudio de la base genética relacionada a la variabilidad de la respuesta a fármacos en individuos o poblaciones (Pierna *et al*, 2018; Lina y Tabak, 2012).

La implementación de la farmacogenómica en la clínica para proporcionar el mejor tratamiento farmacológico disponible desde el inicio podría disminuir los efectos de la enfermedad en el cuerpo del paciente, la administración de medicamentos por “prueba y error”, la cantidad de medicamentos tomados, la duración del tratamiento, el costo general de la atención médica reduciendo las reacciones adversas medicamentosas y el tiempo necesario para obtener la aprobación de un fármaco (Pierna *et al*, 2018; Lina y Tabak, 2012).

Con el propósito de hacer esto posible, es necesario estudiar los genes que participan en la respuesta a medicamentos, para lo cual se requiere del análisis de biomarcadores genéticos. Estos se basan en la presencia de variaciones en la secuencia de DNA, conocidos como polimorfismos, siendo los Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) los más frecuentemente estudiados haciendo uso de las herramientas dispuestas por la biología molecular (Pierna *et al*, 2018; Lina y Tabak, 2012).

Se busca estudiar ciertos polimorfismos debido al comportamiento que tienen algunos fármacos en presencia de estos, particularmente el metotrexato (MTX), fármaco antineoplásico, que es usado para tratar una amplia variedad de padecimientos además del cáncer, entre los que destacan psoriasis y artritis reumatoide, pero es en el área de oncología donde tiende a ser usado a su máxima dosis tolerable para asegurar el mayor porcentaje de muerte celular acarreado consigo una mayor probabilidad de padecer efectos adversos, empeorando el pronóstico de un paciente (Benedi y Ángeles, 2006; McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Howard *et al*, 2016; Puig, 2014).

En general, cualquiera de los esquemas de tratamiento que incluya al metotrexato traen consigo un riesgo elevado de experimentar reacciones adversas de diferente grado, que incluyen náuseas, mareos y otros efectos tóxicos, siendo la muerte el riesgo más grande, por lo cual la medicina personalizada podría beneficiar grandemente tanto a pacientes como al personal sanitario (Benedi y Ángeles, 2006; McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Howard *et al*, 2016).

Una investigación bibliográfica con respecto a los principales polimorfismos relacionados a la respuesta farmacológica del MTX evidenció una gran cantidad de estudios indicativos de que los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), están relacionados con una mayor incidencia en la aparición de efectos tóxicos durante los tratamientos con este fármaco, haciendo importante la implementación de metodologías específicas, confiables y rápidas, cuyo propósito sea la identificación de estos dos polimorfismos de manera eficiente y oportuna en los pacientes cuyo esquema de tratamiento incluyan al metotrexato, y así mismo, poder contribuir en la elaboración de un índice o perfil genético (Mahmoud *et al*, 2018; Kaluzna *et al*, 2015; Qu *et al*, 2017; EL-Khodary, *et al*, 2012; McBride *et al*, 2012; Krajinovic *et al*, 2004; Jonge *et al*, 2005; Imanishi *et al*, 2007; Shao *et al*, 2017; Plaza-Plaza *et al*, 2012; Mena *et al*, 2008).

2.1 Fármacos antineoplásicos

El uso de los fármacos antineoplásicos está dirigido principalmente a tratar cáncer, aunque también pueden emplearse contra una gran variedad de enfermedades; sin embargo, originalmente su diana son las células cancerosas o malignas, pues éstos poseen mecanismos de acción que pueden ir dirigidos ya sea al DNA, RNA o a las vías metabólicas de las células malignas. No obstante, al poseer mecanismos de acción no selectivos, afectan también a las células normales, produciendo su efecto farmacológico en ambas, originando efectos tóxicos no deseados y potencialmente graves en las células sanas (Benedi y Ángeles, 2006; Levien *et al*, 2009).

Los fármacos antineoplásicos suelen actuar sobre una o varias fases del ciclo celular, o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. Como resultado la respuesta al fármaco se relaciona directamente con la capacidad proliferativa, es decir, al tiempo que tarda en duplicarse el tumor, y a mayor proliferación se prevé una mayor respuesta al tratamiento citostático (Benedi y Ángeles, 2006).

Durante la evolución del cáncer se van produciendo alteraciones genéticas que generan una heterogeneidad celular, que corresponden a propiedades bioquímicas, tiempo de

duplicación y una respuesta al tratamiento antitumoral diferentes. Estas alteraciones también están estrechamente ligadas a la desarrollo de resistencias (Benedi y Ángeles, 2006).

El principal motivo de fracaso en los tratamientos contra el cáncer es la resistencia a los fármacos antineoplásicos. Ésta puede estar presente en el momento del diagnóstico o aparecer con el tiempo debido a la quimioterapia, pues las células cancerosas generan clones farmacoresistentes espontáneamente, causado por la inestabilidad genética en las células cancerosas propiciadas por la mutación, eliminación, amplificación génica, translocación o reordenamiento cromosómico, afectando a uno o varios fármacos en el proceso (Levien *et al*, 2009).

Las enfermedades neoplásicas deben ser tratadas con su máxima dosis tolerable para asegurarse de obtener el mayor porcentaje de muerte celular posible, también debe realizarse de forma secuencial, en ciclos, para optimizar el resultado y permitir la recuperación de los tejidos sanos y por último, también se utilizan por lo menos dos fármacos con dianas terapéuticas diferentes y sin toxicidad cruzada. De esta forma se reducen los efectos tóxicos, se aumenta la eficacia de acción sobre el tumor y se disminuye la posibilidad de que se desarrollen resistencias (Benedi y Ángeles, 2006).

Debido a que el índice terapéutico de los antineoplásicos es el más bajo entre las clases de fármacos, es decir, que la dosis que produce el efecto farmacológico deseado y la dosis que produce los efectos tóxicos son muy cercanas, el oncólogo a cargo del tratamiento quimioterapéutico debe sopesar los riesgos de los efectos secundarios y el riesgo de recaída a consecuencia de un tratamiento inadecuado, la más mínima demora en el restablecimiento del tratamiento para atenuar la gravedad de los efectos adversos puede provocar el regreso del tumor e incluso puede llevar a la muerte del paciente (Levien *et al*, 2009).

2.1.1 Metotrexato

Dentro de la clasificación de los antineoplásicos que actúan sobre el DNA están los antimetabolitos. Éstos son fármacos cuya estructura es similar a los componentes involucrados en el metabolismo intermediario celular, de manera que interfieren en la síntesis de los ácidos nucleicos. Estos ejercen su acción principalmente sobre tumores de rápido crecimiento. Esta clasificación a su vez se divide en análogos de pirimidinas, análogos de purinas, análogos de adenosina y antifolatos, siendo este último grupo donde se incluye al metotrexato y a su predecesor la aminopterina (Benedi y Ángeles, 2006).

La aminopterina, un antimetabolito del ácido fólico, fue utilizado inicialmente como fármaco antitumoral por sus efectos antiproliferativos a mediados del siglo pasado. Simultáneamente, se usó por primera vez para tratar la artritis reumatoide en 1951; sin embargo, la elevada presencia de efectos secundarios condujo a la investigación de nuevos fármacos que fueran similares pero con menor incidencia de los efectos adversos (Goicoechea, 2016).

La síntesis del MTX partió de un proceso de diseño racional, pues se sabía que el ácido fólico era necesario para la síntesis de las purinas y pirimidinas requeridas para la síntesis de DNA y por lo tanto de la proliferación celular. Siendo así, se buscó un compuesto capaz de bloquear el efecto del ácido fólico, encontrando la solución en un compuesto con estructura química similar; el ácido fólico y el metotrexato difieren en dos puntos únicamente, el grupo hidroxilo en la posición del anillo pteridínico del ácido fólico se reemplaza por un grupo amino y el nitrógeno de la posición 10 está metilado, estas modificaciones permitieron que el MTX mostrara una mayor afinidad que el ácido fólico a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) (Goicoechea, 2016).

2.1.2 Enfermedades tratadas con metotrexato

El MTX fue utilizado en un inicio exclusivamente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer debido a su efecto como fármaco antineoplásico, a finales de 1940 se basó en la ruta dependiente de folato de células leucocitarias para el tratamiento contra la Leucemia Linfoblástica Aguda, para sustituir la aminopterina, sin embargo, su perfil de toxicidad era desfavorable. Posteriormente, los investigadores se dieron cuenta que el metotrexato tiene propiedades antiinflamatorias y empezó a usarse en enfermedades autoinmunes a principio de los años 50 como la artritis reumatoide y psoriasis (Leveque *et al*, 2017; Puig, 2014).

Actualmente el MTX es utilizado de manera oficial en el tratamiento para artritis reumatoide, psoriasis, al igual que en el área oncológica para Leucemia Linfoblástica Aguda, linfoma no-Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de vejiga y cáncer de mama; por otro lado, se administra de manera no oficial en ciertos tumores cerebrales como el meduloblastoma, en la profilaxis de la enfermedad “injerto contra huésped” que se presenta después de un trasplante alogénico de células hematopoyéticas, en enfermedades inflamatorias del intestino y embarazos ectópicos (Leveque *et al*, 2017).

Este fármaco es ampliamente utilizado en el área oncológica tanto en niños como en adultos ya que es considerado un fármaco esencial en oncología y reumatología por la Organización Mundial de Salud (WHO) (Leveque *et al*, 2017).

2.1.3 Farmacocinética del metotrexato

La absorción del MTX va a depender de su vía de administración, comúnmente este fármaco es administrado por vía oral a dosis menores de 25 mg/kg, sin embargo, por medio de esta vía se ha encontrado que la absorción es incompleta y por tanto variable en cuanto a la biodisponibilidad. La absorción por esta vía se da en el yeyuno proximal por medio de transporte activo principalmente por los transportadores SLC19A1, es saturable ya que depende de la dosis. Se dice que entre mayor sea la dosis la velocidad de absorción es menor. Es por esto que la biodisponibilidad se ve afectada, ésta va de un 30-90% dependiendo de la dosis (Goicoechea, 2016; Piug, 2014).

Ya que esta vía ofrece una biodisponibilidad baja, comenzó a emplearse administración subcutánea como una alternativa a la vía oral, para evitar las variaciones en su absorción y biodisponibilidad. Las ventajas que ofrece esta técnica es que la absorción es completa, es decir, tiene una biodisponibilidad del 100%, por medio de esta vía suele administrarse menos de 25 mg a la semana. Una desventaja es que está limitada por el volumen que está permitido administrar, que son 2ml (Leveque *et al*, 2017).

Por otro lado, la vía intramuscular es otra alternativa de la administración oral de dosis menores, la biodisponibilidad por medio de esta vía a una dosis de 40 mg/m² es del 76% con un rango de 54%-112%. Es inferior a la de la vía subcutánea, pero mayor a la oral; esta vía se utiliza en oncología y en algunas ocasiones en el tratamiento médico del embarazo ectópico (Leveque *et al*, 2017). Otra de las vías de administración es la intratecal, sin embargo, esta vía es menos utilizada debido a su dificultad y está dirigida al tratamiento local de algunas enfermedades hematológicas, sin embargo, puede causar efectos secundarios. Por otro lado, el proceso de absorción del metotrexato por el fluido cerebroespinal hacia la sangre aún no se conoce. La concentración del metotrexato por esta vía es 60% mayor que el de la vía oral y se administran dosis muy bajas que van de 6 a 15 mg (Leveque *et al*, 2017).

La distribución por el organismo está determinada por la unión a proteínas plasmáticas, que para el MTX es de aproximadamente el 50%. Por otro lado el efecto farmacológico será dictaminado por la fracción restante de fármaco libre en plasma. Es importante considerar esta relación, ya que en pacientes con tratamientos con diferentes fármacos, estos competirán por la unión a las proteínas plasmáticas y los fármacos desplazados verán aumentado su efecto farmacológico al tener una fracción mayor libre en plasma, dándose el caso del MTX cuando se administra en conjunto con: salicilatos, fenilbutazona, fenitoína, barbitúricos, tranquilizantes, anticonceptivos orales, tetraciclinas, derivados de la amidopirina o sulfonamidas, ya que tienen una mayor afinidad con la albúmina sérica que el metotrexato. Sin embargo, en la práctica clínica no ha demostrado problemas especialmente serios (Goicoechea, 2016).

El volumen de distribución del metotrexato se encuentra entre 0.7 y 1.4 L/kg, lo que indica que el fármaco alcanza su mínima concentración en el compartimiento intracelular de eritrocitos, leucocitos, hepatocitos y la célula sinovial, para ejercer su función. El sistema de transporte celular encargado de introducir el MTX a la célula es denominado RFC1 (Reduced Folate Carrier, por su traducción Transportador de Folatos Reducidos). Éste puede verse afectado por la presencia de polimorfismos genéticos que provocan que existan diferencias significativas en el proceso de absorción intracelular y a su vez en la respuesta farmacológica. Un ejemplo sería un polimorfismo que facilite la entrada del metotrexato, lo que potenciaría el efecto terapéutico pero también los efectos adversos, sin contar con otros polimorfismos presentes en las enzimas implicadas en las rutas enzimáticas de la síntesis de bases púricas y pirimídicas, que son dianas específicas del metotrexato (TS, ATIC, etc.). Es por estas razones que los polimorfismos se han relacionado ampliamente a la presencia de efectos secundarios, la falta de eficacia del metotrexato e incluso el abandono del tratamiento, en ciertas poblaciones de pacientes (Goicoechea, 2016; Mena *et al*, 2008; Xie *et al*, 2018; Mahmoud *et al*, 2018; Igualada *et al*, 2016; McBride *et al*, 2012; Restrepo *et al*, 2016; Leveque *et al*, 2017).

El MTX es convertido en el hígado a un metabolito que es parcialmente inactivo (7-hidroxi metotrexato) por las enzimas aldehído oxidasa y xantina oxidasa, esto influye en la concentración plasmática del MTX y por lo tanto también en la biodisponibilidad de este, el metabolito contribuye a prolongar el efecto terapéutico del MTX. Por otro lado, también es metabolizado en el intestino por acción de la microbiota en un 5%, pasando a ser el ácido 4-amino-desoxi-N10-metilpterico, el cual es un metabolito inactivo. La vida media del MTX varía entre 8 y 15h, mientras que los metabolitos 7-hidroxi metotrexato y 4-amino-desoxi-N10-metilpterico, tienen una vida media de entre 9 y 10.2 h (Goicoechea, 2016; Leveque *et al*, 2017).

El metotrexato puede ser reabsorbido de los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo por medio de los transportadores ABCC3 y ABCC4, solo una pequeña porción es excretada en el ducto biliar por medio de los transportadores ACC2 y ABCB1 (Chan *et al*, 2004; Mikkelsen *et al*, 2011). El MTX es eliminado principalmente por los riñones tanto el fármaco inalterado, como los metabolitos 7-hidroxi metotrexato y 4-amino-desoxi-N10-metilpterico (Leveque *et al*, 2017), otra parte es excretada en la bilis en donde existe una reabsorción intestinal. En caso de que el paciente presente insuficiencia renal, la eliminación se ve retrasada. Por otra parte, los fármacos que son administrados en conjunto con el MTX pueden retrasar su eliminación, como es el caso del probenecid, diuréticos del asa, fenilbutazona, que son utilizados en el tratamiento para artritis reumatoide y esto aumenta la toxicidad del MTX (Leveque *et al*, 2017; Goicoechea, 2016). En la eliminación del MTX están involucrados muchos transportadores, principalmente los Multidrug resistance protein (MDR) o ATP-binding cassette (ABC), en los cuales existen polimorfismos que se han asociado con

ralentizar la eliminación del MTX y por lo tanto en la toxicidad del MTX (Chan *et al*, 2004; Mikkelsen *et al*, 2011; Favela-Mendoza *et al*, 2018).

2.1.4 Mecanismo de acción antitumoral del metotrexato

El MTX entra a la célula por medio de transportadores RFC1 por transporte activo, debido a que estructuralmente el MTX es un derivado del tetrahidrofolato y como un cofactor de folatos es un anión lipídico insoluble al pH fisiológico. Una vez estando dentro de la célula, inhibe competitiva y reversiblemente a la enzima Dihidrofolato reductasa (DH), enzima encargada en la transformación de folato a tetrahidrofolato. El MTX fue diseñado a manera de que éste tuviera 1000 veces más afinidad que el folato por dicha enzima (McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Trimmer, 2012; Restrepo *et al*, 2016; Goicoechea, 2016).

Es importante recordar que el ácido fólico es necesario para la síntesis *de novo* de la timidina, nucleótido indispensable para la síntesis del DNA. El MTX va a ser transformado a su forma activa por medio de la enzima poliglutamato sintetasa en el citosol, añadiendo residuos de glutamato para producir el MTX-poliglutamato. Esta molécula, más grande e hidrofílica, no es sustrato del transporte de folatos y por lo tanto es retenido en la célula y resulta en un incremento en la concentración del MTX-poliglutamato en la célula, a su vez, va a ayudar a incrementar la efectividad del fármaco (McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Trimmer, 2012; Restrepo *et al*, 2016; Goicoechea, 2016).

Igualmente, la conversión a MTX-poliglutamato va a incrementar la afinidad por otras enzimas que son blanco para detener la síntesis del DNA, como la timidilato sintetasa (TS) que conduce a la inhibición de la biosíntesis de las pirimidinas y otras enzimas involucradas en la síntesis de las purinas como la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC). La inhibición de esta enzima causa la acumulación intracelular del ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida, conduciendo a la síntesis de adenosina (Figura 1) (McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Trimmer, 2012; Restrepo *et al*, 2016; Goicoechea, 2016).

Una vez que el MTX inhibe a las enzimas indispensables para la biosíntesis de purinas y pirimidinas, se detiene la síntesis de ácidos nucleicos, favoreciendo la muerte celular. Por otro lado, el MTX-poliglutamato interfiere con la actividad de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima es la encargada de convertir al 5-10-metilentetrahidrofolato a su forma reducida 5-metilentetrahidrofolato, el folato que se encuentra en circulación que provee de un grupo metilo a la homocisteína para convertirla a metionina (Figura 1) (McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al*, 2018; Trimmer, 2012; Restrepo *et al*, 2016; Goicoechea, 2016).

En la síntesis de purinas, catalizado por la TS, el grupo metilo es transferido de metil tetrahidrofolato a dUMP y después es reducido para formar desoxitimidina monofosfato (dTMP) (Figura 1) (Restrepo *et al*, 2016; Trimmer, 2012).

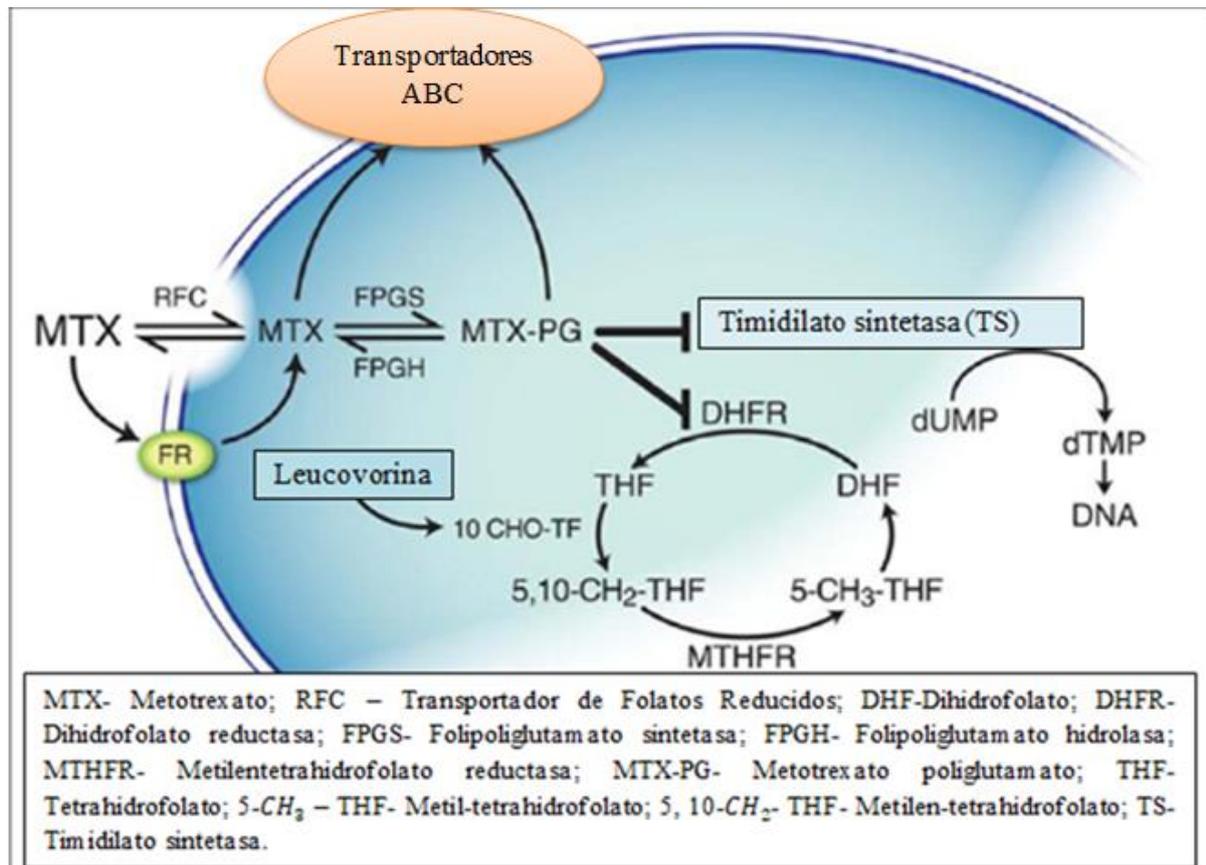


Figura 1. Mecanismo de acción del Metotrexato. Recuperada y modificada de: McBride *et al*, 2012.

2.1.5 Toxicidad en el tratamiento con metotrexato

El tratamiento con metotrexato debe ser constantemente monitoreado debido a los efectos adversos, sobre todo a dosis altas, los síntomas pueden incluir, náuseas, vómito, dolor de cabeza, mucositis, mareo hasta convulsiones, nefrotoxicidad, trombocitopenia, hepatitis, toxicidad gastrointestinal, neurotoxicidad y toxicidad hematológica, en dichos casos deberá reducirse la dosis e incluso interrumpir la quimioterapia de ser necesario, lo que conlleva a una recaída junto a un mayor riesgo de muerte (McBride *et al*, 2012; Mahmoud *et al.*, 2018; Howard *et al*, 2016).

Se recomienda administrar dosis mayores a 100 mg/m² de metotrexato junto a leucovorina, cuyo efecto aumenta la producción de folatos reducidos de las células normales al convertirse intracelularmente en 5-metiltetrahidrofolato. La leucovorina funge entonces

como antagonista del metotrexato evitando el bloqueo metabólico producido por altas dosis de este lo que aminora los efectos adversos, tales como mielosupresión y hepatotoxicidad, que probablemente se producen como resultado de la inhibición de la división celular causada por la reducción de los niveles de folato. Adicionalmente, también compite con el metotrexato por el RFC1 (McBride *et al*, 2012; Feinsilber *et al*, 2018; Howard *et al.*, 2016).

En caso de administrar dosis mayores a 1g, además de la leucovorina, deberá mantenerse una buena hidratación y controlar que la orina sea alcalina, con el fin de incrementar la depuración y disminuir la nefrotoxicidad, ya que el metotrexato y sus metabolitos 7(OH)metotrexato y DAMPA son poco solubles en pH's ácidos, pero solubles a pH 6-7 (McBride *et al*, 2012; Feinsilber *et al*, 2018).

Esto es para evitar la acumulación de concentraciones tóxicas que puedan conllevar a una mayor exposición sistémica al metotrexato y por ende provocar una lesión renal aguda puesto que las personas con disfunción renal presentan un mayor riesgo de padecerlo y al menos el 60% de las personas adultas con cáncer presentan algún grado de disfunción renal. La acumulación también provocaría mielosupresión, mucositis, hepatotoxicidad y fallo multiorgánico (Howard *et al*, 2016; Igualada *et al*, 2016).

Estudios han revelado la aparición de las siguientes reacciones adversas, para diferentes enfermedades tratadas con metotrexato a diferentes dosis: emesis, aun con tratamientos antieméticos normalmente dexametasona, ocurre en un 10-30% de los pacientes, estomatitis en un 20% y se ve ligeramente disminuida al administrar junto a leucovorina, toxicidad hepática transitoria hasta en un 60%, toxicidad hepática 0-10%, hiperbilirrubinemia en 25% de los casos, cirrosis 3-26% en personas con compromiso hepático previo, aumentos transitorios de transaminasas de 13-20%, trastornos transitorios del sistema nervioso central en un 15%, toxicidad hematológica en un 3%. En específico se reportó que la mortalidad por pancitopenia inducida por metotrexato es de un 28%, y finalmente toxicidad pulmonar de 0.3-7.5% de los pacientes; sin embargo, existe el riesgo de neumonitis inducida por metotrexato, únicamente en pacientes con compromiso pulmonar preexistente (Howard *et al*, 2016; Igualada *et al*, 2016).

2.2 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

2.2.1 Estructura de la enzima MTHFR

La proteína Metilentetrahidrofolato reductasa humana contiene 656 aminoácidos donde el dominio catalítico está conservado y tiene forma de barril TIM $\beta 8\alpha 8$ en donde se encuentran los residuos que son indispensables para la unión del factor FAD, el donador de electrones NADPH y el producto metil tetrahidrofolato. Por otro lado, posee un dominio regulatorio C-terminal que está conectado con el dominio catalítico, cuya función es la de unir a SAM, lo que conlleva a la inhibición de la actividad enzimática; sin embargo, la inhibición es muy lenta. Esta inhibición se puede revertir con la unión a la S-adenosilhomocisteína (SAH), la cual es la forma sin metilar de la S-adenosil-metionina (SAM) (Gutiérrez *et al*, 2016; Froese *et al*, 2018; Liew y Das, 2014).

Esta enzima es indispensable en el metabolismo de los folatos, ya que se encarga de generar un compuesto donador de metilo en la síntesis de SAM, donde a su vez SAM está involucrada en reacciones metilación de DNA, RNA y proteínas (Gutiérrez *et al*, 2016; Froese *et al*, 2018; Liew y Das, 2014).

2.2.2 Reacción que cataliza

La enzima MTHFR cataliza la reducción del metilentetrahidrofolato dependiente de FAD por medio de NADPH, transfiere el grupo metilo de dicho producto a la homocisteína para generar la metionina. Esta enzima es sumamente importante en los mamíferos, ya que no sintetizan la metionina *de novo*. La metilación de la homocisteína permite la generación de un grupo metilo de la metionina para las reacciones de metilación dependientes de SAM, el principal donador de grupos metilo para las reacciones de biosíntesis en la célula (Trimmer, 2012).

La reacción comienza con la apertura del anillo del metilentetrahidrofolato, para generar un catión llamado 5-iminium, este catión es reducido por la transferencia de un grupo hidruro proveniente del FAD reducido, al grupo metilo para producir metiltetrahidrofolato (Figura 2) (Trimmer, 2012).

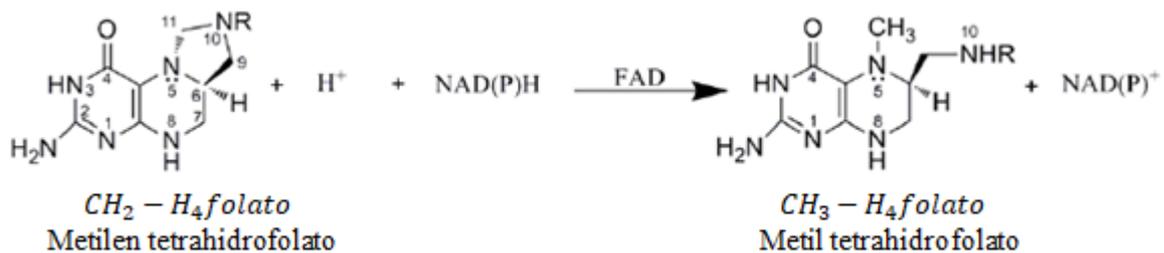


Figura 2. Reacción catalizada por la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Recuperada y modificada de: Trimmer, 2012.

2.2.3 Polimorfismos de *MTHFR*

El gen *MTHFR* conocido como Metilentetrahidrofolato reductasa se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3) el cual consta de 11 exones. Este gen codifica una proteína dimérica de entre 70-77kDa conocida por el mismo nombre que el gen (Metilentetrahidrofolato reductasa) (Gutiérrez *et al*, 2016; Froese *et al*, 2018; Liew y Das, 2014).

El gen *MTHFR* posee 14 mutaciones asociadas con deficiencia enzimática severa, 7 se reportaron en 1995, de las cuales 6 provocan el cambio de un aminoácido y el restante un corrimiento en el marco de lectura. Tres de estas sustituciones se encontraron de forma homocigota de C764T (Pro>Leu), C692T (Thr>Met), C559T (Arg>Ter), C985T (Arg>Cys). Otras tres fueron sustituciones de forma heterocigota, C1015T (Arg>Cys), G167A (Arg>Gln) y C1081T (Arg>Cys). La mutación en el sitio de empalme 5' es una delección de 59 bp que ocasiona una pérdida de 19 aminoácidos entre 653 y 939 bp (Liew y Das, 2014; Goyette, *et al*, 1995).

Otras mutaciones, como C677T (Ala>Val) es considerada común y con efectos perjudiciales en el metabolismo de la homocisteína plasmática, provocando niveles bajos de folatos intracelularmente y conllevando al padecimiento de homocisteinemia (Liew y Das, 2014).

2.2.3.1 Polimorfismo C677T

El polimorfismo C677T (p.Ala222Val, rs1801133) es una mutación puntual en la posición 677 en el gen *MTHFR* con una sustitución nucleotídica de citosina a timina, esta mutación causa la sustitución de una alanina por una valina en la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa en el codón 222. Este polimorfismo reduce la termoestabilidad de la enzima lo que se traduce en la disminución de la actividad enzimática (González *et al*, 2014; Mahmoud *et al*, 2018; Gutiérrez *et al*, 2016; Liew y Das, 2014).

La actividad de la enzima en sujetos homocigotos para el polimorfismo, es decir, con genotipo TT, es de un 50-60% más lenta a 37°C. Esta disminución de actividad impide a la enzima llevar a cabo la correcta conversión de 5,10-metiltetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, el cual es el folato activo circulante, encargado de la metilación de la homocisteína para convertirla en metionina. Por lo tanto, los niveles de homocisteína en suero de los sujetos homocigotos (TT) son elevados (hiperhomocisteinemia) (Liew y Das, 2014; Mahmoud *et al*, 2018; González *et. al*, 2014).

La frecuencia de este polimorfismo en la población mexicana es alta, variando de entre un 50 y 60% para el alelo T, por otro lado, la frecuencia para el genotipo heterocigoto (CT) tiende a ser del 51%, siendo este valor más alto que el genotipo homocigoto polimórfico (TT), que presenta una frecuencia del 26% en la población mexicana mestiza (Contreras, 2016), mientras que en la población mexicana-amerindia la frecuencia para el genotipo heterocigoto es de 40.5% y para el genotipo homocigoto de 44.5% (Contreras, 2016; EL-Khodary *et al*, 2012; Qu *et al*, 2017; González *et al*, 2014; Gutiérrez *et. al*, 2016; Kaluzna *et. al*, 2015).

Por otro lado, según los estudios de Gutiérrez-Álvarez *et al*, 2016 la frecuencia de este polimorfismo para los pacientes mexicanos con Leucemia Linfoblástica Aguda es de un 31.4% para el genotipo CC, un 51.4% para el genotipo CT y de 17.2% para el genotipo TT. Según los estudios de González-Mercado, 2017, en los pacientes mexicanos que padecen de artritis reumatoide prevalece el genotipo heterocigoto en un 47%, siendo así evidente, que en población mexicana el genotipo más frecuente es el heterocigoto.

2.2.3.2 Polimorfismo A1298C

El polimorfismo A1298C con número de identificación rs1801131 es una mutación de sentido equivocado en el exón 7 que consiste en un cambio de A a C en la posición 1298 que conlleva a la sustitución de un ácido glutámico por alanina. Este polimorfismo ocasiona una reducción del 40% en la actividad de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa, pero en menor medida que el polimorfismo C677T, la disminución resultante en la actividad enzimática reduce los niveles de folato y eleva el nivel sanguíneo de homocisteína (Atef *et. al*, 2018; El Hajj Chehadeh *et al*, 2016).

La frecuencia del alelo C difiere enormemente en diferentes poblaciones, mientras que la prevalencia del genotipo homocigoto CC se encuentra de forma variable en chinos de 1-4%, 4-5% en hispanos y de 7-12% en poblaciones norteamericanas y europeas (Yadav *et al*, 2016).

Los genotipos para este polimorfismo en población mexicana específicamente son de 34% para el genotipo heterocigoto (AC) y 9% para el genotipo homocigoto polimórfico (CC), prevaleciendo en un 57% el genotipo normal (AA) (González *et al*, 2014).

Por otro lado, en los pacientes mexicanos que padecen Leucemia Linfoblástica Aguda al igual que la población mexicana en general, prevalece el genotipo AA en un 71%, según los estudios de Gutiérrez-Álvarez, 2016 y el segundo genotipo más frecuente es el heterocigoto con una frecuencia de 20%.

2.2.3.3 Relación de los polimorfismos del gen *MTHFR* con la toxicidad y eficacia del Metotrexato

La importancia clínica de estos polimorfismos reside en la deficiencia en la actividad de la enzima, lo que causa hiperhomocisteinemia. Según lo investigado por Mahmoud *et al*, 2018, la hiperhomocisteinemia que causan tales polimorfismos están estrechamente ligados con la toxicidad causada por el MTX, debido a que el MTX interfiere con el metabolismo de la homocisteína reduciendo los niveles de la 5-metil-THF, que como se mencionó anteriormente, es el donador de un grupo metilo para la conversión de homocisteína a metionina, por lo tanto, los niveles altos de homocisteína en sangre se podría considerar como un marcador de toxicidad en el tratamiento con MTX (Mahmoud *et al*, 2018; Kaluzna *et al*, 2015; Qu *et al*, 2017; EL-Khodary *et al*, 2012; McBride, 2012; Krajcinovic *et. al*, 2004; Jonge *et. al*, 2005; Imanishi *et al*, 2007; Shao *et al*, 2017; Plaza-Plaza *et. al*, 2012; Mena *et. al*, 2008).

Por otro lado, en estudios realizados por Kaluzna *et al*, 2015 se menciona que se encontró relación entre el alelo 677T y una disminución en el aclaramiento del MTX, al igual que aquellos pacientes con el alelo 677T y el haplotipo 677T-1298A tienen concentraciones altas de MTX en sangre durante el tratamiento, así como mayor incidencia de efectos adversos por MTX.

Con base en estudios realizados por Berkani *et al*, 2017, la eficacia del metotrexato es buena en el 57% de los pacientes, regular en el 18% y no tiene eficacia en el 24% de los pacientes. Para ambos polimorfismos, los alelos polimórficos se relacionan con aparición de efectos adversos y poca eficacia o nula del MTX, sin embargo, los pacientes que presentaban el alelo A del polimorfismo A1298C mostraron mejores resultados en cuanto a eficacia, mostrando una frecuencia del 86% los pacientes que presentaban buenos resultados al tratamiento con dicho alelo.

Entonces, entendiendo la relación que existe entre los polimorfismos del gen *MTHFR* y el tratamiento con MTX el genotipificar a los pacientes podría ayudar a hacer un tratamiento

más especializado para los pacientes tratados con este fármaco, para evitar la exposición a sus efectos tóxicos (Mahmoud *et al*, 2018; Kaluzna *et al*, 2015; Qu *et al*, 2017; EL-Khodary *et al*, 2012; McBride *et al*, 2012; Krajinovic *et al*, 2004; Jonge *et al*, 2005; Imanishi *et al*, 2007; Shao *et al*, 2017; Plaza-Plaza *et al*, 2012; Mena *et al*, 2008).

2.3 Técnicas de biología molecular

Para la genotipificación del gen *MTHFR* se han propuesto varias técnicas moleculares en distintas investigaciones. Una de ellas es la de PCR en tiempo real con sondas TaqMan, los autores Imanishi *et al*, 2007; Gutiérrez-Álvarez *et al*, 2016; Lightfoot *et al*, 2005; Sandhu *et al*, 2018; Contreras *et al*, 2016 y Kaluzna *et al*, 2015, trabajaron mediante este método. Éste consiste básicamente en sondas marcadas con fluoróforos que van a emitir una señal en caso de estar presente el alelo que se busca, se lleva a cabo mediante PCR en tiempo real. Sin embargo, las sondas TaqMan son costosas, al igual que el equipo usado para realizar la PCR en tiempo real, haciendo esta metodología poco viable para un laboratorio que no cuenta con la infraestructura necesaria.

Por otro lado, en otras investigaciones hechas por los autores Plaza-Plaza *et al*, 2012; Jonge *et al*, 2005; Mahmoud *et al*, 2018; Gonzalez *et al*, 2014; EL-Khodary *et al*, 2012, realizaron la genotipificación del mismo gen utilizando la técnica PCR-RFLP; esta técnica consiste en crear fragmentos de diferentes tamaños mediante una enzima de restricción, que va a digerir el producto de PCR y de acuerdo a la discriminación sobre la secuencia de reconocimiento de DNA cortará o no al alelo de interés.

Una ventaja que tiene esta técnica es que es de bajo costo en comparación a otras técnicas como la de sondas TaqMan, además de que no requiere equipos especializados que detecten los fluoróforos, es por eso, que inicialmente en esta investigación se propuso la genotipificación de ambos polimorfismos con ayuda de este método, pero solo se mantuvo para el polimorfismo C677T ya que, para el polimorfismo A1298C no se encontró una enzima de restricción que cortara en el sitio del SNP.

2.3.1 Toma de muestra

La saliva fue la muestra de elección en este trabajo para la extracción de DNA, ésta es un líquido que se encuentra en la cavidad oral, se origina en las glándulas salivales, al igual que de los líquidos de la mucosa orofaríngea. Contiene células del trasudado de la mucosa oral y secreciones de vías respiratorias altas (Barriga y Hernández, 2016).

Esta fue la muestra de elección debido a que la saliva es un líquido muy fácil de obtener, a diferencia de las muestras de sangre las de saliva no requieren personal experimentado para su obtención, el procedimiento no es invasivo ni doloroso, la exposición accidental por parte del investigador como del paciente a patógenos virales y microbianos es prácticamente nula, mientras que con las muestras de sangre uno de los incidentes más frecuentes es la picadura accidental con agujas contaminadas. Por lo tanto, para una toma de muestra de sangre, es necesario el adiestramiento del personal, equipo de protección y en caso de una contaminación accidental, es indispensable realizar pruebas bioquímicas y serológicas y la administración de terapias antivirales preventivas (Barriga y Hernández, 2016).

Para la recolección de esta muestra existen diferentes dispositivos, el más utilizado es el que contiene un algodón estéril. Éste se coloca en la boca y es masticado, posterior a eso, se introduce en un tubo para que sea centrifugado o también puede exprimirse con una jeringa sin aguja, sin embargo, el material del algodón puede interferir con algunas determinaciones. Por otro lado, no se recomienda la recolección de las muestras de saliva escupiendo en el contenedor, ya que se ha observado que por medio de este método, la carga bacteriana es mayor (Barriga y Hernández, 2016).

La mejor manera para obtener la muestra de saliva es a través de la canulación de los conductos de las glándulas salivales o por medio de succión con pipetas (Barriga y Hernández, 2016).

2.3.2 Extracción de DNA

Existen diferentes métodos de extracción de DNA, todos, sin excepción, se basan en las propiedades fisicoquímicas del DNA para aislarlo de otras biomoléculas presentes en la célula y obtener una muestra más pura. En general las técnicas de aislamiento y purificación consisten en la lisis de las células, separación de proteínas y lípidos, precipitación del DNA y posterior resuspensión del DNA.

La técnica que utiliza Tris-Tritón-Sacarosa (TTS) es económica y permite la recuperación de grandes fragmentos de DNA, lo que permite el uso de la muestra para la amplificación por la técnica de PCR. Esta técnica contiene un buffer de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), cuya función es la de mantener el pH constante, en este caso de 8. El tritón X-100 actúa como un detergente surfactante no iónico, éste va a romper las interacciones entre lípidos-proteínas y lípidos-lípidos, pero no desnaturaliza proteínas; la sacarosa estabiliza membranas lisosomales y preserva la integridad de algunas células, principalmente

linfocitos. Posteriormente, la muestra es tratada con una solución de Cloruro de sodio 5mM (NaCl), cuya función va a ser la de causar un shock hipotónico en la célula. La adición de un detergente aniónico como el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) va a actuar como un agente solubilizante de proteínas (Velasco, 2005; Ríos *et al*, 2016).

En esta técnica se utiliza también el procedimiento de *salting out* para la precipitación de proteínas, haciendo uso de una solución de NaCl saturada. Los grupos fosfato del DNA tienden a hacer a DNA hidrofílico, por lo que posteriormente se utilizan solventes orgánicos para separar proteínas y lípidos del DNA, se utilizan reactivos como cloroformo-alcohol isoamílico para este fin. Una vez eliminados proteínas y lípidos, se procede a la precipitación del DNA mediante la adición de etanol absoluto. Finalmente, se resuspende el DNA en agua, en donde va a permanecer soluble y listo para realizar la técnica de elección de biología molecular (Velasco, 2005; Ríos *et al*, 2016).

2.3.3 Cuantificación de DNA por espectrofotometría.

La espectrofotometría es una medición cuantitativa de la interacción entre la luz ultravioleta, la luz visible y la infrarroja con otras moléculas, dependiendo de la naturaleza de las moléculas de interés. La espectrofotometría tiene varias mediciones, ya sea de transmitancia, absorbancia, emitancia, reflectividad, entre otras, que se van a clasificar de acuerdo con las propiedades ópticas de las moléculas (Germer *et al*, 2014).

La espectrofotometría de absorción se basa en la Ley descrita por Lambert-Beer, la cual postula que la absorbancia de un soluto de apariencia traslúcida que es expuesta a cierta longitud de onda va a tener un comportamiento lineal en cuanto a la concentración. Este método es idóneo para la cuantificación de DNA, ya que las moléculas que contienen protones deslocalizados siendo un sistema aromático, como lo son las bases nitrogenadas, van a absorber a una longitud de onda de 150-400nm, rango que corresponde al espectro de luz UV (Arenas y López, 2004).

El coeficiente de absorción, como se mencionó anteriormente, está dado por las propiedades de las moléculas que van a actuar como cromóforos, en el caso de las proteínas, las moléculas que van a determinar el coeficiente de absorción son los aminoácidos, específicamente aquellos residuos como la fenilalanina, tirosina, triptófano y los puentes disulfuro de la cisteína, con lo cual generalmente se obtiene un pico de absorbancia a una longitud de 275nm. Por otro lado, en los ácidos nucleicos son las bases nucleotídicas las que actúan como cromóforo, especialmente la guanina y citosina, que en conjunto van a presentar un pico de absorbancia a una longitud de 260nm (Arenas y López, 2004).

Por lo general, para la cuantificación de ácidos nucleicos, se realiza una relación 260/280 para evaluar la pureza de la muestra, esta relación generalmente debe de ser mayor a 1.8 para considerar que la muestra es pura, ya que a 260nm los ácidos nucleicos tienen un pico de absorbancia máximo, a 270nm el fenol tiene mayor absorbancia, mientras que a 280nm los aminoácidos aromáticos que se mencionaron anteriormente tienen su pico más alto de absorbancia. Por lo tanto, una muestra que se encuentre con una relación por debajo al 1.8 se considera una muestra contaminada con proteínas o con solventes orgánicos provenientes, tal vez, de la extracción de DNA (Pacchigar *et al*, 2016).

2.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel permite la separación de ácidos nucleicos, ya sea RNA o DNA en función a su tamaño, brindando la ventaja de ser una técnica sencilla. El principio en que se basa esta técnica es en la carga de la molécula, el DNA posee una carga negativa, por ende, esto genera que la molécula tenga afinidad por las cargas positivas, por lo que el DNA va a migrar hacia el ánodo en una cámara de electroforesis, a través de un polímero que puede ser la agarosa o poliacrilamida (Stellwagen, 2009; Dabrik *et al*, 2016).

En este polímero, las moléculas más pequeñas van a migrar con una velocidad mayor que las moléculas más grandes, que migrarán a una velocidad menor, es decir, la distancia que es recorrida por un fragmento de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, esto es debido en parte al tamaño de las moléculas y por otro lado, también depende del tamaño de los poros del polímero (Stellwagen, 2009; Dabrik *et al*, 2016).

La electroforesis en gel de agarosa es utilizada como método estándar para la separación y purificación de fragmentos de DNA, estos geles pueden separar moléculas mayores de unas 50 pb. Dependiendo de la concentración del gel, entre mayor sea la concentración del gel menor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse. Esta propiedad hace a estos geles ideales para la separación de fragmentos del producto de una digestión con enzimas de restricción. En caso de requerirse una mejor resolución de bandas, se utiliza un gel de poliacrilamida, permitiendo la separación de moléculas que sólo difieran en un par de pares de bases. (Dabrik *et al*, 2016; Stellwagen, 2009).

La agarosa tiene estas propiedades gracias a su composición química, ésta es un copolímero compuesto por residuos de D-galactosa y 3-6-anhidro-L-galactosa que están unidos por medio de enlaces glucosídicos alfa 1-3 y beta 1-4, estas cadenas forman fibras de forma helicoidal unidas por enlaces de hidrógeno no covalentes, que una vez estando sólidas forman una malla tridimensional con canales (Stellwagen, 2009).

2.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es muy utilizada hoy en día en el área de la biología molecular, esta técnica se basa en la replicación del DNA *in vitro* mediante una muestra de DNA, generando miles de copias. Los componentes principales de una PCR son la muestra de DNA, la enzima DNA polimerasa, primers específicos para el fragmento de DNA que se quiere amplificar, nucleótidos y algunos cofactores como el Mg^{+2} que son indispensables para que la enzima trabaje adecuadamente (Solanki, 2012; Yu *et al*, 2019).

Las etapas de una PCR son 3:

1. La desnaturalización que consiste en la separación de las cadenas de DNA a temperaturas altas, es decir, romper los enlaces que existen entre las cadenas de DNA a temperaturas de 94-96°C.
2. El alineamiento, en el cual los primers se van a unir a cada una de las cadenas de DNA en el fragmento para el cual fueron diseñados, este paso ocurre a una temperatura llamada Temperatura de alineamiento o T_m que oscila entre los 40 y 60°C, según el diseño de los primers. La T_m de los primers va a depender de la composición de bases que contenga la secuencia, de la concentración de sales y de la longitud de los mismos. Esta temperatura es a la cual la mitad de los primers van a estar hibridando al DNA molde, mientras que la otra mitad va a estar como hebra simple. La temperatura óptima de alineamiento es entre 50 y 60°C. Por otro lado, la longitud de la secuencia de primers es preferible que sea entre 15-25 pares de bases (SantaLucia, 2007).
3. Finalmente, ocurre la extensión, en la que participa la enzima DNA polimerasa, cuya función es crear una nueva cadena de DNA a partir de la cadena molde, añadiendo nucleótidos. Este paso normalmente se da a una temperatura de 72°C, sin embargo, va a depender de la enzima que se utilice. La DNA polimerasa más utilizada para PCR es la Taq polimerasa.

Esos tres pasos son un ciclo, la PCR consiste de aproximadamente 25-30 ciclos, después de esos ciclos, el resultado del número de copias de cadenas de DNA es exponencial (Solanki, 2012; Yu *et al*, 2019).

2.3.6 Endonucleasas de restricción y fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Las endonucleasas son enzimas de restricción de DNA que reconocen y se unen a secuencias específicas para romper las cadenas de DNA, éstas se clasifican convencionalmente en cuatro tipos tomando en cuenta las siguientes características: composición de la subunidad, posición del corte o escisión, especificidad de la secuencia reconocida y cofactor requerido (Sluss y Hayes, 2017).

La técnica de Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) se basa en la generación de fragmentos de DNA por medio de una enzima de restricción que va a cortar la secuencia de DNA en sitios específicos, a los que se les conoce como sitios de restricción, resultando varios fragmentos de distintos tamaños que son observados al realizar una electroforesis; el número y el tamaño de las bandas va a depender del diseño de la técnica y de la enzima utilizada, ya que de acuerdo al patrón de bandas se va a determinar el genotipo (Forrester *et al.*, 2016; Sorof y Qi, 2015; Ben-Ari y Lavi, 2012).

2.3.7 PCR-Alelo específico (PCR-ASO)

“Oligonucleótido Alelo Específico” (ASO por sus siglas en inglés) son oligonucleótidos con una longitud de 17-25 bases, ligeramente mayor a lo normal, diseñados para hibridarse con uno de dos o más de los alelos presentes en un locus, por lo que el diseño se realiza generalmente alrededor del nucleótido variante. Normalmente se usa en conjunto a la PCR como un medio para determinar la presencia de un alelo en particular en muestras de DNA.

En esta técnica se emplean oligonucleótidos específicos para cada alelo, a esta metodología se le conoce como PCR-ASO pero también como PCR-Alelo Específica (AS por sus siglas en inglés) o Amplificación de PCR alelo específico (PASA por sus siglas en inglés) (Aaronson *et al.*, 2001; Squire y Twyman, 2009; Gaudet *et al.*, 2009).

Como el método se basa en la obtención de un producto de PCR específico para el polimorfismo haciendo uso de Oligonucleótidos Alelo Específicos, el diseño debe ser preciso, de forma que la falta de coincidencia con una sola base impida la hibridación del primer con la cadena de DNA, es por ello que los oligonucleótidos específicos en su extremo 3' tienen la base complementaria al SNP (Aaronson *et al.*, 2001; Squire y Twyman, 2009; Gaudet *et al.*, 2009).

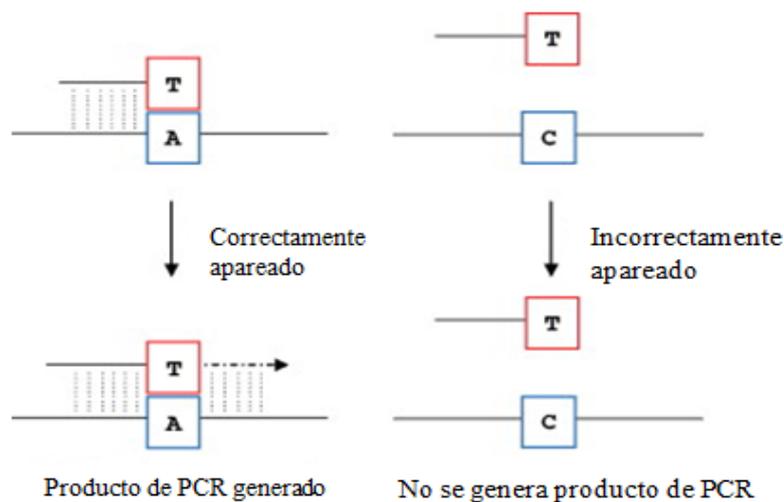


Figura 3. Extensión dependiente del reconocimiento por el oligonucleótido alelo específico. Recuperada y modificada de: Squire y Twyman, 2009.

Una variante de la PCR-ASO, llamada PASA bidireccional, permite la separación de los alelos en gel de agarosa al obtener diferentes productos de PCR de tamaños bien diferenciados entre ellos. Esto se logra utilizando cuatro cebadores: dos externos y dos internos que son los Alelo Específicos, de esta forma, uno de los alelos amplifica mediante PCR en una dirección con un oligonucleótido interno y un oligonucleótido externo, y el segundo alelo amplifica en la dirección contraria con el otro par interno y externo de los oligonucleótidos; adicionalmente los oligonucleótidos externos amplifican un fragmento constante que puede ser usado como control positivo de la PCR, una forma de mejorar este método es introduciendo un par de bases desestabilizadoras dentro de las cuatro o cinco bases más cercanas al extremo 3' dónde está el nucleótido complementario al SNP y modificándolo para que no coincida, esta falta de coincidencia aumenta la especificidad del cebador (Figura 3) (Gaudet *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación documental ha señalado que los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* son frecuentes en la población mexicana y es posible que contribuyan a la aparición de efectos adversos en esquemas de tratamiento que incluyen al MTX, razón por la cual se busca estandarizar una técnica para la identificación de estos polimorfismos que puedan ser usadas en proyectos futuros para determinar la relación que existe entre los polimorfismos y los efectos adversos o elaborar un algoritmo de tratamiento personalizado que permita una dosificación más adecuada y eficaz, para producir un mayor efecto farmacológico y reducir la aparición de efectos tóxicos en los pacientes tratados con este fármaco.

Adicionalmente, se eligieron estrategias de genotipificación que no requieren equipos especializados, son de bajo costo, reproducibles, se pueden utilizar tanto en hospitales del sector público como privado y tienen alto grado de especificidad y sensibilidad, que son las técnicas PCR-RFLP y PCR-ASO. En comparación con otras técnicas que también son utilizadas para genotipificación como las sondas TaqMan y la secuenciación de tipo Sanger, estas requieren equipos especializados, como lo son el termociclador de tiempo real para el uso de las sondas TaqMan que elevan aún más el costo de la prueba, pues los oligonucleótidos marcados con fluorocromos por sí mismos, ya tienen un precio alto. En su lugar, se eligieron técnicas que utilizan un termociclador de punto final convencional y oligonucleótidos sin marcaje.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Diseñar y estandarizar un protocolo experimental que permita identificar los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en muestras del banco de DNA genómico de la asignatura de Farmacogenómica con la finalidad de estandarizar este procedimiento.

4.2 Objetivos particulares

-Obtener el permiso de los participantes por medio de la carta de consentimiento informado para el uso de las muestras de DNA genómico en este proyecto, conservadas en el banco de muestras de Farmacogenómica.

-Diseñar las metodologías para la identificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR*, que va desde la elección de los oligonucleótidos para las técnicas PCR-RFLP y PCR alelo específico, hasta la elección de una enzima para la técnica PCR-RFLP.

-Estandarizar las condiciones de la técnica PCR-RFLP, mediante el ajuste de concentración, temperatura y tiempo de digestión para la obtención de resultados confiables en la genotipificación del polimorfismo C677T.

-Estandarizar las condiciones de PCR-ASO, mediante el ajuste de concentración de los oligonucleótidos y temperaturas, para la obtención de resultados confiables en la genotipificación del polimorfismo A1298C.

5. METODOLOGÍA

5.1 Participantes del estudio

Criterios de inclusión

Alumnos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de entre 20 y 28 años de edad que se cuente con muestra del banco de DNA de Farmacogenómica.

Criterios de exclusión

Aquellos alumnos con los que no se cuenta muestra del banco de DNA de farmacogenómica.

Se obtuvo el consentimiento (ANEXOIII) de 24 alumnos para el uso de su muestra que estaban dentro de los criterios de inclusión.

5.2 Evaluación del DNA extraído

El DNA fue aislado de muestras de saliva por medio de la técnica de Covarrubias Modificado (Ver Anexo I). Una vez extraído se cuantificó por medio de un espectrofotómetro de microvolumen (NuDrop NATGENE NAS-99) y la integridad del DNA fue verificada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.

5.3 Diseño de la técnica PCR-RFLP

El polimorfismo detectado mediante esta técnica fue el C677T, utilizando como referencia la secuencia que se encuentra con el número rs1801133 en dbSNP de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs1801133) para diseñar los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se diseñaron por medio de Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) tomando en cuenta los siguientes parámetros: longitud de la secuencia de 20-25 nucleótidos, temperatura de alineamiento de entre 55-60°C; se analizaron en Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para verificar la especificidad de estos y por último en OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) para ver posibles homodímeros y heterodímeros que se pudieran formar, para esto se tomó en cuenta que los parámetros de energía libre de Gibbs fueran mayor a -6kcal/mol tanto para los homodímeros o heterodímeros, en cuanto a las horquillas se buscó que el valor de entalpía fuera mayor a -3kcal/mol.

Para hacer la digestión del producto amplificado se eligió la enzima HinfI (G/ANTC) en Nebcutter, la enzima corta el amplicón en un fragmento de 154pb y otro de 49pb cuando posee el polimorfismo (alelo T). Para un genotipo homocigoto CC, no se van a generar fragmentos, es decir, será una banda con el tamaño del amplicón de 203pb y para un genotipo CT el patrón de bandas serán tres, una de 203pb, 154pb y 49pb (Figura 4).

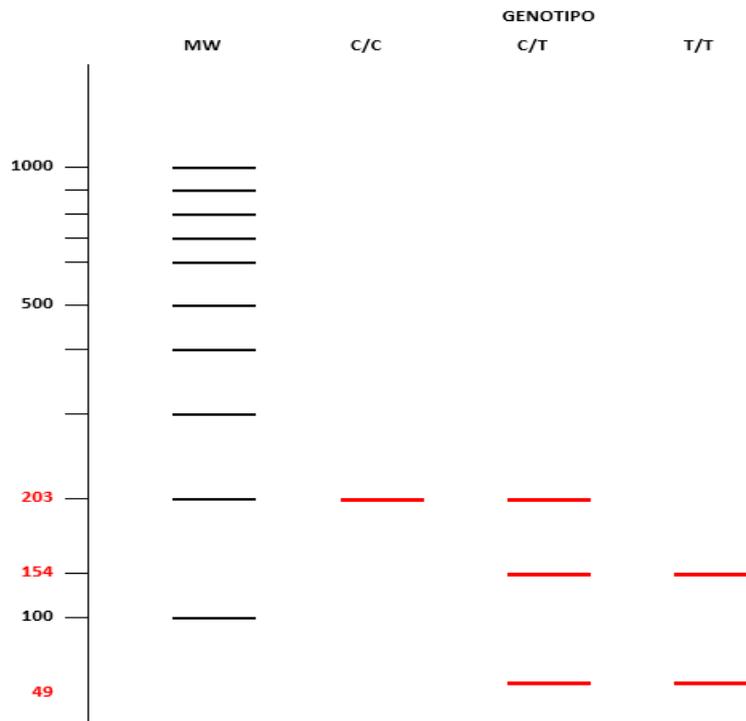


Figura 4. Patrón de bandas en electroforesis esperado de la genotipificación del polimorfismo C677T por técnica PCR-RFLP utilizando la enzima HinfI.. Previendo una PCR en condiciones óptimas y el corrimiento en gel de agarosa 2% con marcador de peso molecular de 100pb.

5.4 Diseño de la técnica PCR-ASO

Inicialmente también se previó utilizar la estrategia PCR-RFLP para el polimorfismo A1298C, sin embargo, no se localizó ninguna enzima de restricción que cortara el sitio del SNP diferencialmente entre ambas secuencias, la de referencia y la que tuviera el polimorfismo, por esta razón se optó por la estrategia PCR-ASO y se empezó a trabajar en ella.

La secuencia usada para trabajar se recuperó de dbSNP de NCBI, cuyo número de identificación del polimorfismo A1298C es rs397507444.

Utilizando las herramientas bioinformáticas Primer3Plus (<https://primer3plus.com/>) se diseñaron un par de oligonucleótidos externos que cumplieran con las siguientes características: longitud de 18-25 nucleótidos, porcentaje de GC de 40-60%, Tm mayor a

56°C que ronde los 60°C con no más de 2°C de diferencia con su oligonucleótido par (VanPelt-Verkuil *et al*, 2019; Elkins, 2015) y producto de PCR de 200-400pb que incluya al SNP. Obteniendo el Forward Externo 5' TTGGGGAGCTGAAGGACTAC 3' y Reverse Externo 5' TTCTCCCTTTGCCATGTCCA 3' con un producto de PCR de 293pb.

Posteriormente se usó primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para confirmar que los oligonucleótidos diseñados fueran específicos para el gen *MTHFR*, una vez confirmado se diseñaron manualmente los Oligonucleótidos Alelo Específicos (u Oligonucleótidos Internos) a partir del producto de PCR obtenido con el par de oligonucleótidos externos, buscándose que cumplieran con las mismas características que los oligonucleótidos externos, los resultados se resumieron en la tabla 3. Adicionalmente se calculó la diferencia de Tm entre los pares: entre Forward y Reverse externos es de 0.5°C, entre Forward interno y Reverse externo es de 2°C y entre Forward externo y Reverse interno es de 0.46°C.

Para el Alelo A se tomaron 25 pb de la cadena sentido (+) donde se incluyó el sitio del SNP, es decir, el nucleótido A en el extremo 5', de modo que estuviera localizado en el extremo 3' del oligonucleótido reverse alelo específico y que su hibridación específica permita la extensión.

Teniendo en cuenta la cadena complementaria de la secuencia tomada, y la posición del nucleótido A, se modificó la tercera base anterior a ésta, con el fin de buscar que la no hibridación de este nucleótido casi al final del oligonucleótido hiciera aún más específica la hibridación para el Alelo A. Obteniendo el Reverse Alelo Específico A 5' AGAACGAAGACTTCAAAGACACATT 3' cuyo producto con el Forward Externo es de 97pb.

Para el diseño del oligonucleótido específico del Alelo C, se tomaron 20 pb de la cadena molde (+) con el nucleótido polimórfico C en el extremo 3' y al igual que con el oligonucleótido del Alelo A se modificó la tercera base anterior a esta para que la hibridación fuera más específica. Obteniendo el Forward Alelo Específico C 5' GAGGAGCTGACCAGTGATGC 3' cuyo producto con el Reverse Externo es de 197pb.

Para ejemplificar lo descrito en los anteriores párrafos, en la figura 5 se esquematizan como fue el diseño de los oligonucleótidos internos o alelo específicos.

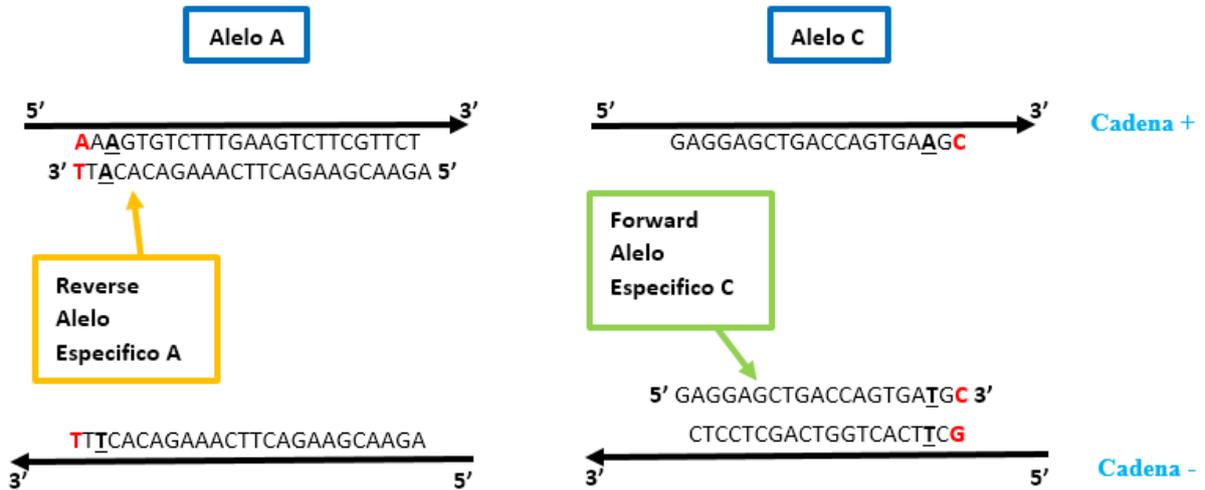


Figura 5. Esquema de diseño del Oligonucleótido Reverse Alelo Especifico para el alelo A y Forward Alelo Especifico para el alelo C del polimorfismo A1298C.

Como paso final se realizó un análisis de los 4 primers en OligoAnalyzer para confirmar que cumplieran con la longitud establecida de 20-25 nucleótidos, Temperatura de Alineamiento (Tm) de 55-60°C, Formación de Horquillas con una ΔG mayor a -3kcal/mol, y formación de dímeros (homodímeros y heterodímeros) con una ΔG mayor a -6kcal/mol o en su defecto que la ΔG de estos no sobrepasará el 40% del ΔG máximo.

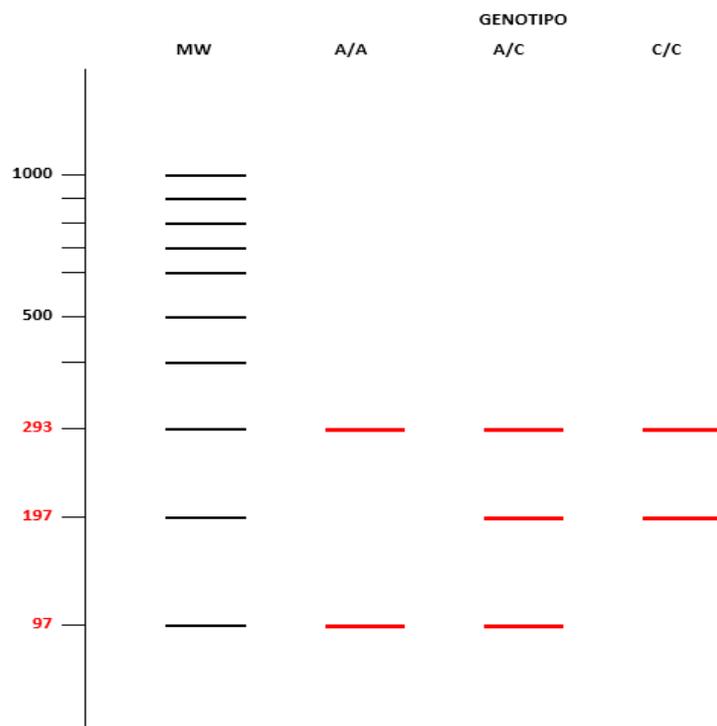


Figura 6. . Electroforesis esperada de la genotipificación del polimorfismo A1298C mediante técnica PCR-ASO. Previendo una PCR en condiciones óptimas y el corrimiento en gel de agarosa al 2% con marcador de peso molecular de 100pb.

Se espera un patrón de bandas de tamaños 293 bp y 97 bp para el genotipo AA, para el genotipo AC el tamaño de bandas esperado es de 293 bp, 197 bp y 97 bp, mientras que para el polimorfismo CC se espera un patrón de bandas de 293 bp y 197 bp (Figura 6).

5.5 Estandarización de la técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T

Se llevaron a cabo gradientes de temperatura para encontrar la temperatura de alineamiento experimental adecuada a la que los oligonucleótidos se alinean y no generan inespecíficos. El gradiente de temperatura se llevó a cabo en un intervalo de 50 a 60°C, debido a que la temperatura de alineamiento a la que se diseñaron los oligonucleótidos fue de 60°C.

Se ajustó el número de ciclos entre 30 y 35, debido a presencia de productos inespecíficos.

Las concentraciones de primers para la amplificación de este fragmento fueron de 100 y 500nM, mientras que las muestras de DNA utilizadas se ajustaron a una concentración de 100ng/μL y así se mantuvo durante toda la experimentación. En la digestión con enzima se utilizaron concentraciones de 2.5, 5 y 7 U/ml en un tiempo de 1, 2 y 3 horas, variando el volumen de producto de PCR a 2, 4 y 6μL.

Se realizaron pruebas con dos Master Mix diferentes, ambos, se probaron a un volumen de reacción de 10μL. El primer Master Mix utilizado fue de la marca Promega, de éste se añadieron 4μL para 10μL de reacción, en la cual la concentración final de sus componentes fue la siguiente: 20U/ml de Taq DNA polimerasa, 160μM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP y 1.2 mM de MgCl₂.

El otro Master Mix utilizado fue de la marca Takara, Omnimix HS, éste era necesario resuspender en 50μL de agua inyectable ya que venía en presentación liofilizada. Para una reacción de 10μL era necesario añadir 8.33μL del Master Mix, en la cual la concentración de sus componentes era la siguiente: 49.98U/ml de Takara Hot Start Taq Polimerasa, 166.6μM dNTP y 3.332mM de MgCl₂.

5.6 Estandarización de la técnica PCR-ASO para el polimorfismo A1298C

Inicialmente se empezó con una PCR de gradiente de 53°C a 59°C con intervalos de 1°C, se eligió este rango al realizar un consenso de temperaturas, tomando en cuenta las Temperaturas de Alineamiento Teóricas establecidas por el proveedor de ambos pares de oligonucleótidos. Para este primer paso, se usó únicamente una muestra de DNA y solamente el par de oligonucleótidos externos, aunque en el rango de temperatura se considerarán ambos pares, con una concentración inicial de 100nM cada uno, con el fin de obtener experimentalmente la Temperatura Óptima de Alineamiento.

El Master Mix utilizado en la primera etapa, marca Promega, se cambió al de la marca Takara Omnimix HS, posteriormente se ajustó el número de ciclos entre 30 y 35 para evitar la aparición de bandas inespecíficas. Se modificaron las concentraciones de los oligonucleótidos externos entre 50-100nM, mientras que la de los oligonucleótidos internos se mantuvo constante. De la mezcla de ambos, internos y externos, depende la síntesis de una cantidad apreciable de los productos tanto general, como específicos; al controlar las concentraciones se evita la aparición de falsos positivos heterocigotos por el exceso de oligonucleótidos, es decir, la aparición de ambos productos específicos, al mismo tiempo que se evita la aparición de falsos negativos para uno u otro alelo, debido a cantidades insuficientes de oligonucleótidos.

5.7 Genotipificación de los polimorfismos mediante las técnicas PCR-ASO y PCR-RFLP

Utilizando las condiciones óptimas de temperatura de alineamiento, concentración de cada primer y cantidad de ciclos obtenidas en la estandarización de cada técnica (Tabla 1), se realizó una PCR de las 24 muestras. La genotipificación por técnica de PCR-RFLP se llevó a cabo cuando se obtuvieron las condiciones ideales en cuanto a concentración de enzima, volumen de producto de PCR y tiempo de digestión. Posteriormente se cargaron las muestras en geles de agarosa 2% junto a un marcador de peso molecular 100pb DNA ladder Invitrogen, usando TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) 1x como buffer a las condiciones 115V por 50-60 minutos. Se observaron y fotografiaron en un fotodocumentador con luz UV. Se realizó la prueba de Hardy-Weinberg para un mejor análisis de la genotipificación, se compararon las frecuencias obtenidas con frecuencias reportadas en la literatura.

Tabla 1. Programa de PCR para los polimorfismos C677T y A1298C.

Paso de PCR	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Desnaturalización inicial	1	94	5
Desnaturalización	30	94	30
Alineamiento		58.1	30
Extensión		72	30
Extensión final	1	72	5

6. RESULTADOS

6.1 Resultados técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T.

6.1.1 Diseño de oligonucleótidos

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la técnica PCR-RFLP para el polimorfismo C677T.

Polimorfismo	Primer (5→3')	Longitud (pb)	%GC	Tm(°C)	Tamaño de amplicón (pb)
C677T	CCAGTCCCTGTGGTCTCT	18	61.11	60.9	203
	GAAGAATGTGTCAGCCTCAA	20	40	61	

6.1.2 Gradientes de temperatura

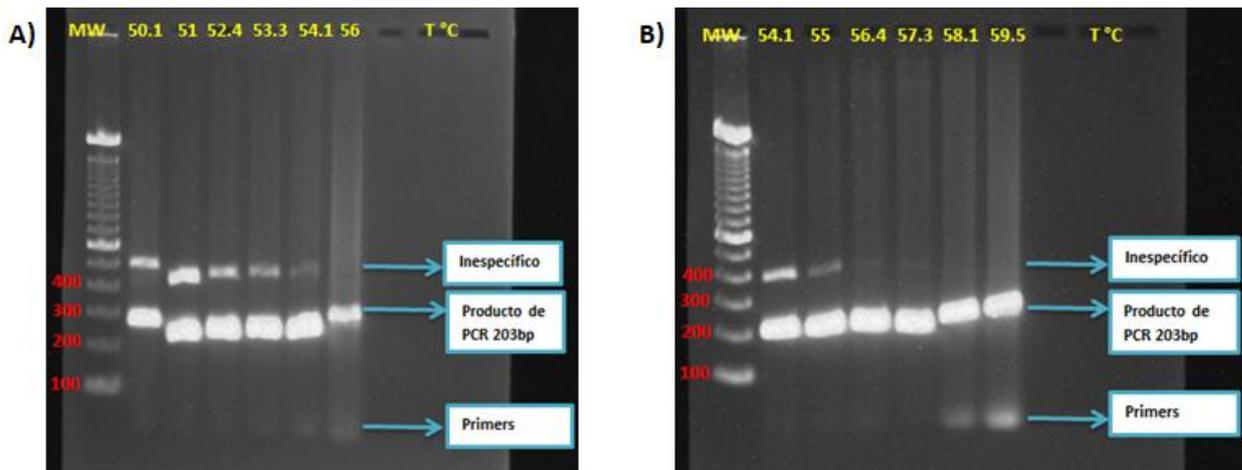


Figura 7. PCR de gradiente de temperaturas del polimorfismo C677T. A) Gradiente de temperaturas 50.1 a 56°C en donde se observa el producto esperado de 203pb y un producto inespecífico de aproximadamente 400pb. B) Gradiente de temperaturas de 54.1 a 59.5°C en donde se observa el producto esperado de 203pb y un producto inespecífico de aproximadamente 400pb observada desde la temperatura 54.1 hasta los 57.3°. Las condiciones en ambos gradientes fueron: oligonucleótidos a 500nM, electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1hr en TBE, con marcador de peso molecular (MW) 100bp DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red.

6.1.3. Uso de diferentes Master Mix y cambio de concentración de primers.

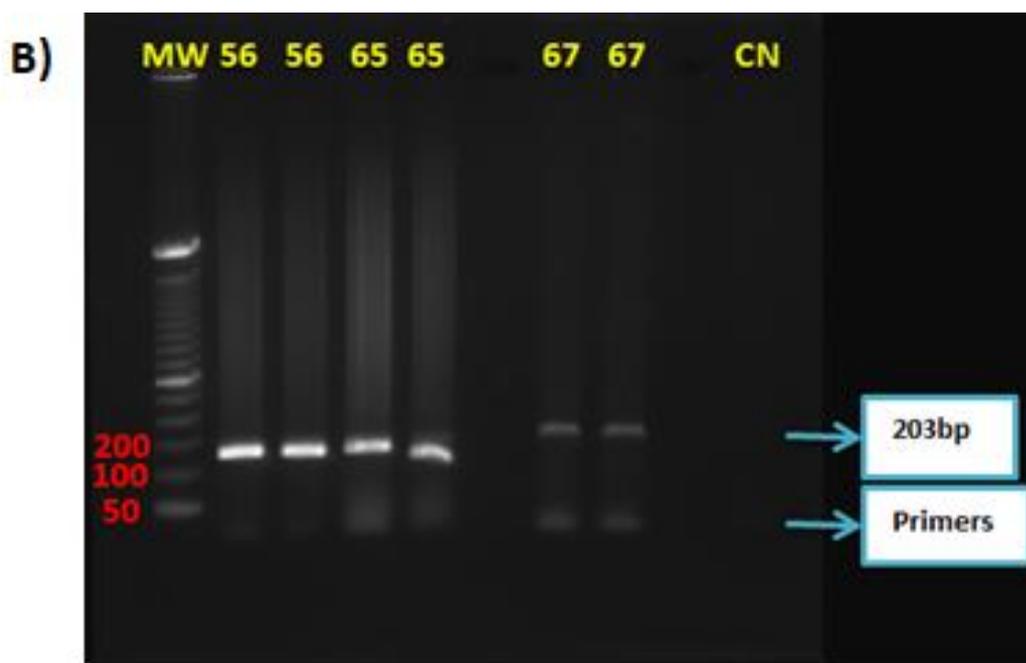
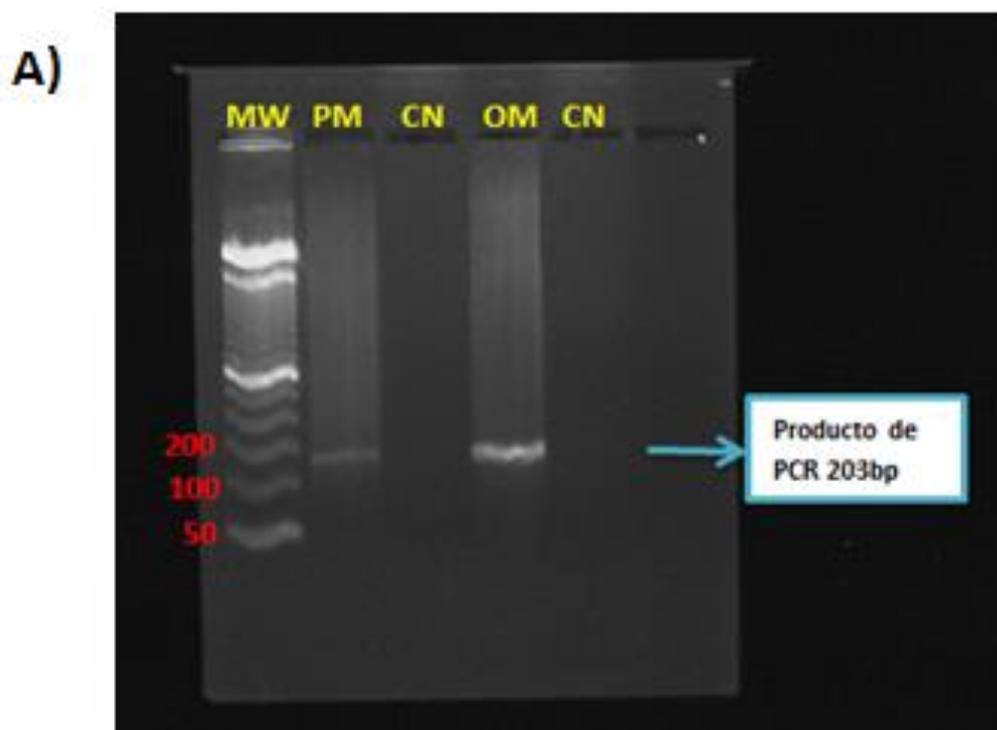


Figura 8. Concentración diferente de primers. A) PCR con dos Master Mix: Promega(PM) y Takara Omnimix HS (OM), concentración de oligonucleótidos a 100nM. B) PCR de muestras 56, 65 y 67 con concentración de oligonucleótidos a 300nM. Electroforesis en gel de agarosa 2% 115v/1h en TBE, 100bp ladder Invitrogen, tinción gel red. MW: marcador de peso molecular. CN: Control negativo.

6.1.4. Cambios en tiempo de digestión y concentración de enzima.

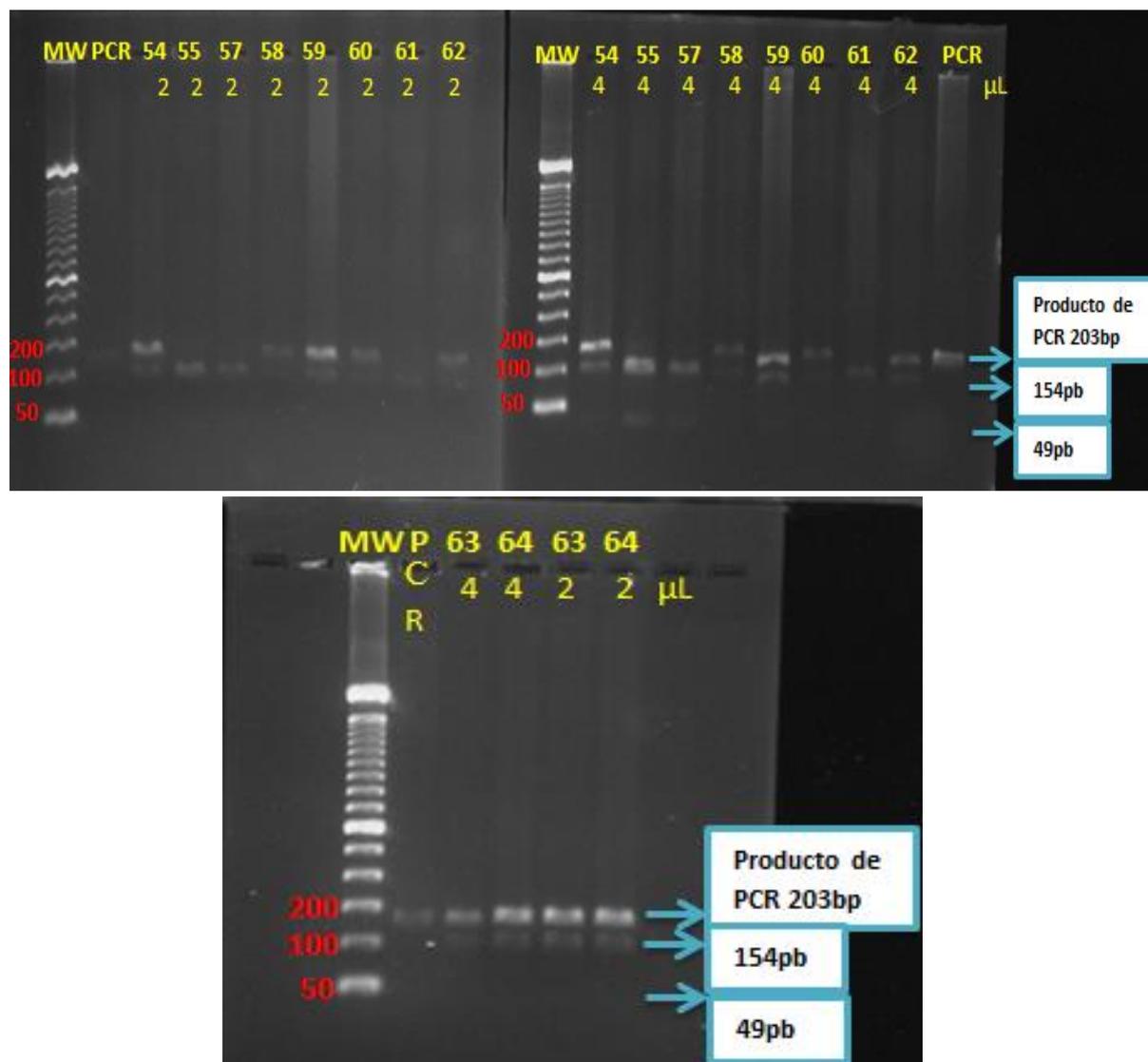


Figura 9. Digestión con enzima *HinfI* del polimorfismo C677T con variación de volumen de producto de PCR de 2 y 4μL. Los volúmenes de producto de PCR fueron de 2 y 4μL, con una concentración de enzima a 5U/μL y tiempos de digestión de 1, 2 y 3 horas. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1h con marcador de 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. MW: marcador de peso molecular. PCR: Producto de PCR sin digerir.

En la figura 9 los individuos 54FG, 57FG, 58FG, 59FG, 60FG, 62FG, 63FG y 64FG presentan un genotipo heterocigoto C/T, mientras que los individuos 55FG y 61FG presentan un genotipo homocigoto polimórfico T/T.

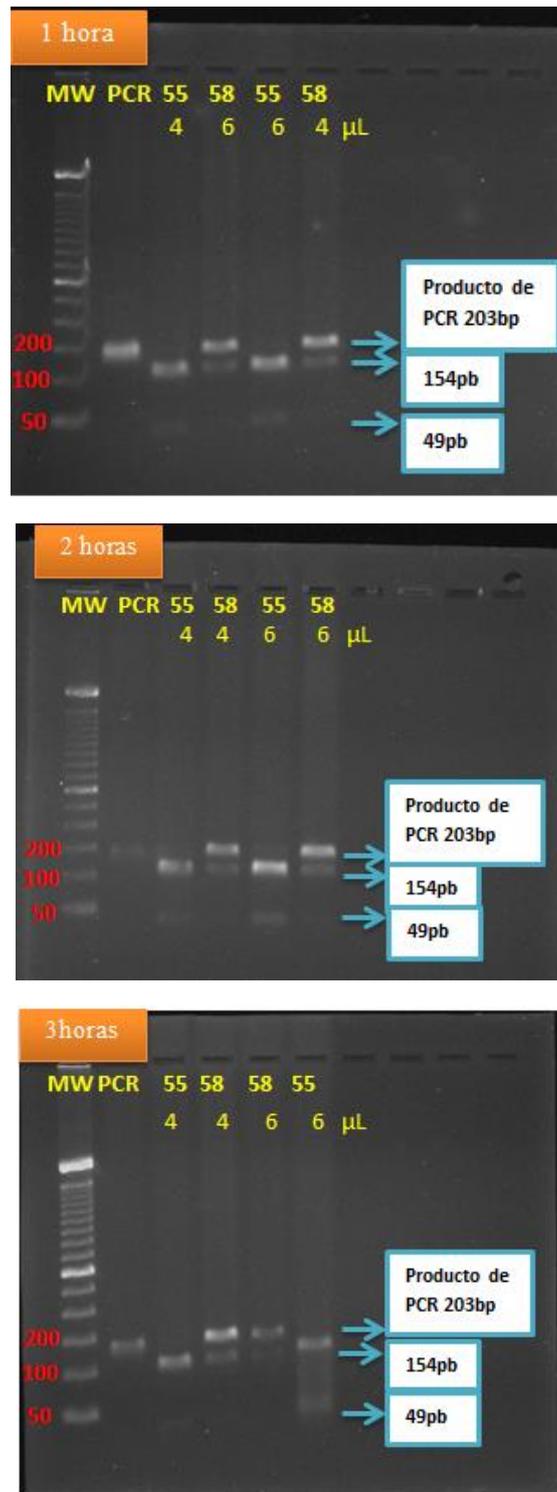


Figura 10. Digestión con enzima *HinfI* del polimorfismo C677T con variable de volumen de producto de PCR de 4 y 6μL. Concentración de enzima a 5U/μL y tiempos de digestión de 1,2 y 3 horas. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1h con marcador de 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. MW: marcador de peso molecular. PCR: Producto de PCR sin digerir.

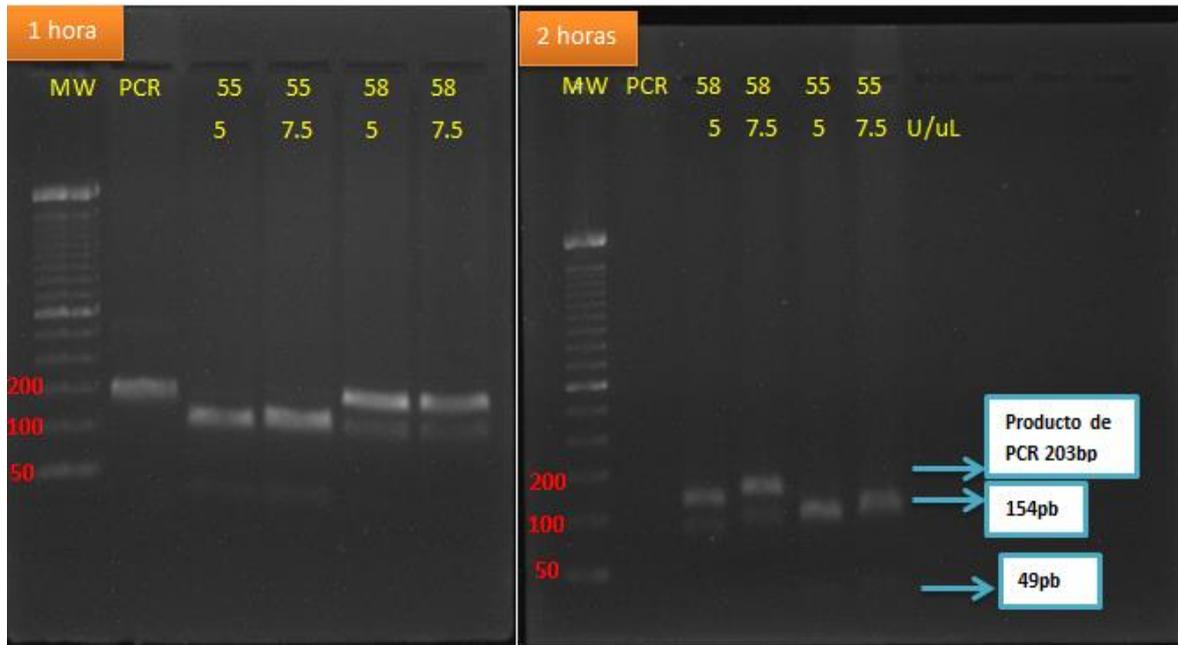


Figura 11. Digestión de enzima HinfI con variable en concentración de enzima de 5 y 7.5U/μL. Volumen de producto de PCR de 4μL y tiempo de digestión de 1 y 2 horas. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1hora con marcador de 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. MW: marcador de peso molecular. PCR: Producto de PCR sin digerir.

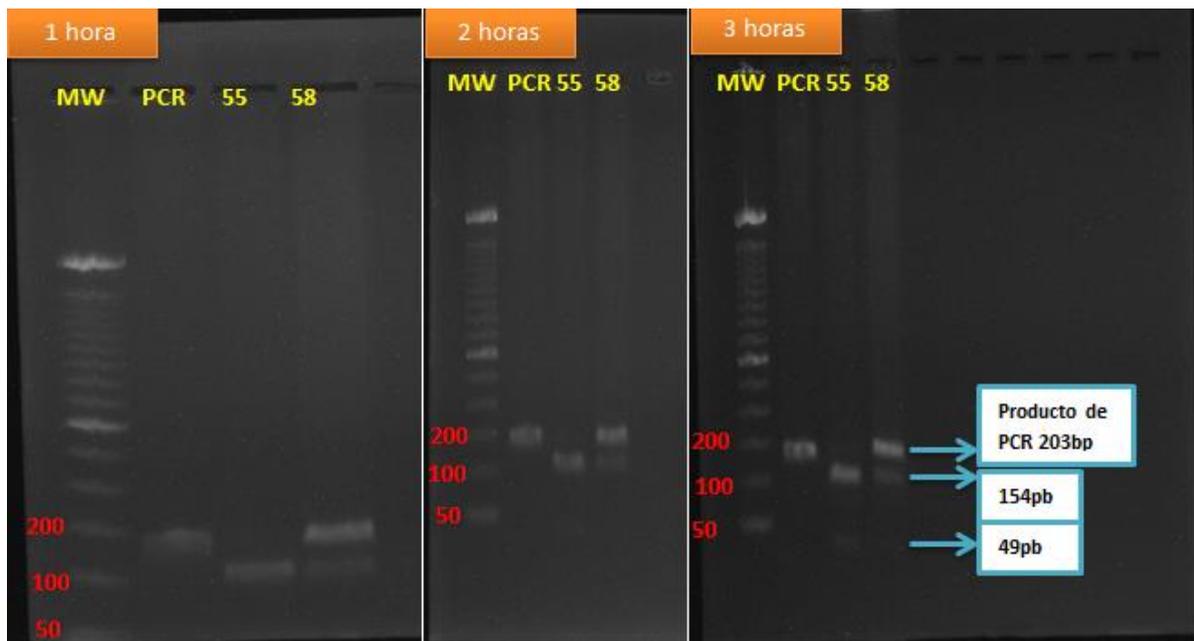


Figura 12. Digestión con enzima HinfI con variable en concentración de enzima 2.5U/μL. Se añadieron 4μL de volumen de producto de PCR y tiempo de digestión de 1,2 y 3 horas. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1 con TBE, marcador de 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. MW: marcador de peso molecular. PCR: Producto de PCR sin digerir.

6.1.5 Genotipificación del polimorfismo C677T por la técnica PCR-RFLP.

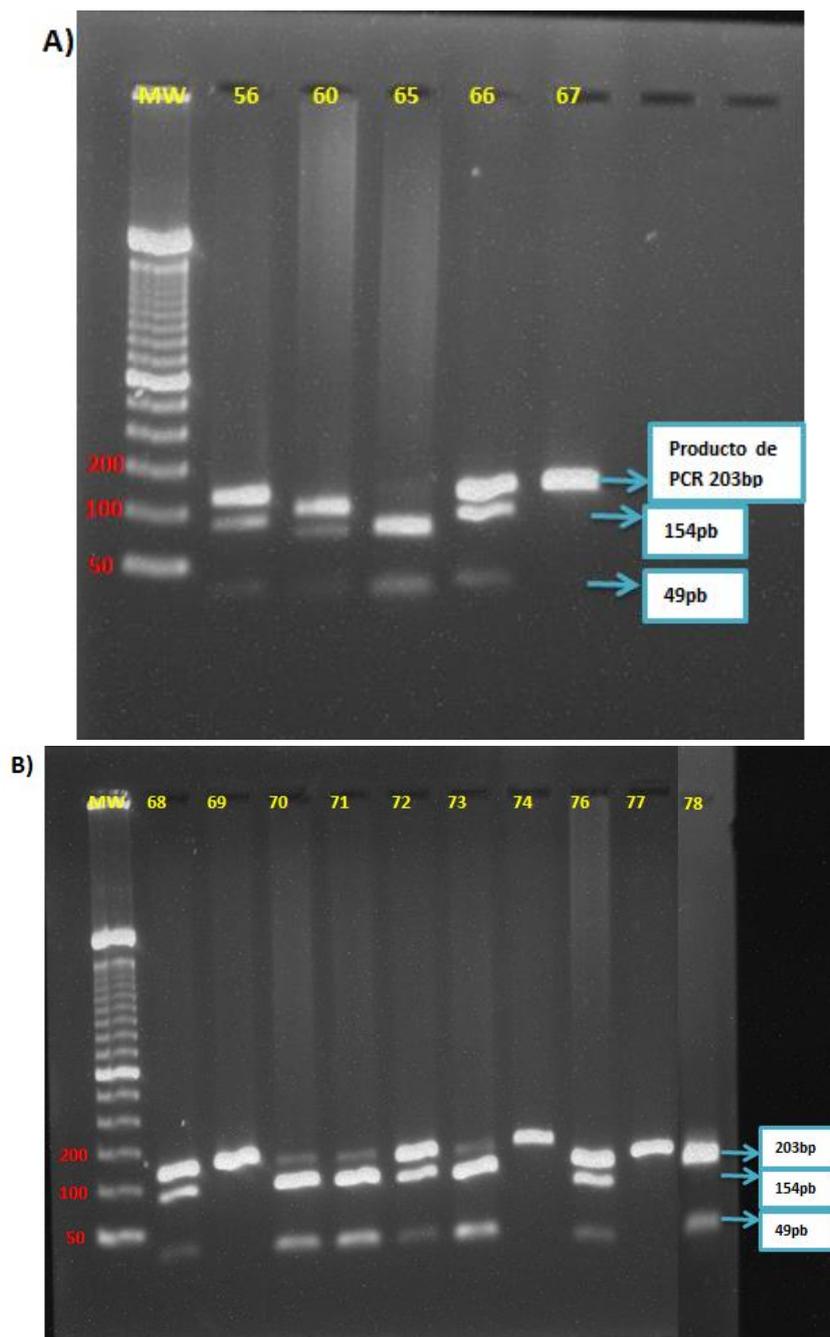


Figura 13. Genotipificación del polimorfismo C677T por PCR-RFLP. A) Genotipificación de las muestras 56, 60, 65, 66 y 67. B) Genotipificación de las muestras 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77 y 78. Genotipificaciones que se realizaron a condiciones: temperatura de alineamiento de 58.1°C a una concentración de primers de 100nM con 30 ciclos de PCR. La concentración de enzima utilizada fue de 5U/μL, con 4μL de producto de PCR y 2 horas de digestión. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1 con TBE, marcador de 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. MW: marcador de peso molecular.

En la figura 13 los individuos que presentan una banda de tamaño de 203pb presentan genotipo C/C, los individuos con bandas de 203, 154 y 49pb presentan genotipo C/T y los individuos con bandas de 154 y 49pb presentan genotipo T/T. Mientras que los individuos 56, 60 y 66 presentan un genotipo C/T, el individuo 65 T/T y el individuo 67 C/C.

6.2 Resultados técnica PCR-ASO para el polimorfismo A1298C

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la técnica PCR-ASO.

Polimorfismo	Primer (5'→3')		Longitud (pb)	%GC	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
A1298C	E	F TTGGGGAGCTGAAGGACTAC	20	55	58.72	293
		R TTCTCCCTTTGCCATGTCCA	20	50	59.22	
	I	F GAGGAGCTGACCAGTGATGC	20	60	57.9	197
		R AGAACGAAGACTTCAAAGACACATT	25	36	59.18	97

E: Externos. I: Internos. F: Forward. R: Reverse

6.2.2 Gradiente de temperatura

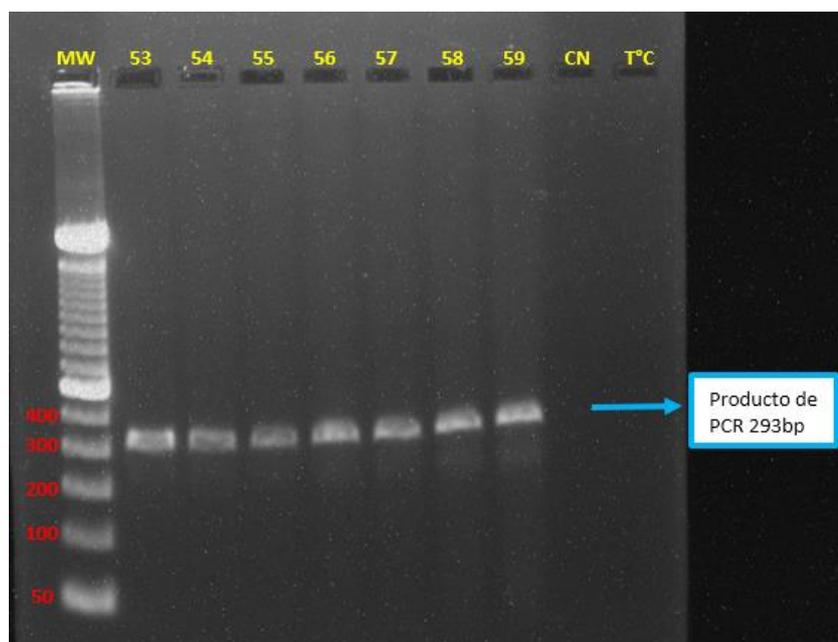


Figura 14. PCR de gradiente para el polimorfismo A1298C. Gradiente de temperaturas 53-59°C, se observa la banda del producto esperado de 293bp, se usaron solo los oligonucleótidos externos a una concentración de 100nM, electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1h en TBE, con marcador de peso molecular (MW) 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel rojo.

6.2.3. Cambio de Master Mix, Concentración de primers, Temperatura de alineamiento y número de ciclos de PCR

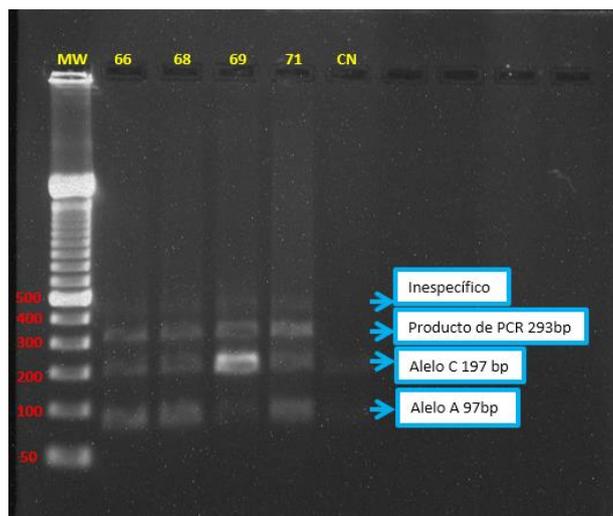


Figura 15. PCR-ASO con variación de las concentraciones de los oligonucleótidos para el polimorfismo A1298C. Concentración de oligonucleótidos externos a 50nM e internos a 300nM, Tm de 58.1°C y 35 ciclos. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1h en TBE, con marcador de peso molecular (MW) 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red.

En la imagen anterior se observan cuatro bandas diferentes para las muestras 66, 68, 69 y 71, la banda control del producto de PCR de 293bp, la banda correspondiente al producto Alelo Específico C de 197bp, la banda correspondiente al producto Alelo Específico A de 97bp y una banda inespecífica de 400bp.

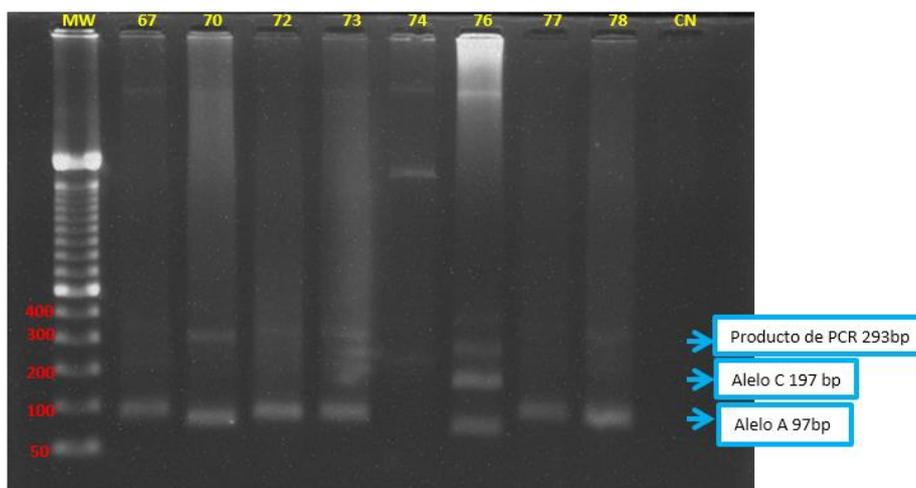


Figura 16. PCR-ASO con reducción en ciclos de PCR para el polimorfismo A1298C. Concentración de los oligonucleótidos externos a 50nM e internos a 300nM, se usó Master Mix Takara Omnimix HS. Se realizó un ajuste en el número de ciclos número de 35 a 30, Tm de 50.1°C. Electroforesis en gel de agarosa al 2% 115v/1h en TBE, con marcador de peso molecular (MW) 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red.

En la figura 16 se observan tres bandas diferentes para las muestras 67, 70, 72, 73, 74, 76, 77 y 78, la banda control del producto de PCR de 293bp, la banda correspondiente al

producto Alelo Específico C de 197bp y la banda correspondiente al producto Alelo Específico A de 97bp, la muestra 74 no amplificó.

6.2.4 Genotipificación del polimorfismo A1208C por la técnica PCR-ASO

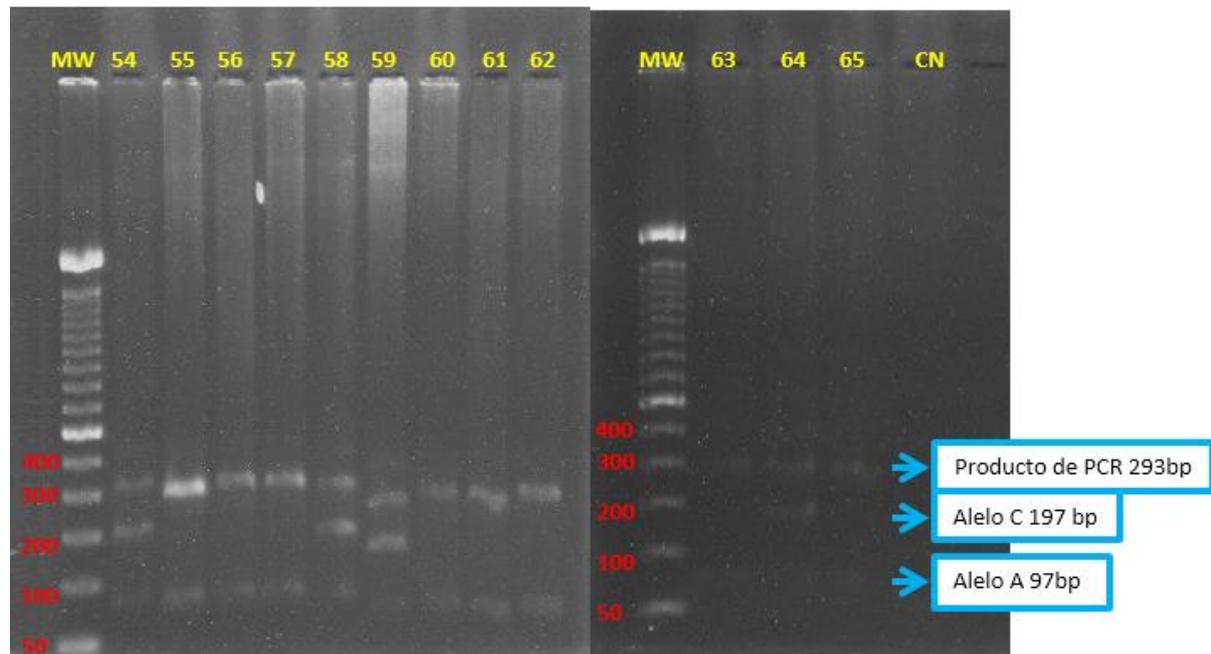


Figura 17. Genotipificación de las muestras 54 a 65 por técnica PCR-ASO del polimorfismo A1298C.

Tm de 58°C, oligonucleótidos externos a 100nM e internos de 300nM, electroforesis en gel de agarosa 2% 115v/1hr en TBE, marcador de peso molecular 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. La banda de 293pb es común y todos los individuos la presentan, si se encuentra en conjunto con la banda de 97pb tienen genotipo A/A; si la presentan con banda de 197pb y 97pb poseen A/C, si la presentan con banda de 97 poseen genotipo C/C.

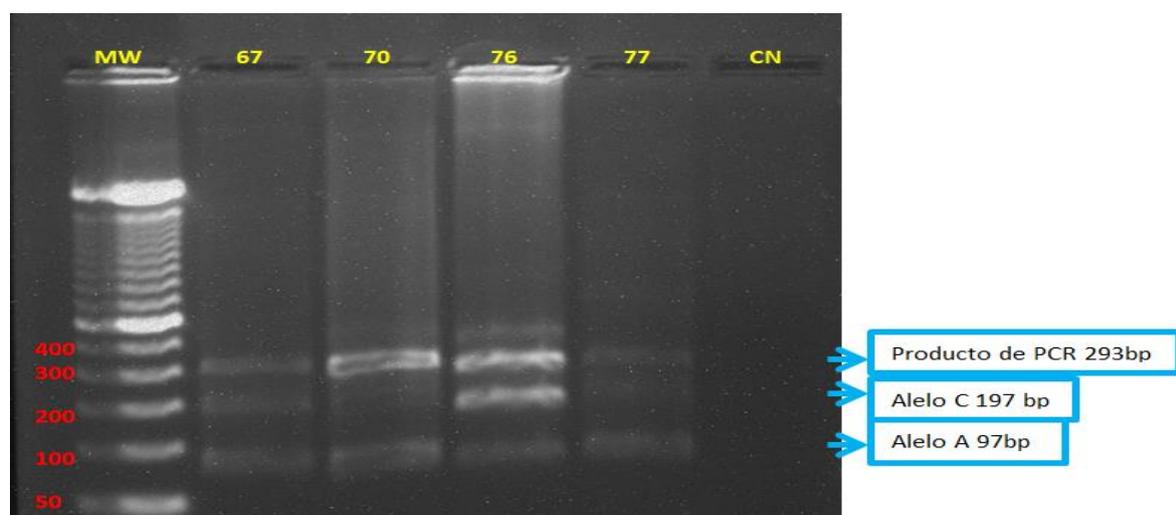


Figura 18. Genotipificación de las muestras 67, 70, 76 y 77 por técnica PCR-ASO para polimorfismo A1298C.

Tm de 58°C, oligonucleótidos externos a 100nM e internos de 300nM, electroforesis en gel de agarosa 2% 115v/1hr en TBE, marcador de peso molecular 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel red. La banda de 293pb es común y todos los individuos la presentan, si se encuentra en conjunto con la banda de 97pb tienen genotipo A/A; si la presentan con banda de 197pb y 97pb poseen A/C, si la presentan con banda de 97 poseen genotipo C/C.

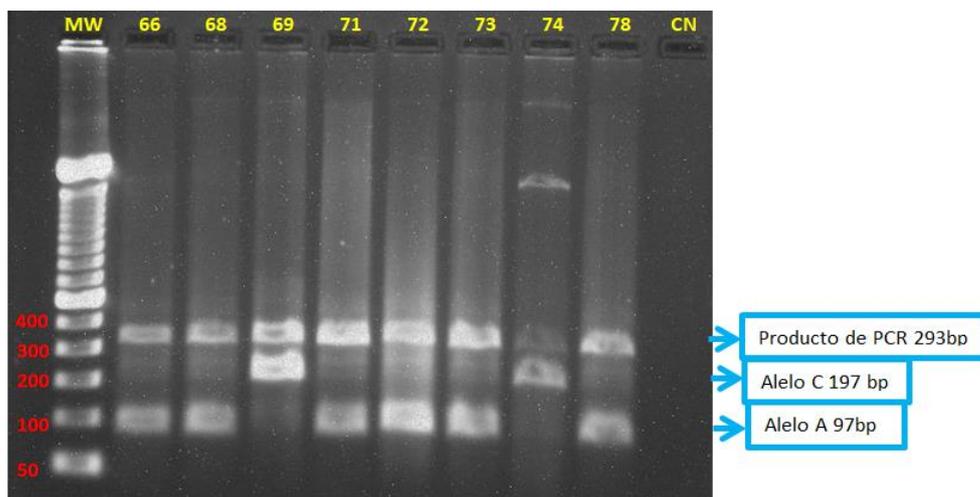


Figura 19. Genotipificación de las muestras 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74 y 78 por técnica PCR-ASO para polimorfismo A1298C. Tm de 58°C, oligonucleótidos externos a 100nM e internos de 300nM, electroforesis en gel de agarosa 2% 115v/1hr en TBE, marcador de peso molecular 100pb DNA ladder Invitrogen, tinción con gel rojo. La banda de 293pb es común y todos los individuos la presentan, si se encuentra en conjunto con la banda de 97pb tienen genotipo A/A; si la presentan con banda de 197pb y 97pb poseen A/C, si la presentan con banda de 97 poseen genotipo C/C.

6.3 Resultados de genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C

Tabla 4. Genotipos por individuo de los polimorfismos C677T y A1298C.

Muestra	Polimorfismo C677T	Polimorfismo A1298C	Muestra	Polimorfismo C677T	Polimorfismo A1298C
54	C/T	A/C	66	C/T	A/A
55	T/T	A/A	67	C/C	A/C
56	C/T	A/A	68	C/T	A/A
57	C/T	A/A	69	C/C	C/C
58	C/T	A/C	70	T/T	A/A
59	C/T	A/C	71	T/T	A/A
60	C/T	A/A	72	C/T	A/A
61	T/T	A/A	73	T/T	A/A
62	C/T	A/A	74	C/C	C/C
63	C/T	A/A	76	C/T	A/C
64	C/T	A/C	77	C/C	A/C
65	T/T	A/A	78	T/T	A/A

Tabla 5. Frecuencias Genotípicas del polimorfismo C677T.

	Genotipo			
Observado	CC	CT	TT	Total
n	4	13	7	24
%	17	58	29	100
F	0.17	0.58	0.29	1
Esperado	CC	CT	TT	Total
n	5	12	8	24
%	21	50	33	100
F	0.21	0.5	0.33	1

n: número de individuos. %: porcentaje de individuos. F: frecuencia.

Tabla 6. Frecuencias Alélicas del polimorfismo C677T.

	Alelo		
Observado	A	C	Total
n	37	11	48
%	77.08	22.92	100
F	0.77	0.23	1

n: número de individuos. %: porcentaje de individuos. F: frecuencia.

Tabla 7. Prueba de Hardy-Weinberg del polimorfismo C677T.

Genotipo	Observado	Esperado	X^2
CC	4	5	0.20
CT	13	12	0.08
TT	7	8	0.12
$\Sigma X^2 =$			0.40

Observado: dato experimental. Esperado: dato teórico

X^2 : prueba de contingencia con 1 grado de libertad y p de 0.05 X^2 de tablas: 3.84.

Siendo las hipótesis:

H0: $X^2_{\text{tabla}} > X^2_{\text{calculado}}$ “No hay diferencia entre los datos observados y los esperados para la genotipificación del polimorfismo C677T, por lo tanto, están en equilibrio de Hardy-Weinberg.”

H1: $X^2_{\text{tabla}} \leq X^2_{\text{calculado}}$ “Si hay diferencia entre los datos observados y esperados para la genotipificación del polimorfismo C677T, por lo tanto, no están en equilibrio de Hardy-Weinberg.”

En base a los resultados anteriores, X^2 calculada es menor que la X^2 de tablas, por lo tanto, se acepta la hipótesis H0 con un nivel de confianza del 95%, significando que los resultados están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 8. Frecuencias Genotípicas del polimorfismo A1298C.

	Genotipo			
Observado	AA	AC	CC	Total
N	15	7	2	24
%	62.50	29.17	8.33	100
F	0.63	0.29	0.08	1
Esperado	AA	AC	CC	Total
N	14	9	1	24
%	58.33	37.50	4.17	100
F	0.58	0.38	0.04	1

Tabla 9. Frecuencias Alélicas del polimorfismo A1298C.

	Alelo		
Observado	A	C	Total
N	37	11	48
%	77.08	22.92	100
F	0.77	0.23	1

Tabla 10. Prueba de Hardy-Weinberg del polimorfismo A1298C.

Genotipo	Observado	Esperado	X^2 calculado
AA	15	14	0.07
AC	7	9	0.44
CC	2	1	1
$\Sigma X^2 =$			1.51

Observado: dato experimental. Esperado: dato teórico

X^2 : prueba de hipótesis con 1 grado de libertad y p de 0.05 X^2 de tablas: 3.84.

Siendo las hipótesis:

H0: $X^2_{\text{tabla}} > X^2_{\text{calculado}}$ "No hay diferencia entre los datos observados y los esperados para la genotipificación del polimorfismo A1298C, por lo tanto, están en equilibrio de Hardy-Weinberg."

H1: $X^2_{\text{tabla}} \leq X^2_{\text{calculado}}$ "Si hay diferencia entre los datos observados y esperados para la genotipificación del polimorfismo A1298C, por lo tanto, no están en equilibrio de Hardy-Weinberg."

Con base en los resultados mostrados en la tabla 8, se acepta Ho con un nivel de confianza de 95% para cada genotipo del polimorfismo A1298C, debido a que no hay ninguna diferencia significativa entre los datos esperados y los observados, lo cual significa que los resultados están en equilibrio de Hardy-Weinberg.6.4. Productos de PCR de ambas técnicas

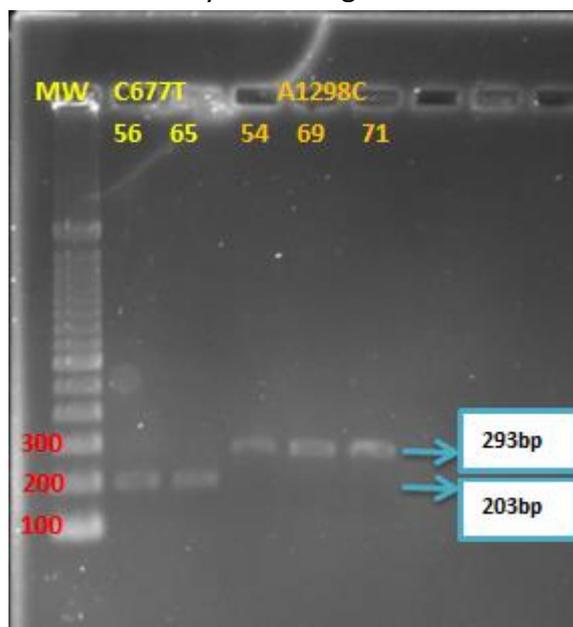


Figura 20. Verificación de tamaños de productos de PCR con Bromuro de etidio. Fragmentos de producto de PCR de diferentes muestras por ambas técnicas para verificación de tamaños. Electroforesis en gel de agarosa 2% 115v/1h en TBE, 100bp ladder Invitrogen, teñido con bromuro de etidio después de electroforesis. MW: marcador de peso molecular.

7. DISCUSIÓN

En la estandarización de las metodologías PCR-RFLP y PCR-ASO cuyo primer paso es la amplificación, es preciso conocer de forma experimental la temperatura de alineamiento, concentración de primers, y la concentración y cantidad de la muestra de DNA. En primer lugar se abordará la elección de las temperaturas para el programa de PCR (tabla 1), principalmente la temperatura de alineamiento y la importancia de su diseño teniendo en cuenta los parámetros que la modifican señalados en la metodología (Sección 5.3 y 5.4), que contribuyeron a encontrar la T_m experimental más rápidamente.

La temperatura de alineamiento de la PCR se encontró y seleccionó experimentalmente para cada una de las metodologías por separado, llevando a cabo gradientes de temperaturas como se muestra en la Figura 7 para la metodología PCR-RFLP, y en la Figura 14 para la metodología PCR-ASO. Sin embargo, la temperatura de alineamiento terminó siendo la misma para ambas. Los intervalos de temperatura utilizados para dicho proceso se escogieron de tal manera que se tomó en cuenta el diseño de los oligonucleótidos y las temperaturas de alineamiento recomendadas por el proveedor, para cada uno de los oligonucleótidos.

Generalmente la T_m experimental se debe de llevar a cabo en un intervalo entre 3 y 10°C por debajo del teórico, ya que la T_m se define como aquella temperatura a la que la mitad de los oligonucleótidos están unidos a la cadena molde de DNA, por lo tanto, a una temperatura mayor a 60° existe la posibilidad de que la mayoría de los oligonucleótidos no se encuentre unida a la cadena molde, lo anterior puede generar que no haya un amplicón o se generen productos inespecíficos (SantaLucia, 2007; Caetano-Anollés, 2013). Asimismo, la T_m se va a ver afectada por diferentes factores como la concentración de sales de la reacción, la composición de los oligonucleótidos en cuanto a nucleótidos se refiere e incluso la concentración del DNA molde, ya que si se encuentra en altas concentraciones hay posibilidad de que los oligonucleótidos hibriden a una temperatura diferente (SantaLucia, 2007).

La temperatura a la que no se observaron productos inespecíficos en la PCR de gradiente del polimorfismo C677T y una menor cantidad de oligonucleótidos fue a 58.1°C (Figura 7), por lo cual, ésta fue la temperatura que se eligió como ideal para T_m .

La temperatura de alineamiento para la PCR-ASO se eligió tras realizar una PCR de gradiente como se muestra en la Figura 14, siendo 58°C la temperatura de alineamiento elegida, pues elegir una Temperatura de alineamiento alta tiene como ventaja una baja posibilidad de formación de dímeros y de productos inespecíficos debido a errores durante el alineamiento. También, experimentalmente se observó que al añadir los oligonucleótidos

internos, a menores temperaturas junto al master mix de marca Promega, no se observaba ningún producto de amplificación (van Pelt-Verkuil, Van Leeuwen y Witt, 2019).

Se eligió 94°C como temperatura de desnaturalización porque tradicionalmente es la temperatura usada para que el DNA se desnaturalice en las PCR's, es decir, que el dsDNA pase a ssDNA, rompiendo los puentes de hidrógeno entre las bases complementarias que mantenían la cadena molde unida a su cadena complementaria. Se colocaron 5 minutos como tiempo inicial de desnaturalización para asegurar la abertura de la mayor cantidad de DNA de doble cadena proveniente de la muestra, posteriormente se colocó un segundo tiempo de desnaturalización mucho más pequeño, de 30 segundos, como parte del ciclo que se repetirá tras el alineamiento y extensión, teniendo en cuenta que la cantidad de bases a separar será mucho menor (Caetano-Anollés, 2013; van Pelt-Verkuil, Van Leeuwen y Witt, 2019).

La temperatura de extensión o de alargamiento es posterior al proceso de alineamiento de la plantilla de DNA con los oligonucleótidos, se usa la temperatura óptima de trabajo de la enzima, es decir, de la Taq Polimerasa, que es de 72°C. Durante este paso las DNA polimerasas sintetizan una nueva cadena de DNA complementaria a partir de la ubicación reconocida por los oligonucleótidos, en condiciones óptimas, a una velocidad aproximada de 1000 bases por minuto, debido a que el producto esperado es menor a 500 pb, 30 segundos es el tiempo más que suficiente para este paso. Típicamente hay un segundo tiempo de extensión final, que se eligió de 5 minutos, en este paso se extiende cualquier secuencia que pudiera haber quedado inconclusa con el fin de los resultados finales sean consistentes entre ellos, es decir, que los productos esperados tengan la misma longitud (Caetano-Anollés, 2013; van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

Todas las electroforesis se realizaron con tinción de GelRed pre-electroforesis, sin embargo, el tamaño de las bandas no eran consistentes con el tamaño de bandas que reporta el inserto del marcador de peso molecular, por lo que se decidió realizar una electroforesis con bromuro de etidio pos-electroforesis para corroborar que los productos obtenidos tenían la longitud correcta (Figura 20), como se puede observar, en esa imagen sí coinciden los tamaños de producto de PCR esperadas con el tamaño de bandas reportados en el inserto del marcador de peso molecular. Se encontró que la preparación del GelRed que se utilizó tiene una alta concentración de NaCl, esto puede afectar a la velocidad del movimiento de las moléculas del DNA por el gel debido a la fuerza iónica, así mismo, el inserto refiere que el GelRed es una molécula grande y que puede verse afectado el movimiento por el gel, se recomienda la tinción con GelRed posterior al corrimiento electroforético ya que es más sensible y se elimina la posibilidad de que interfiera con la migración del DNA (Biotium, 2018; Turned y Ngwenya, 2010).

El uso de dos Master Mix diferentes (Figura 8) se hizo con el fin de observar si a la misma concentración de oligonucleótidos se obtenía sólo el amplificado de 203pb, ya que los Master mix utilizados contienen diferentes concentraciones en sus componentes.

La principal diferencia entre los Master Mix es la enzima Taq polimerasa, ya que el Master mix de marca Promega tiene una concentración de enzima de 20U/ml y el Takara Omnimix de 49.98U/ml, mientras que la concentración de los dNTP's es muy similar y tienen una variación ligera en la concentración de cloruro de magnesio.

Las concentraciones que normalmente contiene un Master Mix de estos componentes son de 0.5-2U de enzima DNA polimerasa, 0.1-0.2 μ M de los dNTPs y de 1-5 mM de cloruro de magnesio (van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

Es recomendable guardar una relación de concentración superior de cloruro de magnesio con respecto a los dNTPs. Los iones magnesio aparte de que juegan un papel de cofactor para la Taq polimerasa, también tiene una función de sal que va a aumentar la temperatura de hibridación del DNA. Un aumento de la concentración de cloruro de magnesio va a disminuir la especificidad de la PCR, mientras que una concentración baja, aumenta la especificidad (van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

Además de tener una mayor concentración de la enzima Taq Polimerasa, el master mix de la marca Takara Omnimix, cuenta con la tecnología Hot Start que inhibe la actividad de la Taq a temperaturas menores de 70°C, impidiendo la amplificación no específica por la formación de dímeros de DNA-Oligonucleótidos y la actividad reducida de la Taq Polimerasa a temperaturas de 50-55% que dan como resultado productos inespecíficos fuera de la temperatura de extensión. Esto se evita haciendo uso de los anticuerpos anti-Taq que se separan a 72°C, es decir, a temperatura de extensión aumentando la especificidad de la reacción y de los productos obtenidos (Caetano-Anollés, 2013; Rybalkin, 1996; van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

El cambio de master mix de la marca Promega a Takara Omnimix queda justificado por las razones anteriormente señaladas, puesto que tanto una mayor concentración de enzima Taq como evitar la formación de productos inespecíficos mejora el pronóstico de los resultados esperados.

La concentración de los oligonucleótidos depende de la concentración del DNA, ya que las altas concentraciones de oligonucleótidos pueden provocar "mispriming", que es la hibridación con secuencias no deseadas y la amplificación de productos inespecíficos. Así mismo, los oligonucleótidos pueden formar interacciones entre sí y generar lo que se conoce como dímeros de primer. Una reacción de PCR generalmente contiene una concentración de oligonucleótidos de 0.05-0.5 μ M (van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

En primera instancia, para la técnica PCR-RFLP, se optó por una concentración de 500nM (Figura 7), en donde se obtenían productos inespecíficos y dímeros de primer. Posteriormente se eligió una concentración de oligonucleótidos a 100nM con una concentración de DNA de 100ng/uL aproximadamente (Figura 8), en donde se observa únicamente una banda de 203pb correspondiente al producto de PCR de interés. Los dos Master Mix se probaron con concentraciones de oligonucleótidos de 100nM, 300nM y 500nM para el polimorfismo C677T (Figura 8).

A su vez, para la metodología PCR-ASO, se inició con una concentración de 100nM para los oligonucleótidos externos (Figura 14) y posteriormente (Figuras 15 y 16) se disminuyó su concentración a 50nM, añadiendo en conjunto a los oligonucleótidos internos a una concentración de 300nM. Se tomó esta decisión intentando optimizar la concentración de los oligonucleótidos al usar la menor cantidad posible de estos. Sin embargo, al analizar el resultado a detalle (Figura 16) y observar que las bandas de los productos alelo específicos esperados eran muy tenues, se elevó la concentración de los oligonucleótidos externos a 100nM dejando intacta la concentración de los oligonucleótidos internos a 300nM, y finalmente, éstas fueron las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos con las cuales se realizó la genotipificación de las muestras (Figura 17, 18 y 19).

En cuanto al número de ciclos elegidos, la Figura 15 muestra los resultados de una PCR-ASO con ambos pares de oligonucleótidos, tanto externos como internos, con 35 ciclos en el programa de PCR. Como resultado se observaron los 3 productos esperados, así como un producto inespecífico de 400bp. Posteriormente, en Figura 16, se disminuyó la cantidad de ciclos de 35 a 30 para evitar la aparición de dicho producto inespecífico, la reducción en el número de ciclos se debe a que a condiciones subóptimas, la síntesis de productos inespecíficos se ve favorecida durante los últimos ciclos de la PCR hasta que se alcanza la meseta final, por ello, se prefiere finalizar el proceso 5-10 ciclos antes (van Pelt-Verkuil y te Witt, 2019).

Por otra parte, una vez que se logró obtener el producto amplificado que contiene al polimorfismo C677T, se inició con la estandarización de la técnica RFLP. Como se mencionó anteriormente, la técnica de PCR-RFLP consiste en la elaboración de la PCR, seguida de una digestión con enzima que va a generar fragmentos para el análisis del polimorfismo (Ota, *et al*, 2009). Para la técnica de RFLP es muy importante mantener las condiciones adecuadas para un correcto trabajo de la enzima, como los son sus cofactores, entre los más importantes se encuentra el ión Mg^{2+} , así como un pH óptimo (Pingoud, *et al*, 1993). Sin embargo, un punto importante para la reacción en presencia con el producto de PCR es la concentración de la enzima en la reacción para generar los cortes en los productos de PCR. La elección de la concentración de la enzima de restricción para la digestión del amplificado se eligió con base en el inserto del proveedor de la enzima como punto de partida, el cual es de 5U/ μ L (Figuras 10 y 11).

Así mismo, se probaron condiciones variando la concentración de enzima a 7.5U/μL, para ver si se podía optimizar el tiempo de digestión de la enzima, sin embargo, se observó que no había mucha diferencia entre los resultados obtenidos a 5U/μL y 7.5U/μL (Figura 11), ya que en ambas se presentan bandas bien definidas a las 2hrs.

Del mismo modo, algunos autores indican que a concentraciones mayores de 10U puede llegar a presentarse un fenómeno llamado “actividad en estrella”, este fenómeno se presenta cuando se adiciona un exceso de enzima a la reacción y la enzima corta en sitios diferentes a su secuencia de reconocimiento, por lo que se decidió que era innecesario aumentar la cantidad de enzima, aparte de que elevaría el costo de la técnica. Este fenómeno, de igual manera, se presenta si no tiene las condiciones apropiadas de pH o de ión Mg^{+2} (Pingoud, *et al*, 1993).

También se probó la digestión del producto a una concentración menor de la enzima a 2.5U/μL; sin embargo, a esta concentración se observan las bandas bien definidas hasta las tres horas de digestión, ya que a las 2 horas no se alcanza a percibir el fragmento más pequeño de 49 pb (Figura 12).

Generalmente las concentraciones de enzima recomendadas para esta técnica son de 5U/μL a 10U/μL (Gaudet *et al*, 2009; Ota *et al*, 2009), no obstante, esta concentración va a depender del volumen de producto de PCR que va a ser sometido a la reacción de digestión con la enzima.

En este experimento se probaron los volúmenes de producto de PCR de 2 (Figura 9), 4 y 6μL (Figura 10). A un volumen de 2μL las bandas se observan muy tenues en todos los genotipos e incluso la banda de 49 pb no se observa. A su vez en el volumen de 6μL todas las bandas se observan bien, sin embargo, en los genotipos T/T en dónde sólo se deberían de ver dos bandas, una de 154pb y otra de 49 pb, se alcanza a ver una tercera banda que corresponde al producto de PCR de 203pb, significando que hay un exceso de DNA sin digerir. De esta forma se determinó que el volumen adecuado de producto de PCR es de 4 μL, en el que se observan todas las bandas de cada genotipo sin excedente de producto de PCR.

Una vez teniendo las condiciones finales para las técnicas PCR-RFLP y PCR-ASO, presentadas en las tablas 11 y 12, se genotipificaron las 24 muestras de DNA (Figura 13 para la PCR-RFLP; Figuras 17, 18 y 19 para la PCR-ASO), como se puede observar se ven bandas definidas en cada muestra que la identifican con un genotipo, lo que coincide con los resultados esperados y previstos durante el diseño de las metodologías (Figura 4 y 6).

Tabla 11. Condiciones de Genotipificación para polimorfismo C677T

Tm(°C)	Concentración de oligonucleótidos (nM)	Concentración de DNA (ng/μL)	Concentración de enzima HinfI(U/μL)	Volumen de producto de PCR (μL)	Tiempo de digestión (hr)	Temperatura de digestión (°C)
58.1	100	100	5	4	2	37

Tabla 12. Condiciones de Genotipificación para polimorfismo A1298C

Tm(°C)	Concentración de oligonucleótidos externos(nM)	Concentración de oligonucleótidos internos(nM)	Concentración de DNA (ng/μL)	Número de ciclos
58	100	300	100	30

La genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* se realizó por medio de las técnicas PCR-RFLP y PCR-ASO respectivamente, debido a que son técnicas de bajo costo en comparación con las sondas TaqMan, que es la técnica con la que se realiza la genotipificación de estos polimorfismos en la mayoría de los casos. Así mismo, la técnica con sondas TaqMan requiere de equipo para PCR en tiempo real, equipo con el que no cuentan muchos laboratorios, ya que es costoso, por otro lado, la técnica PCR-RFLP tiene la desventaja de que es una técnica tardada y laboriosa (Fitarelli-Kiehl *et al*, 2016).

Para tener seguridad en la fidelidad de los resultados es necesario conocer la sensibilidad y especificidad de las técnicas usadas, así también como realizar una prueba de calidad que los evalúe, para este fin se utilizó la ecuación de Hardy Weinberg.

La sensibilidad y especificidad son parámetros importantes para saber si una prueba es confiable o no. La sensibilidad se define como la probabilidad que tiene una prueba o técnica para detectar una afección que se esté tratando, mientras que la especificidad se define como la probabilidad que tiene una prueba o técnica para detectar un resultado negativo en aquellos individuos que no tienen la afección que se está tratando. En este caso, la afección son los polimorfismos que se identificaron por medio de las técnicas PCR-RFLP y PCR-ASO, ambas técnicas son altamente sensibles y específicas según datos reportados. Por una parte, la PCR-RFLP tiene una sensibilidad reportada del 100% y una especificidad del 95-100% (Schirru *et al*, 2007; Sharafi *et al*, 2012; Kamei *et al*, 2014) y por otro, la técnica PCR-ASO tiene una sensibilidad reportada fue de 83.3-96.7%, y una especificidad de 97.3-100% (Thirumurugan, *et al.*, 2015; Ullah, 2019; Hang, 2011)

Por definición, la aplicación del equilibrio de Hardy Weinberg suele indicar si una población que es infinitamente grande y el apareamiento es el azar, está sujeta a fuerzas evolutivas como la mutación y la selección natural, sin embargo, también se usa con mucha frecuencia como prueba de control de calidad en estudios de asociación genética, debido a que se puede hacer una asociación entre los datos obtenidos a partir de la experimentación y los datos que se calculan a partir de la ecuación de Hardy-Weinberg, que serían los datos esperados (Wang y Sanjay, 2017).

Se dice que cuando los resultados esperados y observados son parecidos, se está en equilibrio de Hardy-Weinberg; sin embargo, se debe realizar una prueba estadística llamada Ji-cuadrada (X^2) que consiste en la comparación de la Ji-cuadrada calculada mediante los datos obtenidos y esperados que se obtuvieron mediante la ecuación de Hardy-Weinberg, con la Ji-cuadrada de tablas, en la que se debe de calcular los grados de libertad de acuerdo a los alelos y genotipos que se tienen y un valor de P de tablas. Teniendo esto, se dice que la Ji-cuadrada calculada debe de ser menor a la de tablas. Si es así, se considera que los resultados no tienen diferencia significativa y por tanto se considera en equilibrio, lo que podría indicar que en la genotipificación no hubo errores. Por otro lado, cuando es mayor se considera una desviación de los resultados y por tanto errores en la genotipificación (Wang y Sanjay, 2017).

Como se puede observar en los resultados obtenidos del polimorfismo C677T (Tabla 5) y el polimorfismo A1298C (Tabla 8), el resultado de número de individuos, frecuencias y porcentajes obtenidos experimentalmente son muy similares a los que predice el equilibrio de Hardy-Weinberg, esto se comprobó con la prueba de contingencia de X^2 que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa. En muchas ocasiones, una desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg se debe a la calidad de la muestra de DNA, en cuanto a concentración y pureza se refiere. Una muestra contaminada o con poca concentración puede generar errores en la genotipificación que se van a ver reflejados en el incremento de genotipos homocigotos (Wang y Sanjay, 2017). En los resultados presentados no se observa desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo tanto, se puede decir que las muestras de DNA tenían buena calidad y que la técnica y los resultados a las condiciones que se sugieren en este trabajo son confiables.

Tabla 13. Comparación de frecuencias obtenidas con frecuencias de referencia del polimorfismo C677T y A1298C en población mexicana.

Polimorfismo	Genotipo	Frecuencias			
		Obtenido	Referencia 1	Referencia 2	Referencia 3
C677T	C/C	0.17	0.23	0.28	0.27
	C/T	0.58	0.51	0.51	0.47
	T/T	0.29	0.26	0.21	0.25
A1298C	A/A	0.625	0.743	0.575	0.71
	A/C	0.2917	0.242	0.34	0.277
	C/C	0.0833	0.015	0.085	0.013

Referencia 1: (Contreras-Cubas *et al*, 2016); Referencia 2: (González-Mercado *et al*, 2017)
Referencia 3: (Gutiérrez-Álvarez *et al*, 2016)

En la tabla 13 se presentan frecuencias de referencias recopiladas de artículos en dónde realizaron la genotipificación en población mexicana del polimorfismo C677T y A1298C del gen *MTHFR*. Se tomó en cuenta sólo la población que cuenta con las características que se buscaba en este trabajo, que son los individuos mestizo mexicanos sanos, para comparar las frecuencias.

Como se puede observar, las frecuencias obtenidas en este trabajo del genotipo C/T y TT son ligeramente mayores que las obtenidas en las de referencia. En particular, la muestra en la que se realizó la genotipificación en este trabajo es pequeña, ya que son 24 individuos, mientras que la muestra de los artículos consultados como referencia, tienen una muestra mayor a 50 individuos. Sin embargo, a pesar de la diferencia de tamaño de la muestra, se conserva la similitud y relación entre ellas.

8. CONCLUSIONES

Las muestras de DNA del banco de muestras de Farmacogenómica cuyo consentimiento se obtuvo, fueron genotipificadas por ambas metodologías, comprobando mediante el análisis con la prueba de Hardy-Weinberg, que los resultados son confiables al encontrarse en equilibrio, así mismo también se comprobó que el diseño y estandarización de ambas técnicas fue adecuado para la correcta identificación de los polimorfismos C677T y A1298C.

Mediante la estandarización de las técnicas se llegó a las condiciones finales y óptimas para la genotipificación de las muestras de DNA a partir de saliva, entre las que destacan la temperatura de alineamiento y la concentración de los oligonucleótidos. Para la técnica PCR-RFLP se usó la temperatura de alineamiento de 58.1°C y una concentración de oligonucleótidos de 100nM, adicionalmente se usó la enzima de restricción HinfI a una concentración de 5U/μL; mientras que para la técnica PCR-ASO se usó la temperatura de alineamiento de 58°C, una concentración de 100nM para los oligonucleótidos externos y una de 300nM para los internos, o también conocidos como Alelo Específicos.

9. PERSPECTIVAS

Una vez concluido lo pertinente a este trabajo y que este diseño sirva en un futuro para identificación de los polimorfismos C677T y A1298C en pacientes tratados con metotrexato, se pretende secuenciar una muestra de cada genotipo de dichos polimorfismos, para corroborar el resultado, siendo que la secuenciación es el estándar de oro en este tipo de determinaciones.

10. REFERENCIAS

1. Aaronson, S., *et al.* (2001). ASO (Allele-Specific Oligonucleotide). En Bernard, D. *et al.* (2a Ed) Brenner's Encyclopedia of genetics. Recuperado de: [https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/B9780123749840001017](https://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/B9780123749840001017)
2. Arenas, I. y López, J. (2004). Espectrofotometría de absorción (Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas). Recuperado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf
3. Atef, O., *et al.* (2018). Impact of Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) A1298 gene polymorphism on the outcome of methotrexate treatment in a sample of Egyptian rheumatoid arthritis patients. Alexandria Journal of Medicine; 54(4): 633-638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.11.008>
4. Barriga, G. y Hernández, E. (2016). Utilidad de las muestras de saliva en el diagnóstico por el laboratorio. Rev Latinoam Patol Clín Med Lab, 63(1), 13-18. Recuperado de: www.medigraphic.com/patologiaclinica.
5. Ben-Ari, G. y Lavi, U. (2012). Marker-assisted selection in plant breeding. En Altam, A. y Hasewaga, P. (1 Ed), Plant Biotechnology and Agriculture. doi: [10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0)
6. Benedí, J. y Ángeles, M. (2006). Fármacos Antineoplásicos (I). Farmacia profesional, 20(2), 60-64. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13084621>
7. Berkani, L., *et al.* (2017). Association of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms with methotrexate efficiency and toxicity in Algerian rheumatoid arthritis patients. Heliyon, 3(11), e00467. doi: [10.1016/j.heliyon.2017.e00467](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00467)
8. Biotium (2018). Product information. GelRed Nucleic Acid Gel Stain , 10, 000X. Recuperado de: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/gelred-nucleic-acid-gel-stain-10000x/>
9. Caetano-Anollés, D. (2013) Polymerase Chain Reaction. En Maloy, S., Hughes, K. (eds). Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2a ed. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4>
10. Chan, L., Lowes, S. y Hirst, B. (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 21(1), 25-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.07.003>
11. Contreras, C., *et al.* (2016). Heterogenous Distribution of MTHFR Gene Variant among Mestizos and Diverse Amerindian Groups from Mexico. Plos One, 11(9), e0163248. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163248>
12. Dabrik, A. *et al.* (2016). Gel Electrophoresis. En Ciborowsky, P. y Silberring, J. (2a Ed), Proteomic Profiling and Analytical Chemistry. doi: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-01616-1>
13. El Hajj Chehadeh, *et al.* (2016). Relationship between MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and complications of type 2 diabetes mellitus in an Emirati population. Meta Gene, 9, 70-75. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.04.002>

14. Elkins, K.M. (2015) Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. En Basu C. (eds) PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology, vol 1275. Humana Press, New York, NY. doi: https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-4939-2365-6_2
15. El-Khodary, *et al.* (2012) Study of the pharmacokinetic and pharmacogenetic contribution to the toxicity of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol*, 29(3), 2053-2062. doi: <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9997-6>
16. Favela-Mendoza, A., *et al.* (2018). Genetic variability among Mexican Mestizo and Amerindian populations based on three ABCB1 polymorphisms. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2525-2533. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4419-x>
17. Feinsilber, D., *et al.* (2018). Evaluation, Identification, and Management of Acute Methotrexate Toxicity in High-dose Methotrexate Administration in Hematologic Malignancies. *Cureus*, 10(1), e2040. doi: [10.7759/cureus.2040](https://doi.org/10.7759/cureus.2040)
18. Fitarelli-Kiehl, M., *et al.* (2016). Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p-R337H in TP53. *Genetics and molecular biology*, 39 (2), 203-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2014-0351>
19. Forrester, J., *et al.* (2016). Genetics. En Forrester, J., *et al.* (4a Ed), *The eye: Basic Sciences in Practice*. doi: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07682-X>
20. Froese, D., *et al.* (2018). Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nature communications*. 9(1). 2261. doi: [10.1038/s41467-018-04735-2](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04735-2)
21. Gaudet, M., *et al.* (2009). Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. En Komar, A. (ed) *Single Nucleotide Polymorphisms. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 578. Human Press, Totowa, NJ. doi: [2443/10.1007/978-1-60327-411-1_26](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_26)
22. Germer, *et al.* (2014). Spectrophotometry. En Germer, T., Zwinkels, J. y Tsai, B. (Vol 46), *Experimental Methods in the Physical Sciences*. Recuperado en: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/experimental-methods-in-the-physical-sciences/vol/46/suppl/C>
23. Goicoechea, C. (2016). Farmacología del metotrexato. *Reumatología clínica*, 11(1), 3-7. Recuperado de: <http://www.reumatologiaclinica.org/>.
24. González-Mercado, *et al.* (2017). MTRR A66G, RFC1 G80A, and MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and Disease Activity in Mexicans with Rheumatoid Arthritis Treated with Methotrexate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(11), 698-704. doi: [10.1089/gtmb.2017.0124](https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0124)
25. González, M., *et al.* (2014). Homocisteína, polimorfismos MTHFR C677T, A1298C y variables clínico-bioquímicas en población mexicana. *Acta Bioquímica Clín Latinoam*, 48(1), 23-31. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53531786004>
26. Goyette, P., *et al.* (1995). Seven Novel Mutations in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Genotype/Phenotype Correlations in Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Am. J. Hum. Genet*, 56, 1052-1059. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1801446/pdf/ajhg00031-0041.pdf>
27. Gutiérrez-Álvarez, O., *et al.* (2016). Involvement of MTHFR and TPMT genes in susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Mexicans. *Drug Metabol Pers Ther*. doi: DOI 10.1515/dmpt-2015-0036

28. Hang, G. (2011). Direct detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease vol 69, 51-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.021>
29. Heather, J. y Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics Volume 107, Issue 1, January 2016, Pages 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
30. Howard, S., *et al.* (2016). Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. The Oncologist, 21(12), 1471-1482. DOI: [10.1634/theoncologist.2015-0164](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0164)
31. Iguada, J., *et al.* (2016). Metotrexato: toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. Rev Clin Med Fam, 9(3), 159-166. Recuperado de: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1699-695X2016000300005
32. Imanishi, H., *et al.* 2007. Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. J Hum Genet, 52(1), 166-171. doi: 10.1007/s10038-006-0096-z
33. Jonge, R., *et al.* (2005). Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Blood journal, 106(2), 717-720. Recuperado de: www.bloodjournal.org
34. Kaluzna, E. *et al.* (2015). Functional Variants of gene coding folate metabolizing enzyme and methotrexate-related toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. European Journal of Pharmacology, 769(1), 93-99. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.058>
35. Kamei, K., *et al.* (2014). A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. Journal of Medical Microbiology, 63, 659-666. doi: [10.1099/jmm.0.071498-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.071498-0)
36. Krajcinovic, M., *et al.* (2004). Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 103(1), 252-257. doi: [10.1182/blood-2003-06-1794](https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1794)
37. Leveque, D., *et al.* (2017). Clinical pharmacokinetics of methotrexate in oncology. Int. J. Pharmacokinet, 2(2), 137-147. doi: 10.4155/ipk-2016-0022.
38. Levien, M., *et al.* (2009). Capítulo 10. Principios de la Quimioterapia. En Singh, A., Pe'er, J., Perry, J., Damato, B., Linn, A. (Ed.), Oncología Clínica Oftálmica (25-27). doi: [10.1016/B978-84-8086-369-8.50010-9](https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-369-8.50010-9)
39. Liew, S. y Das, E. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. European Journal of Medical Genetics, 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.10.004>
40. Lightfoot, *et al.* (2005). Risk of Non-Hodgkin Lymphoma Associated with polymorphisms in Folate-Metabolizing Genes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14(12), 2999-3003. Recuperado de: cebp.aacrjournals.org
41. Lina, L. y Tabak, N. (2012). Farmacogenómica en la práctica clínica. Médica Clínica Las Condes, 20(5), 616-624. doi: [10.1016/S0716-8640\(12\)70356-5](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70356-5)
42. Mahmoud, L., *et al.* (2018). Use of MTHFR C677T polymorphism and plasma pharmacokinetics to predict methotrexate toxicity in patients with acute lymphoblastic leukemia. Adv. Clin Exp Med, 27(8). DOI: 10.17219/acem/69802

43. McBride, A., *et al.* (2012). Suspected Methotrexate Toxicity From Omeprazole: A case review of carboxypeptidase G2 use in a Methotrexate-Experienced patient with Methotrexate toxicity and a review of the literature. *Journal of Pharmacy Practice*, 25(4), 477-485. DOI: [10.1177/0897190012442717](https://doi.org/10.1177/0897190012442717).
44. McElhinney, L., *et al.* (2014). Chapter Sixteen-Sanger Sequencing of Lyssaviruses. En Rupprecht, C. y Nagarajan, T. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00016-0>
45. Mena, J., *et al.* (2008). Farmacogenómica del metotrexate: estrategia para una terapéutica más individualizada en pacientes con artritis reumatoide. *Gac Méd Méx* , 144(5), 448-451. Recuperado de: https://www.anmm.org.mx/GMM/2008/n5/77_vol_144_n5.pdf
46. Mikkelsen, T., *et al.* (2011). PharmGKB summary: Methotrexate pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 21(10), 679-686. doi: [10.1097/FPC.0b013e328343dd93](https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328343dd93)
47. Nasiri, H., *et al.* (2005). Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction From Whole Blood Using Laundry Detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19 (1), 229-232. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcla.20083>
48. Ota, M., *et al.* (2009) Restriction Enzyme Analysis of PCR Products. En: Komar A. (eds) *Single Nucleotide Polymorphisms. Methods in Molecular Biology™ (Methods and Protocols)*, vol 578. , 405-414. doi: [10.1007/978-1-60327-411-1_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_25)
49. Pacchigar, K., *et al.* (2016). DNA quantification. En Patel, M. y Tiwari, K. *ICAR Sponsored summer school on Allele mining in crops: Methods and Utility*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/318744511_DNA_QUANTIFICATION/citation/download
50. Pierna, Ma., *et al.* (2018). Farmacogenómica: La medicina personalizada. *Laboratorio Clínico*, 12(3), 147-154. DOI: [10.1016/j.labcli.2018.07.004](https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.07.004)
51. Pingoud, A., *et al.* (1993). Restriction enzymes. En Burrell M. (ed) *Enzymes of Molecular Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 16. Human Press. doi: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1385/0-89603-234-5:107>.
52. Plaza-Plaza, J., *et al.* (2012). Pharmacogenetic Polymorphisms Contributing to Toxicity Induced by Methotrexate in the Southern Spanish Population with Rheumatoid Arthritis. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 16(11), 589-595. doi: [10.1089/omi.2011.0142](https://doi.org/10.1089/omi.2011.0142)
53. Puig, L. (2014). Methotrexate: New Therapeutic Approaches. *Actas dermosiligráficas*, 105(6), 583-589. DOI: [10.1016/j.adengl.2014.05.011](https://doi.org/10.1016/j.adengl.2014.05.011)
54. Qu, J., *et al.* (2017). Presence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism MTHFR C677T in molar tissue but not maternal blood predicts failure of metotrexate treatment for low.risk gestacional trophoblastic neoplasia. *European Journal of Pharmacology*, 794(1), 85-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.010>
55. Restrepo, L., *et al.* (2016). Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide. Revisión sistemática. *Revista Colombiana de Reumatología*. 23(2), 102-114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.02.002>
56. Ríos, E., *et al.* (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4), 56-64. doi: [10.15174/au.2016.1078](https://doi.org/10.15174/au.2016.1078)

57. Sandhu, A. *et al.* (2018). Do SNPs in folate pharmacokinetic pathway alter levels of intracellular methotrexate polyglutamates and affect response? A prospective study in Indian patients. *Clin Rheumatol*, 37(12), 3221-3228. doi: 10.1007/s10067-018-4206-z
58. SantaLucia J. (2007) Physical Principles and Visual-OMP Software for Optimal PCR Design. En Yuryev A. (eds) PCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*, vol 402. Humana Press. doi: https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-1-59745-528-2_1
59. Schirru, E., *et al.* (2007). Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *European journal of Clinical nutrition*, 61, 1220-1225. doi: [10.1038/sj.ejcn.1602638](https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602638)
60. Shao, W., *et al.* (2017). Association Between MTHFR C677T polymorphism and Methotrexate Treatment Outcome in Rheumatoid Arthritis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(5), 275-285. doi: 10.1089/gtmb.2016.0326
61. Sharafi, H., *et al.* (2012). Development and Validations of a Simple, Rapid and Inexpensive PCR-RFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response. *Hepat Mon*. 12(3), 190-195. doi: [10.5812/hepatmon.849](https://doi.org/10.5812/hepatmon.849)
62. Sluss, P. y Hayes, F. (2017). Laboratory techniques for recognition of endocrine Disorders. En Melmed, S., Larsen, P., Polonsky, K. y Kronenberg, H. (13a Ed), *Williams Textbook of Endocrinology*. doi: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15980-6>
63. Solanki, G. (2012). Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2(3), 98-102. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/271729269>
64. Sorof, M. y Qi Cheng. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. En Poltronieri, P. y Hong Y. (1 Ed), *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. doi: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02129-6>
65. Squire, L. R. y Twyman, R.M (2009). Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. En L.R. Squire. *Encyclopedia of neuroscience* (pp 871-875). Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/allele-specific-oligonucleotide>
66. Stellwagen, N. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Wiley InterScience*, 30(1), S188-S195. doi: 10.1002/elps.200900052
67. Thirumurugan, R., *et al.* (2015). Molecular analysis of rpoB gene mutations in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates by multiple allele specific polymerase chain reaction in Puducherry, South India. *Journal of Infection and Public Health* vol 8, 619-625. doi: [2443/10.1016/j.jiph.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.05.003)
68. Tournay, J. y Ngwenya. (2010). The effect of ionic strength on the electrophoretic mobility and protonation constants of an EPS-producing bacterial strain. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348(2) 348-354. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.082>
69. Trimmer, E. (2012). Methylenetetrahydrofolate Reductase: Biochemical Characterization and Medical Significance. *Current pharmaceutical design*. DOI:10.2174/1381612811319140008
70. Ullah, I., *et al.* (2019). Detection of rifampicin resistance of Mycobacterium tuberculosis using multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) in Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution*, 71(1), 42-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.007>

71. van Pelt-Verkuil E. y te Witt R. (2019) Principles of PCR. En van Pelt-Verkuil E., van Leeuwen W., te Witt R. (eds) Molecular Diagnostics. Springer, Singapore. doi: https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-981-13-1604-3_5
72. Velasco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, 3(1), 14-18. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117966>
73. Wang, J. y Sanjay, S. (2017). Testing Departure from Hardy-Weinberg proportions. En Elston, R. (ed). Statistical Human Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. vol 1666. Human press. doi:10.1007/978-1-4939-7274-6_6.
74. Xie, L., Guo, W., Yang, Y., Ji, T., Xu, J. (2018). More severe toxicity of genetic polymorphisms on MTHFR activity in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate. Oncotarget 2017 Dec 14;9(14):11465-11476. doi: 10.18632/oncotarget.23222.
75. Yadav, U., Kumar, P., & Rai, V. (2016). Role of MTHFR A1298C gene polymorphism in the etiology of prostate cancer: A systematic review and updated meta-analysis. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 17(2), 141-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2015.06.005>
76. Yu, K., *et al.* (2019). Polymerase Chain Reaction. En Trost, J. (1a Ed), Companion and Complementary Diagnostics. doi: <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04933-1>

ANEXO I

Método de Covarrubias Modificado

1. Añadir 2ml de amortiguador TTS, resuspender y centrifugar por 6 minutos a 1500 rpm. Desechar el sobrenadante.
2. Repetir de dos a tres veces el paso anterior, hasta obtener un botón limpio.
3. Agregar 1ml de amortiguador TTS y agitar para resuspender. Transferir todo el contenido del tubo Falcon a un tubo de 1.5ml previamente identificado.
4. Centrifugar a 4 rpm durante 2 minutos a 4°C y desechar sobrenadante.
5. Al botón limpio agregar 570µL de NaCl 5mM. Agitar durante 2 minutos y colocar 30µL de SDS al 10%. Agitar durante 5 minutos y agregar 200µL de NaCl saturado. Agitar durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 600µL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), mezclar suavemente durante 10 minutos, centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
7. Tomar la fase superior y pasarla a un tubo Eppendorf de 1.5ml. Agregar el doble del volumen de etanol absoluto frío para precipitar el DNA con agitación suave.
8. Centrifugar a 11 000 rpm por 10 minutos a 4°C y decantar sin perder el botón.
9. Agregar 500µL de etanol al 70% frío, resuspender el botón y centrifugar a 11 000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Decantar (Repetir este paso una vez más).
10. Secar el botón de DNA en la incubadora a 37°C con el tubo abierto para eliminar el etanol residual.
11. Resuspender el DNA con 100 µL agua inyectable e incubar a 37°C durante 15-20 minutos para solubilizar.
(Nasiri *et al*, 2005).

ANEXO II

Tabla 14. Cantidades de los componentes para reacción de PCR del polimorfismo C677T.

Master Mix (μL)		Oligonucleótido Forward (μL)	Oligonucleótido Reverse (μL)	DNA (μL)
Takara Omnimix HS	4	0.18	0.19	1
Promega	8.3	0.18	0.19	1

Tabla 15. Cantidades de componentes para digestión con enzima HinfI para polimorfismo C677T.

RE 10X Buffer (μL)	BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (μL)	Producto PCR	Enzima HinfI 10U/ μL
2	0.2	2	0.5

En las tablas anteriores se presentan las cantidades requeridas para la reacción de PCR de 10 μL y digestión con enzima de 20 μL para el polimorfismo C677T de acuerdo a las concentraciones referidas en la tabla 11.

Tabla 16. Cantidades de componentes para reacción de PCR del polimorfismo A1298C.

Master Mix (μL)		Oligonucleótidos Externos		Oligonucleótidos Internos		DNA (μL)
		Forward (μL)	Reverse (μL)	Forward (μL)	Reverse (μL)	
Takara Omnimix HS	4	0.26	0.35	0.5	0.4	1
Promega	8.33	0.26	0.35	0.5	0.4	1

En la tabla anterior se presentan las cantidades requeridas para una reacción de PCR para la genotipificación del polimorfismo A1298C de acuerdo a las concentraciones referidas en la tabla 12.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Departamento de Ciencias Biológicas
Sección de Bioquímica y Farmacología Humana
Farmacogenómica

Evaluación de las metodologías propuestas para la genotipificación de los Polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* relacionados con el metabolismo del metotrexato.

Por medio de la presente se le invita a participar en la Evaluación de las metodologías propuestas para la genotipificación de los Polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* relacionados con el metabolismo del metotrexato.

Introducción

La genotipificación es el proceso mediante el cual se obtiene el genotipo, entendiéndose por genotipo al conjunto de genes de un individuo expresados en su ADN, el cual se encuentra en todas las células con núcleo del ser humano (ej. Glóbulos blancos, células epiteliales de la mucosa bucal, células de las fibras musculares, folículos pilosos, etc), su análisis permite conocer el material genético que un individuo ha heredado de sus padres biológicos.

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) participa en la vía del ácido fólico y está asociada al metabolismo del metotrexato, un quimioterapéutico, es decir, un fármaco usado en terapias anticancerígenas.

Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de ADN que pueden o no estar relacionados a alteraciones en la función de una enzima. Estudios recientes en los polimorfismos relacionados a la enzima *MTHFR* han analizado la posible asociación con la variación en la eficacia y toxicidad al tratamiento con metotrexato.

Objetivo

Se desea usar las muestras de DNA del grupo de Farmacogenética para genotipificar el gen *MTHFR* e identificar los polimorfismos C677T y A1298C, con el fin de evaluar las metodologías propuestas.

Procedimiento

Solicitar permiso para el uso de la muestra de DNA ya extraída durante la práctica No. 5 "Estudio del polimorfismo del CYP2D6" de la clase de Farmacogenómica grupo 1001 del semestre 2019-II, que actualmente se encuentra en el banco de muestras de Farmacogenómica y que fue utilizada, codificada y almacenada en la práctica ya mencionada para su uso en la genotipificación del alelo 4 de CYP2D6, será utilizada en la genotipificación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* para evaluar dicho protocolo de investigación.