

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO CON CUMARINAS DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: **Paula Sanchón Sánchez**

TUTOR: Dr. Luis A. Tortajada Genaro

*Curso Académico: 2016-2017*

**VALENCIA, JULIO 2017**



**TÍTULO:** Genotipado de polimorfismos de un único nucleótido relacionados con el tratamiento con curmarinas de enfermedades cardiovasculares.

**AUTORA:** Dña. Paula Sanchón Sánchez

**TUTOR:** Prof. D. Luis A. Tortajada Genaro

**FECHA:** Valencia, Julio 2017

## RESUMEN

El acenocumarol ((RS)-4-hidroxi-3-[1-(4-nitrofenil)-3-oxobutil]cromen-2-ona) es un anticoagulante de la familia de las cumarinas comercializado como Sintrom. Su mecanismo de acción se basa en actuar como antagonista de la vitamina K, siendo su diana la enzima VKORC1. Este fármaco se administra en numerosos pacientes con problemas cardiovasculares. Sin embargo, existe una amplia variabilidad interindividual en la respuesta, por lo que el ajuste de la dosis es crítico para evitar episodios tromboembólicos o hemorragias. Dado que existen estudios farmacogenéticos que han demostrado la asociación con ciertas variaciones genéticas, es posible administrar una terapia más personalizada, mejorando la eficacia del tratamiento y reduciendo el daño generado por dosis incorrectas.

El presente TFG está enfocado en apoyar el desarrollo de un dispositivo innovador y de altas prestaciones que permita el genotipado de polimorfismos de un único nucleótido relacionados con la farmacodinámica y farmacocinética del acenocumarol. La información obtenida permitirá administrar un tratamiento de acuerdo a la subpoblación alélica determinada. Las tareas de investigación se centran en la puesta a punto de dos estrategias alelo específicas para determinar la variante polimórfica rs9923231 del gen *VKORC1*, evaluando el efecto que posee el origen del tejido analizado en el ensayo.

La recogida de muestras se realizó mediante métodos no invasivos y sencillos (epitelio bucal y cabello). La extracción de ADN genómico, en ambos casos, presentó unos rendimientos promedio adecuados (70 ng/ $\mu$ L y 14 ng/ $\mu$ L, respectivamente), así como buenos valores de pureza ( $A_{260/280} \geq 1,80$ ). La amplificación de la región diana y del gen endógeno mostró que no había diferencias significativas entre el ADN genómico de ambos orígenes. Respecto al método de discriminación entre subpoblaciones alélicas, la primera aproximación consistió en la amplificación utilizando cebadores alelo específicos tipo ARMS y posterior detección mediante técnicas de fluorescencia, electroforesis e hibridación. Particularmente, la detección basada en un ensayo de hibridación con sondas inmovilizadas en un chip, fue la estrategia que presentó mejor selectividad, discriminando el alelo nativo y mutante. Los resultados obtenidos en la asignación de los genotipos se correlacionaron totalmente con los resultados obtenidos mediante la técnica de referencia (secuenciación Sanger). La segunda aproximación consistió en la ligación alelo específica combinada con amplificación universal. Se han logrado avanzar en la generación de controles positivos y negativos y en el estudio del efecto que poseen las condiciones experimentales en el resultado del ensayo. Aunque la perfecta discriminación de las subpoblaciones no se ha logrado, los resultados muestran el potencial de esta estrategia. En conclusión, ambas aproximaciones de genotipado estudiadas son prometedoras para su integración en un dispositivo transferible a un laboratorio clínico.

## PALABRAS CLAVE

Farmacogenética, genotipado SNP, acenocumarol, anticoagulante, técnicas alelo específicas.

**ABSTRACT**

Acenocoumarol ((RS) -4-hydroxy-3- [1- (4-nitrophenyl) -3-oxobutyl] chromen-2-one) is a coumarin anticoagulant and commercialized as Sintrom. Its mechanism of action is based on vitamin K antagonism, its target is the enzyme VKORC1. It is administered to many patients with cardiovascular problems. However, the drug response has high interindividual variability, so dose adjustment is critical to avoid thromboembolic events or bleeding. Since there are several pharmacogenetic studies that have shown the important role played by genetic variations in acenocoumarol dose requirements, it is possible to use a more personalized that would be more efficient and less harming than the administration of inadequate doses.

This bachelor thesis is focused on supporting the development of an innovative and high performance device that allows for the genotyping of single nucleotide polymorphisms related to the pharmacodynamics and pharmacokinetics of acenocoumarol. The achieved information will allow administering treatment for the specific allelic subpopulation. Research activities concentrate on the development of two allele-specific strategies to determine the polymorphic variant rs9923231 of *VKORC1* gene, evaluating the effect on the origin of the tissue examined in the assay.

Samples were collected using non-invasive and simple methods (buccal epithelium and hair). Genomic DNA extraction, in both cases, showed adequate average yields (70 ng/ $\mu$ L and 14 ng/ $\mu$ L, respectively) as well as good purity values ( $A_{260/280} \geq 1,80$ ). Amplification of the target region and the endogenous gene showed that there were no significant differences between the genomic DNA of both origins. In relation to the method of discrimination among allelic subpopulations, the first approach consisted of amplification using ARMS allele-specific primers and subsequent detection techniques like fluorescence measurement, agarose electrophoresis and hybridization. Particularly, the detection based on a hybridization assay with immobilized probes on a chip, was the strategy that presented better selectivity, discriminating the wild-type allele and mutant. The results obtained in genotypes' assignment were totally correlated with the results obtained by reference technique (Sanger sequencing). The second approach was based on allele-specific ligation combined with universal amplification. Ligation's progress has been made in the generation of positive and negative controls and in the studies on the effect of the experimental conditions on assay results. Although perfect discrimination of subpopulations has not been achieved, the results show the potential of this strategy. In conclusion, both studied approaches of genotyping are promising for their integration into a device transferable to a clinical laboratory.

**KEY WORDS**

Pharmacogenetics, SNP genotyping, acenocoumarol, anticoagulant, allele discrimination strategies.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de alguna forma han estado detrás de este trabajo y durante esta etapa.

A Ángel Maquieira por permitir que realice mi Trabajo Final de Grado en el Departamento de Química y en el grupo que lidera. Mención especial a mi tutor Luis, por todo el tiempo invertido en este trabajo, por sus consejos y transmitirme la importancia de dedicarte a aquello que te apasiona.

A todo el grupo de investigación, por acogerme desde el primer día como una más, por el trato agradable y hacerme partícipe de su buen ambiente. A Eric, por ser guía fundamental y enseñarme sus buenos quehaceres, siempre acompañados de una sonrisa, ánimos y confianza en que los experimentos llegasen a buen puerto. A mis compañeras Irene y Blanca, por los ánimos mutuos y por todos los buenos ratos que hemos compartido durante estos meses en el laboratorio. También a Ana y Sara por estar siempre pendientes de nosotras y de que todo fuera bien.

A mi familia, mamá, papá y mi hermano, por darme raíces y dejar que me crezcan las alas. Por enseñarme y demostrarme que, con esfuerzo y perseverancia, es posible alcanzar las metas que uno mismo se marca. En definitiva, por vuestro apoyo y amor incondicional. GRACIAS.

A mis amigos, por siempre estar “ahí” a pesar de la distancia, por saber ser la mejor vía de escape, por celebrar todos nuestros éxitos; ya que las alegrías compartidas, son más alegrías.

Por último, agradecer a mis amigas también Biotecnólogas, por haber compartido este camino, no siempre cuesta abajo, pero sí gratificante. Gracias por hacerlo ameno, complementarnos y encontrar el equilibrio, incluso en las épocas más difíciles.

**ÍNDICE**

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Medicina personalizada.....	1
1.2.	Farmacogenética.....	1
1.3.	Acenocumarol .....	2
1.4.	SNPs relacionados con acenocumarol.....	4
1.5.	Problemas en la práctica clínica .....	5
1.6.	Herramientas para el genotipado de SNPs .....	6
1.6.1.	Estrategias de discriminación de alelos.....	7
1.6.2.	Tecnologías actuales de genotipado .....	8
1.7.	Tecnologías alternativas para el genotipado de SNPs.....	9
1.7.1.	Necesidades.....	9
1.7.2.	Retos científico-técnicos .....	10
2.	OBJETIVOS .....	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1.	Recogida de muestras.....	12
3.2.	Extracción de ADN genómico .....	12
3.3.	Diseño de oligonucleótidos .....	12
3.4.	Amplificación genérica .....	13
3.5.	Secuenciación Sanger.....	13
3.6.	Amplificación alelo específica: PCR-ASA .....	14
3.7.	Ligación alelo específica.....	14
3.8.	Detección de productos alelo específicos.....	15
3.8.1.	Fluorescencia .....	15
3.8.2.	Electroforesis en gel de agarosa.....	15
3.8.3.	Ensayo de hibridación .....	15
3.9.	Análisis estadístico .....	16
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
4.1.	Extracción de ADN de muestras biológicas.....	17
4.2.	Secuenciación Sanger.....	18
4.2.1.	Descripción.....	18
4.2.2.	Generación de productos para la región en estudio del gen VKORC1 y caracterización.....	18
4.2.3.	Genotipado de individuos.....	19
4.3.	Amplificación alelo específica: PCR-ASA .....	21
4.3.1.	Descripción.....	21
4.3.2.	Puesta a punto del método PCR-ASA con cebadores convencionales.....	21
4.3.3.	Puesta a punto del método PCR-ASA con cebadores ARMS .....	25

4.3.4.	Detección de los productos mediante ensayo de hibridación: Descripción.....	26
4.3.5.	Genotipado de individuos.....	28
4.3.5.1.	Detección mediante fluorescencia.....	28
4.3.5.2.	Detección mediante electroforesis.....	29
4.3.5.3.	Detección mediante ensayo de hibridación .....	29
4.4.	Ligación alelo específica combinada con amplificación genérica .....	31
4.4.1.	Descripción.....	31
4.4.2.	Generación de controles para la amplificación .....	32
4.4.3.	Generación de controles para la ligación .....	33
4.4.4.	Puesta a punto el ensayo.....	34
4.5.	Comparación métodos .....	36
5.	CONCLUSIONES .....	37
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	38
7.	ANEXO .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica para la asignación de la dosis de tratamiento. A) Medicina convencional. B) Medicina personalizada.....	1
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de acenocumarol (RS)-4-hidroxi-3-[1-(4-nitrofenil)-3-oxobutil]cromen-2-ona). Fuente: Figura adaptada de PharmGKB. ....	3
<b>Figura 3.</b> Factores genéticos y no genéticos (edad, sexo, dieta, índice de masa corporal) que afectan a la determinación de la dosis de warfarina. <i>CYP2C9</i> : citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9. <i>VKORC1</i> : complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1. <i>GGCX</i> : Gamma-glutamil carboxilasa. <i>CYP4F2</i> : citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2. Fuente: Figura adaptada de referencia [17].....	3
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción anticoagulante de los fármacos orales cumarínicos. <i>VKORC1</i> : complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1. <i>CYP2C9</i> : citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9. <i>GGCX</i> : gamma-glutamil carboxilasa. $\gamma$ -Glu: gamma-carboxilación de los residuos de ácido glutámico (Glu). ....	4
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de los cuatro posibles métodos de discriminación de alelos. A) Extensión del cebador con cebadores normales y con cebadores alelo específicos. B) Hibridación. C) Ligación. D) Escisión enzimática.....	7
<b>Figura 6.</b> Influencia del tejido de extracción de ADN genómico y detección de los productos post-amplificación del gen <i>ACTB</i> (gen humano beta actina) utilizado como control endógeno. Se evaluó para muestras de dos individuos y un control negativo de amplificación NTC (sin ADN molde). Número de réplicas: 3. ....	17
<b>Figura 7.</b> Esquema de secuenciación por el método de Sanger. Fuente: Cultek [34]. ....	18
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa 3% para los productos resultantes de la amplificación. A) Marcador molecular. B) Producto de amplificación a partir de ADN genómico humano. C) Control negativo de amplificación sin ADN molde (NTC) y control negativo de amplificación (ADN genómico de <i>Salmonella Typhimurium</i> ), respectivamente. ....	19
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos amplificados y purificados mediante columna rellenas de gel de sílice. 1. Marcador molecular. 2. Muestras procedentes de individuos. 3. Muestra sin ADN molde (NTC). ....	19
<b>Figura 10.</b> Electroferograma obtenido en secuenciación Sanger para el gen <i>VKORC1</i> , indicando la posición del SNP rs9923231. A) Individuo con genotipo homocigoto nativo. B) Individuo con genotipo homocigoto mutante. C) Individuo con genotipo heterocigoto.....	20
<b>Figura 11.</b> Esquema de la amplificación alelo específica (PCR-ASA). (A) Individuo homocigoto nativo. (B) Individuo homocigoto mutante. SNP: polimorfismo de un único nucleótido. FP: cebador directo. RP: cebador reverso. ....	21
<b>Figura 12.</b> Efecto de la cantidad de ciclos en la amplificación específica de alelo en dos individuos con distinto genotipo. Número de copias iniciales: 1333.....	22
<b>Figura 13.</b> Efecto de la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) en la fluorescencia post-amplificación PCR-ASA para el SNP rs9923231. A) Individuo homocigoto nativo. B) Individuo homocigoto mutante.....	22
<b>Figura 14.</b> Señal de fluorescencia neta del producto resultante de la amplificación específica de alelo (para los tres posibles genotipos) con dos tipos de cebadores diferentes: convencionales y ARMS. (*) Prueba-t para comparar medias entre los dos cebadores alelo específicos de un mismo tipo, valor-P < 0,05. La hipótesis nula establece que los cebadores no poseen capacidad discriminante. Número de réplicas: 3.....	23
<b>Figura 15.</b> Imágenes del gel de agarosa 3% de los productos PCR-ASA con cebadores convencionales, indicando la banda correspondiente al producto específico. Cada muestra ocupa dos carriles pues corresponden a la amplificación con cebador nativo (alelo C) y mutante (alelo T) respectivamente. A) Marcador molecular. B) Productos post-amplificación alelo específica para el SNP rs9923231 con cebadores convencionales. 1. Muestra de individuo con genotipo homocigoto mutante. 2. Muestra de individuo heterocigoto. 3. Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC).....	24

**Figura 16.** Influencia del reactivo betaína 0,75 M en la señal de fluorescencia del producto generado mediante PCR-ASA a partir de ADN genómico. Betaína -: amplificación alelo específica sin betaína. Betaína +: amplificación alelo específica en presencia de betaína. .... 24

**Figura 17.** Electroforesis de los productos procedentes de PCR-ASA con betaína 0,75 M como reactivo. A) Marcador molecular. B) Muestra de individuo homocigoto nativo. C) Muestra de individuo heterocigoto. D) Muestra de individuo homocigoto mutante. E) Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC). C: alelo nativo del SNP rs9923231. T: alelo mutante del SNP rs9923231..... 25

**Figura 18.** Secuencia flanqueante al SNP rs9923231 y secuencias de los dos cebadores directos ARMS. Se indica la falta de complementariedad en un nucleótido del extremo 3' (rojo) y la base complementaria a la variante alélica en cada caso (azul)..... 25

**Figura 19.** Influencia del tejido de procedencia del ADN genómico en el resultado obtenido con PCR-ASA utilizando cebadores ARMS. Número de réplicas: 3. (\*) valor-P < 0,05. .... 26

**Figura 20.** Esquema general del ensayo de hibridación, donde 1: estreptavidina; 2: etiqueta de biotina de la sonda [A] sonda nativa B) sonda mutante]; 3: digoxigenina (DIG); 4: anticuerpo primario de oveja anti-DIG; 5: anticuerpo secundario de conejo anti-oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP); 6: sustrato enzimático colorimétrico TMB; 7: precipitado azul generado con HRP..... 27

**Figura 21.** Representación de los valores de la relación señal/ruido (SNR) neta promedio tras la hibridación de los productos PCR-ASA con ARMS. Calculada como la diferencia de SNR promedio de la muestra frente a SNR promedio del control negativo de amplificación correspondiente. (\*) valor-P < 0,05. Número de réplicas de las sondas: 4. Número de réplicas de la muestra: 3 ..... 28

**Figura 22.** Imágenes del gel de agarosa 3% de los productos PCR-ASA con cebadores ARMS, indicando la banda correspondiente al producto específico. Cada muestra ocupa dos carriles pues corresponden a la amplificación con cebador nativo (alelo C) y mutante (alelo T) respectivamente A) Marcador molecular. B) Muestra con genotipo homocigoto nativo. C) Muestra con genotipo heterocigoto. D) Muestra con genotipo homocigoto mutante. E) Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC). .... 29

**Figura 23.** Imagen de un disco resultante para ensayo PCR-ASA con cebadores ARMS para el análisis simultáneo de 36 muestras, incluyendo el esquema de impresión de cada micromatriz (5x4). 1. Sonda para cebador universal nativo. 2. Sonda para cebador universal mutante. 3. Sonda para *CYP2C9*\*2. 4. Sonda para *CYP2C9*\*3. 5. Sonda para *ACTB*..... 30

**Figura 24.** Resultados obtenidos mediante el ensayo de hibridación. A) Imagen resultante de la micromatriz para un genotipo heterocigoto, observándose señal en la sonda nativa (1) y sonda mutante (2). Ratio de la relación señal/ruido (SNR) neta promedio obtenida tras la comparación de las señales para la sonda nativa y mutante, de los productos de amplificación con cebadores ARMS. Se asignó el genotipo en función de éste. Las líneas discontinuas representan el factor de discriminación superior e inferior escogido. Homocigoto nativo: ratio SNR neta promedio  $\geq 0,33$ . Heterocigoto:  $-0,33 \leq$  ratio SNR neta promedio  $< 0,33$ . Homocigoto mutante: ratio SNR neta promedio  $\leq - 0,33$ . .... 30

**Figura 25.** Esquema de la reacción de ligación alelo específica y amplificación universal. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho. 1. Reacción nativa. 2. Reacción mutante. P: grupo fosfato. A) Desnaturalización ADN doble cadena. B) Hibridación de oligonucleótidos correspondientes. C) Ligación alelo específica. D) Amplificación universal. .... 32

**Figura 26.** Efecto de la dilución del producto de ligación, para un volumen final de 30  $\mu$ L, utilizando el oligonucleótido de ligación izquierdo (LPO) con 25 nucleótidos de la región de hibridación con ADN molde. La línea discontinua representa la señal registrada para el control negativo de ligación de todo el proceso, sin ADN molde (NTC). (\*) Valor-P < 0,05. Número de réplicas: 3. .... 34

**Figura 27.** Resultados de la detección post-ligación y amplificación universal tanto para la mezcla de reacción mutante, como para la mezcla de reacción nativa. Se hizo el ensayo para los tres genotipos posibles y los controles previamente generados. A) Fluorescencia. La línea discontinua representa la señal registrada para el control negativo de ligación de todo el proceso,



sin ADN molde (NTC). B) Electroforesis en gel de agarosa 3%. C: alelo nativo. T: alelo mutante.  
 1. Marcador molecular. 2. Genotipo homocigoto nativo. 3. Genotipo heterocigoto. 4. Genotipo homocigoto mutante. 5. Control negativo de todo el proceso (NTC). ..... 35

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Información sobre las variantes farmacogenéticas más importantes para los anticoagulantes orales cumarínicos. Los alelos corresponden a la hebra de ADN positiva (+). Fuente: PharmGKB. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Dosis diaria recomendada de warfarina en mg, basada en los genotipos de <i>VKORC1</i> y <i>CYP2C9</i> . La variante usada de <i>VKORC1</i> fue rs923231 (-1639G>A). Fuente: FDA. ....	6
<b>Tabla 3.</b> Principales características de las plataformas de genotipado comerciales de alto rendimiento empleadas en los estudios de asociación (GWAS). ....	9
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de cebadores alelo específicos (modalidad convencional y ARMS) empleados en la reacción de PCR-ASA. El último nucleótido (azul) es el específico de cada variante alélica del SNP. El penúltimo nucleótido (rojo) es el que carece de complementariedad con la secuencia diana. ....	14
<b>Tabla 5.</b> Secuencias de oligonucleótidos empleados en el método basado en la ligación. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho. El último nucleótido (azul) es el específico de cada variante alélica del SNP. [P]: grupo fosfato para permitir la unión con el nucleótido anterior del LPO. DIG: Digoxigenina.....	15
<b>Tabla 6.</b> Secuencias de las sondas utilizadas en la hibridación. [BtnTg]: etiqueta de biotina. T <sub>10</sub> : cola de 10 timinas. <i>ACTB</i> : control endógeno.....	16
<b>Tabla 7.</b> Análisis espectrofotométrico de las distintas muestras y su relación con el tejido de procedencia. ....	17
<b>Tabla 8.</b> Resultados (fluorescencia y electroforesis) obtenidos de la generación de los controles de amplificación. Significación estadística tras la realización de una prueba-t de cada control con muestra sin ADN (NTC). Valor $P < 0,05$ . Intensidad neta (u.a.) de la banda electroforética obtenida mediante <i>GenePix</i> . ....	33
<b>Tabla 9.</b> Resultados (fluorescencia y electroforesis) post-ligación de los controles de ligación. Significación estadística entre cada control y control negativo de todo el proceso, muestra sin ADN molde (NTC). Valor $P < 0,05$ . Intensidad (u.a.) de la banda electroforética obtenida mediante <i>GenePix</i> . ....	34
<b>Tabla 10.</b> Variables estudiadas en el ensayo de ligación alelo específica. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho. ....	35
<b>Tabla 11.</b> Propiedades de los métodos estudiados. ....	36

**ABREVIATURAS**

%GC: porcentaje guanina/citosina

ACTB: beta actina

ARMS: *Amplification Refractory Mutation System*, sistema de mutación resistente a la amplificación

cSNP: polimorfismo de un nucleótido en la región codificante.

CYP2C9: citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9

CYP4F2: citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2.

dbSNP: *database of single nucleotide polymorphisms*, base de datos de SNPs

DIG: digoxigenina

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

dUTP: 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato

FDA: *Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos

FP: *forward primer*, cebador directo

GGCX: Gamma-glutamyl carboxilasa

GWAS: estudios de asociación del genoma completo

HRP: *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante

LPO: *left probe oligonucleotide*, oligonucleótido izquierdo de ligación

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, amplificación de la sonda dependiente de una ligación múltiple

NGS: secuenciación de nueva generación

NTC: *no template control*, control negativo sin ADN molde

pb: pares de bases

PBS: phosphate buffered saline, tampón fosfato salino

PBS-T: tampón fosfato salino con Tween 20

PCR: *polymerase chain reaction*, amplificación en cadena de la polimerasa

PCR-ASA: amplificación alelo específica

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

RP: *reverse primer*, cebador reverso

RPO: *right probe oligonucleotide*, oligonucleótido derecho de ligación

SNP: *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de un único nucleótido

SNR: *signal to noise ratio*, relación señal/ruido

T<sub>a</sub>: *Annealing temperature*, temperatura de alineamiento o anillamiento

TE: Tris-EDTA

T<sub>m</sub>: Temperatura de *melting* o de fusión

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

UV-Vis: ultravioleta-visible

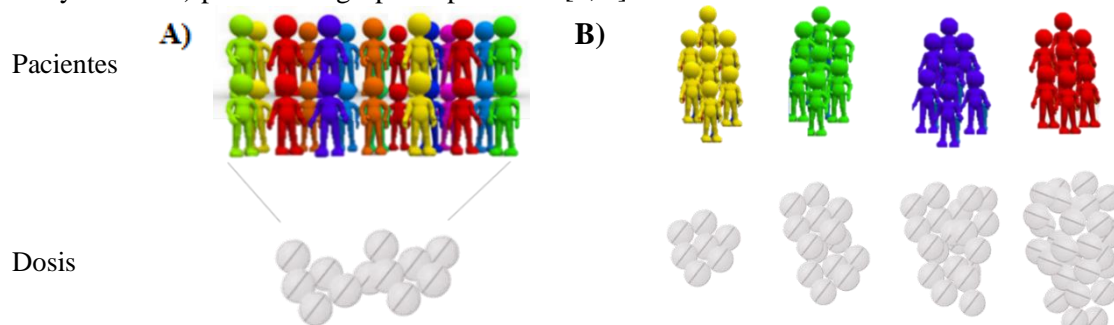
VKORC1: complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Medicina personalizada

La medicina personalizada es un ámbito de la medicina que ha ganado importancia en los últimos años, especialmente desde la secuenciación del Genoma Humano [1]. Tradicionalmente, la medicina se ha fundamentado en datos procedentes de grandes ensayos clínicos y que establecen un tratamiento estándar para todas las personas diagnosticadas con la misma enfermedad. Sin embargo, la medicina personalizada es aquella que basa sus evidencias en los ensayos clínicos y factores específicos de cada individuo (edad, sexo, estilo de vida, historial de salud familiar, enfermedades y fármacos concomitantes) (Figura 1). El término se ha extendido al uso de la información genética para la determinación de un tratamiento óptimo (tipo de fármaco, dosis y duración) para un subgrupo de pacientes [2, 3].



**Figura 1.** Representación gráfica para la asignación de la dosis de tratamiento. A) Medicina convencional. B) Medicina personalizada.

Es una terapia dirigida, es decir, se determina el tratamiento en base a las dianas moleculares que presenta cada individuo, no el conjunto poblacional [2]. Además, este conocimiento molecular permite mejorar las estrategias preventivas y comenzar la administración de fármacos en los primeros estadios de la patología [1].

La medicina personalizada o de precisión ha sido posible gracias a los avances en la secuenciación, proteómica, metabolómica, epigenómica. Ha tenido repercusión en enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades inflamatorias [3]. Ésta logra la reducción de los efectos secundarios (en algunos casos irreversibles), y presenta otras ventajas como la eficiencia y precisión [2].

La importancia de esta disciplina se manifiesta con el aumento de los estudios relacionados con la respuesta a fármacos en función de su perfil genético [4]. Se estudia cómo los agentes químicos interactúan con los receptores del organismo (farmacodinámica) y cómo actúa el organismo vivo sobre los agentes químicos, es decir, cómo lo procesa (farmacocinética) [5].

## 1.2. Farmacogenética

El término “farmacogenética” fue acuñado por primera vez en 1959 por el genetista alemán Friedrich Vogel, pero un par de años antes, en 1957, Arno *Motulsky* estableció las primeras relaciones farmacogenéticas: cambios genéticos conducen a variaciones metabólicas. Ha ido tomando importancia como disciplina para el diagnóstico y, en consecuencia, para poder determinar la respuesta farmacocinética y/o farmacodinámica de fármacos en diversas patologías que afectan al ser humano [6].

El auge de la farmacogenética es relativamente reciente, desde el descubrimiento de que el 0,1% de la secuencia del genoma humano es polimórfica. Por tanto, cierta variedad interindividual frente al tratamiento se explica por alteraciones en la secuencia [7]. Si esta variación se puede medir y constituye un indicador de un proceso biológico normal, patogénico o de respuesta farmacológica, se denomina biomarcador (*National Institutes of Health Biomarkers Definitions*

*Working Group*, 1998). Los biomarcadores son fundamentales para la medicina personalizada, pues están relacionados con el diagnóstico y pronóstico. Hay diversos tipos, incluyendo polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), secuencias cortas repetidas en tándem (STRs), deleciones, inserciones u otras variaciones en la secuencia de ADN [3].

Se denomina SNP, *single nucleotide polymorphism*, a una variante de una única base nucleotídica con una localización específica en el genoma. Esta variante para que se considere SNP tiene que presentar una frecuencia  $> 1\%$  entre los individuos de la población. Los SNPs son las variaciones genéticas más frecuentes en el genoma humano (1 SNP cada 1000 pb). Actualmente hay una gran cantidad de SNPs descubiertos, aproximadamente 150 millones de SNPs del genoma humano, cuyas características se encuentran disponibles en la base de datos pública del NCBI (dbSNP).

Se pueden diferenciar dos tipos de SNPs, los que se encuentran en regiones codificantes (cSNPs) y no codificantes; y ambos son objetivo de la farmacogenética. La mayoría son los que se encuentran en las regiones no codificantes, y no alteran proteínas; con menor frecuencia son cSNPs, alterando la estructura y función de la proteína codificada, pudiendo desarrollar una enfermedad o desencadenar un cambio en la respuesta a fármacos o toxinas ambientales [8].

Aportan información para concretar el tratamiento, especialmente en aquellos fármacos que presentan heterogeneidad en la respuesta interindividual, con el fin de lograr su efectividad, en base a la seguridad del individuo. Junto con los SNPs individuales, también es conveniente estudiar los haplotipos representativos de las poblaciones europea, africana y asiática, recogidos a través de HapMap. [9, 10].

Por lo tanto, la farmacogenética es la disciplina que relaciona la genética y la farmacología, pues aplica los resultados obtenidos de los análisis de las variaciones genéticas en la ayuda para la selección del tratamiento en una enfermedad [5]. El genotipo tiene un impacto en la eficacia de los fármacos, seguridad y potencialmente en la práctica clínica.

La farmacogenética ha destacado en la determinación de la dosis de ciertos fármacos relacionados con enfermedades cardiovasculares y trombosis como warfarina, aspirina, estatinas, entre otros [11]. Esto es debido a que hay una amplia variedad interindividual en la respuesta al fármaco, y por tanto, sin información genética, no se determina la dosis correctamente. También destaca en la determinación de la dosis necesaria y evaluación de la posible toxicidad de antidepresivos, antipsicóticos y fármacos para el dolor [5].

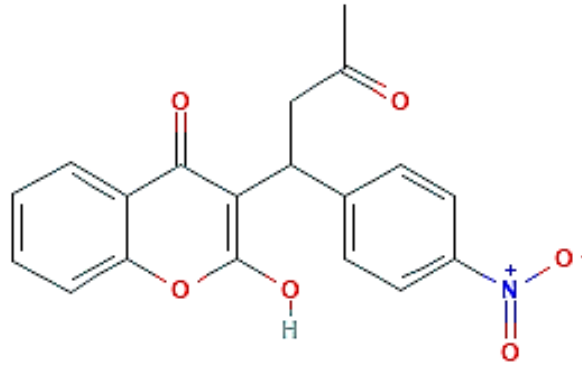
Desde 2007, hay una serie de fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) entre los que se encuentra la warfarina, que proporcionan información farmacogenética en su etiqueta. Esto ha supuesto un avance para la implementación en clínica de la farmacogenética, pues aumenta la difusión y conciencia social [2].

Por tanto, el creciente interés por estas variantes radica en el avance en paralelo de la medicina personalizada, y en consecuencia, la gran demanda de tratamiento personalizado [8]. Aunque todavía existen ciertas limitaciones (costes, duración de los ensayos...) impidiendo su implantación en clínica hasta el momento [2].

### **1.3. Acenocumarol**

Los anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K, más empleados son los fármacos provenientes de la cumarina como la warfarina y el acenocumarol. Aunque su mecanismo de acción y estructura son semejantes, presentan diferencias en sus características y el uso de uno u otro está determinado por su distribución geográfica. Warfarina es el principal anticoagulante en Reino Unido y América, mientras que acenocumarol en el resto de Europa, y Latinoamérica. También hay otros como el fenprocoumon y la fenindiona, que no se comercializan en España [12, 13].

El acenocumarol ((*RS*)-4-hidroxi-3-[1-(4-nitrofenil)-3-oxobutil]cromen-2-ona) (Figura 2) es un fármaco oral anticoagulante, siendo el principio activo del medicamento comercializado como Sintrom. Se utiliza para el tratamiento y la profilaxis de las afecciones tromboembólicas [14]. A pesar de ser una mezcla racémica de ambos enantiómeros ópticos *R*-acenocumarol y *S*-acenocumarol, éste último es el enantiómero más potente [15]. La fórmula química es  $C_{19}H_{15}NO_6$  y tiene una masa molecular media de 353,3255. En el 98,7 % de los casos se encuentra unida a proteína, principalmente a albúmina. Tiene una vida media de 8 a 11 horas. Posteriormente es metabolizado por el hígado y se excreta por la orina en forma de metabolitos inactivados [16].

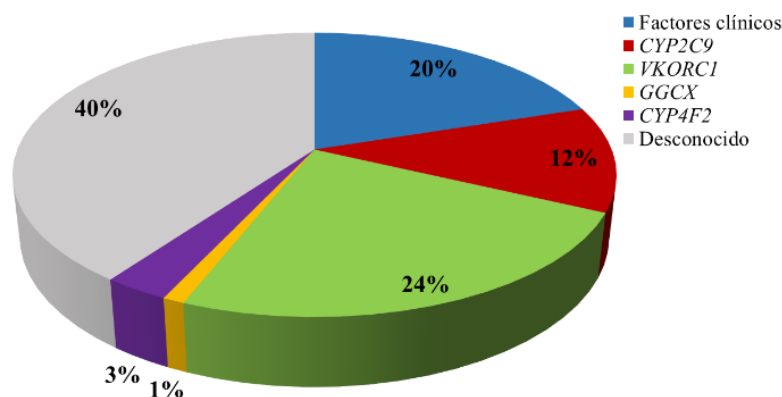


**Figura 2.** Estructura molecular de acenocumarol ((*RS*)-4-hidroxi-3-[1-(4-nitrofenil)-3-oxobutil]cromen-2-ona). Fuente: Figura adaptada de PharmGKB.

Los estudios farmacológicos han demostrado que a pesar de ser uno de los fármacos más efectivos para prevenir los fenómenos tromboembólicos, presenta una estrecha ventana terapéutica. Por tanto, su eficacia está ligada a lograr y mantener esa ventana [11]. Junto con éste, otro desafío es determinar la dosis con precisión de manera individualizada, pues la dosis necesaria para lograr una anticoagulación óptima, presenta una gran variedad interindividual y puede variar a lo largo del tratamiento, como consecuencia, hay una amplia gradación de efectos secundarios asociados a ésta, como tromboembolismo y hemorragia [8].

En la selección de la dosis influyen factores clínicos como la edad, el sexo, peso, dieta; pero también factores genéticos (Figura 3). Actualmente, para determinar la dosis se utilizan algoritmos, pero sólo tienen en cuenta los criterios clínicos [17]. Sin embargo, hay dos algoritmos disponibles en warfarindosing.org, procedentes de estudios con una gran cohorte de pacientes, que estiman la dosis teniendo en cuenta los factores clínicos y el genotipo para dichos genes.

Debido al alto riesgo de estos fármacos, se requiere clasificar los pacientes en distintos subgrupos, para así determinar la dosis terapéutica en función del genotipo.



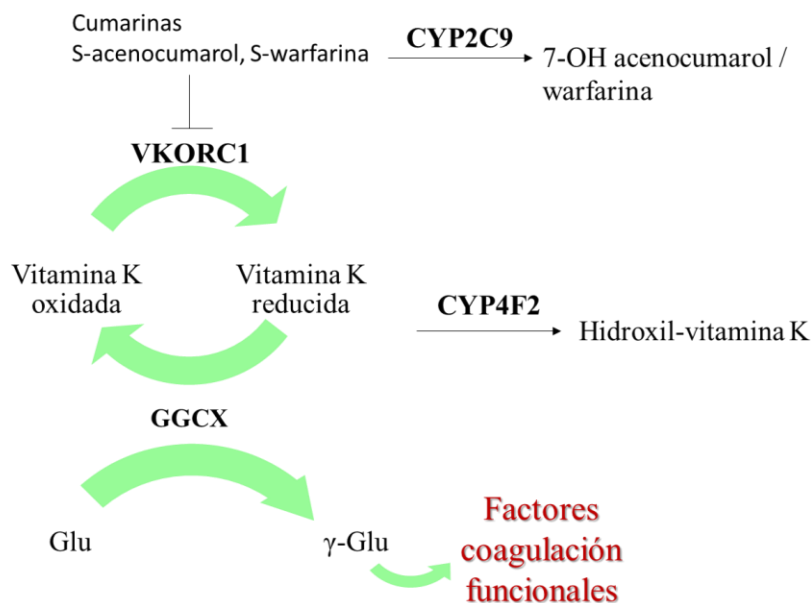
**Figura 3.** Factores genéticos y no genéticos (edad, sexo, dieta, índice de masa corporal) que afectan a la determinación de la dosis de warfarina. *CYP2C9*: citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9. *VKORC1*: complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1. *GGCX*: Gamma-glutamil carboxilasa. *CYP4F2*: citocromo P450, familia 4, subfamilia F, polipéptido 2. Fuente: Figura adaptada de referencia [17].

#### 1.4. SNPs relacionados con acenocumarol

Los estudios farmacogenéticos han determinado que las variantes genéticas de *VKORC1* y *CYP2C9*, explican del 10-45% de la variación interindividual en la dosis de warfarina, dependiendo de la población de estudio y los genotipos detectados [18].

El gen *VKORC1* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p11.2) y el gen *CYP2C9* está situado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23.33). Sus variantes influyen en la variabilidad entre individuos, ya que están directamente relacionados con la farmacocinética y farmacodinámica de estos anticoagulantes.

El acenocumarol, inhibe la enzima codificada por *VKORC1*, complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1. Así disminuye la vitamina K en forma reducida disponible para la síntesis de factores activos de la coagulación II, VII, IX y X y de la proteína C y S. Dado que la vitamina K en forma reducida actúa como cofactor de la enzima GGCX (gamma-glutamil carboxilasa) en la gamma-carboxilación de los residuos de ácido glutámico de estos factores. Sin la carboxilación de estos residuos, no se producirá la activación de estos factores para que sean funcionales, disminuyendo la formación de trombina y la unión a fibrina, reduciendo así los coágulos y no se producirá la coagulación (Figura 4). Mientras que el gen *CYP2C9* codifica para el citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9 enzima principal del metabolismo de cumarínicos (S-acenocumarol, S-warfarina) [14, 16]. Por tanto, variantes genéticas en *VKORC1* (gen que codifica a la enzima diana) y *CYP2C9* (gen que codifica a la enzima de fase I del metabolismo de fármacos) están asociadas al aumento de la sensibilidad a estos fármacos. Otros genes, como *CYP4F2* y *GGCX*, que intervienen en la ruta metabólica de la vitamina K, también están involucrados en la determinación de la dosis [17].



**Figura 4.** Mecanismo de acción anticoagulante de los fármacos orales cumarínicos. *VKORC1*: complejo vitamina K epóxido reductasa subunidad 1. *CYP2C9*: citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 9. *GGCX*: gamma-glutamil carboxilasa.  $\gamma$ -Glu: gamma-carboxilación de los residuos de ácido glutámico (Glu).

La variante rs9923231 del gen *VKORC1* (Tabla 1), se localiza en la región promotora, se trata de una sustitución en la posición 1639 del nucleótido guanina por adenina en la cadena negativa (-1639G>A). Está asociada con la dosis de acenocumarol y el fenprocoumon, y con la sensibilidad a warfarina [19]. Dado que está en la región promotora, no supone cambio aminoacídico. Los pacientes con el alelo A presentan menor función de la enzima codificada, por tanto, se necesita menos anticoagulante para inhibir su función; mientras que los que presentan el alelo G, presentan mayor función de la enzima, y, por tanto, necesitarán dosis mayores de acenocumarol [13, 14].

Por otra parte, las variantes *CYP2C9*\*2 (rs1799853) y *CYP2C9*\*3 (rs1057910) del gen *CYP2C9* (Tabla 1), no sinónimas, son las principales en la población europea. Estas variantes presentan una frecuencia en la población del 17% y 6% respectivamente, provocando una disminución de la actividad enzimática del citocromo y, por tanto, relacionadas con la dosis de anticoagulante [20]. Aunque se han identificado 25 variantes alélicas diferentes, no todas suponen cambios en la respuesta farmacodinámica del anticoagulante [18].

El polimorfismo *CYP2C9*\*2 supone un cambio en la posición 430 de citosina por timina (430C>T), que se traduce en una sustitución del aminoácido arginina por cisteína en la posición 144 (R144C). Esta alteración produce una disminución del metabolismo de anticoagulante e incrementa el riesgo de hemorragia. Por otra parte, el polimorfismo *CYP2C9*\*3, se trata de un cambio nucleotídico de adenina por citosina en la posición 1075 (1075A>C), lo que conlleva una sustitución del aminoácido isoleucina por leucina en la posición 359 (I359L), provocando el mismo efecto que en la variante anterior [21]. Los pacientes con estas variantes, presentan una disminución de la capacidad de aclaramiento de S-acenocumarol, necesitando dosis más bajas de Sintrom [14].

Actualmente, existen ensayos clínicos a gran escala y multicéntricos, tanto para warfarina como acenocumarol, donde se evalúa la seguridad y eficacia de determinar la dosis de esta manera [22, 23]. Pero anteriormente, se han realizado ensayos clínicos que justificasen dicha relación con certeza.

**Tabla 1.** Información sobre las variantes farmacogenéticas más importantes para los anticoagulantes orales cumarínicos. Los alelos corresponden a la hebra de ADN positiva (+). Fuente: PharmGKB.

<i>Variante</i>	<i>Gen</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Alelos</i>	<i>Función</i>	<i>Nivel de evidencia</i>
rs9923231	<i>VKORC1</i>	warfarina acenocumarol fenprocoumon	C > A C > T C > G	SNP	1A
<i>CYP2C9</i> *2 (rs1799853)	<i>CYP2C9</i>	warfarina acenocumarol	C > T	SNP	1A
<i>CYP2C9</i> *3 (rs1057910)	<i>CYP2C9</i>	warfarina acenocumarol	A > C	SNP	1A

1A. Es el nivel de evidencia más alto determinado por la guía farmacogenética del *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*.

## 1.5. Problemas en la práctica clínica

Tras la identificación del marcador molecular, el siguiente paso es extrapolarlo a la práctica clínica pues es el fin último, y esto es lo que se denomina investigación traslacional. La investigación traslacional aprovecha los biomarcadores identificados para ver su efecto en el mecanismo fisiopatológico y en las alteraciones de éste, cómo afectará a la manifestación fenotípica, y por tanto, a la aplicación clínica. Por lo tanto, antes de su implementación en la práctica rutinaria se debe comprobar su validez clínica [9].

Posteriormente, se procede al desarrollo de algoritmos clínicos. Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad, existen dos algoritmos de dosificación farmacogenética basados en los genotipos del polimorfismo rs9923231 de *VKORC1*, *CYP2C9*\*2, *CYP2C9*\*3. Estos algoritmos, recomiendan la dosis de warfarina para pacientes adultos y pediátricos, diferenciando entre ascendencia africana y no africana, en función de los genotipos. Sin embargo, a pesar de estimar mejor la dosis que las etiquetas con la información farmacogenética, aprobadas por la FDA (Tabla 2) [24]; no tienen en cuenta los genotipos de *CYP4F2*, *CYP2C9*\*5, *CYP2C9*\*6, *CYP2C9*\*8, *CYP2C9*\*11 o rs1277823 [25].



**Tabla 2.** Dosis diaria recomendada de warfarina en mg, basada en los genotipos de *VKORC1* y *CYP2C9*. La variante usada de *VKORC1* fue rs923231 (-1639G>A). Fuente: FDA.

<i>VKORC1</i>	<i>CYP2C9</i>					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0,5-2
AG	5-7	3-4	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2
AA	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2

Estos algoritmos además de estar en continua revisión, también hay estudios para la creación de algoritmos basados en la farmacogenética de acenocumarol [26].

A pesar de estos avances, hay retos que vencer, especialmente en el traslado a la práctica clínica, pues hay que optimizar muy bien las estrategias de genotipado que se van a usar, dado que los recursos sanitarios y económicos de un país son limitados [11].

Una vez desarrollado el algoritmo clínico, es necesario el empleo de herramientas de genotipado que proporcionen la información necesaria a aportar al algoritmo, y ahí existe un freno en la medicina traslacional.

La principal limitación de la implantación farmacogenómica en la práctica clínica se relaciona con el no uso rutinario de los test genéticos, pues para el genotipado de pacientes debe considerarse su rentabilidad [27]. En caso que se apliquen, el tiempo de repuesta de los ensayos es inviable, pues la duración en el laboratorio es de días a semanas. Por tanto, con el fin de resolver este problema, se desarrollaron las estrategias de bajo coste “*point-of-care testing*” que se aplica en clínica por el propio paciente o personal no especializado en técnicas de laboratorio y “*preemptive testing*” en centros médicos concretos y guardando la información del genotipo en sistemas informáticos. Inicialmente se crearon para el ámbito cardiovascular, pero se extendió con el fin de conseguir el uso generalizado [4].

Otra limitación de las estrategias farmacogenéticas que se proponen aplicar en clínica es el grado de impacto poblacional. Es decir, si solo van a beneficiar a los individuos con mayor riesgo no serán rentables, pues sólo será una pequeña parte de la población. Por otra parte, existe también una limitación económica, ya que los controles rutinarios de los pacientes con esta medicación, incrementarán los costes del sistema sanitario [11]. Además de las limitaciones técnicas y económicas, otras serían la falta de conocimientos necesarios sobre farmacogenética, en el personal del ámbito sanitario, así como la dificultad para interpretar los resultados obtenidos [2].

Aunque se ha demostrado la asociación entre los polimorfismos de los genes *CYP2C9* y *VKORC1* y manifestaciones clínicas como el sangrado y es la evidencia más clara de la importancia de un test genético; hay una gran controversia en la que involucradas diversas instituciones [11]. A pesar de esto, se fundó el servicio de farmacogenética de la warfarina en *University of Illinois Hospital y Health Sciences System Office of the Vice President for Health Affairs* [17].

Por todos estos inconvenientes, en la práctica clínica actual, en la mayoría de los servicios sanitarios no se apoya el hecho de pedir un test farmacogenético antes de empezar con el tratamiento [18]. Una alternativa, ante la imposibilidad actual de aplicar la farmacogenética en la práctica clínica, es el uso de anticoagulantes orales diana específicos [17]. Otra es proporcionar servicio de genotipado para definir una característica fenotípica, como es la dosificación del fármaco y que, a su vez, presenten una buena relación coste-efectividad, es decir, que sean rentables [5].

## 1.6. Herramientas para el genotipado de SNPs

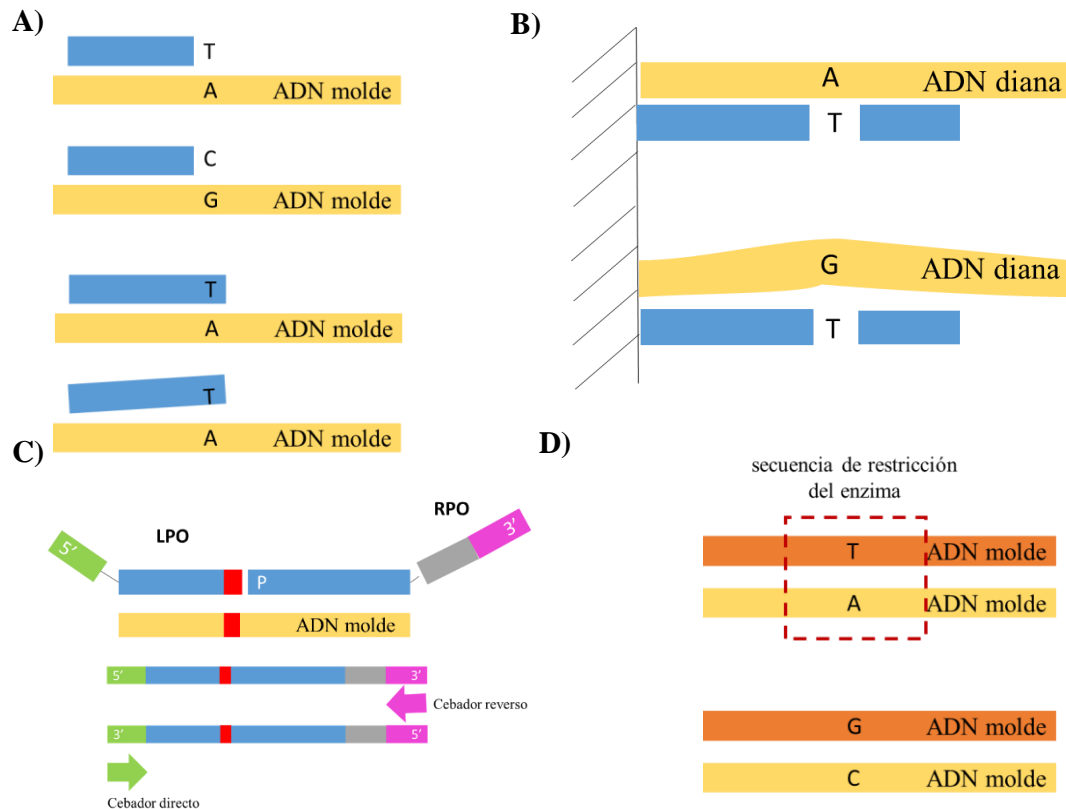
El progreso de la medicina personalizada está ligado a los avances en las tecnologías de genotipado. Han permitido el genotipado de SNPs, identificando así a nivel individual la variabilidad genética implicada. En los últimos años, han sido numerosos los esfuerzos para

desarrollar herramientas rápidas, efectivas, económicas y con un alto rendimiento para el genotipado de SNPs con distintas finalidades [8].

Hay varios factores, que condicionan la elección de esta plataforma, entre ellos, la cantidad de muestras (densidad de SNPs a analizar), el tipo de SNPs (cSNPs o SNPs génicos) [10].

### 1.6.1. Estrategias de discriminación de alelos

La determinación del genotipo de un SNP concreto implica generar productos alelo específicos. Para ello existen cuatro posibles métodos: extensión del cebador, hibridación, ligación y escisión enzimática (Figura 5) [8].



**Figura 5.** Esquema representativo de los cuatro posibles métodos de discriminación de alelos. A) Extensión del cebador con cebadores normales y con cebadores alelo específicos. B) Hibridación. C) Ligación. D) Escisión enzimática.

**Extensión del cebador.** Se basa en la incorporación de nucleótidos complementarios a continuación del cebador, función de un ADN molde y una enzima, tras la hibridación del cebador y formación del complejo cebador-ADN molde. Se pueden utilizar tanto cebadores comunes para ambos alelos como cebadores alelo específico. El empleo de los cebadores alelo específicos se fundamenta en la reacción de amplificación alelo específica (PCR-ASA). En ésta, la amplificación de ADN genómico utiliza cebadores directos específicos, mientras que el cebador reverso es común para ambos alelos.

**Estrategia de hibridación.** Se fundamenta en la estabilidad de la doble hebra de ADN a cierta temperatura. En función de esto, se determina si ha habido una complementariedad perfecta o no, cuando se forma el complejo sonda-ADN diana. Es la aproximación fundamental en la que se basan las estrategias de genotipado de alto rendimiento como los microarrays; aunque su efectividad depende de factores como la longitud y secuencia de la sonda, la posición del SNP en la sonda y las condiciones de trabajo.

**Ligación.** Se apoya en la especificidad de la enzima ligasa empleada para determinar el alelo. Junto a la ligasa, se emplean dos oligonucleótidos izquierdos (LPO) que incluyen en el extremo 3' el nucleótido discriminante, y en 5' una cola común; y un oligonucleótido derecho (RPO) común a ambas variantes del polimorfismo. La secuencia de RPO empieza en la base siguiente al SNP y presenta en 5' un grupo fosfato y en 3' otra cola. Estas colas son complementarias a los cebadores universales que se emplearán en una posterior amplificación. Mediante esta estrategia se puede discriminar el genotipo del SNP, porque solo el LPO específico de alelo que sea complementario en la totalidad de su secuencia, se unirá de manera estable al ADN molde, y la ligasa lo unirá con el RPO común al SNP, formando un único oligonucleótido.

**Escisión enzimática.** Se basa en la especificidad de los enzimas de restricción, para la identificación de la secuencia de reconocimiento en ADN molde de doble cadena. Esta aproximación es el fundamento de la estrategia de detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Para eso, el SNP a determinar debe estar dentro de la secuencia de reconocimiento del enzima, tras la amplificación del producto se incubaba con el enzima de restricción correspondiente y los fragmentos generados se corren en un gel.

### ***1.6.2. Tecnologías actuales de genotipado***

En los últimos años, ha habido un incremento de los avances tecnológicos para el genotipado de SNPs, pues en general ha aumentado el interés por los tests de diagnóstico basados en ADN. Esto ha desencadenado el desarrollo de una gran variedad de plataformas de genotipado a gran escala (*high throughput technologies*) para estudios de asociación del genoma completo (GWAS) que permiten analizar  $10^5$ - $10^6$  SNPs, mientras que las que se utilizan para los estudios de validación y búsqueda de genes candidatos, son plataformas de  $1$ - $10^5$  SNPs. Todas ellas permiten análisis rápidos, son robustos y presentan buena relación coste-efectividad [10]. El desarrollo de estas tecnologías ha sido posible gracias a la puesta a punto de los cuatro métodos anteriores y métodos de detección como MALDI-TOF y la detección fluorescente.

Tras un análisis bibliográfico, se ha elaborado una comparación de las plataformas de genotipado disponibles a nivel comercial, basadas en los distintos métodos alelo específicos y utilizadas para GWAS (Tabla 3). Aunque cabe destacar que actualmente, se utilizan menos debido al auge de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS).

**Tabla 3.** Principales características de las plataformas de genotipado comerciales de alto rendimiento empleadas en los estudios de asociación (GWAS).

<i>Método</i>	<i>Tecnología</i>	<i>Empresa</i>	<i>Comentario</i>
Hibridación	Infinium Beadchips	Illumina	Mayor capacidad de SNP por reacción Precisión > 99,9%
	GeneChip Human	Affymetrix	Pass rate > 95 % Precisión > 99%
	Perlegen's Genotyping Method	Perlegen Sciences	Gran número de SNPs a analizar. Interroga SNP por la hebra directa y reversa Pass rate > 90%
	Molecular Inversion Probes (MIP)	Affymetrix	Replicación y validación de SNPs Precisión > 99% Pass rates > 98%
Extensión de cebador	MassARRAY iPLEX Platform	Sequenom	Replicación y validación de SNPs SNPs elegidos por usuario Detección por MALDI-TOF
	SNPstream	Beckman Coulter	Precisión > 99% Pass rate > 98%
Hibridación	Centaurus Assay	Nanogen	Replicación y validación de SNPs Oligonucleótidos marcados con fluoróforo en 3'
Ligación + PCR	SNPlex	Applied Biosystems	Replicación y validación de SNPs Precisión > 99%
Ligación + extensión de cebador	Goldengate	Illumina	Replicación y validación de SNPs Análisis gran escala Precisión > 99% Pass rate > 99%
5' exonucleasa (escisión enzimática)	TaqMan Assay	Applied Biosystems	Replicación y validación de SNPs PCR a tiempo real

## 1.7. Tecnologías alternativas para el genotipado de SNPs

### 1.7.1. Necesidades

Las tecnologías anteriormente mencionadas son para el genotipado de miles de SNPs y gran cantidad de muestras, es decir, a gran escala.

Generalmente los elevados costes y tiempo de análisis de estas plataformas de alto rendimiento no son la principal limitación en análisis exploratorio. Sin embargo, factores como relación coste-efectividad, rendimiento y precisión son críticos en la selección de las técnicas de genotipado en la práctica clínica.

Por tanto, son necesarias mejoras en las técnicas ya existentes o la aparición de nuevas tecnologías alternativas, para análisis amplio y rutinario de los SNPs diana, siempre que sean adecuadas desde el punto de vista económico y con tiempos eficientes [8].

El genotipado de SNPs asociados con la dosis a fármacos necesita herramientas de menor rendimiento, pues la cantidad de polimorfismos a analizar por muestra serán pocos. Además, interesará que los resultados generados, a diferencia de las de alto rendimiento, puedan ser interpretadas por personal del ámbito sanitario, sin que necesiten ser unos expertos en la materia. Finalmente, deben presentar un tiempo de respuesta reducido (coherente con la actividad rutinaria) que sean rentables y permitan recuperar la inversión realizada.

Por estos motivos, los dispositivos de genotipado efectivos y de bajo coste, como herramienta para el trabajo rutinario, que puedan ser utilizadas en cualquier laboratorio pequeño, son necesarias [27, 28].

Pero los ensayos alternativos deben ser sensibles, pues tienen que ser capaces de detectar bajas concentraciones de ADN diana, y selectivos, minimizando cualquier interacción no específica a la variación deseada.

### **1.7.2. Retos científico-técnicos**

Una estrategia dirigida a solventar estas necesidades, es el desarrollo de dispositivos de detección de polimorfismos que se fundamentan en la reacción selectiva entre la molécula de ADN diana y un elemento de reconocimiento. La puesta a punto de estas estrategias incluye el estudio desde la obtención de la muestra hasta la detección. Por ejemplo, los biosensores y los microchips de ADN, son una alternativa actual muy eficiente, ya que realizan los análisis de manera continua, rápida, sensible, selectiva, multigénicos y pueden ser reutilizables [29].

Hay una serie de retos científico-técnicos a abordar, siendo los iniciales la intención de este trabajo. El primero será la recogida de muestras biológicas de varios individuos mediante métodos mínimamente invasivos, que a diferencia de los utilizados en la actualidad, causan menos molestias en el individuo, no necesitan un procesamiento adicional y la manipulación es más sencilla. Se evaluará la calidad del ADN genómico extraído, con el fin de establecer la idoneidad de estos métodos. A continuación, este ADN es el que se usará en los ensayos alelo específicos en estudio, los cuales permitirán asignar la variante alélica correspondiente en cada caso. Estos ensayos serán la base de una plataforma multiSNP que permita el genotipado de todas aquellas variantes relacionadas con los fármacos anticoagulantes derivados de la cumarina. Esta plataforma irá acompañada de un sistema de detección sensible, selectivo, económico y con alta capacidad de trabajo con el que cuenta experiencia el grupo de investigación.

Por tanto, el conocimiento disponible [28, 30, 31] junto con el obtenido en el presente trabajo, constituirá una sólida base teórico-práctica, marcando las líneas de investigación futuras del propio grupo. Debido a que el objetivo final es la creación de un nuevo dispositivo útil en la práctica clínica rutinaria, basado en ensayos multigénicos que proporcionen información farmacogenética personalizada; ya que en la actualidad falta extrapolar esta información existente, al ámbito sanitario.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo del presente Trabajo Final de Grado es evaluar distintas estrategias de genotipado del polimorfismo de un único nucleótido rs9923231, localizado en el gen *VKORC1*, que codifica una enzima relacionada con el metabolismo de la vitamina K. Se pretenden estudiar metodologías sencillas, económicas, robustas y sensibles que puedan ser integradas en dispositivos de diagnóstico innovadores de altas prestaciones. Estas investigaciones permitirán el desarrollo de protocolos de actuación, basados en la información farmacogenética, que apoyen la administración personalizada del fármaco anticoagulante acenocumarol en la práctica clínica rutinaria.

Con el fin de lograr éste, los objetivos parciales propuestos son:

1. Estudio de la extracción de ADN genómico de diferentes tejidos obtenidos de forma no invasiva (epitelio bucal y cabello).
2. Puesta a punto de dos técnicas alelo específicas capaces de discriminar las variantes del SNP: amplificación alelo específica y ligación alelo específica combinada con amplificación universal.
3. Validación de la asignación de los genotipos (homocigoto nativo, heterocigoto y homocigoto mutante) frente una técnica de referencia (secuenciación Sanger).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado en el contexto del proyecto MINECO CTQ2013-45875-R.

#### 3.1. Recogida de muestras

Se obtuvieron muestras biológicas de epitelio bucal y de cabello procedentes de diferentes individuos voluntarios. El procedimiento se realizó según las directrices de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM) (1964) - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Las muestras de epitelio bucal se recogieron mediante hisopos estériles invasivos (DELTALAB, España) frotando durante 1 min el interior de la mejilla, tras enjuague bucal con agua, correspondiendo a una cantidad de 80 mg de tejido epitelial. Para recoger las muestras de cabello, se cortaron pelos de 2 cm de longitud hasta una cantidad de 5 mg.

#### 3.2. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN de epitelio bucal, se utilizó el kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Estados Unidos). Brevemente, se realizó un lisado celular (sumergiendo el hisopo en 500  $\mu$ L de tampón fosfato salino (PBS 1x filtrado, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4), 20  $\mu$ L de Proteinasa K, 20  $\mu$ L de ARNasa A. Se dejó 2 min a temperatura ambiente y se añadieron 540  $\mu$ L del tampón de lisis/unión (*PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer*). Tras incubación a 55 °C durante 20 min, se añadieron 500  $\mu$ L de etanol 96%. Se transfirió el lisado a columnas de centrifugación (*PureLink Spin Column*), para la purificación y separación del ADN. Se centrifugó a 10000 g durante 1 min y tras descartar el sobrenadante, se hicieron dos lavados y posteriores centrifugaciones a 10000 g, 1 min; con 400  $\mu$ L de los tampones de lavado correspondientes (*Wash Buffer 1* y *Wash Buffer 2*). Finalmente, se hicieron dos eluciones con 25  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,6 (38 mM Trizima base y 11 mM de Clorhidrato de trizima), con las correspondientes incubaciones a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugaciones a máxima velocidad, 90 s; recogiendo el ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras de cabello, se utilizó el mismo kit, pero el procedimiento de lisado celular fue distinto. Se adicionaron 180  $\mu$ L del tampón de digestión (*PureLink Genomic Digestion Buffer*) y 20  $\mu$ L de Proteinasa K a las muestras, dejando éstas completamente sumergidas. A continuación, se hizo una incubación a 55 °C probando tres condiciones diferentes (2 h, 4 h y *overnight*), para lograr el lisado celular. Se centrifugó durante 3 min a máxima velocidad y tras obtener el lisado y eliminar los restos sólidos de la muestra, se adicionaron 20  $\mu$ L de ARNasa A. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se añadieron 200  $\mu$ L de *PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer* y 200  $\mu$ L de etanol 96%. A continuación, se realizó la separación de ADN con columnas spin y la elución de la misma manera que con las muestras de ADN de epitelio bucal.

En ambos casos, se cuantificó la concentración de ADN obtenidos mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Cada muestra se midió tres veces (réplicas instrumentales). Además, se estimó la pureza obteniendo la relación 260/280 nm.

#### 3.3. Diseño de oligonucleótidos

Las técnicas alelo específicas requirieron un diseño de los distintos oligonucleótidos a usar: cebadores, oligonucleótidos de ligación y sondas. La secuencia nucleotídica de los polimorfismos de interés se obtuvo de la dbSNP del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Al programa *Primer 3Plus* se proporcionó la secuencia en formato FASTA, los alelos del SNP y las restricciones de diseño. Los alelos se indicaron en código IUPAC (G/C: S, A/T: W, G/A: R, T/C: Y, G/T: K, A/C: M). Para el diseño, tanto de los cebadores alelo específico directos

como los oligonucleótidos izquierdos, se fijó especial interés en la complementariedad del último nucleótido en el extremo 3', pues es el que determinará la discriminación. También se tuvieron en cuenta ciertas restricciones como el tamaño, el porcentaje de guanina/citosina (% GC), la temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) o de fusión, el tamaño del producto, la autocomplementariedad. El programa devolvió la secuencia de los oligonucleótidos, la secuencia del producto de amplificación y otra información como el tamaño, la T<sub>m</sub>.

Algunos de los oligonucleótidos diseñados presentaron unas colas de 18 nucleótidos de longitud en sus extremos. Éstas se caracterizaron por estar constituidas por secuencias no codificantes, que no se encuentran en el genoma humano, y necesarias para diversas técnicas.

Las propiedades termodinámicas (longitud, T<sub>m</sub>, % GC, peso molecular) de los oligonucleótidos diseñados se verificaron con la herramienta en línea OligoCalc [32].

### 3.4. Amplificación genérica

Las reacciones de amplificación estaban constituidas por 1x tampón de ADN polimerasa (*10x Reaction Buffer MgCl<sub>2</sub> free*, 75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Biotools España), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biotools, España), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Biotools, España), 300 nM del cebador directo y 300 nM del cebador reverso; 0,04 U/μL de ADN polimerasa 1 U/μL (Biotools, España) y 0,32 ng/ μL de ADN genómico. A continuación, se introdujeron en el termociclador *TC-4000 PCR Thermal Cycler* (Techne, Reino Unido).

Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a 95 °C, 5 min, a continuación 35 ciclos constituidos por desnaturalización a 95°C durante 30s; alineamiento de cebadores a temperatura de alineamiento (T<sub>a</sub>), en función de los cebadores empleados; elongación a 72 °C durante 30 s, y por último una elongación final a 72 °C, 10 min.

### 3.5. Secuenciación Sanger

**Amplificación y purificación.** Según protocolo descrito anteriormente, las muestras de ADN genómico, se amplificaron a T<sub>a</sub>=60 °C con los cebadores directo (5' CCTCTGGGAAGTCAAGCAAG 3') y reverso (5' TCGTCCGACCGTAACCTGCTATCTCAAGTGATCCACCCACCT 3'), correspondientes. Se determinó la concentración de ADN. La purificación de muestras de ADN se realizó utilizando el *PCR Purification Kit* (Jena Bioscience, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como se trataban de productos de ADN de tamaño menor que 200 pb, la muestra se preparó añadiendo el triple de volumen de *Binding Buffer* y el doble de volumen de Isopropanol, con respecto al volumen de la muestra. Antes de cargar la columna de gel de sílice, ésta se activó con 100 μl de *Activation Buffer*. Tras la carga y centrifugación pertinente, se hizo un lavado con 700 μl de *Washing Buffer* y una única elución con agua miliQ.

Tras la purificación, se volvió a determinar la concentración de ADN de la fracción recogida, así como la medida de fluorescencia y la realización de una electroforesis en gel de agarosa 3%.

**Secuenciación.** Las muestras purificadas se llevaron al Servicio de Secuenciación de ADN y Análisis de Expresión Génica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)-CSIC. Las muestras se entregaron a una concentración de 10 ng/μL y un volumen de 10 μL y el oligonucleótido reverso, que fue el que se eligió como oligonucleótido de secuenciación, a 5 μM y 15 μL, pues fueron las condiciones requeridas.

El método para secuenciar se basó en el empleo de dideoxinucleótidos marcados con compuestos fluorescentes (*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1*) y la resolución y análisis de los productos marcados, se realizó en Secuenciador capilar ABI 3130 XL.

El electroferograma obtenido se visualizó mediante el programa *Chromas Version 2.6.4* (www.techne.com.au), y mediante su correspondiente análisis se determinó la variante polimórfica asociada al SNP, en cada caso.

### 3.6. Amplificación alelo específica: PCR-ASA

Se realizaron dos reacciones de amplificación, cada una específica para cada variante de SNP, para un volumen final de 12,5  $\mu$ L. Cada mezcla de reacción estaba constituida por los mismos reactivos y la misma concentración de ADN genómico, que se emplearon en la amplificación genérica. Con el fin de generar productos específicos de alelo, se ensayaron dos tipos de cebadores alelo específicos (convencionales y tipo ARMS), descritos en la Tabla 4.

En algunos ensayos, a la mezcla de reacción también se incorporó betaína 0,75 M (*Betaine BioUltra*,  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y dUTPs 10  $\mu$ M (*DIG-11-dUTP*, Jena Bioscience, Alemania) con el fin marcar el producto de amplificación, para la posterior hibridación.

**Tabla 4.** Secuencias de cebadores alelo específicos (modalidad convencional y ARMS) empleados en la reacción de PCR-ASA. El último nucleótido (azul) es el específico de cada variante alélica del SNP. El penúltimo nucleótido (rojo) es el que carece de complementariedad con la secuencia diana.

<i>Función</i>	<i>Secuencia (5' – 3')</i>
Cebador directo nativo	CTGAAAAACAACCATTGGCCG
Cebador directo mutante	CCTGAAAAACAACCATTGGCCA
Cebador ARMS directo nativo	GAGTCGAGGTCATATCGT- AGACCTGAAAAACAACCATTGGCAG
Cebador ARMS directo mutante	ACTTCGTCAGTAACGGAC- AGACCTGAAAAACAACCATTGGCAA
Cebador reverso	TCGTCCGACCGTAACCTGCTAT- CTCAAGTGATCCACCCACCT

Las condiciones que se establecieron para la amplificación alelo específica del gen *VKORC1* en termociclador *UnoCycler 732-1200* (VWR, Alemania) y *5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf, Hamburgo) fueron las establecidas en la amplificación genérica, a  $T_a = 63^\circ\text{C}$  (cebador convencional nativo y cebadores ARMS) o  $T_a = 62^\circ\text{C}$  (cebador convencional mutante).

### 3.7. Ligación alelo específica

Este método consta de dos etapas: ligación discriminante alelo específica y posterior amplificación universal para generar productos.

**Ligación.** La reacción se hizo para un volumen total de 20  $\mu$ L. Cada mezcla estaba constituida por 0,75  $\mu$ L de tampón *SALSA MLPA buffer* (KCl, Tris-HCl, EDTA PEG-6000, oligonucleótidos) (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) que permitió la hibridación de los oligonucleótidos de ligación con el ADN molde, 0,75  $\mu$ L de la mezcla de oligonucleótidos de ligación a 2,66 nM diluidos en tampón TE 1x pH 8,0 (10 mM Trizima base y 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Tabla 5) y 30 ng de ADN genómico.

Se introdujo en el termociclador *TC-4000 PCR Thermal Cycler* (Techne, Reino Unido) y al inicio de la etapa de ligación propiamente dicha, se añadió la mezcla de ligación. Ésta estaba constituida por 1,5  $\mu$ L cada tampón de ligación *Ligase Buffer A* (Coenzima NAD de origen bacteriano) (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) y *Ligase Buffer B* (Tris-HCl,  $\text{MgCl}_2$  y detergente no iónico) (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos) y 0,5  $\mu$ L de la enzima de ligación *SALSA Ligase-65* (Glicerol, EDTA,  $\beta$ -mercaptoetanol, KCl, Tris-HCl, detergente no iónico, enzima ligasa-65 de origen bacteriano) (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos).

Las condiciones de ligación fueron una etapa a 98 °C durante 5 min para la apertura de la hebra, una etapa de hibridación de oligonucleótidos de ligación y ADN genómico molde a 50 °C durante 15 min (temperatura ajustada para los oligonucleótidos utilizados), una etapa de ligación a 54 °C durante 15 min y una etapa de inactivación a 98 °C durante 5 min.

**Amplificación universal.** Se prepararon dos mezclas de amplificación que contenían cebadores (directo conjugado en el extremo 5' con digoxigenina) complementarios a secuencias universales introducidas en los oligonucleótidos de ligación (Tabla 5). La digoxigenina (DIG) es un esteroide que constituyó el marcaje para la posterior etapa de revelado en la hibridación, ya que genera una señal, pues fue el elemento de reconocimiento por un anticuerpo de oveja anti-DIG. Las condiciones de amplificación fueron las establecidas en la amplificación genérica a  $T_a = 64$  °C.

**Tabla 5.** Secuencias de oligonucleótidos empleados en el método basado en la ligación. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho. El último nucleótido (azul) es el específico de cada variante alélica del SNP. [P]: grupo fosfato para permitir la unión con el nucleótido anterior del LPO. DIG: Digoxigenina.

Función	Secuencia (5' – 3')
LPO nativo	GAGTCGAGGTCATATCGT-GAAAAACAACCATTGGCCG
LPO mutante	ACTTCGTCAGTAACGGAC-GAAAAACAACCATTGGCCA
LPO nativo	GAGTCGAGGTCATATCGT-AGACCTGAAAAACAACCATTGGCCG
LPO mutante	ACTTCGTCAGTAACGGAC-AGACCTGAAAAACAACCATTGGCCA
RPO	[P]-GGTGC GGTTACGGTTCACGCCTA- ATAGCAGGTTACGGTTCGGACGA-GTCTGCCTATAGTGAGTC
Cebador directo nativo	DIG-GAGTCGAGGTCATATCGT
Cebador directo mutante	DIG-ACTTCGTCAGTAACGGAC
Cebador reverso	GACTCACTATAGGCAGAC

### 3.8. Detección de productos alelo específicos

#### 3.8.1. Fluorescencia

El producto de reacción amplificado se mezcló con SYBR 0,5x (*SYBR Safe™ DNA Gel Stain*, Invitrogen, Estados Unidos) a 1% (v/v) en una placa multipocillo, en un lector multicanal (*Wallac Victor 1420 multilabel counter*, PerkinElmer, Estados Unidos). Se detectó cuantitativamente por fluorescencia medida a una longitud de onda de absorción de 485 nm y emisión de 535 nm.

#### 3.8.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) 3% (w/v) disuelto en TAE 0,5x [Tris (64.36%), ácido acético, sal de sodio (31.91%) y ácido etilendiamino tetracético (3.72%)] (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) diluyéndolo 50 veces en agua. Para el revelado se utilizaron 5 µL *Real Safe Solution 20000x* (REAL, Durviz, Valencia, España). Los productos de amplificación se mezclaron 1:1 con tampón de carga 2x (13% sacarosa (w/v), 1 mM Tis-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,06% (w/v) azul de bromofenol). Como patrón molecular, se utilizó el marcador (*exACTGene DNA Ladders*, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). La separación se realizó a 110V durante 40 min. Las bandas del gel se visualizaron en un transiluminador UV (VILBER LOURMAT, Francia).

Por último, la imagen del gel se analizó con el programa *ImageJ 1.50i* (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) con el fin de estimar los tamaños de los productos visualizados.

#### 3.8.3. Ensayo de hibridación

**Preparación del chip.** Los productos obtenidos tras la amplificación se hibridaron en micromatrices 5x4, sobre la superficie plana de policarbonato (PC). En el disco se imprimieron 24 o 36 zonas, y cada punto (*spot*) que constituyó la micromatriz tuvo un volumen de 40 nL. La

solución de impresión estaba formada por tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM) que favorece la adsorción de la estreptavidina a la superficie, estreptavidina 10 ppm (*Streptavidin from Streptomyces avidinii*, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), glicerol 1% que evita la rápida evaporación de los puntos y cada sonda a 100 nM (Tabla 6). El dispensador de bajo volumen y no contacto basado en válvula selenoide *BioDot AD1500 Dispenser System* (BioDot, Estados Unidos) fue el que imprimió las micromatrices en el disco a una atmósfera con 90% de humedad. Tras la impresión, se procedió a la inmovilización en incubador (*Beschickung Loading Model 100-800*, Memmert, Alemania) a 37°C durante 2h o 4°C toda la noche. La sonda presenta afinidad por la estreptavidina mediante una modificación con biotina en su extremo 5'. Posteriormente, se realizó el lavado con PBS-T 1x, pH 7,4 (tampón fosfato salino 10x, Tween 20 0,05%) y agua.

**Tabla 6.** Secuencias de las sondas utilizadas en la hibridación. [BtnTg]: etiqueta de biotina. T<sub>10</sub>: cola de 10 timinas. ACTB: control endógeno.

Función	Secuencia (5' – 3')
Sonda para cebador universal directo nativo	ACGATATGACCTCGACTC-T <sub>10</sub> -[BtnTg]
Sonda para cebador universal directo mutante	GTCCGTTACTGACGAAGT-T <sub>10</sub> -[BtnTg]
Sonda para CYP2C9*2 (complementaria amplicón)	[BtnTg]-T <sub>10</sub> -AGACCAGCGGGCTTCCTCTGAACA
Sonda para CYP2C*3 (complementaria amplicón)	[BtnTg]-T <sub>10</sub> -AGACGTGCACGAGGTCCAGAGATAC
Sonda para ACTB	[BtnTg]-T <sub>10</sub> -CAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCA

**Hibridación.** Para la hibridación se mezcló el amplicón diluido 10 veces con formamida 10% (Scharlab, S.L., España), Denhardt's 2,5x que actúa como bloqueante de superficie para uniones inespecíficas (*Denhardt's Solution 50x*, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y tampón de hibridación SSC 1x pH 7,0 (sodio citrato salino) (SSC 20x, citrato trisódico dihidratado 15 mM, NaCl 150 mM). Se calentó a 98 °C durante 10 min en el termobloque *dry bath FB15103* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), para que se abriesen las hebras del producto de amplificación marcado. Se añadieron 15 µL de la mezcla de hibridación, en cada matriz y se incubó a 37 °C durante 1 h. A continuación, se hizo otro lavado con SSC 0,1x y SSC 0,001x.

**Revelado-Lectura.** Se dispuso una disolución de anticuerpos en PBS-T, formada por un anticuerpo primario anti-DIG de origen ovino 2 ppm (*Anti-Digoxigenin antibody (ab64509)*, Abcam, Reino Unido) y un anticuerpo secundario anti-oveja 10 ppm, marcado con el enzima peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase, HRP*) (*Rabbit Anti-Sheep IgG H&L (HRP) (ab6747)*, Abcam, Reino Unido). Se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó con PBS-T y agua para eliminar los excesos y se añadió el sustrato colorimétrico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (ep(HS)TMB-mA, SDT-reagents, Alemania) que forma un precipitado color azul con HRP, en caso de que haya hibridación. Por último, se lavó con agua y se procedió a la lectura del ensayo en un escáner (*Epson Perfection 1640SU Office*, Epson, Estados Unidos). Posteriormente, se analizó cada micromatriz individualmente mediante el programa *GenePix Pro 6.0.1.27*, obteniendo la intensidad de cada punto y del fondo. A partir de estos valores, se pudo calcular la relación señal/ruido (SNR).

### 3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa *STATGRAPHICS Centurion XVI* considerando un nivel de confianza del 95,0% (alfa 0,05).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Extracción de ADN de muestras biológicas

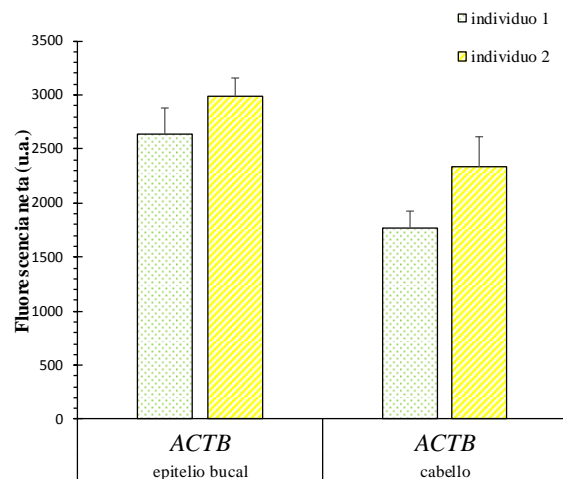
Con el fin de desarrollar una herramienta farmacogenética accesible para cualquier centro sanitario, se eligieron dos sistemas mínimamente invasivos (epitelio bucal y cabello) como modo de obtener tejido de los individuos en estudio. La extracción de ADN se basó en un método de lisado y purificación con columnas de afinidad, promoviendo rapidez y practicidad al método. Se registró la absorbancia de los productos separados, obteniéndose dos parámetros de calidad: concentración ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), que se relaciona con el rendimiento de extracción y el ratio de absorbancia a 260/280 nm, que mide la pureza respecto al contenido proteico (Tabla 7).

**Tabla 7.** Análisis espectrofotométrico de las distintas muestras y su relación con el tejido de procedencia.

Tejido origen	Muestra	Concentración ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	$A_{260/280}$
Epitelio bucal	Individuo 1	$90 \pm 20$	$1,87 \pm 0,01$
	Individuo 2	$50 \pm 4$	$1,79 \pm 0,08$
Cabello	Individuo 1	$14,0 \pm 1,1$	$1,70 \pm 0,03$
	Individuo 2	$14,5 \pm 0,7$	$1,94 \pm 0,01$

El rendimiento de las muestras procedentes de epitelio bucal fue mayor (aproximadamente 5 veces). Sin embargo, todas las muestras presentaron una adecuada concentración de ADN, considerando las cantidades necesarias para la amplificación alelo específica (4 ng) y la ligación alelo específica (30 ng). El estudio variando el tiempo de incubación a 55 °C indicó que no influía en la concentración de ADN extraído a partir de las muestras de cabello. Se obtuvieron ratios de absorbancia 260/280 nm satisfactorios ( $\geq 1,80$ ) para todas las muestras, excepto una.

Para determinar la influencia del origen en el ADN extraído, se realizó una PCR del gen de referencia *ACTB*. Se trata de un gen humano beta actina (*ACTB*), adecuado para ser utilizado como control endógeno, pues tiene un elevado número de copias en el genoma humano. Se hizo una prueba-t ( $t = -1,66$  y valor-P = 0,1) concluyendo que no había diferencias estadísticamente significativas entre el ADN extraído de ambos tejidos e individuos (Figura 6).



**Figura 6.** Influencia del tejido de extracción de ADN genómico y detección de los productos post-amplificación del gen *ACTB* (gen humano beta actina) utilizado como control endógeno. Se evaluó para muestras de dos individuos y un control negativo de amplificación NTC (sin ADN molde). Número de réplicas: 3.

Aunque el rendimiento de las muestras de epitelio bucal fuese mayor, la cantidad de ADN genómico empleada en la amplificación, en todos los casos, fue la misma (4 ng). Esto puso de manifiesto la ausencia de inhibidores de la PCR, es decir, componentes de la extracción que afectan e interfieren en la amplificación), p.ej. compuestos fenólicos y orgánicos, iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,



contaminantes de la propia muestra (no presente suficiente pureza) o exógenos, debidos al contacto con el material fungible [33].

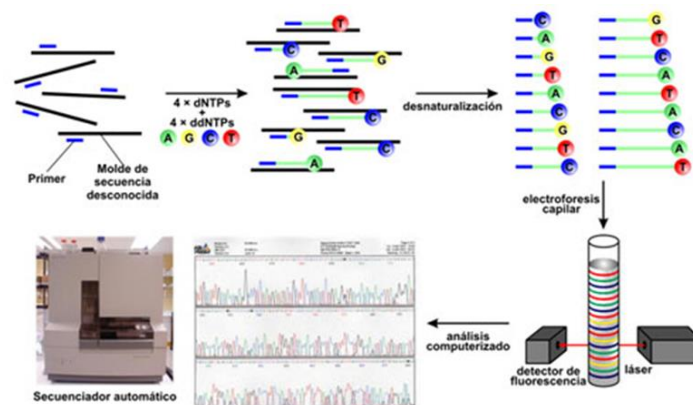
Los resultados demuestran que el método de extracción de ADN seleccionado fue adecuado en ambos casos y que no había efecto matriz, pues era independiente el tejido de procedencia. Esto pone de manifiesto la robustez de los métodos no invasivos para la extracción de ADN. Para posteriores ensayos, se eligieron las muestras de ADN genómico procedentes de epitelio bucal debido a la mayor sencillez en la obtención de la muestra, menor duración del ensayo de extracción y mayor rendimiento de éste.

## 4.2. Secuenciación Sanger

### 4.2.1. Descripción

La secuenciación Sanger, se utilizó como método de referencia para obtener los genotipos de los individuos estudiados en el SNP rs9923231. Se basa en una reacción de PCR de hebra simple (ssADN), empleando una fracción de nucleótidos modificados químicamente (marcados cada uno con un fluoróforo diferente), denominados dideoxynucleótidos (ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Cuando uno de éstos es incorporado a la cadena en formación, se detiene la elongación, pues carecen de 3'-OH. Posteriormente, se resuelve por electroforesis capilar, obteniéndose un electroferograma (Figura 7), comparando la secuencia del producto resultante se determina el genotipo.

Para ello, los extractos de ADN de los individuos fueron sometidos a una PCR genérica, pasando posteriormente por una dilución, extensión con dideoxynucleótidos y separación por electroforesis capilar. Una vez obtenido el electroferograma, se comparó con la secuencia del producto resultante, con el fin de determinar el genotipado.



**Figura 7.** Esquema de secuenciación por el método de Sanger. Fuente: Cultek [34].

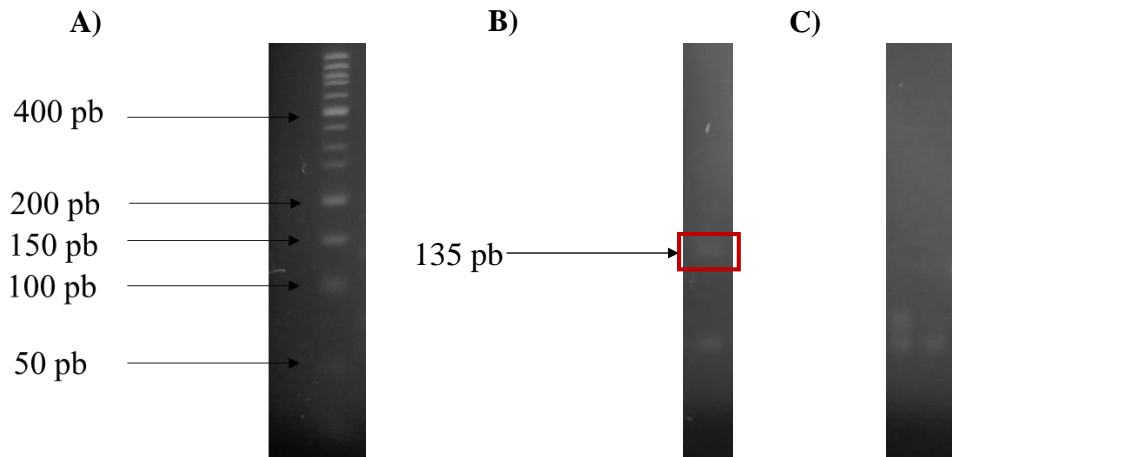
### 4.2.2. Generación de productos para la región en estudio del gen *VKORC1* y caracterización

Se diseñaron los cebadores de amplificación, teniendo en cuenta una serie de condiciones (20-22 pb longitud, 40-50% GC, evitar repeticiones de más de tres bases de una única base,  $T_m = 55$  °C calculada por fórmula de Wallace) que posteriormente debió cumplir el que fue utilizado como oligonucleótido de secuenciación. Con estos cebadores, se generó un producto de 134 pb. Para la secuenciación, se eligió el cebador reverso, pues éste se encuentra a una distancia de 44 pb del SNP diana, a diferencia de las 27 pb de distancia del cebador directo. Al estar el SNP lo más alejado posible, se evita que en los errores iniciales de Sanger, se encuentre la variante polimórfica.

Para establecer la calidad del producto formado, se midió la fluorescencia y se realizó electroforesis (Figura 8). En todos los casos, el rendimiento de amplificación fue  $10^7$  copias. La

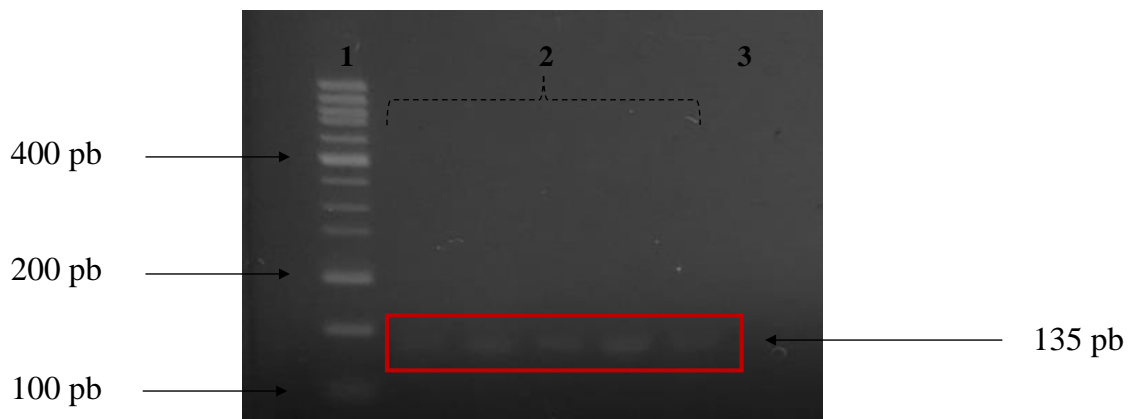


separación electroforética originó tres bandas en todas las muestras, la mayor con un tamaño próximo a 150 pb (tamaño real del producto 134 pb) y las otras dos entre 50 y 100 pb, correspondientes a subproductos. Sin embargo, en los controles negativos de la reacción de amplificación empleados (ADN genómico de *Salmonella Typhimurium* y muestra sin ADN molde-NTC-), sólo se observaron las bandas correspondientes a los subproductos. A continuación, mediante un ajuste exponencial, se estimó que el tamaño de las bandas era de 135 pb, 89 pb y 54 pb.



**Figura 8.** Gel de agarosa 3% para los productos resultantes de la amplificación. A) Marcador molecular. B) Producto de amplificación a partir de ADN genómico humano. C) Control negativo de amplificación sin ADN molde (NTC) y control negativo de amplificación (ADN genómico de *Salmonella Typhimurium*), respectivamente.

Se realizó una purificación mediante columnas de gel de sílice. A continuación, se determinó la concentración de ADN y la fluorescencia de la fracción recogida, observándose que la señal de todas las muestras, disminuía con respecto a la medida previa a la purificación. También se realizó electroforesis (Figura 9), y se confirmó lo esperado: el producto específico (135 pb) se había separado del resto de subproductos.



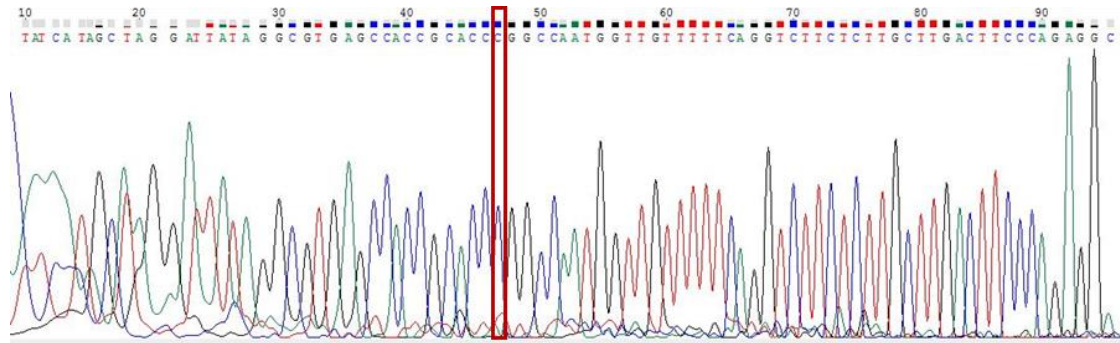
**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos amplificados y purificados mediante columna rellenas de gel de sílice. 1. Marcador molecular. 2. Muestras procedentes de individuos. 3. Muestra sin ADN molde (NTC).

#### 4.2.3. Genotipado de individuos

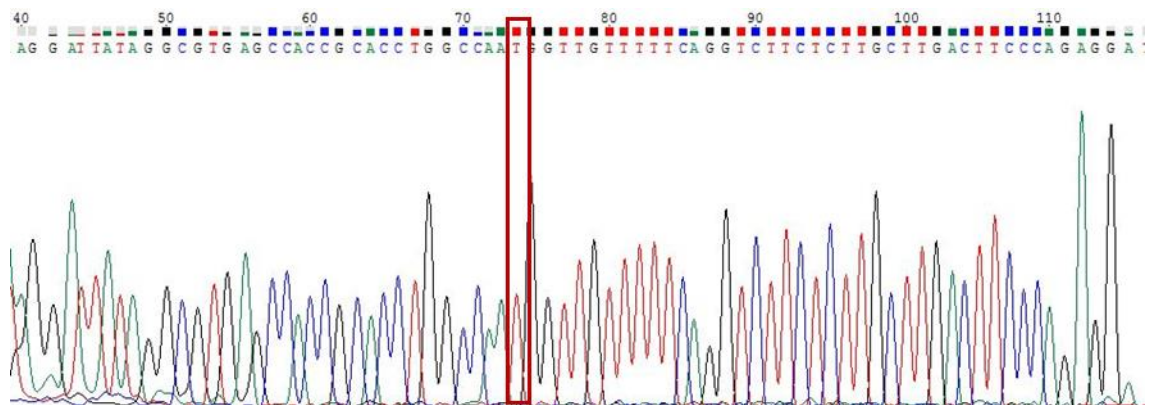
El análisis de los electroferogramas generados se basó en la comparación de la secuencia proporcionada con la secuencia del amplicón con los cebadores diseñados. Se observó que en promedio había errores en la determinación de los 25 primeros nucleótidos, pero no afectaba a la posición polimórfica.

Si se trataba de un genotipo homocigoto para dicha variante, sólo apareció un pico correspondiente a un determinado nucleótido en la posición del SNP. Cuando fue heterocigoto para la variante, en la misma posición aparecieron dos picos distintos superpuestos, cada uno correspondiente a un nucleótido. (Figura 10). Con ello, se pudo establecer el genotipo del SNP rs9923231 de *VKORC1* en cada caso.

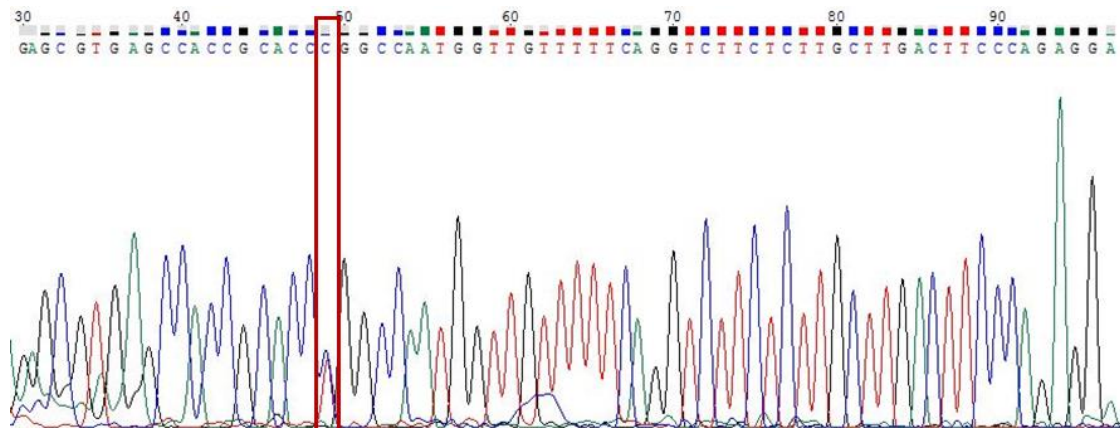
A)



B)



C)



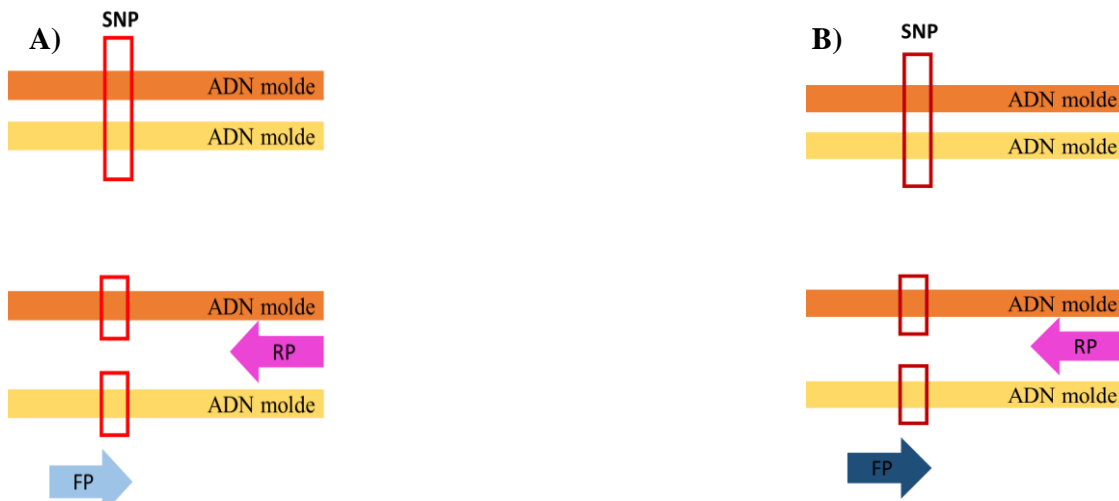
**Figura 10.** Electroferograma obtenido en secuenciación Sanger para el gen *VKORC1*, indicando la posición del SNP rs9923231. A) Individuo con genotipo homocigoto nativo. B) Individuo con genotipo homocigoto mutante. C) Individuo con genotipo heterocigoto.

### 4.3. Amplificación alelo específica: PCR-ASA

#### 4.3.1. Descripción

La amplificación alelo específica se basa en la capacidad de la enzima ADN polimerasa de síntesis en dirección 3' solamente cuando hay una unión totalmente complementaria del cebador con el ADN molde (Figura 11). Para el genotipado se producen dos reacciones independientes, cada una con el cebador directo complementario a una de las variantes alélicas y el cebador reverso, común a ambas variantes [30, 35]. Los dos cebadores directos tienen la misma secuencia, salvo el último nucleótido (extremo 3'), que es el complementario a la variante del SNP. Cuando el individuo sea homocigoto, sólo se obtendrá amplificación en la reacción que se encuentre el cebador directo (nativo o mutante) complementario en toda su secuencia, incluido el último nucleótido. En individuos heterocigotos, se producirá la amplificación del ADN genómico en ambas reacciones.

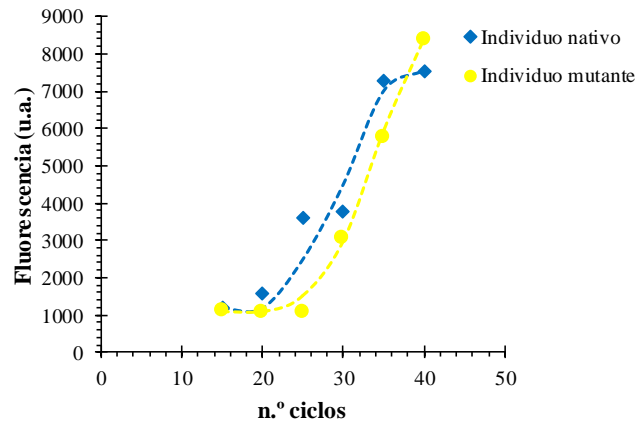
En el presente trabajo, se propone la discriminación de los distintos subgrupos poblacionales mediante PCR-ASA combinada con un sistema de detección post-amplificación como fluorescencia, electroforesis e hibridación en microchip. El método propuesto es rápido, simple y económico, pues requiere reactivos y equipos que se encuentran en la mayoría de laboratorios.



**Figura 11.** Esquema de la amplificación alelo específica (PCR-ASA). (A) Individuo homocigoto nativo. (B) Individuo homocigoto mutante. SNP: polimorfismo de un único nucleótido. FP: cebador directo. RP: cebador reverso.

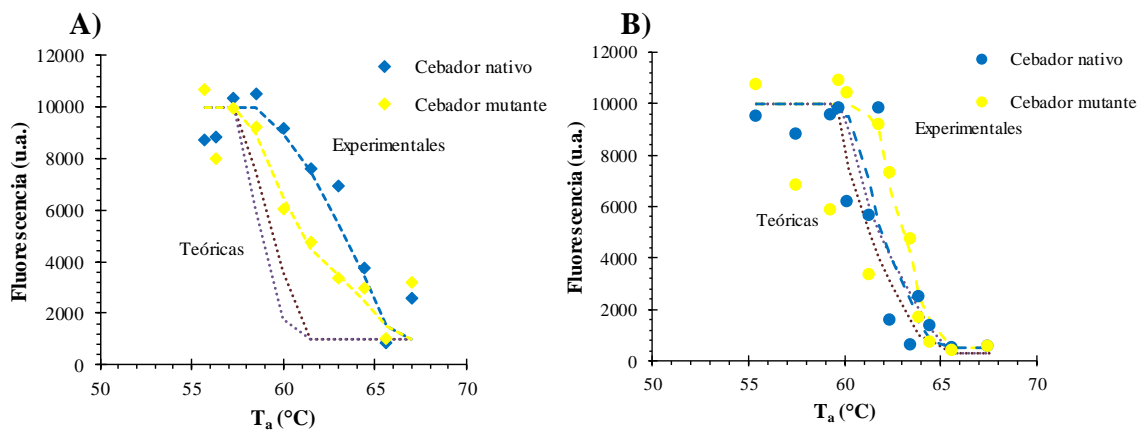
#### 4.3.2. Puesta a punto del método PCR-ASA con cebadores convencionales

Se estudió el efecto de las variables experimentales con el fin de determinar las condiciones que originasen una amplificación específica. Muestras de ADN genómico de individuos homocigotos nativos y mutantes fueron amplificadas utilizando diferentes ciclos de PCR (Figura 12). Se comprobó que a medida que aumentaban los ciclos, aumentaba la intensidad de señal detectada como consecuencia de una mayor cantidad de producto amplificado. Se seleccionó una amplificación de 35 ciclos ( $10^{10}$  copias finales), puesto que se alcanzaba un factor de amplificación suficiente para detectar ADN genómico procedente de tejidos humanos ensayados. Del mismo modo, la concentración de cebadores, concentración de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y unidades de enzima, aunque cambiaron el factor de amplificación, no tuvieron una influencia en la discriminación.



**Figura 12.** Efecto de la cantidad de ciclos en la amplificación específica de alelo en dos individuos con distinto genotipo. Número de copias iniciales: 1333.

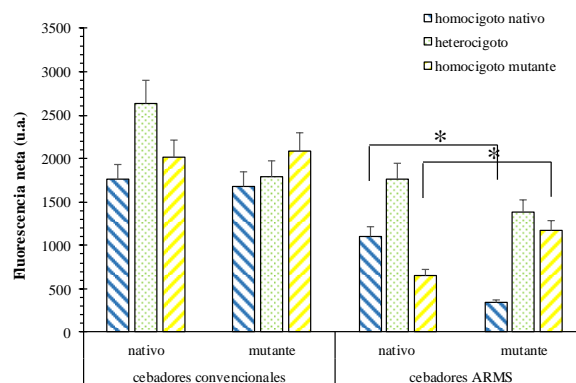
La variable más crítica de la amplificación alelo específica fue la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) de los cebadores con el ADN molde, durante el termociclado. Controla la espontaneidad del proceso en el cual el ADN molde forma un complejo con el cebador complementario, pero no con el cebador no complementario. En primer lugar, se realizó un estudio termodinámico evaluando la temperatura de fusión o *melting* ( $T_m$ ) de los cebadores, mediante la herramienta en línea OligoCalc [32]. Los valores fueron 59,5 °C y 60,1 °C para el cebador nativo y mutante del gen *VKORC1*, respectivamente. Los cebadores fueron diseñados para que esta temperatura fuese similar, aunque la mutación implica una sustitución  $G > A$ , el cebador mutante contiene 1 nucleótido adicional en extremo 5'. A partir de estos valores, se estableció un rango de temperaturas a ensayar. Las muestras de ADN genómico procedentes de individuos homocigoto nativo y mutante fueron añadidas a dos mezclas de reacción conteniendo el cebadores nativo o mutante (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto de la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) en la fluorescencia post-amplificación PCR-ASA para el SNP rs9923231. A) Individuo homocigoto nativo. B) Individuo homocigoto mutante.

Las curvas experimentales estaban desplazadas frente a las teóricas aproximadamente 2 °C, como consecuencia de la composición iónica del medio. A medida que aumentaba la temperatura, la intensidad de señal era menor, debido a que no se producía el complejo cebador-ADN molde. También se observó un comportamiento diferencial, coincidente con el estimado, entre la mezcla que contenía el correspondiente cebador complementario y la mezcla con el cebador no complementario. Seleccionando una temperatura de alineamiento de 63 °C para la reacción con cebador nativo y 62 °C para la del mutante, se discriminaba ambos individuos.

También se determinó la capacidad discriminante de estos cebadores convencionales y de otro tipo de cebadores alelo específicos denominados ARMS (Figura 14). Se confirmó que con los convencionales no se podía discriminar el genotipo homocigoto nativo ( $t = 0,54$  y valor- $P = 0,61$ ) ni el homocigoto mutante ( $t = -1,05$  y valor- $P = 0,35$ ). Aunque para determinar la heterocigosidad, no debería haber diferencias notables entre los dos cebadores, presentó diferencias estadísticamente significativas ( $t = 4,61$  y valor- $P = 0,01$ ). Sin embargo, con los cebadores tipo ARMS, el genotipo homocigoto nativo ( $t = 11,43$  y valor- $P = 3 \cdot 10^{-4}$ ) y el homocigoto mutante ( $t = -6,74$  y valor- $P = 0,002$ ), presentaron diferencias estadísticamente significativas, por tanto, se pudo discernir a qué subgrupo pertenece cada individuo. El genotipo heterocigoto ( $t = 2,78$  y valor- $P = 0,05$ ) no presentó diferencias significativas entre ambos cebadores directos. Por este motivo, se prefirieron los cebadores ARMS para la amplificación alelo específica frente a los convencionales. Comparando los cebadores convencionales y ARMS, se determinó que había diferencias significativas para la determinación del genotipo homocigoto nativo y homocigoto mutante, porque con los cebadores ARMS disminuía la señal. No obstante, no había diferencias significativas para la subpoblación con genotipo heterocigoto, pues como se pudo observar, presentaba la misma relación de señal cebador nativo/cebador mutante, en ambos casos.



**Figura 14.** Señal de fluorescencia neta del producto resultante de la amplificación específica de alelo (para los tres posibles genotipos) con dos tipos de cebadores diferentes: convencionales y ARMS. (\*) Prueba-t para comparar medias entre los dos cebadores alelo específicos de un mismo tipo, valor- $P < 0,05$ . La hipótesis nula establece que los cebadores no poseen capacidad discriminante. Número de réplicas: 3.

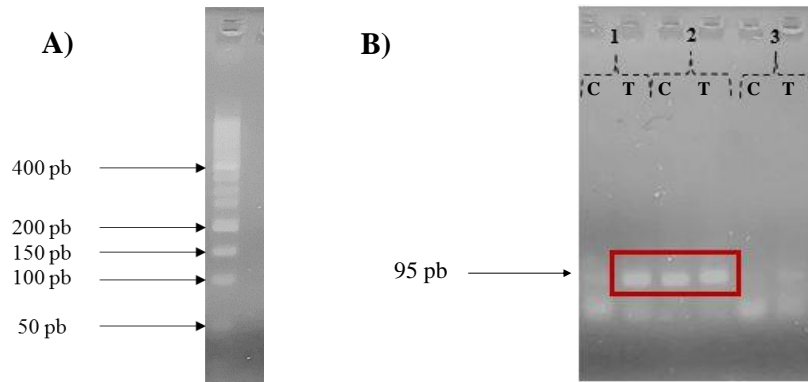
Los productos obtenidos tras la PCR-ASA con cebadores convencionales, también se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa 3% (Figura 15). A partir de la imagen registrada se elaboró la ecuación que relaciona el avance en el gel y el tamaño de las bandas (Ecuación 1). La variable independiente ( $x$ ) fue el avance en el gel y la variable dependiente ( $y$ ) el tamaño de las bandas, y por tanto, la longitud del producto.

$$y = 168,37221e^{-0,00150x} ; \ln y = \ln 168,3722 - 0,00150x \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$R^2 = 0,99997$$

Esta ecuación se ajustó a la representación de Ferguson que establece que el logaritmo del tamaño de la banda en pares de bases, es función de la distancia recorrida en el gel:  $\log Ur = \log Yo - Kr (\%T)$ , siendo  $Ur$  la movilidad electroforética relativa,  $Yo$  el valor limitado,  $Kr$  el coeficiente de retardo y  $\%T$  la concentración de agarosa.

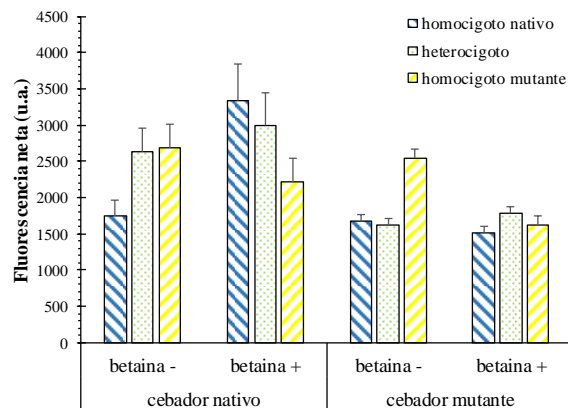
Se estimó que la banda más intensa, correspondiente al producto de amplificación, tenía un tamaño de 95 pb, siendo un valor próximo el tamaño real del producto (108 pb). En aquellos casos que no había amplificación del producto específico, también se observó la presencia de otra banda más débil con un tamaño estimado de 80 pb. Para establecer el genotipo se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de la banda de mayor tamaño en el carril correspondiente a la reacción de amplificación con cebador nativo o mutante. Se pudo asignar el genotipo, en el 60% de los casos, coincidiendo estos resultados con Sanger.



**Figura 15.** Imágenes del gel de agarosa 3% de los productos PCR-ASA con cebadores convencionales, indicando la banda correspondiente al producto específico. Cada muestra ocupa dos carriles pues corresponden a la amplificación con cebador nativo (alelo C) y mutante (alelo T) respectivamente. A) Marcador molecular. B) Productos post-amplificación alelo específica para el SNP rs9923231 con cebadores convencionales. 1. Muestra de individuo con genotipo homocigoto mutante. 2. Muestra de individuo heterocigoto. 3. Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC).

Se estudió la adición de betaína a la mezcla de reacción para mejorar la selectividad del ensayo. La betaína o trimetilglicina es un aminoácido que posee capacidad desestabilizante de la doble hélice de ADN, de modo que provoca la desnaturalización de los complejos parcialmente complementarios [36]. Se ensayaron concentraciones de betaína de 0 a 1 M para la amplificación de tres muestras distintas (control negativo, muestra con genotipo mutante y muestra con genotipo nativo). La adición de betaína a 1 M inhibía la amplificación proporcionando respuestas similares al control negativo en todos los casos. En la Figura 16 se muestran los resultados de fluorescencia post-amplificación alelo específica empleando betaína 0,75 M.

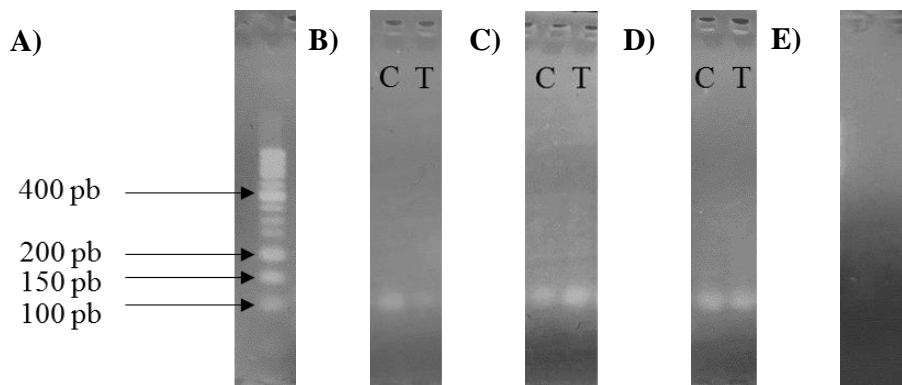
Se analizaron las señales obtenidas aplicando una prueba-t. En el caso de cebador nativo, los valores calculados ( $t = -1,09$  y  $\text{valor-P} = 0,3$ ) indicaron que no había diferencias significativas entre usar betaína y no usarla. A la misma conclusión se llegaba con cebador mutante ( $t = 1,01$  y  $\text{valor-P} = 0,4$ ). Por lo tanto, no se logró mejorar la asignación del genotipo, puesto que la respuesta en la mezcla no complementaria no disminuyó significativamente.



**Figura 16.** Influencia del reactivo betaína 0,75 M en la señal de fluorescencia del producto generado mediante PCR-ASA a partir de ADN genómico. Betaína -: amplificación alelo específica sin betaína. Betaína +: amplificación alelo específica en presencia de betaína.



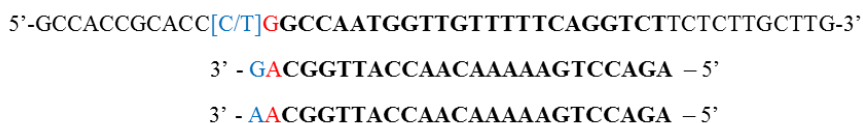
Los ensayos de electroforesis en gel de agarosa confirmaron los resultados observados con fluorescencia (Figura 17). En homocigoto nativo, sólo salió una banda asociada al producto de 86 pb en el carril correspondiente a la reacción con cebador nativo. Tanto en homocigoto mutante como en heterocigoto apareció esa banda en la reacción con cebador directo mutante y nativo.



**Figura 17.** Electroforesis de los productos procedentes de PCR-ASA con betaína 0,75 M como reactivo. A) Marcador molecular. B) Muestra de individuo homocigoto nativo. C) Muestra de individuo heterocigoto. D) Muestra de individuo homocigoto mutante. E) Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC). C: alelo nativo del SNP rs9923231. T: alelo mutante del SNP rs9923231.

#### 4.3.3. Puesta a punto del método PCR-ASA con cebadores ARMS

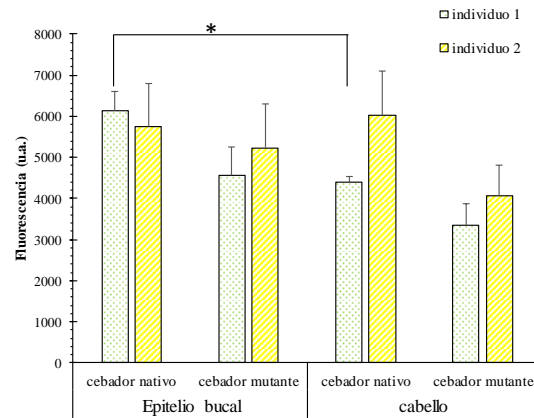
Se estudió una variante de PCR-ASA basada en el uso de cebadores alelo específicos denominados ARMS, cuyo nombre procede de su acrónimo en inglés, *Amplification Refractory Mutation System*. Estos cebadores se caracterizan por ser complementarios a la secuencia de ADN a amplificar, incluir la variante del SNP en el último nucleótido del extremo 3' y poseer un nucleótido no complementario (*mismatch*) en la penúltima posición del extremo 3' del cebador (Figura 18). Por tanto, sólo aquellos cebadores que sean complementarios en la última base (que es la posición del SNP), es decir sean alelo específico, permitirán a la ADN polimerasa que proceda a la extensión de la hebra. En caso contrario, como la Taq ADN polimerasa no tiene capacidad de autocorrección de errores en dirección 3'-5' (*proofreading*), no se podrá subsanar la falta de complementariedad de dos nucleótidos consecutivos, y por tanto se minimizará la amplificación [37].



**Figura 18.** Secuencia flanqueante al SNP rs9923231 y secuencias de los dos cebadores directos ARMS. Se indica la falta de complementariedad en un nucleótido del extremo 3' (rojo) y la base complementaria a la variante alélica en cada caso (azul).

En los ensayos preliminares, se registró una disminución de la señal de fluorescencia, respecto al genotipado con los cebadores convencionales. Se demostró que la no complementariedad en el penúltimo nucleótido del extremo 3', aumentaba la selectividad de los cebadores por el ADN molde (diana) y por tanto se reducía la formación de complejos cebador-ADN molde no específicos. Esta estrategia permitió mejorar la asignación de los genotipos y por tanto, determinar a qué subgrupo poblacional correspondía cada muestra amplificada de ADN genómico.

También se realizó un ensayo con el fin de determinar la influencia del tejido de procedencia del ADN genómico en la amplificación alelo específica con cebadores ARMS del SNP rs9923231. Se analizaron distintos ADN genómico procedentes de epitelio bucal y cabello (Figura 19). Con las señales obtenidas a tiempo final, se realizó un test pareado para cada individuo. En el individuo 1, la amplificación con cebador nativo ( $t = 4,81$  y Valor-P = 0,04), tuvo diferencias estadísticamente significativas entre el ADN genómico procedente de epitelio bucal y cabello. Sin embargo, en la amplificación con cebador mutante ( $t = 0,50$  y Valor-P = 0,7), no existió diferencia respecto al origen. Del mismo modo, se hizo el test para el individuo 2; que ni en la amplificación con cebador nativo ( $t = -0,79$  y Valor-P = 0,51) ni con cebador mutante ( $t = 2,55$  y Valor-P = 0,1) hubo diferencias significativas. Estos resultados obtenidos mediante fluorescencia, se confirmaron con electroforesis en gel de agarosa.



**Figura 19.** Influencia del tejido de procedencia del ADN genómico en el resultado obtenido con PCR-ASA utilizando cebadores ARMS. Número de réplicas: 3. (\*) valor-P < 0,05.

#### 4.3.4. Detección de los productos mediante ensayo de hibridación: Descripción

Las implicaciones clínicas de un tratamiento incorrecto obligan a desarrollar métodos de genotipado fiables. Aunque la medida post-amplificación de la fluorescencia y la electroforesis logran diferenciar entre poblaciones, no son tan específicas como un ensayo de hibridación.

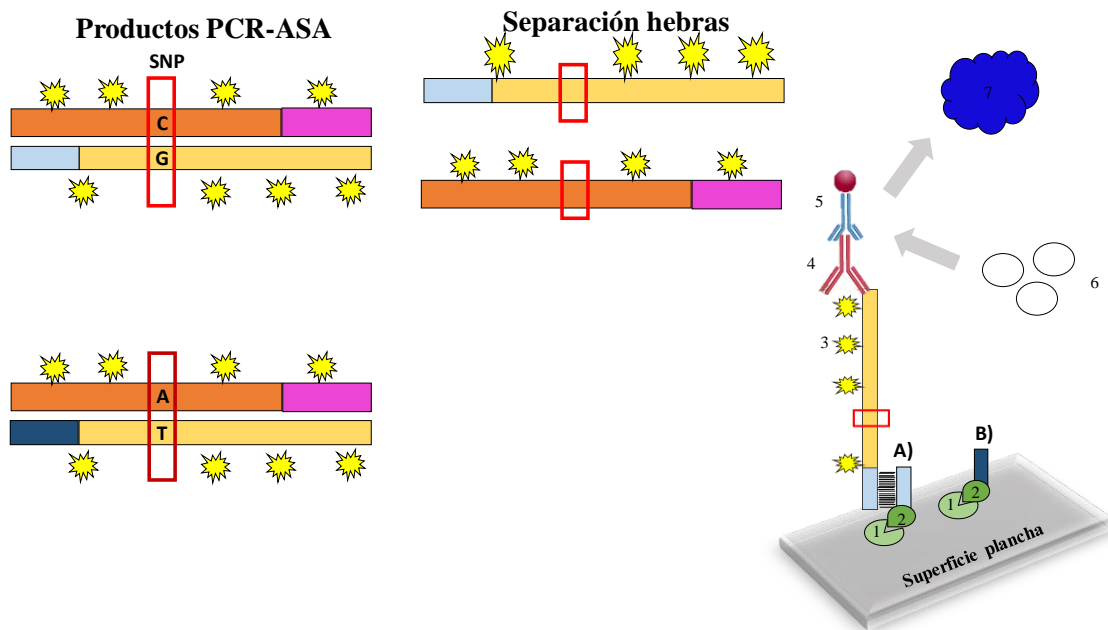
Se estudió la detección de los productos formados mediante hibridación con sondas individualizadas en formato de micromatrices. La mayor selectividad de esta técnica en relación con otras se debe al uso de sondas complementarias a regiones del producto a detectar, que evitan los falsos positivos. Por otra parte, la mayor sensibilidad en la discriminación es gracias a la posterior etapa de revelado, que mejora la relación señal/ruido (SNR).

Para el ensayo de hibridación, se utilizaron las condiciones descritas previamente por el grupo. Se seleccionó un método basado en la detección colorimétrica de la micromatriz [38]. La Figura 20 muestra las distintas etapas del proceso: anclaje de sondas a la superficie del chip, incubación con la muestra, incubación con la sustancia reveladora y detección. El ensayo fue realizado con los correspondientes controles positivos de hibridación (producto de amplificación del gen *ACTB*) para cada genotipo y negativos de amplificación e hibridación. El resultado fue una imagen que contenía un perfil de hibridación según el genotipo del ADN genómico estudiado.

La micromatriz que se utilizó en el presente ensayo de hibridación estaba constituida por cinco sondas diseñadas para que el anclaje a la superficie fuese por afinidad (estreptavidina y biotina). Dos de ellas, presentaban una secuencia complementaria en toda su longitud a una región específica del analito, ya que eran complementarias a las colas de los dos cebadores directos ARMS (nativo -con nucleótido G en 3'- y mutante - con nucleótido A en 3'-) empleados en genotipado. Otras dos sondas no eran complementarias a los cebadores, sino que hibridaban en ciertas regiones de los amplicones de *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3*. La última sonda también era complementaria a una región del amplicón, pero en este caso de *ACTB*. Las sondas específicas para *CYP2C9\*2* y *CYP2C9\*3* se emplearon como controles negativos de hibridación. Dado que

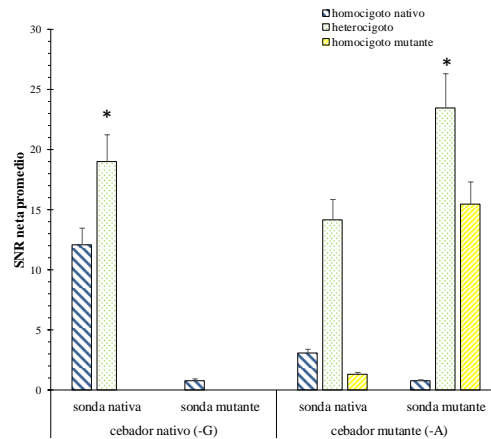


el producto de amplificación no era de estos genes, no se esperaba la visualización de dichos puntos. Por otra parte, la sonda para *ACTB*, sólo generaría señal cuando se hibridase el producto específico marcado con digoxigenina. Se utilizó como control positivo de hibridación, siendo indicador del correcto funcionamiento del ensayo. Se escogió este diseño, porque además de confirmar la selectividad de las sondas específicas diseñadas, pretende constituir la base de una futura integración en un dispositivo multiSNP, que proporcione la información farmacogenética de interés.



**Figura 20.** Esquema general del ensayo de hibridación, donde 1: estreptavidina; 2: etiqueta de biotina de la sonda [A) sonda nativa B) sonda mutante]; 3: digoxigenina (DIG); 4: anticuerpo primario de oveja anti-DIG; 5: anticuerpo secundario de conejo anti-oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP); 6: sustrato enzimático colorimétrico TMB; 7: precipitado azul generado con HRP.

La detección con este ensayo, de los productos PCR-ASA para el SNP de interés, sólo permitió la visualización de señal en las sondas correspondientes al cebador de amplificación empleado. Se determinó la presencia o ausencia de cada alelo, comparando la SNR neta promedio (Figura 21). Para ambos alelos, se observó un aumento de señal cuando el producto de amplificación respectivo estaba presente. Para el alelo C, la elevada señal detectable en heterocigoto ( $t = -3,76$  y valor- $P = 0,02$ ) y homocigoto nativo ( $t = -2,54$  y valor- $P = 0,06$ ), próximo al límite establecido para considerar que había una diferencia significativa, fue debido a que estaba presente dicho alelo y se había amplificado. No se detectó señal para el genotipo homocigoto mutante ( $t = 0,85$  y valor- $P = 0,44$ ). Para el alelo T, se registró una señal elevada para homocigoto mutante ( $t = -2,43$  y valor- $P = 0,07$ ) y heterocigoto ( $t = -3,40$  y valor- $P = 0,03$ ), debido a que había producto marcado resultado de la amplificación para este alelo. Sin embargo, esto no se detectó para homocigoto nativo ( $t = -2,43$  y valor- $P = 0,07$ ), pues dicho alelo no estaba presente.



**Figura 21.** Representación de los valores de la relación señal/ruido (SNR) neta promedio tras la hibridación de los productos PCR-ASA con ARMS. Calculada como la diferencia de SNR promedio de la muestra frente a SNR promedio del control negativo de amplificación correspondiente. (\*) valor- $P < 0,05$ . Número de réplicas de las sondas: 4. Número de réplicas de la muestra: 3.

#### 4.3.5. Genotipado de individuos

Como se estableció que mediante PCR-ASA con cebadores ARMS se podía discriminar a qué subgrupo poblacional pertenecía cada individuo; se evaluó, con un número superior de muestras, la capacidad de asignación de genotipos. El ADN genómico de cada individuo se añadió en dos mezclas de reacción, que diferían en el cebador directo alelo específico (nativo y mutante); y se detectaron los productos obtenidos mediante fluorescencia, electroforesis en gel de agarosa y ensayo de hibridación.

##### 4.3.5.1. Detección mediante fluorescencia

La fluorescencia neta ( $F_n$ ) se calculó a través de la diferencia del valor de fluorescencia para cada muestra en cada mezcla de reacción y el valor de fluorescencia del control de amplificación negativo sin ADN molde (NTC) para dicha mezcla de reacción, medidas a 485/535 nm. A continuación, la población se asignó en base al criterio diferencia de fluorescencias netas para nativo con respecto mutante frente al sumatorio de dichas fluorescencias (Ecuación 2). Para un valor igual o superior a 0,33 el genotipo fue asignado como homocigoto nativo. Para un valor igual o inferior a -0,33 el genotipo fue asignado como homocigoto mutante. Por último, para un valor igual a 0, inferior a 0,33 o superior a -0,33 el genotipo fue heterocigoto.

$$\text{ratio } F = \frac{F_n(\text{nativo}) - F_n(\text{mutante})}{F_n(\text{nativo}) + F_n(\text{mutante})} \quad (\text{Ecuación } 2)$$

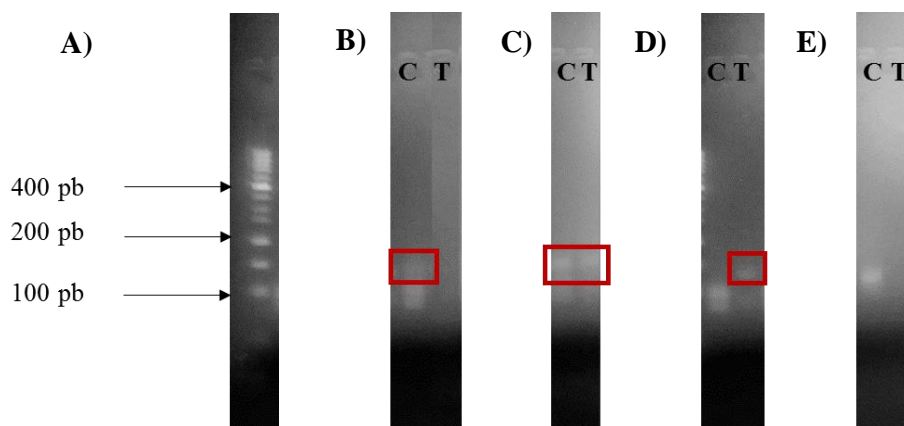
Comparando los valores de fluorescencia netos obtenidos para las dos mezclas de reacción con cebadores ARMS siguiendo el criterio anterior, se obtuvieron los ratios de fluorescencia, permitiendo determinar con exactitud todos los genotipos de los individuos para el SNP rs9923231. Se observaron las diferencias en el ratio F, en función del grupo poblacional. Para los individuos homocigotos nativos el ratio F fue  $0,54 \pm 0,075$ ; para heterocigotos  $0,056 \pm 0,0056$  y para homocigotos mutantes  $-0,39 \pm 0,047$ .

#### 4.3.5.2. Detección mediante electroforesis

Se hizo electroforesis con el fin de confirmar los genotipos anteriores. La asignación del genotipo, se basó en la presencia o ausencia de la banda específica (producto de 129 pb) en el carril correspondiente a la mezcla de reacción de amplificación nativa o mutante. Se observó que cuando había amplificación específica, aparecía una banda intensa entre 100 pb y 150 pb (Figura 22). Pero que cuando no había o se trataba de la mezcla de reacción nativa, aparecían dos productos adicionales, de 100 pb y menor. Se estimaron los tamaños de las tres bandas observadas (Ecuación 3): 131 pb (tamaño real del producto 129 pb), 107 pb y 70 pb. Esta ecuación también se ajustó a la representación de Ferguson. Los otros productos de menos intensidad pueden correlacionarse con estructuras secundarias formadas por los cebadores. Cabe destacar que, mediante esta técnica de detección, se pudieron determinar todos los genotipos.

$$y = 167,35287e^{-0,00135x}; \quad \ln y = \ln 167,35287 - 0,00135x \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$R^2 = 0,99992$$

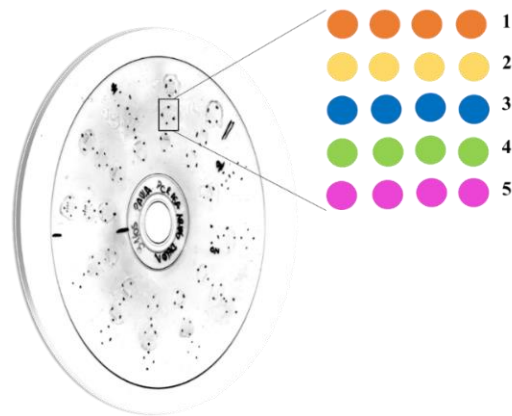


**Figura 22.** Imágenes del gel de agarosa 3% de los productos PCR-ASA con cebadores ARMS, indicando la banda correspondiente al producto específico. Cada muestra ocupa dos carriles pues corresponden a la amplificación con cebador nativo (alelo C) y mutante (alelo T) respectivamente A) Marcador molecular. B) Muestra con genotipo homocigoto nativo. C) Muestra con genotipo heterocigoto. D) Muestra con genotipo homocigoto mutante. E) Control negativo de amplificación, sin ADN molde (NTC).

Dado que estos productos de amplificación estaban marcados con digoxigenina (por la pequeña fracción de dUTPs incorporada), se procedió a detectar mediante hibridación en superficie plana de policarbonato.

#### 4.3.5.3. Detección mediante ensayo de hibridación

Todas las micromatrices de impresión presentaron el mismo formato 5x4 (5 sondas distintas, con 4 réplicas cada una) y en todo el disco (Figura 23). Se eligió este soporte plano porque proporcionaba una gran superficie de ensayo (36 zonas), permitiendo la detección en un único ensayo de un mayor número de muestras distintas y sus respectivas réplicas. También cabría la posibilidad de realizar el ensayo en soportes miniaturizados que facilitasen la portabilidad, así como la individualización de los ensayos. Pero este soporte se utiliza como plataforma modelo, permitiendo una fácil traslación, posteriormente, a otras tecnologías de sensado desarrolladas en el grupo, que incluye el uso de tecnología de disco compacto [30] o escáner documental [39].

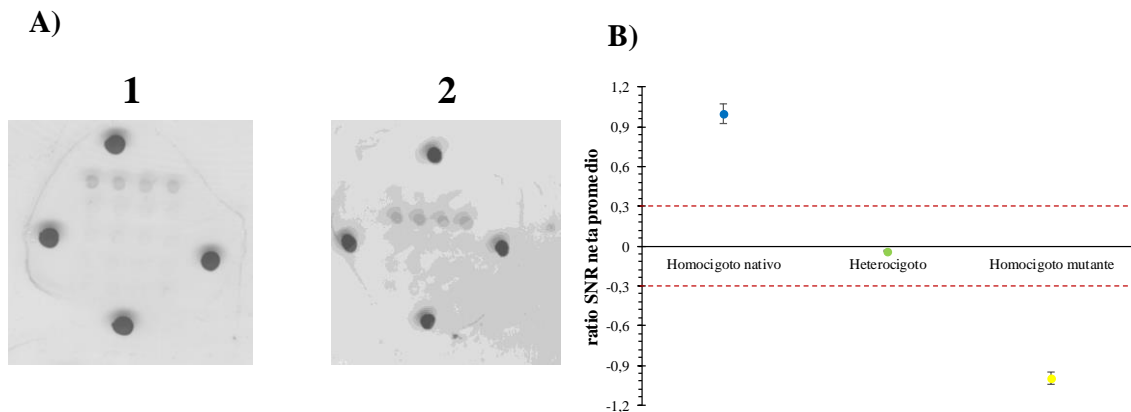


**Figura 23.** Imagen de un disco resultante para ensayo PCR-ASA con cebadores ARMS para el análisis simultáneo de 36 muestras, incluyendo el esquema de impresión de cada micromatriz (5x4). 1. Sonda para cebador universal nativo. 2. Sonda para cebador universal mutante. 3. Sonda para *CYP2C9\*2*. 4. Sonda para *CYP2C9\*3*. 5. Sonda para *ACTB*.

Tal y como se esperaba, en los controles de hibridación negativos, no se observó señal en ninguna de las sondas. En los controles de hibridación positivos, productos post-amplificación *ACTB* para los tres subgrupos poblacionales, se observó señal elevada en la sonda correspondiente.

Para la asignación de los genotipos, fue necesaria la comparación de las intensidades para ambas sondas, complementarias en cada caso al cebador correspondiente. En la Figura 24 se compararon las SNR netas promedio para la sonda nativa y mutante, siguiendo el criterio establecido anteriormente (Ecuación 2). Los ratios SNR neta promedio para los tres subgrupos poblacionales coincidieron con los ratios F anteriores, pero las diferencias entre los grupos fueron más notables, dada la mayor sensibilidad del ensayo.

Por tanto, aunque una futura revisión del ensayo es necesaria, las sondas para los productos de amplificación presentaron una respuesta selectiva al producto correspondiente, permitiendo asignar correctamente el genotipo de todas las muestras.



**Figura 24.** Resultados obtenidos mediante el ensayo de hibridación. A) Imagen resultante de la micromatriz para un genotipo heterocigoto, observándose señal en la sonda nativa (1) y sonda mutante (2). Ratio de la relación señal/ruido (SNR) neta promedio obtenida tras la comparación de las señales para la sonda nativa y mutante, de los productos de amplificación con cebadores ARMS. Se asignó el genotipo en función de éste. Las líneas discontinuas representan el factor de discriminación superior e inferior escogido. Homocigoto nativo: ratio SNR neta promedio  $\geq 0,33$ . Heterocigoto:  $-0,33 \leq$  ratio SNR neta promedio  $< 0,33$ . Homocigoto mutante: ratio SNR neta promedio  $\leq -0,33$ .

La detección mediante electroforesis e hibridación permitió asignar todos los genotipos. El ensayo de hibridación se realizó porque al ser más selectivo y sensible, permitía determinar los resultados con total seguridad. Es importante estar seguro de la correcta asignación de los

genotipos, puesto que en un futuro la población a estudiar serán pacientes con problemas cardiovasculares, y para determinar la dosis correcta del fármaco, será necesario haber establecido anteriormente, un método de detección completamente fiable. A pesar de las ventajas, también presenta algunos inconvenientes como son un mayor coste en comparación con las otras estrategias de detección presentadas, una mayor manipulación de las muestras y un mayor tiempo de ensayo, pues consta de una serie de etapas. Como la asignación de genotipos, a partir de la distintas técnicas de detección de los productos PCR-ASA coincidió, se concluyó que la PCR-ASA con cebadores ARMS era la mejor alternativa para el genotipado de individuos. En base a los resultados obtenidos, se estableció que la frecuencia en homocigoto nativo (0,444) era similar a la frecuencia alélica para genotipo homocigoto nativo registrada en HapMap [40] para la población europea (0,398). Diferenciando más las obtenidas para heterocigoto (0,222) y homocigoto mutante (0,333) respecto a las que hay registradas para heterocigoto (0,407) y homocigoto mutante (0,195). Sin embargo, como estas frecuencias varían según la población de estudio, los resultados fueron similares a la diversidad mundial media (41% genotipo homocigoto nativo, 24% genotipo heterocigoto y 35% genotipo homocigoto mutante) recogida para dicho SNP en SNPedia [41].

#### **4.4. Ligación alelo específica combinada con amplificación genérica**

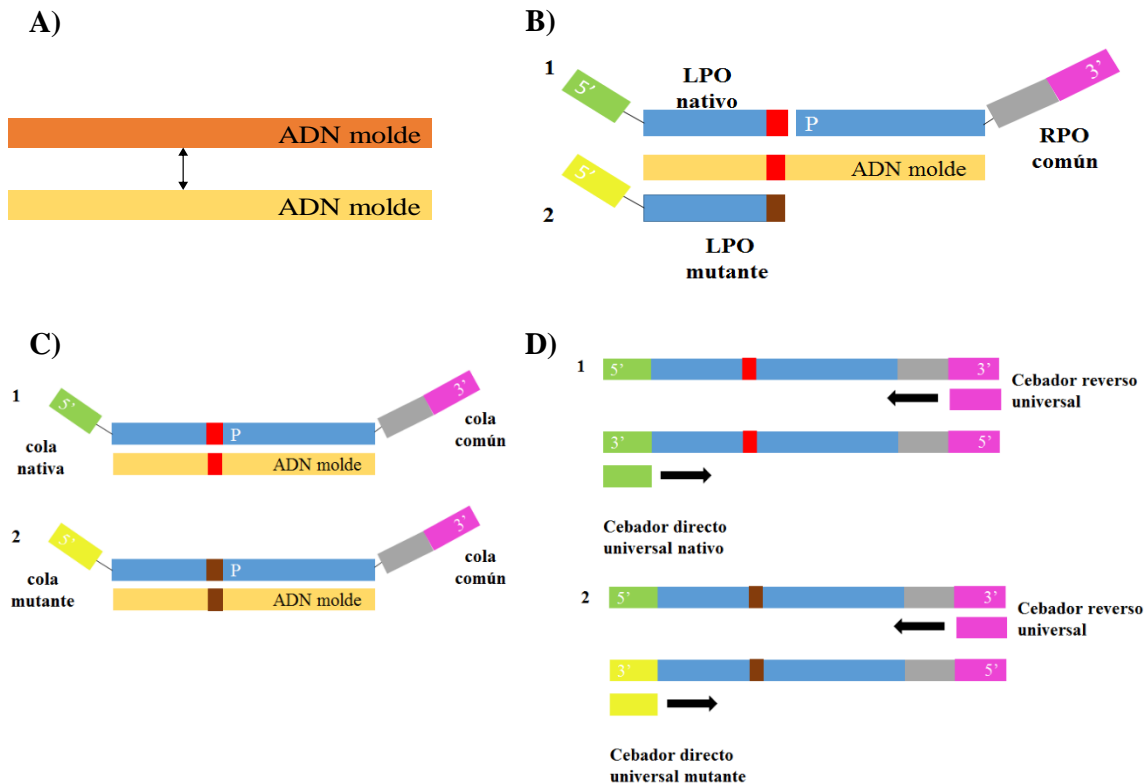
##### **4.4.1. Descripción**

En el presente TFG, se realizó un estudio que apoyase un futuro desarrollo de un método de genotipado que combinara la especificidad de las enzimas ligasas y un sistema de amplificación con cebadores universales, dirigido a la administración de acenocumarol.

A partir de las experiencias preliminares del grupo de investigación, descritas en la patente WO/2017/009515 [31], la estrategia consistió en una ligación alelo específica en disolución. Inicialmente se realiza la hibridación de dos oligonucleótidos de ligación (izquierdo, LPO y derecho, RPO) sobre la misma hebra de ADN de simple cadena, resultante de una etapa de desnaturalización previa. Posteriormente, ambos serán unidos covalentemente (enlace fosfodiéster) por una enzima ligasa de origen bacteriano, siendo el objetivo final la obtención de una secuencia completa que contenga el polimorfismo de un único nucleótido.

La Figura 25 muestra el esquema del ensayo. Se basa en el uso de 3 oligonucleótidos de ligación, complementarios a las regiones flanqueantes del SNP. Hay 2 LPO (uno complementario al alelo normal y otro con el mutado) y 1 RPO, común para las dos variantes del SNP. Los oligonucleótidos LPO llevan una cola distinta en extremo 5' y el RPO en 3' presenta dos colas, una de ellas complementaria a la sonda de hibridación y otra complementaria al cebador de amplificación universal. Sólo se ligarán los oligonucleótidos adyacentes, en el caso en que haya total complementariedad con el ADN molde. Posteriormente, se realiza una amplificación universal, es decir, utilizando cebadores no complementarios a ninguna región del genoma humano y diseñados para hibridar con las colas de los productos de ligación formados. Esta estrategia está ideada para la amplificación simultánea de numerosos productos de ligación bajo unas condiciones experimentales controladas y utilizando únicamente dos cebadores.

Esta aproximación posee similitudes con la técnica semicuantitativa MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que permite determinar el número de copias de más de 60 secuencias de ADN y detectar secuencias específicas (que difieren en un único nucleótido) mediante PCR múltiple. La diferencia con ésta radica en que el oligonucleótido derecho en el extremo 3' presenta una región intercalante (ADN de relleno, de distintos tamaños), para la detección mediante electroforesis capilar, tras la amplificación de todas las secuencias con los mismos cebadores. Esta detección se pudo realizar pues uno de los cebadores de amplificación está marcado con un fluoróforo [42, 43]. Sin embargo, en esta alternativa que se plantea, el LPO lleva en el extremo 3' una región intermedia que permita la posterior detección mediante hibridación.



**Figura 25.** Esquema de la reacción de ligación alelo específica y amplificación universal. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho. 1. Reacción nativa. 2. Reacción mutante. P: grupo fosfato. A) Desnaturalización ADN doble cadena. B) Hibridación de oligonucleótidos correspondientes. C) Ligación alelo específica. D) Amplificación universal.

#### 4.4.2. Generación de controles para la amplificación

Con el fin de monitorizar el funcionamiento del ensayo, se diseñaron y obtuvieron controles de la etapa de amplificación universal con cebadores no codificantes de 18 nucleótidos. La amplificación se realizó en dos reacciones independientes, una con el cebador directo nativo y otra con el mutante con cola en el extremo 5' diferente, siendo el cebador reverso común.

Como controles negativos de amplificación, se empleó una mezcla de reacción sin ADN (NTC) y una mezcla que contenía los reactivos de ligación y ADN genómico humano, pero no sometida a la reacción (control de ligación negativo). Los resultados, recogidos en la Tabla 8, mostraron la ausencia de amplificación, confirmando que los reactivos propios de ligación, no afectaban a la amplificación.

Dado que existen dos reacciones independientes, se diseñaron dos controles de amplificación positivos diferentes. Cada uno presentaba en los extremos las regiones correspondientes al cebador universal reverso y al correspondiente cebador universal directo. Los controles positivos de amplificación se constituyeron a partir del producto de amplificación del gen *CYP2C9*, para el polimorfismo *CYP2C9\*2* (rs1799853) (111 pb). Se escogió este polimorfismo, porque está implicado en la farmacogenética de los anticoagulantes orales cumarínicos. De modo que con estos ensayos al mismo tiempo se obtendrá información para un futuro ensayo multigénico basado en la ligación. Los controles se generaron por amplificación alelo específica de ADN genómico de un individuo con genotipo homocigoto nativo y otro heterocigoto. Los productos post-amplificación se detectaron por fluorescencia y electroforesis (Tabla 8). En ambas técnicas, se observaron diferencias respecto al control negativo.

Se determinó que los productos formados contenían  $10^{10}$  copias. Esto permitía la preparación de disoluciones patrón con un contenido conocido del producto, mediante dilución de éste (p.ej. disolución con  $10^4$  copias). De este modo, cada vez que se realizara la amplificación universal de

los productos de ligación derivados de las muestras de individuos, paralelamente se dispondría de un control positivo del ensayo.

**Tabla 8.** Resultados (fluorescencia y electroforesis) obtenidos de la generación de los controles de amplificación. Significación estadística tras la realización de una prueba-t de cada control con muestra sin ADN (NTC). Valor  $P < 0,05$ . Intensidad neta (u.a.) de la banda electroforética obtenida mediante *GenePix*.

	<i>Fluorescencia</i>	<i>Análisis estadístico</i>	<i>Electroforesis</i>	
			<i>Banda (pb)</i>	<i>Intensidad neta (u.a.)</i>
NTC	2637±316		No	0
Control ligación negativo	2008±303	t=-2,49 valor-P = 0,07	No	0
Control positivo amplificación nativo	5591±671	t = -6,90 valor-P = $2 \cdot 10^{-3}$	116	10220
Control positivo amplificación mutante	8715±462	t=18,81 valor-P = $5 \cdot 10^{-4}$	116	11851

#### 4.4.3. Generación de controles para la ligación

La ligación alelo específica implica dos reacciones independientes, cada una con sus oligonucleótidos a ligar (LPO y RPO) marcados en sus extremos con la correspondiente cola. Así, la reacción de ligación para el alelo nativo contenía el LPO nativo y RPO común, y para el alelo mutante, contenía el LPO mutante y mismo RPO.

Se diseñaron controles negativos y positivos de ligación, para garantizar el funcionamiento del ensayo. Se utilizó un control negativo de todo el proceso (ligación y amplificación universal), que no presentaba ADN molde (NTC) y control negativo de ligación se trataba de ADN genómico no humano de *Salmonella Typhimurium*.

Se prepararon dos controles positivos de ligación, uno contenía la cola nativa o mutante en el extremo 5' y la cola común en el extremo 3'. El control de ligación nativo se generó a partir de la doble hebra de ADN pseudosintético con la secuencia de la región flanqueante al SNP rs9923231 (97 pb). Se trataba de ADN pseudosintético porque se generó a partir de ADN genómico humano y posterior dilución hasta  $10^4$  copias. Tras la ligación, si el producto amplificaba era porque previamente la enzima ligasa había unido el LPO y RPO formando una única secuencia, ya que este producto previamente, no poseía la región de las colas complementarias a los cebadores universales empleados.

Del mismo modo, se obtuvo el control de ligación positivo mutante, pero a partir de una amplificación asimétrica. Este ensayo se caracterizó por una disminución del cebador directo favoreciendo la amplificación de la hebra reversa y la generación de ADN de cadena simple, facilitando así la posterior hibridación del LPO mutante y RPO. Se ensayó para las relaciones estequiométricas concentración de cebador directo respecto cebador reverso, 1:1 – 1:8. En todos los casos, salvo en 1:8, se observaron diferencias significativas (Valor-P < 0,05) en la intensidad de fluorescencia de la muestra de ADN genómico respecto NTC. También que conforme disminuía el cebador directo, lo hacía la intensidad de señal detectada (9%-68%). Por tanto, sí se había producido la ligación en disolución y posterior amplificación universal. Se eligió la muestra 1:2 pues además de presentar una señal detectable, era la que más se diferenciaba del NTC. Así, estos controles empleados en cada ensayo con ADN genómico de individuos, evidenciarían el funcionamiento de la etapa de ligación alelo específica. Los productos se detectaron mediante fluorescencia y electroforesis; y los resultados, acordes con lo esperado, se recogen en la Tabla 9.



**Tabla 9.** Resultados (fluorescencia y electroforesis) post-ligación de los controles de ligación. Significación estadística entre cada control y control negativo de todo el proceso, muestra sin ADN molde (NTC). Valor P < 0,05. Intensidad (u.a.) de la banda electroforética obtenida mediante *GenePix*.

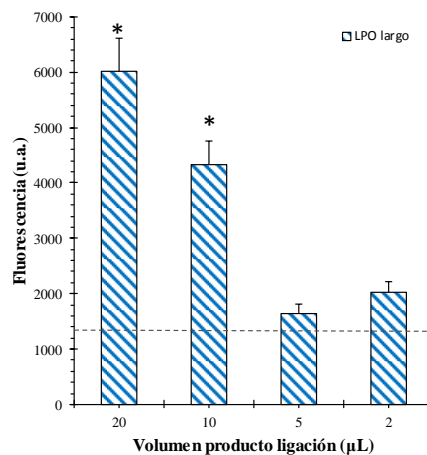
	Fluorescencia	Análisis estadístico	Electroforesis	
			Banda (pb)	Intensidad neta (u.a.)
NTC	1346±202		No	0
Control ligación negativo no humano	1946±291	t = 2,94 Valor-P = 0,04 <sup>1</sup>	No	0
Control positivo ligación nativo doble cadena	4204±631	t = 7,47 valor-P = 0,002	100	2570
Control positivo ligación mutante simple cadena/doble cadena	5408±822	t=8,31 valor-P = 0,001	100	3856

<sup>(1)</sup> Valor-P próximo al límite, se consideró que no había diferencias significativas entre ambos controles negativos de ligación.

#### 4.4.4. Puesta a punto el ensayo

Utilizando los controles preparados y a partir de las condiciones de ligación estudiadas previamente por el grupo, se evaluaron las variables críticas. Se varió el volumen de producto de ligación necesario para la posterior amplificación universal (2-20 µL) y la longitud de la región del LPO que hibrida con el ADN molde (19 ó 25 nucleótidos).

En primer lugar, se observó que para los productos de ligación en que se empleó LPO corto, las señales de fluorescencia no mostraron diferencias respecto al control negativo (NTC). Utilizando el LPO largo, los experimentos variando la cantidad del producto de ligación (Figura 26), se observó que sí mostraban diferencias respecto a NTC, en las diluciones 2:3 (t = -31,00 y valor-P =  $6 \cdot 10^{-6}$ ) y 1:3 (t = -19,76 y valor-P =  $4 \cdot 10^{-5}$ ). Esto evidencia que la mayor longitud de la región de hibridación del LPO con ADN molde tiene un efecto positivo en el ensayo, así como la necesidad de que haya suficiente producto de ligación para la posterior amplificación. Por tanto, como la dilución 1:3 del producto de ligación, era la más pequeña que presentaba señal detectable, se empleó en ensayos posteriores.

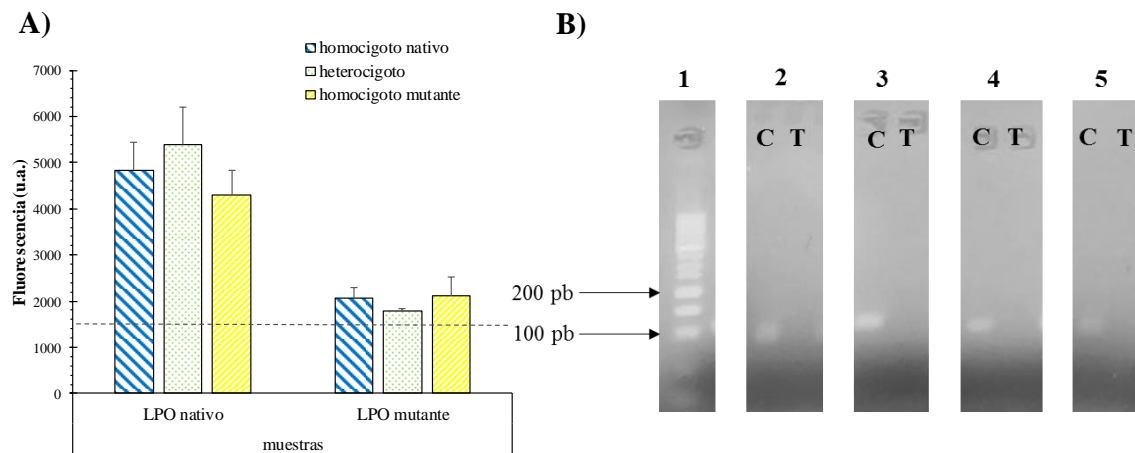


**Figura 26.** Efecto de la dilución del producto de ligación, para un volumen final de 30 µL, utilizando el oligonucleótido de ligación izquierdo (LPO) con 25 nucleótidos de la región de hibridación con ADN molde. La línea discontinua representa la señal registrada para el control negativo de ligación de todo el proceso, sin ADN molde (NTC). (\*) Valor-P < 0,05. Número de réplicas: 3.

A continuación, en estas condiciones seleccionadas, se procedió realizar el ensayo empleando ADN genómico de distintos individuos representativos de las distintas subpoblaciones, y paralelamente con todos los controles generados.



Los productos se detectaron mediante fluorescencia, observándose que para la mezcla de reacción mutante las señales de las muestras eran similares NTC, y a los controles negativos de ligación y amplificación. Sin embargo, para la mezcla de reacción nativa, sí se observaron diferencias respecto a los controles negativos (Figura 27). Estos resultados se comprobaron mediante electroforesis, obteniéndose que, para la mezcla de reacción mutante, no se lograba visualizar banda (coherente con los valores de fluorescencia obtenidos). En el caso de la mezcla de reacción nativa, se visualizaba una banda a 100 pb (tamaño real del producto 97 pb); pero como también se detectó en la subpoblación con genotipo homocigoto mutante, el ensayo no fue selectivo.



**Figura 27.** Resultados de la detección post-ligación y amplificación universal tanto para la mezcla de reacción mutante, como para la mezcla de reacción nativa. Se hizo el ensayo para los tres genotipos posibles y los controles previamente generados. A) Fluorescencia. La línea discontinua representa la señal registrada para el control negativo de ligación de todo el proceso, sin ADN molde (NTC). B) Electroforesis en gel de agarosa 3%. C: alelo nativo. T: alelo mutante. 1. Marcador molecular. 2. Genotipo homocigoto nativo. 3. Genotipo heterocigoto. 4. Genotipo homocigoto mutante. 5. Control negativo de todo el proceso (NTC).

Al combinarlo con el ensayo de hibridación, los productos tampoco se detectaron. Se estudiaron aquellas variables que podrían afectar a la reacción de ligación. Sin embargo, no mejoraron los resultados del ensayo recogidos en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Variables estudiadas en el ensayo de ligación alelo específica. LPO: oligonucleótido de ligación izquierdo. RPO: oligonucleótido de ligación derecho.

Variable estudiada	Rango	Observaciones	
		Reacción nativa	Reacción mutante
Concentración LPO y RPO	0 pM – 500 nM	No selectiva	Ausencia de señal
ADN genómico	0,003 – 150 ng	No selectiva	Ausencia de señal
Concentración ligasa	1x – 16x	No selectiva	Ausencia de señal
Tiempo de la etapa de hibridación	7,5 min – 60 min	No selectiva	Ausencia de señal

Finalmente, como la detección de los controles fue adecuada, se determinó que la no discriminación de las subpoblaciones no era debido a las condiciones de ligación ni amplificación. La estrategia futura a seguir sería el rediseño de los oligonucleótidos izquierdos de ligación alelo específicos, tanto mutante como nativo. Éstos deberían presentar mayor longitud de la región a hibridar con el ADN molde, pues en ensayos anteriores se estableció que mejoraba la señal resultante. A pesar de que hay que tener en cuenta, que una mayor longitud podría incrementar la cantidad de productos secundarios. Otra alternativa paralela sería realizar el ensayo con oligonucleótidos de ligación tipo ARMS, tal y como se hizo en la técnica PCR-ASA. En definitiva, encontrar aquellas condiciones que desestabilizasen los complejos cebador-ADN

molde no específicos, pero que no impidiese la hibridación con el ADN molde, especialmente en la variante mutante.

#### 4.5. Comparación métodos

En este TFG, la técnica PCR-ASA con cebadores ARMS permitió con éxito el genotipado de individuos. A pesar de no haber logrado el genotipado de individuos mediante la estrategia de ligación, se pudieron analizar las propiedades de esta aproximación, recogidas en la Tabla 11, permitiendo una comparación con la primera técnica.

**Tabla 11.** Propiedades de los métodos estudiados.

<i>Propiedades</i>	<i>PCR-ASA con ARMS</i>	<i>Ligación alelo específica + amplificación universal</i>
ADN molde (ng)	4	30
Tiempo de ensayo (min)	90	180
Detección	Fluorescencia	Fluorescencia
	Electroforesis	Electroforesis
	Hibridación	Hibridación
Reproducibilidad <sup>1</sup>	+++	++
Sensibilidad <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
Selectividad	+++	-
Coste <sup>3</sup>	0,82 PCR + 2 hibridación	0,74 ligación + 0,82 PCR
Capacidad de multiplexado	+	+++
Estado ensayo	Confirmado con individuos	Revisión

+: aceptable    ++: buena    +++: muy buena    -: no determinado

(<sup>1</sup>) Estimada mediante el cálculo de la desviación estándar respecto a la media, en un único ensayo con réplicas

(<sup>2</sup>) Estimada a través del mínimo número de copias detectables.

(<sup>3</sup>) Calculado en €/reacción

## **CONCLUSIONES**

## **5. CONCLUSIONES**

Se ha conseguido el objetivo principal del TFG, puesto que se han ensayado diferentes métodos que permiten discriminar los alelos presentes de la variante polimórfica rs9923231 de *VKORC1*, estableciéndose así el genotipo de cada individuo. Además, se ha obtenido información que apoyará la generación con nuevos métodos de genotipado a baja escala. Estos resultados permitirán obtener técnicas extrapolables a la práctica clínica rutinaria, principalmente para su uso en laboratorios no centralizados.

Los métodos no invasivos de extracción de ADN genómico (frotis bucal y cabello) son sencillos, robustos, versátiles y no dolorosos, pudiendo constituir una alternativa frente a los métodos actuales (análisis de sangre) más invasivos y que requieren mayor complejidad en su manipulación y procesamiento adicional. A pesar de estas similitudes, se prefirió la extracción de ADN genómico de epitelio bucal pues además de presentar mayor concentración, el ensayo era más rápido y menos laborioso.

La PCR-ASA con cebadores alelo específico ARMS y la posterior detección mediante hibridación, permitió la discriminación fiable de los genotipos entre los posibles subgrupos poblacionales. Por tanto, podría ser aplicable en la práctica clínica debido a su sencillez, efectividad, rapidez y bajo coste.

La ligación alelo específica combinada con amplificación universal se presenta como un método alternativo de genotipado. Aunque necesita mayor labor experimental, se han puesto a punto controles de las etapas y se han estudiado las condiciones experimentales como influencia de la longitud del oligonucleótido izquierdo de ligación, concentración de oligonucleótidos de ligación, cantidad de ADN genómico, volumen de enzima ligasa y tiempo de la etapa de hibridación

En definitiva, las estrategias desarrolladas en el presente trabajo, aun teniendo en cuenta las limitaciones derivadas de un bajo número de pacientes analizado, son potencialmente integrables en dispositivos de genotipado de altas prestaciones. Desde el punto de vista clínico, permitirá la traslación de la información farmacogenética a la práctica rutinaria previa a la administración del fármaco, subsanando las deficiencias actuales asociadas al diagnóstico de los anticoagulantes orales cumarínicos. De este modo, se minimizarían los frecuentes episodios tromboembólicos y hemorrágicos, consecuencia de una dosis inadecuada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Chan I, Ginsburg G. Personalized Medicine: Progress and Promise. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2011;12(1):217-244.
2. Johnson J, Cavallari L. Pharmacogenetics and Cardiovascular Disease--Implications for Personalized Medicine. *Pharmacological Reviews*. 2013;65(3):987-1009.
3. Ziegler A, Koch A, Krockenberger K, Großhennig A. Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Human Genetics*. 2012;131(10):1627-1638.
4. Scott S. Clinical Pharmacogenomics: Opportunities and Challenges at Point of Care. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2012;93(1):33-35.
5. Valdes R, Payne D, Linder M. *Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics To Clinical Practice*. Washington, DC.: American Association for Clinical Chemistry; 2010.
6. Salamanca D. Dicciomed: Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. *Dicciomedusaes*. <<http://dicciomed.eusal.es/creadores.php?idcre=244>>. [Consulta: 28 de enero de 2017].
7. Benítez Rodríguez J. *Farmacogenética, herramienta para la terapia individualizada de los pacientes*. <<http://www.fundacionpromedic.org/estudios-universitarios/farmacia/ensenanza-continuada/activitats/curso5/libro1/cap6.pdf>> [Consulta: 19 de febrero de 2017].
8. Kim S, Misra A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2007;9(1):289-320.
9. Limaye N. Pharmacogenomics, Theranostics and Personalized Medicine - the complexities of clinical trials: challenges in the developing world. *Applied & Translational Genomics*. 2013;2:17-21.
10. Ragoussis J. Genotyping Technologies for Genetic Research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2009;10(1):117-133.
11. Joseph P, Pare G, Ross S, Roberts R, Anand S. Pharmacogenetics in Cardiovascular Disease: The Challenge of Moving From Promise to Realization. *Clinical Cardiology*. 2013;37(1):48-56.
12. Javier Roncalés F. Tratamiento anticoagulante oral: ¿warfarina o acenocumarol? *Medicina Clínica*. 2008;131(3):98-100.
13. Montes R, Nantes O, Molina E, Zozaya J, Hermida J. Predisposición genética al sangrado durante el tratamiento con anticoagulantes orales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2008;31(3):247-258.
14. Ficha técnica. *Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS - CIMA*. 2017. <<https://www.aemps.gob.es>> [Consulta: 19 de febrero de 2017].
15. Gardiner S. Pharmacogenetics, Drug-Metabolizing Enzymes, and Clinical Practice. *Pharmacological Reviews*. 2006;58(3):521-590.
16. acenocumarol. *PharmGKB*. 2011. <<https://www.pharmgkb.org>> [Consulta: 19 de febrero de 2017].
17. Baker W, Johnson S. Pharmacogenetics and oral antithrombotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016;27:38-42.
18. Johnson J, Cavallari L. Warfarin pharmacogenetics. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2015;25(1):33-41.

19. Hamosh A, Kniffin C. OMIM Entry - \* 608547 - Vitamin K Epoxide Reductase Complex, Subunit 1; *VKORC1*. *Omimorg*. 2004. <<https://www.omim.org>>. [Consulta: 16 de febrero de 2017].
20. User S. Pruebas genéticas - Citocromos P450 y metabolismo de medicamentos, (Polymorphisms of Cytochromes P450 and Drug Methabolism) - Genes CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6. - IVAMI. *Ivamicom*. <<http://www.ivami.com>> [Consulta: 16 de febrero de 2017]
21. Scott A, Hartz P. OMIM Entry - \* 601130 - Cytochrome P450, subfamily 2C, polypeptide 9; *CYP2C9*. *Omimorg*. 1996. <<https://www.omim.org>> [Consulta: 16 de febrero de 2017].
22. Assessing the Clinical Benefits of a Pharmacogenetics-Guided Dosing Regimen for Calculating Warfarin Maintenance Dose - Full Text View - ClinicalTrials.gov. *Clinicaltrials.gov*. 2008. <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00700895?term=warfarin&draw=1&rank=1>>. [Consulta: 11 de abril de 2017].
23. Efficacy and Safety of Acenocoumarol for Treatment of Nontumor Portal Vein Thrombosis in Cirrhosis of Liver - Full Text View - ClinicalTrials.gov. *Clinicaltrials.gov*. 2012. <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01631877?term=acenocoumarol&draw=1&rank=3>> [Consulta: 11 de abril de 2017].
24. *Coumadin (Warfarin Sodium) Tablets Label - FDA*.; 2011. <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/009218s107lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/009218s107lbl.pdf)> [Consulta: 6 de mayo de 2017].
25. Annotation of CPIC Guideline for warfarin and *CYP2C9, CYP4F2, VKORC1*. *PharmGKB*. 2017. <<https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166104949>>. [Consulta: 6 de mayo de 2017].
26. Pharmacogenetic Dosage Algorithm for Acenocoumarol- ClinicalTrials.gov. *Clinicaltrials.gov*. <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03015025?term=acenocoumarol&rank=1>> [Consulta: 6 de mayo de 2017].
27. Higashi M. Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy. *JAMA*. 2002;287(13):1690.
28. Tortajada-Genaro L.A., Puchades R, Maquieira Á. Primer design for SNP genotyping based on allele-specific amplification—Application to organ transplantation pharmacogenomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;136:14-21.
29. Sassolas A, Leca-Bouvier B, Blum L. DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews*. 2008;108(1):109-139.
30. Tortajada-Genaro L.A., Mena S, Niños R, Puigmule M, Viladevall L, Maquieira Á. Genotyping of single nucleotide polymorphisms related to attention-deficit hyperactivity disorder. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016;408(9):2339-2345.
31. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA. Método de genotipado simultáneo de polimorfismos y/o mutaciones. 2017.
32. Kibbe W. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*. 2007;35(Web Server):W43-W46.
33. Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 1997; 63(10), 3741-3751.
34. Secuenciación masiva. Next Generation Sequencing (NGS). *Cultekcom*. <[http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Secuenciacion\\_Masiva&opc=introduccion&idap=36](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Secuenciacion_Masiva&opc=introduccion&idap=36)>. [Consulta: 10 de mayo de 2017].

35. Medintz I. High-Performance Multiplex SNP Analysis of Three Hemochromatosis-Related Mutations With Capillary Array Electrophoresis Microplates. *Genome Research*. 2001;11(3):413-421.
36. Baskaran N, Kandpal R, Bhargava A, Glynn M, Bale A, Weissman S. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Research*. 1996;6(7):633-638.
37. Newton C, Graham A, Heptinstall L et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*. 1989;17(7):2503-2516.
38. Tortajada-Genaro L.A., Rodrigo A, Hevia E, Mena S, Niñoles R, Maquieira Á. Microarray on digital versatile disc for identification and genotyping of Salmonella and Campylobacter in meat products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407(24):7285-7294.
39. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Maquieira Á. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchimica Acta*. 2017;184(5):1453-1462.
40. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs9923231 <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=9923231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9923231)> [Consulta: 20 de junio de 2017].
41. rs9923231 - SNPedia. *Snpedia.com*. <<https://www.snpedia.com/index.php/Rs9923231>> [Consulta: 20 de junio de 2017].
42. *MLPA® General Protocol*. 5th ed. Amsterdam; 2014:1-7. <<https://www.mlpa.com>> [Consulta: 1 de febrero de 2017].
43. Landegren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science*. 1988;241(4869):1077-1080.



**ANEXO**

## 7. ANEXO

Parte de estos resultados se incluyeron como comunicación tipo póster (Sanchón Sánchez P, Yamanaka E, Tortajada-Genaro L, Maquieira Á. Detección de polimorfismos de un único nucleótido como herramienta farmacogenética para la administración de anticoagulantes orales). en el *XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*. Valencia, 2017.