

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



MÉTODO PARA EL GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEÓTIDO RELACIONADOS CON LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO ANTICOAGULANTE WARFARINA

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: **Teresa León Sala**

TUTOR/A: Dr. Luis A. Tortajada Genaro

COTUTOR/A: Dra. Regina Niñoles Rodenes

Curso Académico:2014-2015

VALENCIA, Septiembre 2015



TÍTULO: Método para el genotipado de polimorfismos de único nucleótido relacionados con la administración del fármaco anticoagulante warfarina.

AUTORA: Dña. Teresa León Sala

TUTOR: Prof. D. Luis A. Tortajada Genaro

COTUTORA: Dña. Regina Niñoles Rodenes

Valencia, Septiembre de 2015.

La warfarina es el anticoagulante oral más utilizado a nivel mundial, pero su respuesta presenta un índice terapéutico estrecho y una amplia variabilidad interindividual. En los últimos años, estas diferencias entre pacientes han sido relacionadas con polimorfismos de única base (SNP) en genes involucrados en su metabolismo. Sin embargo, las herramientas farmacogenéticas, que apoyarían una medicina individualizada dependiendo del perfil genético del paciente, tienen un coste elevado y su implantación en la práctica clínica todavía no es una realidad.

En este trabajo se ha iniciado el desarrollo de una plataforma de análisis farmacogenético de bajo coste para el genotipado de SNPs con demostrada relevancia clínica en el efecto terapéutico de la warfarina. Se basa en una amplificación PCR específica de alelo (PCR-ASA) seguida de un ensayo de micromatrices de ADN, utilizando la tecnología del disco compacto.

Seleccionando el genotipado del SNP CYP2C9*2 como modelo, se han estudiado las condiciones para lograr integrar ambas técnicas. Los resultados han indicado que 64 °C es la temperatura óptima de amplificación. Para reducir interferencias con la hibridación, se ensayó la adición de una etapa de purificación posterior a la amplificación así como variantes de la PCR-ASA. La amplificación alelo selectiva seguida de una amplificación universal originó una elevada señal en disco. No obstante, la PCR-ASA asimétrica fue la técnica seleccionada por la reproducibilidad de sus resultados. Además, se añadió un oligonucleótido bloqueante para mejorar la discriminación alélica durante la reacción de amplificación, pero los resultados no fueron robustos. Para la extensión del método de genotipado, se llevaron a cabo los ensayos iniciales del estudio con otros dos SNPs relacionados con el metabolismo de la warfarina: VKORC1 y CYP2C19*17. No se detectó que hubiera reactividad cruzada durante la hibridación, lo que permitirá su análisis en un solo ensayo.

La metodología propuesta resulta ser una herramienta rápida, compacta, barata y versátil, proporcionando una vía potencial para determinar la administración de estrategias terapéuticas personalizadas, mejorando su eficacia y reduciendo el daño generado por dosis incorrectas.

Palabras clave: *farmacogenética, warfarina, amplificación específica de alelo, polimorfismos, DVD.*

Warfarin is the most used worldwide oral anticoagulant, even though its response shows a narrow therapeutic index and a large inter-individual variability. In the past years, these differences between patients had been related to single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes involved in this drug's metabolism. However, the available pharmacogenetic tools that would support an individualized medical treatment depending on the genetic profile of the patient have a really high cost and their clinical implantation is far from being a reality.

In this project, the development of a low cost pharmacogenetic analysis platform for the genotyping of SNPs with demonstrated clinical relevance in the therapeutic effect of warfarin was initiated; this work is based on an allele specific PCR amplification (ASA-PCR), followed by a DNA microarray assay, using the compact disc technology.

By choosing the genotyping of the CYP2C9*2 SNP as model, the conditions to achieve the integration of both techniques were studied. Results showed that 64 °C is the optimum temperature for the amplification. In order to reduce interferences with the hybridization, the addition of a purification phase after ASA-PCR was studied, as well as some ASA-PCR variants. The ASA-PCR followed by an universal amplification got a higher signal in disc. Nevertheless, the asymmetric ASA-PCR was the selected technique because of its reproducible results. Moreover, a blocking oligonucleotide was added in order to improve the allelic discrimination during the amplification reaction, but the results obtained were not robust enough. For the extension of the genotyping method, the initial assays of the study were performed with two other SNPs related with the metabolism of warfarin: VKORC1 and CYP2C19*17. During the hybridization procedure, no cross reactivity was detected, meaning that its analysis can be done in the same assay.

The methodology proposed is a fast, compact, cost effective and versatile tool. It represents a potential manner to determine the administration of personalized therapeutic strategies, improving its efficiency and reducing the damage caused by incorrect doses of the drug.

Key words: *pharmacogenetics, warfarin, allele specific amplification, polymorphisms, DVD.*

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer tanto a Ángel Maquieira como a Rosa Puchades la oportunidad de realizar mi trabajo de final de grado en el departamento de Química, donde me he sentido bienvenida y cuidada desde el primer día por el gran grupo que encabezan.

A Luis A. Tortajada, profesor durante la carrera y tutor de este trabajo. Por transmitirme desde el principio y hasta el final su pasión por la ciencia, la investigación y las cosas bien hechas. Por enseñarme día a día, invirtiendo el tiempo necesario a resolver todas las cuestiones, a desenvolverme en el mundo de la investigación. Gracias por tu paciencia y dedicación desde el primer día de clase.

A Regina, por haberme acompañado de la mano al principio y haberme seguido de cerca después. Por tu interés, tus consejos, tu actitud siempre disponible y atenta, por todo lo que me has enseñado durante estos meses. Por ser clara y paciente, por alegrarte y preocuparte conmigo y por tus ánimos constantes. Gracias por sacar tiempo de debajo de las piedras para ayudarme cuando iba perdida, porque has sido mi mayor apoyo durante esta experiencia.

A todo el grupo de investigación, por haberme hecho sentir acogida y cuidada. Muchas gracias por todas las palabras de ánimo, los consejos y por contarme vuestras propias experiencias. Habéis hecho que la parte humana de este trabajo haya sido un diez. Especialmente, quiero agradecerles a Eric y a Noelle su ayuda y disponibilidad total, sus sonrisas y palabras de ánimo cuando parecía que nada iba a salir bien.

A mi segunda gran familia, porque os lo merecéis aunque las tantas horas que hemos pasado juntos durante estos cuatro años necesiten más de un párrafo para agradecerlos cada uno de los momentos que hemos disfrutado. Gracias por haberme hecho ser quien soy, por ser el mayor apoyo que se puede desear durante esta etapa (que todos sabemos que no es sencilla). Sobre todo gracias por ser un grupo de verdad, de los que comparten las penas, amortiguan las caídas y celebran las victorias (todo tipo de victorias) por todo lo alto. A todos vosotros, uno por uno, muchas gracias. Os quiero.

A mi familia de verdad, por haber creído en mi desde que decidí estudiar eso que no sabéis muy bien de qué va. Por interesaros por lo que hago y a dónde quiero llegar y por animarme a que haga lo que tenga que hacer para conseguirlo. Por soportar mis cambios de humor y quererme sin condiciones. Gracias por saber lo mucho que os quiero, aunque a veces me cueste decirlo. En particular, gracias a ti, Adri, por animarme a conseguir mis metas, y por darme amor y buenos consejos mientras lo intento.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Warfarina	2
1.2 Mecanismo de acción de la warfarina	3
1.3 Farmacogenética relacionada con la warfarina	4
1.3.1 Genes.....	4
1.3.2 SNPs.....	6
1.4 Herramientas para el genotipado de SNPs	7
1.4.1 Estrategias de discriminación de alelos	7
1.4.2 Técnicas de genotipado.....	8
1.5 Tecnologías alternativas para el genotipado de SNPs	9
1.5.1 Biosensores	10
1.5.2 Tecnología del disco compacto	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Toma de muestras y extracción de ADN	15
3.2 Amplificación de ADN.....	15
3.2.1 PCR-ASA.....	15
3.2.2 PCR-ASA asimétrica	16
3.2.3 PCR-ASA seguida de PCR universal.....	16
3.3 Métodos de caracterización de los productos de la amplificación de ADN.....	16
3.3.1 Fluorescencia.....	16
3.3.2 Electroforesis en gel de agarosa	16
3.4 Purificación de los productos de amplificación.....	17
3.5 Genotipado mediante Golden Gate	17
3.6 Genotipado mediante la tecnología de disco compacto	17
3.6.1. Inmovilización de las sondas	17
3.6.2. Hibridación de las muestras	18
3.6.3 Revelado y análisis de datos.....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1 Principio del ensayo y diseño de los oligonucleótidos.....	20
4.2 Amplificación específica de alelo	21
4.3 Integración de la PCR-ASA e hibridación.....	23
4.4 Adición de bloqueante.	29

4.4.1 Diseño del bloqueante	30
4.4.2 Estudio del efecto del bloqueante	31
4.5 Extensión a otros genes	35
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

Índice de Figuras

Figura 1. Molécula de warfarina (4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-cumarina).

Figura 2. Mecanismo de acción de la warfarina.

Figura 3. Representación tridimensional de la enzima CYP2C9 con el grupo hemo visible en el centro.

Figura 4. Genotipado mediante extensión de cebador. a) Utilizando cebador directo común y extensión de una sola base. b) Utilizando cebador específico de alelo.

Figura 5. Esquema de la detección de señal y generación de imágenes mediante un lector de DVD común.

Figura 6. Esquema de la matriz de impresión, donde 1: sonda de CYP CYP2C19*17; 2: sonda de CYP2C9*2; 3: sonda de VKORC1; 4: control positivo de hibridación; 5: control positivo de detección.

Figura 7. Posición de cebadores directo (FP) y reverso (RP) con su cola universal (SONDA) respecto a la secuencia del gen CYP2C9.

Figura 8. Representación gráfica de las medidas de fluorescencia obtenidas de la PCR-ASA en gradiente de temperaturas del SNP CYP2C9*2 en dos individuos con distinto genotipo. Reacciones A: reacciones de amplificación con el cebador específico de alelo mutante (A). Reacciones B: reacciones de amplificación usando el cebador específico de alelo nativo (B). Cuadro marcando el rango de temperaturas óptimo para la discriminación. Número replicas = 3.

Figura 9. Imagen de los productos de PCR-ASA a 64°C del SNP CYP2C9*2 para los dos tipos de genotipo posibles. Tamaño calculado mediante el patrón de peso molecular exACTGene 50bp Mini DNA Ladder.

Figura 10. Señales de hibridación de los productos de amplificación de un individuo heterocigoto para el SNP CYP2C9*2 con ambos cebadores específicos independientemente. ns= no significativo. Número réplicas=5.

Figura 11. A) Señal de fluorescencia neta del producto de amplificación de un individuo heterocigoto con diferentes concentraciones de cebadores. B) Señal de hibridación de la amplificación de un individuo homocigoto nativo con diferentes concentraciones de cebadores. Número réplicas=5.

Figura 12. Señales de hibridación de los productos de PCR-ASA asimétrica de un individuo heterocigoto. Concentración de cebador directo=300 nM. Número réplicas=5.

Figura 13. Esquema de la amplificación PCR-ASA seguida de una amplificación universal; donde U=secuencia universal, FP=cebador directo, RP=cebador reverso, S=sonda, U_FP=cebador directo universal, U_RP=cebador reverso universal, n1=número de ciclos de amplificación específica y n2=número de ciclos de amplificación universal.

Figura 14. A) Señales SNR para diferentes concentraciones de cebadores específicos de alelo, realizando 25 ciclos universales de amplificación de un individuo homocigoto nativo. B) Señales SNR obtenidas tras realizar distinto número de ciclos universales en cada caso, utilizando 50 nM de cebador específico durante la amplificación de un individuo homocigoto nativo. Número réplicas=5.

Figura 15. Señales SNR obtenidas con las mejores condiciones de cada una de las aproximaciones utilizadas para la integración de la PCR-ASA con la hibridación. Individuo heterocigoto. Número réplicas=5.

Figura 16. A) Esquema diseñado para este trabajo de la amplificación específica seguida de la hibridación en disco. B) Imágenes del disco correspondientes al genotipo homocigoto y heterocigoto para CYP2C9*2, obtenidos tras la amplificación independiente de las muestras con cada par de cebadores específicos. Reacción A=reacción mutante. Reacción B=reacción nativa.

Figura 17. Esquema del funcionamiento de la adición del bloqueante A (mutante) a la reacción de amplificación A (mutante). FP_A=cebador directo A, RP=cebador reverso, S=sonda.

Figura 18. A) Representación química de la molécula deoxicitidina. B) Representación química de la molécula dideoxicitidina (ddC).

Figura 19. Señal de fluorescencia obtenida en función de la temperatura de fusión utilizada en la amplificación por PCR-ASA de un individuo homocigoto nativo (BB) para el SNP rs1799853. A: alelo mutante. B: alelo nativo. Reacciones de amplificación A y B: [cebador]=150 nM, [bloqueante]=500 nM. Bloqueantes A y B añadidos, por separado, en ambas reacciones.

Figura 20. Señal de fluorescencia obtenida tras la PCR-ASA de un individuo homocigoto nativo (BB) del SNP rs1799853 en función del ratio bloqueante:cebador para la reacción nativa, con unos ratios entre 0 y 5. n=10

Figura 21. A) Señal de fluorescencia en función de la temperatura de anillamiento y del ratio bloqueante A:cebador A añadido a la mezcla de reacción para un paciente homocigoto nativo (BB). B) Electroforesis en gel de agarosa 3% de algunos productos de la amplificación anterior. T^a=56°C 1) Marcador de peso molecular. exACTGene 50bp Mini DNA Ladder 2) Producto con ratio 0. 3) Producto con ratio 1,66. 4) Producto con ratio 3,33. 5) Producto con ratio 6,66.

Figura 22. Señal de fluorescencia en función de la concentración de cebadores específicos y de bloqueante mutante añadidos a la reacción PCR-ASA para el genotipado de un individuo homocigoto nativo. ND: dato no disponible. Número réplicas=10.

Figura 23. Señal de fluorescencia obtenida tras la amplificación de un individuo homocigoto nativo (BB) para el SNP rs1799853, añadiendo los dos bloqueantes en ambas reacciones independientemente. T anillamiento=38°C. [cebadores]=100 nM.

Figura 24. Esquema de la micromatriz e imágenes de disco obtenidas de la hibridación de un individuo heterocigoto para CYP2C9*2. A=Reacción mutante. B=Reacción nativa.

Figura 25. Representación gráfica de las medidas de fluorescencia obtenidas de la PCR-ASA en gradiente de temperaturas del SNP VKORC1 en dos individuos con distinto genotipo. Reacciones A: reacciones de amplificación con el cebador específico de alelo mutante (A). Reacciones B: reacciones de amplificación usando el cebador específico de alelo nativo (B). Cuadro marcando la temperatura óptima para la discriminación. Número replicas = 3.

Índice de Tablas

Tabla 1. Algunas enzimas metabolizadoras de fármacos y el efecto de los polimorfismos sobre la actividad del fármaco.

Tabla 2. Frecuencia alélica del SNP CYP2C9*2. Individuos CEU. Fuente: NCBI.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ASA: Amplificación específica de alelo

ASO: Oligonucleótidos específicos de alelo

CYP: Citocromo

dUTPs: Digoxigenina-desoxiuridina trifosfato

DVD: Disco digital versátil

FP: Cebador directo

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: tampón fosfato salino 0,05% Tween

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

POC: "Point of care"

RP: Cebador reverso

SNP: Polimorfismo de única base (Single nucleotide polymorphism)

SNR: Relación señal/ruido

SSC: Tampón citrato sódico salino

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

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo, como en la población española. Hoy en día estas enfermedades son responsables de aproximadamente el 31% de las muertes registradas en el mundo anualmente. Pese a existir factores de riesgo intrínsecos de cada persona, la mayoría de enfermedades puede prevenirse actuando sobre aquellos que son comportamentales: dietas inadecuadas, obesidad, sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol, etc.

Este grupo de enfermedades no transmisibles incluye patologías que afectan tanto al corazón como a los vasos sanguíneos, y engloba: cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y trombosis venosa profunda y embolias pulmonares (Mensah y Brown, 2007). La trombosis es la ocupación de la luz de los vasos sanguíneos por un coágulo de sangre o trombo. En la trombosis venosa profunda se producen estos trombos en las venas más profundas del cuerpo, pudiendo desprenderse y llegar a otra parte del cuerpo donde genere un problema mayor, como una embolia pulmonar o un accidente cerebrovascular (Heit *et al.*, 2000). Este tipo de enfermedades requieren de una prevención adecuada, pero sobretodo de una detección y tratamiento precoces.

Los fármacos con acción anticoagulante representan la primera línea de actuación frente a la prevención y tratamiento de la trombosis. Actúan alterando diferentes vías que conforman la cascada de coagulación, ya sea limitando la producción de trombina directamente o bloqueando otros activadores de la ruta (Alquwaizani *et al.*, 2013). Son usados en terapias de larga duración y conllevan un riesgo asociado a posibles hemorragias y aumento de la tasa de recaída, además de por la variabilidad entre los distintos individuos de la población. Según donde intervengan, los fármacos se dividen en tres grupos: inhibidores de la trombina, inhibidores de FXa y antagonistas de la vitamina K (Ahrens *et al.*, 2010). Los fármacos más usados son la heparina y la heparina de bajo peso molecular, inhibidores de FXa, rivaroxaban y warfarina (antagonistas de vitamina K).

1.1 Warfarina

La warfarina (Figura 1) fue descubierta en los inicios del siglo XX y comercializada como raticida, y es hoy en día el anticoagulante por excelencia, sobretodo destinado a pacientes con fibrilación auricular. Al igual que otros anticoagulantes orales, pertenece al grupo de las 4-hidroxicumarinas. Tiene un centro quiral y su síntesis industrial origina una mezcla racémica, presentando el enantiómero S hasta 5 veces más actividad que el enantiómero R (Ufer, 2005).

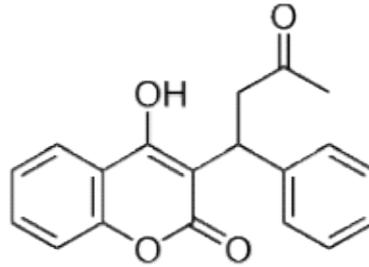


Figura 1. Molécula de warfarina (4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-cumarina).

1.2 Mecanismo de acción de la warfarina

La warfarina actúa, tal y como muestra la Figura 2, sobre la vitamina K reductasa, inhibiéndola, lo que desencadena un agotamiento de la forma reducida de dicha vitamina (vitamina KH₂). La vitamina K es un cofactor de la carboxilación de los residuos de glutamato presentes en el extremo N terminal de las proteínas dependientes de esta vitamina. Así pues, mediante la administración de Warfarina, se limita la gamma-carboxilación y posterior activación de las proteínas coagulantes dependientes de la vitamina K. Es decir, se inhibe la síntesis de los factores II, VII, IX y X de la cascada de coagulación, así como las proteínas anticoagulantes C y S. La carencia de tres de los cuatro factores coagulantes dependientes de vitamina K, desencadena un descenso en los niveles de protrombina y por tanto, un descenso en la cantidad de trombina generada y unida a la fibrina. De esta forma se reduce la trombogenicidad de los coágulos (DRUG BANK, 2015)

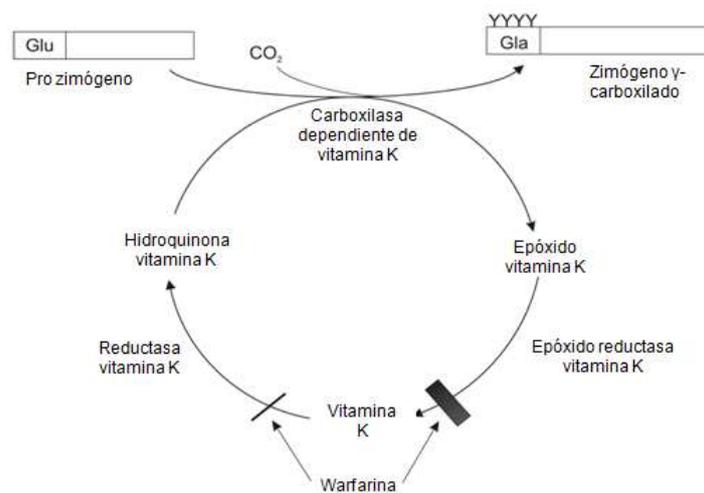


Figura 2. Mecanismo de acción de la warfarina.

El fármaco estudiado es administrado oralmente, al igual que otros medicamentos antagonistas de vitamina K. Es absorbido rápidamente en el tracto gastrointestinal, logrando en pocas horas llegar a la concentración máxima en plasma y uniéndose fuertemente a las proteínas presentes en él.

El metabolismo de la warfarina se puede dividir en dos. Por un lado, dependiente de la actividad de la enzima CYP, el metabolismo tendrá lugar en la fracción microsomal de los hepatocitos, y se obtendrán metabolitos monohidroxilados de warfarina, así como cis/trans-dehidro-warfarina. Por otro, independiente de dicha actividad enzimática, la reducción de la warfarina se dará en el retículo endoplasmático y el citoplasma, produciendo dos alcoholes diastereómeros de warfarina.

La excreción de los productos derivados del fármaco depende en su práctica totalidad del metabolismo y se lleva a cabo por el sistema excretor (80% en la orina y 20% en las heces). Cabe destacar que la excreción de la warfarina no metabolizada es despreciable (Ufer, 2005).

1.3 Farmacogenética relacionada con la warfarina

1.3.1 Genes

La efectividad de un agente farmacológico puede estar influenciada por una gran cantidad de factores inherentes al paciente y otros factores externos como la dosis, el tiempo de administración, interacciones con otros fármacos... Estos factores afectan a la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco. La incorrecta administración de fármacos o su dosis originan millones de hospitalizaciones anualmente debidas a reacciones adversas. También, se observa que el efecto de un mismo fármaco es diferente entre pacientes. Esto se debe a que variaciones en genes concretos relacionados con la enfermedad en cuestión, pueden llegar a modificar la estructura de las enzimas que intervienen en la absorción y metabolismo del fármaco administrado, y provocar así alteraciones en la respuesta al mismo.

La farmacogenética se podría definir como la disciplina orientada al estudio de las bases genéticas de las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos, tanto a nivel de eficacia como de seguridad (Cabaleiro *et al.*, 2011).

En busca de proporcionar un sistema sanitario seguro, nacieron dos disciplinas basadas en el estudio del perfil genético de cada individuo: la farmacogenética está centrada en un solo gen y la farmacogenómica está focalizada en un gran grupo de genes al mismo tiempo. Ambas aproximaciones permiten avanzar en la comprensión de las consecuencias clínicas que pueden producir algunos medicamentos como establecer las bases de una medicina personalizada (Shastry, 2006).

Con el objetivo de encontrar y catalogar las diferencias y similitudes genéticas entre individuos que permitieran entender mejor su interacción con la salud humana, nació el proyecto internacional HapMap a finales del año 2002. Con el paso de los años se ha conseguido conformar, gracias a la colaboración de entidades investigadoras de 6 países, un catálogo de las variantes genéticas comunes en los seres humanos. Junto con el proyecto 1000 Genomes, constituyen una base de datos

de acceso libre donde se pueden encontrar las diferencias genéticas más comunes entre individuos. Éstas son los denominados polimorfismos de una única base (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) (1000 GENOMES, 2015) (NCBI). Los SNPs son marcadores genéticos excepcionales, cuyo único requisito para no ser considerado como mutación (frecuente y generalmente asociada a enfermedades genéticas) es que la base menos frecuente debe tener menos de un 1% de persistencia en la población. Suelen ser bialélicos, siendo muy raros los casos en los cuales las variaciones son trialélicas o tetralélicas.

El valor predictivo del análisis farmacogenético de ciertos SNPs permite obtener un mayor éxito terapéutico, disminuyendo posibles efectos adversos, tiempo y coste al sistema sanitario. Cada vez más extendida la importancia de este tipo de análisis previos al tratamiento de cualquier paciente, se han realizado grandes avances en este campo. No obstante, la Agencia Europea de Medicamentos sólo permite ciertos test genéticos para la detección de genes con alta variabilidad relacionados con el metabolismo de los fármacos o el funcionamiento algunas dianas moleculares a las que se dirigen, dificultando la utilización de la farmacogenética en la práctica clínica.

En la Tabla 1 se pueden ver algunos ejemplos de proteínas que pueden presentar cambios fenotípicos dependiendo del SNP del paciente, y que pueden afectar a la eficacia de ciertos medicamentos.

Tabla 1. Algunas enzimas metabolizadoras de fármacos y el efecto de los polimorfismos sobre la actividad del fármaco.

Enzima	Fármacos	Polimorfismo
CYP2D6	Debrisoquina, sparteína y nortriptilina Codeína	Aumento del efecto del fármaco Descenso del efecto del fármaco
CYP2Cp	Warfarina Fenitoína	Aumento del efecto del fármaco
CYP2C19	Omeprazol	Aumento del efecto del fármaco
N-acetiltransferasa	Isoniazida Hidralazina Procainamida	Aumento del efecto del fármaco
UGT1A1	Irinotecan Bilirrubina	Aumento del efecto del fármaco Síndrome de Gilbert
TPMT	Azatioprina Mercaptopurina	Aumento del efecto del fármaco (toxicidad)
COMT	Levodopa	Aumento del efecto del fármaco

1.3.2 SNPs

La warfarina es administrada en tratamientos de larga duración, por lo que el riesgo de perder sensibilidad a su acción anticoagulante aumenta con el tiempo. El índice terapéutico constituye una medida del margen de seguridad de un medicamento. En el caso de la warfarina, el índice terapéutico es muy estrecho y su eficacia depende de mantener dicho índice en los niveles adecuados. Para el seguimiento de estos pacientes, se medirá el tiempo de protombina, o el ratio normalizado internacional, que deberá mantenerse entre 2 y 3. En el caso de que el tratamiento estuviera por debajo de la dosis terapéutica, aumenta el riesgo de que se creen coágulos, mientras que si es demasiado alto podrían producirse hemorragias en cualquier órgano del cuerpo (Kamali y Wynne, 2010). Otros medicamentos modifican su efectividad potenciando su efecto (ejemplo: omeprazol) o inhibiéndolo (ejemplo: rifampicina) (VADEMECUM, 2015).

La variabilidad en la respuesta entre individuos ha llevado a realizar múltiples estudios buscando las posibles causas genéticas responsables. Particularmente, se han estudiado SNP relacionados con los citocromos P450 (CYP). Son una gran familia de enzimas que metabolizan la warfarina y la mayoría de sustancias químicas extrañas y medicamentos que entran en el organismo, así como otros compuestos endógenos tales como los esteroides. En concreto, la proteína CYP2C9, miembro de esta familia, tiene una gran importancia en el metabolismo e inactivación de la S-warfarina (Figura 3). Las variaciones genéticas en este tipo de enzimas son relativamente frecuentes.

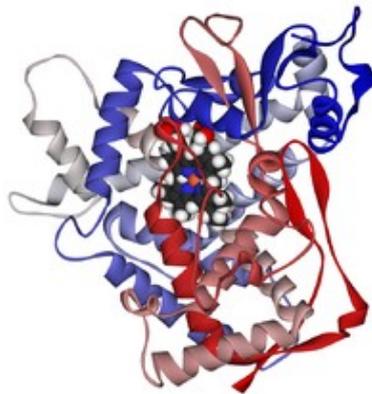


Figura 3. Representación tridimensional de la enzima CYP2C9 con el grupo hemo visible en el centro. Fuente: PDB.

Los polimorfismos en el gen codificante para esta enzima dan lugar a proteínas con diferente actividad catalítica. El alelo nativo (actividad enzimática del 100%) ha sido designado como CYP2C9*1 (Arg144/Tyr356/Ile359/Gly417), y las otras dos variantes más comunes como CYP2C9*2 (Arg144Cys) y CYP2C9*3 (Ile359Leu). Sólo el 2% de la población caucásica es homocigota para el alelo nativo, mientras que el 20% es heterocigota *1*2. El alelo *3 se encuentra mucho menos presente, ni siquiera en heterocigosis con el alelo original.

La presencia del alelo *2, en el cual nos centraremos en este trabajo, supone una disminución del 30% de la actividad enzimática. Al paciente con este alelo se le debe disminuir la dosis media diaria, o de lo contrario podría aumentar el riesgo de sangrados. Aquellos sujetos con al menos una copia de este alelo reciben 0.85 mg menos (0.60-1.11) de la dosis habitual, es decir, un 17% menos (Sanderson *et al*, 2005).

Otro punto clave en la farmacogenética de la warfarina es el gen cuya enzima es la diana de las cumarinas: la epóxido reductasa de vitamina K (VKOR). Esta enzima forma parte del ciclo de la vitamina K y es responsable de la regeneración de la hidroquinona de vitamina K a partir de la 2,3-epóxido vitamina K. Esta hidroquinona funciona como cofactor y es esencial para la activación postraduccional de los factores coagulantes dependientes de vitamina K, ya mencionados anteriormente. El gen codificante para esta enzima (VKORC1) contiene un SNP, cuya variabilidad está ligada a una menor actividad de VKOR. Rieder *et al*. (2005) creó dos grupos de haplotipos, teniendo en cuenta los 10 SNPs más comunes presentes en este gen: haplotipo de dosis bajas (A) y de dosis altas (B). Las dosis medias de mantenimiento varían según el haplotipo, y son las siguientes: 2.7 ± 0.2 mg/día para un individuo con haplotipo A/A, $.9 \pm 0.2$ mg/día para un haplotipo A/B, y 6.2 ± 0.3 mg/día para B/B.

1.4 Herramientas para el genotipado de SNPs

1.4.1 Estrategias de discriminación de alelos

Existen cuatro mecanismos básicos para poder llevar a cabo la discriminación alélica o genotipado de SNPs: hibridación, ligación, escisión enzimática y extensión de cebadores (Kwok, 2001).

Dadas sus prestaciones destaca el mecanismo de discriminación alélica estrategia basada en la extensión de cebadores. Es una estrategia robusta, flexible y sencilla tanto en el diseño como en su optimización. Se basa en la alta especificidad de la ADN polimerasa para incorporar desoxiribonucleótidos complementarios a la secuencia de la cadena molde de ADN. Se puede dividir en dos aproximaciones: incorporación de un nucleótido específico de alelo y extensión de cebador por PCR alelo específica (Figura 4).

En el primer caso, se diseña un cebador común a ambos alelos, cuyo extremo 3' sea el equivalente al nucleótido previo al SNP de interés. Mediante una amplificación por PCR, este cebador se extenderá en una sola base, complementaria a la hebra molde de ADN. Dicha base será determinada posteriormente por fluorescencia, espectrofotometría de masas u otras técnicas para determinar el genotipo de la muestra estudiada.

En el segundo caso, se llevará a cabo una amplificación PCR específica de alelo (PCR-ASA), donde la discriminación se realiza en la propia reacción. Esta metodología utiliza dos cebadores directos (FP) específicos a cada uno de los alelos, y uno reverso (RP) común a ambas reacciones de amplificación. Los cebadores FP difieren entre sí en el último nucleótido de su extremo 3', conteniendo cada uno la base correspondiente a una de las posibilidades del SNP que se pretende estudiar.

Durante la reacción sólo hibridará con la cadena molde aquel FP que sea totalmente complementario a ella, formándose mayoritariamente el producto específico. También se forma el producto inespecífico dada la tasa de error de la enzima. Combinando esta amplificación con un método de detección (fluorescencia, hibridación, electroforesis, RT-PCR, etc.), se logra un genotipado fiable y robusto.

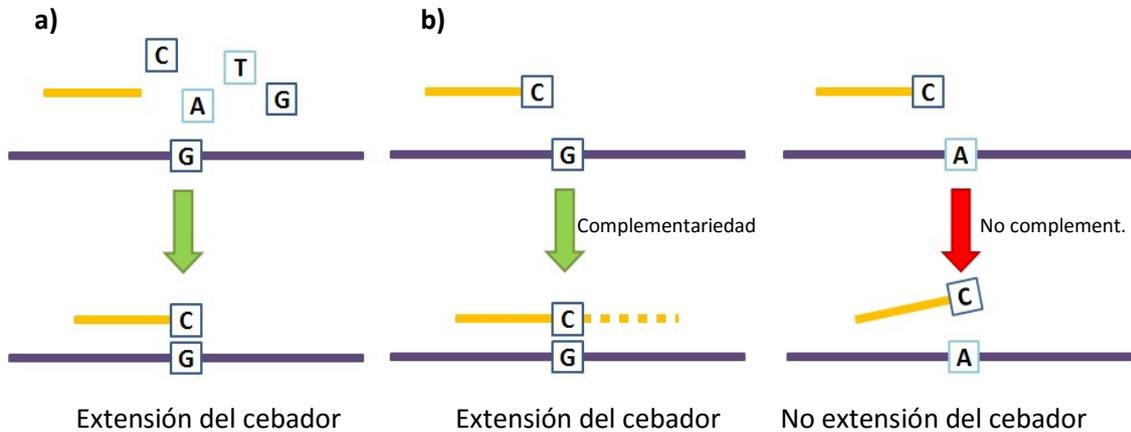


Figura 4. Genotipado mediante extensión de cebador. a) Utilizando cebador directo común y extensión de una sola base. b) Utilizando cebador específico de alelo.

1.4.2 Técnicas de genotipado.

Hay una gran variedad de técnicas basadas en las estrategias anteriormente comentadas que pueden ser utilizadas para el genotipado de SNPs a nivel de laboratorio y disponibles comercialmente.

Algunos ejemplos de plataformas comerciales basados en la hibridación específica para la detección de SNPs son TaqMan[®] (Applied Biosystems, CA), donde los productos son detectados por fluorescencia o mediante la combinación con un MALDI-TOF; Qbead[™] (Quantum Dot, CA), donde la señal del fluoróforo permite confirmar la hibridación y la detección de la microesfera específica revela la identidad del SNP; o DASH[™] (DynaMetrix, Reino Unido), el cual incluye una desnaturalización monitorizada en tiempo real de un dúplex cebador-diana bajo condiciones homogéneas y utilizando fluorescencia como modo de detección (Kim y Misra, 2007). La tecnología Invader[®] (Third Wave[™] Technologies, WI), SNaPshot[®] (Applied Biosystems, CA) o Tag-It[™] (Tm Bioscience Corp., Canada) son solo algunos ejemplos más del amplio abanico de tecnologías propuestas hoy en día.

Sin embargo, cabe destacar y profundizar en dos grandes tecnologías representativas del genotipado de alto rendimiento. Estas son GeneChip[®] (Affymetrix, CA) y GoldenGate (Illumina[®], CA). Ambas utilizan las micromatrices de ADN como base del genotipado. Se caracterizan por contener un elevado número de sondas, ya sean oligonucleótidos, productos de amplificación o fragmentos de ADN, en un espacio muy reducido de forma ordenada y organizada. El ADN a analizar debe ser marcado y ser incubado en las micromatrices. Cuando dicha muestra encuentre en las sondas disponibles zonas complementarias a su propia secuencia, se producirá la

hibridación. A continuación, se podrá analizar la micromatriz, detectar los sitios exactos donde se haya habido hibridación, y así poder inferir el genotipo o perfil genético de la muestra estudiada. La miniaturización del ensayo, el multiplexado y la automatización de los protocolos de análisis, ofrecen una agilización de los ensayos y una reducción considerable en gasto de muestra y reactivos. Además de la farmacogenética, otras áreas de investigación como el diagnóstico de enfermedades, estudios de asociación, estudios de expresión génica y seguridad alimentaria entre otras, se ven beneficiadas de estas tecnologías.

La compañía Affymetrix se ha especializado en el diseño de micromatrices utilizando máscaras fotolitográficas que permiten la creación simultánea de oligonucleótidos distintos muy cercanos entre sí. Mediante esta técnica se pueden diseñar micromatrices a la medida del ensayo e interrogar entre 100.000 y 500.000 SNPs al mismo tiempo y en el mismo espacio (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

La tecnología de Illumina se basa en la extensión del cebador específico de alelo, seguida de una ligación y una posterior amplificación del producto obtenido. El producto de dicha amplificación se incuba en una matriz para llevar a cabo la hibridación con las sondas complementarias. Para todo esto se necesitan dos cebadores específicos de alelo, cada uno marcado con un fluoróforo diferente que permitan su posterior detección en la micromatriz. Esta plataforma admite un multiplexado de los ensayos, pudiéndose detectar hasta 1152 SNPs en cada ensayo (Sobrino *et al.*, 2005).

1.5 Tecnologías alternativas para el genotipado de SNPs

Las tecnologías antes mencionadas son muy útiles para estudiar el nivel de expresión génica, ganancias o pérdidas alélicas en secuencias de ADN, o el genotipo de una muestra. Sin embargo, cuando se trata de farmacogenética aplicada, prima el estudio de unos pocos genes relacionados con una enfermedad o medicamento frente a un estudio de alto rendimiento. Además, muchas de las tecnologías de detección y diagnóstico requieren de instrumentos caros e inaccesibles para muchas entidades, profesionales cualificados que puedan utilizarlas y varios días para obtener el resultado de las pruebas realizadas.

Por lo tanto, aun contando con estas técnicas de genotipado tan extendidas, la innovación en este campo sigue siendo esencial. Es necesario mejorar la sensibilidad y selectividad de estas técnicas, así como su capacidad de ser implementadas en diferentes laboratorios donde la farmacogenética puede jugar un papel fundamental. Por ejemplo, debido a su elevado coste y largos tiempos de respuesta, las micromatrices de casas comerciales como Illumina o Affymetrix no resultan una opción viable para su uso en la práctica clínica diaria. La tendencia actual es desarrollar opciones alternativas que reduzcan los costes y permitan un genotipado de una forma rápida y sencilla. Es por ello que se necesitan técnicas alternativas de genotipado que permitan una detección de un determinado número de polimorfismos en un gran conjunto de muestras, que sean sensibles, selectivas y económicas. El objetivo final será poder implementar dichos ensayos farmacogenéticos en hospitales y centros de salud para su aplicación rutinaria.

1.5.1 Biosensores

Los biosensores son dispositivos de detección que incorporan un elemento sensitivo biológico, son miniaturizables y económicos. Se caracterizan por la combinación de sensibilidad y especificidad que aportan las interacciones biológicas con transductores fisicoquímicos, pudiendo así obtener medidas de factores complejos. Básicamente, constan de un bioreceptor y un transductor, que emitirá una señal medible. El modo de lectura u obtención del valor de dicha señal será característico del sistema empleado. Generalmente los bioreceptores son anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos u otros elementos sintéticos de reconocimiento. A diferencia de las plataformas convencionales de micromatrices, en estos casos las sondas de ADN se hibridarán directamente sobre una superficie transductora. Además la detección de la señal es directa (Sassolas *et al.*, 2008).

Con el paso del tiempo se han desarrollado sistemas portátiles con biosensores incorporados, que puedan funcionar fuera del laboratorio con mínimo conocimiento técnico previo. Existen dispositivos capaces de medir la concentración de glucosa en sangre, la frecuencia cardíaca, la composición de la orina, etc. Con estos dispositivos biosensores del tipo "point of care" (POC) se puede determinar el estado de salud del paciente, informando inmediatamente al mismo paciente o al personal sanitario responsable. En el ámbito de la salud, y particularmente en el caso de la warfarina, esta estrategia es ideal porque permiten un diagnóstico eficiente y rápido, vital para administrar un tratamiento adecuado.

1.5.2 Tecnología del disco compacto

Dentro del campo de los biosensores, la tecnología del disco compacto es una técnica innovadora con demostrado potencial en el diagnóstico clínico. Los discos compactos están compuestos por una capa de policarbonato plástico, cubierto de una superficie reflectante de aluminio, plata u oro y protegido todo ello por una capa polimérica transparente (Morais *et al.*, 2006). Son un material de bajo coste y de fácil acceso, que además de su uso común, permite la preparación de biosensores en forma de micromatrices sobre su superficie. El potencial de esta tecnología para fines bioanalíticos fue demostrado por Kido *et al.* (2000) y desarrollado posteriormente por otros autores, muchos de los cuales forman parte del grupo de investigación en el que fue llevado a cabo este trabajo.

Consiste en un ensayo de micromatrices realizado en la superficie de discos compactos con sondas inmovilizadas que pueden ser de ADN, ARN, proteínas... Para la detección se emplean prototipos basados en lectores de discos convencionales que llevan a cabo la detección óptica de los productos formados. El barrido de la superficie con el láser del lector genera imágenes de las micromatrices. Utilizando un software desarrollado especialmente para ello, la respuesta se traduce en información cualitativa y cuantitativa del analito que ha interactuado con las sondas en cada punto.



Figura 5. Esquema de la detección de señal y generación de imágenes mediante un lector de DVD común.

Esta tecnología de biosensado es rápida, sencilla, sensible, portátil y de bajo coste (Morais *et al.*, 2009). Además permite la inmovilización de un elevado número de sondas debido a su gran superficie (Tortajada-Genaro *et al.*, 2011). Entre las diferentes tecnologías de disco compacto, se encuentra el disco versátil digital o DVD. El lector de estos discos funciona gracias a un láser que emite a 650 nm y que barre toda la superficie del disco. Cuando un analito ha sido reconocido por el biosensor, se produce una alteración de la intensidad de la luz del láser que es reflejada, haciendo posible su detección.

Esta tecnología ha sido empleada para distintas aplicaciones. Un ejemplo es su uso para la detección de SNPs del virus Plum Pox que afecta a la ciruela. Para ello, se requiere de una amplificación previa de la zona circundante al SNP de interés y el genotipado se lleva a cabo gracias a la hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) anclados sobre la superficie de policarbonato del disco. Las condiciones de hibridación son el principal inconveniente de esta estrategia, puesto que deben ser muy estrictas para que la unión entre sonda y amplicón solo ocurra cuando la complementariedad entre ambas sea total.

Para el análisis de SNPs de interés farmacogenético, se propone una solución innovadora que explota la técnica de genotipado basada en la amplificación específica de alelo combinada con una hibridación con las sondas inmovilizadas sobre el DVD.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método de genotipado de polimorfismos de única base (SNP) que permita establecer el perfil genético de aquellos pacientes que sufran de cardiopatías y se les haya prescrito el tratamiento con el anticoagulante warfarina. Para ello, se propone un método de genotipado de SNPs presentes en los genes involucrados en el metabolismo de dicho fármaco, cuyo principio es la realización de una PCR-ASA combinada con un ensayo de hibridación basado en la tecnología de disco compacto.

Para la consecución de este objetivo, y utilizando como modelo el SNP CYP2C9*2 (rs1799853), se plantean los siguientes objetivos parciales:

- a) Establecimiento de las condiciones óptimas de amplificación mediante PCR-ASA.
- b) Estudio de variantes de PCR-ASA que permitan la integración con la hibridación con las sondas inmovilizadas en un disco DVD.
- c) Incorporación de un oligonucleótido bloqueante a la PCR-ASA para mejorar la discriminación alélica durante la amplificación.
- d) Extensión del método a otros genes relacionados con la warfarina y su administración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Toma de muestras y extracción de ADN

Las muestras de ADN estudiadas fueron obtenidas a partir de frotis bucal de 14 voluntarios que dieron su consentimiento firmado. Cabe destacar que en todo momento se mantuvo la confidencialidad de los voluntarios de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Tras un entrenamiento básico, los propios voluntarios tomaron la muestra tras enjuagarse la boca con agua, frotando con intensidad el interior de la mijilla con un isopo estéril (epicentre, an Illumina Company, Madison, WI USA) durante aproximadamente 30 segundos. La extracción de ADN se realizó utilizando del kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Una vez recogida la muestra, se introdujo el isopo en un tubo de microcentrífuga que contenía 500 μL de tampón fosfato salino PBS 1X(10.6 mM KH_2PO_4 , 1551.7 mM NaCl y 29.7 mM Na_2HPO_4) y 20 μL de proteinasa K. Dejando solo el algodón en el interior del tubo, se agitó en vortex durante 1 min. Se añadieron 20 μL de RNAasa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 min. Se añadieron 540 μL del tampón de lisado, se homogeneizó la mezcla agitando en vórtex, y se incubó a 55 °C durante 20 min, agitando cada 5 min. Se añadieron 500 μL de etanol 96% y una vez mezclado completamente, se pasó por la columna de centrifugación de PureLink, centrifugandola a 10.000 rpm durante 1 min. Este paso se repitió dos veces. La columna se lavó en dos pasos con dos tampones de lavado, añadiendo 300 μL del primero, centrifugando a 10.000 rpm durante 1 min y repitiendo con el segundo. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 min. Se colocó la columna en un tubo estéril y se añadieron 25 μL de Tris-HCl 10 mM pH 8.6, se dejó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 12.000 rpm. Se repitieron los últimos 3 pasos.

Midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA), se pudo obtener, a 260 nm, la concentración de ADN obtenido de la extracción. Además, se pudo calcular la pureza de la muestra extraída: mediante la relación A_{260} / A_{280} se obtiene información sobre la presencia de proteínas o fenoles, y la relación A_{260} / A_{230} informa de la presencia de otras moléculas contaminantes como ARN. Para que muestra de ácido nucleico se considerase pura la primera relación debía ser un valor aproximado a 1,8 y la segunda, 2,0 o menor.

3.2 Amplificación de ADN

La técnica de amplificación de ADN principal fue la PCR-ASA, pero también fueron utilizadas algunas variantes de la misma, tales como una PCR-ASA asimétrica y una PCR-ASA seguida de una PCR universal.

3.2.1 PCR-ASA

Las reacciones de amplificación para un volumen de 12.5 μL contenían 4 ng de extracto genómico de ADN (Tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.6), MgCl_2 3 mM, dNTPs 100 μM , digoxigenina-uridina trifosfato (dUTPs) (Jena Bioscience, Alemania) 10 μM , 0.5 unidades de Taq polimerasa (Biotools B&M Labs., España) y tampón 1X (Tris-HCl 75 mM, pH 9, KCl 50 mM y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM). Los cebadores utilizados eran

específicos de alelo y ambos, el directo y el reverso, se añadieron en concentraciones de entre 50 nM y 300 nM, dependiendo del ensayo. Se utilizó un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El programa de termociclado fue: desnaturalización a 95°C, 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, 30 s, anillamiento a 64°C, 30 s, y elongación a 72°C, 30 s, con una elongación final a 72°C, 5 min. La temperatura de anillamiento fue modificada dependiendo del ensayo, utilizando temperaturas de entre 38 a 73°C.

3.2.2 PCR-ASA asimétrica

La PCR asimétrica consiste en utilizar distinta concentración de cebador directo y de reverso. Se utiliza para amplificar preferentemente una de las cadenas. En este caso se disminuyó la concentración de cebador reverso. Se añadió el cebador directo a una concentración de 300 nM, mientras que la concentración del cebador reverso fue variando según el ensayo, entre 50 y 300 nM. El resto de reactivos se mantuvieron igual. El programa de termociclado fue el mismo que para la PCR-ASA convencional.

3.2.3 PCR-ASA seguida de PCR universal

Se caracteriza por la adición de cebadores universales que reconocen secuencias genéricas incluidas en los cebadores específicos y amplifican los productos que éstos generan. Los cebadores específicos de alelo fueron añadidos en concentraciones entre 1 y 150 nM, y los cebadores universales se mantuvieron en 300 nM. El programa de termociclado fue: 5 ciclos a 64 °C sin elongación final y 30 ciclos a 56°C con elongación final a 72°C, 5 min.

3.3 Métodos de caracterización de los productos de la amplificación de ADN

3.3.1 Fluorescencia

Para determinar el rendimiento de las reacciones de amplificación se utilizó la medida de fluorescencia. Al añadir al producto el fluoróforo SYBR Safe (Invitrogen, MA), éste se intercala en las moléculas de ADN de doble cadena y proporciona un valor medido en unidades de emisión proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en la muestra. El producto de amplificación fue diluido 1:100 en tampón TE (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM), conteniendo SYBR 0.5X. La lectura se realizó a 485 nm (excitación) y 585 nm (emisión) en placas multipocillo negras (Fisher Scientific, España). Se utilizó un lector de placas Víctor 3™ V1420 multilabel counter (PerkinElmer, Turku, Finland).

3.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó agarosa (Fisher Scientific, NJ) a una concentración del 3% (w/v) en tampón TBE 0.5X (Tris 100 mM, ácido bórico 100 mM, EDTA 2 mM) (Fisher Scientific, New Jersey, USA). Los productos de amplificación se mezclaron con tampón de carga Glycerol Loadin Dye 5X (bioworld, Dublin, Ohio), a una concentración final de 1X. La separación se realizó aplicando 100 V durante 30 min. Se utilizó el marcador de peso

molecular exACTGene 50bp Mini DNA Ladder (Fisher Science, España). En la etapa de revelado se utilizó el agente intercalante Real Safe 20.000X (MARCA) diluido al 2X en tampón TBE 0.5X, y se visualizó el resultado en un transiluminador UV (Vilber Lourmat, Marne-La-valle Cedex1, Francia).

3.4 Purificación de los productos de amplificación

En algunos ensayos, los productos de amplificación fueron purificados previamente a la hibridación. Para ello se utilizó el kit comercial PCR Purification Kit (Jena Bioscience, Alemania). Se añadieron 75 μ L de tampón Binding y 50 μ L de isopropanol a 25 μ L de producto. Se añadieron 100 μ L de tampón de activación a la columna de purificación y se centrifugó 30 s a 10.000 rpm. Se cargó la mezcla en la columna y se centrifugó de nuevo 30 s a 10.000 rpm. Se añadieron 700 μ L de tampón de lavado y se centrifugó 30 s a 10.000 rpm. Se centrifugó 2 min a 10.000 rpm. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo estéril y se añadieron 25 μ L de tampón de elución. Por último se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 min.

3.5 Genotipado mediante Golden Gate

El genotipado de las muestras fue llevado a cabo por un laboratorio externo, utilizando la tecnología Golden Gate (Illumina®, CA). Se basa en la hibridación de cebadores específicos a la cadena molde, con una posterior extensión de los mismos y amplificación por PCR universal. La detección se realiza sobre micromatrices. Esta técnica requiere de 3 días de trabajo, así como de 250 ng de muestra inicial. Sin embargo, permite un multiplexado de hasta 1536 muestras en el mismo chip. Del grupo de voluntarios estudiado fueron genotipados 12 como homocigotos nativos (85,71 %), y 2 como heterocigotos (14,29 %) para el SNP rs1799853.

3.6 Genotipado mediante la tecnología de disco compacto

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados tanto como sondas como cebadores no han sido incluidas en el manuscrito debido al carácter innovador de la propuesta, y por tanto, a la potencial patentabilidad/explotación del método.

3.6.1. Inmovilización de las sondas

A la disolución de tampón de impresión (50 nM de tampón carbonato, pH 9.6 y 1% glicerol), se añadió estreptavidina (10 ppm en las sondas a hibridar y 5 ppm en el control positivo de impresión) y la sonda biotinilada a 100 nM. El control positivo se añadió a una concentración de 15 nM. Mediante un equipo de impresión (AD 1500 BioDot, Inc, Irvine, CA), se depositaron gotas de 40 nL de cada disolución sobre un DVD, siguiendo un patrón de micromatrices diseñado previamente. La humedad se mantuvo alrededor del 90% durante el proceso. Por último, el disco fue lavado con PBS-T y agua y guardado en la nevera a 4 °C hasta su uso.

El patrón de las micromatrices (5×5) diseñado para este ensayo se observa en la Figura 6. En cada zona se añadieron 5 sondas (5 réplicas). Dos de ellas se utilizaron como controles positivos: hibridación (sonda para el producto de amplificación de *Salmonella*) y detección (sonda marcada con digoxigena). Las demás

hibridarían con los productos de amplificación obtenidos de los tres genes seleccionados (CYP2C19*17, CYP2C9*2 y VKORC1). En el disco se imprimieron 20 zonas, pudiendo genotipar hasta 10 muestras por disco.

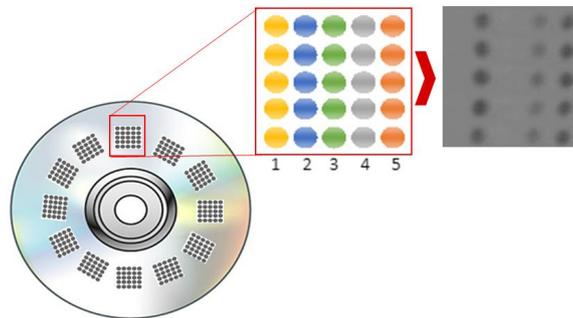


Figura 6. Esquema de la matriz de impresión, donde 1: sonda de CYP CYP2C19*17; 2: sonda de CYP2C9*2; 3: sonda de VKORC1; 4: control positivo de hibridación; 5: control positivo de detección.

3.6.2. Hibridación de las muestras

Se preparó una disolución de 25 μ L para cada producto de PCR a hibridar, compuesta por: SSC (citrato sódico salino, NaCl 150 nM, citrato sódico deshidratado 15 nM, pH 7) 1,5X, 25% de formamida, Denhardt's 2,5X, producto de amplificación de muestra de *Salmonella* 1:20 y agua. Fueron incubadas a 95°C durante 10 min, en hielo durante 2 min y dispensadas sobre el disco. A continuación, el DVD fue incubado a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo, el disco fue lavado con SSC 0,1X y agua, y secado por centrifugación.

3.6.3 Revelado y análisis de datos

Para el revelado de las micromatrices se utilizó un anticuerpo primario de oveja anti-digoxigenina diluido 1:2500 y un anticuerpo secundario anti-oveja, marcado con peroxidasa de rábano (HRP) en una concentración 1:100. Ambos fueron diluidos en 1 mL de PBS-T. El DVD se dejó en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se lavó con PBS-T y agua y se secó. Por último, se añadió 1 mL de TMB sobre el disco. Tras aproximadamente 3 minutos a temperatura ambiente, se lavó con agua y se secó.

El DVD se leyó en el prototipo basado en un lector de DVD, que generó una imagen por matriz, que serían analizadas después con un software específico (Genepix). La velocidad a la que se generan las imágenes es de 4X, es decir, 10 minutos aprox. La señal de los puntos de la matriz utilizada fue la relación señal/ruido (SNR), es decir, la proporción existente entre la señal obtenida y el ruido de fondo o nivel de referencia, el cual se establece en 3 veces la desviación estándar del ruido producido por el instrumento. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa GraphPad Prism y SigmaPlot (5% significación).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Principio del ensayo y diseño de los oligonucleótidos

El método de genotipado propuesto y desarrollado en este trabajo se basa en la amplificación alelo específica, seguida de una hibridación del producto obtenido sobre una micromatriz de sondas de ADN de cadena simple inmovilizadas en un DVD. Para llevar a cabo la amplificación se necesitan tres cebadores diferentes: dos cebadores específicos de alelo (cebadores directos) y uno común que actuará como reverso. Los cebadores específicos de alelo contienen la misma secuencia continua al SNP de interés y el último nucleótido del extremo 3' es el nucleótido polimórfico. El cebador reverso contiene una secuencia complementaria a la hebra seleccionada, de forma que el producto de amplificación conste de menos de 200 pb. Además, este oligonucleótido lleva incorporada una secuencia universal en su extremo 5'. Las colas universales (22-mer) utilizadas son secuencias únicas, imposibles de encontrar dentro del genoma humano, que permiten llevar a cabo la hibridación con las sondas en condiciones homogéneas para un elevado número de genes. El método implica llevar a cabo dos reacciones independientes para la amplificación de cada muestra de ADN a estudiar (mutante y nativa). En cada una de ellas se utiliza uno de los cebadores específicos de alelo, diferenciando las posibilidades alélicas del SNP estudiado.

La detección de los productos formados se realizó mediante un ensayo de micromatrices basado en el biosensado mediante la tecnología de DVD según la metodología descrita en Tortajada-Genaro (2011). Las experiencias previas en el grupo de investigación donde se desarrolló el presente TFG indican que esta aproximación presenta ventajas frente a técnicas convencionales como la medida de la fluorescencia o la electroforesis en gel de agarosa. Por ejemplo, ninguna de estas dos técnicas tiene una sensibilidad y selectividad equiparable a la hibridación en micromatrices. Además la medida de la fluorescencia puede llevar a un cálculo erróneo, ya que la señal obtenida también podría corresponder a productos inespecíficos, dímeros de cebadores, etc. Por lo tanto, la hibridación reúne todos los requisitos para un genotipado fiable.

Para la puesta a punto de este método se seleccionó uno de los SNPs involucrados en el metabolismo de la warfarina y que modifica su efectividad. El SNP CYP2C9*2 (rs1799853) se escogió por su relevancia. La frecuencia poblacional de cada alelo para el grupo poblacional de residentes en Utah con ancestros provenientes del norte y oeste de Europa (CEU), recogida en la base de datos del NCBI, está mostrada en la Tabla 2. Esta es una población utilizada en el proyecto HapMap, representativa de la población europea o caucásica. Con esta información, se diseñaron los cebadores específicos de forma que el extremo 3' del FP fuera guanina (G) en el caso del cebador nativo o adenosina (A), para el mutante.

Tabla 2. Frecuencia alélica del SNP CYP2C9*2. Individuos CEU. Fuente: NCBI.

Gen	rs	Homocigoto nativo (CC)	Heterocigoto (CT)	Homocigoto mutante (TT)
CYP2C9*2	rs1799853	0.792	0.208	0

El diseño de los cebadores para el SNP rs1799853 tuvo en cuenta su auto complementariedad, la temperatura de hibridación, hibridación cruzada entre

cebadores y porcentaje de guanina/citosina. Para ello, se emplearon plataformas informáticas especializadas (OligoCalc, Primer3Plus, Dinamelt web). Además, se eligieron de forma que los cebadores específicos de alelo tuvieran temperaturas de hibridación similares para minimizar la amplificación preferencial de alguno de ellos (Figura 7).

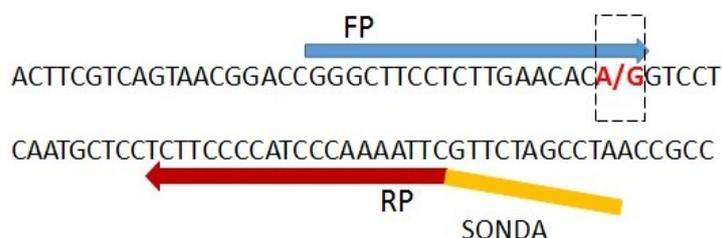


Figura 7. Posición de cebadores directo (FP) y reverso (RP) con su cola universal (SONDA) respecto a la secuencia del gen CYP2C9.

Las sondas de la micromatriz se diseñaron incluyendo una secuencia universal, idéntica a la que contiene el cebador reverso, una secuencia de poli-timina (poli-T) que sirviera como espaciador y minimizara los impedimentos estéricos con la superficie del DVD, y una molécula de biotina en su extremo 5'. Las secuencias se seleccionaron para que tuvieran la misma longitud (22-mer) y unos parámetros termodinámicos que permitieran unas condiciones de hibridación iguales para todas ellas, lo que favorece el futuro multiplexado empleando esta técnica de genotipado.

4.2 Amplificación específica de alelo

Los primeros experimentos fueron dirigidos a estudiar el comportamiento de la amplificación alelo específica PCR-ASA al variar la temperatura de anillamiento en el programa de termociclado, ya que uno de los factores limitantes de la técnica es garantizar la unión selectiva de los cebadores a la hebra molde de ADN.

El ensayo consistió en la amplificación del SNP CYP2C9*2 con ambos cebadores específicos de alelo en reacciones independientes (A: mutante y B: nativa), a temperaturas entre los 51 y 71 °C, utilizando ADN genómico de individuos con diferentes genotipos. Los productos obtenidos fueron medidos por fluorescencia, y los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 8.

A temperaturas bajas (<61,0 °C), la amplificación fue elevada debido a la inespecificidad, es decir, la temperatura permitía la unión de ambos cebadores al ADN molde. A las temperaturas más altas (>66,5 °C) se restringía en exceso dicha unión, no obteniendo amplificación en ninguna de las dos reacciones. Se observó un intervalo de temperaturas entre 62,0 y 66,0 °C, dentro del cual se producía un anillamiento y consecuente amplificación selectiva.

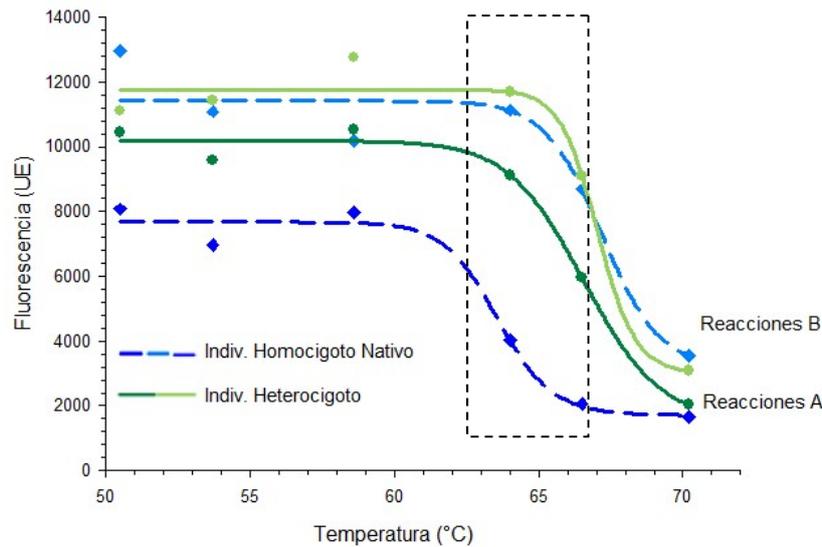


Figura 8. Representación gráfica de las medidas de fluorescencia obtenidas de la PCR-ASA en gradiente de temperaturas para el SNP CYP2C9*2 en dos individuos con distinto genotipo. Reacciones A: reacciones de amplificación con el cebador específico de alelo mutante (A). Reacciones B: reacciones de amplificación usando el cebador específico de alelo nativo (B). Cuadro marcando el rango de temperaturas óptimo para la discriminación. Número replicas = 3.

A temperaturas bajas (<61,0 °C), la amplificación fue elevada debido a la inespecificidad, es decir, la temperatura permitía la unión de ambos cebadores al ADN molde. A las temperaturas más altas (>66,5 °C) se restringía en exceso dicha unión, no obteniendo amplificación en ninguna de las dos reacciones. Se observó un intervalo de temperaturas entre 62,0 y 66,0 °C, dentro del cual se producía un anillamiento y consecuente amplificación selectiva.

Puesto que la fluorescencia no aporta la suficiente información en relación a la especificidad del proceso, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 3% con los productos formados. El objetivo era comprobar que no existieran productos inespecíficos (ej. dímeros) que hubieran modificado la señal de fluorescencia. Mediante esta técnica se comprobó que la banda correspondiente a los fragmentos amplificados era del tamaño esperado (111 pb) según el diseño de los cebadores y que ningún otro subproducto había sido producido (Figura 9). Para algunos pacientes, además, existía una buena discriminación entre genotipos.

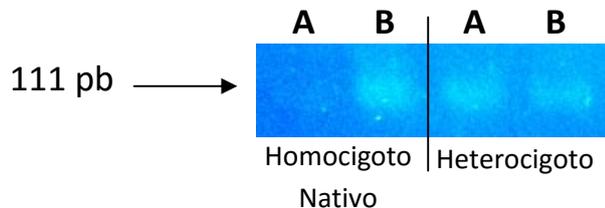


Figura 9. Imagen de los productos de PCR-ASA a 64°C del SNP CYP2C9*2 para los dos tipos de genotipo posibles. Tamaño calculado mediante el patrón de peso molecular exACTGene 50bp Mini DNA Ladder.

Se llevó a cabo la hibridación de los productos obtenidos, pero en ningún caso se obtuvo señal neta, ya que la respuesta fue comparable al fondo de la micromatriz. Puesto que ya se había comprobado la existencia de producto, la hipótesis planteada fue que no se detectaban por un exceso de cebadores que interferían con la hibridación. Esto se debe al diseño de las sondas y cebadores. Tanto el cebador reverso como la sonda contienen la misma secuencia universal para evitar la hibridación sonda-cebador. Sin embargo, esto puede provocar competitividad entre cebador reverso y sonda por el producto (hebra directa). Un exceso de cebadores se uniría al producto amplificado, limitando así su hibridación con la sonda y provocando, por tanto, pérdida de señal e información.

4.3 Integración de la PCR-ASA e hibridación

Se probaron cuatro aproximaciones que favorecieran la amplificación y/o hibridación del producto diana.

A) Purificación del producto de la PCR-ASA

El objetivo era eliminar el exceso de cebadores y posibles impurezas de la amplificación que pudieran estar interfiriendo con la unión sonda-producto. Para ello se purificaron los productos utilizando una columna de sílice en presencia de sales caotrópicas. El fundamento de esta técnica reside en la membrana de sílice, que interacciona con mayor o menor fuerza con las moléculas de ADN, dependiendo de la concentración de sales presente en la preparación. En las condiciones de trabajo iniciales, los ácidos nucleicos interaccionan con el soporte, mientras que el resto de componentes presentes en la disolución no se retienen y son eliminados. Posteriormente, el producto de amplificación purificado es eluido de la columna de forma diferenciada de los cebadores (oligonucleótidos de pequeño tamaño).

La inclusión de esta etapa de purificación originó señal específica relacionada con la hibridación del producto con las sondas inmovilizadas en el disco. En la Figura 10 se muestran, a modo de ejemplo, los valores de señal SNR obtenidos al hibridar el producto de la amplificación mutante (A) y el de la nativa (B) de un individuo heterocigoto (AB). Se observa también, tal y como se registró en los datos de fluorescencia, que la reacción B está más favorecida que la reacción A. Estas diferencias pueden relacionarse con la interacción entre el cebador A (nucleótido específico=adenina) y la cadena de ADN (nucleótido polimórfico=timina). Esta unión es más débil y puede conllevar un menor rendimiento de esta amplificación.

El test estadístico t entre ambas condiciones indicó que dicha diferencia no era significativa (p valor: 0,7230). Sin embargo, el principal inconveniente de añadir la etapa de purificación al proceso es la pérdida intrínseca de producto (hasta un 40%), aumento del tiempo de análisis y encarecimiento del ensayo.

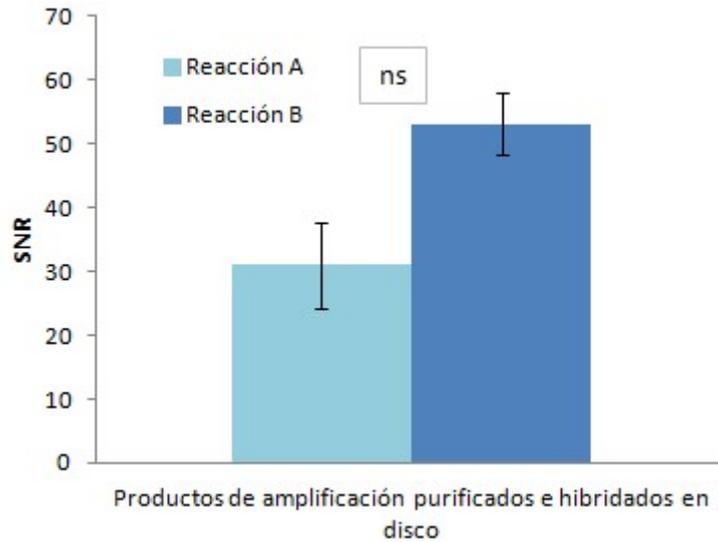


Figura 10. Señales de hibridación de los productos de amplificación de un individuo heterocigoto para el SNP CYP2C9*2 con ambos cebadores específicos independientemente. ns= diferencias no significativas según test estadístico t. Número réplicas=5.

B) PCR-ASA con baja concentración de cebadores

Se realizó un ensayo utilizando una concentración de cebadores menor (inferiores a 300 nM). De esta forma se limitaba la cantidad de cebador en exceso, lo que minimizaría la interferencia con las sondas de hibridación sin necesidad de una purificación. En la Figura 11A se observa una disminución de producto amplificado proporcional al descenso de la concentración de cebadores empleada, aunque el rendimiento de amplificación fue suficiente para originar producto detectable mediante fluorescencia. Pero al hibridar estos productos, se registró respuestas positivas para la reacción nativa (B) y negativas para la reacción mutante (A) (Figura 11B). Por lo tanto, a pesar de las expectativas que ofrecía, esta aproximación no permitió el genotipado.

Los resultados obtenidos sugirieron que todavía existía un exceso de los cebadores A interfiriendo con la hibridación, ya que esta reacción posee un rendimiento inferior a la B.

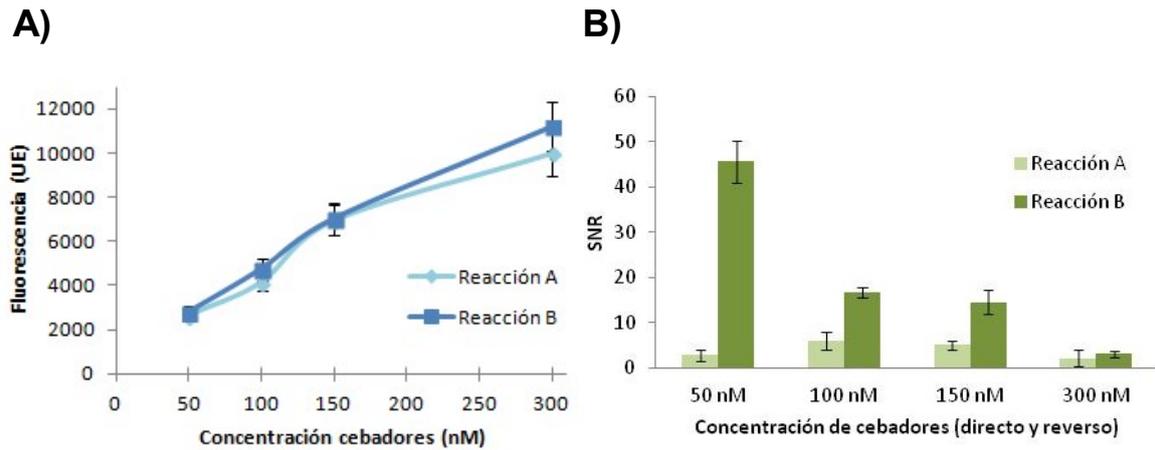


Figura 11. A) Señal de fluorescencia neta del producto de amplificación de un individuo heterocigoto con diferentes concentraciones de cebadores. B) Señal de hibridación de la amplificación de un individuo homocigoto nativo con diferentes concentraciones de cebadores. Número réplicas=5.

C) PCR-ASA asimétrica

Esta variante de la amplificación consistió en utilizar una menor concentración de RP mientras que se mantenía elevada y constante la del FP. El objetivo era favorecer la amplificación de la hebra directa, que es la hebra complementaria a la sonda. Esta aproximación mantenía alta la concentración de FP, favoreciendo la generación de producto específico, pero al disminuir la concentración de RP, se reducía la competitividad del cebador y la sonda por el producto de PCR.

Se realizó la amplificación PCR-ASA de ADN genómico procedente de pacientes con genotipo heterocigoto, manteniendo la concentración del FP a 300 nM. Como se puede observar en la Figura 12, se obtuvieron hibridaciones positivas para ambas reacciones cuando la concentración de los FP fue 200 nM o inferior. Por lo tanto, esta aproximación era válida.

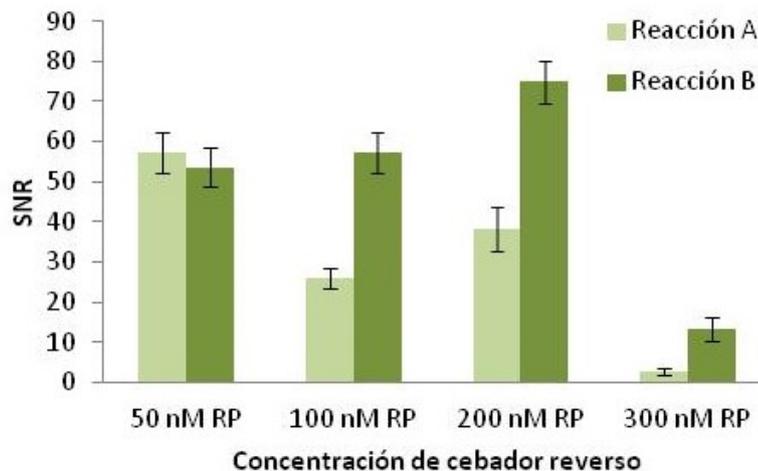


Figura 12. Señales de hibridación de los productos de PCR-ASA asimétrica de un individuo heterocigoto. Concentración de cebador directo=300 nM. Número réplicas=5.

D) Combinación de PCR-ASA y PCR universal

Consiste en la concatenación de dos procesos de amplificación: unos ciclos iniciales de amplificación alelo selectiva seguidos de unos ciclos de amplificación universal (Figura 13). Para este método propuesto se necesitaban 6 cebadores (3 por cada etapa). En la PCR específica de alelo, se utilizaron dos oligonucleótidos como cebadores delanteros (FP-A y FP-B) y uno como cebador trasero (RP). Sus secuencias eran las mismas que en el procedimiento anteriormente descrito salvo que se les había añadido colas genéricas en sus extremos 5'. Estas secuencias eran diferentes entre los tres oligonucleótidos. Para la amplificación universal, se utilizaban tres cebadores (dos directos y uno reverso) que reconocieran las secuencias de las colas que habían sido incorporadas en el producto de amplificación durante la primera amplificación. Además, estos cebadores se diseñan para que las temperaturas de fusión entre ambos conjuntos fueran diferentes. Por lo tanto, el objetivo de esta doble amplificación era disminuir la cantidad de cebador específico sin disminuir el rendimiento de amplificación y válido para un futuro ensayo multiplexado (varios SNPs).

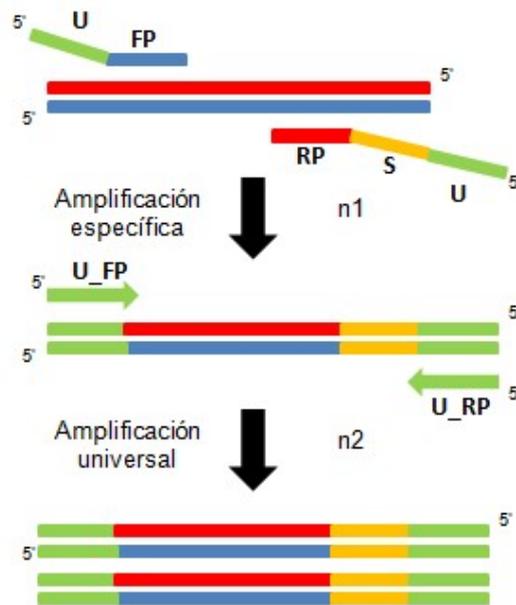


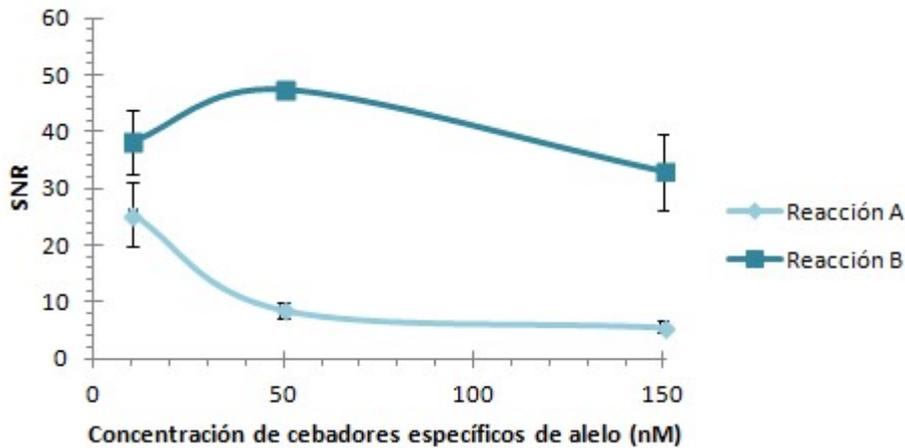
Figura 13. Esquema de la amplificación PCR-ASA seguida de una amplificación universal; donde U=secuencia universal, FP=cebadador directo, RP=cebadador reverso, S=sonda, U_FP=cebadador directo universal, U_RP=cebadador reverso universal, n1=número de ciclos de amplificación específica y n2=número de ciclos de amplificación universal.

Todos los cebadores fueron añadidos en la mezcla de reacción inicial. La concentración de los cebadores universales (300 nM) fue notablemente mayor a la de los específicos. Respecto al programa de termociclado, se fijó a 35 ciclos, variando la distribución de ciclos entre ambos tipos de amplificación. Las temperaturas de anillamiento fueron 64,0 y 56,0 °C, seleccionadas en función de las temperaturas de fusión de ambos conjuntos de cebadores.

Se estudiaron dos variables: concentración de cebadores específicos y número de ciclos de cada etapa (n1: específica y n2: universal). Se estudió un rango de

concentración de cebadores entre 1 nM y 150 nM, con n_2 igual a 0, 25 y 30 ciclos. Tras realizar la hibridación, se obtuvieron los datos mostrados en la Figura 18. Se observó que la concentración óptima de cebador específico era 50 nM, debido al rendimiento obtenido y su capacidad de discriminación (Fig. 14A). Además, $n_1=5$ fue suficiente para obtener un buen rendimiento de amplificación, siendo compatible con la posterior hibridación (Fig. 14B). También se observaron las diferencias entre las reacciones A y B.

A)



B)

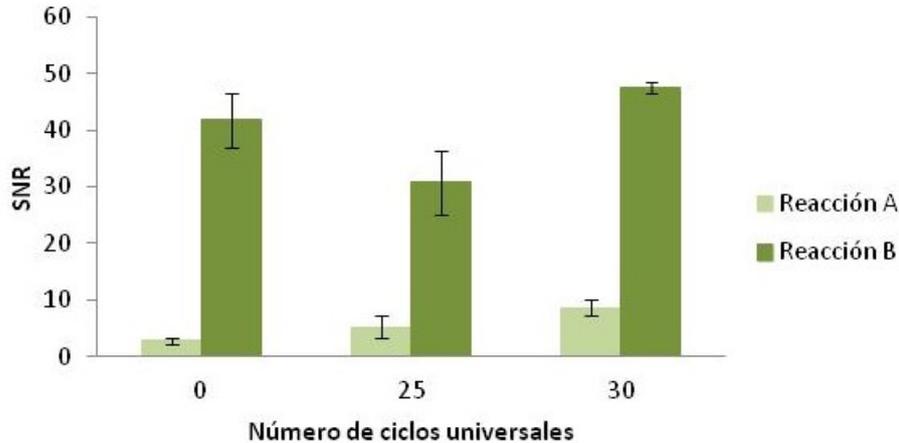


Figura 14. A) Señales SNR para diferentes concentraciones de cebadores específicos de alelo, realizando 25 ciclos universales de amplificación de un individuo homocigoto nativo. B) Señales SNR obtenidas tras realizar distinto número de ciclos universales en cada caso, utilizando 50 nM de cebador específico durante la amplificación de un individuo homocigoto nativo. Número réplicas=5.

E) Comparación de estrategias

Se compararon los resultados obtenidos por las distintas aproximaciones ensayadas para la integración de la PCR-ASA con el método de hibridación. En la Figura 15 se muestran las relaciones SNR del ensayo de micromatrices obtenidos a partir de ADN genómico de un paciente heterocigoto para el SNP en estudio.

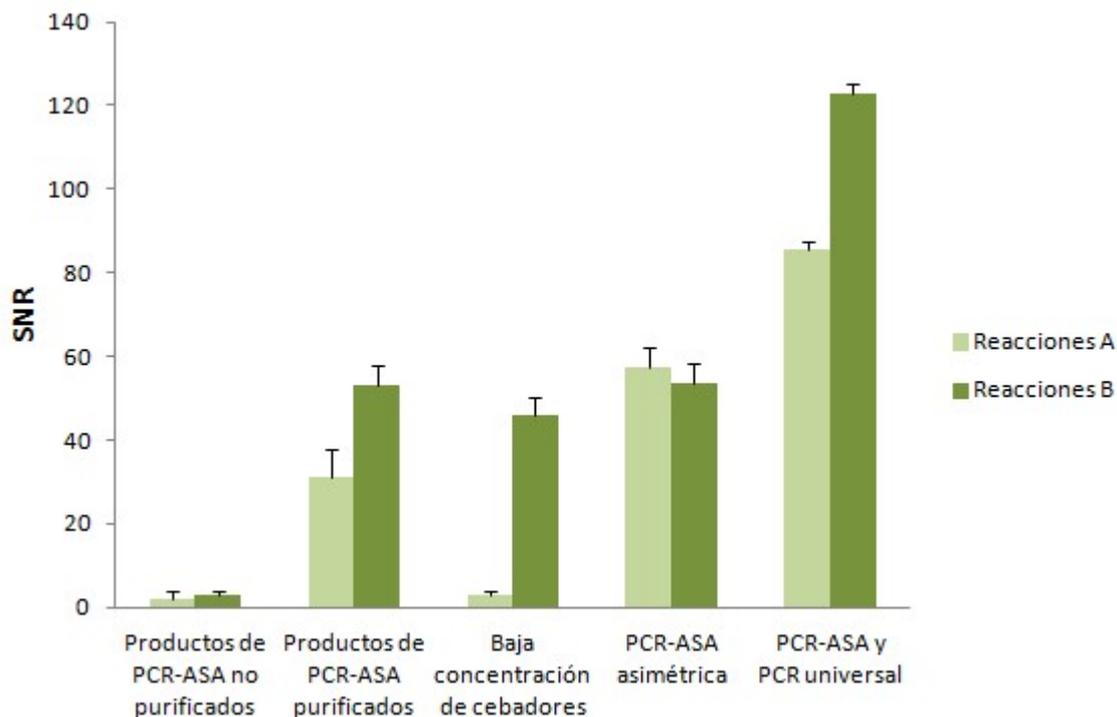


Figura 15. Señales SNR obtenidas con las mejores condiciones de cada una de las aproximaciones utilizadas para la integración de la PCR-ASA con la hibridación. Individuo heterocigoto. Número réplicas=5.

El análisis de la varianza (ANOVA) indicó que existían diferencias significativas en las respuestas registradas en función de la técnica utilizada (p-valor reacciones A: < 0.0001 ; p-valor reacciones B: < 0.0001). Ni los productos de PCR-ASA del protocolo inicial ni la estrategia basada en el descenso de cebadores ofrecen una señal detectable para ambos alelos, siendo comparable al fondo de la micromatriz (test estadístico t: p-valor $> 0,05$). Con el resto de aproximaciones, se consiguen señales SNR muy superiores al límite de cuantificación del biosensor (SNR=10), pudiéndose utilizar cualquiera de ellas para el genotipado, siendo las mayores señales para la PCR-ASA seguida de PCR universal. No obstante, la aproximación que ofrece señales equivalentes en ambas reacciones para un individuo heterocigoto es la PCR-ASA asimétrica. Por lo tanto, la PCR-ASA asimétrica fue la técnica seleccionada para la amplificación del SNP CYP2C9*2 y su posterior hibridación.

Además, los experimentos realizados a partir de ADN genómico de individuos homocigotos nativos (CC) y heterocigotos (CT) indicaron que era posible discriminar entre ambos genotipos mediante esta técnica.

En la Figura 16A se puede observar el esquema general del método propuesto en el presente TFG. Se llevan a cabo dos reacciones independientes para la amplificación de cada muestra de ADN a estudiar. En cada una de ellas se utiliza uno de los cebadores específicos de alelo. De esta forma, añadiendo cada producto sobre una micromatriz diferente, se puede genotipar al individuo por presencia o ausencia de hibridación con la sonda correspondiente, si el valor SNR obtenido tras el procesamiento de las imágenes capturadas es superior al valor límite. En la Figura 16B se observan las imágenes obtenidas para cada uno de los genotipos estudiados para el SNP rs1799853.

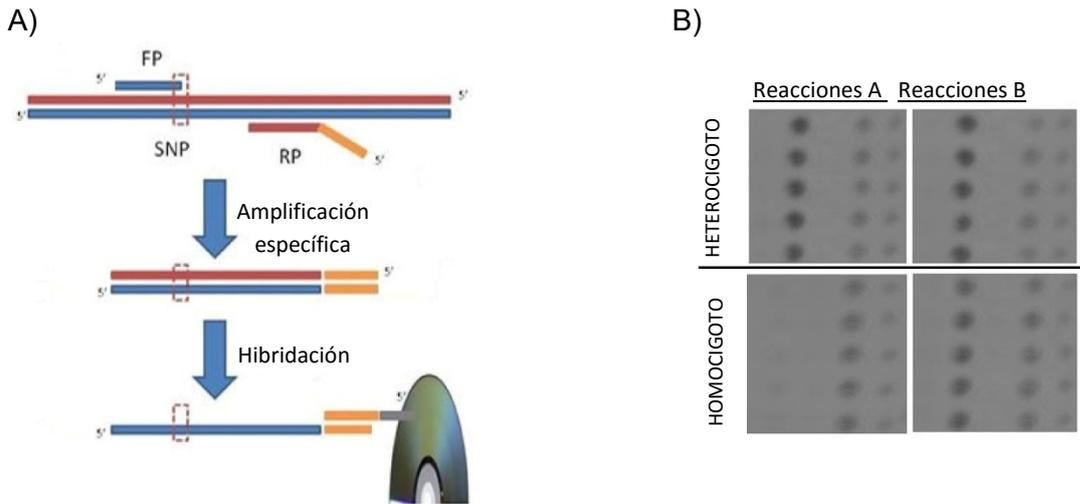


Figura 16. A) Esquema diseñado para este trabajo de la amplificación específica seguida de la hibridación en disco. B) Imágenes del disco correspondientes al genotipo homocigoto y heterocigoto para CYP2C9*2, obtenidos tras la amplificación independiente de las muestras con cada par de cebadores específicos. Reacción A=reacción mutante. Reacción B=reacción nativa. Esquema de la micromatriz:ver Figura 6.

4.4 Adición de bloqueante.

En los experimentos anteriores, aunque era posible el genotipado, cuando se analizaron individuos homocigotos se detectaba una señal residual en la reacción no específica, que teóricamente debería ser nula. Estos problemas son comunes en los métodos de genotipado, debido a una amplificación inespecífica ocurrida por errores de la ADN polimerasa o uniones inespecíficas entre cebador y cadena molde. Para minimizar este efecto, se utilizan cocientes de respuesta entre la variante mutante y la nativa, o herramientas de búsqueda de patrones con programas estadísticos en la asignación de genotipos (Rojas, 2012).

En este TFG, se estudió la posibilidad de añadir un oligonucleótido sintético que disminuyera la amplificación inespecífica con el propósito de mejorar la discriminación alélica a nivel de SNP. Este oligonucleótido se uniría a la hebra de ADN, interfiriendo así con el cebador inespecífico, de forma que la polimerasa no podría llevar a cabo la elongación. De esta forma se beneficiaría la unión del cebador específico de alelo, favoreciendo su amplificación. Esta técnica de bloqueo se ha utilizado para favorecer la amplificación de secuencias raras en mezclas complejas

(Vestheim y Jarman, 2008), para catalogar muestras antiguas de ADN (Boessenkool *et al.*, 2012), detectar mutaciones minoritarias en muestras clínicas (Milbury *et al.*, 2009), o para aislar fragmentos genómicos adyacentes a secuencias conocidas (Bae y Sohn, 2010).

4.4.1 Diseño del bloqueante

La secuencia del bloqueante es idéntica a la secuencia más próxima al SNP, tanto hacia el extremo 5' como al 3'. Es decir, el bloqueante contiene los nucleótidos que flanquean al SNP por ambos extremos, encontrándose el SNP en el centro. Respecto al cebador utilizado en la PCR-ASA al que se pretende bloquear, tan solo coinciden en los últimos 7 nucleótidos del extremo 3', que serán los primeros de la secuencia del bloqueante. Se eligió este diseño por favorecer una mayor desestabilización termodinámica en el dúplex formado, mejor que si el SNP quedara en el extremo del bloqueante.

Se escogieron oligonucleótidos de una longitud de 13 nucleótidos con el fin de no aportar demasiada estabilidad al bloqueante. En caso contrario podría llegar a interferir con la unión del cebador específico y minimizar el rendimiento de la amplificación.

Se diseñaron dos bloqueantes, uno para bloquear la reacción de amplificación del alelo nativo y otro para la del mutante. Ya que solo se diferencian en un nucleótido, sus T_m solo diferían en 2°C. Esto supone que tendrían la misma tendencia de bloqueo y se podría llevar a cabo ambas reacciones simultáneamente. En la Figura 17 se observa el resultado esquematizado del efecto de uno de los bloqueantes sobre su respectiva reacción de amplificación.

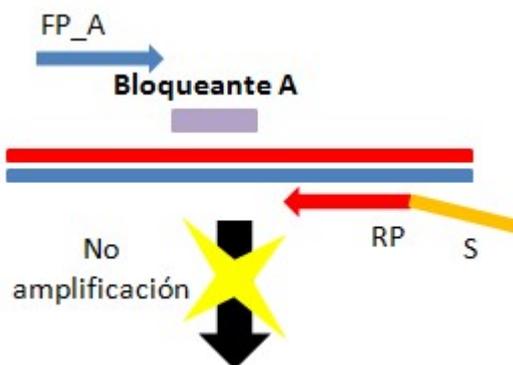


Figura 17. Esquema del funcionamiento de la adición del bloqueante A (mutante) a la reacción de amplificación A (mutante). FP_A=cebador directo A, RP=cebador reverso, S=sonda.

Los oligonucleótidos bloqueantes presentaban una modificación 2',3'-dideoxicidina (ddC). La deoxicidina es una citosina unida a una desoxirribosa. Como se puede apreciar en la figura, a diferencia de la deoxicidina, la ddC carece, además del grupo 2'-OH y del 3'-OH del azúcar (Figura 18). En un ácido nucleico, este grupo es esencial tanto para la unión de la ADN polimerasa como para la elongación de la

cadena durante la replicación, ya que es en este extremo donde se unirá el grupo fosfato proveniente del trifosfato unido al siguiente nucleótido. Al crear un bloqueante de la misma naturaleza que un cebador pero con esta modificación en el extremo 3', se consigue bloquear la amplificación.

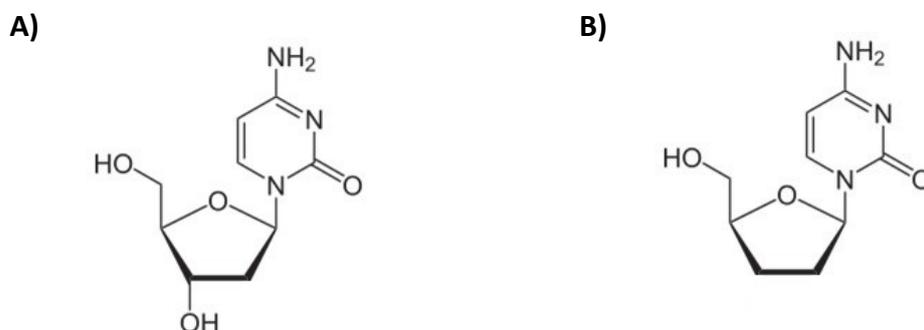


Figura 18. A) Representación química de la molécula deoxicitidina. B) Representación química de la molécula dideoxicitidina (ddC).

4.4.2 Estudio del efecto del bloqueante

Se realizó un ensayo inicial comparando la adición del bloqueante y el efecto de la temperatura. La relación de concentraciones entre bloqueante y cebador fue 3,3 (500:150). Se escogió el rango de temperaturas que incluyera la temperatura óptima de discriminación observada en los ensayos anteriores (56 - 67°C). Este experimento se llevó a cabo para el genotipado de un individuo homocigoto nativo (BB), añadiendo el bloqueante mutante (bloq. A) a la reacción de amplificación del alelo mutante (reac. A), y el bloqueante nativo (bloq. B) a la reacción de amplificación nativa (reac. B) (Figura 19).

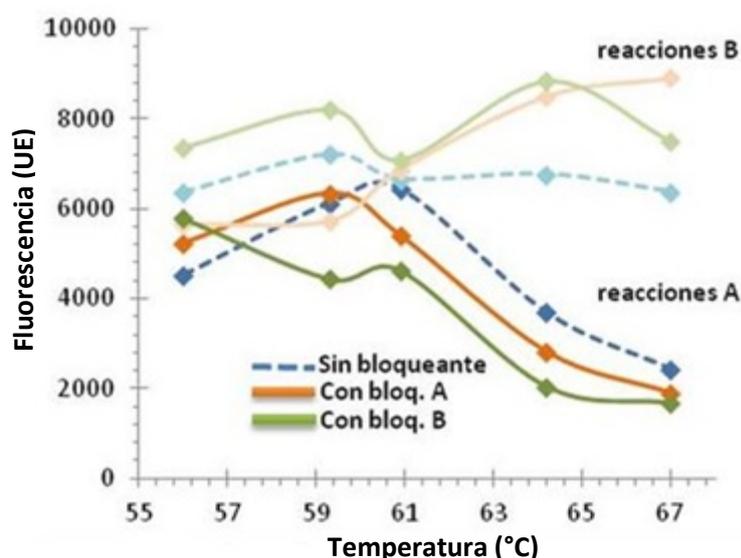


Figura 19. Señal de fluorescencia obtenida en función de la temperatura de fusión utilizada en la amplificación por PCR-ASA de un individuo homocigoto nativo (BB) para el SNP rs1799853.

A: alelo mutante. B: alelo nativo. Reacciones de amplificación A y B: [cebador]=150 nM, [bloqueante]=500 nM. Bloqueantes A y B añadidos, por separado, en ambas reacciones.

No se observó una disminución significativa de la amplificación del alelo mutante al añadir el bloqueante mutante a su reacción de amplificación (test t: p-valor= 0,4055), ni tampoco al añadir el bloqueante nativo a la reacción de amplificación mutante (test t: p-valor= 0,1816). En el caso de la reacción nativa, no se observaron diferencias significativas al añadir el bloqueante mutante respecto a la amplificación sin bloqueante (test t: p-valor= 0,5756), pero sí se fue destacable la adición del bloqueante nativo a esta misma reacción (test t: p-valor= 0,0140). Sin embargo, tal y como se puede observar en la Figura 20, los datos obtenidos no fueron reproducibles.

Se estudió el efecto de la concentración del bloqueante variando la concentración de cebador, hasta un ratio de concentraciones (bloqueante:cebador) de 5, a la temperatura de fusión del bloqueante, 38 °C (Figura 20). Bajo estas condiciones, teóricamente más favorables para el bloqueante, tampoco se observaron cambios en la amplificación, ya que tanto a ratio 0 como a 5 se obtuvieran niveles similares de señal. Es posible que, al tratarse de un individuo homocigoto nativo y tratar de bloquear el propio alelo mayoritario, el número de copias amplificadas desde un momento inicial fue muy elevado y el efecto del bloqueante no fue suficiente como para detectar cambios.

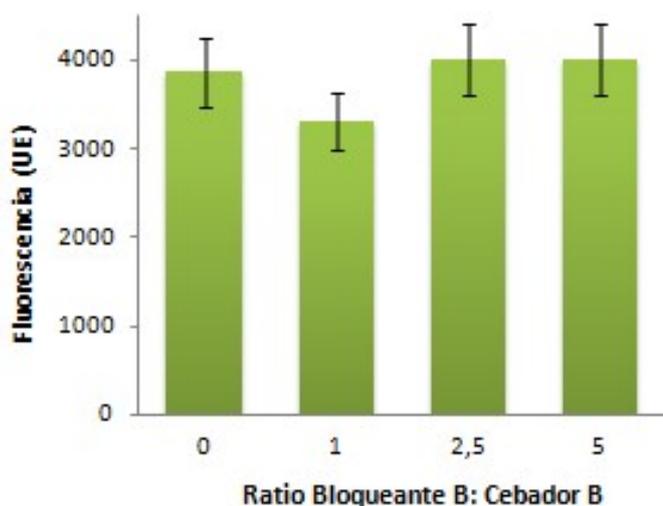


Figura 20. Señal de fluorescencia obtenida tras la PCR-ASA de un individuo homocigoto nativo (BB) del SNP rs1799853 en función del ratio bloqueante:cebador para la reacción nativa, con unos ratios entre 0 y 5. n=10

A) Amplificación específica a altas temperaturas

En este apartado, el objetivo era reducir al máximo aquellas señales residuales de la amplificación inespecífica, con el fin de aumentar las diferencias entre las señales para ambas reacciones y asegurar un correcto genotipado. Para ello, se añadió el bloqueante mutante (A) a la reacción de amplificación del alelo mutante (A) de un individuo homocigoto nativo (BB).

En primer lugar, se hizo un estudio combinado de la concentración del bloqueante y del efecto de la temperatura (Figura 21). El ratio bloqueante:cebador llegó hasta 6,6 y el rango de temperaturas de trabajo fue entre 56 y 67 °C.

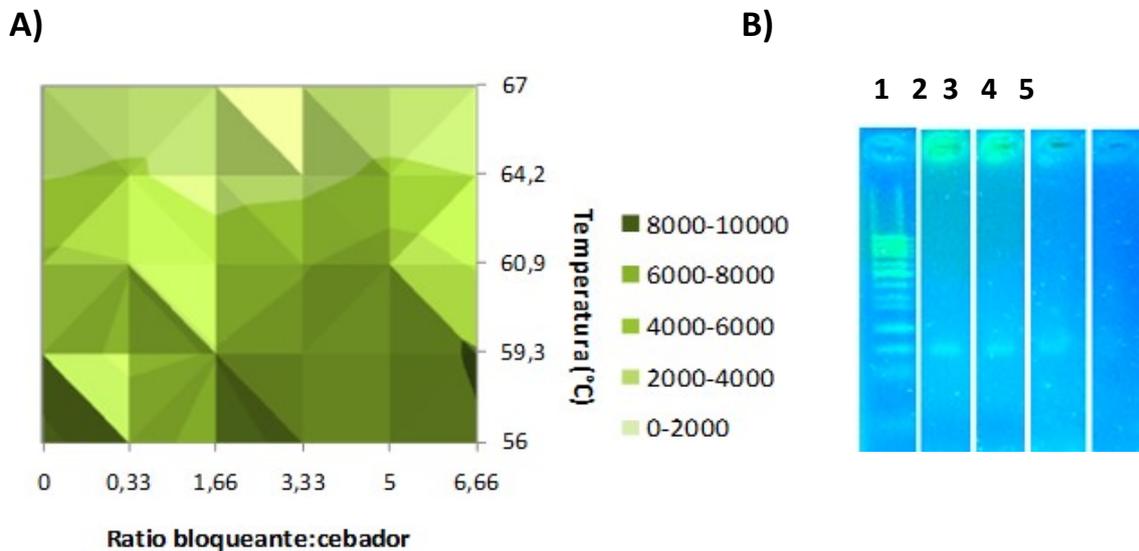


Figura 21. A) Señal de fluorescencia en función de la temperatura de anillamiento y del ratio bloqueante A:cebador A añadido a la mezcla de reacción para un paciente homocigoto nativo (BB). B) Electroforesis en gel de agarosa 3% de algunos productos de la amplificación anterior. $T^a=56^{\circ}\text{C}$ 1) Marcador de peso molecular. exACTGene 50bp Mini DNA Ladder 2) Producto con ratio 0. 3) Producto con ratio 1,66. 4) Producto con ratio 3,33. 5) Producto con ratio 6,66.

La Figura 22A muestra que no hay efecto del bloqueante, independientemente de la temperatura de trabajo y del ratio bloqueante:cebador utilizado. No se observan diferencias notables entre los diferentes casos. Dado que la fluorescencia podría provocar una pérdida de información, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 3%. De este modo se comprobaría que las unidades de emisión detectadas correspondían al producto o a otros subproductos inespecíficos. En la Figura 22B se puede ver que existe una disminución en la intensidad de la señal observada.

Tomando como temperatura de trabajo 59°C , se realizó un segundo ensayo donde las variables a optimizar eran la cantidad de cebadores alelo específicos y de bloqueante añadido. Se estudió la reacción mutante (A) con el bloqueante mutante (A) en un individuo homocigoto nativo (BB) para el gen CYP2C9*2. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Figura 22, donde se observa un aumento de la señal con la concentración de cebadores, pero ningún efecto del bloqueante.

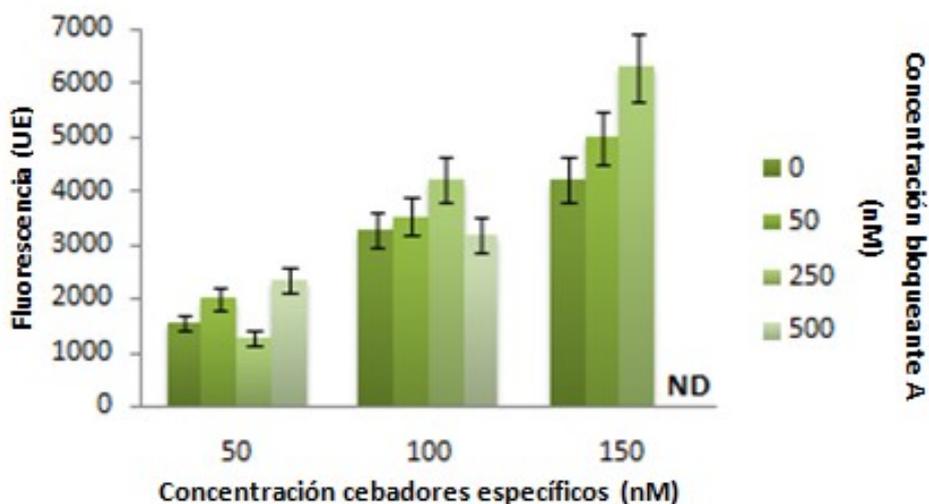


Figura 22. Señal de fluorescencia en función de la concentración de cebadores específicos y de bloqueante mutante añadidos a la reacción PCR-ASA para el genotipado de un individuo homocigoto nativo. ND: dato no disponible. Número réplicas=10.

B) Amplificación específica a bajas temperaturas

Se escogieron aquellas condiciones de amplificación que pudieran favorecer más la efectividad del bloqueante frente a la amplificación alelo específica. La temperatura de anillamiento de cebadores en la amplificación se fijó en 38°C, correspondiente a la media entre las temperaturas de fusión de los dos bloqueantes para el gen CYP2C9*2 (bloqueante A $T_m=40^\circ\text{C}$; bloqueante B $T_m=36^\circ\text{C}$). La concentración de cebadores se estableció en 100 nM, puesto que nos permitía seguir teniendo un alto rendimiento de amplificación al mismo tiempo que se podía mantener el ratio bloqueante:cebador ahorrando en reactivos. De esta forma, se realizaron dos ensayos independientes: uno con el bloqueante mutante añadido a las dos reacciones de amplificación, y otro con el bloqueante nativo sobre ambas reacciones y las mismas condiciones, tal y como se muestra en la Figura 23.

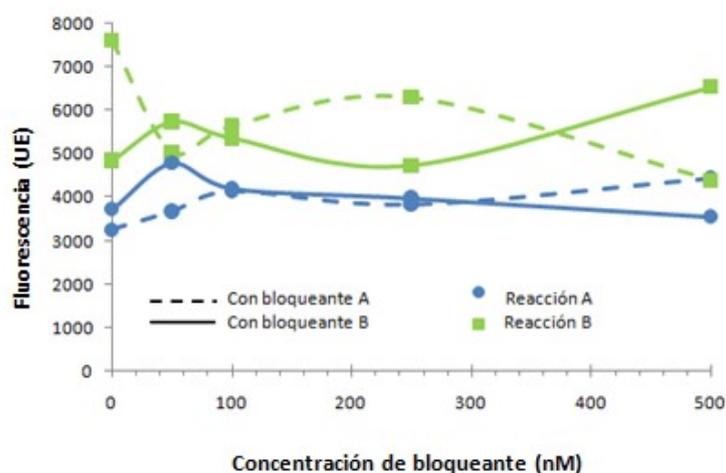


Figura 23. Señal de fluorescencia obtenida tras la amplificación de un individuo homocigoto nativo (BB) para el SNP rs1799853, añadiendo los dos bloqueantes en ambas reacciones independientemente. T anillamiento=38°C. [cebadores]=100 nM.

En este caso tampoco se observó ningún efecto del bloqueante. Cabe destacar que también se realizó una electroforesis en gel de agarosa 3%, incluyendo todos los productos de las cuatro reacciones. Mientras que los productos B seguían presentándose como una banda intensa pese a la adición de bloqueante B, las bandas A eran muy débiles desde el principio y no se veían cambios por más bloqueante A que se añadiera.

C) Propuestas de mejora

En los ensayos realizados con el bloqueante no se han obtenido resultados robustos. Sin embargo, es una técnica bien establecida para similares aplicaciones. Por ello, son necesarios más ensayos con el fin de encontrar aquellas condiciones que favorezcan la efectividad del bloqueante, por ejemplo, continuar los estudios de temperatura y concentración, tanto individualmente como combinados.

En caso de no ver influencia alguna, se podría diseñar un bloqueante de mayor longitud. De esta manera, habría una mayor competencia con el cebador por la unión a la hebra.

Por último, consideraría la opción de diseñar un bloqueante modificado. Por ejemplo, un péptido de ácidos nucleicos podría mejorar la estabilidad del dúplex, hasta el punto de interferir completamente con el cebador. Dicho péptido está formado por una serie de ácidos nucleicos unidos por enlaces peptídicos, lo cual le otorga carga neutra. Esta estructura favorece que se una a la hebra simple de ADN con una alta afinidad y especificidad (Murdock *et al.*, 2000). Otra opción sería elegir un ácido nucleico bloqueado, consistente en un ácido nucleico bicíclico. Es un tipo de bloqueante que ha presentado una altísima afinidad de hibridación con hebras complementarias tanto de ADN como de ARN, y que no permita la elongación de la cadena (Karkare y Bhatnagar, 2006).

4.5 Extensión a otros genes

Demostrado para el SNP modelo, se valoró la capacidad de la técnica para el genotipado simultáneo de tres SNPs en genes relacionados con el metabolismo de la warfarina. Junto al rs1799853, se incluyó VKORC1 (rs9923231) y CYP2C9*2 (rs12248560).

El primer paso fue comprobar la selectividad en la hibridación del producto del rs 1799853 en presencia de las sondas diseñadas que reconocen los productos de amplificación de los otros SNPs. En la Figura 24 se muestran las imágenes correspondientes a las micromatrices correspondientes a un individuo heterocigoto para CYP2C9*2. Se observan respuestas positivas para los controles y para la sonda específica del rs1799853. La señal registrada en los puntos de la micromatriz correspondientes a las sondas específicas para rs9923231 y rs12248560 es comparable al fondo. Puesto que no se observa reactividad cruzada de las sondas, se demostró que podía llevarse a cabo la hibridación de los productos de los tres genes, simultáneamente.

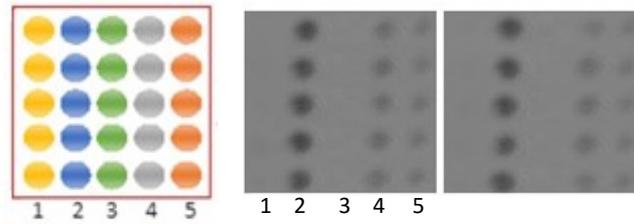


Figura 24. Esquema de la micromatriz (véase Figura 6) e imágenes de disco obtenidas de la hibridación de un individuo heterocigoto para CYP2C9*2. A=Reacción mutante. B=Reacción nativa.

En el presente TFG, también se realizaron los primeros experimentos para la optimización de la amplificación PCR-ASA de los SNPs diana presentes en los genes CYP2C19*17 y VKORC1. La Figura 25 corresponde al estudio de la temperatura de anillamiento efectiva para el conjunto de cebadores correspondiente a VKORC1. Se observó que la temperatura óptima era 64 °C, lo que favorecía en gran medida un posible multiplexado con CYP2C9*2.

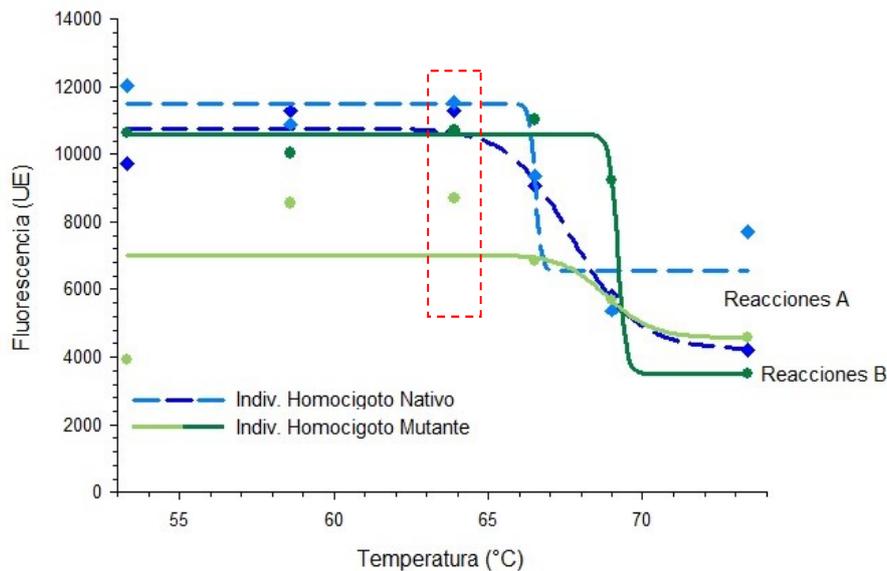


Figura 25. Representación gráfica de las medidas de fluorescencia obtenidas de la PCR-ASA en gradiente de temperaturas del SNP VKORC1 en dos individuos con distinto genotipo. Reacciones A: reacciones de amplificación con el cebador específico de alelo mutante (A). Reacciones B: reacciones de amplificación usando el cebador específico de alelo nativo (B). Cuadro marcando la temperatura óptima para la discriminación. Número replicas = 3.

Considerando los resultados obtenidos en el presente TFG, los siguientes pasos serían la optimización de las aproximaciones PCR-ASA estudiadas (sin o con bloqueante) y corroborar que son adecuadas para los tres genes, en términos de reproducibilidad y exactitud en el genotipado. Para ello, se establecerían las prestaciones analíticas del método. Finalmente, se llevaría a cabo la validación con muestras de pacientes, requisito indispensable para que el método pueda ser implantado en la práctica clínica.

5. CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo ha sido alcanzado, puesto que se han logrado discriminar los genotipos posibles para el polimorfismo rs1799853 presente en el gen CYP2C9*2 mediante un método basado en la extensión de cebadores alelo específicos combinado con un ensayo de hibridación sobre micromatrices en DVD. Las principales conclusiones son:

- La PCR-ASA asimétrica es la mejor aproximación para la amplificación alelo específica del ADN genómico y su posterior hibridación en un formato universal en DVD, logrando disminuir el exceso de cebadores que interfería con dicho proceso.
- En las condiciones estudiadas, no se ha observado mejora en la discriminación por la adición de un bloqueante en la mezcla de reacción de la PCR- ASA.
- Aunque es necesario seguir investigando, el método de genotipado propuesto promete ser una herramienta rápida, compacta, portátil, barata y versátil capaz de ser implementada en la práctica clínica de hospitales y centros de salud. Debido a estas prestaciones, sería potencialmente útil en la medicina personalizada de pacientes con enfermedades tromboembólicas tratadas con el anticoagulante warfarina.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AHRENS, I., LIP, G. Y., & PETER, K. (2010). New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thrombosis & Haemostasis*, 104(1), 49.
- ALQUWAIZANI, M., BUCKLEY, L., ADAMS, C., & FANIKOS, J. (2013). Anticoagulants: a review of the pharmacology, dosing, and complications. *Current emergency and hospital medicine reports*, 1(2), 83-97.
- BAE, J. H., & SOHN, J. H. (2010). Template-blocking PCR: an advanced PCR technique for genome walking. *Analytical biochemistry*, 398(1), 112-116.
- BOESSENKOOL, S., EPP, L. S., HAILE, J., BELLEMAIN, E. V. A., EDWARDS, M., COISSAC, E., ... & BROCHMANN, C. (2012). Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1806-1815.
- CABALEIRO, T., SANTOS, F. A., & LÓPEZ, M. G. (2011). Farmacogenética: presente y futuro. *Actualidad en farmacología y terapéutica*, 9(1), 13-19.
- DALMA-WEISZHAUSZ, D. D., WARRINGTON, J., TANIMOTO, E. Y., & MIYADA, C. G. (2006). [1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview. *Methods in enzymology*, 410, 3-28.
- DRUG BANK OF CALIFORNIA visto el 6 de abril de 2015 en <http://www.drugbank.ca/>
- HAP MAP PROJECT visto el 12 de abril de 2015 en <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
- HEIT, J. A., SILVERSTEIN, M. D., MOHR, D. N., PETTERSON, T. M., O'FALLON, W. M., & MELTON, L. J. (2000). Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine*, 160(6), 809-815.
- KAMALI, F., & WYNNE, H. (2010). Pharmacogenetics of warfarin. *Annual review of medicine*, 61, 63-75.
- KARKARE, S., & BHATNAGAR, D. (2006). Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(5), 575-586.
- KIM, S., & MISRA, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 289-320.
- KWOK, P. Y. (2001). Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual review of genomics and human genetics*, 2(1), 235-258.
- MENSAH, G. A., & BROWN, D. W. (2007). An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health Affairs*, 26(1), 38-48.
- MILBURY, C. A., LI, J., & MAKRIGIORGOS, G. M. (2009). PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations. *Clinical chemistry*, 55(4), 632-640.

MORAIS, S., MARCO-MOLÉS, R., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2006). DNA microarraying on compact disc surfaces. Application to the analysis of single nucleotide polymorphisms in Plum pox virus. *Chemical communications*, (22), 2368-2370. Kido, H., Maquieira, A., & Hammock, B. D. (2000). Disc-based immunoassay microarrays. *Analytica chimica acta*, 411(1), 1-11.

MORAIS, S., TORTAJADA-GENARO, L. A., ARNANDIS-CHOVER, T., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, A. (2009). Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Analytical chemistry*, 81(14), 5646-5654.

MURDOCK, D. G., CHRISTACOS, N. C., & WALLACE, D. C. (2000). The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic acids research*, 28(21), 4350-4355.

RIEDER, M. J., REINER, A. P., GAGE, B. F., NICKERSON, D. A., EBY, C. S., MCLEOD, H. L., ... & RETTIE, A. E. (2005). Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *New England Journal of Medicine*, 352(22), 2285-2293.

ROJAS, D. (2012) Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa *Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia*.

SANDERSON, S., EMERY, J., & HIGGINS, J. (2005). CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: A HuGenet™ systematic review and meta-analysis. *Genetics in Medicine*, 7(2), 97-104.

SASSOLAS, A., LECA-BOUVIER, B. D., & BLUM, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical reviews*, 108(1), 109-139.

SHASTRY, B. S. (2006). Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *The pharmacogenomics journal*, 6(1), 16-21.

SOBRINO, B., BRIÓN, M., & CARRACEDO, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic science international*, 154(2), 181-194.

TORTAJADA-GENARO, L. A., SANTIAGO-FELIPE, S., MORAIS, S., GABALDÓN, J. A., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, A. (2011). Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 36-43.

UFER, M. (2005). Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists. *Clinical pharmacokinetics*, 44(12), 1227-1246.

VADEMECUM visto el 12 de abril de 2015 en www.vademecum.es

VESTHEIM, H., & JARMAN, S. N. (2008). Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples—a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 12.

1000 GENOMES PROJECT visto el 12 de abril de 2015 en <http://www.1000genome>