

La preparación de ADN de referencia para estudios genotípicos

David M. Iovannisci,¹ Claire Gibson,^{1,2} V. Hugo Espín,³ y Edward J. Lammer.¹

¹Children's Hospital Oakland Research Institute, USA, ²University of California Santa Cruz, USA, y

³Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Resumen

El objetivo de este laboratorio de investigación es comprender las interacciones que existen entre el medioambiente con el componente genético, y a su vez entender como estos podrían incrementar el riesgo de malformaciones congénitas. Como parte de ese esfuerzo, el laboratorio de investigaciones de defectos genéticos del C.H.O.R.I. (Birth Defects Research Laboratory Children's Hospital Oakland Research Institute) ha estado llevando a cabo un estudio de caso-control que incorpora genotipificación de casos y controles en polimorfismos de posibles genes involucrados en el problema. Para llevar a cabo estos objetivos las nuevas técnicas de genotipificación desarrolladas son periódicamente evaluadas. Un panel de ADNs humanos se hace necesarios para servir como material de referencia, tanto para el desarrollo de nuevas formas de genotipificación como para servir como controles positivos para las variantes menos comunes de los polimorfismos en estudio. El objetivo en este reporte fue establecer una base de datos que servirá como referencia, utilizando sangre de donadores voluntarios. A estas personas se las genotipificó en los polimorfismos de los genes de nuestro interés. La sangre fue tomada de 29 donantes voluntarios. El ADN fue extraído bajo la técnica de precipitación con sales (salting out). Luego se realizó amplificación por técnica de PCR de los diferentes fragmentos que contenían los fragmentos de interés. A continuación el ADN fue digerido por enzimas de restricción para establecer los polimorfismos. Las bandas resultantes fueron separadas por electroforesis en gel. Los genotipos obtenidos fueron establecidos y luego introducidos en una base de datos computarizados para futuras referencias. **Rev Fac Cien Med (Quito) 2002; 27(1): 32-37**

Palabras clave: Defectos genéticos, ADN, genotipo, polimorfismo.

Abstract

The focus of our laboratory's research is to understand gene-environment interactions that may increase the occurrence risk of birth defects. As part of this ongoing effort, the C.H.O.R.I. Birth Defects Research Laboratory has been conducting case-control studies that incorporate genotyping cases and controls for known polymorphisms of candidate genes. To accomplish these goals, new genotyping methodologies are continually being evaluated. A panel of human DNAs is needed to serve as reference material for the development of new genotyping approaches as well as positive controls for less common variants of the polymorphisms under study. The goal of this project was to establish this reference database by collecting blood from volunteer donors and genotyping them for the polymorphisms of interest within the candidate genes currently under study. Blood was collected from 29 donors and genomic DNA was prepared by salting out. Donor DNAs were then subjected to PCR amplification of DNA fragments containing the polymorphisms of interest. Following PCR, the amplified DNAs were interrogated by digestion with a restriction enzyme diagnostic for the polymorphism, and the resulting bands separated by gel electrophoresis. Genotypes were then scored and placed in a computer database for future reference. **Rev Fac Cien Med (Quito) 2002; 27(1): 32-37**

Key words: Genetic defects, ADN genotyping, polymorphism.

Introducción

El principal objetivo del Laboratorio de Defectos Congénitos del Instituto de Investigaciones del Hospital de Niños de Oakland [Birth Defects Research

Lab at Children's Hospital Oakland Research Institute (C.H.O.R.I.)] es el comprender las interacciones del medio ambiente con los genes que podrían incrementar la incidencia de defectos congénitos comunes. Para lograrlo, estudios de genotipificación son realizados tanto en niños afectados con malformaciones congénitas, así como en niños sanos usados

Dirección para correspondencia: David M. Iovannisci 5700 Martin Luther King Jr. Way Oakland CA, 94609 USA, e-mail: Diovannisci@chori.org

como control. Los resultados de la genotipificación son combinados con datos obtenidos en entrevistas maternas, enfocados básicamente a exposición a sustancias durante el embarazo. Ya que nuevas técnicas de genotipificación son continuamente desarrolladas, un banco de ADN-control se hace muy útil como material de referencia. El establecimiento de una base de datos de ADN de referencia se la describe aquí y los resultados de la genotipificación y caracterización de los 29 ADNs es hecha en un total de 11 sitios polimórficos dentro de 5 loci. Los siguientes genes y sus polimorfismos fueron analizados: N-acetyltransferasa 1 (T1088A); N-acetiltransferasa 2 (C481T, G590A, y G857A); Glutation-S-transferasa T1 (null); Glutation-S-transferase M1 (null); y Citocromo P450-2D6 (1707delT, G1846A, G1758T/A, 2549delA, G1661C).

Materiales y Métodos

Purificación de ADN Genómico

La sangre fue tomada de 29 donantes voluntarios sanos por venipuntura. ADN genómico fue extraído por precipitación de proteínas (salting out) usando el kit de purificación MasterPure™ (Epicentre Technologies).¹

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue usada para amplificar las regiones de interés dentro de los genes. La técnica de PCR consiste en varios pasos, en los que se incluye denaturación de la secuencia blanco, hibridización de oligonucleótidos sintéticos (primers), y la extensión de los primer por una ADN polimerasa. Un incremento exponencial en el número de copias de una secuencia blanco es alcanzado en la mayoría de casos y suficiente material para estudios es generado después de que los ciclos son repetidos de 20 a 30 veces. Las secuencias de los primer se describen en la tabla 1. En muchos casos (NAT1-T1088A, CYP2D6-1707delT y CYP2D6-2549delA), un primer mutagénico es utilizado para introducir un nucleótido equivocado (mismatched nucleotide) dentro del amplicon. Con esto lo que nosotros creamos es un polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP) donde no debería ocurrir naturalmente. Los parámetros de ciclado se los puede encontrar en las publicaciones originales.^{2,4}

Genotipificación

Cuando fue necesario, digestión con enzimas de restricción de los productos amplificados con PCR (amplicons) fueron realizadas para encontrar sitios polimórficos. Enzimas de restricción son enzimas especiales que únicamente cortan el AND en sitios específicos de reconocimiento. Un polimorfismo de un solo nucleótido puede alterar el patrón de corte, ya sea creando u aboliendo un sitio de restricción. De esta manera se hace posible distinguir entre dos segmentos de ADN que podrían ser prácticamente

exactos, variando únicamente en un solo nucleótido. Las digestiones de restricción fueron realizadas combinando⁵⁻¹⁰ µl del producto obtenido por PCR, 2.5 µl de la enzima de restricción apropiada y 2.5 µl del buffer de restricción 10X provisto por la casa comercial (New England Biolabs; concentración final = 1X buffer) en un volumen total de 25 µl. Las muestras fueron incubadas toda la noche a la temperatura recomendada y luego la digestión fue visualizada por electroforesis en un gel de agarosa.

Tabla 1. Secuencias de los Primer para las Reacciones de PCR.

| Primer | Secuencia (5'→3') |
|--|---|
| NAT1(-10) forward (pre-amplicon) | TTAGGAATTCATGGACATTGAAGCATATCTTGAAA GAAT |
| NAT1(1148)reverse (pre-amplicon/nested) | GCTTCTTAGCATAAATCACCAA |
| NAT1(1053)forward (nested, mutagénico) | CAAACCTTTTCAAATAATAATAATAATATATA |
| NAT2 forward | GGAACAAATTGGACTTGG |
| NAT2 reverse | TCTAGCATGAATCACTCTGC |
| GSTM1 forward | GTTGGGCTCAAATATACGGTGG |
| GSTM1 reverse | GTTGGGCTCAAATACGGTGG |
| GSTT1 forward | TTCTTACTGGTCTCACATCTC |
| GSTT1 reverse | TCACCGGATCATGGCCAGCA |
| Albúmina forward | GCCCTCTGCTAACCAAGTCTACT |
| Albúmina reverse | GCCCTAAAAGAAAATCGCCAATC |
| P100 (CYP2D6; pre-amplicon,f) | GGCCTACCCTGGGTAAGGGCCTGGAGCAGGA |
| P100 (CYP2D6; pre-amplicon,r) | CTCAGCCTCAACGTACCCTGTCTCAAATGCG |
| P*3 (CYP2D6; 353nt amplicon, mutagénico,f) | CCTGGGAAGAAGTCGCTGGACCAG |
| P2 (CYP2D6; 353nt/467nt amplicons,r) | GAGACTCCTGGTCTCTCG |
| P522 (CYP2D6;201nt amplicon, mutagénico,f) | GGCTGGGTCCAGGTCATAC |
| P51 (CYP2D6; 201nt amplicon,r) | GCTGGGGCCTGAGCTT |
| P31 (CYP2D6; 467nt amplicon,f) | TAATGCCTTCATGGCCACGCG |

Nota: Los nucleótidos subrayados indican una base errónea (mismatch) en el primer para generar un sitio de restricción.

Análisis y almacenamiento de los datos

Este trabajo requirió el análisis de algunos genes y sus correspondientes polimorfismos. En algunos casos, la alteración de la secuencia fue detectado por la aparición de un sitio de restricción (p.e. NAT2-C481T). En otros casos, la alteración de la secuencia fue detectada por la pérdida de un sitio de corte (p.e. CYP2D6-G1846A). Para evitar confusiones mientras se analizaban y almacenaban los datos obtenidos, un esquema simple fue desarrollado para eliminar la necesidad de pensar acerca de la interpretación de los resultados, y no necesitar del uso de los símbolos +/- . Los polimorfismo en este estudio fueron bialélicos. Es decir, por cada polimorfismo existían 3 posibilidades de genotipo (homocigoto normal – wildtype -; heterocigoto y homocigoto mutante) los mismos que podrían ser interpretados simplemente analizando el número de bandas que se obtuvieran luego de la digestión hecha por la enzima de restricción. Por ejemplo, la digestión con KpnI del amplicon NAT2 podía ser registrada como "1" (1 banda, homocigoto mutante), "2" (2 bandas, homocigoto normal –wildtype-) o "3" (3 bandas, heterocigoto). Una notable excepción de la correlación entre el

número de bandas de restricción y el genotipo ocurría en la digestión del amplicon CYP2D6 353nt con BstNI. Esto se debía a que existen dos sitios polimórficos BstNI dentro del mismo amplicon. Uno de los polimorfismos incluía el apareamiento de un sitio de restricción cuando mutaba (1707delT), mientras que en el otro fragmento (G1846A) involucraba la pérdida de un sitio de restricción. En este ejemplo, existen dos maneras en las que 3 bandas podrían ser generadas. Sin embargo, ellas podían ser distinguidas entre sí registrándolas de esta manera: 3353 (Indicaba 3 bandas, la más larga con 353nt; G1846A/Normal) y 3190 (indicaba 3 bandas, la más larga de ella era de 190nt; homocigoto mutante 1707delT).

La notación de las variantes de la Glutación-S-transferasa fueron basadas por la presencia o ausencia de una banda única por cada 3 bandas presentes en el amplicon luego de una amplificación multiplex. Las "variantes" para estos genes fue un alelo nulo-null-. Muchas veces, ambas copias del gen eran borradas y por lo tanto no era posible su amplificación por PCR. Desde que el genotipo nulo -null- para ambos genes puede ser observado en la población general a frecuencias entre 0.15 y 0.30, individuos simultáneamente homocigotos null para ambos genes pueden ser esperados en una frecuencia de 0.05. Para distinguir entre homocigotos dobles de genotipo nulo -null- de amplificaciones defectuosas, el gen de la albúmina fue también co-amplificado para servir como control positivo del PCR. La notación consistió en T, M o A si el GSTT1, GSTM1 o las bandas de albúmina estaban presentes, o X si estaban ausentes.

Resultados

Cada una de las 29 muestras de sangre fueron analizadas para 5 genes diferentes. El número de sitios polimórficos para cada gen difería, y el fluctuaba desde 1 a 5.

N-acetiltransferasa 1 (NAT1), N-acetiltransferasa 2 (NAT2), Citocromo P450-2D6 (CYP2D6), Glutación-S-Transferasa Theta 1 (GSTT1), y Glutación-S-Transferasa Mu 1 (GSTM1) fueron los genes investigados.

N-Acetyltransferasa 2

NAT2 contiene tres polimorfismos de interés para este estudio. La amplificación PCR de NAT2 genera un fragmento de 1.1 kb que contiene los sitios polimórficos G857A, C418T, y G590A. El uso de secuencias primer flanqueando la región codificante, aseguraba la amplificación específica de NAT1 y no del muy cercano NAT2 o del pseudo gen NATP.⁴

Digestión TaqI (Polimorfismo G590A)

Cuando A esta presente en el nucleótido 590, a diferencia de G de la variante normal -wildtype-, TaqI no corta en el sitio polimórfico y tres fragmentos 395nt, 381nt, y 326nt aparecerán en el gel. Cortes ocurrían a 590 cuando G está presente, resultando en la pérdida de un fragmento de 395nt y en la ganancia de dos nuevos fragmentos (226nt y 169nt)

para un total de cuatro fragmentos: 381nt, 326nt, 226nt, y 169nt (Figura 1). Los heterocigotos muestran cinco fragmentos de tamaño 395nt, 381nt, 326nt, 226nt, y 169nt. Entre nuestras 29 muestras de referencia, la digestión con TaqI del gen NAT2 al menos en una muestra exhibió cada uno de los tres genotipos posibles: un homocigoto mutante (590A/590A), 15 homocigotos normales - wildtype- (G590/G590), y 13 heterocigotos (G590/590A) (véase Figura 2; -homocigoto mutante no mostrado-).

Digestión BamHI (Polimorfismo G857A)

Dos de los 3 posibles genotipos fueron identificados en NAT2 con la digestión con BamHI (Tabla 2). Si una G se encuentra en la posición 857, BamHI cortará en dicho sitio, creando dos fragmentos, uno de 819nt y el otro de 283nt. Si una A se encuentra en la posición 857, la enzima no reconocerá la secuencia, dejando al fragmento de 1102 intacto. Los heterocigotos muestran tres bandas (1102nt, 819nt, y 283nt). Un total de 23 muestras tuvieron dos bandas (819nt y 283nt) resultantes de la digestión (Datos no mostrados). Esto indica que todas fueron homocigotas wildtype para el polimorfismo (G857/G857). Seis muestras tuvieron tres bandas (1102nt, 819nt, y 283nt) mostrando que todas ellas eran heterocigotas (G857/857A) para el polimorfismo G857A, teniendo ambas el alelo normal wildtype y los alelos mutantes. Ningún ejemplo de un homocigoto mutante

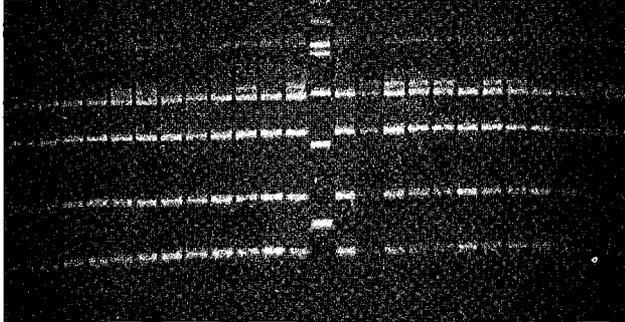
Tabla 2. Genotipo de los polimorfismos de NAT2.

| Muestra No. | G857A Bam HI 1,2,3 | C481T Kpnl 1,2,3 | G590A -TaqI 3,4,5 |
|-------------|--------------------|------------------|-------------------|
| 220501 | 2 | 3 | 4 |
| 220502 | 2 | 1 | 4 |
| 220503 | 2 | 2 | 4 |
| 220504 | 2 | 3 | 4 |
| 220505 | 3 | 2 | 5 |
| 220506 | 2 | 2 | 5 |
| 220507 | 2 | 3 | 4 |
| 220508 | 2 | 1 | 4 |
| 220509 | 2 | 1 | 4 |
| 220510 | 2 | 3 | 5 |
| 220511 | 2 | 2 | 4 |
| 220512 | 2 | 2 | 5 |
| 220513 | 3 | 2 | 4 |
| 220514 | 2 | 2 | 5 |
| 220515 | 3 | 2 | 5 |
| 220516 | 2 | 2 | 5 |
| 220517 | 2 | 3 | 5 |
| 220518 | 2 | 3 | 4 |
| 220519 | 2 | 3 | 5 |
| 220520 | 2 | 3 | 5 |
| 220521 | 2 | 2 | 4 |
| 220522 | 2 | 1 | 4 |
| 220523 | 3 | 2 | 5 |
| 220524 | 3 | 2 | 5 |
| 220525 | 2 | 2 | 4 |
| 220526 | 2 | 2 | 4 |
| 220527 | 3 | 1 | 4 |
| 220528 | 2 | 2 | 3 |
| 220529 | 2 | 2 | 5 |

Para G857A y C481T, 1= homocigoto mutante, 2= homocigoto normal wildtype, 3 = heterocigoto. Para G590A, 3= homocigoto mutante, 4 = homocigoto normal wildtype, 5 = heterocigoto.

(857A/857A) fue identificado en ninguna de las 29 muestras de referencia.

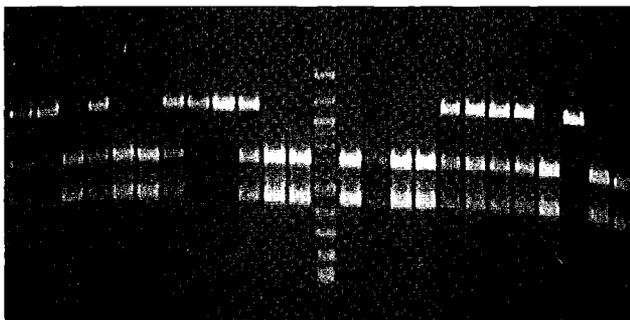
Figura 1. Digestión *TaqI* de NAT2. Línea 13 = marcador molecular de 100bp (NEB). Líneas 5, 6, 10, 12, 15-18, 20, 21, 24 y 25 son heterocigotas. Todas las otras líneas representan muestras normales wildtype homocigotas.



Digestión *KpnI* (Polimorfismo C481T)

Cuando C está en la posición 481, *KpnI* cortará el amplicon para crear un fragmento de 659nt, y un segundo de 443nt. Cuando T está presente en la posición 481, el fragmento no se cortará. Los heterocigotos, teniendo ambos un alelo C481 y un alelo 481T muestran tres bandas en el gel: 1102nt, 659nt, y 443nt. Cinco homocigotos mutantes (481T/481T), 16 homocigotos wildtype (C481/C481), y 8 polimorfismos heterocigóticos (C481/481T) fueron identificados (Figura 2).

Figura 2. Digestión de NAT1 con *KpnI*. Línea 13 = marcador molecular de 100bp (NEB). Líneas 3, 5, 6, 11, 12, 14-17, 22, 24 y 25 son homocigotos normales wildtype. Líneas 2, 8, 9 y 23 son homocigotos mutantes. Líneas 1, 4, 7, 10 y 18-21 son heterocigotas.



N-acetiltransferasa 1

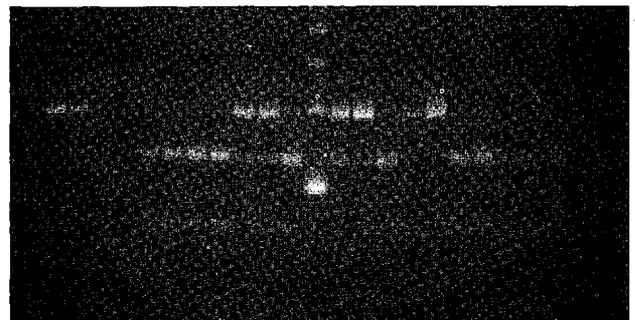
Debido a que la secuencia genómica de NAT1 es similar a otros dos genes homólogos (NAT2 y NATP), amplificaciones anidadas (nested) fueron llevadas a cabo. La primera amplificación (pre-amplicon) utilizó primers fuera de la secuencia codificante de NAT1 asegurando que solo NAT1 era amplificado. La segunda amplificación utilizó el pre-amplicon como molde, sustituyendo el segundo primer anidado 5' (amplificación hemi-nested) para amplificar la región

circundante al sitio polimórfico.³ El primer anidado forward (NAT1-1053) contiene un nucleótido erróneo mutagénico (Tabla 1, subrayada) el cual crea un sitio de restricción *AseI* cuando T está presente como nucleótido 1088 pero no cuando A está presente, de esta manera podemos detectar dos alelos a pesar de que existe un RFLP natural.

Digestión *AseI* (Polimorfismo T1088A)

Para NAT1, un solo sitio polimórfico fue analizado. La amplificación Hemi-nested de la región de NAT1 que contiene el sitio polimórfico 1088 resultaba en la generación de un producto PCR de 96nt. El polimorfismo de interés es T1088A, la notación indica que en la posición 1088 la base podría ser Timina (T) o Adenina (A). Si una T se encuentra presente en la posición 1088, la digestión con la enzima de restricción *AseI* resultará en la generación de dos fragmentos de longitud 64nt y 32nt. Si una A está presente en la posición 1088, entonces la secuencia no será reconocida por *AseI*. El producto PCR que contenga 1088A no será cortado y por lo tanto permanecerá de 96nt. Los heterocigotos generarán todas las tres bandas posibles (96nt, 64nt y 32nt). La digestión con *AseI* nos da la representación de los tres posibles genotipos (Figura 3). Dos muestras fueron homocigotas mutantes (1088A/1088A), 16 fueron homocigotas wildtype (T1088/T1088), y 11 fueron heterocigotas (T1088/1088A) para el polimorfismo T1088A.

Figura 3. Digestión con *AseI* de NAT1. Línea 13 = marcador molecular de 50bp (Life Technologies). Líneas 1, 4, 6-9, 12, 16, 19-23 y 25 son homocigotos normales wildtype. Línea 2 es homocigota mutante. Líneas 3, 10, 11, 14, 15, 18 y 24 son heterocigotas.



Citocromo P450-2D6

Amplificaciones anidadas fueron también realizadas para el análisis de CYP2D6. Un pre-amplicon de 4.68 kb fue el primero en ser generado, asegurándose la amplificación específica de CYP2D6, seguido de 3 amplificaciones anidadas que contienen 4 sitios polimórficos de interés.² Dos de las amplificaciones anidadas involucraban el uso de un primer mutagénico alterado (Mismatched mutagenic primer) para generar un sitio de restricción no presente naturalmente en la secuencia, tal como fue descrito para NAT1 (secuencias de primer, Tabla 1). Cuatro digestiones de restricción fueron luego realizadas.

Digestión MspI (353 amplicon, sitio polimórfico G1758T/A)

Cuando la variante normal wildtype G se encuentra en 1758, el gel nos mostrará fragmentos normales wild-type de 278nt y 75nt después de la digestión con MspI (Datos no mostrados). Sin embargo, el sitio de restricción se pierde si T o A se encuentran en 1758, dejando 1 fragmento de 353nt de longitud. La digestión MspI de los ADNs de este estudio identificaron solo un genotipo, homocigoto normal wildtype (G1758/G1758), para CYP2D6 entre todas las muestras analizadas.

Digestión BsaAI (201nt amplicon, sitio polimórfico 2549delA)

El amplicon PCR que contiene el sitio polimórfico 2549delA es de 201nt de longitud. BsaAI cortará cuando A esté presente (wildtype) en 2549, pero dejará el fragmento intacto si A desaparece. Los fragmentos mutantes serán cortados en dos segmentos pequeños de 181nt y 20nt. Tres bandas aparecerán para los heterocigotos, con tamaños de 201nt, 181nt, y 20nt. Fragmentos normales Wildtype no son digeridos y permanecen de 201nt. Para la digestión con BsaAI, todas a excepción de una de las muestras fueron homocigotas wildtype (2549A/2549A). La única muestra diferente fue heterocigota (2549A/2549delA) para el polimorfismo 2549delA (Figura 4). Ningún homocigoto mutante 2549delA/2549delA fue encontrado entre las 29 muestras de referencia.

Digestión BsmAI (467nt amplicon, sitio polimórfico G1661C)

Para analizar el sitio polimórfico 1661, la PCR produce un amplicon 467nt. BsmAI corta cuando G (wildtype) está presente en el sitio 1661, creando un fragmento de 311nt, y otro de 156nt. Cuando la mutación C está presente en 1661, el sitio de restricción conduce a la formación de tres fragmentos: 209nt, 156nt, y 102nt. El patrón en heterocigotos muestra 4 bandas: 311nt, 209nt, 156nt, y 102nt. Todos los genotipos fueron reportados entre los ADNs analizados (datos no mostrados): 10 fueron heterocigotos (G1661/1661C), 4 fueron homocigotos normales wildtype (G1661/G1661), y 12 fueron homocigotos mutantes (1661C/1661C). Dos muestras no generaron un patrón de bandas lo suficientemente claros para permitir una interpretación.

Digestión BstNI (353nt amplicon, sitio polimórfico 1707delT y G1846A)

Figure 4. Digestión con BsaAI de CYP2D6. Línea 13 = marcador molecular de 100bp (NEB). Línea 21 es heterocigota. Todas las otras líneas representan homocigotos normales wildtype.



Después de una amplificación anidada, un amplicon de 353nt que contiene dos sitios G1846A y 1707delT es obtenido. La digestión con BstNI es usada para interpretar dos SNPs diferentes en el mismo producto amplificado: G1846A y la delección de timina en 1707. Cuando G está en 1846 y T está en 1707, fragmentos de 190nt y 163nt aparecerán en el gel. Cuando T desaparece de 1707 (Homocigoto) tres fragmentos aparecerán: 190nt, 139nt, y 23nt. Cuando 1846 ha sido reemplazado por A en lugar del normal wildtype G (homocigoto), el sitio de restricción BstNI se pierde y el amplicon 353nt permanece intacto (Figura 5). Nueve muestras fueron catalogadas como heterocigotas para G1846A y normal wildtype para T1707 (G1846/1846A/T1707/T1707); 18 homocigotas normal wildtype para ambos polimorfismos (G1846/G1846/T1707/T1707); 1 homocigoto mutante para G1846A (1864A/1864A/T1707/T1707), y 1 muestra amplificada muy débil como para poder ser interpretada. No se encontró 1707delT homocigotos mutantes (G1846/G1846/1707delT/1707delT) ni heterocigotos (G1846/G1846/T1707/1707delT) fueron encontradas entre las 29 muestras de sangre recogidas.

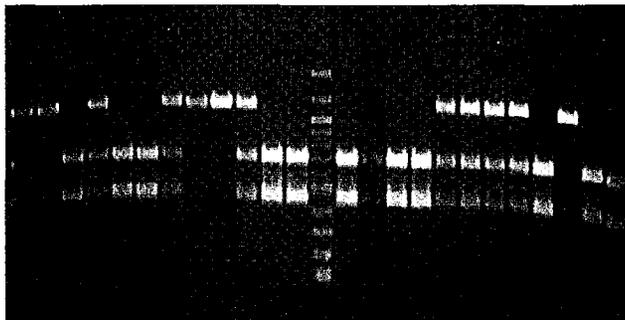
Figura 5. Digestión con BstNI de CYP2D6. Línea 1, 11 y 22 = marcador molecular de 100bp (NEB). Líneas 2, 4, 7-10, 13, 14, 16, 18 y 19 son homocigotos normales wildtype. Líneas 5, 6, 1, 15 y 17 son heterocigotos para G1846A.



Glutation-S-transferasa Theta 1 y Mu 1

GSTT1 y GSTM1 son diferentes de los otros polimorfismos representados en este estudio en la que el mayor defecto es la delección de esencialmente todo el gen. Aunque no se requiere digestión con enzimas de restricción ya que es posible registrar este polimorfismo únicamente por la presencia o ausencia del producto PCR del tamaño apropiado. El análisis puede ser simplificado co-amplificando ambos genes en una misma reacción de PCR. La amplificación de albúmina es también incluida como un control del PCR para asegurarnos que las reacciones de amplificación fueron satisfactoriamente realizadas porque si ambas copias de ambos genes GST están deleccionados en la misma muestra, no existiría ningún producto de amplificación. Genotipos nulos – null- ocurren con una frecuencia entre 0.15 y 0.30 para cada uno de los loci GST.⁵ Una desventaja de esta técnica es que no nos permite diferenciar entre los genotipos de los homocigotos normales wildtype de los heterocigotos. GSTT1 muestra una banda de 480nt, GSTM1 una banda de 215nt, y la albúmina. Que nos sirve como control del PCR) una banda de 350nt. De las 29 muestras de ADN, 7 contenían ambos theta y mu, 9 carecían de ambos theta y mu ;10 carecían solo de mu y 3 carecían solo de theta (Figura 6).

Figura 6. Análisis con PCR de GSTT1, GSTM1 y Albúmina. Línea 13 = marcador molecular de 100bp (NEB). Líneas de 3, 4, 6, 8, 9 y 20 son homocigotos nulos para T1 y M1 ; comparar con la falla de amplificación de la línea 15 . Líneas 1, 5, 10, 11, 16, 18, 23-25 son homocigotos null para M1 únicamente. Líneas 21 y 22 son homocigotos null para T1 únicamente. No es posible identificar heterocigotos para GSTM1 o GSTT1 usando este análisis.



Conclusiones

En el total de 29 ADN genómicos analizados, 9 de las 11 mutaciones de interés fueron identificadas. Dos polimorfismos (CYP2D6-G1758T/A y CYP2D6-1707delT) incluidas en este estudio no fueron encontradas en ninguna de las muestras. Estas mutaciones reportadas ocurren con una frecuencia muy baja en la población general y se requeriría de una muestra poblacional más grande para encontrar algún ADN que posea uno de estos polimorfismos.² Ejemplares de homocigoto G857A SNP para NAT2; homocigoto y heterocigoto G1758T/A para CYP2D6, y homocigoto 2549delA para CYP2D6 no fueron tampoco identificados en las 29 muestras de ADN recolectadas. Esta muestra de referencia poblacional deberá irse ampliando, para de esta manera llegar a poseer ejemplares de cada una de las variantes polimórficas. Sin embargo esta colección de muestras se encuentra muy bien y suficientemente caracterizada como para servir de manera adecuada como material de referencia para muchos estudios futuros de genotipificación.

Agradecimiento

La presencia en CHORI del Dr. Espín fue posible gracias al aporte del SSI (Sustainable Science Institute).

Bibliografía

1. Iovannisci DM. Highly Efficient Recovery of DNA from Dried Blood Using the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. *Epicentre Forum* 2000;7(1):6-8.
2. Sachse C, et al. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60(2):284-95.
3. Deitz AC, Doll MA, Hein DW. A restriction fragment length polymorphism assay that differentiates human N-acetyltransferase-1 (NAT1) alleles. *Anal Biochem* 1997;253(2):219-24.
4. Doll MA, et al. Determination of human NAT2 acetylator genotype by restriction fragment-length polymorphism and allele-specific amplification. *Anal Biochem* 1995;231(2):413-20.
5. Arand M, et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem* 1996;236(1):184-6.