



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
"DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO"
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (REGIONES
5'UTR Y 3'UTR) EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN DE LA REGIÓN
CENTRAL DE VENEZUELA**

Trabajo de Grado presentado por la Licenciada Cecilia Andreina Villegas Mendoza,
ante el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo Sede Aragua,
para optar al Título de Magister en Ciencias Biomédicas Mención Bioquímica y
Biología Molecular.

Tutora: Dra. Nancy de La Trinidad Moreno de Martínez

Maracay, Enero de 2015

Universidad de Carabobo



Edo. Aragua – Venezuela

Facultad de Ciencias de la Salud

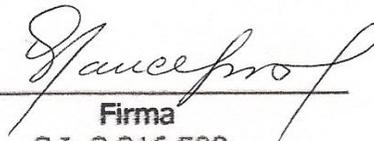


Dirección De Asuntos Estudiantiles

AVAL DEL TUTOR

Dando cumplimiento a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo en su Artículo 133, quien suscribe NANCY DE LA TRINIDAD MORENO DE MARTÍNEZ titular de la cédula de identidad N° 3.216.508, en mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado titulado: "HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (REGIONES 5'UTR Y 3'UTR) EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN DE LA REGION CENTRAL DE VENEZUELA" presentado por la ciudadana CECILIA ANDREINA VILLEGAS MENDOZA Titular de la cédula de identidad N° 18.553.456, para optar al título de MAGISTER EN: CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, hago constar que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se le designe.

En MARACAY a los 04 días del mes de NOVIEMBRE del año 2014


Firma
C.I: 3.216.508



ACTA DE VEREDICTO
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Nosotros, miembros del jurado designado para la evaluación del trabajo especial de grado Titulado:

“HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (REGIONES 5’UTR Y 3’UTR) EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN DE LA REGIÓN CENTRAL DE VENEZUELA”.

Presentado por: CECILIA ANDREINA VILLEGAS MENDOZA

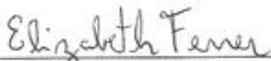
Cédula de Identidad; V-18.553.456

Para optar al Título de: MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Estimamos que el mismo reúne los requisitos por lo cual es: APROBADO, ya que cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 129 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: “El trabajo de grado es el resultado del estudio, que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante, ...”. Asimismo, consideramos que el trabajo hace un gran aporte en el área de farmacogenética, por lo cual, se le otorga la Mención Honorífica y la Mención Publicación.

Maracay a los 13 del mes de marzo de 2015


MSc. Marifel Carrozza
C.I: 14.052.558


Dra. Elizabeth Ferrer




Dra. Zorella Blanco
C.I: 9.696.157



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

Año Jubilar Marzo 2012 - 2013

Dirección de Asuntos Estudiantiles

Sede Aragua

Rif. 20000041-4

ACTA DE DISCUSIÓN TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Maestría titulado:

"HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (REGIONES 5'UTR Y 3'UTR) EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN DE LA REGIÓN CENTRAL DE VENEZUELA".

Presentado para optar al grado de **MAGISTER EN CIENCIAS BIOMEDICAS, MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** por el aspirante:

CECILIA ANDREINA VILLEGAS MENDOZA
C.I. V-18.553.456

Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Maracay a los 13 del mes de MARZO de 2015

Elizabeth Ferrer

Dra. Elizabeth Ferrer
C.I:7.101.850

Marifel Carrozza

MSc. Marifel Carrozza
C.I: 14.052.558



Zorella Blanco

Dra. Zorella Blanco
C.I: 9.696.157

Gilda Marcano 13.03.15

"Democracia y Autonomía, garantía de presente y futuro Universitario"
Final Av. Leonardo Ruiz Pineda - La Morita - Edo. Aragua
Telf. 0243-2710520 - 2713471 ext. 207

DEDICATORIA

A los pacientes, especialmente a los niños con
cáncer, a quienes llamo: “Los valientes”.

AGRADECIMIENTO

A Dios, mi fuerza y sustento.

A mi madre, Esther Mendoza, mi más grande apoyo, simplemente gracias por aligerar mis cargas en los días difíciles.

A todos los pacientes y participantes de esta investigación, al igual que al personal médico y de enfermería, del Servicio de Hematología del Hospital Central de Maracay, por su colaboración en la toma de algunas muestras.

Mi más sincero agradecimiento a los profesores Nancy Moreno de Martínez y José Martínez, por el tiempo dedicado a mi formación, por todos y cada uno de los conocimientos brindados a mi persona y por la confianza depositada en mí. Es un honor aprender de sus manos.

A Carlos Flores, por su generosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A Yuselin Mora, por su valioso apoyo y por la colaboración durante el desarrollo de algunos ensayos.

Al personal de la Sección de Polimorfismos Genómicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Lic. Teresa Oropeza, y Lic. Narviz Pulido, por la colaboración prestada durante el desarrollo de esta investigación.

A los profesores: Flor Herrera, Heriberto Correia y Francisco Rodríguez por ceder parte de su espacio y permitir la utilización de varios equipos.

Este trabajo fue realizado en la Sección de Polimorfismos Genómicos de Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso”. Recibió financiamiento del programa de becarios asistenciales del MPPPS y del FONACIT a través del proyecto N° 2012001248.

Al personal de la oficina administrativa del instituto BIOMED.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1-6
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5

CAPÍTULO II

	Pág.
MARCO TEÓRICO.....	7-29
2.1 TIMIDILATO SINTASA.....	7
2.1.1 Gen de la TS (<i>TYMS</i>)	10
2.2 POLIMORFISMOS EN EL GEN <i>TYMS</i>	14
2.2.1 Polimorfismo TSER (rs34743033).....	15
2.2.2 Distribución del polimorfismo TSER en distintas poblaciones....	18
2.2.3 Polimorfismo 3RG>C.....	21
2.2.4 Polimorfismo 1494DEL6 (rs34489327).....	22
2.2.5 Haplotipos <i>TYMS</i>	23

2.3 EXPRESIÓN DE TS EN TEJIDO TUMORAL.....	24
2.3.1 Pérdida de la heterocigocidad	25
2.4 EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER EN VENEZUELA.....	26
2.5 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	28
2.5.1 Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	28

CAPÍTULO III

	Pág.
MARCO METODOLÓGICO.....	30-42
3.1 Tipo de investigación.....	30
3.2 Población y muestra.....	30
3.3 Obtención de la muestra de ADN	31
3.4 Verificación de cantidad y calidad de las muestras de ADN.....	33
3.5 Determinación del polimorfismo TSER (Región 5'UTR).....	34
3.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	35
3.6 Determinación del polimorfismo 1494DEL6 (Región 3'UTR).....	37
3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
3.6.2 Polimorfismos de Longitud Fragmentos de Restricción.....	39
3.7 Desbalance alélico.....	40
3.8 Determinación de frecuencias de genotipos y alelos, equilibrio de Hardy-Weinberg y comparación con otras poblaciones.....	40

3.9 Estimación de haplotipos y diplotipos.....	41
3.10 Inferencia del fenotipo de expresión de TS.....	41

CAPÍTULO IV

	Pág.
RESULTADOS.....	43-56
4.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TSER.....	43
4.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 1494DEL6.....	45
4.3 Frecuencia haplotípica 5'UTR/3'UTR.....	48
4.4 Frecuencia diplotípica en población de referencia.....	51
4.5 Frecuencia diplotípica en el grupo de enfermos.....	53
4.6 Comparación estadística de los polimorfismos <i>TYMS</i> con los reportados en poblaciones de otras latitudes	53
4.7 Desbalance alélico.....	56

CAPÍTULO V

	Pág.
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

	Pag.
1 Relación entre la TS y la síntesis de pirimidinas, Formación del complejo TS-5FdUMP-MTHF (Inactivo) en presencia de 5-FdUMP.....	9
2 Elementos funcionales del promotor del gen <i>TYMS</i>	11
3 Elementos moduladores de la expresión de <i>TYMS</i>	13
4 Polimorfismos en el gen de la Timidilato sintasa (<i>TYMS</i>).....	16
5 Programa de amplificación utilizado en el análisis del polimorfismo TSER	37
6 Representación gráfica del diplotipo de un individuo con alta expresión de TS.....	42
7 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para visualizar el polimorfismo TSER	43
8 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para verificar la presencia de productos PCR región 3'UTR del gen <i>TYMS</i>	46
9 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, para observar resultado de RFLP de la región 3'UTR del gen <i>TYMS</i>	46

TABLAS

	Pag.
1 Frecuencia alélica de los polimorfismos TSER en distintas poblaciones.....	19
2 Frecuencia genotípica del polimorfismo TSER en distintas poblaciones.....	20
3 Tamaño del producto PCR según el número de repeticiones del polimorfismo TSER en 5'UTR del gen <i>TYMS</i>	35
4 Oligonucleótidos cebadores utilizados para el análisis del polimorfismo TSER	36
5 Oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar una secuencia de 142/148 pb de la región 3'UTR de <i>TYMS</i>	38
6 Fragmentos de restricción esperados para la digestión de los productos PCR con la enzima <i>Dra</i> I.....	39
7 Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos TSER en 5'UTR del gen <i>TYMS</i> . Población de referencia.....	44
8 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo TSER en 5'UTR del gen <i>TYMS</i> . Grupo de enfermos.....	45
9 Frecuencia genotípica del polimorfismo 1494DEL6 en 3'UTR del gen <i>TYMS</i> . Población de referencia.....	47
10 Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 1494DEL6 en 3'UTR del gen <i>TYMS</i> . Grupo de enfermos.....	48
11 Distribución de haplotipos regiones 5'UTR/3'UTR del gen <i>TYMS</i> , población de referencia (n= 260 individuos).....	49
12 Distribución de haplotipos regiones 5'UTR/3'UTR del gen <i>TYMS</i> , grupo de enfermos (n=20 individuos).....	50
13 Comparación estadística haplotipos 5'UTR/3'UTR, Grupo de referencia vs grupo de enfermos.....	50
14 Fenotipo de expresión de TS en función de los diplotipos deducidos con el programa PHASE 2.1.1 en la población de referencia.....	52
15 Nivel de expresión de TS en población de referencia.....	53

16	Fenotipo de expresión de TS en función de los diplotipos deducidos con el programa PHASE 2.1.1 en el grupo de enfermos	54
17	Distribución genotípica del polimorfismo TSER en varias poblaciones.....	55
18	Distribución genotípica del polimorfismo 1494DEL6 en varias poblaciones	56

RESUMEN

HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA TIMIDILATO SINTASA (REGIONES 5'UTR Y 3'UTR) EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN DE LA REGIÓN CENTRAL DE VENEZUELA

AUTORA:

CECILIA ANDREINA VILLEGAS MENDOZA

TUTORA:

DRA. NANCY DE LA TRINIDAD MORENO DE MARTÍNEZ

La enzima Timidilato Sintasa (TS) codificada por el gen *TYMS*, es un blanco para 5-Fluorouracilo (5-FU) y Metotrexato, antineoplásicos que inhiben su función. La expresión de *TYMS* está modulada principalmente por un polimorfismo en 5'UTR el cual consiste en secuencias de 28 pb repetidas en tándem, los alelos más comunes, son los de dos (2R) y tres repeticiones (3R), este último se asocia con niveles elevados de TS. En 3'UTR de *TYMS* existe otro polimorfismo consistente en la deleción de 6pb, cuya presencia se asocia con inestabilidad del ARNm y disminución de los niveles enzimáticos. Una menor expresión de TS, se relaciona con mejor respuesta farmacológica en pacientes con cáncer tratados con ambos fármacos. El objetivo del trabajo fue: Analizar los haplotipos del gen *TYMS* (regiones 5'UTR y 3'UTR) en una muestra de población de la región central de Venezuela. Se obtuvo consentimiento informado, se tomó una muestra sanguínea para aislar ADN. La determinación de los polimorfismos se realizó mediante ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa y en la región 3'UTR se utilizó digestión con enzimas de restricción. Se identificaron 6 haplotipos cuyas frecuencias fueron: 2R/-6pb (5,96%), 2R/+6pb (31,7%), 3R/-6pb (31,3%), 3R/+6pb (30%) 4R/-6pb (0,38%), 4R/+6pb (0,57%). El análisis de diplotipos en el conjunto de individuos estudiados arrojó que el 50,77 de la población posee un fenotipo de alta expresión de TS, lo que está asociado a respuesta pobre al tratamiento con 5-FU y Metotrexato. Los resultados del trabajo aportan conocimientos básicos necesarios para iniciar estudios de farmacogenética relacionados con la utilización de estos fármacos en pacientes con cáncer.

Palabras clave: Gen *TYMS*, Timidilato sintasa, haplotipos, 5-FU, Metotrexato

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La Timidilato Sintasa (TS), es una enzima fundamental en el metabolismo del uracilo, la reparación del ADN y el balance de los cuatro nucleótidos requeridos para la síntesis del mismo. Su función principal es catalizar la conversión de 5-desoxiuridina monofosfato (dUMP) hasta 5-desoxitimidina monofosfato (dTMP), un precursor esencial para la síntesis de ADN durante la replicación celular (Voet y Voet 2006). Debido a que la inhibición de TS trae consigo consecuencias catastróficas sobre la replicación, siendo el efecto más notable la muerte celular; a lo largo de los años se han utilizado diversos fármacos cuyo mecanismo de acción está basado en la inhibición de la función de TS con el fin de tratar las enfermedades que involucran crecimiento celular acelerado, como lo es el cáncer. Sin embargo, se ha demostrado que la efectividad de estos agentes, depende, entre otros factores, de la tasa de expresión de esta enzima, elemento que juega un rol bien importante en el tipo de respuesta farmacológica de cada individuo (Krajinovic et al., 2002; Danenberg 2004; Lenz et al., 2004; Marsh, 2005; Lima et al., 2013).

La expresión de TS está modulada por varios polimorfismos en el gen que codifica esta enzima (*TYMS*); uno de ellos, se encuentra en la región no traducible en el extremo 5' (5'UTR), se conoce con el nombre de TSER y consiste en secuencias

de 28 pb repetidas en tándem que actúan como un elemento *cis* activador (Kaneda et al., 1990; Lurje et al., 2009). Las repeticiones más frecuentes son las formas alélicas de dos y tres repeticiones identificadas como 2R y 3R, respectivamente (Marsh et al., 1999; Marsh, 2005). En 3R se ha descrito, a su vez, un polimorfismo de un sólo nucleótido (G>C) en la posición 12 de la segunda repetición (Mandola et al., 2003), lo que da lugar a tres formas alélicas: 2R, 3RC y 3RG. El otro polimorfismo identificado en este gen es la variación de una secuencia de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1494 en 3'UTR del gen (1494DEL6) cuya inserción o deleción se identifica respectivamente como: +6pb y -6pb (Ulrich et al., 2000).

En este sentido, varios autores han demostrado que estas variantes alélicas están estrechamente relacionadas con el nivel de expresión de TS, lo que a su vez está asociado a la respuesta terapéutica, de manera que existe una relación inversa entre el nivel intracelular de enzima y el beneficio terapéutico en pacientes que reciben quimioterapia con fármacos inhibidores de TS (Danenberg 2004; Marsh, 2005), de modo que, ha sido demostrado a través de numerosos estudios que niveles altos de TS se correlacionan directamente con mal pronóstico en cáncer de mama (Pestalozzi et al., 1997), cáncer gástrico (Lentz et al., 1996), cáncer colorrectal (Aschele et al., 1999) y Leucemia Linfoblástica (Krajanovic et al., 2002), entidades cuyo tratamiento está basado en este tipo de agentes quimioterapéuticos. En Venezuela se publicó un trabajo importante donde se investigó la expresión de TS a través de métodos inmunohistoquímicos, en muestras de biopsias provenientes de 34 pacientes con cáncer de colon quienes recibieron tratamiento con 5F-U y leucovorina. Los pacientes en cuyos tumores se detectó una expresión baja de TS, mostraron una evolución más favorable y tuvieron una mayor probabilidad de sobrevida (Hernández et al., 2007).

Debido a que los polimorfismos del gen *TYMS*, juegan un rol fundamental en la expresión de esta enzima, diversos autores proponen la utilización de los mismos como elementos predictores de la efectividad de los fármacos inhibidores de TS

(Ross et al., 2010; Nalejska et al., 2014), hecho que está basado en estudios diversos donde se ha demostrado que los individuos con el genotipo 3R/3R en 5'UTR del gen poseen una mayor eficiencia en la traducción de ARNm de TS al ser comparados con los individuos que poseen los genotipos 2R/3R y 2R/2R, quienes reflejan menores niveles intracelulares de enzima (Kawakami et al., 2001). Asimismo estudios de correlación entre estos genotipos y la respuesta clínica demuestran que los pacientes con genotipo 3R/3R tratados con MTX y 5-FU tienen mayor probabilidad de presentar una respuesta deficiente al tratamiento en relación a los pacientes con los genotipos 2R/3R o 2R/2R (Krajinovic et al., 2002; Huang et al., 2009).

Con respecto a la influencia que tienen las variantes genéticas en 3' UTR sobre el nivel de expresión de TS, se ha determinado que el alelo -6pb está vinculado con inestabilidad del ARNm, niveles bajos del mismo y menor expresión enzimática (Ulrich et al., 2000; Lenz et al., 2002; Pullmann et al., 2006.). La importancia clínica de dicha variante fue estudiada por Huang et al. (2009), quienes encontraron que los pacientes con cáncer de estómago tratados con 5-FU que eran homocigotos para la inserción (+6pb/+6pb) tenían una supervivencia total más corta (11,5 meses) en comparación con los que portaban el genotipo -6pb/-6pb (36,9 meses) o +6pb/-6pb (20,8 meses).

La distribución de los genotipos TSER y 1494DEL6 se presenta de forma variable en las distintas poblaciones, pudiéndose observar en la mayoría que las formas alélicas más comunes (3R y +6pb) son las que condicionan al individuo a una respuesta deficiente ante la terapia con fármacos inhibidores de TS (Marsh et al., 1999; Iacopetta et al., 2001; Acuña et al., 2006; Lecomte et al., 2004). Por ejemplo, se ha reportado que el alelo 3R es predominante en poblaciones de origen asiático, con una frecuencia mayor al 80% en China, sin embargo en la población caucásica la frecuencia varía en torno al 60% (Marsh et al., 1999). Las mismas variaciones han sido observadas con respecto a la distribución de las formas alélicas en 3'UTR; de manera que en población caucásica se ha reportado una frecuencia de 29% para la

variante -6pb, no obstante la frecuencia del mismo alelo en población asiática alcanza el 65,30%, según datos reportados por Ulrich et al. (2000), e Inoue et al. (2009), respectivamente.

Tomando en cuenta estas diferencias poblacionales, y dada la importancia que tiene la identificación de estas variantes alélicas en individuos con cáncer con alto riesgo de recidiva de acuerdo a sus características genéticas; enfermedad que en Venezuela ocupa el segundo lugar entre las causas muertes en adultos y niños con edades comprendidas entre los 5-14 años (MPPS/Anuario de mortalidad 2011), es recomendable emprender el estudio de genes con importancia en farmacogenética; disciplina que estudia el efecto de la variabilidad genética de un individuo en su respuesta a determinados fármacos, y por estos motivos se ha planteado como objetivo de este trabajo: Analizar los haplotipos del gen de la Timidilato Sintasa (regiones 5'UTR y 3'UTR) en una muestra de población de la región central de Venezuela, y en un grupo de pacientes con diagnosticado con Leucemia Linfoblástica Aguda, como paso previo al análisis de pacientes con cáncer. Los datos obtenidos pueden contribuir a la personalización del tratamiento de los pacientes con ciertos tipos de neoplasias malignas y otras enfermedades, lo cual maximizaría la respuesta terapéutica.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Analizar los haplotipos del gen de la Timidilato Sintasa (regiones 5'UTR y 3'UTR) en una muestra de población de la Región Central de Venezuela, y en un grupo de pacientes diagnosticados con Leucemia y tratados con Metotrexato.

1.2.2 Objetivos específicos:

- 1.- Obtener frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos siguientes:
 - Repetición en tándem de minisatélites en la región 5'UTR del gen *TYMS*
 - Ausencia o presencia de la delección de 6pb en la posición 1494 en la región 3'UTR del gen *TYMS*
- 2.- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg
- 3.- Estimar los haplotipos 5'UTR/3'UTR
- 4.- Establecer los posibles diplotipos y la frecuencia con la que éstos se presentan en la población analizada.
- 5.- Inferir en el fenotipo de expresión de TS mediante el análisis de los diplotipos.
- 6.- Comparar estadísticamente los resultados de este estudio con los obtenidos en otras poblaciones

7.- Investigar el posible desbalance alélico o pérdida de la heterocigocidad de las variantes presentes en las regiones 3'UTR y 5'UTR del gen *TYMS* en dos poblaciones celulares diferentes (Medula ósea y células bucales) de pacientes diagnosticados con diagnóstico de Leucemia, tratados con metotrexato y atendidos en el Servicio de Hematología del Hospital Central de Maracay - Edo. Aragua.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 TIMIDILATO SINTASA

La Timidilato sintasa (TS) (EC 2.1.1.45) es un homodímero evolutivamente muy conservado de 70 kD y 330 aminoácidos, donde alrededor del 20% de sus residuos se mantienen invariables en los mamíferos, bacterias, virus, hongos y protozoos. Un elevado porcentaje de estos residuos se ubican en una hendidura que representa el lugar activo. Esta enzima tiene un rol fundamental en el metabolismo, reparación del ADN y el balance de los cuatro nucleótidos requeridos para la síntesis del mismo, siendo su función principal la de catalizar la conversión de 5-desoxiuridina monofosfato (dUMP) hasta 5-desoxitimidina monofosfato (dTMP) un precursor esencial para la síntesis de ADN durante la replicación celular (Voet y Voet 2006).

El mecanismo de síntesis de dTMP, llevado a cabo por la TS involucra la metilación reductiva de dUMP mediante la transferencia de una unidad de carbono a nivel de oxidación de metileno y reduciéndolo a nivel de metilo. Durante esta reacción el 5,10 Metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) actúa como cofactor y donador del grupo carbono, generando a su vez la conversión simultánea de este último hasta dihidrofolato (DHF), quien posteriormente es regenerado por otros mecanismos enzimáticos (Figura 1A). De esta manera la TS provee uno de los cuatro sustratos

Indispensables para la síntesis de ADN, además de tener importantes implicaciones en el metabolismo del folato de la célula. (Voet y Voet 2006)

Estas funciones hacen de TS un elemento esencial en la multiplicación celular, motivos que la convierten en el principal blanco de acción de los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer, enfermedad que involucra una proliferación celular autónoma y descontrolada.

Entre estos agentes destaca el 5-fluorouracilo (5-FU) y su compuesto activo la 5-Fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), un análogo de uracilo capaz de unirse a TS en presencia de 5,10-MTHF, y formar un complejo covalente TS-5FdUMP-MTHF, que bloquea su función, disminuyendo al mismo la disponibilidad de la misma para sintetizar dTMP y replicarse, lo que trae como consecuencia la muerte celular (Voet y Voet 2006; Nishino et al., 2013) (Figura 1B).

Por otra parte, se encuentran los análogos de folato, cuyo representante más común es el Metotrexato (MTX), estos fármacos poseen un mecanismo de acción basado en la inhibición “indirecta” de la función de TS. El MTX, al igual que los análogos de uracilo, inhiben la síntesis de pirimidinas por medio del bloqueo de la acción de TS, pero en este caso el mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR), un elemento clave en el ciclo de regeneración del 5,10-MTHF, compuesto que es preciso para la función de TS. (Tian y Cronstein 2007).

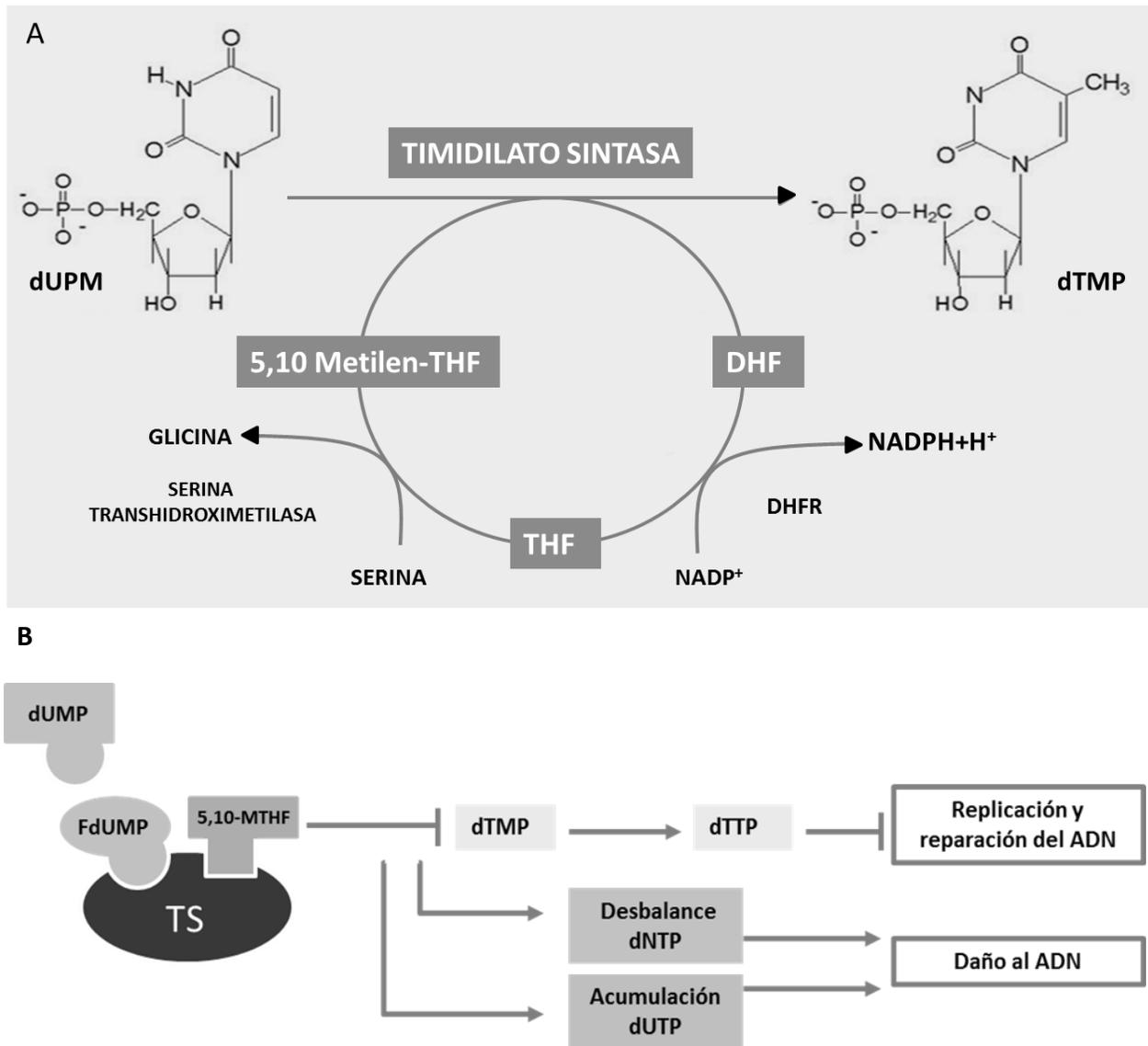


Figura 1. A) Relación entre la TS y la síntesis de pirimidinas. B) Formación del complejo TS-FdUMP-MTHF (Inactivo) en presencia de FdUMP. Fuente: Modificado de Longley et al. (2003).

2.1.1 Gen de la TS (*TYMS*)

La enzima TS es codificada por el gen *TYMS* (OMIN# 188350), ubicado en el brazo corto del cromosoma 18, en la región 18p11.32. (Hori et al., 1990), contiene 7 exones y codifica una proteína de 313 aminoácidos (Kaneda et al., 1990). Las características estructurales del gen *TYMS* son únicas en comparación con muchos otros genes, especialmente en el extremo 5' no traducible (5'UTR), zona reconocida como la “región promotora del gen *TYMS*”; es allí donde se encuentran los elementos esenciales que participan en la regulación de su expresión, proceso que a su vez, está modulado por varios polimorfismos cuya presencia o ausencia repercuten directamente sobre la tasa de transcripción y traducción de TS, y cuyas variantes se han vinculado a la eficacia terapéutica de diversos fármacos utilizados en la terapia anti cáncer. (Villafranca et al., 2001; Edler et al., 2002; Krajinovic et al., 2002; Kawakami y Watanabe 2003; Marsh, 2005; Lurje et al., 2009; Hu et al., 2012)

El promotor de *TYMS* posee características especiales que lo diferencian de la mayoría de los genes, no posee caja TATA ni caja CAAT, sin embargo a lo largo de la región 5'UTR existen otros elementos menos comunes, pero esenciales para la actividad potenciadora del mismo. Algunos de estos elementos tienen implicación sobre la tasa de transcripción, otros, a su vez, pueden tener repercusión tanto en la tasa de transcripción del gen como en la traducción. Son: **1) La secuencia consenso GAGGCGGA**, reconocida por ser motivo de unión de factores de transcripción de tipo Sp1, los cuales tienen como función promover la expresión génica. **2) la “caja CACCC”**; esta secuencia reguladora se encuentra en un gran número de genes, y en un amplio espectro de especies, incluidas las plantas, donde actúa potenciando la transcripción; En el gen *TYMS* de humanos, se encuentra ubicada a 70 pb corriente arriba del motivo de unión a Sp1 y ha sido ampliamente estudiada en los genes de la beta globina humana debido a que son sitios de unión de

factores de transcripción del tipo EKLf (del inglés: *Erythroid Kruppel-Like Factor*) los cuales, se sabe son necesarios para la expresión de estos genes en etapas específicas (Li et al., 2006). **3) Repeticiones en tándem de 28pb**, estas últimas consisten en secuencias de 28 pb repetidas en tándem que actúan como un elemento *cis* activador puesto que a lo largo de las mismas existen motivos de unión de factores de transcripción que actúan como un potenciador (del inglés: *enhancer*) y tienen como función aumentar la señal de transcripción (Kaneda et al., 1990; Horie y Takeishi 1997; Lurje et al., 2009; Mandola et al., 2003).

Los tres elementos principales del promotor actúan en conjunto para mantener la actividad del mismo, y cada uno de los cuales es esencial para modular la expresión de *TYMS* en distintos niveles, por ej. El motivo de unión Sp1 (GAGGCGGA) es considerado como la secuencia central del promotor cuya función, al igual que la caja CACCC es mantener la actividad a nivel transcripcional, lo que genera un efecto positivo sobre la tasa de expresión de TS (Horie y Takeishi 1997), cabe destacar que entre ambas regiones y en una región corriente arriba de la caja CACCC se identifican secuencias reguladoras que por el contrario, tienen una función negativa sobre la expresión del gen (Figura 2) (Horie y Takeishi 1997).



Figura 2. Elementos funcionales del promotor del gen *TYMS*.

Fuente: Kaneda et al., 1990; Horie y Takeishi 1997

Además de los elementos antes mencionados, la repeticiones en tándem de 28 pb presentes en 5'UTR presentan en el interior de su secuencia **motivos de unión de factores de transcripción** del tipo USF1 y USF2 (secuencia consenso CACTTG), elementos cuya función es controlar la expresión a través del incremento de la señal de transcripción (Figura 2) (Mandola et al., 2003; Marsh, 2005). Las repeticiones en tándem de 28pb en 5'UTR son fundamentales para el funcionamiento del *enhancer* por dos importantes razones; en primer lugar, llevan consigo los motivos de unión USF, de manera que al existir un mayor número de repeticiones, aumenta la cantidad de sitios de unión para estos factores, lo que mantiene un efecto mayor sobre la transcripción (Mandola et al., 2003; Marsh, 2005). En segundo lugar, porque estas repeticiones participan en la formación de estructuras secundarias en forma de bucle, hecho que es promovido por la presencia de una secuencia invertida complementaria a la secuencia de 28 pb, y que se localiza corriente arriba de este sitio (Figura 3). Este evento contribuyen no solo a la amplificación de la señal del promotor *TYMS* (Marsh, 2005), sino también a la regulación postranscripcional (Gibson, 2006).

Se ha propuesto que al menos una copia de las repeticiones es necesaria para la interacción con la secuencia invertida, dando lugar a la formación de una estructura de bucle con tallo, cuyo tamaño, viene determinado por el número de repeticiones presentes en dicha región del gen (Figura 3) (Marsh, 2005; Gibson, 2006).

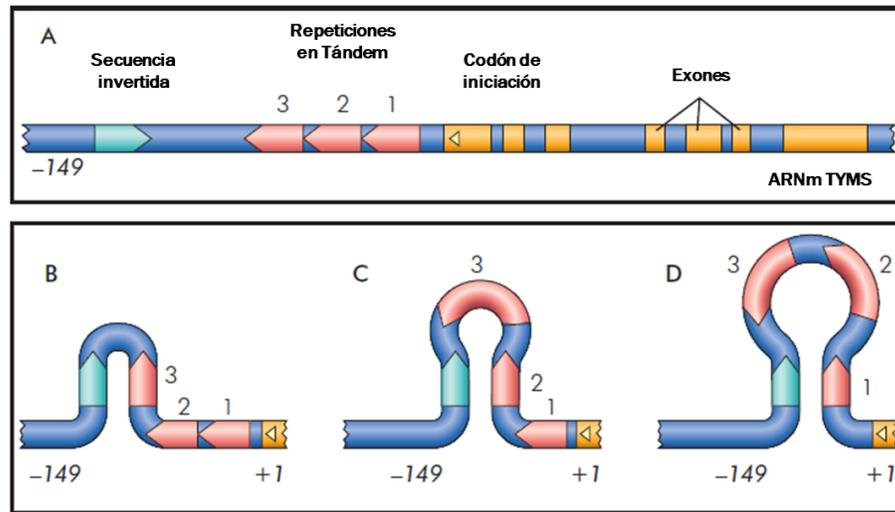


Figura 3. Elementos moduladores de la expresión de *TYMS*. A) Región limitante 5'UTR del ARNm TS, elementos próximos al codón de iniciación. B) Formación de estructuras de bucle con tallo en la región limitante 5'UTR del ARNm de TS. **Fuente:** Modificado de Gibson, (2006).

La participación de esta estructura secundaria durante la regulación de la expresión de TS a nivel postranscripcional, viene dada porque la traducción de ARNm de TS humana está controlada por su propio producto; estudios recientes indican que TS posee también un papel como proteína autorreguladora de unión al ARNm, en dicha función, TS puede unirse a la estructura tallo-bucle en 5'UTR de su propio ARNm, en una región cercana al codón de iniciación, desestabilizando la unión ribosoma-ARNm e inhibiendo finalmente la traducción (Chu et al., 1991). Este mecanismo de autorregulación ocurre cuando tiene lugar la presencia de dos repeticiones de 28pb, no obstante, puede verse impedido en el caso de que exista una repetición adicional, ya que la copia adicional altera la estructura secundaria del tallo-bucle ubicando a la región promotora en una proximidad más cercana al sitio de inicio de la traducción, lo que impide la unión de TS en ese lugar, y por ende, la adecuada inhibición por retroalimentación conduciendo a un mayor nivel de expresión de enzima activa (Gibson, 2006).

2.2 POLIMORFISMOS EN EL GEN *TYMS*

Los polimorfismos del gen *TYMS* constituyen uno de los ejemplos clínicos más desarrollados a nivel de farmacogenética debido al importante papel que ejerce TS en el metabolismo de las pirimidinas y del folato, habiéndose relacionado principalmente a la respuesta terapéutica de varios medicamentos. Hasta el momento se han descrito tres polimorfismos en el gen *TYMS*, todos asociados a la modulación de la expresión de TS; dos de éstos se encuentran ubicados en la región 5'UTR y consisten en un variable número de repeticiones de 28 pares de bases en la región del promotor (Horie et al., 1995), y un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (G>C) (Mandola et al., 2003); El tercer polimorfismo es una variación de 6pb en el extremo 3'UTR (Urlich et al., 2000).

La asociación existente entre estos polimorfismos y el nivel de respuesta terapéutica se debe principalmente a su función como moduladores de la expresión de *TYMS*, cuyas formas alélicas más comunes en la población están estrechamente relacionadas con el aumento de los niveles de TS, lo que al mismo tiempo se relaciona de forma inversa con el beneficio terapéutico observado en pacientes con cáncer tratados con fármacos inhibidores de esta enzima (Danenbergs, 2004; Lentz, 2004). La sobreexpresión de TS se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a drogas, tales como 5-FU y sus prodrogas orales (Ej. Capecitabine), MTX y otros antifolatos (Ej. Ralitrexed), los cuales son fármacos de elección en el tratamiento de neoplasias malignas que afectan el tracto gastrointestinal y leucemias del tipo linfocítico.

Varios estudios basados en la cuantificación de TS mediante técnicas de inmunohistoquímica han ratificado la existencia de esta relación inversa entre el nivel intracelular de enzima y el beneficio terapéutico, lo que se ve reflejado en la tasa de

supervivencia del paciente con cáncer. Aschele et al. (1999) estudiaron esta correlación en 48 pacientes de nacionalidad italiana que padecían de cáncer colorrectal avanzado y cuya terapia estaba basada en dosis de 5-FU en combinación con MTX y Leucovorina de forma alternada, ellos observaron que el 66% de los pacientes que presentaron baja expresión TS tuvo una respuesta favorable, no obstante en aquellos con alta expresión de enzima, solo se observó respuesta en el 24%. Un resultado similar fue encontrado por Cascinu et al., (1999), quien observó que la mayor tasa de respuesta a 5-FU, en correlación con otros parámetros, ocurre en pacientes con bajos niveles de TS, en los cuales también se observó una mayor reducción del tumor y una mayor duración en el tiempo de respuesta. En este mismo orden Leichman et al. (1997) estudiaron la tasa de respuesta y supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal de colon tratados con 5-FU en función de los niveles TS, basado en la cuantificación de ARNm mediante la técnica de PCR en tiempo real, encontrando en dicho estudio que los individuos con alta expresión de TS poseían una supervivencia media mucho menor (8,2 meses) en comparación con los que exhibían menor cantidad de enzima circulante, cuya supervivencia media fue de 13,6 meses.

2.2.1 Polimorfismo TSER (rs34743033)

Este polimorfismo descrito por Horie et al. (1995), consiste en repeticiones en tándem de secuencias de 28 pb en 5'UTR de *TYMS* que actúan como un elemento *cis* activador (Figura 4) (Kaneda et al., 1990; Lurje et al., 2009). Recibe el nombre de TSER (por sus siglas en inglés: *Tymidylate Sintase Enhancer Region*) y las repeticiones pueden variar en número desde dos (TSER*2) hasta nueve (TSER*9), siendo las más frecuentes, las formas alélicas de dos (TSER*2) y tres repeticiones (TSER*3) (Figura 4), identificadas también como 2R y 3R respectivamente; sin

embargo, formas alélicas con un mayor número de repeticiones (TSER*4/*5/*9) se han observado principalmente en población africana y asiática (Marsh et al., 1999; Luo et al., 2002).

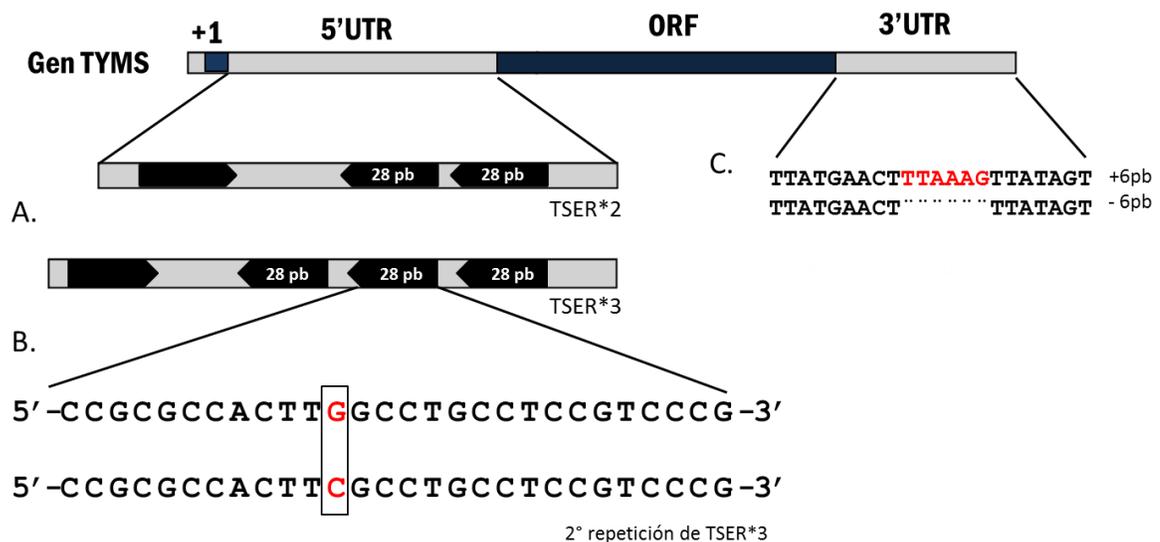


Figura 4. Polimorfismos en el gen de la Timidilato sintasa (*TYMS*). A) Polimorfismos TSER. B) Polimorfismo 3RG>C. C) Polimorfismo 1494DEL6. Fuente: Modificado de Lurje et al. (2009)

La presencia del alelo TSER*3 en 5'UTR del gen está relacionada directamente con la sobreexpresión de *TYMS*, y se ha demostrado que los individuos que presentan el genotipo 3R/3R tienen una mayor eficiencia en la traducción de ARNm del gen cuando son comparados con aquellos que poseen los genotipos 2R/3R y 2R/2R, quienes reflejan menores niveles intracelulares de enzima (Kawakami et al., 2001). En este sentido, Villafranca et al. 2001 realizó un estudio dirigido a determinar si los diferentes genotipos TSER podían ser predictivos del descenso del estadio

tumoral y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes con cáncer rectal quienes recibieron tratamiento con 5-FU previa operación, observando que la disminución del estadio tumoral en los pacientes homocigotos para la doble repetición y heterocigotos (2R/2R y 2R/3R) fue 3,7 veces mayor que en los pacientes homocigotos 3R/3R.

Asimismo estudios de correlación entre estos genotipos y la respuesta clínica demuestran que los individuos que poseen la variante genética 3R/3R tienen una mayor probabilidad de presentar falla terapéutica o una respuesta deficiente ante el tratamiento con agentes quimioterapéuticos inhibidores de TS; Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Krajanovic et al. (2002), quienes estudiaron niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) tratados con MTX y que poseían este genotipo, encontrando que los mismos presentaban una pobre perspectiva de supervivencia en comparación con los que portaban los genotipos 2R/3R y 2R/2R; El mismo resultado fue hallado por Huang et al. (2009), al estudiar pacientes con cáncer gástrico que habían sido tratados con 5-FU.

Esta implicaciones clínicas, relacionadas al genotipo TSER de los individuos con cáncer, han sido el basamento para proponer a este polimorfismo como un elemento predictor de respuesta farmacológica (Villafranca et al., 2001); lo que viene dado principalmente por la relación existente entre el alelo 3R y el aumento de la eficiencia en la transcripción y traducción de *TYMS*, por tanto que la indagación del genotipo en este tipo de pacientes resulta en una herramienta de gran utilidad para el médico tratante, ya que brinda información potencial acerca de la selección de la terapia, monitoreo de la enfermedad y pronóstico de la misma.

2.2.2 Distribución del polimorfismo TSER en distintas poblaciones

Los alelos TSER están distribuidos de manera variable en los distintos grupos poblacionales. Se ha reportado que el alelo 3R es predominante en poblaciones de origen asiático, con una frecuencia mayor al 80% para China (Marsh et al., 1999; Gao et al., 2012) y alrededor del 62% en el sureste de Asia (Marsh et al., 1999), en la población caucásica varía en torno al 60% (Marsh et al., 1999) y en caucásicos americanos la frecuencia es alrededor del 54% (Marsh et al., 2000; Shi et al., 2005). En italianos y españoles las frecuencias se ubican entre el 50 y 43% de la población, respectivamente (Graziano et al., 2004; Menoyo et al., 2005); mientras que en afrodescendientes varían entre el 49 y 56% (Marsh et al., 2000). En un estudio realizado en Latinoamérica, específicamente en población chilena se obtuvo una frecuencia alélica de 55% para 3R (Acuña et al., 2006). Por otra parte el alelo 2R, en contraste con lo anterior se ha observado en menor proporción en poblaciones asiáticas, con una frecuencia poco menor del 20% en poblaciones china y japonesa, 38% en el sureste de Asia, y alrededor del 40% en población caucásica (Marsh et al., 1999). Estos datos se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Frecuencia alélica de los polimorfismos TSER en distintas poblaciones.

Población	n	Frecuencia alélica				Referencia
		2R	3R	4R	9R	
Chinos*	439	19%	81%	ND	ND	Gao et al. (2012)
Chinos	192	18%	82%	ND	ND	Marsh et al. (1999)
Surasiáticos	190	38%	62%	ND	ND	
Caucásicos**	192	40%	60%	ND	ND	
Italianos	272	50%	50%	ND	ND	Graziano et al. (2004)
Espanoles	---	57%	43%	ND	ND	Menoyo et al. (2005)
Afroamericanos	184	46%	52%	2%	ND	Marsh et al. (2000)
Kenyanos	196	44%	49%	7%	ND	
Ghaneses	496	40%	56%	3%	1%	
Caucásicos americanos	208	46%	54%	ND	ND	
Chilenos	736	55%	45%	ND	ND	Acuña et al. (2006)

ND: No determinado
 * Chinos de las Provincias de Huian y Jintan
 ** Caucásicos de las ciudades de Aberdeen y Glasgow, Escocia.

Con respecto a la distribución genotípica, se conoce que el genotipo 3R/3R es predominante en población asiática con una frecuencia de 67% (China), mientras que en población caucásica se presenta con una frecuencia del 38%. Por otro lado, solo del 2% al 5% de la población china posee el alelo 2R en condición homocigota (2R/2R) (Marsh et al., 1999, Gao et al., 2012) sin embargo la presencia de este genotipo en caucásicos es alrededor del 20% (Marsh et al., 1999).

Otros estudios que incluyen datos acerca de la distribución genotípica de los genotipos TSER en poblaciones cuyo origen obedece a una mezcla racial permiten observar que existe igualmente una notable variabilidad en cuanto a su distribución

(Tabla 2), ejemplo de ello son los datos obtenidos por Iacopeta et al. (2001), quienes reportan frecuencias de 44% para 3R/3R, 34% para 2R/3R y 22% para el genotipo 2R/2R en un estudio realizado en población australiana; por otra parte, Acuña et al. (2006) encontró frecuencias de 31% para el genotipo 3R/3R, 47% para 2R/3R y 22% para el homocigoto 2R/2R en pobladores de Chile. No obstante, cifras notablemente variables fueron reportadas por Hammad et al. (2012), quien encontró frecuencias de 25% para 3R/3R, 39% para la forma 2R/3R, y 35% para el homocigoto 2R/2R en un estudio realizado en pobladores del sur de Florida, el cual incluyó individuos de cuatro grupos étnicos distintos (latinos o hispanos, blancos no hispanos, afroamericanos y asiáticos).

Tabla 2: Frecuencia genotípica del polimorfismo TSER en distintas poblaciones.

Población	Frecuencia genotípica			Referencia
	3R/3R	2R/3R	2R/2R	
Chinos*	66%	29%	5%	Gao et al. (2012)
Chinos	67%	31%	2%	Marsh et al. (1999)
Caucásicos**	38%	43%	19%	
Australianos	44%	34%	22%	Iacopeta et al. (2001)
Chilenos	31%	47%	22%	Acuña et al. (2006)
Espanoles	19 %	47 %	34 %	Bolufer et al. (2007)
Italianos	22 %	54 %	22 %	Graziano et al. (2004)
Floridanos***	25%	39%	35%	Hammad et al. (2012)

* Chinos de las Provincias de Huian y Jintan

** Caucásicos de las ciudades de Aberdeen y Glasgow, Escocia.

*** Se incluyeron individuos hispanos, blancos no hispanos, afroamericanos y asiáticos. Habitantes del sur de Florida, Estados Unidos.

2.2.3 Polimorfismo 3RG>C

Además de las repeticiones en tándem existentes en 5'UTR, se ha descrito otro polimorfismo en esta región de *TYMS* que puede ocurrir sólo en el caso de estar presente el alelo 3R (Figura 4) y consiste en la sustitución de una guanina por una citosina G>C en la posición número 12 de la segunda repetición, lo que da lugar a dos nuevas formas alélicas: 3RG (alelo silvestre) y 3RC (variante) (Mandola et al., 2003). Este cambio en la secuencia afecta uno de los dominios de unión de los factores de transcripción del tipo USF alterando así la capacidad de éstos para enlazarse al ADN, lo que interfiere de manera directa en la activación transcripcional de *TYMS* (Mandola et al., 2003, Thomas et al., 2010).

El Polimorfismo 3RG>C es común en los blancos no hispanos, blancos hispanos (latinos), afroamericanos y asiáticos. Estudios en distintas poblaciones indican una distribución variable del alelo 3RC, el cual se presenta con una frecuencia de 56 %, 47 %, 28 % y 37 % para los blancos, hispanos, afroamericanos y chinos, respectivamente (Mandola et al., 2003).

La presencia de formas alélicas 3RC y 3RG tiene impacto sobre la función de la triple repetición (3R) en el mecanismo transcripcional de *TYMS*, pudiendo determinar su función activadora, de manera que el alelo 3RC se relaciona con disminución de la eficiencia de traducción de TS; permitiendo clasificar a los individuos que poseen este alelo dentro del grupo de “baja expresión” en conformidad con aquellos que presentan el alelo 2R (Mandola et al., 2003; Lurje et al., 2009). Kawakami et al., (2003), estudió este polimorfismo en una población de 285 individuos con cáncer colorrectal, observando una mayor tasa de supervivencia en el grupo de baja expresión (genotipos 2R/2R, 2R/3C y 3C/3C) tratados con fluoropirimidinas, en comparación con el grupo clasificado como de “alta expresión” (genotipos 2R/3G, 3C/3G, 3G/3G), en el cual no hubo ningún tipo de beneficio. Un resultado similar fue observado por Li et al. (2013), quienes reportaron una mayor

tasa de respuesta en individuos con cáncer de pulmón que exhibían los genotipos 2R/2R, 2R/3C o 3C/3C y que fueron tratados con pemetrexed, antifolato que inhibe la función de TS.

2.2.4 Polimorfismo 1494DEL6 (rs34489327)

Otro tipo de polimorfismo identificado en *TYMS*, es la variación de una secuencia de 6 pb (TTAAAG), en la posición 1494 de la región 3'UTR y cuya inserción o delección se identifica respectivamente como: +6pb y -6pb (Ulrich et al., 2000). Estas variantes alélicas están igualmente relacionadas con el nivel de expresión de TS, variable que fue estudiada por Lenz et al. (2002) quién reportó que pacientes homocigotos para el alelo -6pb tienen una expresión de ARNm de TS 4,2 veces menor en comparación con los que poseen la inserción. Dicha correlación fue estudiada por Mandola et al. (2004) quienes determinaron que el alelo -6pb está vinculado con inestabilidad del ARNm, niveles bajos del mismo y menor expresión enzimática, luego Pullmann et al. (2006) expone que la causa de la inestabilidad del ARNm se debe a que la ausencia de las 6pb aumenta la afinidad entre éste y el factor regulador AUF1, una ribonucleoproteína que en ocasiones actúa como desestabilizador del ARNm.

La distribución de las formas alélicas en 3'UTR varía de acuerdo a la población y los distintos grupos étnicos; Hasta ahora se conoce que el alelo -6pb se presenta con una frecuencia de 29% en la población caucásica, 33,53% en población francesa y 65,30%, en población asiática, según datos reportados por Ulrich et al. (2000), Lecomte et al. (2004) e Inoue et al. (2009), respectivamente.

La indagación del genotipo en 3'UTR de *TYMS* también es considerada una herramienta con valor pronóstico en la respuesta farmacológica de pacientes con

cáncer, habiéndose relacionado igualmente con el pronóstico del paciente sometido a quimioterapia con fármacos inhibidores de TS. La importancia clínica de dicha variante fue estudiada por Huang et al. (2009), quienes encontraron que los pacientes con cáncer de estómago tratados con 5-FU que eran homocigotos para la inserción (+6pb/+6pb) tenían una supervivencia total más corta (11,5 meses) en comparación con los que portaban el genotipo -6pb/-6pb (36,9 meses) o +6pb/-6pb (20,8 meses) (Huang et al., 2009).

2.2.5 Haplotipos *TYMS*

El haplotipo de un individuo se define como el conjunto de alelos que se transmiten simultáneamente en cada cromosoma, así, un individuo, para un conjunto de *loci* cercanos, posee dos haplotipos, uno heredado del padre y el otro de la madre (Iniesta et al., 2005), al conjunto de haplotipos de un individuo suele llamarse “diplotipo”. La estimación de los haplotipos en la investigación genética es de gran utilidad, ya que el haplotipaje puede dar como resultado una mejor comprensión del pronóstico de enfermedades, y la interrelación entre los polimorfismos que afectan el desencadenamiento de determinado fenotipo.

La determinación de haplotipos del gen *TYMS* se efectúa al combinar ambos polimorfismos: TSER y 1494DEL6; el estudio de ambos *loci* en combinación proporciona información más completa, lo que viene dado por la influencia que tienen ambos polimorfismos sobre la tasa de expresión del gen. Varios estudios han demostrado que estos polimorfismos están en fuerte desequilibrio de ligamiento ($D' = 0.71$; $P < .001$) (Dotor et al., 2006), por lo que la inclusión de este análisis permite obtener una mejor interpretación en cuanto a la estimación de la expresión de TS,

información valiosa en la evaluación del pronóstico del paciente tratado con fármacos inhibidores de TS.

La distribución de los haplotipos, al igual que lo reportado para los polimorfismos individuales varía en función de la población analizada, así como también en función el grupo de estudio analizado (individuos sanos o enfermos), en la mayoría de los casos se ha observado que los haplotipos más comunes en la población son las combinaciones 3R/-6pb y 2R/+6pb, con frecuencias que oscilan alrededor del 24 y 42%, respectivamente (Dotor et al., 2006; Graziano et al. 2004), a excepción de China, donde el haplotipo 2R/+6pb es menos frecuente, con cifras que no superan el 14% (Zhang et al. 2004; Zhai et al. 2006).

2.3 EXPRESIÓN DE TS EN TEJIDO TUMORAL

El nivel de expresión de TS en tejido tumoral varía considerablemente con respecto al tejido normal, inclusive puede ser también significativamente diferente entre tumores, y en referencia a esto último, se ha reportado que esta expresión es mayor en los tumores primarios que en las metástasis (Edler et al., 2002). Es importante tomar en cuenta que la célula tumoral experimenta constantemente una proliferación rápida y descontrolada, lo que aumenta su necesidad de síntesis de nucleótidos y explica en gran medida el porqué de la sobreexpresión de TS. Estas poblaciones celulares captan y metabolizan el uracilo de manera mucho más rápida y eficiente (Mathews et al., 2002), hecho que las selecciona para el uso de agentes quimioterapéuticos como el 5-FU y el MTX, análogos de este compuesto.

La efectividad y éxito de la terapia con este tipo de fármacos depende, entre otros factores, del nivel de expresión de TS, que está estrechamente ligado tanto al genotipo del individuo como al genotipo expresado en el tejido tumoral. Se ha

descrito que el genotipo de TS en los tumores sólidos puede variar con respecto al observado en la línea germinal del individuo, ya que estas poblaciones celulares sufren alteraciones cromosómicas tales como deleciones y aberraciones, lo que trae como consecuencia el desbalance alélico entre el tumor y la línea germinal (Kawakami et al., 2002).

2.3.1 Pérdida de la heterocigocidad

La pérdida de la heterocigocidad (LOH, del inglés: *Loss Of Heterozygosity*) es un tipo de desbalance alélico operante en muchos tumores que implica la pérdida por deleción de la totalidad de un gen y sus regiones limitantes, esta condición se presenta con frecuencia en genes supresores de tumores, y se evidencia cuando el genotipo de las células somáticas de un individuo difiere con respecto al observado en la línea tumoral (Oriola et al., 2004). El gen de TS está localizado en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 18, este cromosoma es conocido por ser un sitio con alto porcentaje de deleciones, manifestadas en gran medida en el cáncer colorrectal (Vogelstein et al., 1989). Cuando se produce LOH en el locus de TS, el genotipo del tumor de los pacientes heterocigotos pasará de ser 2R/3R al genotipo 2R/loss o 3R/loss, lo que dará lugar a diferentes niveles de expresión de TS en dicho tejido. La LOH ha sido estudiada por varios autores, quienes reportan frecuencias muy parecidas, en base a esto, Zinzindohoue et al. (2001) reportaron una frecuencia de LOH de 63 % (19/30) en metástasis hepática colorrectal, dichos resultados concuerdan con lo reportado por Kawakami et al. (2002) quienes obtuvieron un resultado de 62 % (31/50) de frecuencia de LOH en tumores colorrectales de individuos con genotipo 2R/3R.

El hecho de que el alelo 3R esté asociado con una respuesta clínica menos favorable, ha conllevado al desarrollo de diversos estudios de farmacogenética en los que se incluye además la genotipificación del tejido tumoral del paciente, con el fin de investigar la posible pérdida de heterocigocidad, y de esta manera predecir de forma más directa el posible pronóstico del paciente en relación al tratamiento administrado. En base a esto, Uchida et al. (2004) estudio 30 pacientes con cáncer colorrectal tratados fluoropirimidinas, todos los cuales tenían la enfermedad en estadio IV, en este estudio se encontró una frecuencia de LOH de 77%. Los pacientes 2R/3R en su línea germinal, y que presentaron un genotipo 2R/loss en sus tumores tenían sorprendentemente mejor tasa de respuesta en comparación con pacientes en cuyos tumores se identificó el genotipo 3R/loss, así como la supervivencia (333 días frente a 203 días, respectivamente), esto permitió concluir que aquellos individuos que posean un genotipo tumoral 3R/loss tendrán peor pronóstico que aquellos con genotipo 2R/loss.

2.4 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN VENEZUELA

El cáncer es una enfermedad multifactorial provocada por alteraciones en los mecanismos de control que regulan el crecimiento celular, lo que trae como consecuencia una división celular descontrolada que puede dar origen a tumores con la capacidad de invadir y dañar tejido circundante sano, y además, diseminarse a través de la sangre y tejido linfático a otros tejidos dando lugar a las “metástasis”. No todos los cánceres originan un tumor sólido, sino que algunos casos, las células cancerígenas alcanzan la médula ósea, y se diseminan por el torrente sanguíneo como es el caso de las leucemias. Se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer, siendo los más frecuentes los de piel, pulmón, mama y colorrectal (Herrero y Mulas 2008).

En Venezuela, el cáncer constituye una de las más frecuentes causas de enfermedad o muerte, siendo uno de los problemas de salud más importantes del país, del modo que, una de cada cuatro personas, si alcanza la edad de 74 años, será afectada por alguna de sus variedades y una de cada siete tiene el riesgo de fallecer por esta causa (Capote, 2013). Para el año 2011 el registro de defunciones por cáncer en Venezuela fue de 22.237 casos, alcanzando el 15.61% del total de muertes registradas, ocupando el segundo lugar dentro de las veinticinco primeras causas de muerte diagnosticadas en Venezuela, siendo superada solo por las enfermedades del corazón, patología que actualmente encabeza la lista. (MPPS/Anuario de mortalidad 2011).

En cuanto a las localizaciones de las distintas variedades de cáncer existen diferencias por género y edad, siendo notablemente diferentes los cánceres de niños, adultos jóvenes o personas de la tercera edad. Según los datos estadísticos publicados por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) en el anuario epidemiológico del año 2011, la principal causa de muerte por cáncer en varones y hembras adultos se debió a tumores malignos del tracto digestivo (3.553 muertes) y en lo referente a la mortalidad por cáncer en niños se registraron en Venezuela para el año 2011, 91 muertes por causas de leucemias del tipo linfocitoide en menores con edades comprendidas entre los 5-14 años, siendo este tipo de cáncer la segunda causa de muerte en este grupo etario.

En países desarrollados como Estados Unidos y España, cerca de 14 de cada 100 mil niños tiene una forma de cáncer. En este grupo las leucemias agudas constituyen las neoplasias más frecuentes, cuya incidencia a escala mundial, se estima entre 20 a 35 casos por cada millón de habitantes al año (Rendón-Macias et al., 2012).

2.5 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia que se caracteriza por la proliferación clonal y acumulación de células linfoides malignas en la médula ósea (MO) y en la sangre periférica, es el tipo de cáncer más común en niños menores de 15 años, y su incidencia es superior en el género masculino. Constituye el 25% de todos los cánceres en la edad pediátrica y aproximadamente 75% de todos los casos de leucemia en la infancia. Esta neoplasia está clasificada como uno de los tipos de cáncer más curables, y en cuanto a su pronóstico, datos recientes, que incluyen países desarrollados indican que existe un incremento en la supervivencia global de niños con LLA de 60% en 1984 a 83,5% en 2007, no obstante en países subdesarrollados, para ese año, las cifras se mantuvieron aún alrededor del 60% (Rendón-Macias et al., 2012).

2.5.1 Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

La LLA es una neoplasia rápidamente fatal si no se trata. Actualmente, cuatro de cada cinco niños pueden ser curados con los protocolos de tratamiento utilizados. El tratamiento consiste en tres fases bien definidas: Inducción, Consolidación y Mantenimiento, durante las cuales se incorpora la profilaxis del Sistema Nervioso Central (SNC), con quimioterapia intratecal o altas dosis de quimioterapia, donde el fármaco de elección es el metotrexato (MTX) (Chona de Armas et al., 2010).

La Inducción tiene como objetivo erradicar las células leucémicas y restaurar la hematopoyesis con el fin de mejorar la condición física del paciente. Durante esta fase se administran ocho ciclos de tratamiento alternante de ciclofosfamida

hiperfraccionada y altas dosis de metotrexato más citarabina. Con la inducción, usualmente más del 90% de los pacientes alcanzan remisión completa (Combariza et al., 2007) (Chona de Armas et al., 2010). La fase de consolidación mejora la remisión alcanzada por la inducción; comúnmente los regímenes incluyen altas dosis de metotrexato asociado a 6-mercaptopurina. La fase de mantenimiento tiene como objetivo mantener la remisión ya alcanzada. La mayoría de los regímenes contempla la combinación de metotrexato semanal con 6-mercaptopurina diaria. La duración total del tratamiento debe ser de dos años o de dos años y seis meses (9,10). (Chona de Armas et al., 2010).

La profilaxis del SNC es un componente fundamental de la terapia posterior a la remisión, para garantizar la supervivencia libre de enfermedad, es de gran importancia durante el tratamiento de las leucemias, ya que las células leucémicas poseen gran afinidad por dicha ubicación y si no se administra un tratamiento profiláctico, el 50% de los pacientes recaerá en el SNC (Ruiz-Arguelles y Ruiz-Delgado 2009). Los tratamientos incluyen quimioterapia intratecal y sistémica en altas dosis con penetración del SNC (por ejemplo, altas dosis de metotrexato o ARA-C) (Chona de Armas et al., 2010).

CAPITULO III

MARCO METOLOGICO

3.1 Tipo de investigación

De acuerdo a los objetivos planteados se trata de un estudio de tipo descriptivo, debido a que se determinarán dos polimorfismos del gen de la Timidilato Sintasa, en dos grupos de población venezolana, un grupo de individuos sanos y un grupo de pacientes diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda, con el fin de obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de las distintas variables, y de esta manera reconstruir y analizar los haplotipos.

3.2 Población y Muestra

La muestra poblacional estuvo constituida por dos grupos: 260 individuos, aparentemente sanos residentes de la región central de Venezuela, mayores de 18 años, de ambos sexos y sin relación de consanguinidad. Este grupo fue considerado en la investigación como la “Población de referencia”. Los sujetos se seleccionaron de forma aleatoria mediante un muestro probabilístico no intencional. El segundo grupo estuvo compuesto por 20 pacientes con diagnóstico clínico de Leucemia,

atendidos en el Servicio de Hematología del Hospital Central de Maracay - Edo. Aragua; Estos individuos debían tener tratamiento con regímenes de MTX, y diagnóstico confirmado de la enfermedad por citometría de flujo. El protocolo de investigación fue diseñado de acuerdo a las pautas descritas en el Código de Bioética y Bioseguridad de Venezuela, El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso”. Para el caso de los enfermos se contó además con la aprobación la comisión de ética del Hospital Central de Maracay. Todos los participantes firmaron su consentimiento informado, y en el caso de los enfermos con edades entre 5 y 17 años se solicitó la autorización de su representante.

La muestra biológica de la población de referencia consistió en 2 mL de sangre periférica, mientras que la de los enfermos estuvo constituida por un hisopado de mucosa oral y un volumen variable de aspirado medular (200-400 μ L), a partir de las cuales se realizó el aislamiento de ADN.

3.3 Obtención de la muestra de ADN

A todos los individuos pertenecientes al grupo referencia se les extrajeron 2 mL de sangre periférica de la región del antebrazo, esta muestra se conservó a 4°C con EDTA hasta su posterior procesamiento. El aislamiento del ADN se logró aplicando una modificación de la técnica de Miller et al. (1988), la cual se basa en la aplicación de soluciones lisantes que permiten la ruptura celular, dicha técnica es comúnmente utilizada para extraer ADN de leucocitos a partir de sangre.

El procedimiento para llevar a cabo el aislamiento de ADN fue el siguiente: Se tomaron 300 μ L de sangre periférica y se trataron con 1 mL de solución de lisis de glóbulos rojos, esta mezcla se centrifugó a 2700 rpm por 10 minutos, durante este

tiempo se produjo la lisis de los eritrocitos debido al carácter hipotónico de la solución, este procedimiento se repitió dos veces, se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido, constituido por leucocitos, fue lavado con 1,5 mL de solución de lisis de glóbulos blancos, luego se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores, con el fin de obtener solo los núcleos celulares, se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido fue sometido a incubación durante tres horas a 50 °C en una solución que contenía: 230 μ L tampón Tris-EDTA pH: 7,2 en proporción 20:5 mM, 14 μ L de SDS al 10% y 4 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) (Invitrogen). Al término de esta incubación se realizó la precipitación del ADN y proteínas con Isopropanol al 100% y acetato de amonio (7M), respectivamente. La medusa obtenida fue lavada con Isopropanol al 70% y finalmente se resuspendió en 300 mL de Tris-EDTA en proporción 10:1 mM.

La muestra de médula ósea fue obtenida a partir de pacientes con diagnóstico de Leucemia, a quienes se les realiza el análisis de médula ósea como parte rutinaria de los estudios de seguimiento de la enfermedad. El procedimiento fue realizado por un médico hematólogo, y consistió en la extracción de un volumen de médula ósea de la espina ilíaca postero-superior. La muestra fue repartida para los distintos análisis, y una parte fue utilizada para esta investigación, previo consentimiento informado del paciente.

Para realizar aislamiento de ADN se utilizó un protocolo previamente optimizado por Flores-Angulo et al. (2013), el cual está basado en una modificación del método salino de Miller et al. (1988) para sangre periférica. El volumen óptimo de aspirado medular para obtener ADN fue de 75 μ L y se agregaron entre 0,27 – 0,33 μ g/ μ L de proteinasa K (80 – 100 μ g en un volumen final de 300 μ L).

Adicionalmente, al grupo de pacientes con Leucemia se les realizó un hisopado en ambos carrillos para obtener células de la mucosa oral, estas muestras fueron resuspendidas en tubos con etanol al 70% y conservadas hasta el momento del

análisis. Para el aislamiento de este ADN en primer lugar se estandarizó un protocolo de extracción por *salting out*, metodología que se fundamenta en la precipitación de proteínas utilizando concentraciones elevadas de sales (acetato de amonio) quedando el ADN en disolución, el cual es recuperado posteriormente mediante precipitación con Isopropanol al 99%; se realizaron ensayos previos, en los cuales se ajustaron parámetros críticos tales como, tiempo y velocidad de centrifugación de cada una de las etapas, condiciones del tampón de lisis (solución que contenía: Tampón Tris-EDTA 20:5, SDS 10% y proteinasa K), y concentración óptima de acetato de amonio. Una vez fijadas las condiciones se procedió a realizar el aislamiento del ADN a partir de las muestras del grupo de pacientes.

3.4 Verificación de cantidad y calidad de las muestras de ADN

La cantidad del ADN obtenido a partir de las diferentes muestras (sangre periférica, médula ósea y células bucales) se verificó mediante espectrofotometría. Para medir la concentración se utilizó un equipo de lectura modelo *BioPhotometer plus* marca Eppendorf®. Se realizó una dilución 1/100 a partir de la solución madre de ADN y se efectuaron las lecturas de absorbancia a 260 y 280nm, los cálculos de la concentración se determinaron utilizando la fórmula siguiente:

$$[\text{ADN } (\mu\text{g/mL})] = A_{260\text{nm}} \times \text{dilución} \times 50 \mu\text{g/mL} *$$

* Es un valor constante que indica lo siguiente: una solución de ADN de doble hebra que contenga 50 $\mu\text{g/mL}$ tiene una medida de $A_{260} = 1$.

Para verificar la calidad de las muestras, en primer lugar, se evaluó que las mismas tuviesen un mínimo de contaminantes proteicos, esto se realizó a través de la determinación de la relación A_{260}/A_{280} . La obtención de un índice cuyo valor se encuentre entre 1,6 - 1,9 es indicativo de buena desproteización (Kirby, 1992). En segundo lugar se comprobó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante una hora a 80 voltios, se empleó el marcador de tamaño Fago Lambda *Hind III Eco RI*; los geles fueron teñidos con SYBR Green® y revelados en un equipo de fotodocumentación modelo Gel DocTM-XR, marca Bio-rad®.

3.5 Determinación del polimorfismo TSER (Región 5'UTR)

El análisis del extremo 5'UTR se realizó mediante amplificación por PCR de un segmento de ADN en esta región del gen. La observación de un tamaño característico del producto PCR permitió identificar los genotipos de cada individuo. Así, los sujetos que poseen el genotipo 2R/2R generan una banda de 116 pb, los homocigotos 3R/3R una banda de 144 pb, y en los individuos heterocigotos se evidencian dos bandas cuyos tamaños dependen del número de repeticiones en tándem de la secuencia de 28pb (Tabla 3). El tamaño del producto PCR se verificó mediante comparación con una escalera molecular de 20 pb.

Tabla 3: Tamaño del producto PCR según el número de repeticiones del polimorfismo TSER en 5'UTR del gen *TYMS*.

Alelo	Tamaño del producto PCR
2R	116 pb
3R	144 pb
4R	172 pb

3.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction*)

El procedimiento se inició con la estandarización del ensayo PCR. El programa de amplificación se estableció tomando como referencia las características de los oligonucleótidos cebadores (Tabla 4), y se realizó de la siguiente manera: pre-desnaturalización: 96°C por 3 minutos, desnaturalización: 94 °C durante 60 segundos; la hibridación de los cebadores ocurrió en dos pasos: 62°C por 3 minutos - desnaturalización- 62 °C por 60 segundos, y finalmente la extensión a 72°C por 60 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 30 segundos (Figura 5). Las muestras fueron amplificadas en un termociclador modelo C100TM marca Bio-Rad®.

Tabla 4: Oligonucleótidos cebadores utilizados para el análisis del polimorfismo TSER.

Cebador	Secuencia	TM	Referencia
5' D	5'- AAAAGGCGCGCGGAAGGGGTCCT -3'	67,3 °C	Iacopetta et al. (2001)
5' R	5'- TCCGAGCCGGCCACAGGCAT -3'	65,7 °C	

Las concentraciones óptimas de cada componente se ajustaron mediante curvas de concentración hasta lograr una banda integra, sin producto inespecífico ni efecto de barrido, posteriormente se fijaron las concentraciones de los componentes y se procedió a realizar los ensayos de PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L que contenía: MgCl₂ 0,7 mM, mezcla de los cuatro dNTPs 140 μ M, enzima *Taq* ADN polimerasa 1U, oligonucleótidos cebadores 0,35 μ M, ADN 20 ng.

El producto de esta PCR fue verificado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, se aplicaron 180 voltios durante 1 hora, y los geles fueron revelados con sales de plata, se observó el resultado obtenido para cada individuo y se tomó una fotografía digital utilizando equipo de fotodocumentación Modelo GEL-DOC XR marca Bio-rad®

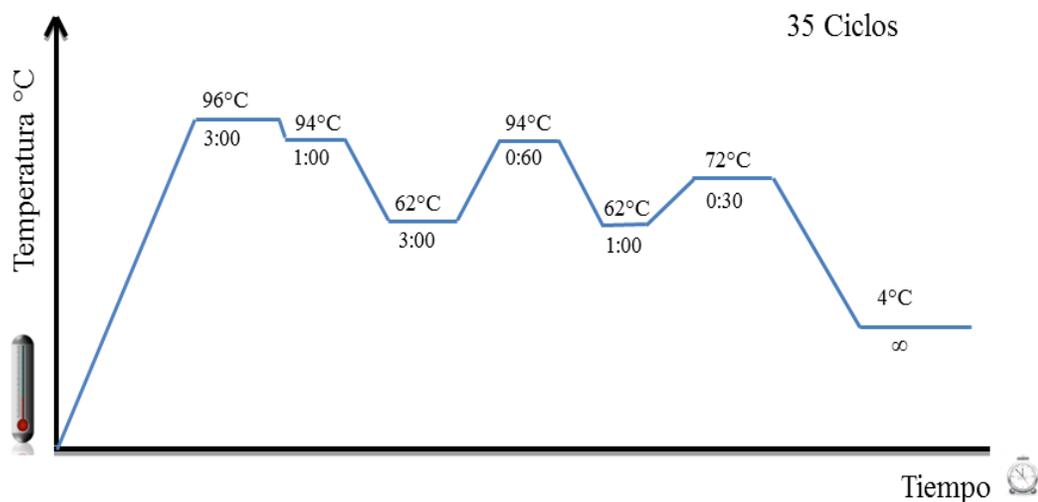


Figura 5: Programa de amplificación utilizado en el análisis del polimorfismo TSER.

3.6 Determinación del polimorfismo 1494DEL6 (Región 3'UTR)

El análisis del polimorfismo 1494DEL6 se realizó a través de ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) acoplados al método de Polimorfismos de Longitud Fragmentos de Restricción (RFLP, del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En primer lugar se optimizó el ensayo de PCR para amplificar una secuencia de 142/148 pb de la región 3'UTR del gen *TYMS*, las condiciones de amplificación se establecieron tomando como base los lineamientos de Ulrich et al. (2000) y las

concentraciones óptimas de cada componente del ensayo PCR se ajustaron mediante curvas de concentración hasta obtener banda íntegras, sin producto inespecífico ni efecto de barrido. Una vez realizada esta optimización, se fijaron las concentraciones de los componentes y se procedió a realizar los ensayos de PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L que contenía: $MgCl_2$ 1mM, mezcla de los cuatro dNTPs 180 μ M, enzima *Taq* ADN polimerasa 0,70 U, oligonucleótidos cebadores 0,25 μ M, ADN 15 ng. Las características de los cebadores se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Oligonucleótidos cebadores utilizados para amplificar una secuencia de 142/148 pb de la región 3'UTR de *TYMS*.

Cebador	Secuencia	TM	Referencia
TS1	5'-CAAATCTGAGGGAGCTGAGT-3'	50,5 °C	Urlich et al. (2000)
TS2	5'-CAGATAAGTGGCAGTACAGA -3'	44,6 °C	

El programa de amplificación constó de una pre-desnaturalización inicial a 96 °C por 3 minutos, seguido de una desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, la hibridación de los cebadores se llevó a cabo a 52 °C por 30 segundos, y la extensión ocurrió a 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final por 3 minutos a 72 °C durante 30 ciclos. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador modelo C100TM marca Bio-Rad®.

Las distintas amplificaciones fueron verificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, la migración se realizó a 140 voltios durante 1 hora y posteriormente estos geles fueron revelados con sales de plata. El tamaño del producto fue comparado con una escalera molecular de 50 pb.

3.6.2 Polimorfismos de Longitud Fragmentos de Restricción

El producto de esta PCR fue sometido posteriormente a ensayos de RFLP mediante digestión con la enzima *Dra* I, el ensayo se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C durante dos horas, según especificaciones del fabricante. La presencia de la secuencia de 6 pb TTAAAG en la posición 1494 del gen introduce un sitio de restricción (TT/AA) para la enzima *Dra* I, lo que genera un patrón característico en el tamaño de los fragmentos, y permite identificar el alelo +6pb, por el contrario la ausencia de esta secuencia en dicha región del gen desprovee de sitio de restricción para esta enzima, evitando la digestión del producto PCR, lo que permite identificar a los individuos que poseen el alelo -6pb. El tamaño esperado para los fragmentos de restricción de cada genotipo posible se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Fragmentos de restricción esperados para la digestión de los productos PCR con la enzima *Dra* I.

Genotipo	Tamaño del fragmento
+6pb/+6pb	83 pb, 65 pb
-6pb/-6pb	142 pb
+6pb/-6pb	83 pb, 65 pb, 142 pb

Al finalizar el período de incubación del ensayo de restricción se efectuó electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, se aplicaron 140 voltios durante 1 hora y los geles fueron revelados con sales de plata. Se observó el patrón de restricción obtenido para cada individuo, comparando con un marcador de tamaño

molecular Phi X174 *Hinf* I, y finalmente se tomó una fotografía digital utilizando equipo de foto documentación Modelo GEL-DOC XR marca Bio-rad®.

3.7 Desbalance alélico

Se analizaron los polimorfismos TSER y 1494DEL6 en cada uno de los pacientes con Leucemia a partir de ADN proveniente tanto de células de la mucosa oral como de medula ósea con el fin de conocer si los polimorfismos se presentaban de la misma manera en ambos tipos celulares: Línea germinal (células bucales) y tejido potencialmente tumoral (medula ósea), este análisis se realizó basado en el hecho descrito por varios autores donde el nivel de expresión de TS en tejido tumoral varía considerablemente con respecto al tejido normal, lo que está relacionado al desbalance alélico debido a la pérdida de la heterocigocidad en el locus TS (Oriola et al., 2004; Vogelstein et al., 1989).

Los resultados obtenidos de los polimorfismos en cada uno de los pacientes a partir de las distintas localizaciones fueron comparados y almacenados en una tabla.

3.8 Determinación de frecuencias de genotipos y alelos, equilibrio de Hardy-Weinberg y comparación con otras poblaciones

Los genotipos en las regiones 5'UTR y 3'UTR fueron asignados a partir de la observación directa de los geles de poliacrilamida provenientes de cada una de las electroforesis. Los datos de los genotipos de cada individuo fueron organizados en una tabla, a partir de la cual se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de cada una de las variantes de los polimorfismos TSER y 1494DEL6, para ello se utilizó el programa estadístico SPSS *statistic* 19 (IBM corp., 2010), y una vez

obtenidos estos datos se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el programa H-W Equilibrium Calculator. Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en la población analizada fueron comparadas con las observadas en otras poblaciones mediante la prueba de chi cuadrado, para lo que se estableció un nivel de significancia de 0,05.

3.9 Estimación de haplotipos y diplotipos

Basado en los genotipos observados, se procedió posteriormente a estimar las frecuencias de cada haplotipo. La estimación de este parámetro se realizó utilizando el programa PHASE versión 2.1.1. Con base en los datos estadísticos generados del análisis de los haplotipos de cada individuo y del conjunto de la población estudiada, se determinó la frecuencia de los diplotipos, es decir, el par de haplotipos que posee cada individuo, lo que permitió clasificar a dicha población conforme al fenotipo de expresión de TS.

La estimación de los posibles pares de haplotipos en cada sujeto se obtuvo a partir del análisis de los datos con el programa PHASE. Una vez conocido el total de diplotipos más probables, se procedió a calcular la frecuencia de cada uno en la población de referencia, con el fin de conocer cómo están distribuidos.

3.10 Inferencia del fenotipo de expresión de TS

El análisis posterior de cada diplotipo permitió estratificar a la población de acuerdo al fenotipo de expresión de TS en individuos de alta, intermedia o baja expresión enzimática, lo que está relacionado directamente con la respuesta farmacológica ante el tratamiento con fármacos inhibidores de TS.

La inferencia del fenotipo de expresión de TS se realizó tomando como referencia lo propuesto por Afzal et al. (2011), dicha clasificación se basa en el predominio de los alelos funcionales de cada *loci*, en el par de cromosomas, lo que influye de manera global en la tasa de expresión del gen; de forma tal que la presencia de más de dos alelos relacionados al incremento de la expresión enzimática (3R o +6pb) o viceversa (2R o -6pb), tomando en consideración ambos cromosomas, tendrá mayor influencia sobre el fenotipo de expresión de TS, esto se ilustra en la Figura 6, correspondiente a un individuo de **alta expresión** (*diplotipo: (3R/+6pb) / (2R/+6pb)*), nótese en dicha representación el predominio de alelos asociados a alta expresión de TS (3/4 alelos).

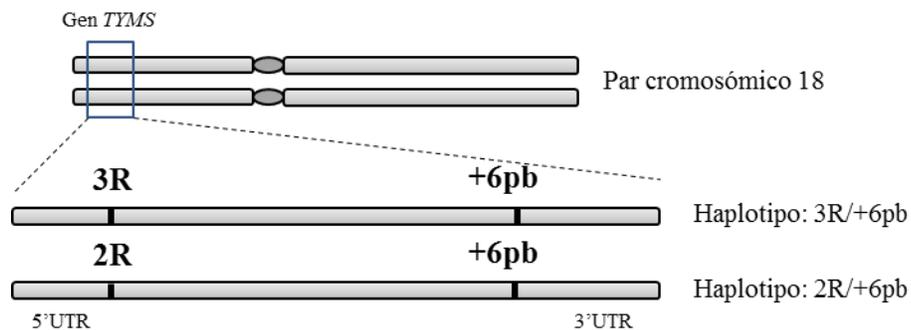


Figura 6: Representación gráfica del diplotipo de un individuo con alta expresión de TS. Clasificado según el predominio de alelos funcionales.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TSER

Se identificaron 5 genotipos, lo cual se logró mediante la observación de los distintos tamaños del producto PCR de la región 5'UTR. En la figura 7 se muestra un ejemplo del patrón electroforético obtenido en 7 individuos.

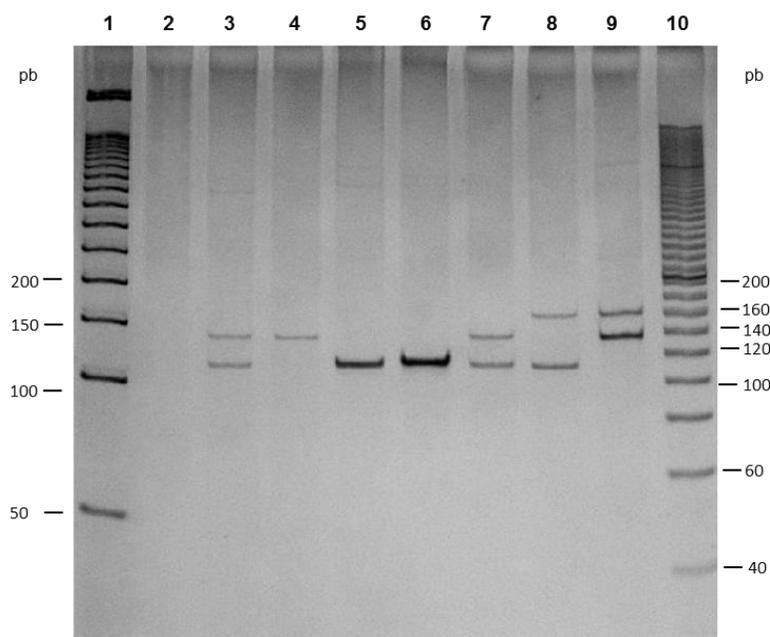


Figura 7: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para visualizar el polimorfismo TSER. Se muestran los distintos genotipos encontrados. Línea 1: Escalera de tamaño de 50 pb, Línea 2: Control negativo, Líneas 3 y 7: heterocigotos 2R/3R, Línea 4: Homocigoto 3R/3R, Líneas 5-6: Homocigotos 2R/2R, Línea 8: Heterocigoto 2R/4R, Línea 9: Heterocigoto 3R/4R, Línea 10: Escalera de tamaño de 20pb.

En el grupo de referencia, se identificaron 5 genotipos, la forma heterocigota 2R/3R predominó con una frecuencia de 48,8 %, seguido por 3R/3R (36,2%) y 2R/2R (13,1%), el alelo 4R solo fue hallado en condición heterocigota (Tabla 7, Figura 7, Línea 8). El alelo predominante en esta población fue 3R con una frecuencia de 61,35%, mientras que 2R se presentó con una frecuencia de 37.69% (Tabla 7). La distribución de los genotipos en el grupo de referencia se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,99$)

Tabla 7. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo TSER en 5'UTR del gen *TYMS*. Población de referencia.

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	n = 260	(%)	Alelo	n = 520	(%)
<i>TSER 5'UTR</i>					
2R/2R	34	13,10	2R	196	37,69
2R/3R	127	48,80			
3R/3R	94	36,20	3R	319	61,35
2R/4R	1	0,40			
3R/4R	4	1,50	4R	5	0,96

En relación al grupo de enfermos (Tabla 8), se observó que a diferencia del grupo de referencia el genotipo predominante fue 3R/3R, con una frecuencia de 45%, seguido de 2R/3R (40%), mientras que los menos frecuentes continúan siendo 2R/2R y 2R/4R, con frecuencias de 10 y 5%, respectivamente. Con respecto a la frecuencia alélica, de igual forma, el alelo más común fue el de tres repeticiones (65%). El alelo 4R sólo fue encontrado en un individuo en forma heterocigota con el alelo 2R, la

frecuencia alélica de este último fue de 32,5%. La distribución de los genotipos se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,39$).

Tabla 8. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo TSER en 5'UTR del gen *TYMS*. Grupo de enfermos.

Genotipo	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica		
	n = 20	(%)	Alelo	n = 40	(%)
2R/2R	2	10	2R	13	32,50
2R/3R	8	40	3R	26	65,00
3R/3R	9	45	4R	1	2,50
2R/4R	1	5			
Total	20	100		40	100

4.2 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 1494DEL6

Se encontraron los tres genotipos posibles, en la Figura 8 se observa el resultado de una electroforesis de los productos PCR de la región 3'UTR de *TYMS*, y en la Figura 9 se observan los patrones de restricción que identifican cada uno de los genotipos, se muestra el resultado de 11 individuos; en el resto de la población analizada se obtuvieron perfiles similares.

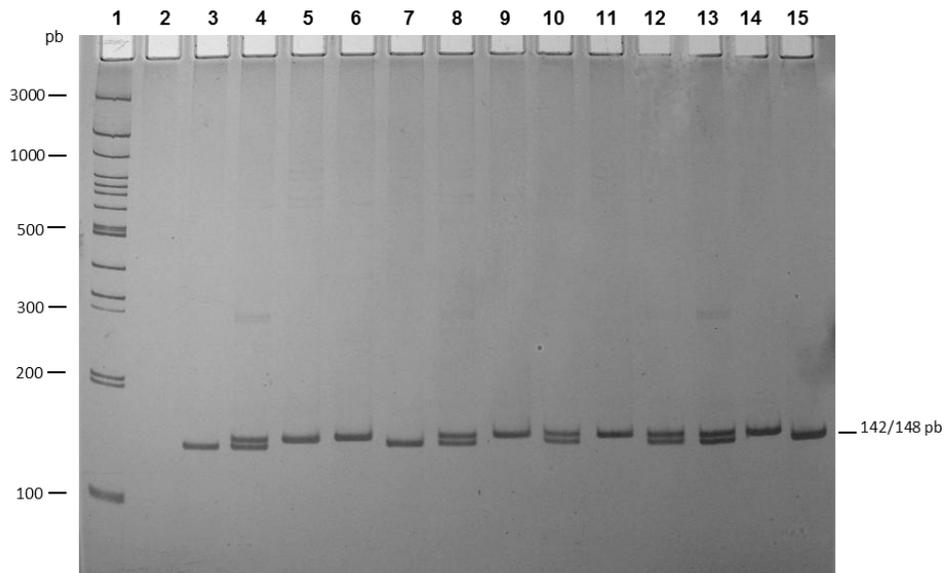


Figura 8: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para verificar la presencia de productos PCR región 3'UTR del gen *TYMS*. Línea 1: Escalera de tamaño molecular de 100 pb. Línea 2: Control negativo. Líneas 3-15: productos PCR 142/148 pb.

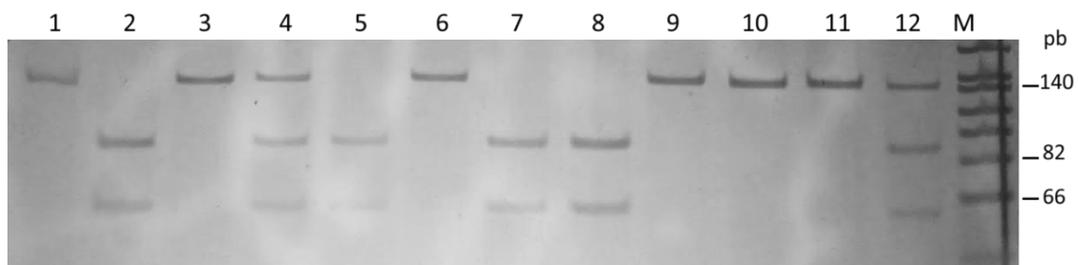


Figura 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, para observar resultado de RFLP de la región 3'UTR del gen *TYMS*. Línea 1: Control Negativo de digestión, Líneas 2-12: Productos PCR 142/148pb digeridos con *Dra* I, Línea M: Marcador de tamaño molecular Phi X174 *Hinf* I. En las líneas 2,5,7 y 8 se observan dos bandas: 83 y 65 pb (+6pb/+6pb), En las líneas 3,6,9-11 se observa una banda de 142 pb correspondiente a individuos homocigotos para la delección (-6pb/-6pb), y en las líneas 4 y 12 se observa un patrón de tres bandas: 142, 83 y 65 pb, lo que indica la presencia de heterocigotos (+6pb/-6pb).

En el grupo de referencia; 101 individuos resultaron homocigotos para la inserción +6pb+6pb, lo que representa una frecuencia de 38,8%, se encontraron 41 individuos homocigotos para la delección -6pb/-6pb (15,8%) y 118 resultaron heterocigotos +6pb/-6pb (45,4%), siendo este último el genotipo más común (Tabla 9). Con respecto a la frecuencia alélica, se observó que el alelo +6pb, el cual se asocia con una mayor expresión de la enzima se presentó con una frecuencia de 61,54 %, mientras que -6pb tuvo una frecuencia de 38,46 % (Tabla 9). La distribución de los genotipos para el polimorfismo 1494DEL6, está en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,99$).

Tabla 9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 1494DEL6 en 3'UTR del gen *TYMS*. Población de referencia.

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	n = 260	(%)	Alelo	n = 520	(%)
<i>1494DEL6</i>					
+6pb/+6pb	101	38,80	+6pb	320	61,54
+6pb/-6pb	118	45,40	-6pb	200	38,46
-6pb/-6pb	41	15,80			

Al determinar este polimorfismo en el grupo de enfermos, se obtuvieron las siguientes frecuencias genotípicas: 12 individuos presentaron el genotipo +6pb+6pb, cuya frecuencia se corresponde con el 60%, sólo 3 resultaron homocigotos para la delección -6pb/-6pb (15%) y 5 individuos resultaron heterocigotos +6pb/-6pb (25%). Con respecto a la frecuencia alélica, se observó que el alelo +6pb, en este grupo, tuvo una frecuencia de 72,5 %, mientras que la de -6pb fue de 27,50 % (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 1494DEL6 en 3'UTR del gen *TYMS*. Grupo de enfermos.

Genotipo	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica		
	N	(%)	Alelo	n	(%)
+6pb/+6pb	12	60	+6pb	29	72,50
+6pb/-6pb	5	25	-6pb	11	27,50
-6pb/-6pb	3	15			
Total	20	100		40	100

4.3 Frecuencia haplotípica 5'UTR/3'UTR

Los resultados de la frecuencia haplotípica obtenida en el grupo de referencia y los enfermos se detallan en las Tablas 11 y 12, respectivamente.

Tabla 11. Distribución de haplotipos regiones 5'UTR/3'UTR del gen *TYMS*, población de referencia (n= 260 individuos).

Haplotipo	TSER / 1494DEL6	n (%)
1	2R/-6pb	31 (5,96%)
2	2R/+6pb	165 (31,73%)
3	3R/-6pb	163 (31,35%)
4	3R/+6pb	156 (30,00%)
5	4R/-6pb	2 (0,39%)
6	4R/+6pb	3 (0,57%)

El análisis de ambos *loci* en la población de referencia arrojó la existencia de 6 haplotipos, siendo el más común (2R/+6pb), el cual se presentó 165 veces, con una frecuencia relativa de 31,73% (Tabla 11), el haplotipo (3R/-6pb) fue hallado casi con la misma frecuencia, 163 veces (31,35 %). La combinación (3R/+6pb) tuvo una frecuencia del 30%, mientras que (2R/-6pb) solo se presentó 31 veces, lo que representa el 5,96%. Esta última observación permite inferir el hecho que solo una pequeña proporción de la población estudiada posee el haplotipo con alelos totalmente relacionados a baja expresión enzimática, y de forma contraria alrededor del 30% de la población posee en combinación los alelos completamente asociados a alta expresión de TS (3R/+6pb). La frecuencia de los haplotipos (4R/+6pb) y (4R/-6pb) fue de 0,57 y 0,39 %, respectivamente (Tabla 11).

Con respecto al grupo de enfermos; individuos con diagnóstico de Leucemia, solo se encontraron 5 haplotipos, de los cuales el más común fue (3R/+6pb) con una frecuencia de 42,5%, seguido de (2R/+6pb) (30%), la frecuencia del haplotipo (2R/-6pb), se presentó sólo en el 2,5% de la población. (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de haplotipos regiones 5'UTR/3'UTR del gen *TYMS*, grupo de enfermos (n=20 individuos).

Haplotipo	TSER / 1494DEL6	n (%)
1	2R/-6pb	1 (2,5 %)
2	2R/+6pb	12 (30 %)
3	3R/-6pb	9 (22,5 %)
4	3R/+6pb	17 (42,5 %)
5	4R/-6pb	1 (2,5 %)

La frecuencia haplotípica observada en ambos grupos de estudio se comparó estadísticamente, este análisis arrojó que no existen diferencias significativas ($p>0,22$) entre los haplotipos observados en la población de referencia y el grupo de enfermos (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación estadística haplotipos 5'UTR/3'UTR, Grupo de referencia vs grupo de enfermos:

Grupo	Haplotipos						P
	1 2R/-6pb	2 2R/+6pb	3 3R/-6pb	4 3R/+6pb	5 4R/-6pb	6 4R/+6pb	
Referencia (n=260)	31 (5,96%)	165 (31,73%)	163 (31,35%)	156 (30%)	2 (0,39%)	3 (0,57%)	
Enfermos (n=20)	1 (2,5 %)	12 (30 %)	9 (22,5 %)	17 (42,5 %)	1 (2,5 %)	0 (0)	0,22

Se consideran estadísticamente significativos valores de $p<0,05$

4.4 Frecuencia diplotípica en población de referencia

El resultado del análisis anterior reveló la existencia de seis haplotipos, pudiendo existir entre ellos 21 combinaciones posibles, cuyos pares de detallan en la Tabla 14. En la población de referencia sólo se presentaron 13 de estos posibles diplotipos, siendo el más frecuente (2,3) el cual apareció en el 22,30 % de la población, seguido de (2,4) y (3,4) con frecuencias de 21,15% y 18,84 %, respectivamente. Los diplotipos menos frecuentes fueron (1,1) (2,5) y (3,1) con frecuencias de 0,39 %.

La población en estudio fue clasificada en función del nivel de expresión de TS, tomando como referencia los diplotipos observados. Se pudo determinar que de los 260 individuos analizados, 31 poseen diplotipos de baja expresión, lo que representa el 11,92%, 132 (50,7%) diplotipos de alta expresión, y el 37,37% restante correspondió a individuos clasificados como de expresión intermedia (Tabla 15).

Tabla 14: Fenotipo de expresión de TS en función de los diplotipos deducidos con el programa PHASE 2.1.1 en la población de referencia.

DiploTipos TYMS	Definición	Fenotipo de expresión de TS
(1,1)*	(2R/-6pb) / (2R/-6pb)	<i>Bajo</i>
(1,2)*	(2R/-6pb) / (2R/+6pb)	
(1,3)*	(2R/-6pb) / (3R/-6pb)	
(1,5)	(2R/-6pb) / (4R/-6pb)	
(2,4)*	(2R/+6pb) / (3R/+6pb)	<i>Alto</i>
(2,6)	(2R/+6pb) / (4R/+6pb)	
(3,4)*	(3R/-6pb) / (3R/+6pb)	
(3,6)*	(3R/-6pb) / (4R/+6pb)	
(4,4)*	(3R/+6pb) / (3R/+6pb)	
(4,5)	(3R/+6pb) / (4R/-6pb)	
(4,6)*	(3R/+6pb) / (4R/+6pb)	
(5,6)	(4R/-6pb) / (4R/+6pb)	
(6,6)	(4R/+6pb) / (4R/+6pb)	
(1,4)	(2R/-6pb) / (3R/+6pb)	<i>Intermedio</i>
(1,6)	(2R/-6pb) / (4R/+6pb)	
(2,2)*	(2R/+6pb) / (2R/+6pb)	
(2,3)*	(2R/+6pb) / (3R/-6pb)	
(2,5)*	(2R/+6pb) / (4R/-6pb)	
(3,3)*	(3R/-6pb) / (3R/-6pb)	
(3,5)*	(3R/-6pb) / (4R/-6pb)	
(5,5)	(4R/-6pb) / (4R/-6pb)	

*: Diplotipos encontrados en población venezolana.

La inferencia del fenotipo de expresión en función de los diplotipos se realizó basado en el predominio de los alelos influyentes sobre incremento de la expresión enzimática o viceversa en ambos *loci*. Los diplotipos con dos alelos de alta expresión y dos alelos de baja expresión fueron clasificados como de expresión intermedios

Tabla 15: Nivel de expresión de TS en población de referencia

Nivel de expresión de TS	N° de individuos	Frecuencia (%)
Bajo	31/260	11,92
Alto	132/260	50,77
intermedio	97/260	37,3

4.5 Frecuencia diplotípica en el grupo de enfermos

En el grupo de enfermos solo se presentaron ocho diplotipos, los más comunes fueron (2,4) y (4,4), ambos determinantes del fenotipo de expresión de TS alto, 60% de los individuos analizados presentaron este fenotipo de expresión de TS, 35% expresión intermedia, y 5% expresión baja. Los resultados se detallan en la Tabla 16.

4.6 Comparación estadística de los polimorfismos *TYMS* con los reportados en poblaciones de otras latitudes

Las frecuencias genotípicas obtenidas para cada uno de los polimorfismos estudiados fueron comparadas con las obtenidas en otras poblaciones (Tablas 17 y 18). En lo que respecta a la distribución del polimorfismo TSER, se observó que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) cuando se compara con población australiana, kenianos, caucásicos, afroamericanos y españoles, sin embargo, existen diferencias cuando se compara con población de origen asiático (China), habitantes del sur de Florida y chilenos. Estos resultados y sus datos estadísticos se observan con detalle en la Tabla 17.

Tabla 16. Fenotipo de expresión de TS en función de los diplotipos deducidos con el programa PHASE 2.1.1 en el grupo de enfermos.

Paciente	Diplo tipo	Fenotipo de expresión de TS
1	(2,5)	<i>Intermedio</i>
2*	(2,4)	<i>Alto</i>
3	(2,2)	<i>Intermedio</i>
4	(2,4)	<i>Alto</i>
5	(1,3)	<i>Bajo</i>
6	(2,3)	<i>Intermedio</i>
7	(2,4)	<i>Alto</i>
8	(4,4)	<i>Alto</i>
9	(2,2)	<i>Intermedio</i>
10*	(2,4)	<i>Alto</i>
11	(2,3)	<i>Intermedio</i>
12	(4,4)	<i>Alto</i>
13	(4,4)	<i>Alto</i>
14**	(3,3)	<i>Intermedio</i>
15	(3,4)	<i>Alto</i>
16	(4,4)	<i>Alto</i>
17	(4,4)	<i>Alto</i>
18	(3,4)	<i>Alto</i>
19	(2,4)	<i>Alto</i>
20	(3,3)	<i>Intermedio</i>

60% de los individuos poseen un fenotipo de alta expresión de TS, 35% expresión intermedia, y 5% expresión baja.

*** Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)**

**** Leucemia Mieloide Crónica (LMC)**

Pacientes sin asterisco: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Tabla 17: Distribución genotípica del polimorfismo TSER en varias poblaciones.

Poblaciones	$\frac{2R/2R}{n(\%)}$	$\frac{2R/3R}{n(\%)}$	$\frac{3R/3R}{n(\%)}$	$\frac{2R/4R}{n(\%)}$	$\frac{3R/4R}{n(\%)}$	<i>p</i>	<i>Ref</i>
Venezolanos (Presente estudio) (n=260)	34 (13,1)	127 (48,8)	94 (36,2)	1 (0,4)	4 (1,5)		
Chinos (n=96)	2 (2)	30 (31)	64 (67)	0 (0)	0 (0)	0,0001	Marsh et al. (1999)
Caucásicos* (n=96)	18 (19)	41 (43)	37 (38)	0 (0)	0 (0)	0.3980	Marsh et al. (1999)
Australianos (n=91)	20 (22)	31 (34)	40 (44)	0 (0)	0 (0)	0.115	Iacopeta et al. (2001)
Floridianos ** (n=74)	26 (35,1)	29 (39,2)	18 (24,3)	0 (0)	1 (1,4)	0,0006	Hammad et al. (2012)
Chilenos (n=368)	78 (21,1)	174 (47,2)	116 (31,2)	0 (0)	0 (0)	0,0081	Acuña et al. (2006)
Kenianos (n=98)	17 (7)	43 (44)	25 (26)	10 (10)	3 (3)	0.3314	Marsh et al. (2000)
Afroamericanos (n=92)	18 (20)	49 (53)	22 (24)	0 (0)	3 (3)	0.1550	Marsh et al. (2000)
Españoles (n= 347)	68 (19,6)	162 (46,7)	117 (33,7)	0 (0)	0 (0)	0.1383	Bolufer et al. (2007)
Italianos (n= 136)	31 (22)	74 (54)	31 (22)	0 (0)	0(0)	0,0315	Graziano et al. (2004)

*Caucásicos de las ciudades de Aberdeen y Glasgow, Escocia.
 ** Habitantes del sur de Florida, Estados Unidos.
 Se consideran estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$

Por otra parte, al comparar la distribución de los genotipos en cuanto al polimorfismo 1494DEL6 entre la población de referencia de este estudio y varias poblaciones de otras latitudes, se observó que no existen diferencias significativas cuando se compara con las muestras de poblaciones de Italia, España, Francia y México ($p > 0,05$), mientras que existen diferencias cuando se compara la distribución de este polimorfismo con población caucásica y japonesa ($p < 0,05$).

Tabla 18. Distribución genotípica del polimorfismo 1494DEL6 en varias poblaciones.

Poblaciones	$\frac{+6pb/+6pb}{n (\%)}$	$\frac{+6pb/-6pb}{n (\%)}$	$\frac{-6pb/-6pb}{n (\%)}$	<i>p</i>	<i>Ref.</i>
Presente estudio (n=260)	101 (38,8)	118 (45,40)	41 (15,80)		
Estadounidenses (n=95)	46 (48,4)	42 (44,3)	6 (7,3)	0,0430	Ulrich et al. (2000)
Franceses (n=85)	34 (40)	45 (52,94)	6 (7,06)	0,112	Lecomte et al. (2004)
Japoneses (n=36)	4 (11,1)	17 (47,22)	15 (41,68)	0,0001	Inoue et al. (2009)
Chinos (n=439)	43 (9,8)	197 (44,9)	199 (45,3)	0,0001	Gao et al. (2012)
Italianos (n=139)	63 (45,0)	58 (42,0)	18 (13,0)	0,430	Graziano et al. (2004)
Mexicanos (n=200)	92 (46)	86 (43)	22 (11)	0,183	Gallegos-Arreola et al. (2008)
Espanoles (n=110)	49 (44,5)	44 (40)	17 (15,5)	0,566	Patiño-Garcia et al. (2009)

Se consideran estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$

4.7 Desbalance alélico

El análisis de los genotipos de ambos polimorfismos en células tanto de la línea germinal (mucosa oral) como del tejido potencialmente tumoral (medula ósea), en el grupo de enfermos, reveló que en el polimorfismo 1494del6; 5/20 individuos resultaron heterocigotos (+6pb/-6pb), mientras que en TSER, se encontraron 9/20: 8 (2R/3R) y 1 (2R/4), Tablas 8 y 10. Esta proporción genotípica se mantuvo idéntica en ambas poblaciones celulares, por tanto en el estudio de estos 20 pacientes se descartó la posibilidad de existencia de pérdida de la heterocigocidad para ambos *loci*.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

Los polimorfismos del gen de la TS constituyen uno de los ejemplos clínicos más desarrollados a nivel de farmacogenética, lo que se debe principalmente a la marcada influencia que éstos tienen sobre el nivel de expresión de la enzima y su relación con la respuesta farmacológica. Este aspecto ha sido ampliamente desarrollado por varios autores (Kawakami y Watanabe 2003; Marsh, 2005; Di Francia et al., 2012 (a); Lima et al., 2013), quienes concuerdan en el hecho que la sobreexpresión de TS se asocia a resistencia de fármacos tales como: 5-FU, Capecitabine, Tegafur, MTX, entre otros. El estudio de la distribución de los polimorfismos del gen *TYMS* en la población venezolana resulta fundamental, debido a que la frecuencia genotípica de cada uno de ellos varía en función de los grupos poblacionales analizados (Marsh et al., 1999; Iacopetta et al., 2001; Acuña et al., 2006; Lecomte et al., 2004; Gao et al., 2012). Los resultados de esta investigación aportan información acerca de la distribución de los dos polimorfismos más influyentes del gen *TYMS* en una muestra de población de la región central de Venezuela.

Cuando se comparó la distribución genotípica polimorfismo TSER con los reportados en muestras de poblaciones de otras latitudes, se observaron diferencias significativas con: chinos, chilenos, habitantes del sur de Florida e italianos ($p < 0,05$) (Marsh et al., 1999; Acuña et al., 2006; Hammad et al., 2012; Graziano et al., 2004); mientras que existe similitud con muestras de población caucásica, española y afroamericana (Marsh et al., 1999; Bolufer et al., 2007; Marsh et al., 2000) (Tabla

17). Este resultado guarda relación con el proceso de mestizaje que ha operado con el transcurrir del tiempo en la población venezolana; la cual inicialmente fue producto de una mezcla de pobladores originarios (amerindios), colonos españoles y esclavos africanos, con una contribución posterior de inmigrantes principalmente de Italia, Portugal y España (Rodríguez-Larralde et al., 2001; Castro de Guerra y Suárez, 2010), lo cual condujo a modificar la composición genética de la población, y se produjo una sustitución de los genes nativos por genes de carácter europeo y africano, quedando prácticamente sublevado el componente amerindio (Castro de Guerra y Suarez, 2010), por lo cual resultaría interesante estudiar cómo están distribuidos estos polimorfismos en poblaciones indígenas venezolanas, con el fin de conocer cuáles son los alelos predominantes en este componente menos mezclado y así establecer comparaciones.

Con base a lo antes expuesto, es importante mencionar que la presencia del alelo TSER*4 (4R) en la población analizada hace evidente el aporte africano que existe en nuestro país, ya que este alelo ha sido reportado principalmente en poblaciones afrodescendientes (Marsh et al., 2000), este hallazgo coincidente con lo observado por Hammad et al. (2012), quienes también reportaron presencia de 4R en pobladores del sur de Florida, cuya muestra, estuvo integrada por latinos, blancos no hispanos, asiáticos y afroamericanos.

Cuando se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo 1494DEL6 con otras localidades, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a población caucásica, japonesa y china ($p < 0,05$), no obstante, no existen diferencias al comparar con población de Francia, Italia, México y España ($p > 0,05$) (Tabla 18). En relación a este polimorfismo existe menor probabilidad de encontrar diferencias en los diversos grupos de población, ya que se trata de un sistema bialélico y existen solo tres genotipos probables, a diferencia del polimorfismo TSER, el cual tiene varias formas alélicas (Marsh et al., 2000), y de esta manera se incrementa el número de combinaciones posibles para los genotipos.

Durante el estudio de ambos polimorfismos en la población de referencia se pudo observar que alelo más común es siempre el que se asocia a respuesta terapéutica deficiente. En el caso del polimorfismo TSER, el alelo más frecuente es 3R (61,35 %) (Tabla 7), el cual también es predominante en poblaciones tales como: chinos, cuya frecuencia alcanza niveles que superan el 80 % (Gao et al., 2012), pobladores del sudeste asiático (62 %), y caucásicos (60 %) (Marsh et al., 1999), mientras que en el polimorfismo 1494DEL6, predomina la forma +6pb con una frecuencia de 61,54 % (Tabla 9). La frecuencia alta observada con respecto a estos alelos en población venezolana resulta de gran interés, debido a que estas variantes al promover la sobreexpresión de TS, son capaces de contribuir a la resistencia a fármacos como el MTX y 5-FU, aspecto que se relaciona con el pronóstico del paciente, puesto que la tasa de sobrevida depende en gran medida del éxito de la terapia; Un ejemplo de esto lo constituye el trabajo reportado en Venezuela por Hernández et al., (2007), donde se investigó mediante métodos inmunohistoquímicos, la expresión de TS en muestras de biopsias provenientes de 34 pacientes con cáncer de colon, quienes recibieron tratamiento con 5-FU y leucovorina; estos autores observaron que los pacientes en cuyos tumores se detectó una expresión baja de TS, mostraron una evolución más favorable y tuvieron una mayor probabilidad de sobrevida.

Cabe señalar que MTX y 5-FU no son de prescripción esporádica, sino que por el contrario son fármacos de elección en el tratamiento de varios tipos de cáncer, en especial el 5-FU, que es utilizado en el tratamiento de tumores sólidos, como el cáncer colorrectal (Hitre et al., 2005; Meza et al., 2011), gástrico (Kawakami et al., 2005), mama (Fujishima et al., 2010) entre otros, y cuya eficacia, según lo reportado por estos autores depende en buena medida del genotipo expresado tanto en la línea germinal del paciente como en el tejido tumoral. El 5-FU es el tercer agente antitumoral más prescrito, y el principal agente utilizado en el tratamiento del cáncer colorrectal, sin embargo, está documentado que sólo del 20 al 30% de los pacientes

responden satisfactoriamente al tratamiento con este fármaco (Bandres y García Foncillas, 2004). Aunque está descrito que la resistencia a este tipo de fármacos puede obedecer a causas farmacocinéticas, por ejemplo; defectos en las enzimas que los metabolizan, también es evidente que las causas farmacodinámicas juegan un rol fundamental en el desarrollo de resistencia, razones que agregan importancia al hecho de conocer cuál es la distribución de los alelos asociados a alta expresión de TS, como es el caso de 3R y +6pb, puesto que el éxito de la terapia antitumoral, según lo expuesto en párrafos anteriores, depende en buena medida de los genotipos *TYMS*.

Con respecto a los alelos 2R y -6pb asociados a mejor respuesta farmacológica y mayor tasa de sobrevida (Krajinovic et al., 2002; Huang et al., 2009), fueron encontrados en menor proporción: 37,69 % (2R) (Tabla 7) y 38,46% (-6pb) (Tabla 9). Esta observación resulta común en la mayoría de las poblaciones, por ejemplo; en caucásicos y habitantes del sudeste de Asia la distribución del alelo 2R se mantiene entre el 40 % y 38 %, respectivamente, según datos reportados por Marsh et al. (2000) y Marsh et al. (1999). Asimismo, se ha descrito que el alelo -6pb se ha presentado con frecuencias que varían entre el 29% hasta el 34% en caucásicos y franceses, respectivamente (Ulrich et al., 2000; Lecomte et al., 2004), y por el contrario en países asiáticos alcanza frecuencias que superan el 65%, del mismo modo en Chile, la frecuencia del alelo 2R sobrepasa el 50%. Estas observaciones resaltan el valor que tiene el emprender estudios de marcadores genéticos en función de poblaciones específicas de cada región, país, o grupo étnico, debido la variabilidad con que las mismas se presentan, y la influencia actual que tiene la constitución genética del individuo en la farmacoterapia.

Si bien las variantes alélicas en 5'UTR de *TYMS* poseen mayor influencia sobre la tasa de expresión enzimática, resulta muy importante prestar atención a los polimorfismos presentes en 3'UTR, principalmente porque la variante alélica más común en esta región (+6pb) está asociada con el aumento en los niveles de expresión de TS debido al incremento en la estabilidad del ARNm (Pullmann et al., 2006), la

influencia de esta variable sobre el beneficio terapéutico fue estudiado por Fujishima et al., (2010) quien midió el nivel de expresión de TS en pacientes con cáncer de mama en relación a los genotipos que éstas expresaban en 3'UTR; dicho estudio mostró que el nivel de expresión de TS en el tejido normal y tumoral de pacientes con genotipo +6pb/+6pb es significativamente mayor que en los pacientes con otros genotipos, estos últimos, al exponer menor cantidad de enzima circulante podrían tener el mayor beneficio de la quimioterapia, no obstante, y en contraste con lo antes expuesto, este grupo se convierte al mismo tiempo en el más vulnerable a desarrollar toxicidad relacionada con el medicamento, variable que también debe considerarse al momento de dosificar al paciente.

Está descrito que el riesgo para el desarrollo de la toxicidad relacionada a este tipo de fármacos depende en gran medida de los efectos generales de las enzimas que los metabolizan (Ezzeldin y Diasio 2008), sin embargo, hoy día se conoce que los polimorfismos del gen *TYMS*, tanto en 5'UTR como en 3'UTR tienen potencial para ser catalogados como predictores de toxicidad en los pacientes tratados con quimioterapia basada en 5-FU y MTX, de hecho, se ha determinado que un aumento en la expresión de TS en tejido normal se encuentra vinculado con menor toxicidad al empleo de 5-FU (Santini et al., 2004).

En este sentido, existen estudios que demuestran que los alelos que condicionan al individuo para una buena respuesta terapéutica, son al mismo tiempo los que los predisponen al desarrollo de toxicidad en varios grados. Lecomte et al., (2004) estudiaron el grado de toxicidad en un grupo de 90 pacientes con cáncer colorrectal, los cuales recibieron quimioterapia basada en 5-FU, y demostraron que los individuos homocigotos 2R/2R en 5'UTR de *TYMS* tenían efectos secundarios más severos al 5-FU, con una tasa de toxicidad grado 3 ó 4 de hasta 43%, en contraste con los que poseían el genotipo 3R/3R, de los que solo el 3% llegó a desarrollar toxicidad en esta magnitud ($p < 0,01$).

Lo antes expuesto indica que los agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de los tumores sólidos que afectan el tracto gastrointestinal u otra localización son efectivos sólo en algunos pacientes, por ejemplo, es sabido que a pesar que todos los pacientes con cáncer colorrectal en estadio III son tratados con este fármaco, la tasa de supervivencia se encuentra alrededor del 65%, pues el 35% restante fallece a pesar de haber recibido el tratamiento (Moertel et al., 1995), lo que podría atribuirse en parte a los efectos altamente tóxicos del medicamento. En un estudio realizado en 118 pacientes venezolanos con cáncer colorrectal quienes recibieron terapia adyuvante con 5-FU posterior a cirugía, donde el 66,7% de esto paciente presentó eventos adversos que incluían: diarreas, náuseas, vómitos, y neuropatía periférica (Meza et al., 2011)

Estas observaciones demuestran la importancia que tienen ambos polimorfismos *TYMS* sobre el desarrollo de resistencia o toxicidad ante estos agentes quimioterapéuticos, de forma tal que al pretender utilizar los polimorfismos *TYMS* como marcador de resistencia o toxicidad al 5-FU, MTX y sus derivados, es fundamental analizar en conjunto los polimorfismos de las regiones 5'UTR y 3'UTR, con base en esto el análisis de haplotipos 5'UTR/3'UTR resulta útil en mayor grado, debido a que estas variantes en combinación son más eficaces para determinar el nivel de expresión enzimática.

En relaciona este aspecto, se ha reportado que existe una notable asociación entre el alelo +6pb y la variante 2R, ya que las mismas se encuentran en desequilibrio de ligamiento ($D' = -0,76$) (Lecomte et al., 2004). El haplotipo 2R/+6pb se asocia significativamente con alto riesgo de efectos secundarios graves a 5-FU aun cuando la variante +6pb se relaciona de manera directa con el aumento de la expresión de TS. Dicha observación explica por qué los individuos con genotipo -6pb/-6pb poseen un

riesgo de toxicidad al 5-FU significativamente inferior en relación a los pacientes con el genotipo +6pb/+6pb (OR: 0,19; 95% CI: 0,04-0,91) (Gusella et al., 2009).

El análisis de haplotipos en ambos grupos de estudio mostró una asociación preferencial entre 2R y +6pb, aspecto antes descrito por Lecomte et al., (2004), de manera que casi siempre que se presenta el alelo 2R, este aparece en combinación con +6pb, este haplotipo resultó ser el más común en la población de referencia; no obstante este acontecimiento sucede casi de la misma manera con el alelo -6pb, el cual se vincula preferentemente con la variante 3R.

En el presente trabajo se encontró que las combinaciones más comunes en la población de referencia son: 2R/+6pb y 3R/-6pb, las mismas que predominan en población italiana (Graziano et al., (2004), sin embargo al comparar estadísticamente la distribución de estos haplotipos con dicha población, se observan diferencias significativas ($p=0.010$), esto se debe al predominio que tiene la combinación 2R/+6pb (40,6%) en población italiana (Graziano et al., (2004), el cual difiere con lo encontrado en la población de referencia, donde este haplotipo se presenta con frecuencia de 31,73% (Tabla 11). Los resultados hallados en el presente trabajo acerca de la distribución de haplotipos difieren en mayor grado con lo reportado para poblaciones de origen asiático, donde el haplotipo 2R/+6 se clasifica entre los menos frecuentes (10,4%) (Zhang et al., 2004), y obedece su causa a la baja frecuencia con la que se presenta el alelo 2R en esta población.

Los datos obtenidos acerca de la distribución de genotipos y haplotipos en la población de referencia aportan el conocimiento básico necesario para emprender estudios a futuro con fines de investigación en farmacogenética o para los estudios de asociación de un genotipo o haplotipo determinado con un tipo de cáncer (Graziano et al., 2004). Esta información además de poseer gran valor desde el punto de vista de genética poblacional, es fundamental para estimar el diplotipo de los individuos,

variable que finalmente permite inferir con mayor certeza el nivel de expresión de TS del individuo, factor que ejerce gran influencia al momento de predecir el tipo de respuesta farmacológica o predisposición del paciente a desarrollar toxicidad cuando es tratado con 5-FU, MTX y sus prodrogas.

En función de lo antes descrito es importante resaltar que los haplotipos más frecuentes en la población de referencia: 2 y 3 (2R/+6pb y 3R/-6pb) (Tabla 11), al estar en combinación con cualquiera de los otros haplotipos, existe mayor probabilidad de generar un fenotipo de expresión de TS intermedio, o alto (Tabla 14), siendo menos probable el desarrollo de un fenotipo de baja expresión, ya que para que esto sea posible, cualquiera de estos dos haplotipos tendría que aparecer en combinación exclusivamente con el haplotipo 2R/-6pb, hecho que ocurrió con una frecuencia de 0,38%, y debe su causa a la baja frecuencia con la que el haplotipo 2R/-6pb aparece en la población (Tabla 11).

Cuando la población de referencia es clasificada en función del nivel de expresión de TS (Tabla 15) se pudo observar que más del 50% de la población posee el fenotipo de alta expresión, y solo una minoría (11,92%) se ubica dentro del grupo de baja expresión. Este resultado puede ser consecuencia de la alta frecuencia con la que se presenta el haplotipo 3R/+6pb en la población de referencia (30%), el cual al poseer dos alelos asociados a la sobreexpresión de la enzima contribuyen en mayor grado en la aparición del fenotipo de expresión de TS alto, pues el mismo por si solo aporta la mitad de la carga necesaria para que esto ocurra, y al aparecer en combinación con casi cualquiera del resto de los haplotipos es capaz de determinar la aparición de este fenotipo.

El análisis de polimorfismos *TYMS* en el grupo de enfermos permitió conocer que al igual que en población sana, los alelos predominantes fueron los que predisponen al individuo a pobre respuesta farmacológica, sin embargo, en este grupo

de estudio, fue notable una mayor presencia de los alelos +6pb y 3R, en comparación con lo observado en el grupo de referencia. En este sentido, se halló que para 1494DEL6, el genotipo más frecuente fue +6pb/+6pb, el cual estuvo presente en 12/20 individuos, lo que constituye el 60% de los pacientes, asimismo se encontró una predominio notable del alelo 3R, el cual se presentó casi con la misma con una frecuencia poco menor que el anterior (65%), y que se ve reflejado en los genotipos exhibidos por este grupo de pacientes, de los cuales el 45% posee el genotipo de alta expresión de TS (3R/3R) y 40% el genotipo de expresión intermedia (2R/3R).

La frecuencia alta del haplotipo 3R/+6pb (42,50%) en el grupo de pacientes (Tabla 12), llama la atención en gran medida, principalmente por tratarse de individuos con una neoplasia hematológica, lo cual podría estar relacionado a la sobreexpresión de TS. Este hallazgo podría sugerir la existencia de una asociación entre estos alelos y la susceptibilidad a la enfermedad, aspecto que ha sido estudiado por varios autores: Nazki et al. (2012) y Weng et al. (2012), estos últimos hallaron que el genotipo 3R/3R puede contribuir a la susceptibilidad de riesgo de LLA en niños y linfoma no Hodgkin en caucásicos, y que a su vez el genotipo (-6pb/-6pb) podría tener un efecto protector en neoplasias hematológicas. La existencia de una asociación entre los polimorfismos *TYMS* y la susceptibilidad al cáncer ha sido propuesta por otros investigadores en cáncer de pulmón (Takehara et al., 2005), adenocarcinoma esofágico, gástrico y de la unión gastroesofágica (Graziano et al., 2004; Yang et al., 2012; Zhang et al., 2004), cáncer de mama (Zhai et al., 2006; Da silva Nogueira et al., 2012), entre otros. Sin embargo, al comparar estadísticamente los resultados obtenidos en este trabajo acerca de la distribución de los haplotipos en los dos grupos de estudio analizados: población de referencia y grupo de enfermos, no existen diferencias significativas ($p=0,22$). Este resultado podría deberse al tamaño pequeño de la muestra ($n=20$), por ello es recomendable analizar un mayor número de pacientes.

La determinación de los dipolitos *TYMS* en el grupo de enfermos reveló que el 60% de los pacientes analizados posee el fenotipo de alta expresión de TS, condición que les hace propensos a desarrollar falla terapéutica al ser tratados con MTX, no obstante, es esta proporción de individuos los que poseen una mayor capacidad de superar los efectos adversos del medicamento (Santini et al., 2004). El 35% restante tendrá probabilidad de responder medianamente ante el tratamiento con este fármaco y desarrollar efectos adversos en distinta medida. Esta inferencia está basada en lo observado por Krajinovic et al., (2002), quienes estudiaron niños con LLA tratados con MTX encontrando que los portadores del genotipo 3R/3R tienen una pobre perspectiva de supervivencia en comparación con los que portan los genotipos 2R/3R y 2R/2R.

Este resultado posee importancia desde el punto de vista clínico debido que al momento del análisis, estos pacientes estaban siendo tratados con MTX. Cabe recordar que los pacientes con LLA reciben altas dosis de MTX (Combariza et al., 2007; Chona de Armas et al., 2010) y que este fármaco y sus derivados no solo forman parte de los estándares de tratamiento de la LLA, sino que además son de aplicación en tratamiento de otras neoplasias hematológicas y otros tipos de cáncer, como el osteosarcoma (Patiño-García et al., 2009), cáncer de vejiga invasivo (Vera-Gimon et al., 2003), e inclusive la artritis reumatoide (Rego-Pérez et al., 2009; Lima et al., 2014). El conocimiento de estos resultados por los médicos tratantes permitirá, en primer lugar estudiar la relación existente entre el fenotipo de expresión de TS de cada paciente diagnosticado con leucemia y la tasa remisión completa alcanzada, y así poder comparar el comportamiento de dichos pacientes con lo reportado en otros países.

Debido a que la variabilidad de respuesta de los pacientes ante determinado medicamento, se debe fundamentalmente a polimorfismos genéticos que afectan la actividad de las enzimas que participan en la farmacocinética o en la

farmacodinámica del medicamento (Candelaria et al., 2006; Morán et al., 2008), como es el caso de TS, el conocer el perfil genético del individuo, no solo permite al médico tratante llevar la medicina hacia un nivel más personalizado, sino que beneficia en gran medida al paciente, el cual estará en condición de recibir, desde el principio el tratamiento que más le favorezca y dosis con un mayor ajuste (Jakka y Rossbach, 2013), del mismo modo, el conseguir identificar a los individuos con mayor probabilidad de beneficio de determinado fármaco durante la terapia anti cáncer, podría conllevar a la larga a la modificación de los regímenes de tratamiento, de forma tal que se disminuya el uso generalizado de los mismos, hecho que en definitiva tiene un impacto social, puesto que podrían fortalecerse las políticas de salud dirigidas al financiamiento de este tipo de terapia, mecanismo que ha sido propuesto en algunos países de Europa con el fin de brindar el mayor beneficio al numeroso grupo de pacientes que reciben quimioterapia (Tirelli et al., 2011), lo que tiene como objetivo, disminuir los efectos tanto físicos y psicológicos, como monetarios que acarrea el método de ensayo y error, de los cuales se estima que representan el 1,9% del total de costos hospitalarios y el 15% de los costos totales del tratamiento en pacientes que padecen alguna enfermedad crónica (Marsh, 2007).

Hoy día el estudio de los polimorfismos de la TS representan una herramienta de gran ayuda en el desafío que tiene el tratante al elegir la farmacoterapia adecuada para el paciente afectado por algún tipo de cáncer, en el cual sea necesario administrar 5-FU o MTX. Si bien en la actualidad, aún se encuentra en discusión el uso específico de los polimorfismos *TYMS* como elemento predictivo en el tratamiento adyuvante, debido a la inconsistencia en algunos resultados, según lo indicó la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) en el año 2006 (Locker et al., 2006), la gran mayoría de estudios demuestran que existe una marcada relación entre el nivel de TS expresado por el paciente (determinado por los genotipos *TYMS*) y la respuesta farmacológica o la toxicidad desarrollada por los mismos, por lo que, desde el punto de vista clínico, dejar de considerarle significa desaprovechar los

numerosos beneficios que ofrece este conocimiento tanto para el tratante como para el paciente.

Asimismo es necesario tomar en cuenta que la predicción de la efectividad o toxicidad de estos fármacos no depende únicamente de los polimorfismos del gen *TYMS*, y que a pesar de que la inhibición de la TS es el principal mecanismo de acción del 5-FU (Schilsky et al., 1998), es fundamental incluir un enfoque integral en donde se evalúen además otros marcadores que son clave tanto en el metabolismo del fármaco como otras enzimas que participan en la farmacodinamia e interacciones blanco-medicamento (Ezzeldin y Diasio 2008; Di Francia et al., 2012 (b); Loganayagam et al., 2013). Un ejemplo de ello son los polimorfismos del gen *DPYD*, que poseen influencia sobre la actividad de la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), enzima limitante de la velocidad en el catabolismo 5-FU que tiene un papel crítico tanto en la efectividad antineoplásica como en la toxicidad del fármaco, del modo que, según lo indican varios autores, una actividad intratumoral incrementada de la DPD se correlaciona con resistencia al 5-FU, mientras que una actividad disminuida conlleva un descenso en la tasa de catabolismo del 5-FU con el consiguiente aumento de su toxicidad (López et al., 2008; Schwab et al., 2008; González-Haba et al 2012).

Otros polimorfismos con valor predictivo, en cuanto a toxicidad y efectividad son los del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), enzima es muy importante durante la regeneración de folato reducido. Entre los polimorfismos que influyen sobre la actividad de esta enzima destacan dos SNP cuya presencia genera variantes con actividad disminuida que tienen efectos sobre la eficacia y toxicidad del medicamento (Rego-Pérez et al., 2009). Aunque dichas variantes han sido asociadas principalmente al MTX, existen estudios recientes que los reconocen como marcadores farmacogenética clínicamente útiles en la predicción de la toxicidad a la terapia con fluoropirimidinas (Loganayagam et al., 2013).

Es importante señalar que en el presente estudio solo se incluyó en el análisis de 5'UTR de *TYMS*, el polimorfismo TSER, y a pesar que éste es el de mayor influencia, el estudio de esta región estará más completo si se incluye el análisis del polimorfismo 3RG>C, el cual da lugar a las formas alélicas 3RC y 3RG variantes que tienen impacto sobre la función de 3R en el mecanismo transcripcional de TS, pudiendo determinar su función activadora, de manera que los individuos que exhiban el genotipo 3RC pueden ser clasificados dentro del grupo de alelos de “baja expresión” en conformidad con aquellos que presentan el alelo 2R, así posean la triple repetición (Mandola et al., 2003; Lurje et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen datos estadísticos de referencia en población de la región central de Venezuela, y son a su vez el fundamento para realizar estudios futuros de casos y controles, necesarios para dilucidar algunas hipótesis producto de esta investigación. El estudio de los polimorfismos del gen *TYMS* en población venezolana constituye el punto de partida de investigaciones posteriores que tienen como fin la indagación de otros polimorfismos y genes implicados en la respuesta a este tipo de medicamentos, lo cual constituye la base de la medicina personalizada, que a futuro podrá mejorar la efectividad del tratamiento en pacientes con cáncer.

CONCLUSIONES

- El análisis de diplotipos en la población de referencia, demostró la presencia de 13 diplotipos, siendo el más frecuente (2,3) el cual apareció en el 22,30 % de los individuos analizados. Se pudo determinar que el 50,7% de la población posee diplotipos de alta expresión de TS, este conocimiento es importante en farmacogenética, debido a que la expresión de TS ha sido utilizada como marcador predictivo y de pronóstico en algunos tipos de cáncer
- La determinación de los diplotipos *TYMS* en el grupo de enfermos reveló que el 60% de los pacientes, al poseer el fenotipo de alta expresión de TS, son vulnerables a presentar falla terapéutica cuando son tratados con MTX, u otro inhibidor de TS, no obstante, es esta proporción de individuos los que poseen una mayor capacidad de superar los efectos tóxicos del medicamento, estos datos constituyen la plataforma para investigar como es la evolución de los pacientes diagnosticados con Leucemia tratados con este tipo de fármacos, en función del fenotipo de expresión de TS.
- Las diferencias estadísticas observadas en lo que respecta a la distribución de los polimorfismos TSER y 1494DEL6 del gen *TYMS* entre la población estudiada y otras poblaciones, refleja la necesidad de emprender estudios de los marcadores de importancia en farmacogenética en el país, sobre todo por el carácter mestizo de la población venezolana.

- La presencia del alelo TSER*4 (4R) en población venezolana hace evidente el aporte africano que existe en nuestro país, ya que este alelo ha sido reportado principalmente en poblaciones afrodescendientes.
- El estudio comparativo de los polimorfismos *TYMS* en dos poblaciones celulares diferentes, provenientes del grupo de enfermos descartó la posibilidad de existencia de pérdida de la heterocigocidad para ambos *loci*.
- Los resultados obtenidos en esta investigación contribuyen a la creación de bases de datos necesarias para emprender estudios de farmacogenética en relación al gen *TYMS* en la región central del país. Esta base de datos podrá ser utilizada como referencia para deducir los haplotipos y diplotipos de los individuos que lo requieran, permitiendo inferir en el posible fenotipo de expresión de TS, lo que está relacionado directamente con la respuesta terapéutica y toxicidad ante fármacos inhibidores de TS.

RECOMENDACIONES

- Resulta fundamental la evaluación de otros marcadores asociados a la respuesta terapéutica de fármacos inhibidores de TS, del modo que se incluya el estudio no solo de las enzimas que participan en la farmacodinámica, sino también aquellas que participan en la farmacocinética del medicamento, esto debido a que el conocimiento del efecto conjunto de otras enzimas que participan en la ruta de estos medicamentos permite inferir de una manera más global en el fenotipo de respuesta a este tipo de fármacos
- Debido a la heterogeneidad con la que se presentan los polimorfismos *TYMS* en las distintas poblaciones, aunado a las características étnicas de nuestro país, es necesario analizar individuos de otras regiones de Venezuela, con el fin de conocer si existen diferencias en la distribución de los mismos.
- Analizar la evolución del tratamiento con MTX en función de la expresión de TS en el grupo de pacientes incluidos en este estudio
- Es recomendable estudiar un mayor número de individuos enfermos, especialmente aquellos tratados con este tipo de fármacos, esto permitiría a su vez indagar la posible asociación de los polimorfismos *TYMS* con la enfermedad, mediante el estudio de casos y controles.
- Es de gran importancia establecer relación directa con la comunidad médica, con el fin de dar a conocer esta información y buscar las bases para integrar conocimientos de farmacogenética en la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Eaton, L., Cifuentes, L., y Massardo, D. (2006). Genetic variants in the enhancer region of the thymidylate synthase gene in the Chilean population. *Br J Clin Pharmacol*, 6(6), 778-782.
- Afzal, S., Gusella, M., Jensen, S., Vainer, B., Vogel, U., Andersen, J., et al. (2011). The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, 12(9), 1257–1267.
- Aschele, C., Debernardis, D., Casazza, S., Antonelli, G., Tunesi, G., Baldo, C., et al. (1999). Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 17(6), 1760-1770.
- Bandres, E., y García-Foncillas, J. (2004). Factores moleculares predictivos de respuesta y toxicidad para seleccionar el tratamiento adyuvante. *Oncología*, 27(4), 252-257.
- Bolufer, P., Collado M., Barragán, E., Cervera J., Calasanz, M., Colomer, D., et al. (2007). The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug- metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica*, 92, 308-314.
- Candelaria, M., Taja-Chayeb, L., Vidal-Millan, S., Gutiérrez, O., Serrano-Olvera, A., Arce-Salinas, C., et al. (2006). Importancia de la Determinación de Variantes Genéticas que Influyen en la Eficacia y Toxicidad Farmacológica en Oncología. *Cancerología*, 1, 57-70.
- Capote, L. (2013). Perfil epidemiológico y control del cáncer en Venezuela. *Gac Méd Caracas*, 121(1), 43-52.
- Cascinu, S., Aschele, C., Barni, S., Debernardis, D., Baldo, C., Tunesi, G., et al. (1999) Thymidylate Synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res*, 5, 1996–1999.

- Castro de Guerra, D., y Suárez, M. (2010). Sobre el proceso de mestizaje en Venezuela. *Interciencia*, 35(9), 654-658.
- Chona de Armas, Z., Montero, E., e Inaty, J. (2010). Leucemia linfoblástica aguda: Evaluación clínico terapéutica del protocolo total XV modificado. Hospital universitario de Caracas 2003-2007. *Arch Venez Puer Ped* ,73(2), 18-28.
- Chu, E., Koeller, D. M., Casey, J. L., Drake, J. C., Chabner, B. A., Elwood, P.C., et al. (1991). Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(20), 8977–8981.
- Combariza, J. F., Casas, C., Rodríguez, M., Cardona, A. F., Ospina, É., y Grajales, M. (2007). Supervivencia en adultos con leucemia linfocítica aguda de novo tratados con el esquema Hyper CVAD en el Instituto Nacional de Cancerología (Colombia), entre enero de 2001 y junio de 2005. *Rev Colomb Cancerol*, 11(2), 92-100.
- Da Silva Nogueira, J., De Lima Marson, F., y Bertuzzo, C. (2012). Thymidylate synthase gene (TYMS) polymorphisms in sporadic and hereditary breast cancer. *BMC res Notes*, 5(676), 1-6.
- Danenbergh, P. (2004). Pharmacogenomics of thymidylate synthase in cancer treatment. *Front Biosci*, 9, 2484-94.
- Di Francia, R., Cimino, L., y Berretta, M. (2012) (a). Genetic variants influencing Fluoropyrimidine based-therapy and available methods to detect them. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16, 285-298.
- Di Francia, R., Siesto, R.S., Valente D., Spartà D., y Berretta M. (2012) (b). Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropyrimidine/Oxaliplatin-based therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16, 1211-1217.
- Dotor, E., Cuatrecasas, M., Martínez-Iniesta, M., Navarro, M., Vilardell, F., Guino, E., et al. (2006). Tumor Thymidylate Synthase 1494del6 Genotype As a Prognostic Factor in Colorectal Cancer Patients Receiving Fluorouracil-Based Adjuvant Treatment. *J Clin Oncol*, 24, 1603-1611.
- Edler, D., Glimelius, B., Hallstrom, M., Jakobsen, A., Johnston, P. G., Magnusson, I., et al. (2002). Thymidylate Synthase Expression in Colorectal Cancer: A Prognostic and Predictive Marker of Benefit From Adjuvant Fluorouracil-Based Chemotherapy. *J Clin Oncol* , 20(7), 1721-1728.

- Ezzeldin, H., y Diasio, R. (2008). Predicting Fluorouracil Toxicity: Can We Finally Do It? *J Clin Oncol*, 26(13), 2080-2082.
- Flores-Angulo, C., Moreno, N., Martínez, J. A., Herrera, A., Mora, Y., Villegas, C., et al. (2013). Estandarización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de aspirado de médula ósea en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. LXIII Convención Anual AsoVac. *Acta Cien. Venez.*, 63(1), 21-22. Resumen.
- Fujishima, M., Inui, H., Hashimoto Y., Azumi, T., Yamamoto, N., Kato, H. et al. (2010). Relationship between Thymidylate Synthase (TYMS) Gene Polymorphism and TYMS Protein Levels in Patients with High-risk Breast Cancer. *Anticancer Res*, 30, 4373-4380.
- Gallegos-Arreola, M., Peralta-Leal, V., Morgan-Villela, G. y Puebla-Pérez, A. (2008). Frecuencia del polimorfismo TS 1494del6 en pacientes con cáncer colorrectal del Occidente de México. *Rev Invest Clin*, 60 (1), 21-30.
- Gao, C. M., Ding, J. H., Li, S. P., Liu, Y. T., Cao, H. X., Wu, J. Z., et al. (2012) Polymorphisms in the thymidylate synthase gene and risk of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(8), 4087-91.
- Gibson, T.B. (2006). Polymorphisms in the thymidylate synthase gene predict response to 5-fluorouracil therapy in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 5(5), 321-323.
- González-Haba, E., Martín, M., Sanjurjo, M., y López L. (2012). Toxicidad severa a capecitabina en un paciente portador de una mutación en el gen dihidropirimidin deshidrogenasa. *Farm Hosp*, 36(6), 554-555.
- Graziano, F., Kawakami, K., Watanabe, G., Ruzzo, A., Humar, B., Santini, D., et al. (2004). Association of thymidylate synthase polymorphisms with gastric cancer susceptibility. *Int J Cancer*, 112(6), 1010-1014.
- Gusella, M., Frigo, A., Bolzonella, C., Marinelli, R., Barile, C., Bononi, A., et al. (2009). Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer*, 100(10), 1549-1557.
- Hammad, H., Sarkar, M., Subbarayan, P. R., y Ardalan, B. (2012). Thymidylate Synthase 5' UTR Polymorphic Allele Distribution in South Florida Population. *J Cancer Ther*, 3(2), 173-176.
- Hernández, M., Monzón, A., Zabner-Oziel, P., Morales, M., y Guedez, N. (2007). Valor pronóstico y predictivo de la timidilato sintetasa (TS) en pacientes con cáncer de colon. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec*, 10(2), 55-64.

- Herrero, F., y Mulas, A. (2008). Cáncer y ejercicio. En López, J (Ed.), *Fisiología clínica del ejercicio* (pp. 343). Madrid, España: Panamericana.
- Hitre, E., Budai, B., Adleff, V., Czeglédi, F., Horváth, Z., Gyergyay, F., et al. (2005). Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenet. Genomics*, 15(10), 723-730.
- Hori, T., Takahashi, E., Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S., y Seno, T. (1990). Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Hum. Genet*, 85, 576-580.
- Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H., y Takeishi, K. (1995). Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct*, 20(3), 191-197.
- Horie, N., y Takeishi, K. (1997). Identification of functional elements in the promoter region of the human gene for thymidylate synthase and nuclear factors that regulate the expression of the gene. *J Biol Chem*, 272(29), 18375-18381.
- Hu, Q., Li, X., Su C., Chen, X., Gao, G., Zhang J., et al. (2012). Correlation between thymidylate synthase gene polymorphisms and efficacy of pemetrexed in advanced non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med*, 4, 1010-1016.
- Huang, Z., Hua, D., y Li, L. (2009). The polymorphisms of TS and MTHFR predict survival of gastric cancer patients treated with Xuorouracil-based adjuvant chemotherapy in Chinese population. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63, 911-918.
- Iacopetta, B., Grieu, F., Joseph, D., y Elsaleh, H. (2001). A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5- fluorouracil. *Br J Cancer*, 85, 827-830.
- IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp
- Iniesta, I., Guinó, E., y Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios Epidemiológicos. *Gac Sanit*, 19(4), 333-341.
- Inoue, S., Hashiguchi, M., Takagi, K., Kawai, S., y Mochizuki, M. (2009). Preliminary study to identify the predictive factors for the response to

methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Pharm. Soc. Jpn*, 129(7), 843-849.

Jakka, S., y Rossbach M. (2013). An economic perspective on personalized medicine. *Hugo J*, 7(1), 1-6.

Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K., Shimizut K., Gotoh, O., Seno, T., et al. (1990). Structural and functional Analysis of the Human Thymidylate Synthase Gene. *J. Biol. Chem*, 265(33), 20277-20284.

Kawakami, K., Graziano, F., Watanabe, G., Ruzzo, A., Santini, D., Catalano, V., et al. (2005). Prognostic role of thymidylate synthase polymorphisms in gastric cancer patients treated with surgery and adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 11, 3778-3783.

Kawakami, K., Ishida, Y., Danenberg K. D., Omura, K., Watanabe, G., y Danenberg P. V. (2002). Functional Polymorphism of the Thymidylate Synthase Gene in Colorectal Cancer Accompanied by Frequent Loss of Heterozygosity. *Jpn. J. Cancer Res*, 93, 1221–1229.

Kawakami, K., Salonga, D., y Park, J.M. (2001). Different length of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affects translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res*, 7, 4096– 4101.

Kawakami, K., y Watanabe, G. (2003). Identification and Functional Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Tandem Repeat Sequence of Thymidylate Synthase. Gene. *Cancer Res*, 63, 6004–6007.

Kirby, L. (1992). Specimens: DNA extracción Fingerprinting. New York: Freeman

Krajnovic, M., Costea, I., y Chiasson, S. (2002). Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 359, 1033–1034.

Lecomte, T., Ferraz, J., Zinzindohoué, F., Lorient, M., Tregouet, D., Landi, B., et al. (2004) Thymidylate Synthase Gene Polymorphism Predicts Toxicity in Colorectal Cancer Patients Receiving 5-fluorouracil-based Chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 10, 5880-5898.

Leichman, C., Lenz, H., Leichman, L., Danenberg, K., Baranda J., Groshen, S., et al. (1997) Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol*, 15(10), 3223-3229.

- Lenz, H. (2004). Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Ann Oncol*, *15*(4), 173–177.
- Lenz, H., Zhang, W., Zahedy, S., Gil, J., Yu, M., y Stoehlmacher, J. (2002). A 6 base-pair deletion in the 3'UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors. A possible candidate gene for colorectal cancer risk. *Proc Am Assoc Cancer Res*, *43*, 660.
- Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Groshen, S., Cohen H., et al. (1996). Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol*, *14*, 176–182.
- Li W., Jiang, H., Fang, X., Ye, H., Liu, M., y Liu, Y. (2013). Polymorphisms in thymidylate synthase and reduced folate carrier (SLC19A1) genes predict survival outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with pemetrexed-based chemotherapy. *Oncol Lett*, *5*, 1165-1170.
- Li, Q., Fang, X., Olave, I., Han, H., Yu, M., Xiang, P., et al. (2006). Transcriptional potential of the gamma-globin gene is dependent on the CACCC box in a developmental stage-specific manner. *Nucleic Acids Res*, *34*(14), 3909-3916.
- Lima, A., Azevedo, R., Sousa, H., Seabra, V. y Medeiros R (2013). Current approaches for TYMS polymorphisms and their importance in molecular epidemiology and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, *14*(11), 1337–1351.
- Lima, A., Seabra, V., Bernardes, M., Azevedo, R., Sousa, H., y Medeiros, R. (2014). Role of Key TYMS Polymorphisms on Methotrexate Therapeutic Outcome in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients. *Plos One*, *9*(10), 1-10.
- Locker, G., Hamilton, S., Harris, J., Jessup, J., Kemeny, N., Macdonal, J., et al. (2006). ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol*, *24*, 5313-532.
- Loganayagam, A., Arenas, M., Corrigan, A., Fairbanks, L., Lewis, C., Harper, P., et al. (2013). Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br. J. Cancer*, *108*, 2505–2515.
- Longley, D., Harkin, D., y Johnston, P. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, *3*, 330-338

- López, M., Criado, M., Herrera, B., y López, M. (2008). Toxicidad grave por 5-fluorouracilo asociada a deficiencia de dihidropirimidina deshidrogenasa. *Farm Hosp*, 32(1), 53-61.
- Luo, H.R., Lu, X.M., Yao, Y.G., Horie, N., Takeishi, K., Jorde, L.B., et al (2002). Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in Chinese populations and evolution of the novel alleles. *Biochem Genet*, 40, 41–51.
- Lurje, G., Manegold, P., Ning, Y., Pohl, A., Zhang, W., y Lenz, H. (2009) Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther*, 8(5), 1000-1007.
- Mandola, M. V., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Yu, M.C., Iqbal, S., et al. (2004). A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*, 14(5), 319-327.
- Mandola, M., Stoehlmacher, V., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M., Lenz, H., et al. (2003). A Novel Single Nucleotide Polymorphism within the 5' Tandem Repeat Polymorphism of the Thymidylate Synthase Gene Abolishes USF-1 Binding and Alters Transcriptional Activity. *Cancer Res*, 63, 2898–2904.
- Marsh, S. (2005). Thymidylate synthase pharmacogenetics. *Invest New Drugs*, 23, 533-37.
- Marsh, S. (2007). Pharmacogenomics. *Ann. Oncol*, 18(9), 24-28.
- Marsh, S., Ameyaw, M., Githang, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D. y McLeod, H. (2000) Novel Thymidylate Synthase Enhancer Region Alleles in African Populations. *Hum Mutat*, 376, 1-6.
- Marsh, S., Collie-Duguid, E.S., Li, T., Liu, X., y McLeod, H.L. (1999). Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics*, 58, 310-312 .
- Marsh, S., McKay, J., Cassidy, J., y McLeod, H. (2001). Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 19, 383–386.
- Mathews, C. K., y Van Holde, K. E. (2002). *Bioquímica*. Madrid, España: Pearson Addison.
- Menoyo, A., Marcuello, E., Altes, A., Del Rio, E., Cesar, A., y Baiget, M. (2005). A Single Nucleotide Polymorphism on the 5'-Tandem Repeat Sequences of

Thymidylate Synthase Gene Predicts for Response to Fluorouracil Based Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer Patients. 1er Congreso Nacional sobre farmacogenética y farmacogenómica. Valencia-España. Abstract no. 21.

- Meza, C., Pérez, M., Fuentes M., Cabello, A., Rodríguez, J., Colón, V., et al. (2011). Tratamiento adyuvante en cáncer de colon. Nuestra experiencia. *Rev Venez Oncol*, 23(2), 66-75.
- Miller, S., Dykes, D., y Polesky, Y. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Ac Res*, 16, 1215.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2011). Anuario de mortalidad 2011. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela No.40.287; 2013. Recuperado en 10 de febrero de 2014, de: <http://www.mpps.gob.ve>
- Moertel, C., Fleming, T., Macdonald, J., Haller, D., Laurie, J., Tangen, C., et al. (1995). Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol*, 13(12), 2936-2943.
- Morán, D., Jiménez, Silvia., y Domínguez-Gil, A. (2008). Farmacogenética en oncología. *Med Clin (Barc)*, 131(5), 184-95
- Nalejska, E., Maczynska, E., y Lewandowska, M. (2014). Prognostic and Predictive Biomarkers: Tools in Personalized Oncology. *Mol Diagn Ther*, 18, 273-284.
- Nazki, F., Masood, A., Banday, M., Bhat, A., y Ganai, B. (2012). Thymidylate synthase enhancer region polymorphism not related to susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in the Kashmir population. *Genet Mol Res*, 11 (2), 906-917.
- Nishino, S., Itoh, A., Matsuoka, H., Maeda, K., y Kamoshida, S. (2013). Immunohistochemical analysis of organic anion transporter 2 and reduced folate carrier 1 in colorectal cancer: Significance as a predictor of response to oral uracil/ftorafur plus leucovorin chemotherapy. *Mol Clin Oncol*, 1(4), 661-667.
- Oriola, J., Costa, D., y Oliva, R. (2004). Cáncer. En R. Oliva, F. Ballesta, J. Oriola, y J. Claria (Ed.). *Genética Médica* (pp 217-218). España: Edicions Universitat Barcelona.
- Patiño-García, A., Zalacaín, M., Marrodán, L., San-Julián, M., y Sierrasesúmaga, L. (2009). Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in

- relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression. *J Pediatr*, 154(5), 688-693.
- Pestalozzi, B.C., Peterson, H.F., Gelber, R.D., Goldhirsch, A., Gusterson, B.A., Trihia, H., et al. (1997). Prognostic importance of thymidylate synthase expression in early breast cancer. *J Clin Oncol*, 15, 1923–1931.
- Pullmann, R., Abdelmohsen, K., Lal, A., Martindale, J., Ladner, R., y Gorospe, M. (2006). Differential stability of Thymidylate Synthase 3'-Untranslated region polymorphic variants regulated by AUF1*. *J Biol Chem*, 281(33), 23456-23463.
- Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Carreira-García, V., y Blanco, F. (2009). Polimorfismos genéticos y farmacogenética en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin*, 5(6), 268–279.
- Rendón-Macías, M., Reyes-Zepeda, N, Villasís-Keever, M., Serrano, J., y Escamilla, A. (2012). Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda: Revisión de las últimas cuatro décadas. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 69(3), 153-163.
- Rodríguez-Larralde, A., Castro De Guerra, D., González-Coira, M.Y., y Morales, J. (2001). Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos RH y ABO. *Interciencia*, 26(1), 8-12.
- Ross, J., Torres-Mora, J., Wagle, N., Jennings, T., y Jones. D. (2010). Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer: current perspective. *Am J Clin Pathol*, 134(3), 478-90.
- Ruiz-Arguelles, G., y Ruiz-Delgado, J. (2009). Leucemias agudas. En G. Ruiz-Arguelles (Ed.). *Fundamentos De Hematología* (pp. 143-158). Mexico: Panamericana.
- Santini, D., Vincenzi, B., Perrone, G., Rabitti, C., Borzomati, D., Caricato, M., et al. (2004). Thymidylate synthase expression in normal colonic mucosa: a predictive marker of toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Oncology*, 67(2), 135-142.
- Schilsky, R. (1998). Biochemical and Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Oncology*, 12(10), 1-8.
- Schwab, M., Zanger, U., Marx, C., Schaeffeler, E., Klein, K., Dippon, J., et al. (2008). German 5-FU Toxicity Study Group. Role of genetic and nongenetic

- factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol*, 26(13), 2131-2138.
- Shi, Q., Zhang, Z., Neumann, A., Li, G., Spitz, M., y Wei, Q. (2005). Case-control analysis of thymidylate synthase polymorphism and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 649-656.
- Takehara, A., Kawakami, K., Ohta, N., Oyama, N., Ota, Y., Oda, M., et al. (2005). Prognostic Significance of the Polymorphisms in Thymidylate Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Lung Cancer. *Anticancer Res*, 25, 4455-4462.
- Thomas, F., Hoskins, J. M., Dvorak, A., Tan, B. R. y McLeod, H. L. (2010). Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of TYMS using gel-based capillary electrophoresis. *Pharmacogenomics*, 11(12), 1751-1756.
- Tian, H., y Cronstein, BN. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65(3), 168-173.
- Tirelli, U., Berretta, M., Bearz, A., y Carbone, A. (2011) Grouping of molecularly targeted anti-cancer agents based on cost-effectiveness analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15, 1355-1356.
- Uchida, K., Hayashi, K., Kawakami, K., Schneider, S., Yochim, J. M., Kuramochi, H., et al. (2004). Loss of heterozygosity at the thymidylate synthase (TS) locus on chromosome 18 affects tumor response and survival in individuals heterozygous for a 28-bp polymorphism in the TS gene. *Clin Cancer Res*, 10(2), 433-439.
- Ulrich, C., Bigler, J., Velicer, C. M., Greene, E. A., Farin, F. M., y Potter, J. D. (2000). Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery and Confirmation of a Common Polymorphism in the Thymidylate Synthase Gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9, 1381-1385.
- Vera-Gimon, R., Sucre-Márquez, C., Arbona, E., Gutiérrez, M., Vivas, L., Vera-Vera, R., et al. (2003). Tratamiento preservador del cáncer invasivo de vejiga con quimioterapia y radioterapia. *Rev Venez Oncol*, 15(4), 203-214.
- Villafranca, E., Okruzhnov, Y., Dominguez, M.A., García-Foncillas, J., Azinovic, I., Martínez, E., et al. (2001). Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict

downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol*, 19(6), 1779-1786.

Voet, D., y Voet, J.G. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., et al. (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244, 207-211.

Weng, Y., Zhang, J., Tang, X., Xie, X., y Chen, G. (2012) Thymidylate synthase polymorphisms and hematological cancer risk: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*, 53(7), 1345-51.

Yang, Z., Liu, H., y Zhang X. (2012). 2R of Thymidylate Synthase 5'-untranslated Enhanced Region Contributes to Gastric Cancer Risk: a Meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13, 1923-1927.

Zhai, X., Gao, J., Hu, Z., Tang, J., Qin, J., Wang, S., et al. (2006). Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast cancer in a Chinese population: a case-control analysis. *BMC Cancer*, 6, 138.

Zhang, J., Cui, Y., Kuang, G., Li, Y., Wang, N., Wang, R., et al. (2004). Association of the thymidylate synthase polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 25(12), 2479-2485.

Zinzindohoue, F., Ferraz, J. M. y Laurent-Puig, P. (2001). Thymidylate synthase promoter polymorphism. *J Clin Oncol*, 19, 3442.