



Universidad
de La Laguna

**Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular
y Genética**



**Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA**

Desarrollo de un ensayo de genotipado para un SNP que afecta al gen que codifica el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) humano.

Development of a genotype assay for a SNP that affect the gene encoding the human vascular endothelial grown factor A (VEGF-A).

Trabajo de Fin de Grado

Alejandro Mendoza Álvarez

Grado en Biología. Universidad de La Laguna

Julio, 2016.

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

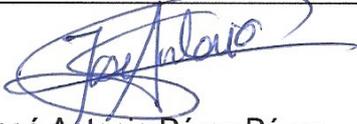
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78764549Z	ALEJANDRO MENDOZA ALVAREZ
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
619758283	alu0100777192@ull.edu.es

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

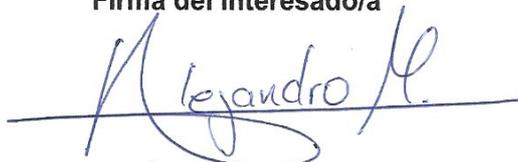
Desarrollo de un ensayo de genotipado para un SNP que afecta al gen que codifica el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) humano

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. JOSE ANTONIO PEREZ PEREZ	
Profesor/a del DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA	
y Dña. Ruth Ramos Díaz	
TÉCNICA INVESTIGADORA DEL SERVICIO DE FARMACIA DEL HUC, FUNCANIS	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: José Antonio Pérez Pérez	 Fdo.: Ruth Ramos Díaz

La Laguna, a 17 de JUNIO de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Abreviaturas

- ADNg: ADN genómico.
- ARNm: ARN mensajero.
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.
- kb: kilobases
- mM: milimolar.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- pb: pares de bases.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- RFLP: polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción.
- SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.

Índice

Introducción	1
Concepto de angiogénesis y relevancia en el contexto de cáncer	1
El gen <i>VEGFA</i>	1
Las proteínas VEGF-A y el receptor VEGFR-2.....	2
Terapia antiangiogénica: Bevacizumab (Avastin®; Genentech Inc.)	3
Objetivos	4
Materiales y métodos	5
Extracción de ADN genómico (ADNg)	5
Conservación de los extractos de ADNg.....	6
Diseño de cebadores de amplificación	6
PCR convencional	6
Preparación de amplicones para secuenciación.....	8
Genotipado mediante análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) acoplada a PCR mutagénica	8
Resultados y discusión	11
Determinación del genotipo de un conjunto de muestras mediante secuenciación.....	11
Puesta a punto del ensayo de genotipado mediante RFLP acoplado a PCR mutagénica.....	12
Comprobación de la fiabilidad del nuevo método de genotipado mediante un ensayo ciego.....	13
Conclusions.....	15
Bibliografía	16

Resumen

Actualmente, la farmacogenética es la herramienta preventiva más importante al aplicar la quimioterapia a pacientes con cáncer. Una gran parte de los pacientes sufren intoxicaciones debido a dosis incorrectas o incluso, a los fármacos incorrectos. Por ello, la farmacogenética es un área que se está desarrollando para resolver estos problemas sanitarios. En nuestro país no tenemos una ley que obligue a genotipar a los pacientes antes de aplicar cualquier tratamiento farmacológico, pero cada vez más agencias reguladoras recomiendan genotipar algunos lugares del genoma de los pacientes para regular las dosis y prevenir así intoxicaciones. Esta práctica clínica minimiza los costes de hospitalización de los pacientes. El objetivo del presente TFG fue desarrollar y optimizar un método de genotipado para uno de los SNP del gen *VEGFA* que codifica el factor A de crecimiento endotelial vascular, una proteína que promueve la angiogénesis y que, por tanto, favorece el desarrollo de los tumores. El método de genotipado propuesto es una técnica de bajo coste que puede ser aplicada en hospitales con pocos recursos. Además, es un método rápido porque el periodo entre la extracción de sangre periférica y la obtención de los resultados es solamente de 6 horas.

Palabras clave: farmacogenética, genotipado, PCR, RFLP, SNP, *VEGFA*.

Abstract.

Nowadays, pharmacogenetics is the most preventive tool to apply chemotherapy for cancer treatment. The majority of the patients suffer intoxications due to the wrong doses or even, for the wrong drugs. For that, pharmacogenetics is an area that is developing for solve these health problems. In our country we haven't a law to genotype the patients before applicate any treatment, but an increased number of regulatory agencies recommend to genotype some place of the genome of the patients in order to regulate the doses and prevent intoxications. This clinical practise minimises the hospitalization costs of patients. The aim of the present TFG was to develop and optimize a genotyping method for one SNP in the *VEGFA* gene that encodes the vascular endothelial grown factor A, a protein that promotes the angiogenesis and therefore, stimulates the development of tumours. The proposed genotyping method is fast because the time between the extraction of peripheral blood and results recovery is only 6 hours.

Key words: genotyping, PCR, pharmacogenetics, RFLP, SNP, *VEGFA*.

Introducción

Concepto de angiogénesis y relevancia en el contexto de cáncer

La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) es un proceso esencial para el desarrollo embriológico, el crecimiento normal y la reparación tisular. La angiogénesis es regulada con precisión a nivel molecular, sin embargo, este proceso se desregula en ciertas condiciones patológicas como el cáncer (Rapisarda and Melillo, 2012), jugando un papel vital en el crecimiento de diferentes tumores sólidos debido a que la vascularización favorece el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor. El factor A de crecimiento endotelial vascular, codificado por el gen *VEGFA*, es uno de los mediadores proangiogénicos más importantes. Este factor induce la proliferación y la migración de células endoteliales, con el fin de generar nuevos vasos sanguíneos, remodelar la matriz extracelular y aumentar la permeabilidad de los vasos sanguíneos previamente formados (Olsson et al., 2006).

El gen *VEGFA*

El gen *VEGFA* está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p12). Su longitud es de 14 kilobases (kb) y está organizado en 8 exones y 7 intrones. En la bibliografía han sido descritos al menos 30 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para este gen, de los cuales 4 están localizados en la región promotora del gen. El SNP objeto de estudio en el presente trabajo (ID: rs1570360) se localiza 1154 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de transcripción. Dicho SNP consiste en la variante salvaje G y la variante mutante A. En poblaciones caucásicas el alelo mutante puede alcanzar frecuencias del 32% (NCBI). Este alelo está asociado con un incremento de la expresión del gen *VEGFA*, y ha sido relacionada con el desarrollo de numerosos tipos de cánceres como el carcinoma hepatocelular (Wu et al., 2013), cáncer de mama (Jacobs et al., 2006), cáncer colorrectal (Zhou et al., 2011), cáncer de vejiga (Yang et al., 2014) y otras patologías como la artritis reumatoide (Rueda et al., 2005; Wei et al., 2015) o la varicosis (Flórez et al., 2013).



Figura 1. Localización de los distintos SNPs descritos en la literatura para el gen *VEGFA*. Los exones están representados como cajas, donde las zonas blancas representan las UTRs y los intrones como líneas horizontales. Señalado en rojo está el SNP en estudio. Tomado de (Wu et al., 2013).

El perfil genético de cada paciente individual juega un papel radicalmente importante para determinar el tratamiento a seguir. Determinados biomarcadores relacionados con *VEGFA* son predictivos de la respuesta a las terapias antiangiogénicas y están siendo evaluados, incluyendo polimorfismos en el gen *VEGFA* o la expresión de su receptor.

Las proteínas VEGF-A y el receptor VEGFR-2.

La expresión del gen *VEGFA* da lugar, mediante procesamiento alternativo de exones, a un conjunto de glicoproteínas homodiméricas (Figura 2). Dependiendo del subconjunto de exones que permanecen en el ARNm maduro se generarán factores proangiogénicos o antiangiogénicos. Las proteínas proangiogénicas se unen a sus receptores en células endoteliales y se activa una cascada de señalización intracelular que afecta a diferentes procesos celulares como proliferación celular, migración, supervivencia y aumento de la permeabilidad. De los tres receptores descritos para VEGF-A, el principal en células endoteliales es VEGFR-2.

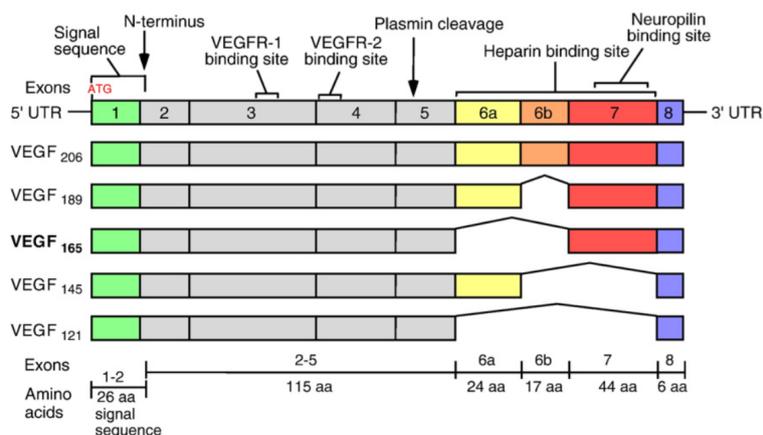


Figura 2. Distintas variantes de ARNm del gen *VEGFA* obtenidas mediante procesamiento alternativo de exones. En la parte superior se muestran los 8 exones que componen el gen *VEGFA* y los lugares que codifican los sitios de unión a los receptores. Tomado de Holmes et al., 2007.

La producción de factores proangiogénicos puede ser inducida en células que no reciben suficiente oxígeno mediante el factor inducido por hipoxia (HIF), el cual se une al elemento de respuesta de hipoxia (HRE) asociado al gen *VEGFA*, aumentando la transcripción del mismo (Figura 3).

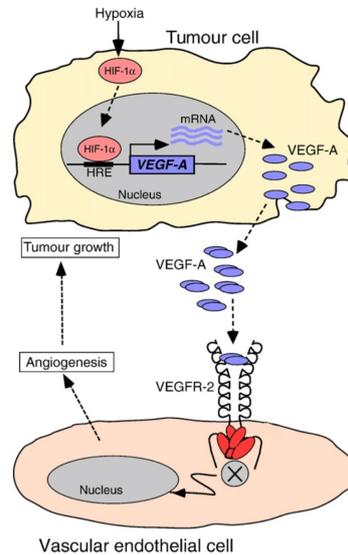


Figura 3. Inducción de la angiogénesis por una célula tumoral. Bajo el estímulo del factor inducible por hipoxia (HIF) la célula tumoral sintetiza y secreta la proteína VEGF-A, la cual interactúa con el receptor VEGFR-2 de una célula endotelial vascular próxima. Modificado de Holmes et al., 2007

Terapia antiangiogénica: Bevacizumab (Avastin®; Genentech Inc.)

Una de las primeras estrategias para inhibir la angiogénesis y por consiguiente el desarrollo tumoral, fue el empleo del fármaco Bevacizumab, el cual consiste en un anticuerpo monoclonal que bloquea a VEGF-A (Lambrechts et al., 2013). Este fármaco ha sido el primer tratamiento antiangiogénico en ser aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la terapia contra el cáncer, en combinación con quimioterapia (Ferrara et al., 2003). La eficacia del Bevacizumab dependerá del nivel de expresión de su diana (Koutras et al., 2011) y, por lo tanto, el SNP objeto de estudio en el presente trabajo debería ser analizado en el contexto farmacogenético para establecer la dosis óptima de este fármaco para cada paciente.

Objetivos

El SNP rs1570360 se localiza en una región de alto contenido en guanina y citosina que dificulta el empleo de métodos de genotipado homogéneos basados en el uso de sondas fluorescentes o en el análisis de fusión del amplicón. En el presente TFG se propone desarrollar y optimizar un método de genotipado no homogéneo para dicho SNP empleando PCR mutagénica y digestión con una endonucleasa de restricción. El método propuesto constituye una alternativa económica que no requiere plataformas ni reactivos de alto coste.

Materiales y métodos

Extracción de ADN genómico (ADNg)

El ADNg fue extraído a partir de muestras de sangre periférica tomadas de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC). Estas muestras fueron depositadas en tarjetas de papel (Whatman™ 903). El protocolo de extracción (Ramos-Díaz et al., 2015) comienza con el corte de un disco de papel de 3mm de diámetro asegurando que esté impregnado con sangre del paciente por sus dos caras. Esto se realizó con un sacabocados (Figura 4a) que fue limpiado con alcohol al 96% entre dos muestras consecutivas. Los discos fueron depositados individualmente en tubos de 0,5 ml previamente rotulados con el número identificativo de cada paciente (Figura 4b).



Figura 4. Toma de muestras de sangre seca en papel con un sacabocados.

A cada tubo se le añadió 20 μ l de NaOH 0,2 M y se incubó en un bloque térmico a 75°C durante 5 minutos. A continuación, se le añadió 180 μ l de Tris-HCl 40 mM, EDTA 0,55 mM a pH 8,0. Este paso se realiza para disminuir el pH altamente básico producido por el NaOH, y añadir al extracto un agente quelante de magnesio que proteja al ADN de la degradación por desoxirribonucleasas. Seguidamente, se agitan los tubos para asegurar la mezcla de los reactivos y se centrifugan a 18000g durante 10 minutos, con lo cual se consigue que el disco de papel y los restos celulares acaben en el fondo del tubo y deje por encima la solución con el ADNg. De esta solución se retiraron 170 μ l con precaución de no tomar el sedimento y se transfirieron a un tubo limpio de 0,5 ml.

Conservación de los extractos de ADNg

Los extractos, en caso de no ser analizados inmediatamente, pueden ser congelados a -20°C durante varios años sin la necesidad de tomar medidas adicionales. Sin embargo, el hecho de congelar y descongelar repetidamente los extractos termina por inutilizarlos para el análisis genético, por lo que es recomendable hacer alícuotas del ADNg extraído.

Diseño de cebadores de amplificación

Los cebadores se diseñaron con el programa Gene Runner v5.1. Aparte de las recomendaciones habituales para este diseño, los cebadores elegidos tienen una elevada temperatura de anillado (T_m aprox. 88°C) para competir eficientemente con la reasociación de las cadenas del amplicón durante la etapa del anillado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se debe recordar que la región de interés tiene un alto contenido en guanina/citosina y, por tanto, la unión de las dos cadenas del amplicón es muy estable. Esto es debido a que dichas bases nitrogenadas se unen por tres puentes de hidrógeno, mientras que la adenina y timina lo hacen con dos.

PCR convencional

El objetivo de estas amplificaciones fue obtener amplicones que permitieran secuenciar la región de interés. En estas PCR se empleó como cebador directo el oligonucleótido GCCCTGGGCTCTCTGTACATGAAGCAACTCCAGTC y como cebador reverso GGGGCGGGGACAGGCGAGCCTCAG. El amplicón resultante tiene un tamaño de 641 pb (Figura 5).

```
GCCCTGGGCTCTCTGTACATGAAGCAACTCCAGTCCCAAATATGTAGCTGTTTGGGAGGTCAGAAATAGGGGGTGC
CAGGAGCAAACCTCCCCCACCCCTTTCCAAAGCCCATTCCCTCTTTAGCCAGAGCCGGGGTGTGCAGACGGCAG
TCACTAGGGGGCGCTCGGCCACCACAGGGAAGCTGGGTGAATGGAGCGAGCAGCGTCTTCGAGAGTGAGGACGTG
TGTGTCTGTGTGGGTGAGTGAGTGTGTGCGTGTGGGGTTGAGGGCGTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGGGGTCACT
CCAGGATTCCAATAGATCTGTGTGTCCCTCTCCCCACCCGTCCCTGTCCGGCTCTCCGCCCTTCCCCTGCCCCCTT
CAATATTCTAGCAAAGAGGGAACGGCTCTCAGGCCCTGTCCGCACGTAACCTCACTTTTCTGCTCCCTCCTCGC
CAATGCCCCGCGGGCGCGTGTCTCTGGACAGAGTTTCCGGGGCGGATGGGTAATTTTCAGGCTGTGAACCTTGG
TGGGGTTCGAGCTTCCCCTTCATTGCGGGCGGGCTGCGGGCCAGGCTTCACTGAGCGTCCGAGAGCCCGGGCCCC
AGCCGCGTGTGGAGGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCCCC.
```

Figura 5. Amplicón utilizado para secuenciar el locus de interés. Se resalta en rojo la posición del SNP objeto de estudio con la variante salvaje (G) y se indica en negrita los cebadores de amplificación.

Las PCRs se realizaron en tubos de 0,2 ml y con un volumen final de reacción de 20 μ l. A cada tubo se le añadió 2 μ l de extracto de ADNg, o de agua en el caso del control negativo, y 18 μ l de la mezcla maestra de reacción, cuya receta por reacción se indica a continuación:

- Tampón de reacción 5X (4 μ l)
- dNTPs 2 mM (2 μ l)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (1 μ l)
- Cebador directo 5 μ M (2 μ l)
- Cebador reverso 5 μ M (2 μ l)
- Agua (6,8 μ l)
- ADN polimerasa termoestable (0,2 μ l)

A la reacción de amplificación se le añadió DMSO a una concentración final del 5% para debilitar el emparejamiento entre bases y facilitar así la amplificación de una región rica en guanina y citosina. Con la intención de minimizar la formación de dímeros de cebador o de productos de amplificación inespecíficos, la mezcla maestra se mantuvo en frío y se le añadió la ADN polimerasa cuando todo lo demás estaba preparado, incluyendo el precalentamiento del termociclador. La enzima empleada (*Phire Hot Start II DNA Polymerase; Finnzymes*) permite el inicio de la reacción en caliente (*Hot Start*) gracias a una proteína que bloquea el sitio activo de la polimerasa, lo cual previene uniones inespecíficas de los cebadores.

El perfil térmico al que se sometieron estas PCR, que incluye una etapa de anillado a alta temperatura, fue el siguiente:

1. 98°C 30 segundos
 2. 98°C 10 segundos
 3. 80°C 10 segundos
 4. 72°C 15 segundos
 5. 72°C 2 minutos
- } 40 ciclos

La especificidad y el rendimiento de estas amplificaciones se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE al 1X. Para ello, se tomaron 5 μ l de amplificado, se le añadieron 1 μ l de tampón de carga 6X y las electroforesis se detuvieron cuando el frente de bromofenol (azul) estuvo a punto de abandonar el gel. Los resultados de la

electroforesis fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta (254 nm). Una vez observado el tamaño de amplicón esperado, se dio el visto bueno a aquellas amplificaciones con un rendimiento igual o superior a 3 ng/μl, lo cual fue estimado por comparación con el marcador de peso molecular (*DNA Ladder 100 bp; AppliChem*).

Preparación de amplicones para secuenciación

Para poder secuenciar el amplicón de 641 pb descrito en el apartado anterior, a 5 μl de las PCRs correspondientes se le añadieron 1 μl del preparado comercial *ExoProStar* (*Amershan, GE Healthcare*) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Este tratamiento incluye la acción de una exonucleasa que degrada los cebadores no utilizados por la ADN polimerasa durante la PCR y una fosfatasa alcalina que desfosforila los nucleótidos libres. Las enzimas añadidas fueron inactivadas calentando a 80°C durante 15 minutos. Los amplicones tratados de esta manera fueron secuenciados por un servicio externo empleando el siguiente cebador: TCCAGGATTCCAATAGATC.

Los electroforegramas fueron analizados con el programa informático MEGA v6.06 (OSX v10.11.13), anotándose los genotipos correspondientes a la posición de interés para cada una de las muestras secuenciadas.

Genotipado mediante análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) acoplada a PCR mutagénica

Esta técnica consiste en la introducción, a través del cebador, de una mutación en el amplicón (PCR mutagénica), que en combinación con una de las variantes del SNP que se quiere genotipar genera una diana para una endonucleasa de restricción. En el sistema puesto a punto en este trabajo, la mutación introducida es la sustitución de una G por una C (figura 4), que en combinación con la variante A del SNP crea una diana de restricción (AGG↓CCT) para la restrictasa *StuI* (*Streptomyces tubercidicces*).

Para aplicar esta técnica de genotipado se empleó el cebador directo GCGGGCGCGTGTCTCTGGACAGAGTTTC (T_m 86.6°C) y el cebador reverso (mutagénico) GGCGGGGACAGGCGAGCCTCAGGC (T_m 88,1°C). El amplicón resultante

contiene 180 pb (Figura 6). Si el amplicón es cortado por *StuI*, se obtienen dos fragmentos de restricción de 157 pb y 23 pb. De esta manera, se esperaría observar un solo fragmento de 180 pb con los individuos homocigóticos GG, un solo fragmento de 157 pb con los individuos homocigóticos AA (el fragmento de 23 pb difícilmente se observaría) o ambos fragmentos en el caso de los individuos heterocigóticos GA.

CGGGGCGCGTGTCTCTGGACAGAGTTTCCGGGGGCGGATGGGTAATTTTCAGGCTGTGAACCTTGGTGGGGGTCCG
 AGCTTCCCCTTCATTGCGGGCGGGCTGCGGGCCAGGCTTCACTGAGCGTCCGCAGAGCCCGGGCCCGAGCCGCGTG
 TGGAR**GG**↓**CCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCC**

Figura 6. Amplicón obtenido mediante PCR mutagénica. Se señala en negrita el lugar de unión de los cebadores. En verde se indica la mutación introducida por el cebador reverso y en rojo la posición del SNP que se desea genotipar. R = G o A. La flecha indica el lugar de corte de *StuI*.

Las reacciones de amplificación, con un volumen final de 20 µl en tubos de 0,2 ml, incluyeron 2 µl de extracto de ADNg, o de agua en el caso del control negativo, y 18 µl de la mezcla maestra de reacción, cuya receta por reacción se indica a continuación:

- Tampón 5X (4 µl)
- dNTPs 2 mM (2 µl)
- Cebador directo 5 µM (2 µl)
- Cebador reverso 5 µM (2 µl)
- Agua (7,8 µl)
- *Phire* ADN polimerasa (0,2 µl)

El perfil térmico empleado en este ensayo, que se detalla más abajo, difiere del perfil térmico utilizado para la PCR convencional en una menor temperatura de anillado. Esto es debido a que el cebador mutagénico no empareja completamente con el ADNg y que el emparejamiento incorrecto se localiza próximo al extremo 3' del cebador.

1. 98°C 30 segundos
 2. 98°C 10 segundos
 3. 70°C 10 segundos
 4. 72°C 15 segundos
 5. 72°C 2 minutos
- } 40 ciclos

Una vez realizada la amplificación, ésta se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% con tampón TBE 1X. Para ello, a 5 µl de producto de PCR se le añadió 1 µl de un tampón de carga comercial que incluye un agente fluorescente que tiñe el ADN (*DNA-Dye NonTox; AppliChem*). La electroforesis se permitió correr hasta que el frente de bromofenol (azul) estuvo a punto de abandonar el gel. El resultado de la electroforesis se visualizó exponiendo el gel a luz ultravioleta (254 nm). Solo en caso de que el rendimiento de la amplificación fuese alto (al menos 10 ng/µl) se continuó con el protocolo de genotipado.

Puesto que el tampón de amplificación es incompatible con la restrictasa elegida se tomó un pequeño volumen de la PCR mutagénica para preparar las reacciones de digestión. Concretamente, 2 µl de amplificado se mezclaron con 8 µl de la mezcla maestra de digestión, cuya composición se detalla a continuación:

- Tampón 10X (1 µl)
- Agua (6,9 µl)
- *StuI* 10 U/µl (0,1 µl; *Takara-Clontech*)

Es importante que los componentes sean añadidos en el orden indicado para evitar la inactivación de la enzima. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 1 hora, en un termociclador con la tapa calefactora a 105°C para evitar la evaporación del agua de la reacción.

Finalmente, los resultados de la digestión fueron analizados mediante electroforesis siguiendo las mismas condiciones descritas más arriba en la comprobación del rendimiento, pero añadiendo 2 µl de tampón de carga a los 10 µl de la reacción de digestión y utilizando un marcador de peso molecular más adecuado (*DNA Ladder 50 bp; AppliChem*).

Resultados y discusión

Determinación del genotipo de un conjunto de muestras mediante secuenciación

Con el objeto de obtener estándares de genotipo (homocigóticos GG o AA, y heterocigóticos GA) y también un conjunto de muestras de genotipo conocido para comprobar la fiabilidad del método desarrollado en el presente trabajo, se procedió a la secuenciación del locus de interés en 42 muestras de pacientes con carcinoma hepatocelular. En la figura 7 se muestran los resultados de la amplificación del locus de interés en un conjunto de 21 muestras. Como resultado del análisis de secuenciación se detectaron 19 individuos homocigóticos GG, 3 individuos homocigóticos AA y 20 individuos GA. En la figura 8 se muestran electroforegramas de secuenciación representativos de cada uno de los genotipos.

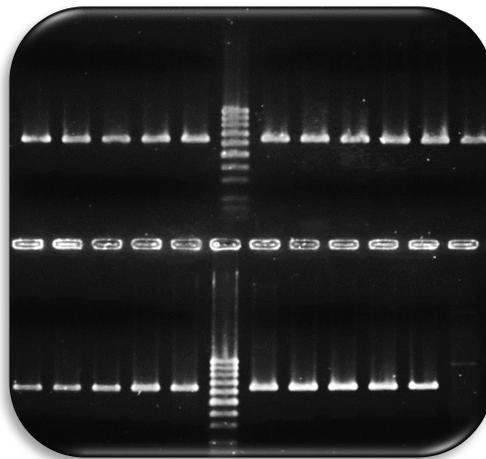


Figura 7. Electroforesis de amplicones de 641 pb obtenidos mediante PCR convencional. El carril sin bandas corresponde al control negativo.

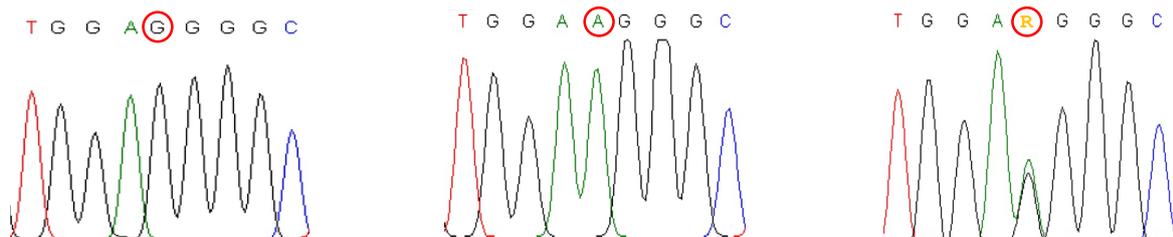


Figura 8. Electroforegrama de secuenciación del SNP rs1570360. De izquierda a derecha, genotipo homocigótico GG, homocigótico AA y heterocigótico GA.

Puesta a punto del ensayo de genotipado mediante RFLP acoplado a PCR mutagénica

De entre las 42 muestras genotipadas mediante secuenciación, se seleccionó un representante de cada genotipo para ser utilizadas como estándares durante la optimización del nuevo método de genotipado. Tal como se muestra en la figura 9a, la PCR mutagénica con las muestras estándares dio lugar al amplicón con el tamaño esperado (180 pb) y un rendimiento adecuado. De esta manera, tomando 2 μ l del amplificado se asegura una visualización correcta de los fragmentos de restricción en la segunda etapa del protocolo de genotipado.

El resultado final, que se muestra en la figura 9b, coincide con el obtenido mediante secuenciación. Es llamativo el hecho de que en el patrón de fragmentos de restricción observado en el individuo heterocigótico la banda correspondiente a la variante mutante (157 pb) fue unas 3-4 veces menos intensa que la banda procedente del alelo salvaje (180 pb), cuando lo que se espera son cantidades equimoleculares de las mismas. Teniendo en cuenta que con el individuo homocigótico AA se observa una única banda de gran intensidad correspondiente al amplicón digerido (figura 9b), se concluye que la mezcla maestra de digestión fue correctamente preparada y, por tanto, la diferente intensidad de las bandas observadas en el heterocigótico no puede ser explicada por una digestión parcial sino más bien por una amplificación diferencial de los alelos.

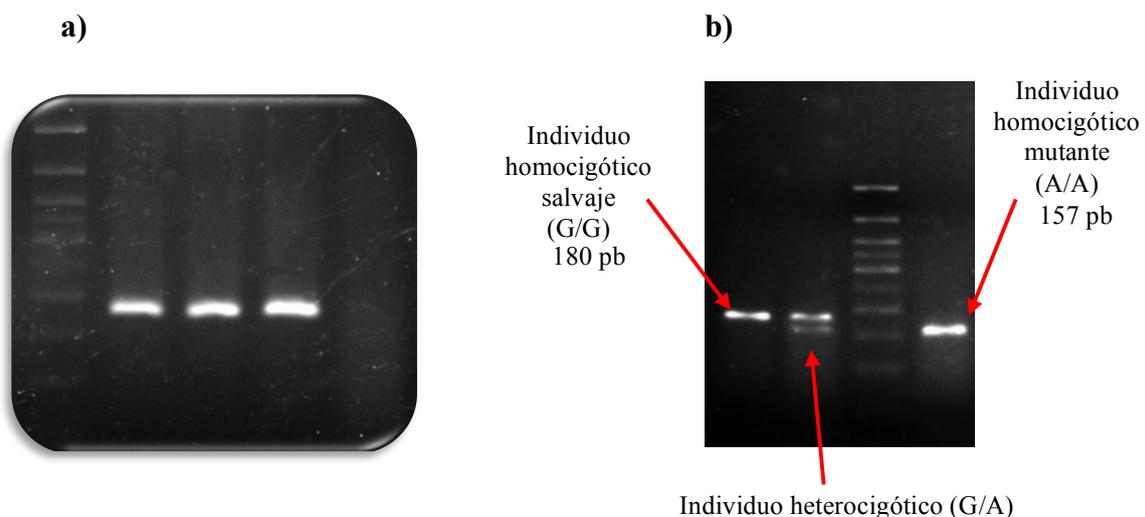


Figura 9. a) Verificación de rendimiento de la PCR mutagénica de las muestras estándar previa a la digestión con la restrictasa. De izquierda a derecha homocigótico GG, heterocigótico GA y homocigótico AA. El carril sin bandas corresponde al control negativo. **b)** Resultado del análisis de RFLP.

Comprobación de la fiabilidad del nuevo método de genotipado mediante un ensayo ciego

La robustez del ensayo de genotipado basado en el análisis de RFLP se puso a prueba asignando números aleatorios a las 42 muestras que habían sido previamente caracterizadas mediante secuenciación. Este conjunto de muestras fue entregada al autor del presente TFG, sin ser informado del genotipo de las mismas, para ser procesadas con el nuevo método. En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo ciego de validación. El éxito en esta determinación de genotipos fue del 97,6%, es decir, 41 aciertos en la asignación de genotipos de un total de 42 muestras. La discrepancia respecto a los datos de secuenciación con una de las muestras fue debido a una señal muy débil que impidió observar adecuadamente la banda correspondiente al alelo mutante, el cual había sido amplificado en menor magnitud tal como había ocurrido en el ensayo de optimización previo. Cuando se repitió el ensayo completo únicamente con la muestra afectada se obtuvo el resultado esperado.

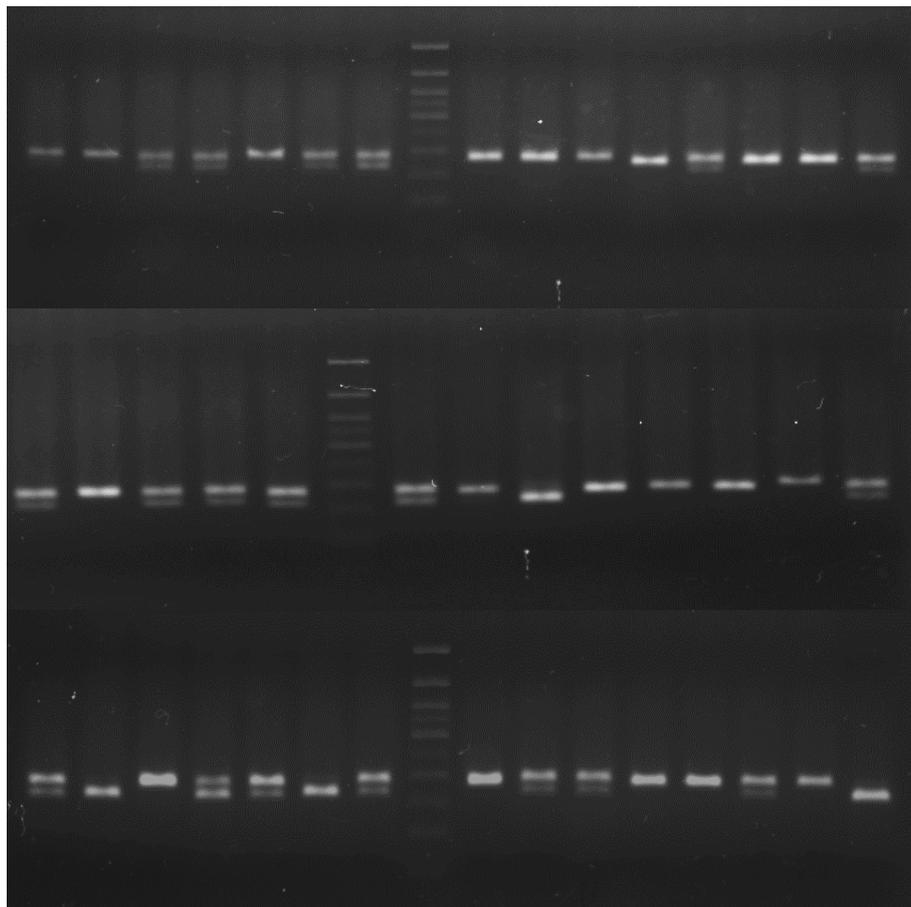


Figura 10. Resultado del ensayo ciego donde se genotipan 42 muestras mediante RFLP acoplada a PCR mutagénica. El último carril es un control positivo (individuo homocigótico AA) de digestión con la restrictasa.

Cuando se examina con detalle los resultados mostrados en la figura 10, se comprueba que en 19 de las 20 muestras heterocigóticas el alelo salvaje da lugar a una banda de electroforesis de mayor intensidad, en ocasiones con diferencias muy notables. De esto se deduce que la amplificación diferencial de alelos no es un proceso aleatorio debido a errores de muestreo por una concentración muy baja de ADNg en los extractos. De alguna manera, que no conseguimos explicar, la presencia de la variante G o A en el SNP estudiado influye en la eficiencia de la amplificación del fragmento de 180 pb, conduciendo a una amplificación preferencial del alelo que contiene la G en dicha posición (variante salvaje). Curiosamente, este sesgo no ocurre con el amplicón de 641 pb utilizado para secuenciar, a juzgar por los resultados observados en los correspondientes electroforegramas. Quizás esto sea debido a su menor contenido en pares G/C (64,4%) comparado con el amplicón obtenido mediante PCR mutagénica (69,4%).

Conclusions

1. We achieved performance the genotyping method for SNP rs1570360 based in mutagenic PCR and digestion with *StuI* restrictase.
2. The proposed protocol can be performed in 6 hours or less, depending of the operator's technical skills.
3. The costs of this technique, including disposable materials and infrastructures, are compatible with a limited resources clinical diagnosis laboratory.
4. Accuracy of the proposed method is 97,6%. In our opinion, this percent should be improved considering the pharmacogenetic interest of the polymorphism studied.
5. Is recommended, in the application of this genotyping method, always include one positive control for the restrictase digestion, as well as repeat the assays for every supposed wild homozygous result which genotype was been deduced from a lower signal.

Bibliografía

- Ferrara, N., Gerber, HP., & LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6): 669-676.
- Flórez, A., De Haro, J., Bleda, S., Varela, C., Esparza, L. & Acin, F. 2013. Analysis of vascular endothelial growth factor gene expression in the tissues of patients with chronic venous insufficiency. *Phlebology*, 28(1): 32-37.
- Holmes, K., Roberts, OL., Thomas, AM. & Cross, MJ. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*, 19(10): 2003-2012.
- Jacobs, EJ., Feigelson, HS., Bain, EB, Brady, KA., Rodríguez, C., Stevens, VL., Patel, AV., Thun, MT & Calle, EE. et al. 2006. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Research*, 8(2): R22.
- Koutras, AK., Antonacopoulou, AG., Eleftheraki, AG., Dimitrakopoulos, FI., Koumarianou, A., Varthalitis, I., Fostira, F., Sgouros, J., Briasoulis, E., Bournakis, E., Bafaloukos, D., Bompolaki, I., Galani, E., Kalogeras, KT., Pectasides, D., Fountzilias, G. & Kalofonos, HP. 2012. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in colorectal cancer patients treated with irinotecan-based chemotherapy and bevacizumab. *The pharmacogenomics journal*, 12(6), 468-475.
- Lambrechts, D., Lenz, HJ., de Haas, S., Carmeliet, P. & Scherer, SJ. (2013). Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *Journal of Clinical Oncology*, 31(9): 1219-1230.
- Olsson, AK., Diemberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. 2006. VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5): 359-371.
- Ramos-Díaz, R., Guitiérrez-Nicolás, F., Nazco-Casariego, GJ., González-Perera, I. & Pérez-Pérez, JA. 2015. Validation of a fast and low-cost alkaline lysis method for gDNA extraction in a pharmacogenetic context. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(5): 1095-1098.
- Rapisarda, A. & Melillo, G. 2012. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Guidance Molecules in Cancer and Tumor Angiogenesis*, 114: 237.
- Rueda, B., González-Gay, MA., López-Nevot, MA., García, A., Fernández-Arquero, M., Balsa, A., Pablos, JL., Pascual-Salcedo, D., Gómez de la Concha, G., González-Escribano, MF. & Martín, J. 2005. Analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) functional variants in rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, 66(8): 864-868.
- Wei, N., Chen, Z., Xue, Z. & Zhu, Y. 2015. Polymorphism of VEGF gene in susceptibility to chronic immune-mediated inflammatory diseases: a meta-analysis. *Rheumatology International*, 35(8): 1351-1360.
- Wu, X., Xin, Z., Zhang, W., Wu, J., Chen, K., Wang, H., Zhu, X., Pan, L., Li, Z., Li, H. & Liu, Y. 2013. Polymorphisms in the VEGFA promoter are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma by altering promoter activity. *International Journal of Cancer*, 133(5): 1085-1093.
- Yang, Y., Zhang, X., Song, D. & Wei, J. 2014. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and bladder cancer risk. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(4): 501-505.
- Zhou, LP., Luan, H., Dong, XN., Jin, GL., Man, DL. & Shang, H. 2011. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Genetic Molecular Research*, 10(4): 3674-3688.